



Editora

DOLLY MONTOYA CASTAÑO, Ph. D.

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

CONSEJO EDITORIAL

GABRIEL OSVALDO GUTKIND, Ph.D

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires, Argentina

GUSTAVO BUITRAGO HURTADO, MSc

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

ÓSCAR CASTELLANOS D., Ph. D.

Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Colombia

ÓSCAR ALZATE, Ph. D.

Department of Neurobiology
Duke University Medical Center, EE.UU.

ENRIQUE GALINDO, Ph. D.

Departamento de Bioingeniería
Universidad Autónoma de México, México

RAFAEL RANGEL ALDAO, Ph. D.

Departamento de Tecnología y Procesos
Biológicos y Bioquímicos
Universidad Simón Bolívar, Venezuela

MARÍA TERESA REGUERO R., MSc

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

JORGE MAYER, Ph. D.

Golden Rice Project – Manager
University of Freiburg, Alemania

Directora Ejecutiva

Jacqueline Ramírez Piraján, MSc
Universidad Nacional de Colombia

Con el apoyo de:



**COLCIENCIAS
COLOMBIA**

Nombre de carátula:

"Cultivos de Coliflor". Segundo Premio del Concurso de fotografía en Micro y Nanociencias, realizado por el SENA, Tecnoparque nodo Medellín.

Descripción de la obra:

crecimiento nódular de un recubrimiento electroless de níquel-boro sobre una superficie de magnesio

Autor:

Esteban Alberto Correa Bedoya

Lugar: Universidad de Antioquia

Correo: estebancorreo@udea.edu.co

Técnica Utilizada:

microscopía electrónica de barrido. Los colores fueron agregados usando Photoshop.

CONSEJO ASESOR

ANDRÉS ILLANES, MSc

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

ALLAN RUSSELL, Ph. D.

McGowan Institute for Regenerative Medicine
Universidad de Pittsburgh, EE.UU.

JORGE OSSA, Ph. D.

Corporación Biogénesis
Universidad de Antioquia, Colombia

ARCADY SINITSYN, Ph. D.

Departamento Cinética Enzimática
Universidad Estatal de Moscú, Rusia

JUAN GENTINA, MSc

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

JOSÉ SÁNCHEZ-SERRANO, Ph. D.

Centro Nacional de Biotecnología
Madrid, España

FABIO A. ARISTÁBAL GUTIERREZ, Ph.D.

Instituto de Biotecnología,
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

JENNY DUSSAN, Ph. D.

Centro de Investigaciones Microbiológicas
Universidad de los Andes, Colombia

Esta publicación ha sido indexada en:

- Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts- Verfahrenstechnische Berichte – CEABA – VtB (Alemania)
- Sistema de Información de publicaciones científicas seriadas en América Latina, El Caribe, España y Portugal (LATINDEX)
- Índice Nacional de publicaciones seriadas, científicas y tecnológicas (PUBLINDEX)
- Red de Revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)
- Índice de revistas latinoamericanas en ciencias PERIÓDICA de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://www.snsn.mx/bidimasp/periodica.html>
- Base de datos bibliográfica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://dgb.unam.mx/periodica.html>
- Informe Académico. International Thomson Editores S.A. de C.V. Thomson Gale
- LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde)
- DIALNET (Universidad de la Rioja- España)
- CAB Abstracts and Global Health (Wallingford, UK)
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España)
- Swets Information Services B.V. (The Netherlands)
- INIST- Centre National de la Recherche Scientifique
- Institut de l'Information Scientifique et Technique (France)

Coordinación Académica



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA**

S E D E B O G O T Á

Público objetivo

Investigadores, estudiantes y profesionales de las disciplinas que se desarrollan en torno a la biotecnología.

Periodicidad:

semestral

La Revista Colombiana de Biotecnología no se responsabiliza por las ideas emitidas por los autores.

Los artículos que aparecen en esta revista pueden ser reproducidos citando la fuente.

**Suscripciones, envío de trabajos, canjes o comentarios:**

Instituto de Biotecnología /Universidad Nacional de Colombia.

Ciudad Universitaria. Edificio Manuel Ancízar.

A.A. 14490 de Bogotá. Tel. [5-71] 316-5450 / 316-5000 (ext. 16981) - Fax: [5-71] 316-5415

Correo electrónico: revcbib_bog@unal.edu.co

CONTENIDO**EDITORIAL***Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia

Dra. Ninfa María Rosas García 5

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Aprendizaje de clases de equivalencia de redes bayesianas basado en búsqueda competitiva de hormigas artificiales

E. Fabián Cardozo, Henry Arguello Fuentes 7

Optimización de un sistema *in vitro* de regeneración para variedades colombianas de arroz indica

Iván Darío Barbosa Cepeda, Alejandro Chaparro Giraldo 19

Detección molecular de potyvirus en hojas y minibulbilllos de ajo, *Allium sativum*, asociados a un programa de producción de semilla limpia

Parra-Fuentes, M., Reyes-Perdomo, C. y Hernández-Fernández, J. 30

Efecto del filtrado crudo de *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA0106), sobre la eclosión de huevos y movilidad de juveniles de *Meloidogyne incognita-javanica*

Nadya Lorena Cardona Bustos, Harold Pavas, Erika Pamela Fernández 37

Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbóticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*)

Lina M. Moreno Conn, Adrián Pérez, Margarita Ramírez, Marcela Franco 45

Diversidad y estructura genética de accesiones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) provenientes de Camerún

Estiben Pacheco, Diana Arias, Zaida Ojeda, Hernán Romero 57

Cultivo por lote de *Wickerhamomyces anomalus* en un biorreactor a escala laboratorio para la producción de una poligalacturonasa

Maria Alicia Martos, Ana Paula Butiuk*, Natalia Lorena Rojas, Roque Alberto Hours 68

Organogénesis y embriogénesis en *Curcuma longa* L. a partir de capas delgadas de células, segmentos y bases de hoja

Zulma Isabel Monsalve Fonnegra, Aura Inés Urrea Trujillo*, Alejandra Canal Morales 74

Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe colombiana en *Vigna unguiculata*

Jonathan Alberto Mendoza Labrador, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago 84

Hallazgo de una nueva secuencia codificadora para una proteína inmunomoduladora de origen fúngico en *Ganoderma australe*

Andrea González Muñoz, Kelly Johana Botero Orozco, Germán Ariel López Gartner 90

Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal

Jorge Vilchez, Nilca Albany 96

Análisis genómico del resistoma de la cepa de *Acinetobacter baumannii* ABIBUN 107m multi-resistente y persistente en hospitales colombianos

Ma. Teresa Reguero, José Ramón Mantilla, Emilia María Valenzuela de Silva, Laurent Falquet, Elsa Beatriz González, Vanessa Flores, Laura Patricia Uribe, Emiliano Barreto-Hernández 104

Efecto de antioxidantes y señalizadores en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* bajo condiciones de invernadero

Areli González Cortés, Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez, María Alejandra Torres Tapia, Víctor Manuel Zamora Villa, Isidro Humberto Almeyda León 114

Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston

Diana Beatriz Sánchez López, Ana María García Hoyos, Felipe Andrés Romero Perdomo, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago 122

Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento Colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

Gloria Barrera, Juliana Gómez, Paola Cuartas, Guillermo León, Laura Villamizar 129



Resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias aisladas de subsuelo en la región El Callao, Venezuela	141
Maura Lina Rojas Pirela, Wilmar Alirio Botello Suárez, María Mercedes Ball Vargas	141
Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín	150
Pamela E. Canales, Elizabeth L. Chávez-Hidalgo, Amparo I. Zavaleta	150
Variación temporal a <i>Micrococcus ulei</i> en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones controladas	158
Armando Sterling Cuéllar, Luz Marina Melgarejo	158
ARTÍCULOS CORTOS	
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Schinus fasciculata</i> (Griseb) J.M. Johnst var. <i>fasciculata</i> (molle)	
Rodrigo Freire; Nélida J. Carnevale; Claudia Alzugaray y Mirian S. Bueno	169
Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de <i>Enterococcus mundtii</i> Tw56	
Marisol Vallejo, Pablo Ledesma, Luciano Anselmino, Emilio Marguet	174
Establecimiento <i>in vitro</i> de dos especies nativas de Costa Rica: <i>Terminalia amazonia</i> (Amarillón) y <i>Vochysia allenii</i> (Botarrama Blanco)	
Hine Gómez, Ana; Rojas Vargas, Alejandra; Daquinta Gradaille, Marcos	180
Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de neem sobre aislamientos de dermatofitos	
Daniel Iván Ospina Salazar, Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez, Myrtha Arango Arteaga, Fernando Orozco Sánchez, Jhon Diego Ríos Salazar	187
Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos en <i>Pterogyne nitens</i> Tull "tipa colorada"	
Maritza Vacca Molina, María Luisa Cristina Bonomo, Zulma Avilés, Lucía Díaz	194
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	206

CONTENTS

EDITORIAL

<i>Bacillus thuringiensis</i> : an application of the science	
Dra. Ninfa María Rosas García	5

RESEARCH ARTICLES

Learning of bayesian networks equivalence classes based on competitive search of artificial ants	
E. Fabián Cardozo, Henry Arguello Fuentes	7
Optimization of an <i>in vitro</i> regeneration system for colombian <i>indica</i> rice varieties	
Iván Darío Barbosa Cepeda, Alejandro Chaparro Giraldo	19
Molecular detection of potyvirus in leaves and small bulbs of garlic, <i>Allium sativum</i> , associated a clean seed production program	
Parra-Fuentes, M., Reyes-Perdomo, C. y Hernández-Fernández, J.	30
Effect of the raw filtrate of <i>Purpureocillium</i> sp. (UdeA0106 strain) on the eclosion of eggs and the motility of <i>Meloidogyne incognita-javanica</i> juveniles	
Nadya Lorena Cardona Bustos, Harold Pavas, Erika Pamela Fernández	37
Effect of storage temperature on the viability of symbiotic nitrogen fixing bacteria used in the preparation of biological inoculants for crop pea (<i>Pisum sativum</i>) and soybean (<i>Glycine max</i>)	
Lina M. Moreno Conn, Adrián Pérez, Margarita Ramírez, Marcela Franco	45
Diversity and genetic structure of oil palm accession (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) from Cameroon	
Estiben Pacheco, Diana Arias, Zaida Ojeda, Hernán Romero	57
Batch culture of <i>Wickerhamomyces anomalus</i> in a lab scale bioreactor for poligalacturonase production	
Maria Alicia Martos, Ana Paula Butiuk, Natalia Lorena Rojas, Roque Alberto Hours	68
<i>Curcuma longa</i> L. embryogenesis and organogenesis from thin cell layers, leaf segments and bases of leaf	
Zulma Isabel Monsalve Fonnegra, Aura Inés Urrea Trujillo, Alejandra Canal Morales	74
Infectivity and effectiveness of isolated rhizobia from colombian caribbean soils in <i>Vigna unguiculata</i>	
Jonathan Alberto Mendoza Labrador, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago	84
Finding of a novel fungal immunomodulatory protein coding sequence in <i>Ganoderma australe</i>	
Andrea González Muñoz, Kelly Johana Botero Orozco, Germán Ariel López Gartner	90



<i>In vitro</i> multiplication of <i>Psidium guajava</i> L. in temporary immersion systems Jorge Vilchez, Nilca Albany	96
Genomic analysis of the resistoma of the strain of <i>Acinetobacter baumannii</i> ABIBUN 107m multi-resistant and persistent in Colombian hospitals Ma. Teresa Reguero, José Ramón Mantilla, Emilia María Valenzuela de Silva, Laurent Falquet, Elsa Beatriz González, Vanessa Flores, Laura Patricia Uribe, Emiliano Barreto-Hernández	104
Effect of antioxidants and singes in potato plants (<i>Solanum tuberosum</i> L.) infected with <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> under greenhouse conditions Arelí González Cortés, Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez, María Alejandra Torres Tapia, Víctor Manuel Zamora Villa, Isidro Humberto Almeyda León	114
Effect of plant growth promoting rhizobacteria phosate solubilizing <i>Lactuca sativa</i> cultivar White Boston Diana Beatriz Sánchez López, Ana María García Hoyos, Felipe Andrés Romero Perdomo, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago	122
Characterization of a Colombian isolate of <i>Erinnyis ello</i> granulovirus (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) Gloria Barrera, Juliana Gómez, Paola Cuartas, Guillermo León, Laura Villamizar	129
Antibiotic- and heavy-metal resistance in bacteria isolated from deep subsurface in El Callao region, Venezuela Maura Lina Rojas Pirela, Wilmar Alirio Botello Suárez, María Mercedes Ball Vargas	141
Characterization of halophilic bacteria producing amylase isolated from San Blas Salters in Junín Pamela E. Canales, Elizabeth L. Chávez-Hidalgo, Amparo I. Zavaleta	150
Temporal variation to <i>Microcyclus ulei</i> in rubber tree clones FX 3864 and FX 4098 under controlled conditions Armando Sterling Cuéllar, Luz Marina Melgarejo	158
SHORT ARTICLES	
<i>In vitro</i> culture of <i>Schinus fasciculata</i> (Griseb) J.M. Johnst var. <i>fasciculata</i> (molle) Rodrigo Freire; Nélida J. Carnevale; Claudia Alzugaray y Mirian S. Bueno	169
Effect of growth conditions and culture medium composition on bacteriocin production by <i>Enterococcus mundtii</i> Tw56 Marisol Vallejo, Pablo Ledesma, Luciano Anselmino, Emilio Marguet	174
<i>In vitro</i> establishment of two species native to Costa Rica: <i>Terminalia amazonia</i> (Amarillón) and <i>Vochysia allenii</i> (Botarrama Blanco) Hine Gómez, Ana; Rojas Vargas, Alejandra; Daquinta Gradaille, Marcos	180
Antifungal activity of neem cellular biomass extracts on dermatophytes isolates Daniel Iván Ospina Salazar, Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez, Myrtha Arango Arteaga, Fernando Orozco Sánchez, Jhon Diego Ríos Salazar	187
Embriogenic calli induction and somatic proembryo formation in <i>Pterogyne nitens</i> Tull Maritza Vacca Molina, María Luisa Cristina Bonomo, Zulma Avilés, Lucía Díaz	194
AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA	208



Bacillus thuringiensis: una aplicación de la ciencia

Bacillus thuringiensis: an application of the science

Dra. Ninfa María Rosas García*

Decía Louis Pasteur “Il n'y a pas des sciences appliquées...mais il y a des applications de la science” que significa “No hay ciencias aplicadas...sino aplicaciones de la ciencia”.

Desde el siglo antepasado el uso de herramientas biológicas para el control de plagas de insectos, empezó a comprenderse como una posibilidad de contrarrestar el efecto nocivo de las plagas en los cultivos, sin embargo fueron necesarios casi dos siglos para que sus ventajas así como su eficiencia y eficacia fueran realmente aprovechadas. Recordando un poco de historia en 1835 Agostino Bassi, científico italiano, descubrió una enfermedad infecciosa en *Bombyx mori*, mejor conocido como el gusano de seda, causada por la muscardina blanca, *Beauveria bassiana*, lo que le valió una inmensa notoriedad. Varias décadas después Pasteur y Koch redescubrieron sus principios y Eli Metchnikoff en 1878 puso en práctica el uso de la muscardina verde, *Metarhizium anisopliae*, contra larvas del escarabajo *Anisoplia austriaca*. Shigetane Ishiwata, científico japonés, descubrió en 1901 unos aislados que enfermaban al gusano de seda, pero no fue sino hasta 1911, que el científico alemán Ernst Berliner, redescubrió el agente causal en *Anagasta kuehniella*, aquel mismo descrito por Ishiwata, y lo nombró *Bacillus thuringiensis* por haberlo encontrado en Thuringia, Alemania. Varias décadas de estudio posteriores sobre esta bacteria hicieron de *B. thuringiensis* el agente entomopatógeno más sobresaliente. Entre sus rasgos más característicos está la formación de esporas y la producción de una proteína cristalina, conocida como δ-endotoxina o cristal parasporal, entre otros nombres que se le han dado y a la cual se ha atribuido la actividad insecticida de esta bacteria. El primer producto a base de *B. thuringiensis* surgió en Francia en 1938 con el nombre comercial de Sporeine y muchos otros surgieron con el tiempo para el control no sólo de lepidópteros sino también de dípteros y coleópteros. Debido a su eficacia y seguridad con el medio ambiente tuvo un auge tan importante que para el año 2000 las ventas a nivel mundial de este insecticida ascendían a 200 millones de dólares y esto sólo representaba el 2% del mercado mundial de los insecticidas.

Las características de *B. thuringiensis* tales como la alta especificidad, inocuidad al hombre, animales y plantas y mínima residualidad le permitieron marcar un parteaguas en los tipos de insecticidas que se aplicaban a los cultivos. Esto permitió visualizar con un mayor enfoque y razonamiento el tipo de insecticida, químico o biológico, más conveniente a aplicar en un cultivo determinado. A la fecha en algunos casos se opta por la aplicación de insecticidas químicas porque se requiere rapidez en el control de la plaga, sin embargo en muchas otras ocasiones se aplican insecticidas a base de *B. thuringiensis* porque lo que se persigue es la obtención de un cultivo libre de residuos químicos, que cumpla con las regulaciones internacionales y que se pueda exportar.

Los insecticidas biológicos basados en *B. thuringiensis* se han adaptado a los tiempos cambiantes y han evolucionado junto con los avances de la ciencia y la tecnología, así han tomado ventaja de la biología molecular, la recombinación genética, la mutagénesis, sólo por mencionar algunas técnicas que han tenido fuertes repercusiones en el mejoramiento de este agente insecticida. Esto ha permitido que en la actualidad existan cepas que producen una mayor cantidad de cristales proteicos, cristales más tóxicos o que han ampliado el espectro de acción, logrando de esta manera atacar no sólo a más lepidópteros,

* Profesora Titular B
Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México
nrosas@ipn.mx



coleópteros y dípteros, sino a himenópteros, ortópteros, nematodos, protozoarios, hongos, y algunos otros organismos cuyo control con esta bacteria fue inimaginable en algún tiempo.

El aprendizaje en el manejo de *B. thuringiensis* ha hecho surgir el interés por transformar a otros microorganismos para que éstos sean capaces de producir las proteínas tóxicas en los ambientes que colonizan y facilitar así el control de plagas. Estos insecticidas constituyen los productos de segunda generación que son aquellos que contienen cepas que han sufrido algún tipo de manipulación genética con la finalidad de incrementar su espectro de actividad.

El futuro aún más promisorio de *B. thuringiensis* estará en manos del conocimiento profundo de este microorganismo, que conduzca al hallazgo de cepas más potentes, al desarrollo de proteínas químéricas, al descubrimiento de nuevos genes, a la ampliación de su espectro de acción y a la resolución de lo que ello implique en el medio ambiente, así como de la superación de los obstáculos entre los que se encuentran el desarrollo de resistencia en ciertos insectos bajo ciertas condiciones, la autorización para el consumo humano de plantas transgénicas que contienen genes de *B. thuringiensis*, así como análisis concienzudos de los efectos que estas mismas plantas transgénicas pueden causar a insectos benéficos, o a otras plagas hacia las cuales sus efectos no están dirigidos. La aplicación del conocimiento podrá determinar su continuidad como un insecticida seguro para el ambiente, la flora, la fauna y el hombre, la alta eficiencia que puede ofrecer en el manejo integrado de plagas y el retraso o la nula generación de resistencia, de tal manera que su aplicación sea amigable con el ecosistema, apoye a la agricultura, de mayores rendimientos y ofrezca productos más sanos para su consumo.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Aprendizaje de clases de equivalencia de redes bayesianas basado en búsqueda competitiva de hormigas artificiales

Learning of bayesian networks equivalence classes based on competitive search of artificial ants

*E. Fabián Cardozo**, *Henry Arguello Fuentes***

Resumen

Este artículo propone un algoritmo de aprendizaje de clases de equivalencia de redes bayesianas basado en un algoritmo de búsqueda Greedy y modelos de búsqueda inspirados en hormigas competitivas. Específicamente para el algoritmo propuesto, se obtuvo una mejor aproximación entre la red predicha y la red bayesiana teórica de ejemplo ASIA, con respecto a algoritmos anteriores, para conjuntos de datos con 20 y 500 muestras. En promedio el algoritmo desarrollado obtuvo una aproximación con respecto a la distancia estructural de hamming de 10.7% y 5.3% menor comparada con la obtenida por los algoritmos Greedy y de colonia de hormigas (ACO-E) respectivamente para 20 muestras, y de hasta el 6.8% menor con respecto al algoritmo ACO-E para 500 muestras. Además, para 500 muestras el número de llamadas a la función de puntaje realizadas por el algoritmo propuesto fue menor que las realizadas por el algoritmo ACO-E en el 90% de las combinaciones, concluyendo que hubo una reducción de la complejidad computacional. Finalmente se presentan los resultados de la aplicación del algoritmo propuesto a un microarreglo obtenido por muestras de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con 6 nuevas interacciones con dependencias estadísticas como potenciales interacciones biológicas con alta probabilidad.

Palabras clave: redes bayesianas, aprendizaje estructural, clases de equivalencia, colonia de hormigas, búsqueda heurística.

Abstract

This article proposes an algorithm for learning equivalence classes of Bayesian networks based on a Greedy search algorithm and search patterns inspired by competitive ants. Specifically, for the proposed algorithm, we obtained a better approximation between the predicted network and the theoretical network ASIA with respect to previous algorithms for data sets with 20 and 500 samples. On average, the algorithm developed an approximation with respect to Structural Hamming Distance of 10.7% and 5.3% lower than Greedy algorithms and ACO-E respectively to 20 samples, and up to 6.8% lower than ACO-E algorithm for 500 samples. Furthermore, for 500 samples the number of calls to the scoring function performed by the algorithm proposed was smaller than in the ACO-E algorithm in 90% of the combinations, concluding that there was a reduction in the computational complexity. Finally, we present the results of applying the proposed algorithm to a microarray samples obtained from patients with acute myeloid leukemia (AML) with 6 new interactions with statistical dependencies as potential biological interactions with high probability.

Key words: Bayesian networks, learning structural equivalence classes, ant colony, heuristic search.

Recibido: mayo 15 de 2013

Aprobado: octubre 1 de 2014

Introducción

El surgimiento de tecnologías para obtener muestras de elementos de una célula a nivel molecular, ha traído consigo interés en inferir conocimiento estructural acerca de sus interacciones (Pe'er, 2005). El enfoque

de biología de sistemas supone que las muestras están relacionadas con una estructura, donde los elementos muestreados no están aislados sino que interactúan para formar una red con propiedades y funciones propias (Pe'er, 2005). Dentro de diferentes modelos matemáticos que interpretan de manera estructural

* MSc. Ingeniería de Sistemas e Informática, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga - Colombia. e-mail: fabiancardozo@gmail.com
** PhD, Profesor Asociado, Universidad Industrial de Santander. e-mail: henarf@uis.edu.co



un fenómeno, las redes bayesianas han sido utilizadas para representar el sistema de interacciones moleculares. En estas aproximaciones se asume que el nivel de expresión de los genes que conforman la red y sus relaciones tiene un grado de incertidumbre, por lo tanto pueden ser representados como variables aleatorias y probabilidades condicionales entre ellas. Dada esta incertidumbre, un estado propio de la red se puede describir por una distribución de probabilidad conjunta de las variables (Jensen, 2007). Así, el análisis e interpretación de las muestras se define como el problema de encontrar una red bayesiana que mejor se ajuste a ellas. Conocida una posible red, es posible hacer aproximaciones de diferentes escenarios de las moléculas (Needham et al., 2009). El proceso de encontrar una red bayesiana consiste en obtener los parámetros de dicha red (Heckerman, 1995), y su estructura. Esto último, sin embargo, es un problema NP-Duro (Chickering, 1996) y se formaliza de la siguiente manera: dado E_B , el conjunto de todas las estructuras posibles de redes bayesianas con n nodos, $Sf(G):EB \rightarrow \square$ la función de puntaje que mide cada estructura $\{G\}$ en E_B ; y M un algoritmo de búsqueda, el objetivo del aprendizaje de redes bayesianas consiste en encontrar la mejor estructura G^* de una red bayesiana tal que:

$$G^* = \max_{G \in E_B} S_f(G) \quad (1)$$

Este enfoque es llamado puntaje búsqueda, donde los algoritmos diseñados tienen en común operadores para moverse dentro del espacio de búsqueda, y su diferencia radica en como se utilizan dichos operadores. Entre ellos se han presentado en la literatura, el algoritmo K2 (Cooper, 1992), algoritmos evolutivos (Wong, 2004), colonias de hormigas (de Campos, 2002), enjambre de partículas (Du et al., 2009), sistemas inmunes artificiales (Castro, 2005) y uno de los más utilizados, el Hill Climbing (Pe'er, 2005). Por otro lado, E_B se puede dividir en clases de equivalencia en las cuales estructuras diferentes dentro de la misma clase pueden describir la misma distribución de probabilidad (Chickering, 2002). La principal ventaja de las clases de equivalencia reside en que se evita el movimiento dentro de una misma clase (Chickering, 2002). Sin embargo, incluso la búsqueda de clases de equivalencias no es trivial, sino que es de orden exponencial (Acid, 2003, Gillispie, 2006). Así, dada la complejidad de hallar clases de equivalencia, diseñar algoritmos más exactos para su inferencia es todavía un problema abierto (Daly, 2011). Entre los trabajos más recientes y con mejor desempeño se destacan extensiones del algoritmo greedy (Zhang, 2013), algoritmos evolutivos (Larrañaga, 2013) y aquellos que utilizan optimización basada en colonia de hormigas. En la última categoría se encuentra el algoritmo llamado ACO-E propuesto (Daly, 2009) y el propuesto en (Pinto et al., 2009) llamado MMACO.

En este artículo se propone un nuevo algoritmo para el aprendizaje de clases de equivalencia de redes ba-

yesianas extendiendo el trabajo previo en la categoría de colonia de hormigas, combinando el enfoque competitivo propuesto en (Pinto et al., 2009) y la extensión del algoritmo greedy usando operadores para moverse entre clases de equivalencia (Chickering, 2002). El enfoque competitivo de hormigas difiere del modo clásico en el sentido que un conjunto de hormigas construye un solo camino o solución en lugar de que cada hormiga construya su propio camino como en (Daly, 2009). De esta forma, se reduce la complejidad computacional y por tanto se obtienen mejores resultados que el algoritmo de búsqueda Greedy clásico (Chickering, 2002) en términos del número de evaluaciones de la función de puntaje S_f y del número de interacciones erróneas en la estructura aproximada. Finalmente, este artículo describe la aplicación del algoritmo propuesto en la inferencia de interacciones de naturaleza estocástica entre moléculas que responden en relación a cambios de la molécula EVI-1 y su aporte al posible descubrimiento de interacciones reales entre ellas. La razón por la cual se escogió este gen, es su asociación a una de las formas más severas de un tipo de patología tumoral denominado Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Wieser. 2007).

Materiales y métodos

Modelado bayesiano para el aprendizaje de redes bayesianas

Una red bayesiana es una forma de representar el conocimiento de relaciones entre elementos a través de un digrafo acíclico y un conjunto de probabilidades condicionales que cuantifican dichas relaciones, de tal forma que codifican una distribución de probabilidad conjunta de los elementos. Como un ejemplo, una red bayesiana puede representar la regulación en la expresión de un gen por otros dos genes como se muestra en la figura 1(a). En este caso, cada gen X_i tiene dos posibles estados: estado 1 si el gen está activo o estado 2 si no lo está. La regulación en la red genética es cuantificada por los parámetros de la red bayesiana. En la figura 1(b) el parámetro θ_{311} denota la probabilidad de que X_3 esté activo cuando X_1 y X_2 están activos. Esto es, cuando ambos genes X_1 y X_2 están expresados pueden actuar sobre el gen X_3 activando su expresión. Las demás relaciones siguen el mismo razonamiento, permitiendo cuantificar las relaciones entre los elementos. Formalmente una Red Bayesiana es una dupla (G, Θ) que representa la distribución de probabilidad conjunta:

$$p(X_1, X_2, \dots, X_n) = \prod_{i=1}^n p(X_i | \Xi_i, G, \Theta) \quad (2)$$

donde $G = (X, A)$ es la estructura de la red representada por un digrafo acíclico tal que sus nodos representan el conjunto de variables aleatorias $X = \{X_1, X_2, \dots, X_n\}$



con $X_i \in \{1, \dots, r_i\}$ y $A \subset X^2$ define el conjunto de arcos dirigidos entre los nodos.

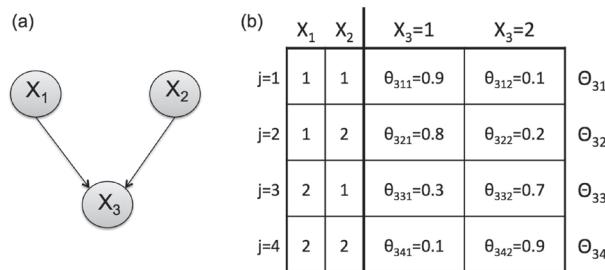


Figura 1. (a) Ejemplo de la estructura de una red bayesiana G de tres variables donde la variable X_3 tiene dos padres. Una relación o arco es el par (X_1, X_3) . (b) Ejemplo de los parámetros para X_3 denotados como Θ_3 . Cada elemento de la tabla representa una probabilidad condicional.

Además $\Xi_i = \{X_k \mid (X_k, X_i) \in A\}$ describe el conjunto de padres de X_i , y Θ es el conjunto de relaciones entre las variables en X definido como:

$$\Theta = \bigcup_{i=1}^n \Theta_i, \Theta_i = \bigcup_{j=1}^{q_i} \{\Theta_{ij}\}, \Theta_{ij} = \bigcup_{k=1}^r \{\theta_{ijk}\} \quad (3)$$

donde θ_{ijk} representa la probabilidad, $p(X_i = v_k \mid \Xi_i = w_j)$, w_j es la $j^{\text{ésima}}$ combinación del conjunto $\Omega = \{(v_1, \dots, v_\beta, \dots, v_{|\Xi_i|}) \mid \forall \beta, X_\beta = v_\beta, X_\beta \in \Xi_i\}$ y $q_i = |\Omega|$. En la figura 1(b), Θ_3 es el conjunto de todos los valores dentro de la tabla, Θ_{3j} es el conjunto de valores de la fila j y θ_{311} es igual a $p(X_3 = 1 \mid \Xi_3 = w_1)$. Entonces, el problema a resolver es inferir la dupla (G, Θ) que se ajuste a un conjunto de datos. Estudios se han realizado para obtener el conjunto Θ cuando la estructura G es conocida (Heckerman, 1995; Jensen, 2007). Sin embargo, obtener la estructura es un problema NP-Duro. Formalmente, el modelado bayesiano para aproximar una estructura G se basa en que, dado un conjunto de datos con $\mathbf{D} = [\mathbf{d}_1, \mathbf{d}_2, \dots, \mathbf{d}_m]$ con \mathbf{d}_h como el estado de las variables en X para un caso \mathbf{h} y dada la hipótesis que dichos datos fueron generados a partir de la distribución de probabilidad conjunta derivada de la red bayesiana con estructura G , la aproximación bayesiana describe cómo se actualiza la probabilidad de que esa red genera dichos datos (Cooper, 1992; Heckerman, 1995; Jensen 2007). Así, la probabilidad de obtener G a partir de \mathbf{D} está dado por:

$$p(G|\mathbf{D}) = (p(\mathbf{D}|G)/p(\mathbf{D})) p/G) \quad (4)$$

donde $p(G)$ es la probabilidad a priori de la estructura hipotética, $p(\mathbf{D})$ es una constante de normalización y $p(\mathbf{D}|G)$ es la probabilidad marginal de \mathbf{D} dada la red con estructura G . Asumiendo que $p(G)$ es uniforme para todas las posibles estructuras, el problema de encontrar la función de puntaje S_f , se reduce a calcular la probabilidad que una red con estructura G pueda generar un conjunto de datos \mathbf{D} , $p(\mathbf{D}|G)$.

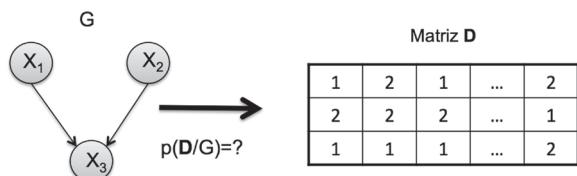


Figura 2. El problema de aprendizaje estructural, para el caso de 3 variables se reduce a encontrar la probabilidad $p(\mathbf{D}|G)$ de que la matriz \mathbf{D} de tres filas sea generada por la red con estructura G .

La figura (2) muestra la matriz \mathbf{D} asociada a la estructura de la figura (1(a)). Cada fila i de \mathbf{D} está asociada a la variable X_i y cada columna h de \mathbf{D} es un caso h en que todas las variables han sido generadas. La pregunta a resolver es, ¿cuál es la probabilidad que los valores en la matriz \mathbf{D} sean generados por la red con estructura G ? Esta probabilidad define la función de puntaje que puede ser obtenida siguiendo el razonamiento realizado en (Cooper, 1992; Heckerman, 1995; Pe'er, 2005) como es descrito en detalle en el apéndice A. En resumen, a partir de las siguientes suposiciones: (1) El muestreo de las variables de X en \mathbf{D} tiene distribución multinomial para cualquier estructura. (2) Cada caso \mathbf{d}_h es independiente de los demás y para cada variable X_i solo se puede tener un conjunto finito de estados. (3) Existe un valor para todas las variables en todos los casos en \mathbf{D} . (4) Los parámetros asociados con cada variable en la estructura son independientes. (5) Los parámetros asociados con cada instancia de los valores de los padres de cada variable son independientes. (6) La función de densidad para los parámetros sigue una distribución de Dirichlet. De esta manera, la ecuación resultante es:

$$S_f(G) = \sum_{i=1}^n S(X_i|\Xi_i) \quad (5)$$

donde $S(X_i|\Xi_i)$ se define como:

$$S(X_i|\Xi_i) = \log \left[\prod_{j=1}^{q_i} \frac{\Gamma(N_{ij})}{\Gamma(N_{ij} + N'_{ij})} \prod_{k=1}^r \frac{\Gamma(N_{ijk} + N'_{ijk})}{\Gamma(N_{ijk})} \right] \quad (6)$$

La ecuación (5) es llamada ecuación bayesiana de Dirichlet (BD), donde $\Gamma(\cdot)$ es la función Gamma, N_{ijk} es el número de veces que la variable X_i tiene el valor v_k y los padres Ξ_i tienen la combinación de estado w_j . El valor de N'_{ijk} tiene el mismo significado de N_{ijk} pero con la diferencia que es un valor asumido antes de tener el conjunto de muestras \mathbf{D} . Este parámetro N'_{ijk} se ajusta a $N'_{ijk} = \eta \cdot 1/r_i q_i$ asumiendo que dos estructuras equivalentes pueden tener el mismo puntaje y que en η posibles muestras iniciales la probabilidad de que $X_i = w_k$ es $1/r_i$ y que $\Xi_i = v_j$ es $1/q_i$ en cada muestra (Daly, 2009).

Clases de equivalencia de redes bayesianas

Formalmente, como es probado en (Chickering, 2002; Jensen, 2007), se dice que dos variables $X_\alpha, X_\beta \in X$ de una red bayesiana están direccionalmente separadas si existe una variable intermedia X_γ (diferente de X_α y X_β) y se cumple una de las siguientes condiciones:



(1) existe una configuración de la forma $X_\alpha \rightarrow X_\gamma \rightarrow X_\beta$ o de la forma $X_\alpha \leftarrow X_\gamma \leftarrow X_\beta$ y se conoce el estado de la variable X_γ , (2) existe una configuración de la forma $X_\alpha \leftarrow X_\gamma \rightarrow X_\beta$ y se conoce el estado de la variable X_γ o (3) existe una configuración de la forma $X_\alpha \rightarrow X_\gamma \leftarrow X_\beta$ y no se conoce el estado de la variable X_γ . Si X_α está d-separada de X_β dado el conocimiento del estado de la variable X_γ se dice que X_α y X_β son condicionalmente independientes dado X_γ y se denota $(X_\alpha \perp X_\beta | X_\gamma)$. De tal forma X_α, X_β y X_γ , satisfacen la siguiente relación,

$$p(X_\alpha | X_\gamma, X_\beta) = p(X_\alpha | X_\gamma) \quad (7)$$

Dados estos conceptos, dos estructuras G y G' son equivalentes si y sólo si, para toda red bayesiana $B = (G, \Theta)$ existe una red Bayesiana $B' = (G', \Theta')$ tal que B y B' describen el mismo conjunto de independencias y tienen la misma distribución de probabilidad (Chickering 2002, Jensen 2007). De forma similar, dos estructuras G y G' son equivalentes si y sólo si tienen el mismo esqueleto y las mismas estructuras-v (Chickering, 2002).

Representación de Clases de Equivalencia

Dado el espacio no vacío E_B de estructuras de redes bayesianas, la relación entre redes equivalentes en dicho espacio, denotada como \sim , cumple las propiedades de reflexividad, simetría y transitividad, formando todas ellas una clase de equivalencia. Así, para representar de una sola forma, una clase de equivalencia, se define a un digrafo acíclico parcial P con aristas dirigidas y no dirigidas, que describa todos los grafos de dicha clase, así:

$$[P] = \{G \in E_B \mid G \sim P\} \quad (8)$$

Si la arista $X_\alpha \rightarrow X_\beta$ está presente en todo $G \in [P]$, se dice que $X_\alpha \rightarrow X_\beta$ es forzada y si una arista $X_\alpha \rightarrow X_\beta$ no es forzada, se dice que es reversible. Un digrafo acíclico parcial completo P^c es aquel en el que toda arista forzada es una arista dirigida, y toda arista reversible es una arista no dirigida. Dado entonces un espacio de estructuras de redes bayesianas E_B , existe un único digrafo acíclico parcial completo por cada clase de equivalencia en dicho espacio.

Movimientos entre clases de equivalencia

El conjunto de todas las clases de equivalencia de redes bayesianas de cierto número de nodos es denominado E_E , donde existen un conjunto de operadores para hacer posible el movimiento entre dichas clases o estados en un solo paso por medio de la transformación de un digrafo acíclico parcial completo a otro. Este documento utiliza un conjunto de seis operadores con una prueba de validación para cada uno, con la ventaja de que se puede calcular el puntaje del nuevo grafo generado solo con el puntaje local $s(X_i | \Xi_i)$ de acuerdo a la tabla 1 y la ecuación (6). Los teoremas y

pruebas concernientes a la validación de los operadores se encuentran detallados en (Chickering 2002) y tienen en cuenta que: (1) Ξ_α es el conjunto de Padres de X_α , es decir, el conjunto de nodos que tienen arcos dirigidos hacia X_α . (2) Ψ_α es el conjunto de vecindad de X_α , es decir, el conjunto de nodos que tienen arcos no dirigidos hacia X_α . (3) $\Psi_{\alpha\beta}$ es la intersección entre Ψ_α y Ψ_β . (4) $\Omega_{\alpha\beta}$ es el conjunto de padres de X_α que son vecinos de X_β . Además, dentro de la función local de puntaje en la última columna, se utiliza la notación $\Psi_{\alpha\beta}^{\beta}$ y $\Psi_{\alpha\beta}^{\alpha}$, que define el conjunto $\Psi_\alpha \cup \{X_\beta\}$ y $\Psi_\alpha \setminus \{X_\beta\}$ correspondientemente. Finalmente, teniendo un operador y dado un digrafo acíclico parcial P , un movimiento / es una instancia de un operador aplicado a un conjunto de nodos de P . M es el conjunto de todos los movimientos / válidos a partir de P . Dichos operadores hacen más eficientes los algoritmos moviéndose entre subconjuntos dentro de E_B . Cada operador tiene como entrada dos o tres nodos de un grafo acíclico parcial completo y produce un grafo acíclico parcial de acuerdo a la operación.

Colonia de hormigas en el aprendizaje

El método de optimización basado en colonia de hormigas es un algoritmo heurístico multiagente propuesto por Marco Dorigo (2005). Estos algoritmos son inspirados en el comportamiento colaborativo de las hormigas para encontrar la ruta más corta desde su nicho hasta la comida, y son utilizados con el fin de resolver problemas combinatorios de búsqueda y optimización con alta complejidad (o llamados NP-Duros).

Representación del problema

El primer elemento del problema de aprendizaje es el conjunto de componentes $C = \{c_1, c_2, \dots, c_n\}$ que se pueden combinar para obtener una solución. En este problema corresponde al conjunto de movimientos / que pueden ser realizados en un estado representado por el digrafo acíclico parcial P . Un camino (o solución) s es una secuencia de movimientos $\langle I_1, \dots, I_m \rangle$ de tal forma que si se aplica cada uno de ellos (en el exacto orden) en un digrafo acíclico parcial P , dará como resultado un digrafo acíclico parcial completo que representa el estado actual. Un conjunto de m hormigas son los agentes que construyen una solución. Así, cada hormiga compite para incluir un nuevo movimiento al camino, hasta que todas construyen una solución S . Existe una feromona τ_i asociada a cada movimiento $I_i \in C$ en una solución S . El comportamiento de cada τ_i es representado por un modelo que define su incremento de acuerdo a si el mejor camino S contiene el movimiento I_i y disminuye exponencialmente de acuerdo a un factor ρ de evaporación. Esta actualización se aplica tanto para la mejor solución de una iteración, como al mejor camino de todas las iteraciones. En el algoritmo todas las hormigas construyen una única solución o camino escogiendo cada una, un sólo movimiento, y



Tabla 1. Conjunto de operadores que permiten pasar de una clase de equivalencia a otra (Chickering 2002).

Operador	Efecto	Prueba de Validación	Cambio en el Puntaje
$X_\alpha - X_\beta$	Añadir un arco no dirigido entre X_α y X_β .	(1) Todo camino no dirigido de X_α a X_β contiene un nodo en $\Psi_{\alpha,\beta}$. (2) $\Xi_\alpha = \Xi_\beta$.	$s(X_\beta \Psi_{\alpha,\beta}^{\alpha} \cup \Xi_\beta) - s(X_\beta \Psi_{\alpha,\beta}^{\alpha} \cup \Xi_\beta)$
$X_\alpha + X_\beta$	Eliminar un arco no dirigido entre X_α y X_β .	$\Psi_{\alpha,\beta}$ es un clique.	$s(X_\beta \Psi_{\alpha,\beta} \cup \Xi_\beta) - s(X_\beta \Psi_{\alpha,\beta}^{\alpha} \cup \Xi_\beta)$
$X_\alpha \rightarrow X_\beta$	Añadir un arco dirigido entre X_α y X_β .	(1) Todo camino semi-dirigido de X_α a X_β contiene un nodo en $\Omega_{\alpha,\beta}$. (2) $\Omega_{\alpha,\beta}$ es un clique. (3) $\Xi_\alpha = \Xi_\beta$.	$s(X_\beta \Omega_{\alpha,\beta} \cup \Xi_\beta^{\alpha}) - s(X_\beta \Omega_{\alpha,\beta} \cup \Xi_\beta)$
$X_\alpha \not\rightarrow X_\beta$	Eliminar un arco dirigido entre X_α y X_β .	Ψ_β es un clique.	$s(X_\beta \Psi_\beta \cup \Xi_\beta^{\alpha}) - s(X_\beta \Psi_\beta \cup \Xi_\beta)$
$X_\alpha \leftarrow X_\beta$	Invertir el arco dirigido de X_α a X_β .	(1) Todo camino semi-dirigido de X_α a X_β que no incluya el arco $X_\alpha \rightarrow X_\beta$ contiene un nodo en $\Omega_{\alpha,\beta} \cup \Psi_\beta$. (2) $\Omega_{\alpha,\beta}$ es un clique.	$s(X_\beta \Xi_\beta^{-\alpha}) + s(X_\alpha \Xi_\alpha^{\beta} \cup \Omega_{\beta,\alpha})$ $-s(X_\beta \Xi_\beta) - s(X_\alpha \Xi_\alpha \cup \Omega_{\beta,\alpha})$
$X_\alpha \rightarrow X_\gamma$ $X_\gamma \leftarrow X_\beta$	Convertir en un arco dirigido los arcos no dirigidos de X_α , X_β y X_γ .	Todo camino semi-dirigido entre X_α y X_β contiene un nodo en $\Psi_{\alpha,\beta}$.	$s(X_\gamma \Xi_\gamma^{\beta} \cup \Psi_{\alpha,\beta}^{-\gamma+\alpha}) + s(X_\beta \Xi_\beta \cup \Psi_{\alpha,\beta}^{-\gamma})$ $-s(X_\gamma \Xi_\gamma \cup \Psi_{\alpha,\beta}^{-\gamma+\alpha}) - s(X_\beta \Xi_\beta \cup \Psi_{\alpha,\beta})$

aplicando solo aquel que produzca un mejor puntaje S_f hasta que no haya posibilidad de un mejor movimiento para cualquier hormiga.

Modelo de la Feromona

El modelo dinámico de la actualización de la feromona se describe de la siguiente manera:

1. Se inicializa la feromona τ_i asociada a todos los movimientos posibles desde un digrafo vacío de la siguiente manera:

$$\tau_i = \frac{1}{|S_f(\hat{P})|}, i \in \hat{S} \quad (9)$$

donde S_f está dada por la ecuación (5).

2. Se actualiza la feromona asociada a todos los movimientos que se han realizado utilizando una función de evaporación, $\tau_i = (1 - \rho)\tau_i$.
3. En cada iteración k , después de que todas las hormigas han construido el mejor camino s , cada feromona τ_i es incrementada si el movimiento se encuentra en el digrafo P^k que representa el camino. Así,

$$\tau_i = (1 - \rho)\tau_i + \frac{\rho}{|S_f(P^k)|}, i \in S \quad (10)$$

4. Además se actualiza la feromona de aquellos elementos que se relacionan con los movimientos del mejor camino de todas las iteraciones, así:

$$\tau_i = (1 - \rho)\tau_i + \frac{\rho}{|S_f(\hat{P})|}, i \in \hat{S} \quad (11)$$

Información Heurística

La información heurística η_i define el puntaje para un movimiento i . Dado que un movimiento consiste en la transformación de un digrafo acíclico parcial en otro, ese cambio trae consigo un cambio en el puntaje de todo el digrafo. Sin embargo, puede ser simplificado como el cambio en la función local de puntaje $s(X_i|\Xi_i)$ definida en la ecuación (6) para cada operador como se muestra en la tabla 1.

Regla de Probabilidad

Cuando cualquier hormiga compite por escoger el mejor movimiento a partir del grafo parcial P , cada una utiliza una regla de transición pseudoaleatoria (Dorigo, 2005) que permite hacer un balance entre exploración y explotación para obtener el posible siguiente movimiento. Formalmente el siguiente movimiento i para una hormiga está dado por,

$$i = \begin{cases} \underset{i \in M}{\operatorname{argmax}} \tau_i^\alpha \eta_i^\beta, & q \leq q_0 \\ \sim p(i), & q > q_0 \end{cases} \quad (12)$$

donde $p(i) = \tau_i^\alpha \eta_i^\beta \prod_{\mu \in M} \tau_\mu^\alpha \eta_\mu^\beta$. Los parámetros α y β en el rango $[0,5]$ (Daly, 2009), son la potencia asignada a la feromona y a la información heurística respectivamente, q_0 es un número aleatorio con distribución unifor-



Tabla 2. Notación utilizada para cada una de las variables, grafos y parámetros dentro del algoritmo.

O	Conjunto de todos los operadores descritos en la Tabla 1.	M	Conjunto de todos los posibles movimientos a partir de un digrafo acíclico parcial.
t_{máx}	Número máximo de iteraciones.	m	Número de hormigas.
ŷ	Mejor digrafo acíclico parcial de todas las iteraciones	p	Tasa de evaporación de la feromona.
ŷ	Mejor solución de las hormigas de todas las iteraciones.	P	Digrafo acíclico parcial construido por todas las hormigas en una iteración.
q₀	Valor entre [0,1] que hace un balance entre la explotación y la exploración al escoger un nuevo movimiento por una hormiga.	β	Influencia que tiene la información heurística en la regla de probabilidad
s	Camino construido por todas las hormigas en una iteración.	n	Número de nodos de la red que se desea inferir.

me en el intervalo [0,1] y es el conjunto de todos los posibles movimientos para el grafo parcial .

Descripción del Algoritmo

El algoritmo propuesto, mostrado en la tabla 3, está principalmente basado en el procedimiento para el aprendizaje de estructuras de redes bayesianas donde todas las hormigas colaborativamente construyen un camino por cada iteración a partir de una estructura vacía (Pinto et al., 2009). Además, el aprendizaje se hace en el espacio de clases de equivalencia utilizando una representación en la cual cada solución conduce a un digrafo acíclico parcial (Daly, 2009). La notación del algoritmo es presentada en la tabla 2.

Tabla 3. Algoritmo ACO-CE: Algoritmo principal de hormigas competitivas para el aprendizaje de clases de equivalencia de redes bayesianas.

Entrada: $D, O, t_{\max}, m, p, q_0, \alpha, \beta, n$
Salida: \hat{P}, s
M = $o(P); \forall o \in O; \tau_i = 1/ S_i(P) , \forall i \in M$
Para $t = 1$ hasta t_{\max} hacer
$P = \text{grafo_vacío}, s = \langle \rangle$
$(P, s) = \text{ANTS}(P, s, O, q_0, \alpha, \beta)$
Si $S_i(P) > S_i(\hat{P})$ entonces , $P = P, \hat{P} = s = s$ Fin si
$\tau_i = (1 - p)\tau_i + p/ S_i(P) , i \in s$
$\tau_i = (1 - p)\tau_i + p/ S_i(\hat{P}) , i \in \hat{P}$
Fin Para

Como describe la tabla 3, por cada iteración las hormigas construyen un camino, se escoge el mejor camino de todas las iteraciones y se actualiza el valor de la feromona asociada a cada movimiento. La construcción de una solución por el conjunto de hormigas es descrito en la función ANTS, en la tabla 4. A partir de

Tabla 4. Algoritmo ANTS: Algoritmo que describe la competencia de las hormigas para generar un digrafo acíclico parcial en una iteración del algoritmo principal.

Entrada: $P, s, O, q_0, \alpha, \beta$
Salida: P, s
Mientras $switch = 0$ hacer
$switch = 1$
Para $k = 1$ hasta m hacer
$M = o(P); \forall o \in O$
Si $ M = 0 \vee \max_{i \in M} \tau_i^\alpha \eta_i^\beta \leq 0$ entonces Devolver (P, s) Fin si
$q \sim U[0, 1]$,
$I = \begin{cases} \arg \max_{i \in M} \tau_i^\alpha \eta_i^\beta, & q \leq q_0 \\ \sim p(I), & q > q_0 \end{cases}$
$p(I) = \tau_I^\alpha \eta_I^\beta / \sum_{i \in M} \tau_i^\alpha \eta_i^\beta, P_k = \text{Aplicar } I \text{ a } P,$
$s = \langle s, I \rangle, S_k(P_k) = S_k(P) + \eta_I$
Fin para
$r \sim U[1, \dots, m], S_b = S_r(P)$
Si $S_b > S_r(P)$ entonces $P = P_r, s = s_r$ sino $witch = 0$ Fin si
Fin mientras

un digrafo acíclico parcial P vacío, las hormigas construyen el camino de tal forma que cada una haya todos los posibles movimientos a partir del actual P y escoge uno de los movimientos de manera pseudoaleatoria de acuerdo a la regla de probabilidad dada en la ecuación (12). Al final, se aplica dicho movimiento a P obteniendo un nuevo digrafo P_k para la hormiga k . Cuando todas las hormigas han escogido un posible siguiente movimiento, se escoge la solución s_r , donde $r \sim U[1, \dots, m]$. Si hubo al menos una hormiga que realizó un mejor movimiento, es decir, si $S_r(P_r) > S_r(P)$, las hormigas vuelven a competir por el siguiente movimiento. De otro modo, se retorna a la solución P , se actualiza el mejor camino de todas las iteraciones y se actualiza el valor de la feromona de acuerdo a las ecuaciones (10) y (11).



Aproximación de una red de regulación genética

El algoritmo propuesto puede ser utilizado para mejorar el entendimiento de redes de regulación genética a partir de microarreglos de ADN. Un microarreglo de ADN es un chip que contiene información relativa al nivel de expresión de un conjunto de genes en una célula cuando ésta última es estimulada. Este valor se obtiene al comparar el nivel de expresión genética de una célula de referencia con la información genética de una célula blanco (Wang, 2011). Por ejemplo, una célula de referencia puede ser una célula sana, y la célula blanco una anormal (Meloni, 2004). Matemáticamente, se puede expresar la relación entre la expresión del gen i en la célula blanco B_i con respecto a su expresión en la célula de referencia R_i como $T_i = \log_2(\frac{B_i}{R_i})$. Cuando $T_i > 1$ se dice que el gen i está activado en la célula blanco, y si $T_i < 1$ se dice que el gen i en la célula blanco está inhibida. De esa forma la discretización mas simple, esto es, de tres estados (inhibido, neutro, activado) es sencilla de hacer (Quackenbush 2002). Generalizando, si el número de células blanco es igual a m , para las cuales se desea obtener la información del nivel de expresión de n genes, el conjunto de datos final es una matriz \mathbf{D} de $n \times m$ donde d_{ij} representa el radio T_i para la célula blanco j , donde $i = 1, \dots, n$ y $j = 1, \dots, m$. A partir de esta matriz es posible obtener una aproximación de una red bayesiana que represente la red de regulación genética deseada, dependiendo de que genes se escojan.

Características del microarreglo utilizado

Como ejemplo, se seleccionó el microarreglo con número de acceso GSE6891 de la base de datos Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Este microarreglo contiene datos de expresión genética de grupos de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con el objetivo de estudiar su aplicabilidad en la predicción de subclases asociadas a una anormalidad específica en la LMA (Verhaak, 2009). Dentro de sus resultados se encontró que dentro de una de aquellas subclases, uno de los genes más discriminantes para detectar anomalías de dicha clase fue el gen EVI-1 (o también llamado MECOM). Estas características hacen de este conjunto de datos propicio y viable para ser utilizado en el aprendizaje de la red. Específicamente el conjunto de datos cuenta con información de 461 muestras tomadas de la sangre o de la médula ósea. Para ilustrar el uso del algoritmo de hormigas propuesto en la sección anterior, de este microarreglo se obtuvieron solamente las filas de genes relevantes los cuales tuvieron cambios de 6 veces o más en su valor cuando EVI-1 cambió su valor. De esta forma se obtiene un conjunto de genes relevantes en diferentes casos con respecto a EVI-1. Este es el conjunto de datos \mathbf{D} utilizado por el algoritmo para aproximar la red de interacciones.

Obtención de una Red Semilla

Antes de realizar el proceso de aprendizaje es posible extraer conocimiento previo de interacciones moleculares. Esta información es almacenada en bases de datos. Se escogió la base de datos Biogrid (<http://thebiogrid.org/>) por ser la base de datos de acceso libre más completa, en la que se encontraban más interacciones, y en la que se mantenía el formato de los nombres de las moléculas como en los microarreglos. Para extraer una red inicial a partir de dicha información, se utilizó el algoritmo basado en el método descrito en (Djebari 2008) puesto que minimiza la redundancia en los datos. El algoritmo es el siguiente: (1) Se obtiene la red inicial de la biomolécula en estudio (EVI-1/MECOM), (2) de cada uno de los elementos de la red anterior se obtiene su propia red (ya que las interacciones de EVI-1 son muy pocas), (3) se unen las redes filtrando las interacciones repetidas, (4) se filtran las interacciones de acuerdo a los genes listados en el microarreglo y se forma una red unidireccional. (5) Finalmente se aplica el algoritmo en (Djebari 2008) basado en la técnica depth-first para convertir la red anterior en una grafo acíclico no dirigido. Teniendo entonces el conjunto de datos con los genes relevantes, entonces de la red inicial son utilizados aquellas interacciones cuyos genes se encuentran en el microarreglo.

Resultados y discusión

Evaluación del Algoritmo de Aprendizaje

La metodología de evaluación del aprendizaje que se utilizó se basó en la descrita en (Daly, 2009), donde: (1) Se selecciona la red ASIA (figura 3(a)) como red teórica o estándar (<http://compbio.cs.huji.ac.il/Repository/>) para comparar los algoritmos Greedy (Chickering, 2002), ACO-E (Daly 2009) y el nuevo algoritmo propuesto. (2) Se selecciona un conjunto de valores para los parámetros del algoritmo propuesto, manteniendo el número de hormigas m igual a 15. Los conjuntos de valores son $\rho = [0.05 \ 0.1 \ 0.3 \ 0.5]$, $q_0 = [0.3 \ 0.5 \ 0.7]$, $\alpha = [2 \ 3 \ 4 \ 5]$ y $\beta = [1 \ 1.5 \ 2]$. (3) Para el algoritmo ACO-E se mantuvieron los parámetros obtenidos en (Daly 2009), es decir, $\rho = 0.3$, $q_0 = 0.7$, $\alpha = 1$ y $\beta = 2.5$. (4) Para cada una de las combinaciones de los valores de los parámetros se hicieron las simulaciones respectivas para los tres algoritmos utilizando 20 conjuntos de datos con 20, y 500 muestras generadas a partir de la red bayesiana ASIA. El rendimiento y la red o estructura obtenida por cada uno de los algoritmos se evaluaron utilizando las siguientes métricas: (a) la función de Puntaje (S_i) para evaluar la cercanía de la red construida y los datos según la ecuación (5) y (6). Valores altos indican alta probabilidad de que los datos hayan sido generados por el grafo obtenido. (b) Distancia Estructural de Hamming (SHD): Es la diferencia entre los arcos añadidos, omitidos e invertidos (en dirección) entre la estructura generada por el algoritmo y la



estructura de la cual se generaron los datos iniciales. Una distancia menor significa entonces, que el digrafo aproximado es mas cercano al teórico. (c) Número de evaluaciones o llamadas estadísticas (NSC) que mide la complejidad computacional del algoritmo al calcular el número de llamadas que hace el algoritmo a la función objetivo. (5) Para la función de puntaje se escogió el tamaño de muestreo equivalente $\eta = 4$ utilizado en (Daly, 2009). En la figura 3(b)-(d) se muestra el resultado del protocolo descrito anteriormente para la red ASIA, para una simulación utilizando 500 muestras. La primera red, es la red teórica de la cual se obtienen los datos, las demás son las redes aproximadas por los algoritmos GES, ACO-E y el algoritmo propuesto, respectivamente. El número total de combinaciones para los valores de los parámetros del algoritmo fue 144. Como se muestra en la tabla 5 estas combinaciones se clasificaron de acuerdo a los valores obtenidos en las métricas S_f , SHD y NSC para los tres algoritmos probados. De acuerdo a la segunda fila de la tabla 5, sin importar el número de muestras y la combinación de parámetros, el nuevo algoritmo propuesto tiene una mayor probabilidad de generar los datos que el algoritmo Greedy.

Para el criterio utilizado con respecto a SHD, se presentaron 21 combinaciones de los parámetros para los cuales el algoritmo propuesto tuvo menor valor con respecto a los otros dos algoritmos, es decir es mas eficiente al obtener un grafo mas cercano al teórico. En promedio, se obtuvo un 2,6 % y 4,8 % menor valor que para los algoritmos Greedy y ACO-E respectivamente (figura 4(a-b)). De acuerdo a la suma cuadrática de las diferencias en los valores del SHD de estas 21 combinaciones, la mayor diferencia fue para la combinación $\rho = 0,1$, $q_0 = 0,3$, $\alpha = 5$ y $\beta = 1$.

Tabla 5. Clasificación de los resultados al protocolo descrito. En la tercera y cuarta columna se muestran el número de combinaciones, de las 144 en total, que cumplieron con el criterio de las métricas mencionadas para 20 y 500 muestras de datos iniciales.

	Criterio Clasificación	20 Muestras	500 Muestras
1	$S_f_{Propuesta} > S_f_{ACO-E}$	1	4
2	$S_f_{Propuesta} > S_f_{GES}$	144	144
3	$SHD_{Propuesta} < SHD_{ACO-E}$ y $SHD_{Propuesta} < SHD_{GES}$	21	41
4	$SHD_{Propuesta} < SHD_{GES}$	24	66
5	$S_f_{Propuesta} > S_f_{ACO-E}$ y $SHD_{Propuesta} < SHD_{ACO-E}$	0	2
6	$NCS_{ACO-E} > NCS_{Propuesta}$	0	129

Como es descrito en la figura 4(c), la diferencia de combinaciones erróneas del grafo final del algoritmo propuesto con respecto al algoritmo ACO-E fue de 10,7% menor y con el algoritmo Greedy del 5,3 % menor. Los resultados anteriores muestran que el algoritmo propuesto puede obtener estructuras con menos interacciones erróneas que los algoritmos ACO-E y Greedy para redes pequeñas, usando 20 muestras. Para 500 muestras, según la primera fila de la tabla 5, de las 144 combinaciones de los parámetros, en cuatro de ellos el algoritmo propuesto obtuvo mayor valor en S_f con respecto al algoritmo ACO-E. De estas cuatro, aquella combinación con mayor diferencia en la métrica SHD, $\rho = 0,5$, $q_0 = 0,7$, $\alpha = 5$ y $\beta = 1$, obtuvo un valor del 10,4 % y 4 % de menos combinaciones erró-

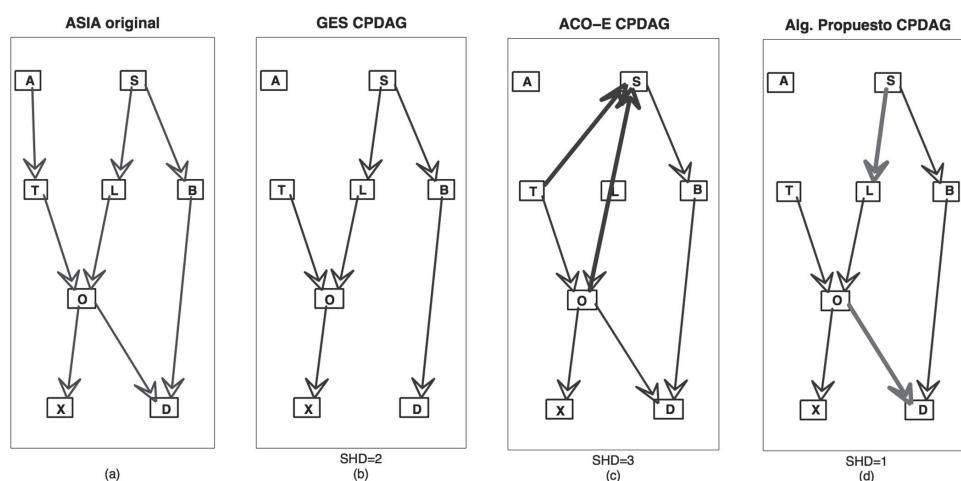


Figura 3. Ejemplo predicción de la estructura de la red bayesiana ASIA. (a) Red original, (b) Red aproximada por el algoritmo GES, (c) ACO-E y (d) el algoritmo propuesto en este artículo con 500 muestras. Los arcos rojos en el grafo aproximado por ACO-E son arcos que no corresponden al grafo original, y los arcos en verde son arcos aproximados por el algoritmo propuesto.

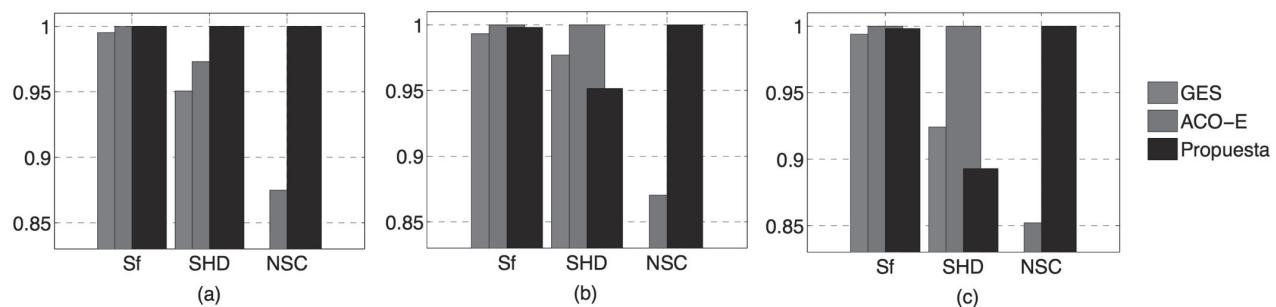


Figura 4. Resultados obtenidos en las métricas S_f , SHD y NSC en el protocolo descrito para los tres algoritmos probados utilizando datos con 20 muestras. Un S_f mayor, un SHD menor y un NSC mayor implican mejor desempeño. (a) Resultados para la combinación $\rho = 0,1$, $q_0 = 0,7$, $\alpha = 3$ y $\beta = 1$ referido en la fila 1 de la tabla 5. (b) Resultados promedio para las combinaciones referidas en la fila 3 de la tabla 5. (c) Resultados para la mejor combinación $\rho = 0,1$, $q_0 = 0,3$, $\alpha = 5$ y $\beta = 1$ de las referidas en la fila 3 de la tabla 5. Los valores están normalizados.

neas en el grafo final con respecto al algoritmo GES y ACO-E respectivamente, (figura 5(a)). En la tercera fila de la tabla 5, de las 144 combinaciones se obtuvieron 41 para las cuales el valor de SHD del algoritmo propuesto fue menor que los otros dos. Específicamente, en promedio el valor fue de un 5% y 9% menor con respecto al algoritmo ACO-E y Greedy respectivamente como se muestra en la figura 5(b). Según la quinta fila de la tabla 5, en dos de ellas se obtuvo un mayor valor para la función de puntaje. Una de ellas es la mostrada en la figura 5(a), y la otra es la combinación $\rho = 0,5$, $q_0 = 0,3$, $\alpha = 5$ y $\beta = 1$, la cual obtuvo un valor del SHD 3% menor para el algoritmo propuesto con respecto a los otros dos algoritmos. La última fila de la tabla 5 hace referencia a la medida de complejidad del algoritmo NSC. El número de llamadas a la función de puntaje por el algoritmo propuesto fue menor que en el algoritmo ACO-E en el 90% de las combinaciones utilizando 500 muestras.

En promedio esta diferencia fue del 6,8%, denotando que la complejidad del nuevo algoritmo es menor. Adi-

cionalmente, para las combinaciones referidas en la fila 3 de la tabla 5, mostradas en la figura 5(b), en promedio el algoritmo propuesto obtuvo una disminución del 4,6 % en la métrica SHD con respecto al algoritmo ACO-E. Y por último en promedio para la combinación mostrada en la figura 5(c), referida en la fila cinco de la tabla 5 obtuvo un valor del NSC del 5,8 % menor que el algoritmo ACO-E. Todo lo anterior indica que el algoritmo propuesto, para la mayoría de combinaciones, usando 500 muestras de redes pequeñas tiene un orden de complejidad menor que el algoritmo ACO-E. Además, para las combinaciones referidas en la fila 5 de la tabla 5 y mostradas en la figura 5, tienen la posibilidad de obtener estructuras con menos interacciones erróneas (falsos positivos) que los algoritmos ACO-E y Greedy, y a su vez con mayor o muy semejante probabilidad como indica la función de puntaje.

Aproximación de la red de regulación genética

Dado que es posible que haya información espuria en varios casos en la tabla de datos, que produzcan

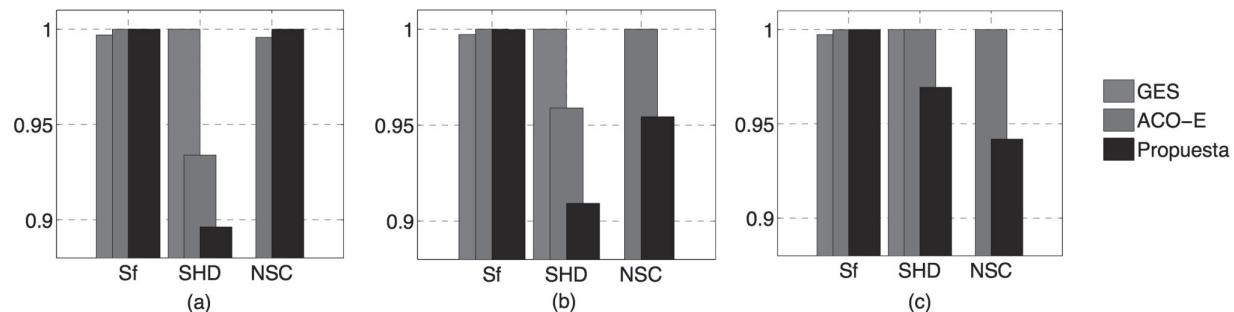


Figura 5. Resultados obtenidos en las métricas S_f , SHD y NSC en el protocolo descrito para los tres algoritmos probados utilizando datos con 500 muestras. Los valores están normalizados. (a) Resultados para la mejor combinación $\rho = 0,5$, $q_0 = 0,7$, $\alpha = 3$ y $\beta = 1$. (b) Resultados promedio para las combinaciones referidas en la fila 3 de la tabla 5. (c) Resultados para la combinación $\rho = 0,5$, $q_0 = 0,3$, $\alpha = 3$ y $\beta = 1$.



posibles falsos positivos, se infirieron un conjunto de M estructuras y se seleccionaron las interacciones en común de todas ellas. Para cada estructura G_i obtenida se obtiene su función de puntaje o probabilidad de aproximar la información en los datos $S_i(G_i)$ y a partir de ellas se obtiene un medidor de confianza por el promedio de las probabilidades, $\text{conf}(G) = \sum_{i=1}^M S_i(G_i)$. El resultado es entonces un grafo G con las interacciones en común mencionadas, con un valor de confianza $\text{conf}(G)$ (Pe'er, 2005). Para los datos del microarreglo con los genes relevantes filtrados, el resultante modelo G inferido por el algoritmo propuesto, con un número de 20 arcos entre 16 componentes. La figura 6(b) describe la comparación del valor de confianza según la ecuación (14) obtenido para las estructuras inferidas con el algoritmo propuesto, y la estructura G es presentada en la figura 6(a) con las nuevas interacciones en rojo. Como muestran los valores, el valor de confianza obtenido por el algoritmo propuesto tiene un puntaje del 10% mayor para la estructura inferida que para la estructura inicial. El algoritmo es capaz de inferir interacciones de naturaleza estadística, y a pesar de que tiene la posibilidad de obtener estructuras con menos interacciones erróneas, las interacciones reales sólo son comprobables a través de métodos experimentales. Sin embargo, estas nuevas interacciones obtenidas con el algoritmo son de potencial importancia al elucidar la exacta interacción que hay entre los elementos.

Conclusiones

El principal resultado de este trabajo fue el desarrollo de un algoritmo de aprendizaje de clases de equivalencia basado en modelos de búsqueda inspirado en colonia de hormigas. Además se describieron las ventajas del enfoque de puntaje y búsqueda entre clases de equivalencia de redes bayesianas. Principalmente,

se evita el movimiento redundante por medio de operadores. Los resultados mostraron que el algoritmo propuesto para redes pequeñas, usando 20 muestras, y en específicas combinaciones de sus parámetros, tiene la posibilidad de obtener estructuras con menos interacciones erróneas (falsos positivos) que los algoritmos ACO-E y Greedy. Además, los resultados mostraron que, para 500 muestras, y redes pequeñas, el algoritmo propuesto tiene la posibilidad de obtener estructuras con menos interacciones erróneas (falsos positivos) que los algoritmos ACO-E y Greedy, y a su vez con mayor o muy semejante probabilidad como indica la función de puntaje y con un orden de complejidad menor que el algoritmo ACO-E. Además, se describió la aplicación de la inferencia de interacciones de naturaleza estocástica entre moléculas que responden en relación a cambios de la molécula EVI-1 y su aporte al descubrimiento de interacciones reales entre ellas. Se describieron los conceptos básicos sobre microarreglos necesarios para la aplicación del algoritmo de aprendizaje de redes bayesianas. Se mostró como es posible emplear datos de microarreglo para la selección de genes relevantes de acuerdo a cambios significativos cuando hay cambios en las condiciones celulares. También se mostró la utilidad de utilizar información a priori de la literatura científica para dirigir más precisamente el aprendizaje. Por último se mostró los resultados de la aplicación del algoritmo a un microarreglo obtenido por muestras de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con el fin de encontrar interacciones con dependencias estadísticas como potenciales interacciones biológicas con alta probabilidad. Este último resultado es de gran importancia puesto que aporta en la generación de conocimiento en investigaciones de como interactúan los genes relacionados con enfermedades como la

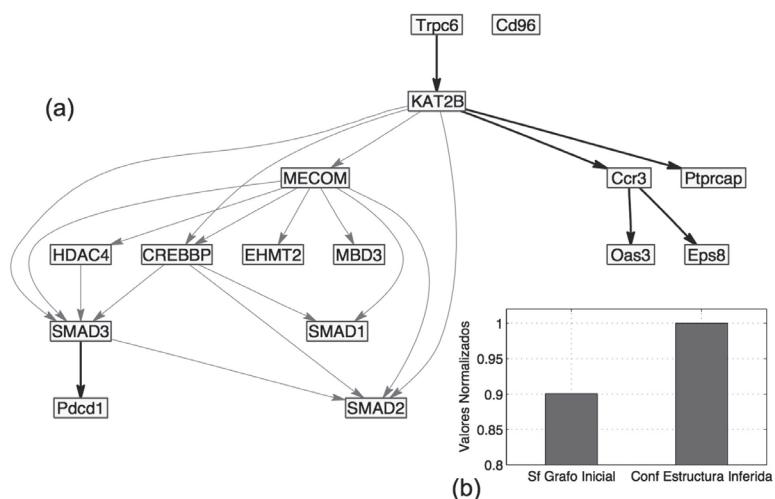
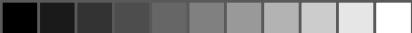


Figura 6. (a) Estructura inferida por el algoritmo a partir de los datos del microarreglo con los genes relevantes. Se infirieron 6 interacciones nuevas, de las cuales tres fueron con el gen SMAD3 y 5 con KAT2B. (b) Comparación del valor de puntaje de la red semilla inicial y el valor de confianza estimado por la estructura inferida con el algoritmo propuesto.



LMA. Por ejemplo, es posible que al expresarse uno de los genes directamente regule al otro en la dirección aproximada por el algoritmo. También es posible que la regulación entre los genes esté en la dirección inferior, pero puede ser mediada por otros genes que no fueron tenidos en cuenta como genes relevantes en la sección anterior. Por ejemplo los genes SMAD3 y Pdcd1 aproximados por el algoritmo podrían tener genes intermedios. Por último, las interacciones pueden llegar a ser inversas, es decir, en cualquiera de los casos anteriores es posible que la dirección de la regulación sea contraria a la que se approximó con el algoritmo.

Apéndice A: Deducción de la función de puntaje

Siguiendo el razonamiento realizado en (Cooper, 1992; Heckerman, 1995) para obtener la probabilidad $P(\mathbf{D}|G)$ en la ecuación (5) y (6), se tiene en cuenta que:

1. Se supone que el muestreo de las variables de \mathbf{X} en \mathbf{D} tiene distribución multinomial para cualquier estructura G . Entonces, dado \mathbf{D} como el arreglo de los d_{ih} y como los valores de Ξ_i en \mathbf{d}_h donde $\sigma_i = \{\ell | X_\ell \in \gamma\}$ para todo G en \mathbf{E}_B , existe un conjunto de valor positivo Θ tal que,

$$p(d_{ih} = v_k | D_{\sigma_i, h} = w_j) = \theta_{ijk} \quad (13)$$

donde $\sum_{k=1}^r \theta_{ijk}$. Dada la existencia de los parámetros $\Theta = \{\theta_{ijk}\}$, se define la ecuación de puntaje (4) teniendo en cuenta la incertidumbre que se tiene de ellos, calculando el promedio de la probabilidad $P(\mathbf{D}|G)$ sobre todos los posibles valores de los parámetros en G , así:

$$p(\mathbf{D}|G) = \int_{\Theta} p(\mathbf{D}|G, \Theta) f(\Theta|G) d\Theta \quad (14)$$

Entonces se requiere definir de (14) la probabilidad $p(\mathbf{D}|G, \Theta)$ con respecto a los datos y $f(\Theta|G)$ con respecto a los parámetros.

2. Se asume que cada caso \mathbf{d}_h es *independiente* de los demás y para cada variable X_i solo se puede tener un conjunto finito de estados, de tal forma que:

$$p(\mathbf{D}|G, \Theta) = \prod_{h=1}^m p(d_h|G, \Theta) \quad (15)$$

3. Se supone que existe *un valor* para todas las variables en todos los casos en \mathbf{D} , entonces la expresión (15) se puede escribir como,

$$p(\mathbf{D}|G, \Theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{h=1}^m p(d_{ih}|G, \Theta) \quad (16)$$

Sin embargo, dado que G establece los elementos de Ξ , se puede descomponer la expresión anterior de acuerdo a las contribuciones locales de cada variable,

$$p(\mathbf{D}|G, \Theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{h=1}^m p(d_{ih}|G, \Theta) \quad (17)$$

Además, si se define N_{ijk} como el número de veces que d_{ih} es igual a un valor v_k y $D_{\sigma_i, h}$ a un elemento

$w_j \in \Omega$ para todo h en \mathbf{D} , la ecuación anterior puede reagruparse de la siguiente manera,

$$p(\mathbf{D}|G, \Theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \prod_{k=1}^r p(d_{ih} = v_k | D_{\sigma_i, h} = w_j)^{N_{ijk}} \quad (18)$$

Usando (13) y (18) se tiene que

4. Se asume que los parámetros asociados con cada variable en la estructura son independientes, entonces se tiene que:

$$p(\mathbf{D}|G, \Theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \prod_{k=1}^r p(d_{ih} = v_k | D_{\sigma_i, h} = w_j)^{N_{ijk}} \quad (19)$$

A esta propiedad se le llama Independencia Paramétrica Global.

$$f(\Theta|G) = \prod_{i=1}^n f(\Theta_i|G) \quad (20)$$

5. Se asume que los parámetros asociados con cada instancia de los valores de los padres de cada variable son independientes. Esto se puede expresar como:

$$f(\Theta|G) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m f(\Theta_{ij}|G) \quad (21)$$

Esta propiedad tiene el nombre de Independencia Paramétrica Local. Así a partir de (19) y (21), la ecuación (14) se puede reescribir de la siguiente forma:

$$p(\mathbf{D}|G) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \int_{\Theta} \left[\prod_{k=1}^r \theta_{ijk}^{N_{ijk}} \right] f(\Theta_{ij}|G) d\Theta_{ij} \quad (22)$$

6. Por último, se supone que la función de densidad para los parámetros en Θ_{ij} , sin conocer \mathbf{D} (*o a priori*), sigue una distribución de Dirichlet principalmente porque, al actualizarse cuando se hace un muestro multinomial \mathbf{D} , siguen siendo Dirichlet (Heckerman 1995). Así, la función de densidad para los parámetros es como sigue,

$$p(\mathbf{D}|G) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \int_{\Theta} \left[\prod_{k=1}^r \theta_{ijk}^{N_{ijk}} \right] f(\Theta_{ij}|G) d\Theta_{ij} \quad (23)$$

donde N_{ijk} es la información a priori para las probabilidades numéricas θ_{ijk} sin tener \mathbf{D} . Basado en las suposiciones anteriores, y dado que la integral en (22) describe $\int_{\Theta} \theta_{ijk}^{N_{ijk}}$ con respecto a $f(\Theta_{ij}|G)$, la ecuación resultante para (14) solucionando la integral según (Heckerman 1995) es:

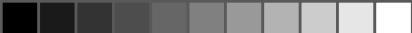
$$p(\mathbf{D}|G) = p(G) \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \frac{\Gamma(N_{ij})}{\Gamma(N_{ij} + N_{ij}^*)} \prod_{k=1}^r \frac{\Gamma(N_{ijk} + N_{ijk}^*)}{\Gamma(N_{ijk})} \quad (24)$$

Referencias bibliográficas

- Acid, S. and de Campos, L. M. 2003. Searching for bayesian network structures in the space of restricted acyclic partially directed graphs. *Journal of Artificial Intelligence Research*. 18: 445-490.
- Castro, P. A. D. and Von Zuben, F. J. 2005. An immune-inspired approach to bayesian networks. in *HIS '05: Proceedings of the Fifth International Conference on Hybrid Intelligent Systems*, (Washington, DC, USA), pp. 23-28, IEEE Computer Society, 2005.
- Chickering, D. M. 1996. Learning bayesian networks is np-complete. Pp. 121-130.
- Chickering, D. M. 2002. Learning equivalence classes of bayesian-network structures. *The Journal of Machine Learning Research*. 2: 445 - 498.



- Cooper, G. F. and Herskovits, E. 1992. A bayesian method for the induction of probabilistic networks from data. *Machine Learning*. 9(4): 309–347.
- Daly, R. and Shen, Q. 2009. Learning bayesian network equivalence classes with ant colony optimization. *Artificial Intelligence Research*. 35: 391–447.
- Daly, R. Shen; Q. Aitken, S. 2011. Learning Bayesian networks: approaches and issues. *The Knowledge Engineering Review*. 26(2): 99–157.
- de Campos, L. M.; Fernández-Luna, J. M.; Gámez, J. A., and Puerta, J. M.. 2002. Ant colony optimization for learning bayesian networks. *International Journal of Approximate Reasoning*. 31(3): 291 – 311.
- Djebbari, A.; Quackenbush, J. 2008. Seeded bayesian networks: Constructing genetic networks from microarray data. *BMC Systems Biology*. 2(1): 57.
- Dorigo, M.; Blum, C. 2005. Ant colony optimization theory: A survey. *Theoretical Computer Science*. 344(2-3): 243 – 278.
- Du, Z.; Wang, Y.; Ji, Z. June 2009. A new structure learning method for constructing gene networks. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2009. 3rd International Conference*. Pp. 1–4.
- Gillispie, S. B. 2006. Formulas for counting acyclic digraph markov equivalence classes. *Journal of Statistical Planning and Inference*. 136(4): 1410 – 1432.
- Heckerman, D. 1995. A tutorial on learning with bayesian networks. *Tech. Rep., Microsoft Research*.
- Jensen, F. V. and Nielsen, T. D. 2007. *Bayesian Networks and Decision Graphs*. Springer Science + Business Media, LLC.
- Larrañaga, P.; Karshenas, H.; Bielza, C. and Santana R. 2013. A review on evolutionary algorithms in Bayesian network learning and inference tasks. *Information Sciences*. 233: 109–125.
- Meloni, R.; Khalfallah, O., and Faucon Biguet, N. 2004. DNA microarrays and pharmacogenomics. *Pharmacological Research*. 49(4): 303 – 308.
- Needham, C.; Manfield, I.; Bulpitt, A.; Gilmarin, P.; and Westhead, D. 2009. From gene expression to gene regulatory networks in arabidopsis thaliana. *BMC Systems Biology*. 3(1): 85.
- Pe'er, D. 2005. Bayesian Network Analysis of Signaling Networks: A Primer. *Sci. STKE*, 281: I4.
- Pinto, P.; Nagele, A.; Dejori, M.; Runkler, T.; and Sousa, J. 2009. Using a local discovery ant algorithm for bayesian network structure learning. *Evolutionary Computation, IEEE Transactions on*. 13: 767–779.
- Quackenbush, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*. 32: 496-501.
- Verhaak, R.G.W.; Wouters, B.J.; Erpelink, C.A.J.; Abbas, S.; Beverloo, H.B.; Lugthart, S.; Lwenberg, B.; Delwel, R.; and Valk, P.J.M. 2009. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 94(1): 131 – 134.
- Wang, L. and Li, Paul C.H. 2011. Microfluidic DNA microarray analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*. 687(1): 12 – 27.
- Wieser, R. 2007. The oncogene and developmental regulator evi1: Expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene*. 396(2): 346 – 357.
- Wong, M. L. and Leung, K. S. Aug. 2004. An efficient data mining method for learning bayesian networks using an evolutionary algorithm-based hybrid approach. *Evolutionary Computation, IEEE Transactions*. 8: 378–404.
- Zhang, Y.; Zhang,W.; Xie, Y. 2013. Improved heuristic equivalent search algorithm based on Maximal Information Coefficient for Bayesian Network Structure Learning. *Neurocomputing*. 117: 186–195.



Optimization of an *in vitro* regeneration system for colombian *indica* rice varieties

Optimización de un sistema *in vitro* de regeneración para variedades colombianas de arroz *indica*

Iván Darío Barbosa Cepeda*, Alejandro Chaparro-Giraldo**

Abstract

In order to optimize an *in vitro* regeneration system for colombian rice varieties, the amount of plant regulators used for each step of the process was modified, together with other factors such as seed position and time of exposition to plant regulators. Modification of 2,4-D concentration during callus induction and coculture has a negative effect on regeneration potential. However, it is possible to increase the amount of produced calli by modifying the position in which the seed is placed on the culture medium. Moreover, a longer callus induction time decreased the regeneration percentage. During the regeneration step, for FEDEARROZ 2000 variety, a combination of 1,0 mg/l g/l mg/l of naftalenacetic acid + 4,0 mg/l g/l mg/l of kinetin increases the regeneration percentage, without increasing the amount of abnormal shoots and without decreasing their size. For FEDEARROZ 50 variety, the best combination of plant regulators is 0,5 mg/l g/l mg/l of naftalenacetic acid + 2,0 mg/l g/l mg/l of kinetin.

Key words: Colombian rice, FEDEARROZ 2000 variety, FEDEARROZ 50 variety, plant regulators, somatic embryogenesis.

Resumen

Para optimizar un sistema de regeneración *in vitro* de variedades colombianas de arroz, se modificaron las concentraciones de los reguladores utilizados a lo largo de cada etapa del proceso de cultivo, junto con otros factores como la posición de siembra de la semilla y el tiempo de exposición a los reguladores. Se encontró que la modificación de la concentración de 2,4-D para las etapas de inducción de callo y cocultivo repercute de forma negativa en la regeneración. Por otra parte, es posible incrementar el porcentaje de formación de callo cambiando la posición de siembra de la semilla. Adicionalmente, un mayor tiempo de formación de callo provocó una disminución del porcentaje de regeneración. En la etapa de regeneración, para la variedad FEDEARROZ 2000 se encontró que una combinación de 1,0 mg/l g/l mg/l de ácido naftalenacético + 4,0 mg/l g/l mg/l de kinetina aumenta el porcentaje de regeneración, sin incrementar la cantidad de brotes anormales y sin disminuir de forma considerable el tamaño de los brotes. Para la variedad FEDEARROZ 50, la mejor combinación de reguladores durante la regeneración es de 0,5 mg/l g/l mg/l de ácido naftalenacético + 2,0 mg/l g/l mg/l de kinetina.

Palabras clave: Arroz colombiano, variedad FEDEARROZ 2000, variedad FEDEARROZ 50, reguladores, embriogénesis somática.

Introduction

Rice is one of the most important crop species in the world (Ignacimuthu & Arockiasamy, 2006; FAO, 2012). It is the main food source for nearly half of human population (Sivakumar et al., 2010) and 23% of global caloric consumption comes from this plant (Carsono, 2007). Biotechnology is a valuable tool to meet the current and future demands of rice production (Tariq et

al., 2008, Sivakumar et al., 2010), but it cannot replace conventional methods of plant breeding; however, it can help to obtain new genotypes (Poehlman & Allen, 2005, Sharma et al., 2005, Abdul Rahman et al., 2010). In Colombia, breeding programs have increased the production levels and developed broadly accepted varieties, because of their agronomical and culinary characteristics (Diago, 2003).

* Biologist, MSc. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. idbarbosac@unal.edu.co.

** Agronomical Engineer, MSc., Ph.D. Associated professor, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. achaparrog@unal.edu.co.



The development of regeneration protocols is essential for agricultural biotechnology, especially for genetic engineering (Pérez Molpe Balch *et al.*, 1999, García-González *et al.*, 2010). Several factors are important for a successful *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. However, the availability of an efficient *in vitro* culture system is critical (Danilova, 2007; Kathuria *et al.*, 2007). There are still some difficulties related with *indica* rice transformation. This subspecies is considered recalcitrant because of its poor *in vitro* response and great genotypical variability, compared to *japonica* genotypes (Saharan *et al.*, 2004a; Amarasinghe & Yang, 2005). Therefore, it is necessary to adjust the protocols almost every time a new genotype has to be transformed, given that no standard protocol has been developed to date (Hoque *et al.*, 2007; Kathuria *et al.*, 2007; Sivakumar *et al.*, 2010). Several factors influence the regeneration potential of an explant: plant genotype, carbon source, mineral nutrients, additives (e.g. vitamins, aminoacids, antioxidants), temperature, relative humidity and even the culture recipient. However, most of the times the response is determined by the interaction between plant genotype, endogenous and exogenous plant growth regulators (Mroginski & Roca 1993; Pérez Molpe Balch *et al.*; 1999; Pedroza Manrique, 2008).

Recently, the work of Perafán (2011) selected a regeneration protocol (Saharan *et al.*, 2004a) for colombian rice varieties FEDEARROZ 2000, FEDEARROZ 50, FEDEARROZ 369 and CICA 8. However, this protocol needs adjustments (Barbosa & Chaparro, 2011). For that reason, in this work, the response of explants to the artificial plant growth regulators used in *in vitro* culture was studied, in order to raise the efficiency of the regeneration protocol. Additionally, other factors such as seed position and time of callus induction were evaluated.

Materials and methods

Plant genotypes Mature seeds of *indica* rice varieties FEDEARROZ 2000 and FEDEARROZ 50 were used. The

seeds were kindly provided by the Federación Nacional de Arroceros – FEDEARROZ (National Federation of Rice Growers).

Surface sterilization and culture media

For each experiment, the seeds were manually de-husked and surface-sterilized following a previously established protocol (Barbosa & Chaparro 2011). The initial tissue culture protocol was the one proposed by Saharan *et al.* (2004a), and selected by Perafán (2011). The coculture step, suggested by Saharan *et al.* (2004b) was later added, in order to perform *Agrobacterium*-mediated transformation assays. Culture mediums are summarized in Table 1.

Effect of 2,4-D on callus formation

The formation of callus from mature seeds of FEDEARROZ 2000 and FEDEARROZ 50 was evaluated under different 2,4-D concentrations (T1 = 2,5 mg/l; T2 = 3,0 mg/l; T3 = 3,5 mg/l; T4 = 4,0 mg/l; T5 = 4,5 mg/l; T6 = 5,0 mg/l) and compared with a control (T0 = 0 mg/l). 50 seeds in 5 Petri dishes (10 seeds per dish) were placed for each treatment and genotype. Seeds were cultured under dark conditions at 28 °C during 3 weeks. Callus formation percentage was calculated as CFP = (Nº of formed calli / Nº of seeds cultured) * 100%. Dry weight of each callus per treatment was also determined.

Effect of seed position on callus formation

Mature seeds of both genotypes were manually de-husked and surface sterilized, and then placed on callus induction medium, supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D. Seeds were placed either at 60° (T1) or fully horizontally on the medium. For each treatment and genotype, 10 plates with 10 seeds each were used. Seeds were cultured under dark conditions at 28 °C during 3 weeks. Callus formation percentage was cal-

Table 1. Culture mediums of Saharan *et al.* (2004a, 2004b).

Medium	Composición
Callus induction.	MS basal medium + 30 g/l sacarose + 0,5 g/l proline + 0,5 g/l caseine hydrolysate + 2,5 g/l gelrite; pH 5,8.
Liquid coculture.	MS basal medium + 68,5 g/l sacarose + 35 g/l glucose + 0,5 g/l proline + 0,5 g/l caseine hydrolysate + 200 µM acetosyringone; pH 5,2.
Solid coculture.	MS basal medium + 30 g/l sacarose + 10 g/l glucose + 0,5 g/l proline + 0,5 g/l caseine hydrolysate + 200 µM acetosyringone + 2,5 g/l gelrite; pH 5,8.
Regeneration.	MS basal medium + 30 g/l sacarose + 0,5 g/l proline + 0,5 g/l caseine hydrolysate + 6 g/l gelrite; pH 5,8.



culated as CFP = (Nº of formed calli/Nº of seeds cultured)*100%.

Effect of 2,4-D and callus age on regeneration potential

In order to evaluate the effect of 2,4-D and callus age on regeneration potential, mature seeds of both genotypes were placed on callus induction medium, supplemented with different concentrations of 2,4-D (FEDEARROZ 2000: T1 = 3,0 mg/l and T2 = 4,0 mg/l; FEDEARROZ 50: T1 = 3,5 mg/l and T2 = 4,5 mg/l). These concentrations were selected based on previous experimental results and thus were different for each genotype. Seeds were cultured under dark at 28 °C. During 3 weeks, 150 calli were selected weekly and used to simulate coculture conditions according to Saharan et al. (2004b), but without using bacteria. Briefly, shoots and endosperms were removed from the selected calli and they were immersed in liquid coculture medium, supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D, for 30 minutes under constant shaking. Calli were blotted dry on absorbent paper and transferred to solid coculture medium, supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D. Each Petri dish had one Whatman Nº1 paper sheet over the medium. Calli were kept under dark conditions at 25 °C. After 3 days, they were partially dessicated on Petri dishes containing one Whatman Nº 1 paper sheet. Calli were kept under dark conditions at 28 °C for 48 h. Then, the calli were transferred to regeneration medium supplemented with 0,5 mg/l of naphtalene acetic acid (NAA) and 2,0 mg/l of kinetin (KIN). Initially, the calli were transferred to Petri dishes (for each genotype 10 calli per dish, 5 dishes per treatment), and after 3 weeks, they were transferred to 100 mL flasks for 3 additional weeks. During this period, calli were kept under 16 h-photoperiod at 28 °C. For each treatment, shoots were counted (counting only those longer than 5 mm). Regeneration percentage was calculated as RP = (Nº of shoots produced/Nº of calli cultured)*100%.

Effect of 2,4-D used during coculture on callus regeneration potential

The effect of 2,4-D concentration during coculture on callus regeneration potential was evaluated by placing seeds on callus induction medium, supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D. Seeds were cultured under dark conditions at 28 °C, during 2 weeks (for FEDEARROZ 2000) or 1 week (for FEDEARROZ 50). Seeds of both genotypes were also cultured during 3 weeks and used as control. After the culture period, the coculture were simulated as previously described, without using bacteria. Three different 2,4-D concentrations were used for liquid and solid coculture media (T1 = 2,5 mg/l, T2 = 1,25 mg/l and T3 = 0 mg/l), plus one control for 3 week-old calli (Co = 2,5 mg/l). For each treatment, 50 calli of each genotype were used. After this, calli

were dissecated for 48 h and transferred to regeneration medium supplemented with 0,5 mg/l NAA and 2,0 mg/l KIN, in 100 ml flasks (10 flasks per treatment, 5 calli per flask), under 16 h photoperiod conditions at 28 °C. After 3 weeks, calli were transferred to 200 ml flasks under the same conditions, for 3 additional weeks. For each treatment, shoots were counted (counting only those longer than 5 mm). Regeneration percentage was calculated as RP = (Nº of shoots produced/Nº of calli cultured)*100%.

Effect of plant growth regulators on callus regeneration potential

Seeds of both genotypes were placed on callus induction medium, supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D. Seeds were cultured under dark conditions at 28 °C for 2 weeks (FEDEARROZ 2000) and 1 week (FEDEARROZ 50). Seeds of both genotypes were also cultured during 3 weeks and used as control. After the culture period, the coculture was simulated as previously described, without using bacteria. Liquid and solid coculture media were supplemented with 2,5 mg/l of 2,4-D. After this, calli were dissecated for 48 h and transferred to 100 ml flasks with regeneration medium, supplemented with ANA + KIN or ANA + BAP concentrations detailed in table 2.

Table 2. Treatments used during regeneration for both genotypes. *Co: 3 week-old calli of both genotypes.

Treatment	ANA (mg/l)	KIN (mg/l)	BAP (mg/l)
Co*	0,5	2,0	-
T0	0,5	2,0	-
T1	0,25	2,0	-
T2	1,0	2,0	-
T3	1,0	4,0	-
T4	0,5	4,0	-
T5	0,5	1,0	-
T6	0,5	-	2,0
T7	0,25	-	2,0
T8	1,0	-	2,0
T9	1,0	-	4,0
T10	0,5	-	4,0
T11	0,5	-	1,0
T12	-	-	-



Calli were cultured under 16 h photoperiod, during 3 weeks (5 calli per flask, 6 flasks per treatment). After this period, calli were transferred to 200 ml flasks for another 3 weeks, under the same conditions. For each treatment, shoots were counted (counting only those longer than 5 mm), and regeneration percentage was calculated as $RP = (N^{\circ} \text{ of shoots produced} / N^{\circ} \text{ of calli cultured}) * 100\%$. Shoot dry weight was also determined, and shoots were morphologically classified, according to Pérez Bernal *et al.* (2007):

- Type 1: Morphologically normal shoots, with typical bipolar structure, apex and root with proportional length.
- Type 2: Morphologically abnormal shoots, with small or absent root.
- Type 3: Morphologically abnormal shoots, with evident phenotypical alterations, like albinism, very wide or rolled up leaves, or deformed growth axis.

Statistical analysis

For statistical analysis, software Minitab® 16 for Windows™ was used. In all cases, normality tests (Anderson-Darling and Ryan Joiner) were performed. Since data did not adjust to normal distribution and could not be transformed, non-parametrical methods in all analysis were used. For the effect of 2,4-D and callus age on regeneration potential, Friedman test was used. For all the rest of experiments, Kruskal-Wallis test was used.

Results and discussion

Effect of 2,4-D on callus formation

Figure 1 shows the results of callus formation percentage per treatment and varieties. Treatment had a significant effect on the number of produced calli for both genotypes (FEDEARROZ 2000: $p < 0,001$; FEDEARROZ 50: $p < 0,001$). Absence of calli without 2,4-D shows that this regulator is the key factor to stimulate their formation, although some other medium components and environmental aspects could have influence on the morphogenic response (Litz & Jarret, 1993; Mroginski & Roca, 1993; Pérez Molpe Balch *et al.*, 1999; Pedroza Manrique, 2008). FEDEARROZ 2000 had higher callus formation percentages than FEDEARROZ 50. For both genotypes, there were more produced calli with a higher amount of 2,4-D added to the callus induction medium. In contrast, Abayawickrama & Anai (2006) reported that an increase in 2,4-D does not imply a higher amount of formed calli. It must be noticed that there is a slight drop in formed calli from 4,5 mg/l of 2,4-D for FEDEARROZ 2000, and from 5,0 mg/l for FEDEARROZ 50 variety. This drop might be related with

the possible toxic and inhibitory effect of high auxin concentrations in the culture medium (Machakova *et al.*, 2008).

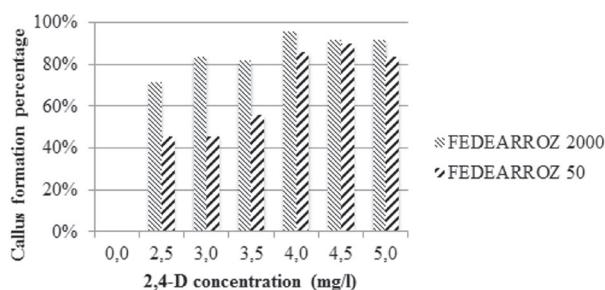


Figure 1. Percentage of callus formation per treatment and genotype.

Callus dry weight was used in order to estimate its size. Again, treatment had a significant effect on callus dry weight (FEDEARROZ 2000: $p < 0,05$; FEDEARROZ 50: $p < 0,001$). For all treatments, calli of FEDEARROZ 2000 were larger than calli of FEDEARROZ 50 (figure 2). However, the optimum for dry weight is not the same as for number of calli (figure 1). From 3,0 mg/l, there is a drop in size for FEDEARROZ 2000. FEDEARROZ 50 reaches an optimum dry weight on 3,5 mg/l of 2,4-D and it is kept stable until 5,0 mg/l. The same situation that is observed with FEDEARROZ 2000 can be seen in this case: the optimum treatment for number of calli is not the same for size of calli. This situation has already been reported by Tariq *et al.* (2008) in mature seeds of four different Basmati varieties.

Effect of seed position on callus formation

Kruskal-Wallis test found significant effects of seed position on callus percentage formation for both genotypes (FEDEARROZ 2000: $p = 0,001$; FEDEARROZ 50: $p < 0,001$). Figure 3 shows an important increase of formed calli. FEDEARROZ 2000 goes from 77% to 94%,

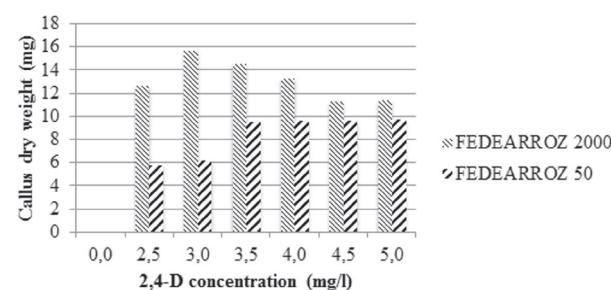


Figure 2. Mean callus dry weight per treatment and genotype.



while FEDEARROZ 50 goes from 48% to 75%. According to Perafán (2011), seeds were placed at a 60° angle over the culture medium. However, placing the seed horizontally has a positive effect on callus induction. This situation might be related with the function of scutellum in a mature embryo. This tissue, and particularly the epithelial cells, absorbs nutrients and growth regulators from endosperm, which are needed for the normal development of the embryo (Vega *et al.*, 2009). It is possible to consider that this position promotes absorption of 2,4-D and thus increases callus formation response. In fact, embryo position in the medium is critical to produce callus from the scutellum of both immature (Jakubeková *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011) and mature embryos in maize (Jia *et al.*, 2008), and it has been already reported that seed position has an impact on rice callus production (Amarasinghe & Yang, 2005).

Effect of 2,4-D and callus age on regeneration potential

In order to establish the effect of 2,4-D and callus age on regeneration potential, two 2,4-D concentrations for each genotype were selected, according to the previous experimental results (FEDEARROZ 2000: T1 = 3,0 mg/l, T2 = 4,0 mg/l; FEDEARROZ 50: T1 = 3,5 mg/l, T2 = 4,5 mg/l). They were selected because a 2,4-D concentration appropriate to maximize the number of produced calli does not correspond to one appropriate to maximize the size of each callus. By choosing two concentrations instead of one, both

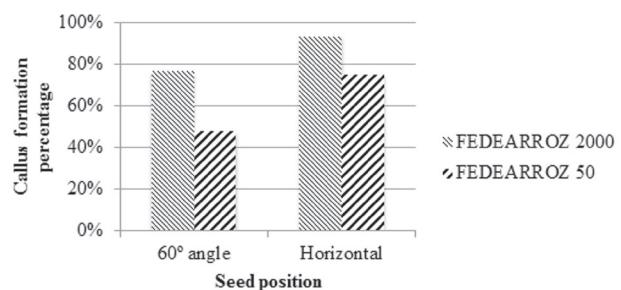


Figure 3. Effect of seed position on callus formation.

variables -number and size- were taken into account. Additionally, a control (Co) with the same 2,4-D concentration used in Saharan *et al.* (2004a, 2004b) was included. According to Perafán (2011), calli were placed on Petri dishes for 3 weeks when transferred to regeneration medium, however, after this time they only developed green buds and spots, with very few shoots (figure 4). For this reason, calli were transferred to 100 mL flasks and sealed with vinylpel, and left under the same environmental conditions for another 3 weeks.

After the additional 3 weeks, produced shoots per each treatment were counted. In both genotypes, Friedman test detected significant differences per 2,4-D concentration and callus age (FEDEARROZ 2000: $p = 0,05$; FEDEARROZ 50: $p = 0,05$). Since the p -value in both cases was on the rejection threshold, this result has to be cautiously read. However, figure 5 shows that for

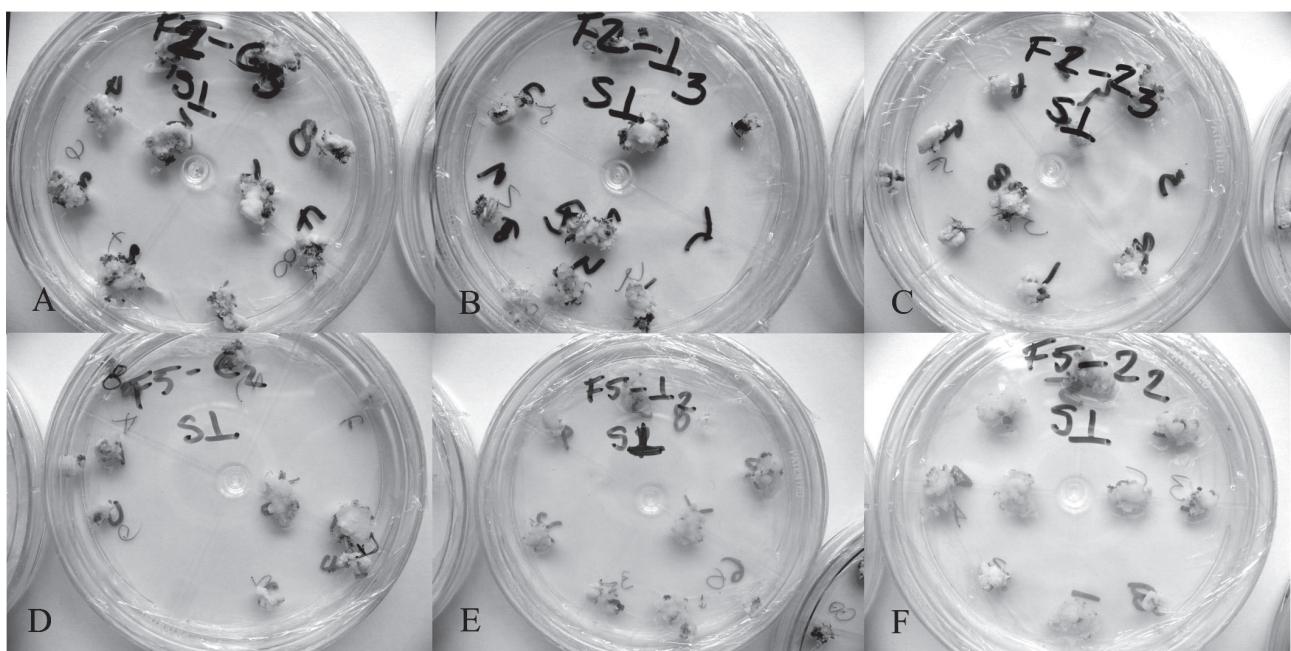
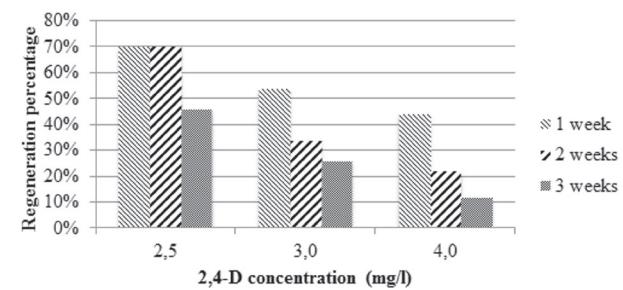


Figure 4. Calli of FEDEARROZ 2000 (A-C) and FEDEARROZ 50 (D-F) after 3 weeks on regeneration medium.



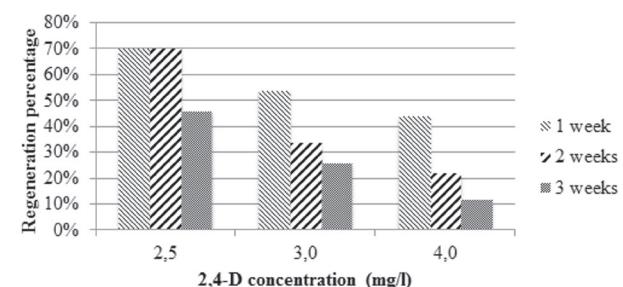
FEDEARROZ 2000, the increase of 2,4-D concentration had a negative impact on regeneration potential. While 2,5 mg/l, percentages oscillated between 46% and 70%, 3,0 mg/l percentages oscillated between 26% and 54%, and 4,0 mg/l percentages dropped to 12% - 44%. In addition, callus age also had a negative effect on regeneration potential. Older calli produced less shoots than younger calli. The only exception to this trend occurred with 2,5 mg/l 2,4-D-induced calli, which were able to maintain a 70% regeneration potential until 2 weeks. Figure 6 shows a similar trend for FEDEARROZ 50, regarding 2,4-D concentration and callus age. However, this genotype has a considerably lower regeneration potential than FEDEARROZ 2000, which accounts for the expected high genotypical variation between different *indica* varieties in response to *in vitro* culture (Saharan et al., 2004a). Previously, Amarasinghe & Yang (2005) reported that high 2,4-D concentrations and long induction time has a negative impact on callus proliferation capacity.

Figure 5. FEDEARROZ 2000 regeneration percentage per



treatment and callus age.

Figure 6. FEDEARROZ 50 regeneration percentage per treatment and callus age.



Although the response of these varieties is different, it is clear that the effect of 2,4-D concentration and

callus age is similar for both genotypes. A prolonged incubation time of an explant can cause the loss of its response capacity. It is always best to use young tissues that can respond better to incubation conditions (Litz & Jarret, 1993; Amarasinghe & Yang, 2005). For indirect somatic embryogenesis, one of the main

causes of the loss of response capacity is the accumulation of chromosomal aberrations in cells. In fact, several reports indicate that auxins like 2,4-D induce aneuploidies (Singh, 2003). In addition, recent molecular evidence suggests that high concentrations of artificial plant growth regulators in *in vitro* culture media can trigger the alteration of expression of some miRNAs in calli. This alteration might be the cause of many changes associated to prolonged incubation times, including loss of embryogenic potential (Rodríguez-Enríquez et al., 2011).

In addition, 2,4-D acts not only as an inductor of callus formation, but it also promotes the formation of somatic embryos. Nevertheless, this regulator inhibits the maturation of the embryos, which cannot produce complete plants unless they are transferred to a medium without 2,4-D (Jones & Rost, 1989; Raghavan, 2004; Neumann et al., 2009). High 2,4-D concentrations can promote callus formation, but it can equally cause problems during regeneration since there are residues inside of cells, and these delay or even prevent embryo maturation (Meneses et al., 2005). Additionally, 2,4-D can stimulate ethylene production from explants, which acts as growth inhibitor in *in vitro* cultures (Machakova et al., 2008). It might be considered, for future experiments, the use of lower 2,4-D concentrations during callus induction in combination with NAA, enough to stimulate the production of calli and, simultaneously, reduce the exposition of somatic embryos to this regulator, which in turn can increase the regeneration potential (Abdul Rahman et al., 2010).

Effect of 2,4-D used during coculture on callus regeneration potential

Kruskal-Wallis test did not find significant differences between treatments in any of the genotypes (FEDEARROZ 2000: $p = 0,405$; FEDEARROZ 50: $p = 0,430$). However, figure 7 shows that for both varieties, more shoots were produced in T1 (2,5 mg/l), which is the same amount of 2,4-D used by Saharan et al. (2004b), although with 2 week-old calli for FEDEARROZ 2000 (118%) and 1 week-old calli for FEDEARROZ 50 (44%). Control calli had lower regeneration percentages in both genotypes (FEDEARROZ 2000 = 92%, FEDEARROZ 50 = 22%).

Against what was expected, a reduction of 2,4-D concentration during coculture has a negative impact on callus regeneration potential. For FEDEARROZ 2000, percentages dropped to 78% with 1,25 mg/l and to 48% with 0 mg/l, while for FEDEARROZ 50 they dropped to 26% and 6%, respectively. Visually, calli oxidation levels were higher when the amount of 2,4-D were diminished, therefore it might be considered that this regulator has a protective effect on explants. Generally, the use of 2,4-D has been associated with an increase of oxidation in *in vitro* conditions, because

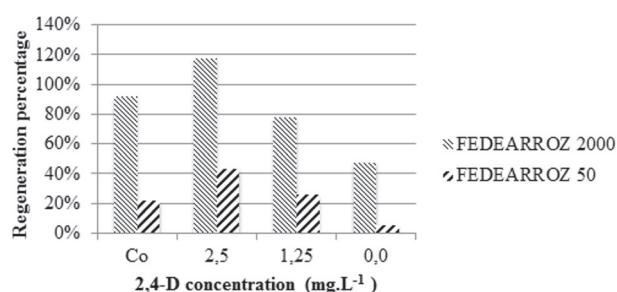


Figure 7. Effect of 2,4-D used during coculture on callus regeneration potential.

it stimulates the production of phenolic compounds from the explant (Azofeifa, 2009). However, it has been reported that elimination of 2,4-D in an induction medium might also be associated with oxidation, cell death and extracellular acidification in *in vitro* culture of Norway spruce (Bozhkov *et al.*, 2002, cited in Machakova *et al.*, 2008).

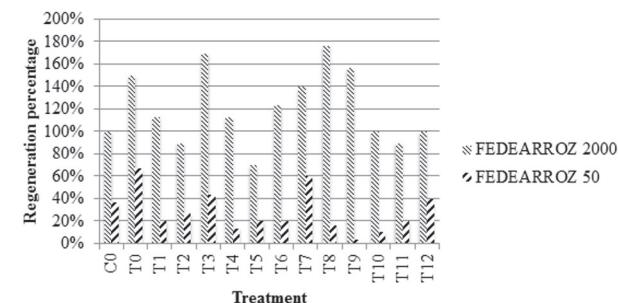
Effect of plant growth regulators on callus regeneration potential

Figure 8 shows the regeneration percentages per treatment and genotype. In both cases, Kruskal-Wallis test did not find significant differences (FEDEARROZ 2000: $p = 0,670$; FEDEARROZ 50: $p = 0,680$). However, the graphic shows differences in regeneration values for treatments. First, absence of regulators did not prevent shoot production in both genotypes (T12: FEDEARROZ 2000 = 100%; FEDEARROZ 50 = 40%). Regeneration percentages were similar to those obtained with 3 week-old calli and with the same concentration of ANA and KIN used by Saharan *et al.* (2004a) (Co: FEDEARROZ 2000 = 100%; FEDEARROZ 50 = 36,7%). It is not always necessary to add regulators to the medium, in order to obtain a morphogenic response (Mroginski & Roca, 1993), and similar results have been reported previously (Sivakumar *et al.*, 2010). Withdrawal of 2,4-D from the medium is, at least initially, the main condition to allow maturation of embryos produced during callus induction (Jones & Rost, 1989; Litz & Jarret, 1993; Neumann *et al.*, 2009).

On the other hand, the genotype response to treatments was not equal. Different types of explants and genotypes require different types of cytokinins to have an optimal morphogenic response (Van Staden *et al.*, 2008). For this reason, it is to be expected that BAP and KIN have different effects on calli. BAP induced the highest regeneration percentages for FEDEARROZ 2000 (figure 8, treatments 6-11), which were always higher than 100%, except in T11, where it was 90%. T8 had the highest regeneration percentage,

with 176,7%. Regarding KIN treatments, percentages oscillated between 70% and 170%, being T3 the highest (figure 8, treatments 0-5). T2 and T5 had regeneration percentages lower than 100%. Similar results have been reported when comparing treatments of NAA + BAP against NAA + KIN (Pons *et al.*, 2000; Jubair *et al.*, 2008). FEDEARROZ 50 instead, had the highest regeneration percentages in KIN treatments, which oscillated between 13,3% and 66% (figure 8, treatments 0-5). BAP treatments had regeneration percentages between 3,3% and 60% (figure 8, treatments 6-11).

Figure 8. FEDEARROZ 2000 and FEDEARROZ 50 regeneration percentages per treatment.



As expected, not all shoots were morphologically equal. Figure 9 shows different types of shoots for

FEDEARROZ 2000. Figure 10 shows that FEDEARROZ 2000 produced shoots with some kind of malformation, and that the amount of abnormal shoots varied according to treatment. Only T5 had a 100% normal shoots. Nevertheless, it can be seen that KIN treatments had a higher proportion of normal shoots than BAP treatments. Note that the only BAP treatment with a proportion of normal shoots higher than 80% is T11. Given that 1,0 mg/l were used, it can be assumed that high amounts of BAP causes the formation of abnormal shoots. T8 was the treatment with more shoots produced (176,7%, see figure 8), but only half of them were morphologically normal, and 28,3% were type 3 (figure 10). In comparison, T3 had a regeneration percentage of 170%, and only 11,8% of shoots were type 3. FEDEARROZ 50 had a bigger contrast between proportions obtained for different types of shoots. Figure 11 shows different morphological types of shoots for FEDEARROZ 50. KIN treatments (0-5) produced between 75% and 100% of Type 1 shoots, while BAP treatments produced mostly abnormal shoots (figure 12). Only T11 had a 100% of normal shoots, but this treatment presented only a 20% regeneration percentage. Regarding the rest of BAP treatments, only T7, T8 and T10 produced normal shoots, although merely between 20% and 38,9%. T6, T8 and T9 did not produce any Type 1 shoot. The high proportion of abnormal



shoots obtained with BAP, shows that this regulator has an even more negative impact on FEDEARROZ 50 regeneration than on FEDEARROZ 2000. In addition, given that the regeneration percentages were lower than those of KIN treatments, the use of BAP on FEDEARROZ 50 calli can be completely discarded. This type of morphological abnormalities –particularly the absence of roots- have already been reported for *indica* genotypes, when using BAP as cytokinin (Pipatpa-

nukul *et al.*, 2004; Panjaitan *et al.*, 2009), although normal plants can also be obtained with this regulator (Sivakumar *et al.*, 2010).

Shoot dry weight was used, as in the case of calli, in order to estimate size. Kruskal-Wallis test found significant differences between treatments for both genotypes (FEDEARROZ 2000: $p = 0,032$; FEDEARROZ 50: $p = 0,001$). Figure 13 shows a high dispersion in shoot

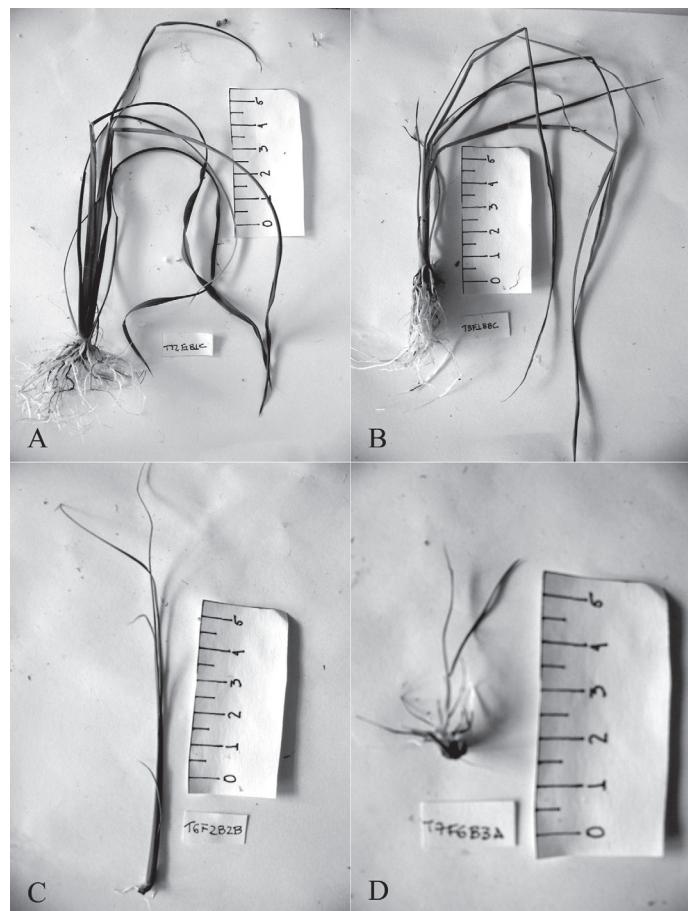


Figure 9. Morphological types of shoots for FEDEARROZ 2000. A, B: Type 1; C: Type 2; D: Type 3.

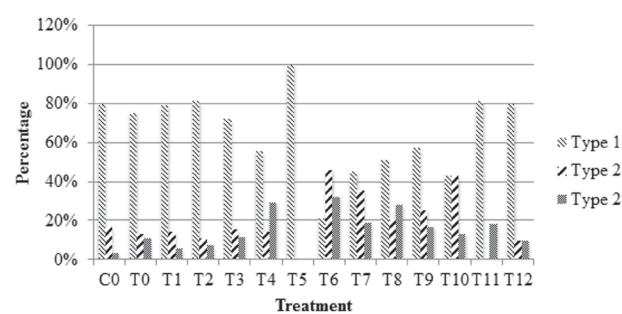


Figure 10. FEDEARROZ 2000 shoot percentages per treatment and morphological type.

dry weight data for FEDEARROZ 2000. However, given the size of boxes and position of medians, it can be seen that, in most of the cases, shoots were small. KIN treatments (T0-T5) produced bigger shoots than BAP treatments, which can be related to the development of a better radicular system, and the consequent formation of normal plants. T5 had the biggest shoots, which might be related to the fact that it also had the highest proportion of normal shoots. Still, this is counteracted by the low regeneration percentage (see figure 8). On the other hand, T3, where the highest regeneration percentage was obtained, had smaller shoots than T5 or even T0. Despite shoot size, the high production of shoots with this treatment constitutes

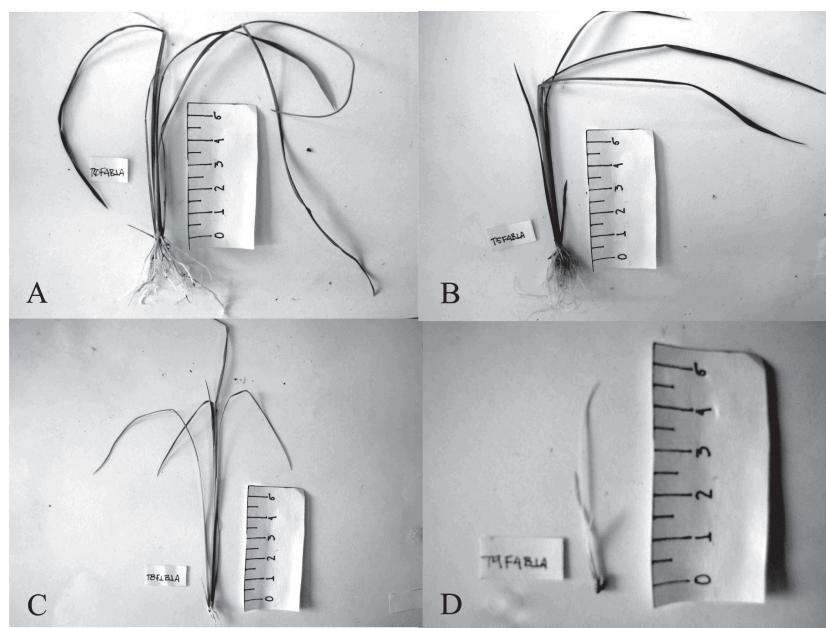


Figure 11. Morphological types of shoots for FEDEARROZ 50. A, B: Type 1; C: Type 2; D: Type 3.

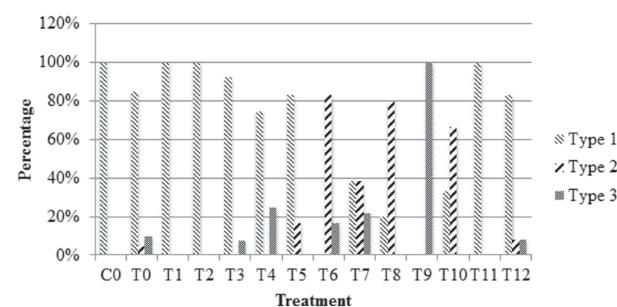


Figure 12. FEDEARROZ 50 shoot percentages per treatment and morphological type.

an advantage, compared with the ANA/KIN proportion used by Saharan *et al.* (2004a). In contrast, boxes and extreme values of BAP treatments are down-displaced, which indicates a smaller dry weight and smaller size. This confirms the negative effect of BAP on callus regeneration.

Shoot dry weight data for FEDEARROZ 50 did not have a dispersion as big as for FEDEARROZ 2000 (figure 14). However, again a down-displacement for BAP treatments (T6-T11) can be seen. This result, together with low regeneration percentages (figure 8) and high abnormal shoot production (figure 11), drives to the conclusion that BAP has a negative impact on FEDEARROZ 50 callus regeneration, and should not be used.

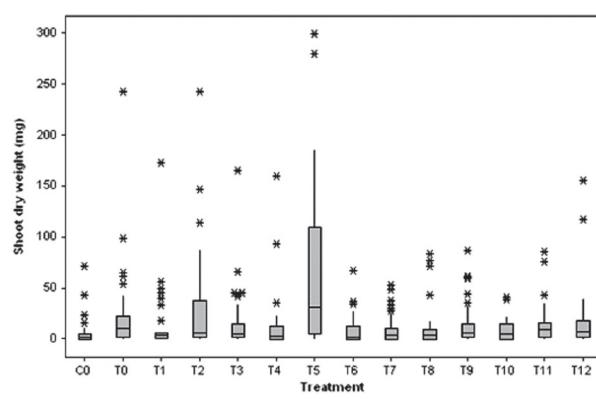


Figure 13. Box-plot diagram for FEDEARROZ 2000 shoot dry weight.

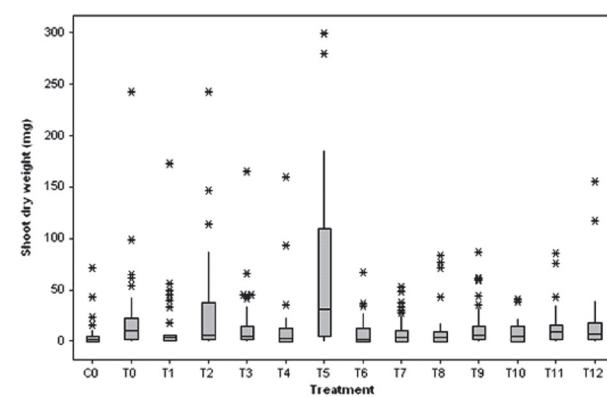


Figure 14. Box-plot diagram for FEDEARROZ 50 dry weight.



Conclusions

This study showed that an increase of 2,4-D during callus induction can increase callus size and callus formation, but it can also reduce the regeneration potential. In this case, no more than 2,5 mg/l during callus induction should be used. The production of calli can be improved by placing the seeds horizontally on the culture medium. In addition, a reduction of callus time induction has a beneficial impact on callus regeneration potential. For FEDEARROZ 2000, calli of up to 2 weeks can be used, whereas for FEDEARROZ 50 calli should not be older than 1 week. On the other hand, a reduction of 2,4-D concentration during co-culture has a negative impact on regeneration potential of both genotypes, for which the same amount suggested by Saharan *et al.* (2004b) should be used. Finally, for FEDEARROZ 2000, 1,0 mg/l ANA + 4,0 mg/l KIN in regeneration medium increased shoot production, in comparison with regulator treatment used by Saharan *et al.* (2004a) and Perafán (2011). This was achieved without raising the production of abnormal shoots or reducing the shoot size significantly. For FEDEARROZ 50, the best AUX/CIT combination was the already reported 0,5 mg/l ANA + 2,0 mg/l KIN.

Acknowledgments

First author wants to acknowledge the "Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Piñeres", of the "Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias", for the partial funding of his Master's studies. This work was partially funded by the "Federación Nacional de Arroceros - Fondo Nacional del Arroz (FEDEARROZ - FNA).

Bibliography

- Abayawickrama, A.; & Toyoaki, A. 2006. Comparison of Regeneration Efficiency of Different Genotypes of Indica Rice Cultivars. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Saga University*. 92: 17-23.
- Abdul Rahman, Z.; Roowi, S.; Zalih, W.; Subramaniam, S. 2010. Regeneration of Malaysian Indica Rice (*Oryza sativa*) Variety Mr232 via Optimised Somatic Embryogenesis System. *Journal of Phytology*. 2(3): 30-38.
- Amarasinghe, A.A.Y.; & Yang, Y.S. 2005. Comparative studies on *in vitro* responses of fresh and old calli of rice (*Oryza sativa* L.). *The Journal of Agricultural Science*. 1 (2): 1-14.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20 (1): 153-175.
- Barbosa, I. & Chaparro, A. 2011. Concentración mínima inhibitoria de higromicina B en callos embrionarios de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13 (2): 193-198.
- Carsono, N. 2007. The Establishment of *in vitro* Culture and Genetic Transformation of the Wheat Glu-1Dx5 Gene to Rice Plants by Gene Gun Bombardment. Tokyo: United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology (Doctoral thesis), p 107.
- Danilova, S.A. 2007. The Technologies for Genetic Transformation of Cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54 (5): 569-581.
- Diago, M. 2003. Compendio de Resultados de Investigación 2001-2002. Colombia: FEDEARROZ-Fondo Nacional del Arroz.
- FAO. 2012. FAO Statistical Yearbook. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 363.
- García-González, R.; Quiroz, K.; Carrasco, B.; Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*. 37 (3): 5-30.
- Hoque, M.E.; Ali, M.S.; Karim, N.H. 2007. Embryogenic Callus Induction and Regeneration of Elite Bangladeshi Indica Rice Cultivars. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 17 (1): 65-70.
- Ignacimuthu, S.; & Arockiasamy, S. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of an elite indica rice for insect resistance. *Current Science*. 90 (6): 829-835.
- Jakubeková, M.; Pret'ová, A.; Obert, B. 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 1(4): 478-487.
- Jia, X.X.; Zhang, J.W.; Wang, H.N.; Kong, W.P. 2008. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. *Maydica*. 53(3): 239-248.
- Jubair, T.A.; Salma, U.; Haque, N.; Akter, F.; Mukti, I.J.; Haque, A.K.; Ali, M.R. 2008. Callus Induction and Regeneration of Local Rice (*Oryza sativa* L.) Variety Topa. *Asian Journal of Plant Sciences*. 7 (5): 514-517.
- Jones, T.J.; & Rost, T.L. 1989. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Botanical Gazette*. 150 (1): 41-49.
- Kathuria, H.; Giri, J.; Tyagi, H.; Tyagi, A. 2007. Advances in Transgenic Rice Biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26: 65-103.
- Litz, R.E.; & Jarret, R.L. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*. Cali: CIAT, p. 143-172.
- Machakova, I.; Zazimalova, E.; George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: EF George, MA Hall, G-J De Klerk, editores. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Dordrecht: Springer, p. 175-204.
- Meneses, A.; Flores, D.; Muñoz, M.; Arrieta, G.; Espinoza, A. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biología Tropical*. 53 (3-4): 361-368.
- Mroginski, L.A.; & Roca, W.M. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*, Cali: CIAT, p. 19-40.
- Neumann, K-H; Kumar, A.; Imani, J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. Berlín: Springer, p 333.
- Panjaitan, S.B.; Abdullah, S.N.A.; Abdul Aziz, M.; Meon, S.; Omar, O. 2009. Somatic Embryogenesis from Scutellar Embryo of *Oryza sativa* L. var. MR219. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 32 (2): 185-194.
- Pedroza Manrique, J.A. 2008. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas, p 348.
- Perafán, R. 2011. Determinación de un sistema de regeneración para variedades colombianas de arroz (*Oryza sativa* ssp. *indica*). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia (Tesis de Maestría), p 81.
- Pérez Bernal, M.; Delgado Rigo, M.; Hernández Díaz, C.A.; Armas Ramos, R. 2007. Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9 (1): 35-40.
- Pérez Molpe Balch, E.M.; Ramírez Malagón, R.; Núñez Palenius, H.G.; Ochoa Alejo, N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Mexico: Universidad Autónoma de Aguas Calientes, p 179.
- Pipatpanukul, T.; Bunnag, S.; Theerakulpsit, P.; Kositrakul, M. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songkla University Journal of Science and Technology*. 26 (1): 1-13.



- Poehlman, J.M.; & Allen Sleper, D. 2005. Mejoramiento Genético de las Cosechas. 2 ed. México: Limusa Wiley, p 512.
- Pons, M.J.; Marfa, V; Mele, E.; Massager, J. 2000. Regeneration and genetic transformation of Spanish rice cultivars using mature embryo. *Euphytica*. 114: 117-122.
- Raghavan, V. 2004. Role of 2,4-Dichlorophneoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany*. 91 (11): 1743-1756.
- Rodríguez-Enríquez, J.; Dickinson, H.G.; Grant-Downton, R.T. 2011. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? *Trends in Plant Science*. 16 (5): 242-248.
- Saharan, V.; Yadav, R.C.; Yadav, N.R.; Chapagain, B.P. 2004a. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 3 (5): 256-259.
- Saharan, V.; Yadav, R.C.; Yadav, N.R.; Ram, K. 2004b. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 3 (11): 572-575.
- Sharma, K.K.; Bhatnagar-Mathur, P.; Thorpe, T.A. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 41(2): 102-112.
- Singh, R.J. 2003. *Plant Cytogenetics*. 2 ed. USA: CRC Press, p 463.
- Sivakumar, P.; Law, Y.S.; Ho, C.L.; Harikrishna, J.A. 2010. High Frequency Plant Regeneration from Mature Seed of Elite, Recalcitrant Malaysian Indica Rice (*Oryza sativa* L.) cv. MR219. *Acta Biologica Hungarica*. 61 (3): 313-321.
- Tariq, M.; Ali, G.; Hadi, F.; Ahmad, S.; Ali, N.; Shah, A.A. 2008. Callus induction and *in vitro* Plant Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) Under Various Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11 (2): 255-259.
- Van Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: EF George, MA Hall, G-J De Klerk, editores. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 1. The Background. 3 ed. Dordrecht: Springer, p. 205-226.
- Vega, R.; Vásquez, N.; Espinoza, A.M.; Gatica, A.; Valdez-Melara, M. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista de Biología Tropical*. 57 (1): 141-150.
- Zhong, D.Y.; Zhu, Y.Y.; Liu, Q.; Zhou, T.; Zhao, D.G. 2011. Production of Embryogenic Callus and Plant Regeneration from Elite Guizhou Waxy Maize Inbred Lines. *Agricultural Sciences in China*. 10 (4): 490-498.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Detección molecular de potyvirus en hojas y minibulbilllos de ajo, *Allium sativum*, asociados a un programa de producción de semilla limpia

Molecular detection of potyvirus in leaves and small bulbs of garlic, *Allium sativum*, associated a clean seed production program

*Parra-Fuentes, M. *, Reyes-Perdomo, C. **, Hernández-Fernández, J. **

Resumen

El ajo (*Allium sativum* L) se reproduce vegetativamente utilizando bulbillos, condición que favorece la propagación de enfermedades, especialmente bacterias, hongos y virus que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo. Por este motivo se implementó la identificación molecular por RT-PCR de los potyvirus LYSV y OYDV en el sistema de producción de semilla limpia de ajo en tres clones nacionales. En la fase de producción de semilla limpia mediante micropagación, se estandarizó el establecimiento de meristemos de ajo. La presencia de potyvirus se analizó en 586 plántulas mediante ELISA y en 70 por RT-PCR. Para la RT-PCR se extrajo ARN a partir de microbulbillos y hojas de plántulas, obteniéndose 1.7 a 226 ng/microlitro de ARN y se sintetizó entre 35 a 50 ng de cADN. Los resultados obtenidos mostraron que el protocolo de desinfección produjo una viabilidad del 73.6%. El análisis ELISA presentó un saneamiento del 96.1% de las plántulas a potyvirus, mientras que con RT-PCR se identificó la presencia de LYSV en el 8.6% de las muestras evaluadas. El virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) no fue detectado en ninguna de las muestras. Los resultados muestran que el cultivo *in vitro* de meristemos de ajo es una excelente alternativa para la producción de semilla, mostrando un 92% de eficiencia. Además, validan el diagnóstico eficiente del potyvirus LYSV en hojas y microbulbillos de ajo.

Palabras clave: *Allium sativum*, ELISA, micropagación, LSYV, potyvirus, OYDV, RT-PCR.

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L), reproduces vegetatively using bulbils, condition that favors the spread of diseases, especially bacteria, fungi and viruses, which affect the quality and crop yield. For this reason, the molecular identification by RT-PCR of potyvirus: LYSV and OYDV in the production system of clean seed garlic of three national clones were implemented. In the production phase of clean seed was establishing garlic meristems micropagation. Potyvirus presence in 586 seedlings was analyzed by ELISA and for RT-PCR in 70. RNA was extracted from leaves and small bulbs, yielding 1.7 to 226 ng/μl, and with this RNA, between 35 to 50 ng of cDNA. The results showed that the disinfection protocol produced a 73.6% viability of plants. ELISA analysis showed 96% sanitation of seedling to potyvirus, whereas, Leek Yellow Strip Virus, LYSV was identified in 8.6% of samples used RT-PCR methodology. Onion yellow dwarf virus (OYDV) was not detected in any sample. The results show that the *in vitro* culture of meristem of garlic, is an excellent alternative for seed production, showing a 92% efficiency. Moreover, efficient diagnostics of LYSV potyvirus was validated in leaves and small bulbs of garlic.

Key words: *Allium sativum*, ELISA, micropagation, LSYV, potyvirus, OYDV, RT-PCR.

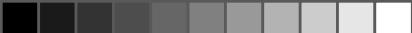
Recibido: octubre 18 de 2013

Aprobado: octubre 1 de 2014

* Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Centro de Biosistemas. Grupo de Investigación, Desarrollo en Horticultura Sostenible.

** Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de Investigación GENBIMOL “Genética, Biología Molecular y Bioinformática”, Cra. 4 No 22-61, Bogotá, D.C., Colombia.

Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co



Introducción

El ajo (*Allium sativum* L) contiene sustancias nutritivas como calcio, hierro y vitamina C, además de alicina y diferentes sulfatos que lo hacen atractivo a nivel culinario, agroindustrial y medicinal (Metwally *et al.*, 2012). El ajo es una especie de reproducción agámica que no posee semilla botánica, siendo estrictamente apomíctica (Mújica y Mogollón, 2004; Pardo *et al.*, 2011). Su propagación se realiza de manera vegetativa a través de bulbillos (Torres *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2011; Metwally *et al.*, 2012), lo cual favorece la transmisión y acumulación de virus (Davis, 1995; Lunello *et al.*, 2005) hongos, bacterias y nematodos (Burba, 1992), produciendo enfermedades sistémicas entre generaciones. El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural reportó para el año 2007 en Colombia, 375 ha sembradas con una producción de 4.300 t y un rendimiento de 11.5 t ha⁻¹. Pese a la poca área cultivada hay un aumento notable en el consumo, el cual ha llevado a la importación de más del 90% del ajo para consumo interno (Pinzón, 2009).

En el cultivo de ajo, los patógenos, especialmente los virus se acumulan dentro de los tejidos y se propagan durante cada ciclo, reduciendo el rendimiento y afectando la calidad de los bulbos (Torres *et al.*, 2000; Fajardo *et al.*, 2001). Por lo general, la presencia de virus se presenta como un complejo viral compuesto por dos o más carlavirus y/o potyvirus (Van Dijk, 1993; Melo Filho *et al.*, 2004) que causan un mosaico de síntomas y generan en la planta una infección crónica, más no mortal. La familia Potyviridae que debe su nombre al grupo de *Potato Virus*, o virus de la papa, es la más grande dentro de los grupos de virus de importancia económica (Chung *et al.*, 2008; Danci *et al.*, 2009), que causan enfermedades en una amplia gama de cultivos (Shukla *et al.*, 1994). Los virus de los 6 géneros de Potyviridae (Adams *et al.*, 2005) son transmitidos por insectos vectores como áfidos, mosca blanca, hongos y ácaros eriódidos, o a través de las estructuras reproductivas de la especie vegetal (Berger, 2001). Los potyvirus son el género más grande de esta familia con más de 100 especies y se transmiten por áfidos, e inclusive, por medios mecánicos (Danci *et al.*, 2009).

El virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV por sus siglas en inglés *Onion Yellow Dwarf Virus*) y el rayado amarillo del puerro (LYSV por sus siglas en inglés *Leek Yellow Strip Virus*) son los potyvirus que más afectan cultivos del género *Allium* (Van Dijk, 1993; Barg *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001), siendo difíciles de eliminar una vez infectan la planta (Walkey, 1989; Bai *et al.*, 2010). Las enfermedades causadas por virus reportan perdidas en el rendimiento del 25-50%, dependiendo del cultivar (Messiaen *et al.*, 1981; Lot *et al.*, 1998; Haque, 2003) y disminución en el peso y tamaño de los bulbillos a causa de OYDV del 24-60% y por LYSV del 17-54% (Lot *et al.*, 1998).

Actualmente, se ha desarrollado un gran interés por la obtención de semilla limpia y libre de virus de acuerdo a los estándares de calidad, mercadeo y presentación de los productos a nivel internacional (Lunello *et al.*, 2005). Entre las diversas técnicas que permiten eliminar estos agentes infecciosos se encuentran el cultivo de meristemos, aplicación de termoterapia (Hernández y Mancipe, 1995; Varés y Iglesias, 2005) o electroterapia (Hernández *et al.*, 1997) y el cultivo de meristemos combinado con termoterapia (Verbeek *et al.*, 1995). La técnica de cultivo de tejidos a través del aislamiento de meristemos permite la propagación de plántulas libres de patógenos bajo condiciones de asepsia (Pérez, 1998) y favorece la posibilidad de obtener semilla limpia de alta calidad, aumentando la producción y rendimiento de los cultivos (Conci *et al.*, 1986; Walkey *et al.*, 1987; Conci y Nome 1991; Verbeek *et al.*, 1995). La termoterapia es un método eficaz y de fácil aplicación para la erradicación de patógenos (bacterias, hongos, nematodos, virus y fitoplasmas) en material vegetal utilizado en la reproducción vegetativa (Varés *et al.*, 2009), sin embargo, la sensibilidad de algunos cultivares a las altas temperaturas y la ineficiencia en la erradicación de ciertos patógenos (Guillen, 2007) limitan el uso de este tratamiento.

La aplicación de técnicas de diagnóstico como la prueba inmunoenzimática conocida como ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), así como, el análisis ISEM (microscopía electrónica de inmunoabsorbancia) permiten identificar el estado fitosanitario de las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* (Hernández *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque la técnica ELISA es favorecida por el análisis rápido y el fácil uso para procesar una gran cantidad de muestras, su detección es limitada y frecuentemente produce falsos negativos (Conci, 1997), mientras que la técnica ISEM desarrolla un escrutinio de una gran cantidad de muestras en poco tiempo (Walkey *et al.*, 1990), pero requiere personal calificado y laboratorios equipados (Salazar, 1995).

La transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) consiste en la síntesis de ADN complementario (CADN) a partir de ARN, utilizando una transcriptasa reversa retroviral (Prediger, 2001). La RT-PCR es un método sensible que permite identificar virus en plantas (Dovas *et al.*, 2001; Melo Filho *et al.*, 2004). Con esta técnica se han desarrollado varias investigaciones sobre detección de virus en ajo (Tsuneyoshi y Sumi, 1996; Takaichi *et al.*, 1998; Ayabe y Sumi, 2001; Dovas *et al.*, 2001; Shibleth *et al.*, 2001; Lunello, 2004; Park *et al.*, 2005; Arya *et al.*, 2006; Majumder *et al.*, 2008; Oleas, 2013). La RT-PCR es considerada una alternativa novedosa para la detección de virus en bajas concentraciones (Lunello, 2005).

El objetivo de este estudio fue identificar molecularmente los potyvirus LYSV y OYDV utilizando RT-PCR para certificar la producción, por cultivo *in vitro* de



meristemos, de semilla limpia de ajo en tres clones nacionales.

Materiales y métodos

Material vegetal: se utilizaron tres clones nacionales de ajo provenientes de Cerrito (Santander), Santa Rosa de Viterbo (Boyacá) y la Sabana de Bogotá, cuya semilla fue seleccionada con los agricultores en las zonas de producción luego de evaluar la apariencia y estado sanitario, así como las características agronómicas de producción y rendimiento. Los bulbillos se desinfectaron con solución jabón antibacterial comercial al 10% durante 5 min, etanol al 70% durante 30 s, hipoclorito de calcio (1gL⁻¹) por 10 min e hipoclorito de sodio (0.1%) por 15 min. Los meristemos aislados del segmento basal de los bulbillos se inocularon asépticamente en medio de cultivo formulado con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 0.5 mgL⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA), 0.6 mgL⁻¹ de 2-Isopentil adenina (2ip), 3% de sacarosa y 9.5 gL⁻¹ de agar PTC (*PhytoTechnology Laboratories*). El crecimiento de los explantes se realizó a una temperatura de 25±3°C y fotoperíodo de 16 horas luz.

Identificación de potyvirus mediante ELISA: se utilizó el kit Potyvirus Group CAB 27200/0500 (Agdia inc®, Elkart, E.U.A.) para determinar mediante la técnica inmunoenzimática ELISA indirecto (Koenig, 1981) la presencia de potyvirus en 586 muestras foliares de plántulas *in vitro* y en 6 muestras foliares de plantas cultivadas en campo como control positivo. El análisis se realizó por duplicado para confirmación de resultados.

Análisis molecular por RT-PCR

Material biológico: 70 muestras de hojas y bulbillos de ajo cultivados *in vitro* se conservaron en RNALater (Ambion Inc. Woodward St. Austin, Texas, USA) para evitar la degradación del ARN.

Aislamiento y purificación del ARN: se extrajo ARN a partir de fragmentos de tejido de aproximadamente 60 a 100 mg. El tejido fue macerado en morteros de porcelana estériles utilizando nitrógeno líquido bajo una cámara de flujo horizontal LABCONCO Class II Tipo A2 (Kansas, E.U.A.) en condiciones de asepsia. El tejido pulverizado se utilizó para la extracción del ARN utilizando el Kit NucleoSpin RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa comercial fabricante. El ARN se observó después de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml). El gel se fotografió empleando el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System y se analizó con el programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software (UVP, Upland, E.U.A.). A continuación, se determinó la concentración de ARN con el equipo NanoDrop 1000

Spectrophotometer y se registró con el programa ND-1000 V3.7.1 (Thermo Scientific, Denver, E.U.A.).

Síntesis de ADN complementario (cADN): el cADN fue sintetizado utilizando el kit RETROscript Reverse Transcription for RT-PCR (Ambion Inc., Woodward St., Austin-Texas, E.U.A.), preparado en un volumen final de 30 µl, el cual contenía 1.2 µM de oligo (dT), 1X de tampón de RT (Tris-HCl 100 mM, pH:8.3; KCl 500 mM y MgCl₂ 15 mM), 2.5 mM de la mezcla de deoxinucleótidos (dNTP's), 10 unidades del inhibidor de RNase y 100 unidades de la enzima RT-MMLV (Reverse Transcriptase - Moloney Murine Leukemia Virus). La reacción se llevó a cabo en un termociclador de bloque PTC-100 Peltier Thermal Cycler (M.J. Research, Waltham, E.U.A.) utilizando un programa que comprendió 30 min a 44°C, 15 min a 50°C y finalmente 15 min a 55°C. Posteriormente, se incubó 10 min a 92°C para inactivar la enzima.

PCR para la detección de virus: se realizó la estandarización de las concentraciones de la enzima Taq Polimerasa y de cADN requeridas para la adecuada amplificación de la banda específica para los virus LYSV y OYDV. Se evaluó la amplificación de 2 muestras de ajo en una reacción de PCR con concentraciones de Taq polimerasa entre 1 a 2.5 U y entre 0,5 y 0,8 mg/ml de cADN. Además, se adicionaron 2.5 mM de dNTP's y 1 µM de oligonucleótidos directo 1OYDV (5' TTA CAT TCT AATACC AAG CA 3') y reverso 2OYDV (5' GCA GGA GAT GGG GAG GAC GC 3') para identificar el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y de los oligonucleótidos directo 1LYSV (5' TCA CTG CAT ATG CGC ACC AT 3') y reverso 2LYSV (5' GCA CCA TAC AGT GAA TTG AG 3'), para identificar el virus del rayado amarillo del puerro (LYSV) previamente descritos (Fajardo et al., 2001). Se utilizó como control positivo para los virus LYSV y OYDV la muestra de cDNA obtenida a partir de una planta de ajo cultivada en campo que presentaba los síntomas virales característicos. Con las concentraciones de Taq Polimerasa y cADN estandarizadas se realizó la evaluación de presencia de los virus a las muestras de microbulbillos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador de bloque PTC-100 Peltier Thermal Cycler (M.J. Research, Madison, E.U.A.) utilizando un programa que comprendió una fase inicial de desnaturación de 94°C por 4 min y 35 ciclos de amplificación de 94°C por 30 s, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min. Los productos de amplificación se revelaron en una cámara de electroforesis Gel XL ultra V-2 (Labnet International, Inc. Bioscience Research, New Jersey, E.U.A.) utilizando geles de agarosa al 1% (Seakem), corridos por 30 min a 100 v. Los geles fueron fotografiados con el fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ imaging system (UVP LSC, Upland, E.U.A.) y se analizaron con el programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software (UVP, Upland, E.U.A.).



Resultados y discusión

Un total de 730 meristemos fueron introducidos. La desinfección realizada a los bulbillos produjo 100% de explantes libres de contaminación bacteriana o fúngica. Se presentaron pérdidas en 31% de los explantes introducidos, 18% de los meristemos se perdieron por muerte del tejido o viabilidad (figura 1). Los porcentajes de establecimiento permiten validar la producción *in vitro* de ajo en los clones Cerrito, Santa Rosa y Bogotá (figura 1). El 71% de las plántulas establecidas en medio de cultivo suplementado con los reguladores 2ip y ANA, mostraron después de cuatro semanas una adecuada formación y vigor conforme a los requerimientos de la etapa, presentando características deseables como una altura promedio de 1.5 cm, y el desarrollo de plántulas con 2.5 hojas por plántula y sin raíces.

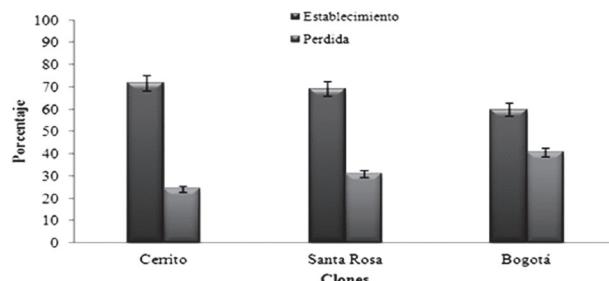


Figura 1. Porcentaje de establecimiento y perdida en tres clones nacionales de ajo introducidos *in vitro*. No se presentan diferencias significativas entre los 3 clones para las variables analizadas. Para las variables porcentaje de establecimiento y pérdida el valor de $F = 0.79$ y 1.87 , el valor de $P = 0.483$ y 0.1783 y el coeficiente de variación = 17.91 y 37.97 respectivamente. El error experimental para los clones Cerrito, Santa Rosa y Bogotá en la variable establecimiento fue = 5.34 , 4.71 y 2.26 , respectivamente, mientras que para la variable perdida fue = 4.69 , 4.71 y 2.26 .

Los resultados obtenidos con el análisis ELISA, mediante anticuerpos policlonales contra el grupo potyvirus, identificaron 23 plántulas infectadas (3.9%), las restantes 563 plántulas (96.1%) dieron negativo para la presencia de potyvirus, mostrando un resultado satisfactorio del tratamiento realizado. De otra parte, las plantas provenientes de campo fueron positivas para la presencia de potyvirus, confirmando la infección del material inicial. Este resultado está de acuerdo con estudios previos, donde semilla de ajo colombiano de las variedades Rubí-1 y Criollo presentaban 100% de la semilla donante infectada con potyvirus (Parra, 2006), así mismo, Torres *et al.* (2000) identificaron que el material donante de semilla del clon Amarante se hallaba infectado 100% por virus, mientras que Alvarado (2001) detectó la presencia de potyvirus en el 57 y 75% en los materiales donantes de ajo Chino,

California y Perla. El alto porcentaje de saneamiento alcanzado en esta fase de este estudio, permite concluir inicialmente que el proceso de producción de plántulas por cultivo *in vitro* de meristemos permite la obtención de semilla limpia.

En otros estudios realizados, en donde también se utilizó el cultivo de meristemos *in vitro* y ELISA para evaluar la presencia de potyvirus, se observó un saneamiento en las variedades de ajo Rubí-1 en 87% y de ajo criollo en un 66% (Parra, 2006), resultado que está de acuerdo con los obtenidos en este estudio. Por el contrario, Pérez *et al.* (2008) encontraron porcentajes de infección de 78 y 90% de los potyvirus OYDV y LYSV, respectivamente, en diferentes materiales obtenidos a partir de meristemos.

Debido a que el proceso de saneamiento viral a través del cultivo de meristemos no es 100% eficiente (Shiboleth *et al.*, 2001), es necesario el análisis para cada uno de los virus a fin de detectar las plantas que están realmente libres de virus. Adicionalmente, las concentraciones de los virus en las plántulas *in vitro* son muy bajas, por ello, es importante utilizar métodos de diagnóstico de alta sensibilidad e incluso utilizar técnicas combinadas (Conci, 2004).

Análisis molecular

El método utilizado en este estudio buscaba detectar la presencia de bajas concentraciones de potyvirus a través de oligonucleótidos específicos, en plántulas cultivadas a partir de cultivo de meristemos, para ello, se realizó la extracción de ARN de 70 muestras de ajo, obteniéndose concentraciones entre 1.7 y 226 ng/ μ l. Se observó que a partir de muestras de bulbo se obtienen concentraciones de ARN adecuadas para la identificación de los virus (entre 30 y 226 ng/ μ l), contrario a la concentración de ARN obtenida a partir de hojas (entre 1.7 y 20 ng/ μ l).

Se obtuvieron cADNs a partir de los ARN con concentraciones entre 0.3 y 2.533 ng/ μ l, mostrando una alta variación de acuerdo con las concentraciones obtenidas de ARN total. Aunque las concentraciones bajas de ARN no permitieron obtener una buena cantidad de cADN, estas pueden producir cADN de mejor calidad con el uso de cantidades más altas de dNTP's al mejorar la detección de las transcripciones específicas (Williams *et al.*, 1992).

Para la amplificación de la secuencia de los virus LYSV y OYDV se realizó una estandarización utilizando diferentes concentraciones de la enzima Taq Polimerasa y de cADN. Las mejores condiciones de amplificación se lograron con el uso de 1U de Taq Polimerasa y 0.3-0.6 mg/ μ l de cADN, produciendo una banda intensa y definida (figura 2, carril 2) para el virus LYSV. Para el virus OYDV ninguna de las combinaciones de Taq y cADN evaluadas generó la presencia de una banda



específica del virus, lo cual pudo deberse a la ausencia del virus en las muestras analizadas, a la necesidad de realizar ajustes en los parámetros de amplificación para el virus o que la secuencia de los oligonucleótidos no amplifican la región específica del virus en las muestras, siendo necesario diseñar otros oligonucleótidos.

Para la identificación del virus LYSV, los resultados obtenidos permitieron observar la amplificación de una banda de aproximadamente 335 pb (figura 2, carriles 1 y 4 flecha oscura) que identifica la presencia del virus LYSV en 2 muestras de bulbillos. También se observaron bandas inespecíficas (figura 2, carriles 3 y 4 flechas claras) posiblemente generadas debido a la mayor concentración de cADN y de Tag Polimerasa utilizadas. En los carriles 6-9 no se produjo ningún producto de amplificación que comprueba que estas plantas no contienen infección con ARN del virus OYDV.

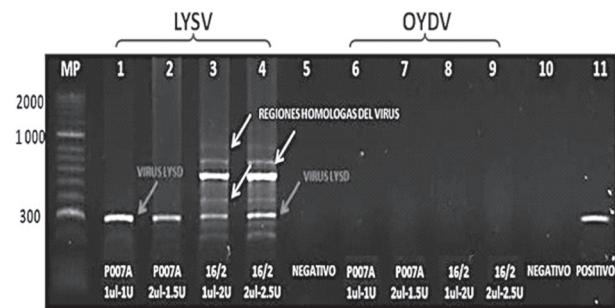


Figura 2. Variación en las concentraciones de la enzima Taq ADN polimerasa (entre 1-1.5 U) y de cADN (1-2 ml) empleada en dos muestras de bulbillos. Carriles 1 y 2 muestra P007A con Taq ADN polimerasa (1 y 1.5 U) y cADN (0.3-0.6 mg/ml). Carriles 3 y 4 muestra 16/2 con Taq ADN polimerasa (2 y 2.5 U) y cADN (1 y 2 ml). Carriles 1 al 4 las amplificaciones con oligonucleótidos reconocen el virus LYSV. Los carriles 6 al 9 contiene las mismas concentraciones de cADN y Taq ADN polimerasa empleando oligonucleótidos que reconocen el virus OYDV. MP: marcador de peso Hyperladder II (Bioline, California, USA), carriles 5 y 10 pertenecen al negativo y el carril 11 la muestra B2 planta infectada con el virus LYSV (control positivo).

Korkmaz y Cevik (2009) utilizando los oligonucleótidos 1LYSV y 2LYSV (Fajardo et al., 2001), los mismos utilizados en este estudio, y analizando plantas de puerro (*Allium porrum*) en Turquía, obtuvieron por RT-PCR una banda amplificada de 308 pb que al ser secuenciada y comparada por blastn tenía 93% de similaridad con el virus LYSV reportado en Argentina.

Teniendo estandarizada la reacción de RT-PCR se procedió a evaluar 70 de las 592 plántulas provenientes de cultivo *in vitro* de tejidos (586) y de casa de malla (6) seleccionadas al azar. Se obtuvieron amplificacio-

nes por PCR en cuatro de las muestras de cultivo *in vitro* y en dos bulbillos cultivados en casa de malla. La figura 3 muestra la amplificación específica obtenida para las plantas 5, 6, 26 y 32 procedentes de cultivo *in vitro*. Se observa claramente una banda de peso aproximado de 335 pb que identifica infección por virus LYSV.

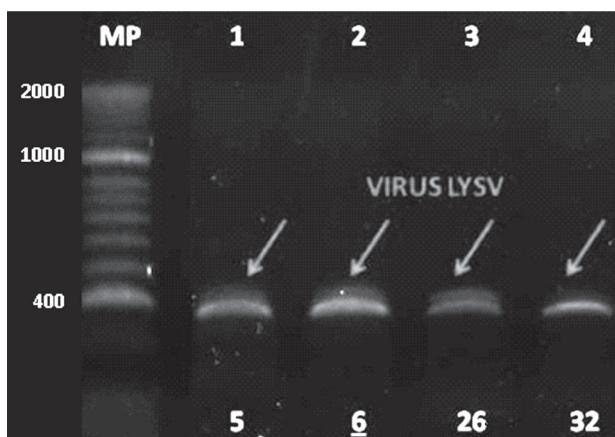


Figura 3. Amplificación por PCR del virus LYSV presente en 4 muestras de bulbillos producidos *in vitro* (microbulbillos 5, 6, 26 y 32). Electroforesis de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

El muestreo y análisis de cada una de las plántulas establecidas de ajo mediante test ELISA permitió detectar aquellas plántulas con presencia de potyvirus antes de realizar el proceso de multiplicación, sin embargo, se identificó y detectó el virus del rayado amarillo del puerro (LYSV) utilizando el método molecular RT-PCR. También se confirmó, que las muestras evaluadas no contienen el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV). Las concentraciones óptimas para la producción de cADN se obtuvieron, en todos los casos, a partir de muestras de bulbillos, mientras que las concentraciones a partir de muestras de hojas fueron muy bajas. Se recomienda la utilización de esta metodología para la evaluación masiva del material obtenido tanto de plantas *in vitro* sometidas a tratamientos de limpieza o saneamiento, como de las plantas provenientes de casa de malla o campo, que requiera la identificación y detección del virus LYSV, a fin de garantizar que la propagación y el cultivo de plántulas se encuentre libre de patógenos a lo largo del proceso de producción *in vitro*.

Conclusión

El método de detección por RT-PCR de potyvirus puede ser utilizado con éxito para supervisar un programa de producción de semilla de alta calidad de ajo libre de potyvirus asociado a un programa eficaz de erradicación de virus de ajo por cultivo de meristemos.



Agradecimientos

Los autores agradecen a Julio Cesar Martínez por su apoyo en el análisis de algunas muestras por RT-PCR.

Referencias bibliográficas

- Adams, M.; Antoniw, J.; Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of virology*. 150 (3): 459-479.
- AGDIA. Indirect ELISA, alkaline phosphatase label. Disponible en internet: http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi?m23.
- Alvarado, R.; Moreno, A.; Martínez, M. 2001. Obtención de semilla de Ajo (*Allium sativum*) libre de patógenos. Disponible en internet: <http://www.ciu.reduaz.mx/investigacion/Agropecuarias/WORD/ap02-002.doc>.
- Arya, M.; Baranwal, V. K.; Ahlawat, Y. S.; Singh, L. 2006. RT-PCR detection and molecular characterization of Onion yellow dwarf virus associated with garlic and onion. *Current Science*. 91(9): 1230-1234.
- Ayabe, M.; Sumi, S. 2001. A novel and efficient tissue culture method—"stem-disc dome culture"—for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 20 (6): 503-507.
- Bai, Y.; Zhang, W.; Li, X.; Shen, Y.; Gao, G.; Geng, H.; Meng, X. 2010. Advances in research of garlic virus diseases. *Jornal of Northeast Agricultural University*. 17(2): 85-92.
- Barg, E.; Lesemann, D.; Vetten, H.; Green, S. 1997. Viruses of alliums and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Horticulturae*. 433: 607-616.
- Berger, P. 2001. *Potyviridae*. En: *Encyclopedia of Life Science* DOI:10.1038/npg.els.0000755. Disponible en internet: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000755/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=f> else.
- Burba, J. 2009. Mejoramiento genético y producción de "semilla" de ajo. Posibilidades de adaptación a diferentes ambientes. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 3 (1): 28-44.
- Burba, J. 1992. *Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate*. Santiago de Chile, Chile: FAO, pp 23-25, 63-127.
- Chen, J.; Adams, J. 2001. Molecular Characterisation of a Complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of Virology*. 146: 1841-1853.
- Chung, B.; Miller, W.; Atkins, J.; Firth, A. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (15): 5897-5902.
- Conci, V.; Moriconi, D.; Nome, S. 1986. Cultivo de meristemas apicales de seis tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton*. 46 (2): 187-194.
- Conci, V.; Nome, S. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Journal of Phytopathology*. 132 (3): 186-192.
- Conci, V. 1997. *Virus y Fitoplasmas de ajo*. En: Burba, JL (Ed.). 50 temas sobre producción de ajo. Mendoza, Argentina: EEA-INTA La Consulta. 3: 267-291.
- Conci, V. 2004. *Obtención de plantas libres de virus*. En: Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. (Eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA, Parte VIII, Cap. 5: 303-312. ISBN 987-521-138-9.
- Danci, O.; Ziegler, A.; Torrance, L.; Gasemi, S.; Danci, M. 2009. Potyviridae family-short review. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 13: 410-420.
- Davis, R. 2008. *Diseases Caused by Viruses and phytoplasmas*. En: Schwartz H., Mohan S. (Eds.). *Compendium of onion and garlic diseases and pest*. Minnesota, USA: APS Press. p 78. ISBN 978-0-19-89054-357-3
- Dovas, C.; Hatziloukas, E.; Salomon, R.; Barg, E.; Shibolet, Y.; Katis, N. 2001. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European journal of plant pathology*. 107 (7): 677-684.
- Dovas, C.; Hatziloukas, E.; Salomon, R.; Barg, E.; Shibolet, Y.; Katis, N. 2001. Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. *Journal of Phytopathology*. 149 (11-12): 731-737.
- Fajardo, T.; Nishijima, M.; Buso, J.; Torres, A.; Ávila, A.; Resende, R. 2001. Garlic viral complex: identification of Potyviruses and Carlavirus in Central Brasil. *Fitopatología Brasileira*. 26: 619-626.
- Guillen, D.; Hernández, R.; Rodríguez, L.; Gómez, R. 2007. Deteción de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.), Saneamiento Mediante Técnicas Biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* A.C. 11(2): 8-27.
- Haque, M.; Wada, T.; Hattori, K. 2003. Shoot regeneration and bulblets formation from shoot and root meristem of Garlic Cv Bangladesh local. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2: 23-27.
- Hernández, P.; Bertrand, H.; Lepoivre, P.; González, J.; Rojas, X.; Pairol, A.; González, Y.; González, G.; Cortés, C. 2002 Diagnóstico y saneamiento de Banana Streak Virus (BSV) en *Musa* spp. *Centro Agrícola*. 2: 42-47.
- Hernández, C.; Mancipe, M. 1995. *Evaluación de técnicas de terapia y cultivo de meristemas para la erradicación de enfermedades virales en Ajo (*Allium sativum* L.)*. Bogotá, Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencia y Educación. Departamento de Biología. Trabajo de grado (Licenciado en Biología). p. 73.
- Hernández, R.; Fontanella, J.; Noa, C.; Manso, R.; Pichardo, T.; Cárdenas, H. 1997. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnóstico por μELISA. *Centro Agrícola*. 24 (1): 64-65.
- Korkmaz, S.; Cevik, B. 2009. Leek yellow stripe virus newly reported in Turkey. *Plant Pathology*. 58: 787.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*. 55 (1): 53-62.
- Lot, H.; Chovelon, V.; Souches, S.; Delecolle, B. 1998. Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Virus on symptomatology and yield loss of three French Garlic Cultivars. *Plant Diseases*. 82: 1381-1385.
- Lunello, P.; Ducasse, D.; Conci, V. 2005. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*. 112: 371-378.
- Lunello, P.; Mansilla, C.; Conci, V.; Ponz, F. 2004. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. *Journal of virological methods*. 118 (1): 15-21.
- Majumder, S.; Baranwal, V.; Joshi, S. 2008. Simultaneous detection of Onion yellow dwarf virus and Shallot latent virus in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*. 371-374.
- Melo, Filho P.; Nagata, T.; Dusi, A.; Buso, J.; Torres, A.; Eiras, M.; Resende, R. 2004. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39 (8): 735-740.
- Messiaen, C.; Youcef-Benkada, M.; Beyries, A. 1981. Rendement potentiel et tolérance aux virus chez l'ail (*Allium sativum* L.). *Agronomie*. 1: 759-762.
- Metwally, E.; El-Denary, M.; Omar, A.; Naidoo, Y.; Dewir Y. 2012. Bulb and vegetative characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) from *in vitro* culture through acclimatization and field production. *African Journal of Agricultural Research*. 7 (43): 5792-5795.
- Mujica, H.; Mogollón, N. 2004. Bulbificación "in vitro" del Ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*. 16 (1): 55-60.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Oleas, A. 2013. Simultaneous RT-PCR detection of 3 infecting garlic (*Allium sativum* L.) crops in Ecuador and *in vitro* production of virus-free bulblets. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. p. 94.



- Pardo, A.; Luna, F.; Hernández, N. 2011. Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. *Bio-agro.* 23 (3): 207-214.
- Park, S.; Bae, Y.; Jung, E.; Kang, S. 2005. RT-PCR-based detection of six garlic viruses and their phylogenetic relationships. *Journal of microbiology and biotechnology.* 15 (5): 1110-1114.
- Parra, M. 2006. Desarrollo de tecnologías para la producción de semilla prebásica indexada de ajo (*Allium sativum* L.) var. Rubí y Criollo en el laboratorio de micropagación de plantas de CORPOICA C.I. Tibaitatá del municipio de Mosquera-Cundinamarca. Cucutá, Colombia: Universidad Francisco de Paula Santander.
- Pérez, L.; Santiago, D.; Rico, E.; Ramírez, R.; Mendoza, B. 2008. Efecto de virus fitopatógenos sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología.* 26 (1): 40-48.
- Pérez, J. 1998. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas. 390 p.
- Pinzón, H. 2009. *Los cultivos de cebolla y ajo en Colombia: estado del arte y perspectivas*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.* 3 (1): 46-55.
- Prediger, E. 2001. Quantitating mRNAs with relative and competitive RT-PCR. *Methods in Molecular Biology.* 160: 49-63.
- Salazar, L. 1995. Los virus de la papa y su control. *Centro Internacional de la Papa (CIP).* 226 pp.
- Shibolet, Y.; Gal-On, A.; Koch, M.; Rabinowitch, H.; Salomon, R. 2001. Molecular characterisation of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermootherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Annals of Applied Biology.* 138 (2): 187-195.
- Shukla, D.; Ward, C.; Brunt, A. 1994. *The Potyviridae. Cab International.*
- Takaichi, M.; Yamamoto, M.; Nagakubo, T.; Oeda, K. 1998. Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease.* 82 (6): 694-698.
- Tsuneyoshi, T.; Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology.* 86 (3): 253-259.
- Torres, A.; Fajardo, T.; Dusi, A.; Resende, R.; Buso, J. 2000. Shoot tip culture and thermotherapy in recovering virus free plants of garlic. *Horticultura Brasileira, Brasília.* 18 (3): 192-195.
- Van, Dijk P. 1993. *Carlavirus Isolates from cultivated Allium species represent three viruses*. *Netherlands Journal of Plant Pathology.* 99: 233-257.
- Verbeek, M.; Van, Dijk P.; Van, Well M. 1995. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. *European Journal of Plant Pathology.* 101: 231-239.
- Varés, L.; Iglesias, C. 2005. Termoterapia aplicada al cultivo del ajo de utilidad para el control de nematodos, hongos y virus. *Agro-cultura.* 880: 866-869.
- Varés, L.; Correa, E.; Iglesias, C. Palmero D. 2009. Efectos de la termoterapia sobre la viabilidad de los ajos destinados a producción. *Agricultura.* 79: 536-539.
- Walkey, D.; Webb, M.; Bolland, C. Miller A. 1987. Production of viruses-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of horticultural Science.* 62: 211-220.
- Walkey, D.; Antill, D. 1989. Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science.* 64: 53-60.
- Walkey, D. 1990. *Virus Diseases*. En: Rabinowitch H., Brewster J. (Eds.). *Onion and Allied crops*. CRC Press. Florida, USA. p. 320.
- Ward, C.; Shukla, D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology.* 32 (5): 269-296.
- Williams, W.; Rosenbaum, H.; Weiner, D. 1992. Effect of RNA concentration on cDNA synthesis for DNA amplification. *Genome Research.* 2 (1): 86-88.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Efecto del filtrado crudo de *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA0106), sobre la eclosión de huevos y movilidad de juveniles de *Meloidogyne incognita-javanica*

Effect of the raw filtrate of *Purpureocillium* sp. (UdeA0106 strain) on the eclosion of eggs and the motility of *Meloidogyne incognita-javanica* juveniles

Nadya Lorena Cardona Bustos*, Harold Pavas**, Erika Pamela Fernández***

Resumen

Meloidogyne incognita-javanica representa una limitación de los cultivos agrícolas y es necesario buscar alternativas para su manejo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* del filtrado crudo de *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA0106) sobre la eclosión de huevos y los estadios juveniles de *Meloidogyne* spp. Adicionalmente, se evaluaron los medios: caldo extracto de malta (CEM), caldo extracto de levadura (CEL) y caldo papa glucosa (CPG), escogiéndose aquel que no ejerciera daño sobre la morfología de los huevos y permitiera la eclosión de los estadios juveniles. El hongo se multiplicó durante 7 días y fue filtrado. Para establecer su efecto sobre los huevos y estadios J2 de *Meloidogyne* spp., se probaron concentraciones del filtrado al 100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 25 % y 10 %; comparándolas con un control compuesto de estadios J2 en agua destilada estéril (ADE) y CPG. Las variables a evaluar fueron el porcentaje de eclosión e inmovilidad en los J2. La unidad experimental fue la caja de Petri, cada una con 200 huevos/J2, con 5 réplicas de cada tratamiento. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con ANOVA ($P = 0,05$) y análisis de comparación múltiple de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P < 0,05$) pero el tratamiento correspondiente al filtrado puro (100 %) logró mantener el porcentaje más bajo de eclosión y mayor porcentaje de inmovilidad de los J2 (96,8 %). Las concentraciones al 90 % y 70 % igualmente lograron efectos en los J2, con porcentajes altos de inmovilidad.

Palabras clave: *Meloidogyne incognita-javanica*, *Purpureocillium* sp., control biológico de nematodos, Metabolitos fúngicos.

Abstract

Meloidogyne incognita-javanica represents an important threat to the agricultural crops, and it is necessary to seek alternatives for its control. The aim of this research it was to evaluate a crude filtrate from the strain *Purpureocillium* sp. UdeA0106 in order to establish the *in vitro* effect on the egg hatching and the immobility of juvenile stages of *Meloidogyne* spp. The mediums evaluated were malt extract broth (MEB), yeast extract broth (YEB), and potato dextrose broth (PDB), after which it was chosen the one that didn't produce any damages on nematode eggs and allowed the emergence of the larval stages. The fungus was multiplied for 7 days, and then it was filtrated. To evaluate its effect on the eggs and the J2 of *Meloidogyne* spp., filtrate concentrations were made at 100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 25 % and 10 %, contrasting them with a control composed of the J2 stages in sterile distilled water and PDB. The variables evaluated were the percentage of altered eggs and the immobility observed in J2 stages. The experimental unit was the Petri dish, each one containing 200 eggs /J2. Each treatment was replicated 5 times. It was used a completely randomized design, and an ANOVA was performed ($P = 0,05$) as well as a multiple comparison test (Tukey). Significant differences were found between all treatments ($P < 0,05$), although the most effective in inhibiting both egg hatching and J2 mobility (96,8 %) were the full strength filtering (100 %). The dilutions at 90 % and 70 %, were able to produce effects with high percentages in the immobility.

Key words: *Meloidogyne incognita-javanica*, *Purpureocillium* sp., Biological control of nematodes, Fungus metabolites

Recibido: octubre 10 de 2013

Aprobado: octubre 17 de 2014

* M.Sc., Ph.D. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Calle 67# 53-108. Grupo BIOMA, nadya.cardona@udea.edu.co (Autor de correspondencia)

** Biólogo, Universidad de Antioquia. bachue@gmail.com

*** Microbióloga Industrial. Instituto de Biología, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Grupo BIOMA, eripafer@gmail.com



Introducción

Los nematodos formadores de agallas del género *Meloidogyne* spp., son de gran importancia económica; representan un limitante en la agricultura ya que se estima que son responsables de más del 90 % de todos los daños causados por fitopatógenos en todo el mundo (Castagnone-Sereno, 2002).

Para minimizar el nivel de daño causado por estos organismos, existen varias estrategias que pueden ser empleadas, de acuerdo con las condiciones climáticas, estado del cultivo, la especie de nematodo y su nivel de densidad poblacional (Kaşkavalci et al., 2009). Sin embargo, algunas de las prácticas más extendidas corresponden al uso de productos químicos, que conllevan a problemas medioambientales y de resistencia. Por otra parte, se encuentra el uso de variedades tolerantes o resistentes, las cuales no siempre están disponibles para todos los tipos de cultivos comerciales, o no cumplen con las exigencias de los consumidores.

Debido a lo anterior, desde hace varios años se han buscado otras alternativas, tales como el uso de hongos biorreguladores, que deben ser utilizados dentro de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE). Actualmente, hay en el mercado diferentes bioformulados que utilizan algunas de sus estructuras, y se están desarrollando productos con actividad tóxica o propiedades enzimáticas derivados de hongos, que pueden afectar la viabilidad de fitopatógenos y son prometedoras fuentes de innovación en nuevos productos orgánicos para su manejo integrado (Hashem y Abo-Elyousr, 2011; Regaieg et al., 2010; Al abed, 2008).

Existen diferentes grupos de hongos que se están implementando para biocontrol, dentro de los cuales se encuentra *Purpureocillium* sp. que ha sido recientemente descrito (Luansa et al., 2011). El hongo *Purpureocillium* sp., cepa UdeA0106, se ha venido trabajando en el grupo BIOMA (Biocontrol y Microbiología ambiental) desde hace algunos años y ha mostrado ser un buen biocontrolador de Sinfílidos (Salazar, 2013; Gallego, 2012; Durán, 2012) y nematodos del género *Meloidogyne* spp. De acuerdo con varios estudios, realizados en el grupo BIOMA (Cardona y Montoya, 2013; Sánchez, 2013), se ha observado como posteriormente a 24 - 48 horas de la interacción hongo-nematodo, éstos presentan alteraciones visibles en los diferentes estadios, sin que se presente aún micosis sobre éstos, lo que podría sugerir la presencia de metabolitos difusibles en el medio.

Aun cuando existen algunos estudios relacionados con la expresión genética en interacción hongo-nematodo (Cardona et al., 2008), es necesario continuar con los estudios sobre la producción de metabolitos presentes en el medio de crecimiento con el fin de

contar con información que pueda conllevar en un futuro a procesos biotecnológicos para la producción de bioformulados. En este sentido, se realizó este trabajo de investigación que tuvo como objetivo, determinar el efecto *in vitro* del filtrado crudo de medio de cultivo la cepa UdeA0106 sobre la eclosión de huevos y la inmovilidad de los J2 del complejo *Meloidogyne incognita-javanica*.

Materiales y métodos

Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Control Microbiológico del grupo BIOMA de la Universidad de Antioquia, y la cepa utilizada corresponde a *Purpureocillium* spp., cepa UdeA0106, aislada en los suelos de la finca Vegas de la Clara, propiedad de la Universidad de Antioquia, (Municipio de Gómez Plata-Antioquia), dentro de prácticas académicas. Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. fueron obtenidos a partir de plántulas de tomate, variedad Santa Clara, susceptibles a nematodos, multiplicados en condiciones de invernadero en suelo previamente esterilizado. Los nematodos, fueron identificados morfológicamente de acuerdo con el método de los patrones perineales (Perry et al., 2010).

Los ensayos realizados correspondieron a la selección del mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad de los filtrados crudos, sobre los estadios de *Meloidogyne* spp., la obtención del filtrado crudo de la cepa UdeA0106 para la realización de las pruebas de patogenicidad y la determinación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre los huevos y J2 de *Meloidogyne* spp.

Debido a que la cepa estaba almacenada en nevera en medio de cultivo sintético, fue preciso realizar su reactivación. Colonias del hongo con dos semanas de crecimiento en medio PDA acidificado (Papa Dextrosa Agar, Merck®), se pusieron en contacto con huevos de *Meloidogyne* spp., hasta la observación de huevos que presentaran evidencia de crecimiento micelial en su interior. Estos, fueron traspasados a medio de cultivo PDA acidificado, en donde se pudieron obtener colonias características de la cepa UdeA0106 (Cardona, 2007).

Selección del medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad de los filtrados crudos, sobre los estadios de *Meloidogyne* spp.

Con el objetivo de establecer el efecto de los medios sobre estadios del nematodo, y buscar aquel que no ejerciera daño alguno sobre la morfología y permitiera la eclosión de los huevos larvarios, fueron evaluados diferentes medios de cultivo. Los tratamientos evaluados correspondieron a los medios de cultivo:



caldo extracto de malta (20 g/L, Oxoid[®]) (CEM), caldo extracto de levadura (20 g/L, Oxoid[®]) (CEL) y caldo papa glucosa (200 g/L papa, 20 g/L Glucosa) (CPG). Estos fueron envasados en erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de medio líquido y esterilizados durante 15 min a 121°C y 15 psi. Posterior a su enfriamiento, se dispensaron huevos de *Meloidogyne* spp., los cuales se mantuvieron entre 18 – 25 °C, durante 2, 4 y 6 días. La variable a evaluar fue el porcentaje de eclosión de los huevos y se utilizó un control, los huevos del nematodo, dispensados en agua destilada estéril (ADE), incubados bajo las mismas condiciones que los tratamientos. Se consideró como el mejor medio de cultivo, aquel en donde el número de huevos eclosionados fue igual o menor que el control, permitiendo corroborar con ello, que el medio no intervenía con el desarrollo del nematodo.

Diseño experimental y Análisis estadístico

La unidad experimental fue la caja de Petri, con 5 réplicas, cada una con 100 huevos de *Meloidogyne* spp. Se realizaron ANOVAS a un nivel de significancia del 5 % y para determinar cuál sería el mejor tratamiento, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey por medio del programa SPSS Statistic versión 19 y las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot (versión 11.0).

Evaluación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre los huevos de *Meloidogyne* spp.

Con el objetivo de establecer el efecto del filtrado crudo de la cepa UdeA0106, a partir de las raíces de plantas de tomate infestadas previamente, se obtuvieron masas de huevos. Para ello, tales raíces fueron cortadas en trozos pequeños y dispensadas en frascos que contenían 200 mL NaOCl al 1 % las cuales fueron sometidas a agitación durante 3 min, para posteriormente realizar lavados con abundante ADE. A continuación los huevos fueron obtenidos por tamizaje diferencial y finalmente en un tamiz de 500 mesh. Con el fin de remover el exceso de hipoclorito, se les hicieron cuatro enjuagues con (ADE), para posteriormente ser lavados con una solución de Oxitetraciclina[®] al 0,1 % por 10 min. Por último, con el fin de remover el antibiótico presente, se hicieron 5 lavados sucesivos con ADE para posteriormente ser utilizados en el bioensayo (Giraldo et al., 1997; Liu et al., 2008; Meyer et al., 2004; Regaieg et al., 2010).

Para obtener el filtrado crudo de la cepa UdeA0106 usado en ésta prueba, el hongo fue cultivado durante 7 días en el medio escogido, en agitación constante (150 rpm), a temperatura ambiente (18-25 °C). Con el fin de obtener una solución sin ninguna traza de la biomasa del hongo, posterior al tiempo de incubación, se realizó una doble filtración inicial, la cual incluyó el uso de una gasa estéril y un papel de filtro

Whatman No.1. El producto obtenido, se centrifugó a 5200 rpm por 15 min y se filtró utilizando una bomba de vacío, con un filtro miliporo (0,2 µm). Posteriormente, con el fin de eliminar posibles restos de esporas o micelio, el filtrado fue centrifugado a 13000 rpm por 20 min. Por último, el sobrenadante obtenido, atravesó un filtro de fibra de vidrio (47 mm de poro) y con este material, se procedió a realizar los experimentos (Al abed, 2008; Liu et al., 2008; Regaieg et al., 2010; Yang et al., 2010).

Con el fin de obtener la solución de trabajo para la prueba de patogenicidad, se ajustó la concentración de nematodos entre 150 a 200 huevos/ml, los cuales fueron depositados en cajas de Petri estériles (Cardona y Leguizamón, 1994). A éstas, se les adicionaron los tratamientos a evaluar, consistentes en las diferentes concentraciones del filtrado (100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 25 % y 10 %), las cuales fueron incubadas durante el tiempo del ensayo a temperatura ambiente (18-25 °C), bajo condiciones del laboratorio. Para la evaluación de los huevos, los controles, consistieron en el medio escogido estéril (CPG), y ADE, sin la adición de los filtrados del hongo. Las evaluaciones se realizaron bajo microscopio invertido en 20 y 40X y las variables a evaluar correspondieron al porcentaje de eclosión de los huevos, a los 2, 4 y 6 días de exposición y adicionalmente se hicieron registros cualitativos de cambios en la morfología de los huevos. Aquellos huevos con alteraciones morfológicas, fueron fotografiados utilizando para ello un microscopio invertido de luz marca Zeiss[®], en objetivos de 40 y 100X.

Evaluación del filtrado de la cepa UdeA0106 en la actividad de los estadios J2 de *Meloidogyne* spp.

Para establecer el efecto del filtrado crudo de la cepa UdeA0106, se realizó extracción de J2 de *Meloidogyne* spp. a partir de muestras de suelo y raíces de las plántulas de tomate por el método del tamiz-papel facial (Coyne et al., 2007). Las muestras se colocaron en bandejas con un tamiz y una hoja de papel facial, y se le adicionó 300 ml de agua, para posteriormente recoger su filtrado en beakers a las 24 y 48 h, para concentrar los J2. Posteriormente, con el fin de limpiar de residuos vegetales la suspensión, se pasó por un juego de tamices de malla No. 16, 32, 60 y 150. Adicionalmente, se utilizaron juveniles, procedentes de la eclosión de huevos, en cajas de Petri estériles, incubadas a temperatura ambiente de 3 a 5 días. Los J2 obtenidos fueron concentrados por medio de tamices y utilizando un frasco lavador con agua corriente, fueron colectados en un beaker

La concentración de nematodos se ajustó entre 150 a 200 J2/ml, los cuales fueron depositados en cajas de Petri estériles (Cardona y Leguizamón, 1994). A éstas, se les adicionaron los tratamientos a evaluar, consistentes en las diferentes concentraciones del filtrado



(100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 25 % y 10 %), las cuales fueron mantenidas durante el tiempo del ensayo a temperatura ambiente (25-28 °C), bajo condiciones del laboratorio. La variable a evaluar fue la proporción de inmovilidad de los J2 a las 24, 48 y 72 horas y adicionalmente, se hicieron registros cualitativos de cambios en la morfología de los J2, relacionados con presencia de vacuolas en el interior y deformidad corporal.

Diseño experimental y análisis estadístico del filtrado sobre huevos y J2 de *Meloidogyne spp.*

La unidad experimental, fue la caja de Petri, con 5 réplicas por tratamiento, cada una con 150-200 huevos o J2. En el estudio se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un intervalo de confianza del 95 % ($P = 0,05$) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo y se realizaron pruebas de comparación múltiple con el estadístico de prueba Tukey para determinar el mejor tratamiento. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistic versión 19 y las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot (versión 11.0).

Para cada una de las pruebas de patogenicidad, fue necesario hacer transformaciones (log) a los datos, para que se ajustaran a los requerimientos de los supuestos de normalidad, homogeneidad y el supuesto de esfericidad exigidos por el modelo estadístico.

Resultados

Selección del mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad

Los resultados de la evaluación de los medios, para establecer su efecto sobre estadios del nematodo, mostraron diferencias significativas en la eclosión de huevos en los medios CEL y CPG con respecto a su control ($P < 0,05$) (tabla 1). En CEM, se observó una eclosión mayor que en los demás medios evaluados y no se presentaron diferencias significativas comparadas con el control. Por otra parte, a pesar de que en los medios CEL y CPG, no presentaron diferencias entre sus medias (tabla 1), se seleccionó el CPG para cultivo de la cepa UdeA0106, debido a su bajo costo,

comparado con los otros medios evaluados. Con este medio escogido, se realizaron las evaluaciones, cuyos resultados se muestran en párrafos posteriores.

Efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre la eclosión de huevos de *Meloidogyne spp.*

Los tiempos de evaluación mostraron inhibición de la eclosión diferencial de *Meloidogyne spp.* el medio CPG estéril, en comparación con los controles ($P < 0,000$) en la eclosión de los huevos de *Meloidogyne spp.* (tabla 2). Así mismo, los resultados muestran diferencias en la interacción tiempo x concentración, evidenciando la relación existente entre estas dos variables (figura 1).

Tabla 1. Resultados del test de Tukey de los promedios de eclosión de huevos entre los diferentes medios de cultivo a un nivel de significancia del 5%.

Comparación medios de cultivo y controles	Diferencia de medias	Valor de P
ADE vs. CPG	0.776	0.001
ADE vs. CEL	0.595	0.001
ADE vs. CEM	0.334	0.156
CEM vs. CPG	0.443	0.003
CEM vs. CEL	0.262	0.156
CEL vs. CPG	0.181	0.444

A partir del primer tiempo de evaluación, se observó como las concentraciones de los filtrados, mostraron inhibición de la eclosión, comparados con los controles. La concentración del 100 % al día 2, presentó una eclosión del 2 %, mientras que el de la concentración del 90 %, fue del 3,4 %. Por otra parte, en el cuarto y sexto día de exposición, los controles aumentaron el porcentaje de eclosión a un 16,8 %, mientras que los porcentajes de eclosión a partir de la concentración del 25 %, estuvieron por debajo del 10 %. Los valores menores, se alcanzaron en las concentraciones del filtrado al 100 %.

Tabla 2. Resultados del ANOVA para determinar diferencias en los promedios de eclosión de los huevos *Meloidogyne spp.* durante el tiempo de exposición en cada uno de las concentraciones del filtrado, a un nivel de significancia del 5%.

	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Valor p
Tiempo de exposición	42.973	2	21.487	172.631	<0.000
Tiempo de exposición * Concentración	6.838	14	0.488	3.924	<0.000



Durante todo el tiempo del experimento, las mejores concentraciones del filtrado fueron el 70, 90 y el 100 %, quienes presentaron los menores porcentajes de eclosión de los huevos, comparados con el control. A pesar de que todos los tratamientos mostraron disminución en el porcentaje de eclosión, los resultados sugieren que el tratamiento con filtrado puro de la cepa UdeA0106 (100 %), fue el más efectivo, ya que logró mantener el porcentaje más bajo de eclosión.

Los resultados anteriores, indican que la cepa UdeA0106, podría estar produciendo ciertas sustancias que inhibirían la eclosión de los huevos del complejo *Meloidogyne* spp., aspecto que debe ser estudiado en posteriores investigaciones.

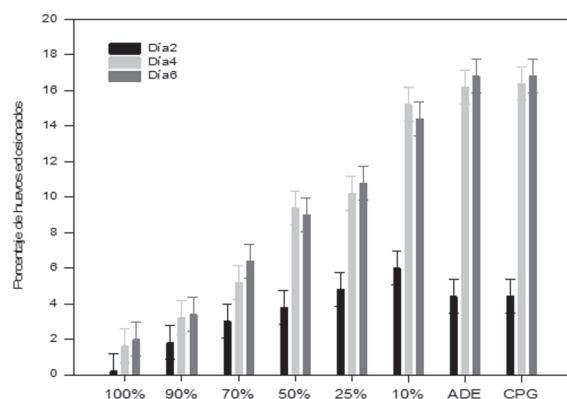


Figura 1. Efecto del filtrado de la cepa UdeA 0106 en los tres tiempos evaluados, sobre la eclosión de los huevos de *Meloidogyne* spp. comparados con los controles.

Por otra parte, aun cuando no se cuantificó el número de huevos morfológicamente anormales, se observó que para los tratamientos con el filtrado al 100%, 90%, 70% una gran proporción presentaban huevos con vacuolas en su interior y con deterioro de la pared, desde las 24 horas (figura 2).

Efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre la inmovilidad de estadios J2 de *Meloidogyne* spp.

La inmovilidad de los estadios J2 de *Meloidogyne* spp. mostró diferencias significativas para los tiempos de evaluación y en la interacción tiempo x concentración del filtrado (tabla 3).

Posterior a las 72 horas de incubación del hongo con los J2, se logró mayores valores de inmovilidad en comparación con el control de ADE (figura 3). Los tratamientos con una mejor respuesta fueron el filtrado puro (100%) y las diluciones al 90% y 70% con porcentajes de inmovilidad del 96,8 %, 94,8% y 90,4 % respectivamente. Se encontró diferencias significativas, entre todos los tratamientos evaluados ($P<0,05$). El control con ADE registró un 3% de inmovilidad a las

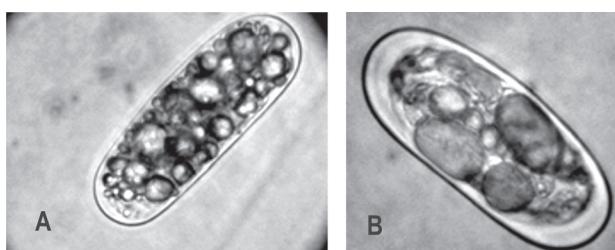


Figura 2. Alteraciones morfológicas producidas por el filtrado de la cepa UdeA0106 sobre estadios de *Meloidogyne* spp. a las 24 horas A. Contenidos vacuolados en un huevo inmaduro. 40X B. Observación de vacuolas en un huevo con un J2 en formación.100X (Fotografías: Harold Pavas).

24 horas, y 0 % a las 48 y 72 horas en los estadios J2 de *Meloidogyne* spp. De acuerdo con el estadístico de Tukey, todos los tratamientos mostraron diferencias con el control, considerándose como los mejores, aquellos que tuvieron los mayores porcentajes de inmovilidad como los presentados por las concentraciones del 100 y el 90 %, en todos los tiempos evaluados (figura 4).

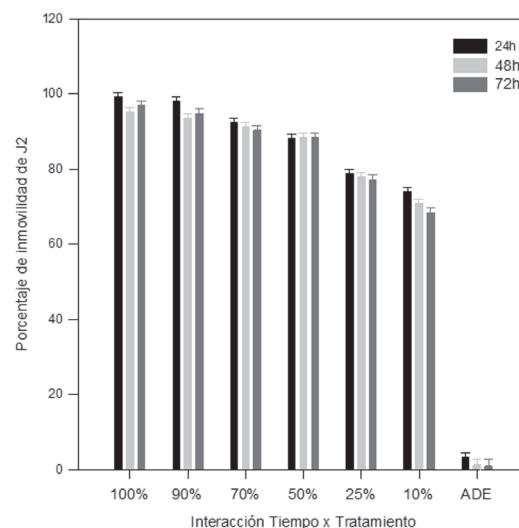


Figura 3. Porcentaje de inmovilidad de J2 para cada uno de los tratamientos en los tres tiempos evaluados (24,48, 72 horas), comparados con su control.

Discusión

La actividad de filtrados de hongos nematófagos contra especies de nematodos fitoparásitos ha sido reportada en años anteriores (Cayrol et al., 1989; Mayer et al., 1999; Kerry, 2000) y los compuestos derivados de estos hongos con propiedades tóxicas y/o enzimáticas, se han registrado como una fuente promisoria



Tabla 3. Resultados del ANOVA de estadios inmóviles de J2 de *Meloidogyne* spp. durante su tiempo de exposición en las diferentes diluciones

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Valor p
Tiempo de exposición	0.15	2	0.007	12.154	<0.000
Tiempo de exposición * Concentración	0.13	10	0.001	2.1	0.043

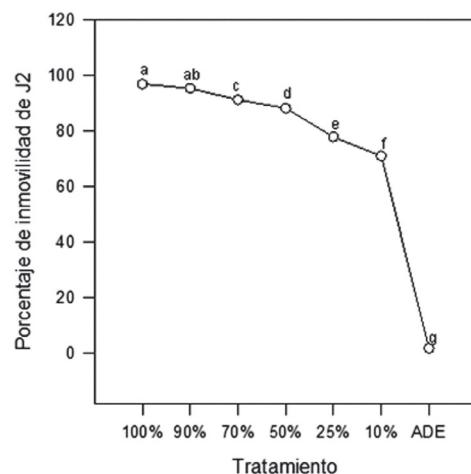


Figura 4. Promedio del porcentaje de inmovilidad de los J2, en la variable Concentración del filtrado, en los tres tiempos de evaluación. De acuerdo con el estadístico de comparación múltiple de medias de Tukey se observa como todos los tratamientos presentan diferencias con el control (ADE) ($P=0.05$) al igual que entre ellos, excepto en las concentraciones de 100 y 90 %, cuyas medias presentan letras iguales (a).

de nuevas sustancias para el manejo de nematodos parásitos de plantas (Regaieg et al., 2010).

La existencia de efectos adversos de los filtrados de hongos sobre la eclosión de huevos y la mortalidad de nematodos parásitos de plantas han sido reportados por varios estudios (Cayrol et al., 1989; Mukhtar y Pervaz, 2003; Regaieg et al., 2010; Yang et al., 2010; Ayatollahy y Fatemy, 2010), y se ha demostrado como varios hongos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Talaromyces* sp., *Curvularia* sp., *Beauveria* sp., *Verticillium* sp., *Gymnoascus* sp.) entre otros, producen toxinas y antibióticos así como sustancias que aún no han sido identificadas (Al abed 2008.; Liu et al., 2008, 2009; Cardona et al., 2008; Ayatollahy y Fatemy, 2010).

Es importante señalar como el hongo en estudio, tuvo la capacidad de afectar los dos estadios evaluados mientras que, existen algunos registros de hongos

en los cuales, se ha observado que solo tienen la capacidad de inhibir uno de los estadios de los nematodos. En este sentido, Shinya et al., (2008) demostraron como aislados de *Lecanicillium lecanii* mostraron una alta actividad nematicida contra los huevos *Heterodera glycines*, en donde se observó inhibición de la embriogénesis en el huevo (huevos fertilizados pero sin desarrollo de juveniles) y en los huevos maduros (con formación de J2), este hongo evitó la eclosión; sin embargo no tuvo la capacidad de afectar la movilidad de los juveniles. Los resultados obtenidos por la cepa evaluada, con respecto a la capacidad de afectar J2 y huevos, concuerdan con el efecto del filtrado de *Metacordyceps chlamydosporia* sobre huevos y J2 de *Meloidogyne incognita-javanica*, en donde las diferentes diluciones del filtrado, ejercieron acción sobre estos (Mukhtar y Pervaz 2003; Perry et al., 2010). De otra forma, Regaieg et al. (2010) observaron que los filtrados de *V. leptobactrum* tenían un efecto sobre la movilidad de los J2 de *M. incognita* en las concentraciones de 10 y 50%, e inhibían la incubación de huevos después de 7 días de exposición con la dilución de 50%. Los mismos autores, realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido, demostrando alteraciones e inviabilidad en los huevos que fueron expuestos al tratamiento.

Adicionalmente, en el caso de *Metacordyceps chlamydosporia*, se encontró la producción de la toxina Verticilina A, B y C y se observó como las concentraciones de 80 y 100% inhibían la incubación de los huevos de *M. javanica*, y que el porcentaje de inhibición aumentaba proporcionalmente con el tiempo de exposición a filtrados crudos. De igual manera se encontró que a mayor concentración, se incrementaba la tasa de mortalidad de los J2 y que está a su vez era directamente proporcional al tiempo de exposición (Mukhtar y Pervaz, 2003). Los resultados del presente estudio, indican la presencia de igual forma de productos que son exudados hacia el medio, que no han sido identificados aún, lo cual hace necesario continuar los estudios en este sentido, con la cepa UdeA0106.

A pesar de que para este estudio no se determinó la naturaleza química de los compuestos del filtrado de la cepa UdeA0106 que pudieron tener un efecto sobre la inhibición en el porcentaje de eclosión, la mal-



formación de los huevos y en la inmovilidad de los estadios J2 de *Meloidogyne incognita-javanica*, existen investigaciones previas realizadas con otra cepa de este mismo hongo (Codificada como Cenicafé 9501). Esta cepa, producía enzimas hidrolíticas extracelulares como quitinasas, una serín proteasa y lipasas (Villa, 2006; Cardona et al., 2007, 2008), que son expresadas en procesos complejos que conllevan a la penetración y degradación de la cutícula del nematodo hospedero y su digestión celular, lo cual podría dar origen a las alteraciones morfológicas observadas. En los estudios de Cardona et al. (2008) se determinaron algunos genes candidatos que se expresaban en la interacción directa hongo- nematodo, pero se desconocía la probabilidad de que, metabolitos producidos directamente en el medio, sin ejercer el estímulo de la interacción, tuvieran capacidades nematicidas.

Con relación a lo anterior, desde hace varios años, Bonants et al. (1995) reportaron el efecto deletéreo del filtrado de un cultivo de *Purpureocillium lilacinum* sobre huevos de *Meloidogyne hapla*, sugiriendo que la causa de este efecto, se debe a una proteasa extracelular que actúa sobre huevos; sin embargo, no afectó a los J2. Este resultado, también fue registrado por el efecto del filtrado de *Lecanicillium lecanii* sobre huevos de *Heterodera glycines* (Shinya et al. 2008) *Metacordyceps chlamydosporia* o *Purpureocillium lilacinum* que han sido encontrados como hongos parásitos de huevos y productores de toxinas y enzimas contra nematodos fitoparásitos (Kiewnick y Sikora, 2006).

Se ha descrito, que la forma en que afecta la producción de toxinas por parte de estos hongos nematófagos, ocurre por diferentes vías; Cayrol et al. (1989) sugiere que algunas toxinas producidas por hongos poseen por ejemplo un mecanismo de acción sobre los receptores neurotrópicos de los nematodos. Adicionalmente, se ha encontrado que un número de hongos nematófagos, conocidos por su actividad proteolítica y quitinolítica, causan serias alteraciones a la estructura cuticular de los huevos, cambios en la permeabilidad de la pared de éstos o producen perforaciones en la cutícula de los embriones. Lo anterior, es producido por enzimas y metabolitos tóxicos, que a su vez pueden causar desórdenes fisiológicos (Mukhtar y Pervaz, 2003). Debido a los registros existentes, sería importante estudiar, si este tipo de metabolitos producidos en el medio por la Cepa UdeA0106, los cuales son producidos sin estímulo por parte del nematodo, eventualmente podría estar explicando la formación de vacuolas al interior de los huevos de *Meloidogyne* spp.

Conclusiones

Los resultados obtenidos por esta investigación demuestran como diferentes concentraciones del filtrado del cultivo de la cepa UdeA0106, obtenidas en el medio CPG, afectaron el desarrollo y eclosión de los huevos, así como la movilidad de los J2 de *Meloidogy-*

ne spp. De acuerdo con estos resultados, es necesario continuar con las investigaciones relacionadas con el uso de filtrados o metabolitos de los hongos biocontroladores de nematodos, ya que en un futuro, ésta podría constituirse en una alternativa en la producción de bioformulados en nuestro medio.

Referencias bibliográficas

- Al, abed A. M. 2008. *In vitro Studies on Nematode Interactions with their Antagonistic Fung in the Rhizosphere of Various Plants*. Faculty of Forest and Environmental Sciences, Albert Ludwigs Universität. Freiburg im Breisgau, Germany. 227 pp.
- Ayatollahy, E.; Fatem, S. 2010. *In vitro assessment of pathogenicity and culture filtrates of fungi against Heterodera schachtii*. *Applied Entomology and Phytopathology*. 77(2): 15-17.
- Bonants, P. J.; Fitters, P.F.; Thijss, H. den Belder E.; Waalwijk, C.; Hengling, J.W.1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology*. 141 (Pt 4): 775-84.
- Cardona, N.L.; Leguizamón, J. 1994. Aislamiento y Patogenicidad de hongos y bacterias al nematodo del nudo radical del café *Meloidogyne incognita-javanica* Goeldi. *Revista Fitopatología Colombiana*. 21(1): 39-52.
- Cardona, N.L. 2007. Caracterización molecular de la cepa "Cenicafé 9501", y anotación de genes involucrados en la interacción con huevos de *Meloidogyne incognita-javanica* provenientes de zona cafetera. Tesis para optar al título de PhD. en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 177 p.
- Cardona, N. L.; Betancur, J. F.; Rivera, L.F.; Gaitán, A. 2008. Identification of pathogenic candidate's genes in the interaction of the CENICAFFE 9501 strain with the root knot nematode *Meloidogyne incognita-javanica*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 61 (2): 4527-4541. ISSN 0304-2847.
- Cardona, H.V.; Montoya, T.G.J. 2013. Evaluación de la patogenicidad del bioformulado de esporas de *Purpureocillium* spp. (Cepa UdeA 0109) sobre poblaciones de *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de pregrado para optar por el título de Biólogo. Medellín (Colombia). Grupo BIOMA. Universidad de Antioquia. 52 p.
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita-javanica*, and their ability to overcome plant resistance genes. *Nematology*. 4: 605-608.
- Cayrol, J. C.; Djian, C.; Pijarowski, L. 1989. Study of nematicidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue Nématol.* 12 (4): 331-336.
- Coyne, D.L.; Nicol, J.M.; Claudius-Cole, B. 2007. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. ISBN 978-131-294-7. 82 p.
- Durán, B. 2012. Evaluación de la patogenicidad de la cepa UdeA0106 sobre poblaciones de Sinfilidos, en condiciones de invernadero. Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Biólogo. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.44p.
- Gallego, J. M. 2012. Compatibilidad del hongo entomopatógeno Cepa UdeA0106 con biocontroladores y productos fitosanitarios utilizados en cultivos de crisantemo. Tesis para optar al título de Magíster en Biología. Universidad de Antioquia. 122 pp.
- Giraldo, M. A.; Leguizamón, J.; Chaves, B. 1997. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para el control de *Meloidogyne incognita-javanica* Goeldi. en almacigos de café (*Coffea arabica* L.) variedad caturra. *Revista de Fitopatología Colombiana*. 21(2): 104-117.



- Hashem, M.; Abo-Elyousr, K. 2011 Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*. 30: 285-292.
- Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 38: 423-441.
- Kaşkavalci, G.; Tüzel, Y.; Dura, O.; Öztek, G.B. 2009. Effects of alternative control methods against *Meloidogyne incognita* in organic tomato production. *Ekoloji*. 18: 23 - 31.
- Kiewnick, S.; Sikora, R. A. 2006. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematology*. 8: 69-78.
- Liu, T.; Wang, L.; Duan, Y. X.; Wuang, X. 2008. Nematicidal activities of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 113-118.
- Liu, Y. J.; Zhai, C.Y.; Liu, Y.; Zhang, K. Q. 2009. Nematicidal Activity of *Paecilomyces* spp. and isolation a Novel Active Compound. *The Journal of Microbiology*. 47 (3): 248 - 252.
- Luansga, J.J.; Houbreken, J.; Van, DornT.; Hong, S.B.; Borman, A.M.; Hygel-Jones, N.L.; Samson R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett*. 321: 141-149.
- Mayer, A.; Kilian, M.; Hoster, B.; Sterner, O.; Anke, H. 1999. *In-vitro* and *in-vivo* nematicidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A. *Pesticide Science*. 55: 27-30.
- Meyer, S.L.F.; Huettel, R.N.; Liu, X.Z.; Humber, R.A.; Juba, J.; Nitao, J.K. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*. 6: 23-32.
- Mukhtar, T.; Pervaiz, I. 2003. *In vitro* Evaluation of Ovicidal and Larvicidal Effects of Culture Filtrate of *Verticillium chlamydosporium* Against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture & Biology*. 5 (4): 576-579.
- Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J. L. 2010. Root-Knot Nematode. MPG Books group. CABI UK. ISBN 978-1-84593-492-7. 488 p.
- Regajeg, H.; Ciancio, A.; Horrigue, N.; Grasso, G.; Rosso, L. 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 26: 2285-2289. DOI 10.1007/s11274010-0397-4.
- Salazar, D. 2013. Desarrollo de Métodos *in vitro* e Invernadero para el Control de *Scutigerella* sp. con la Cepa del Hongo UdeA0106 en Cultivos de Flores del Oriente Antioqueño. Tesis de grado como requisito parcial para obtener el título de Doctor en Biología. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. 160 p.
- Sánchez, J. Y. 2013. Estudio de viabilidad de las estructuras del hongo *Purpureocillium* sp. Cepa UdeA0109 formulado en un ingrediente inerte bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Seccional oriente - Carmen de Viboral. Grupo BIOMA. Universidad de Antioquia. 35 p.
- Shinya, R.; Aiuchi, D.; Kushida, A.; Tani, M.; Kuramochi, K.; Koike, M. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 291-297.
- Villa, C. 2006. Estudios *in vitro* sobre la patogenicidad de cultivos monospóricos del Hyphomycete sp. (Cenicafé 9501) sobre huevos de *Meloidogyne incognita-javánica* provenientes de café. Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. 51 p.
- Yang, Z.S.; Li, G.H.; Zhao, P.J.; Zheng, X.; Luo, S.L.; Niu, X.M.; Zhang, K.Q. 2010. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-010-0410-y.



Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*)

Effect of storage temperature on the viability of symbiotic nitrogen fixing bacteria used in the preparation of biological inoculants for crop pea (*Pisum sativum*) and soybean (*Glycine max*)

*Lina M. Moreno Conn**, *Adrián Pérez***, *Margarita Ramírez****, *Marcela Franco*****

Resumen

El nitrógeno es un elemento requerido en grandes cantidades por los cultivos, sin embargo, en el suelo es uno de los elementos más limitantes ya que se encuentra en formas poco disponibles para las plantas y debe ser incorporado a través de la fertilización química o por medio de la fijación biológica llevada a cabo por microorganismos. Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno han sido ampliamente utilizadas para la elaboración de inoculantes, constituyéndose en una alternativa viable para mejorar el rendimiento de los cultivos a través de un mejor suministro de este elemento. Estos inoculantes para que puedan ser comercializados deben cumplir con ciertos requisitos de calidad que garanticen el buen funcionamiento del producto. En este estudio se evalúo la viabilidad de las cepas ICA L9 e ICA J96 en inoculantes almacenados a temperaturas de 4 ± 2 , 18 ± 3 y 28 ± 2 °C durante 180 días y la actividad biológica en plantas de arveja y soya. Las cepas utilizadas pertenecen al Banco de Germoplasma de Microorganismos de Corpóica; para los ensayos biológicos se emplearon semillas de arveja variedad "Santa Isabel" y soya variedad "Corpóica Superior 6". Al evaluar la viabilidad de los inoculantes almacenados a 4 ± 2 °C, 18 ± 3 °C y 28 ± 2 °C, se evidenció que la temperatura no afectó la supervivencia y la concentración de rizobios después de 180 días de almacenamiento permitiendo observar un número de unidades formadoras de colonias por gramo superior a 10^8 , valor que garantiza la calidad del inoculante. En cuanto a la actividad biológica, se observó que las cepas inoculadas fueron infectivas y efectivas para la fijación biológica del nitrógeno, comparado con los testigos absolutos.

Palabras clave: nitrógeno, inoculantes, Banco de Germoplasma, arveja, soya.

Abstract

Nitrogen is an element required in large amounts by most crops, however, in soil is one of the most limiting and located in ways not available to the plant and must be incorporated through chemical fertilization or by biological fixation conducted by microorganisms. Fixing symbiotic bacteria nitrogen has been widely used for the production of inoculants, becoming a viable alternative to improve crop yields through a better supply of this element. These inoculants to be marketed must meet certain requirements quality to ensure the smooth operation of the product. This study assessed the viability of the strains ICA L9 and ICA J96 inoculants stored at temperatures 4 ± 2 , 18 ± 3 y 28 ± 2 °C for 180 days and the biological activity in pea and soybean plants. The strains used belong to the collection of work Germplasm Bank CORPOICA Microorganisms; for biological assays were used pea seeds variety "Santa Isabel" and soybean variety "Superior Corpóica 6". In assessing the viability of inoculants stored at 4 ± 2 °C, 18 ± 3 °C and 28 ± 2 °C, evidenced that the temperature did not affect the survival and

* Microbióloga Agrícola y Veterinaria MSc. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpóica C.I La Libertad. Km 19 vía Puerto López, Villavicencio-Meta. lmoreno@corpoica.org.co.
** Ingeniero de Producción Biotecnológica MSc. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpóica C.I Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca. urleyadrian@gmail.com.
*** Ingeniero agrónomo PhD. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpóica C.I Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca. mmramirez@corpoica.org.co.
**** Microbióloga. PhD. Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología. Bogotá-Cundinamarca. franco@javeriana.edu.co.



the concentration of rhizobia after 180 days of storage allowing to observe a number of colony forming units per gram than 10^8 , value that guarantees the quality of the inoculant. Concerning the biological activity, it was observed that the strains were inoculated infective and effective biological nitrogen fixation, absolute compared to controls.

Key words: nitrogen, inoculants, Germplasm Bank, pea, soybean

Recibido: noviembre 25 de 2013

Aprobado: octubre 17 de 2014

Introducción

El nitrógeno (N) es un elemento importante en el desarrollo de todos los organismos ya que hace parte estructural de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y componentes celulares; sin embargo, en el suelo es uno de los nutrientes más limitantes ya que se encuentra en formas poco disponibles y solo puede ser utilizado por un grupo de microorganismos altamente especializados, donde se incluyen las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofas de vida libre y simbóticas que se asocian con diferentes especies vegetales, especialmente las leguminosas (Racca, 2004). Esta asociación biológica es de gran importancia para la agricultura ya que contribuye a aumentar la fertilidad de los suelos a través de la fijación de nitrógeno y se estima que con la simbiosis establecida entre los rizobios y las leguminosas se puede fijar de 24 hasta más de 584 kg de nitrógeno/ha abasteciendo en algunos casos hasta el 90 % de las necesidades de las plantas (Ferrera y Alarcón, 2007; Lindström et al., 2010).

En la simbiosis rizobio-leguminosas, los dos organismos establecen una cooperación metabólica; por un lado las bacterias reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) por acción del complejo enzimático nitrogenasa a amonio (NH_4), el cual es exportado al tejido vegetal para su asimilación en proteínas y otros compuestos nitrogenados complejos. Por otra parte, durante la fotosíntesis, las plantas reducen el CO_2 en azúcares que son transportados a la raíz donde son aprovechados por los bacteroides que se encuentran dentro del nódulo, como fuente de energía para proveer ATP al proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN). Esta asociación es de gran importancia para la agricultura y los ecosistemas naturales ya que conlleva a un aumento significativo del nitrógeno disponible para las plantas, siendo la manera directa de incorporar el nitrógeno atmosférico al suelo. De igual forma pueden promover la toma de otros nutrientes como el fósforo, producir fitohormonas, vitaminas y sustancias antibacterianas capaces de mitigar el ataque por patógenos (Ernst, 2004) contribuyendo a disminuir la aplicación de insumos químicos y/o fertilizantes nitrogenados que han alterado significativamente los constituyentes del suelo y el equilibrio ecológico, modificando especialmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema (Reyes et al., 2008).

En los últimos años, las bacterias simbóticas fijadoras de nitrógeno perteneciente a la familia de las *Rhizo-*

biaceae han sido ampliamente utilizadas para la elaboración de inoculantes biológicos para cultivos de leguminosas como la arveja y la soya, constituyéndose en una alternativa viable para mejorar la nutrición y el rendimiento de los cultivos mediante una fijación biológica más eficiente del N_2 , con niveles que oscilan entre el 60 y 90 % de FBN para ser utilizado por las plantas, favoreciendo el desarrollo de una agricultura ecológicamente sostenible y reduciendo costos de producción (Alfonso et al., 2005).

En Colombia, la arveja es la segunda leguminosa de mayor importancia después del frijol por ser el motor de la economía de pequeños productores, con una producción calculada de 80000 toneladas de vaina para consumo fresco y 1200 toneladas de arveja seca para semilla cultivadas principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Tolima y Huila (Fenalce, 2010). Los mayores limitantes en la producción de este cultivo se ven reflejados en el incremento de costos de producción ya que esta leguminosa requiere altas dosis de fertilizantes que suplan las necesidades nutricionales de las plantas, debido a la baja productividad de los suelos en que se establecen generalmente estos cultivos; dichos suelos se caracterizan principalmente por bajos contenidos de nitrógeno disponible, baja mineralización de la materia orgánica y altas tasas de pérdida de nitrógeno por lixiviación o volatilización.

Para el caso de la soya, este cultivo ocupa el octavo lugar en superficie cosechada; el principal productor es el departamento del Meta con una participación en la producción nacional del 68,7 % y un área sembrada de aproximadamente 61000 ha con un rendimiento que oscila entre 2,5 y 3 ton/ha destinadas para la producción de aceite, harina de soya y grano para su uso en la alimentación humana o materia prima para la obtención de albúminas concentradas, convirtiéndose en una alternativa nutricional por su alto contenido de proteína de excelente calidad (Fenalce, 2010; Gutiérrez & Forero, 2007). La soya requiere de nutrientes durante su ciclo de desarrollo, entre ellos el nitrógeno, potasio, calcio, fósforo y azufre, indispensables para obtener altas producciones y buena calidad del grano, considerándose como uno de los cultivos que más extraen nutrientes en comparación con otras especies transitorias (Guerrero, 1993). Cerca del 50 % del nitrógeno total necesario para las plantas de soya es absorbido en la etapa de floración y llenado de vainas; sin embargo, la exigencia de nitrógeno diaria de esta leguminosa es dependiente del índice de crecimiento



y la etapa del desarrollo. Las principales fuentes de nitrógeno para este cultivo provienen del suelo cuando no establece asociación simbiótica y del N₂ atmosférico obtenido mediante el proceso de FBN cuando es inoculado con bacterias simbióticas pertenecientes a la familia de las *Rhizobiaceae* (George & Singleton, 1992). En la Altillanura Colombiana, la inoculación de las semillas de soya con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno como *Bradyrhizobium japonicum* es una práctica que se ha implementado en los últimos años y ha conllevado a disminuir hasta en un 80 % a 90 % la fertilización nitrogenada.

En el país, la producción de inoculantes biológicos ha venido abarcando un amplio mercado dentro del sector agropecuario nacional; actualmente existen alrededor de 71 empresas registradas y avaladas por el ICA destinadas a la producción de inoculantes con base en microorganismos promotores de crecimiento vegetal dentro de los cuales se incluyen las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (Zambrano, 2008). El uso de estos insumos en cultivos de interés como es el caso de la arveja y soya se ha venido incrementando acorde a las demandas generadas por los productores en su afán por reducir costos de producción. El ICA como entidad responsable de garantizar la calidad de los insumos agrícolas expidió en la resolución 0698 del 2011 que los inoculantes para ser comercializados deben cumplir con rigurosos estándares de calidad microbiológica que garantice el buen funcionamiento del producto y que permitan al agricultor utilizarlos en un determinado período de tiempo. El manejo inadecuado de los productos tanto en la etapa de almacenamiento, preparación y almacenamiento puede traer como consecuencia una baja viabilidad y efectividad de los inoculantes (Reyes et al., 2008; Munévar & Ramírez, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre la viabilidad y actividad biológica de las cepas ICA L9 e ICA J96 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *Bradyrhizobium japonicum*) utilizadas en la elaboración de inoculantes sólidos con base en turba para el cultivo de arveja y soya, durante 180 días.

Materiales y métodos

Material biológico

Las cepas ICA L9 e ICA J96 utilizadas para la elaboración de los inoculantes hacen parte del Banco de Germoplasma de Microorganismos del Centro de Investigación de Corpoica. La cepa ICA L9 se aisló a partir de raíces noduladas de *Pisum sativum*. La cepa ICA J96 fue aislada a partir de raíces noduladas de *Glycine max*; este aislamiento es utilizado para la elaboración de inoculantes biológicos para el cultivo de soya por

Corpoica. Para los ensayos de actividad biológica bajo condiciones controladas en invernadero, se utilizaron semillas de arveja variedad "Santa Isabel" y soya variedad "Superior 6". La variedad de arveja "Santa Isabel" es la más cultivada en Colombia con un rendimiento promedio entre 4000 a 4500 tn/ha, se adapta a altitudes entre 2200 y 3000 msnm. Por otra parte, la variedad de soya "Superior 6" es un material desarrollado por Corpoica en el centro de investigaciones La Libertad ubicado en Villavicencio-Meta, como alternativa genética para la Orinoquia colombiana con adaptación a suelos de vega del Piedemonte llanero y suelos mejorados de la Altillanura, a altitudes entre 150 y 1200 msnm (Corpoica, 2006). Las semillas de arveja y soya se desinfectaron previamente sumergiéndolas en etanol al 85% por 20 seg, luego se pasaron a hipoclorito de sodio al 2 % por dos min y finalmente se enjuagaron con suficiente agua destilada con el objeto de eliminar el exceso de las soluciones desinfectantes.

Preparación del pre-inóculo

Cada una de las cepas almacenadas a 4 °C fueron reactivadas en 500 ml de medio levadura-manitol (LM); la cepa ICA L9 se llevó a incubación por 24 a 48 h teniendo en cuenta que es una bacteria de crecimiento rápido. Para el caso de la cepa ICA J96 por ser una bacteria de crecimiento lento, se dejó en incubación hasta las 72 h a una temperatura de 28±2 °C y 120 rpm. Una vez que se observó la turbidez del medio de cultivo, como indicio del crecimiento de los microorganismos, se procedió a inocular cada cepa en 3000 ml de medio LM e incubar por 24-48-72 h a 28±2 °C y agitación orbital a 120 rpm. Posteriormente se realizó un control de calidad a cada inóculo líquido para verificar la pureza, mediante la técnica de diluciones seriadas utilizando solución salina al 0,85 % y siembra en superficie sobre el medio levadura-manitol-agar (LMA) suplementado con Rojo Congo. Los resultados de los conteos se expresaron en unidades logarítmicas (UL).

Elaboración de los inoculantes

Se tomaron 35 ml de la cepa ICA L9, en fase exponencial con una concentración de 8x10⁸ UFC de rizobios/ml, y se inyectaron en 62,5 g de turba proveniente del departamento de Antioquia, previamente esterilizada a 120 °C y 15 lb de presión por tres días con intervalos de 24 h; este mismo procedimiento se realizó con la cepa ICA J96. La turba utilizada se caracterizó por presentar porcentajes altos de materia orgánica, según el análisis químico (tabla 1). De cada cepa se inocularon 90 bolsas y se tomaron como controles negativos las bolsas impregnadas con el medio de cultivo LM estéril sin microorganismos, para un total de tres tratamientos por cada temperatura evaluada (T1: inoculantes elaborados con la cepa ICA L9, T2: inoculantes elaborados con la cepa ICA J96, T3: control negativo). Los inoculantes se llevaron a incubación durante 24-48 h a



28±2 °C; posteriormente se almacenaron a tres temperaturas (4±2, 18±3 y 28±2 °C) por un periodo de seis meses (180 días); para las evaluaciones se tomaron 4 bolsas de cada tratamiento por cada temperatura a las cuales se les realizó el control de calidad para verificar la pureza y viabilidad de las cepas. La primera evaluación se realizó 5 días después de la inoculación sobre el soporte turba, a partir de este momento se evaluó la pureza y viabilidad, teniendo en cuenta 4 tiempos: T1: 15 días después de la incubación, T2: 60 días después de la inoculación, T3: 120 días después de la inoculación, T4: 180 días después de la inoculación. La pureza de los inoculantes se determinó mediante el conteo del número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) utilizando el método de recuento en placa de diluciones en base diez en medio LMA y características microscópicas de las cepas, teniendo en cuenta los protocolos establecidos en el manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes de Corpoica (Corpoica, 2007) y el manual Bergey (2005).

Los datos se analizaron por medio de estadística descriptiva y por comparación entre medias utilizando la prueba de Duncan ($p<0,05$) con un nivel de confianza del 95 % empleando el programa SAS versión 8.3.1.

Actividad biológica

Para evaluar la actividad biológica de la cepa ICA L9 (*R. leguminosarum* bv. *viceae*), se establecieron ensayos en invernadero con semillas de arveja variedad "Santa Isabel" inoculadas con el producto; para el caso de la soya variedad "Superior 6" se inocularon con la cepa ICA J96 (*B. japonicum*) previamente desinfectadas. La cantidad de inóculo utilizado para cada ensayo fue de 5 g/kg mezclado con una solución de sacarosa al 10 % para permitir la impregnación de la semilla con el inoculante (Corpoica, 2007). Los ensayos se establecieron de forma independiente bajo condiciones de invernadero con una temperatura promedio entre 10,9 y 32,9 °C y una humedad relativa entre 50 y 70%; los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 2.

Se realizaron muestreos destructivos de las plantas de arveja y soya cada dos meses después de la siembra e inoculación y se evaluaron variables dependientes

como altura de planta, peso seco foliar y radical, número y color de los nódulos.

El diseño estadístico empleado para los ensayos fue el de bloques completos al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Se aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple con la prueba de Duncan ($p<0,05$) con un nivel de confianza del 95 % empleando el programa SAS versión 8.3.1, para la determinación de diferencias entre los tratamientos evaluados.

Reducción de acetileno para la determinación de la actividad de la nitrogenasa

La actividad del complejo enzimático nitrogenasa evaluado en las cepas ICA L9 e ICA J96 se determinó en las raíces noduladas de las plantas de arveja y soya inmediatamente después del muestreo, utilizando la técnica de reducción de acetileno en un cromatógrafo de gases marca Perkin-Elmer 3920B, con detector de llama FID, columna empacada Poropack R (malla 80/100) de 200 cm de longitud y 0,2 cm de sección e inyector manual (Corpoica, 2007).

Resultados y discusión

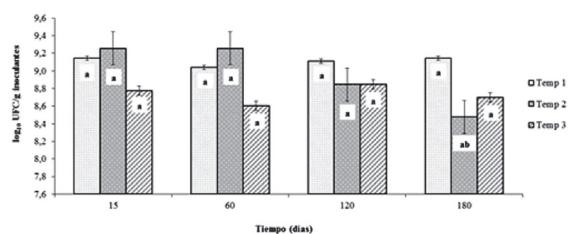
Al realizar el control de calidad de los inoculantes después de 5 días de incubación se observó que la cepa ICA L9 se multiplicó en el soporte turba aumentando el número de células en 0,43 unidades logarítmicas (UL), mientras que la cepa ICA J96 no tuvo un aumento en el número de células bacterianas (tabla 3); este resultado se pudo deber al cambio drástico medioambiental al que son sometidas las cepas y está relacionado con el tiempo de adaptación y multiplicación ya que la cepa ICA J96 es un microorganismo de crecimiento lento con una fase exponencial entre 22 a 50 h, la capacidad de adaptación al soporte y utilización de los diferentes sustratos, generando en algunos casos la disminución de la biomasa celular.

Efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre la viabilidad de las cepas

Al evaluar el efecto de las temperaturas 4±2, 18±3 y 28±2 sobre la viabilidad de la cepa ICA L9 en los ino-

Tabla 1. Características químicas de la turba utilizada para la elaboración de los inoculantes.

Textura	Ph	%M.O	P	S	AL+H cmol/ kg	Sat. AI %	Cationes cambio						C.E.	Elementos menores					
							AI	Ca	Mg	K	Na	CICE		Fe	Cu	Mu	Zn	B	
			cmol(+)/kg						mg/kg					mg/kg					
F	7.3	22.6	31	36.5	0	0	0	0	20.6	1.45	0.36	0.41	22.8	2.34	79	1	2	4.1	0.17
Franco	N					NL		A	B	M	A				A	M		A	B



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$). Temperatura 1: 4 ± 2 °C; Temperatura 2: 18 ± 3 °C; Temperatura 3: 28 ± 2 °C; Las barras indican la diferencia media significativa.

Figura 1. Efecto de las temperaturas de almacenamiento 4 ± 2 , 18 ± 3 y 28 ± 2 °C sobre el número de UFC/g en los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 hasta los 180 d de evaluación.

Tabla 2. Tratamientos evaluados en invernadero sobre arveja y soya inoculadas con las cepas ICA L9 e ICA J 96 almacenados a diferentes temperaturas.

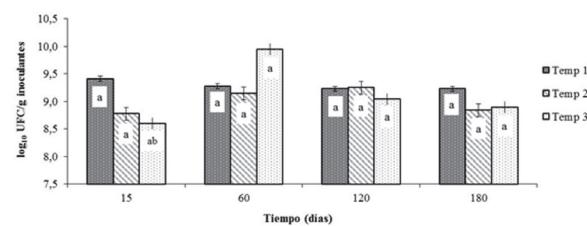
Hospedero - arveja	Hospedero - soya
T1: Inóculo ICA L9 (4 ± 2 °C)	T1: Inóculo ICA J96 (4 ± 2 °C)
T2: Inóculo ICA L9 (18 ± 3 °C)	T2: Inóculo ICA J96 (18 ± 3 °C)
T3: Inóculo ICA L9 (28 ± 2 °C)	T3: Inóculo ICA J96 (28 ± 2 °C)
T4: Testigo absoluto (Sin inocular)	T4: Testigo absoluto (Sin inocular)
T5: Testigo químico (200 ppm N ₂)	T5: Testigo químico (200 ppm N ₂)

Tabla 3. Logaritmo de UFC/ml obtenidos a partir del control de calidad de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96, después de 5 días de incubación.

Cepa	log UFC/ml Inóculo inicial	log UFC/g Inoculantes
ICA L9	8,47	8,90
ICA J96	8,60	8,60

culantes se observó que la concentración celular se mantuvo en 10^8 hasta los 180 días de almacenamiento, no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p < 0,05$) en el número de rizobios presentes en los inoculantes (figura 1). Con este resultado se puede justificar que aunque no hubo un efecto significativo de la temperatura sobre la viabilidad de la cepa, si se observó claramente un incremento en la concentración inicial pasando de

8,90 UL/g a 9,14 UL al almacenar el inoculante a temperatura de 4 ± 2 °C; este incremento en la concentración celular puede estar relacionado con el contenido de materia orgánica y los nutrientes encontrados en la turba utilizada como soporte, que permitieron el desarrollo y multiplicación de las bacterias presentes en el inoculante. Después de 60 días de almacenamiento, estos nutrientes pudieron agotarse paulatinamente a través del tiempo, especialmente el manitol utilizado por los rizobios como fuente de carbono, disminuyendo así la concentración celular del microorganismo evaluado.



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$). Temperatura 1: 4 ± 2 °C; Temperatura 2: 18 ± 3 °C; Temperatura 3: 28 ± 2 °C; Tiempo 1: 15 días almacenamiento; Tiempo 2: 60 d; Tiempo 3: 120 d; Tiempo 4: 180 d. Las barras indican la diferencia media significativa.

Figura 2. Efecto de las temperaturas de almacenamiento 4 ± 2 , 18 ± 3 y 28 ± 2 °C sobre el número de UFC/g en los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 hasta los 180 d de evaluación.

En los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 almacenados a 4 ± 2 , 18 ± 3 y 28 ± 2 °C se observó que desde los 120 hasta los 180 días de evaluación el número de unidades formadoras de colonias se mantuvo en 9,23 UL/g de inoculante, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas evaluadas (figura 2).

Con estos resultados obtenidos sobre los inoculantes elaborados con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, se puede observar que las temperaturas de almacenamiento no tuvieron un efecto marcado sobre la población bacteriana ya que hasta el final de la evaluación (180 días) se mantuvo el número de UFC/g de inoculante, con una concentración de 10^8 lo cual hace que sea apto para su uso. Los inoculantes elaborados con turba estéril deben contener un mínimo de 1×10^8 células viables de rizobios (*Rhizobium* sp. y/o *Bradyrhizobium* sp.) por gramo de inoculante en fábrica hasta el término de su vida útil. Sin embargo, este requerimiento varía de acuerdo a las legislaciones vigentes para cada país (Rossi, 2005). En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en la resolución 0698 del 2011 exige que los inoculantes elaborados con base en bacterias fijadoras de nitrógeno



contengan una concentración mínima de 1×10^8 UFC/g de inoculante, para su comercialización.

La temperatura óptima para el crecimiento de los rizobios en medios de cultivo e inoculantes sólidos puede variar entre cepas y especies, con valores entre 27 °C y 39 °C. Las temperaturas máximas en las cuales pueden crecer estos microorganismos se encuentran en el rango de 35-39 °C, sin embargo, se ha observado aumentos en la proliferación celular de los rizobios hasta los 42 °C. Esta característica es importante ya que cepas utilizadas para los inoculantes, adaptadas a altas temperaturas de almacenamiento pueden sobrevivir bajo las condiciones de suelos tropicales, las cuales oscilan entre 27 y 50 °C (Abdulland & Al-falih, 2002). Kremer y Peterson (1983) evaluaron diferentes soportes para la preparación de inoculantes entre ellos turba, carbón vegetal, bentonita y aceite vegetal, encontrando que la turba y el aceite vegetal puede mantener un alto número de rizobios ($> 10^8$) almacenados a temperatura entre 30 y 60 °C después de 6 meses; para el caso del aceite vegetal, observaron que la alta supervivencia y viabilidad de los rizobios se debe a que este soporte puede proteger a las células bacterianas contra el calor y condiciones de sequía por el uso de altas temperaturas de almacenamiento.

Estrada et al., (2009) evaluaron diferentes temperaturas para el almacenamiento de inoculantes con base en bacterias diazotróficas, entre ellas *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Rhizobium tropici* (SP245) encontrando que los inoculantes elaborados con base en *H. seropedicae* y *R. tropici* (SP245) almacenados a 4 °C mantuvieron la concentración celular por encima de 10^8 UFC/g de inoculante durante los 150 días de evaluación comparado con las otras bacterias evaluadas. Este resultado es similar al obtenido con los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 almacenados a 4 °C, donde a los 180 días de almacenamiento, aún mantuvieron una concentración de 10^8 UFC/g de inoculante.

Temprano et al., (2002) encontraron que inoculantes elaborados con *Rhizobium* sp. almacenados a 25 ± 3 °C, presentaron un incremento inicial en el número de células viables a las dos semanas de almacenamiento; luego éste se redujo durante las ocho semanas siguientes a una concentración por debajo de 10^8 UFC/g de inoculante. En este trabajo de investigación, los inoculantes sólidos elaborados con base en *Rhizobium* sp. almacenados a 28 ± 2 °C presentaron 10^8 UFC/g durante 180 días. Con este resultado se puede inferir que los inoculantes son aptos para su comercialización ya que se conservan durante 180 días con un número de UFC/g en 10^8 . Según Kuykendall et al., (2005) la temperatura óptima para el crecimiento y multiplicación de rizobios es entre 25 y 30 °C.

Tittabutr et al., (2007) encontraron que cepas de crecimiento lento pueden sobrevivir más tiempo (> 6 me-

ses) almacenadas en inoculantes sólidos con base en turba, e incluso en inoculantes líquidos, comparadas con cepas de crecimiento rápido; sin embargo, la eficiencia de los rizobios puede disminuir con el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, largos períodos de almacenamiento (> 1 año) pueden traer cambios fisiológicos en las células bacterianas, reducción en la viabilidad y tasa de multiplicación, interferir en la síntesis de proteínas, ADN, ARN, disminución del vigor celular por la pérdida de genes dispensables ex planta posiblemente ligados a plásmidos portadores de genes simbóticos y aumentar el tiempo de nodulación en las raíces de las leguminosas, disminuyendo la eficiencia de los rizobios en los inoculantes (León et al., 1986).

A mayor temperatura de almacenamiento de los inoculantes, se acelera los procesos biológicos, específicamente la respiración de los microorganismos dentro del empaque, agotando en menor tiempo el sustrato y disminuyendo la cantidad de carbono disponible (Pérez & Torralba, 1997 citado por Jiménez, 2007). Sin embargo, este efecto no es visible en esta investigación debido a que el material utilizado como soporte es turba la cual se caracterizó por un alto contenido de materia orgánica (22,6 %), lo cual pudo proveer de nutrientes a las bacterias en su etapa de multiplicación permitiendo una mayor supervivencia en condiciones de déficit hídrico y temperaturas elevadas (Hungria et al., 2005).

Albareda et al., (2008) evaluaron diferentes sustratos para la preparación de inoculantes con base en *Sinorhizobium freddi* SMH12 (*Ensifer*) y *B. japonicum* USDA110, observando que el compost de corcho, perlita y la turba son soportes eficaces ya que permitieron la supervivencia de altas poblaciones de rizobios con concentraciones de 10^{10} UFC/g de inoculantes y se mantuvo sin cambios por un periodo de 90 y 120 días de incubación a temperatura de 25 °C. Al final del tiempo de almacenamiento, el número de células viables para las cepas SMH12 y USDA110 fue superior a 10^9 y 5×10^8 UFC/g respectivamente en los inoculantes elaborados con turba. Aunque la turba es un recurso natural sujeto a procesos de degradación natural y humano, ha sido el sustrato más ampliamente utilizado en la elaboración de inoculantes ya que presenta ventajas como estabilizar el número de bacterias dentro del producto, protegerlas durante el período de almacenamiento y factores adversos del suelo como altas temperaturas, deshidratación y proveer mejor adhesión a la semilla en el momento de la inoculación (Drevon, 2009).

Actividad biológica de los inoculantes evaluada sobre variables agronómicas en plantas de arveja

Para la variable peso seco foliar y radical de las plantas inoculadas con la cepa ICA L9 no se observaron dife-



encias estadísticamente significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p<0,05$) entre los inoculantes almacenados a 4 ± 2 °C, 18 ± 3 °C y 28 ± 2 °C a los 15, 60, 120 y 180 d. El testigo químico y el testigo absoluto presentaron los menores valores de peso seco foliar y radical con respecto a los tratamientos inoculados (tabla 4). El testigo químico mostró un valor menor para la variable de peso seco radical de 0,04 g con respecto al testigo absoluto de 0,07 g en los ensayos de evaluación de 120 días de almacenamiento de los productos. Las plantas de arveja inoculadas con los productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas no presentaron diferencias significativas para las variables de peso seco de la parte aérea y radical con respecto al testigo químico.

Este resultado muestra la necesidad de incluir el nitrógeno como elemento esencial en la nutrición de las plantas; en los ensayos de inoculación se observó que el N pudo ser tomado por la FBN a través de la asociación con los rizobios o el nitrógeno contenido dentro de la fertilización. Para el caso de las plantas asociadas a rizobios o en simbiosis, la sustitución del nitrógeno puede ser hasta en un 80-90 % lo cual disminuiría la aplicación de fertilizantes nitrogenados que aporten este elemento. Lo anterior se confirma con los menores valores obtenidos para esta variable, obtenidos con el testigo absoluto. El peso seco de la parte aérea y radical es un parámetro útil para determinar la influencia de la inoculación de la cepa ICA L9 sobre la producción de materia verde en las plantas de arveja, teniendo en cuenta que la disponibilidad de nitrógeno procedente de la fijación biológica se inicia aproxi-

madamente 20 días después de la siembra, lo cual ha generado una controversia entre diferentes investigadores y asistentes técnicos, ya que algunos consideran necesario adicionar una pequeña cantidad de N mineral (30kg/ha) para estimular el crecimiento inicial de las plántulas, favorecer el establecimiento de las cepas en el cultivo y estimular la formación de los nódulos en la raíz (Silvestre 1983 citado por Mora, 1995). Sin embargo, en este trabajo de investigación, no se adicionó nitrógeno en ninguno de los ensayos evaluados con las semillas inoculadas a través del tiempo, razón por la cual se puede pensar que la asociación entre los rizobios y la leguminosa se presentó de forma natural con la formación de nódulos en las raíces de arveja estimulada quizás por el nitrógeno presente en el soporte o por el contenido dentro de la semilla, necesario en la etapa de crecimiento y desarrollo de las plantas.

Por otra parte, las plantas inoculadas con rizobios tienden a tener mayor capacidad fotosintética expresada en el área foliar con respecto a las plantas no inoculadas. Peñaranda (2004) evaluó plantas de arveja variedad "Santa Isabel" inoculadas con la cepa ICA L9, encontrando un mayor peso de la parte aérea de las plantas inoculadas con respecto al testigo químico y absoluto, 99 días después de la siembra del cultivo. Esta característica se vio reflejada en una mayor capacidad productiva por el cultivo, generando plantas con mayor tasa absoluta de crecimiento e índice de área foliar aumentando la biomasa vegetal.

Ramírez et al., (2007) realizaron ensayos de eficacia con la cepa ICA L9 de *Rhizobium* inoculada sobre arveja (*Pisum sativum*) bajo condiciones de campo, donde

Tabla 4. Efecto de la inoculación de la cepa ICA L9 en plantas de arveja variedad "Santa Isabel" sobre las variables peso seco foliar y radical.

Fuente variación	Tiempo (días)							
	15		60		120		180	
	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)
GLM	**	**	**	**	**	**	**	**
ICA L9 (1)	0,11a	0,07a	0,16a	0,06a	0,35a	0,03a	0,32a	0,18a
ICA L9 (2)	0,09a	0,06a	0,17a	0,06a	0,39a	0,14a	0,28a	0,16a
ICA L9 (3)	0,08a	0,06a	0,17a	0,06a	0,39a	0,14a	0,28a	0,16a
Testigo absoluto	0,05b	0,04b	0,05b	0,03b	0,12b	0,07b	0,22b	0,12b
Testigo Químico	0,06b	0,04b	0,07b	0,04b	0,10b	0,04c	0,28a	0,16a
CV	75,95	79,26	45,77	43,01	35,64	37,10	42,41	47,63

(1) Temperatura almacenamiento 4 ± 2 °C; (2) Temperatura almacenamiento 18 ± 3 °C; (3) Temperatura almacenamiento 28 ± 2 °C, ** Diferencias estadísticamente significativas ($p\leq0,01$); * Diferencias significativas ($p\leq0,05$); ns: no diferencias significativas de acuerdo al ANOVA, Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p\leq0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan.



observaron que la inoculación mostró un beneficio en el desarrollo y crecimiento de las plantas, viéndose reflejado este efecto en el peso fresco y seco de la parte foliar con valores de 328,56 y 37,26 g al compararlos con el testigo absoluto con valores de 273,15 y 30,24 g respectivamente, observándose una mayor acumulación de biomasa en los tratamientos inoculados con la cepa ICA L9, en la época de cosecha.

Para las variables de longitud foliar, radical y número de nódulos se pudo observar que no hay diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p<0,05$) entre los inoculantes almacenados a $4\pm2^{\circ}\text{C}$, $18\pm3^{\circ}\text{C}$ y $28\pm2^{\circ}\text{C}$ durante 15, 60 y 180 d; sin embargo, visualmente es evidente las diferencias entre las plantas inoculadas con respecto al testigo químico y el testigo absoluto (figura 3). Las plantas inoculadas con la cepa ICA L9 independientemente de las temperaturas de almacenamiento del producto, fueron las más vigorosas, mostrando una longitud foliar y radical mayor comparadas con los testigos. Este resultado muestra el beneficio proporcionado a las plantas con la inoculación, y surge como una alternativa viable para disminuir el uso de fertilización química nitrogenada con una reducción en los costos de producción (Alfonso et al., 2005). Es evidente que el nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este efecto se vio claramente en las plantas no inoculadas (testigo absoluto) donde la no aplicación del mismo produjo un efecto negativo sobre las variables evaluadas.

En cuanto a las estructuras nodulares encontradas en las raíces de las plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9, se observó la formación de nódulos indeterminados que generalmente se forman en leguminosas de zona templada como *Lupinus* sp, *Vicia* sp, *Pisum* sp o *Medicago*; estos nódulos se caracterizan por presentar

una forma alargada con un meristemo nodular que es persistente y un cordón de infección ancho; Una característica importante que sirve para diferenciar los nódulos indeterminados de los determinados es que estos estimulan la producción de polímeros de reserva de poli β -hidroxibutirato (PHB) los cuales juegan un papel importante en el metabolismo celular de la bacterias interviniendo en el proceso de infección, nodulación y fijación de nitrógeno (Trainer et al., 2006). Cuando se está dando la FBN por los bacteroides dentro del nódulo, estos toman una coloración roja dada por la proteína leghemoglobina encargada de mantener los niveles de oxígeno dentro de la estructura; en este momento se determina que los rizobios son efectivos llevando a cabo este proceso biológico (figura 4).

Se determinó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje de los productos almacenados a las tres temperaturas durante los primeros 15 días, teniendo en cuenta la expresión propuesta por Beck et al., 1993 citado por León et al., (2002):

$$\text{IEI} = (msi - msni) / (mscn - mschin) \times 100$$

Donde msi es la materia seca del tratamiento inoculado, msni: materia seca del tratamiento control no inoculado, mscn: materia seca del control con nitrógeno y mschin: materia seca control no inoculado, sin nitrógeno; y se clasifica así:

- Inefectivo = Menos del 50% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)
- Parcialmente efectivo = 50-75% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)

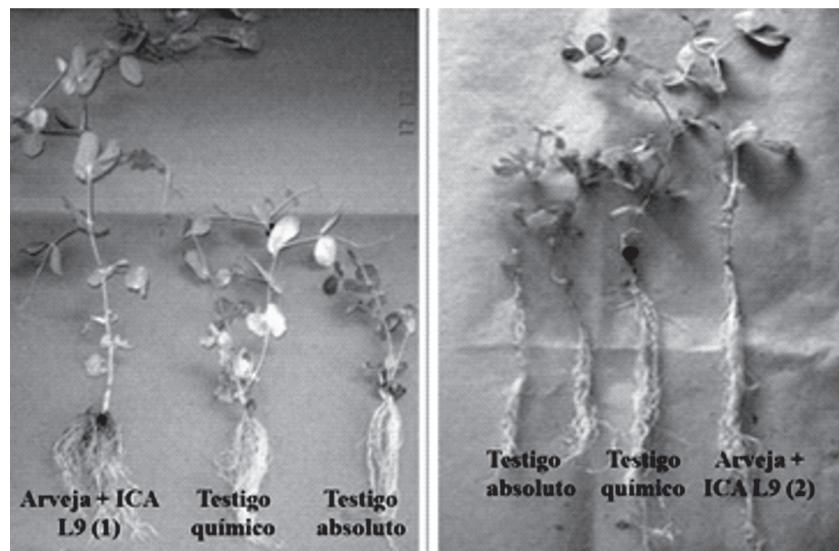


Figura 3. Efecto de la inoculación de la cepa ICA L9 en plantas de arveja variedad "Santa Isabel" sobre las variables longitud foliar y radical.



Figura 4. Nódulos indeterminados encontrados en las raíces de las plantas de arveja donde se observa una coloración roja en el interior lo cual muestra la funcionalidad en la FBN.

- Efectivo = 75-100% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)

Según el IEI, los inoculantes almacenados a temperatura de 4 ± 2 °C, fueron los más efectivos con un porcentaje del 90 % comparado con los almacenados a 18 ± 3 °C y 28 ± 2 °C con valores de 60 y 50 % respectivamente. Este resultado puede estar relacionado con la disminución de las actividades metabólicas de los microorganismos en el inoculante ya que cuando se encuentran almacenados en nevera entran en estado de latencia, esto se refleja con la disminución en el consumo de nutrientes encontrados en el soporte, tolerando así varios períodos de almacenamiento; cuando son inoculados en el suelo, activan su maquinaria enzimática para llevar a cabo las diferentes funciones como la FBN. Por otro lado, los microorganismos que se encuentran almacenados a temperaturas más altas dentro del producto, pueden llegar a utilizar los nutrientes encontrados en el soporte, para llevar a cabo sus funciones metabólicas de acuerdo a sus requerimientos, pasando por la etapa de adaptación, exponencial, latencia y decline dentro del mismo sustrato. Es posible que cuando se inocularon estos productos en las leguminosas, el número de rizobios haya disminuido por efecto de la temperatura y humedad en el invernadero durante el tiempo de evaluación y esto conllevo a que el proceso de nodulación haya sido menos eficiente y así mismo, la fijación biológica de nitrógeno; lo cual se pudo ver reflejado en una menor producción de biomasa fresca en las plantas inoculadas.

Actividad biológica de los inoculantes evaluada sobre variables agronómicas en plantas de soya

Para evaluar la actividad biológica de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 en plantas de soya se tuvo en cuenta variables agronómicas como el peso

seco foliar y radical; según el análisis de varianza realizado para el peso seco foliar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas de soya inoculadas con los productos almacenados a diferentes temperaturas durante 15, 60, 120 y 180 días. Para la variable de peso seco radical, se pudo observar que los inoculantes utilizados en soya almacenados durante 15 y 180 días a diferentes temperaturas, no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo químico y absoluto (tabla 5). Este resultado puede estar relacionado con la dinámica de crecimiento y establecimiento de los rizobios en el soporte después de 15 días de elaborados los productos y la disminución en el número de células viables después de 180 días de almacenamiento.

Mannasila et al., (2007) evaluaron el efecto de cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii* sobre el crecimiento en plantas de soya (*Glycine max*) y fríjol mongo (*Vigna radiata*), encontrando que hay una relación directa entre el efecto de la inoculación sobre la materia seca de las plantas, número y peso fresco de nódulos, con respecto a los testigos sin inocular donde los valores son menores; estos resultados son similares al obtenido en este trabajo de investigación ya que demuestra claramente el efecto positivo que tienen las plantas de soya inoculadas en la producción de materia seca, sin haber un efecto directo en las temperaturas de almacenamiento de los productos; lo cual indica que sí hubo una asociación de los rizobios con las plantas y adquisición de nitrógeno mediante la fijación biológica.

Para las variables longitud foliar, radical y número de nódulos se pudo observar que no hay diferencias estadísticamente significativas en las plantas inoculadas con los productos almacenados durante 15, 60 y 180 días a diferentes temperaturas (tabla 6); pero sí es evidente un efecto negativo en el testigo químico y absoluto en cuanto al desarrollo radical de las plantas (figura 5). En el caso de la longitud



Tabla 5. Efecto de la inoculación de la cepa ICA J96 en plantas de soya variedad “Superior 6” sobre las variables peso seco foliar y radical.

Fuente variación	Tiempo (días)							
	15		60		120		180	
	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)	Peso seco foliar (gr)	Peso seco radical (gr)
GLM	**	**	**	**	**	**	**	**
ICA J96 (1)	0,43a	0,11a	0,51ab	0,16a	0,44a	0,13a	0,43a	0,11a
ICA J96 (2)	0,45a	0,13a	0,47b	0,14a	0,44a	0,12a	0,45a	0,13a
ICA J96 (3)	0,46a	0,11a	0,60a	0,17a	0,47a	0,14a	0,46a	0,11a
Testigo absoluto	0,32b	0,10a	0,17c	0,06b	0,25c	0,08b	0,32b	0,10a
Testigo Químico	0,35b	0,11a	0,25c	0,07b	0,33b	0,09b	0,35b	0,11a
C.V	39,82	62,38	43,08	45,78	47,27	53,26	39,82	62,38

radical, se observó que las plantas inoculadas con los productos almacenados a 18 ± 3 °C durante 120 días, mostraron una menor longitud con 11,99 cm, comparados con los productos almacenados a 4 ± 2 °C y 28 ± 2 °C con valores de 14,78 cm y 16,60 cm, observándose también diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo químico y absoluto con valores de 15,09 cm y 15,36 cm respectivamente, siendo el tratamiento inoculado el que presentó menores valores de longitud radical evaluado en este tiempo.

En las raíces de soya se evidenciaron nódulos determinados, los cuales se encuentran generalmente en leguminosas tropicales como *Glycine* sp, *Arachis* sp, *Phaseolus* sp, *Vigna* sp, *Lotus* sp; son nódulos temporales de estructura globular, el meristemo de crecimiento está ubicado de forma radial y una vez ha alcanzado su máximo desarrollo deja de crecer; carecen de meristemo indeterminado y el tejido central

contiene tanto células infectadas como no infectadas encontrándose en el mismo estado de desarrollo (figura 6). Las células no infectadas están especializadas en el transporte de ureidos procedentes del nitrógeno fijado (Vasse et al., 1990).

Actividad del complejo enzimático nitrogenasa a partir de raíces de arveja noduladas

Según los resultados obtenidos en la prueba de reducción de acetileno para la cepa ICA L9, se observó que la mayor actividad de la enzima nitrogenasa se evidenció en las plantas inoculadas con los productos almacenados a 28 ± 2 °C con un valor de 3,22 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, seguido de las plantas inoculadas con los productos almacenados a 4 ± 2 °C y 18 ± 3 °C, con valores de 2,45 y 2,28 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$ respectivamente. Para el caso de los testigos químicos y absolutos, no se observó la actividad de esta enzima indispensable para la FBN.

Tabla 6. Efecto de la inoculación de la cepa ICA J96 en plantas de soya variedad “Superior 6” sobre las variables de longitud foliar, radical y número de nódulos

Fuente variación	Tiempo (días)											
	15			60			120			180		
	Longitud foliar (gr)	Longitud radical (cm)	Número nódulos	Longitud foliar (cm)	Longitud radical (cm)	Número nódulos	Longitud foliar (cm)	Longitud radical (cm)	Número nódulos	Longitud foliar (cm)	Longitud radical (cm)	Número nódulos
GLM	**	**	**	**	**	**	**	ns	**	**	**	**
ICA J96 (1)	23,82a	18,56a	22,30a	30,91a	15,07a	30,83a	22,65a	14,78a	29,20a	23,82a	18,56a	22,30a
ICA J96 (2)	24,31a	20,44a	19,93a	30,82a	14,62a	25,86a	22,70a	11,99b	22,00b	24,31a	20,44a	19,93a
ICA J96 (3)	24,76a	20,79a	17,70a	30,48a	15,30a	28,26a	24,54a	16,60a	24,83a	24,76a	20,79a	17,70a
Testigo absoluto	22,86ab	15,98a	0,00b	18,12c	11,74b	0,00b	19,89b	15,36a	0,00b	22,86ab	15,98b	0,00b
Testigo Químico	21,92b	17,25a	0,00b	21,28b	12,83b	0,00b	21,25b	15,09a	0,00b	21,92b	17,25b	0,00b
C.V	17,41	38,42	51,14	11,99	21,15	42,64	17,013	27,25	45,27	17,41	38,42	51,14

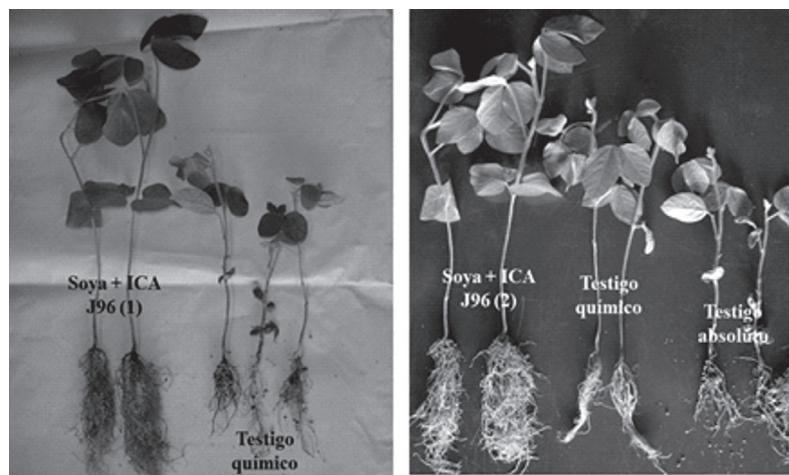


Figura 5. Efecto de la inoculación de la cepa ICA J96 en plantas de soya variedad “Superior 6” sobre las variables longitud parte aérea y radical.

Ayala (2005) evalúo el efecto de 8 cepas de *Rhizobium* sp. sobre la actividad específica del complejo nitrogenasa en plantas de maní variedad Red Starr a los 40 días de edad; encontrando que 2 cepas (VII-VII) aisladas a partir de *Arachis hypogaea* y *Centrosema pubescens*, presentaron la mayor actividad de la enzima con valores de 12,83 y 13,84 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta respectivamente; el valor menor obtenido en la evaluación de la nitrogenasa fue de 4,36 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta, sin embargo, se vio un efecto positivo de la fijación biológica de nitrógeno sobre la producción de biomasa en las plantas evaluadas.

Jiménez en el año 2007 evaluó la actividad de la enzima nitrogenasa en árboles de *Enterolobium cyclocarpum*, *Samanea saman*, *Pterocarpus indicus*, *Clitoria farchildiana* y *Flemingia macrophylla* sembrados en suelos con poblaciones nativas de rizobios, observando que los árboles que presentaron la mayor actividad de la en-

zima fueron los de *Clitoria farchildiana* y *Flemingia macrophylla* con valores de 3,23 y 3,97 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos para la cepa ICA L9 donde el valor mayor observado fue de 3,22 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta.

Para el caso de las plantas inoculadas con la cepa ICA J96 se pudo observar que la mayor actividad se evidenció en las plantas inoculadas con los productos almacenados a 4 ± 2 °C con valor de 0,633 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta, seguido de las plantas inoculadas con los productos almacenados a 28 ± 2 °C y 18 ± 3 °C con valores de 0,518 y 0,476 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta, respectivamente.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rey et al., (2005) quienes evaluaron la actividad de la enzima nitrogenasa en cepas nativas aisladas e inoculadas en *Leucaena leucocephala* y una cepa de referencia perteneciente al Banco de Germoplasma de Corpoica codificada como C50, encontrando que el mayor valor lo reportó la cepa nativa C-202 con 0,90 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta, seguido de la cepa control C-50 con 0,82 $\mu\text{mol}/\text{ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ /planta. Este resultado muestra la efectividad de la cepa ICA J96 inoculada en las plantas de soya.

Conclusiones

Las cepas ICA L9 e ICA J96 sobreviven en los inoculantes con base en turba en un rango de temperatura entre 4 ± 2 °C a 28 ± 2 °C, manteniendo la concentración superior o igual a 10^8 UFC/g de inoculante, nivel requerido para su comercialización hasta 6 meses después de la elaboración; esto sugiere que los productos no requieren cadena de frío para su almacenamiento. Este trabajo se puede implementar con inoculantes líquidos elaborados con base en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno para determinar la vida útil del

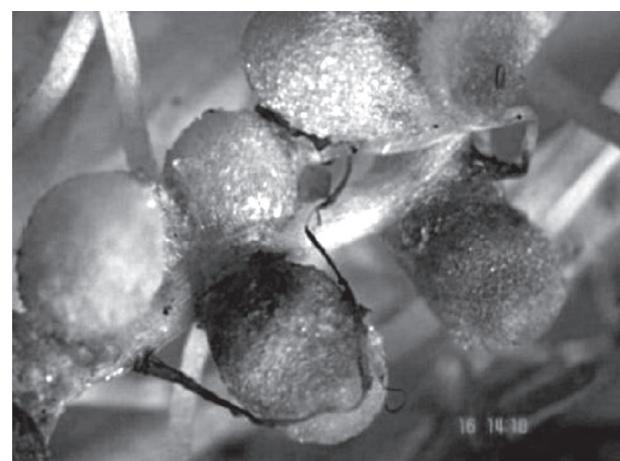
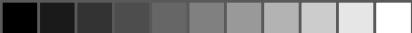


Figura 6. Nódulos determinados encontrados en las raíces de las plantas de soya donde se observa una coloración roja en el interior lo cual muestra la funcionalidad en la FBN.



producto teniendo en cuenta la temperatura óptima para el almacenamiento.

No se evidenció un efecto negativo de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes sobre la actividad biológica de las cepas ICA L9 e ICA J96 y el establecimiento de la simbiosis con plantas de arveja y soya; la asociación de los rizobios se evidenció a los 30 días después de la inoculación mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas.

Las cepas ICA L9 e ICA J96 utilizadas en la elaboración de los inoculantes sólidos con base en turba mostraron ser infectivas y efectivas para la FBN, esto se evidenció con el incremento significativo de la biomasa foliar y radical de plantas de arveja y soya comparado con los testigos absolutos.

Referencias bibliográficas

- Abdullah, M.; Al-falih, K. 2002. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Pakistan Journal of Biological Science*. 5 (11): 1277-1279.
- Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D.; Camacho, M.; Temprano, J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:2771-2779.
- Alfonso, E.; Leyva, A.; Hernández, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2 (2):47-54.
- Ayala, L. 2005. Estudio de algunos aspectos de la fijación biológica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypoagea*): Evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación Maní-*Rhizobium* sp. *Agronomía tropical*. 27 (4): 427-449.
- Bergey Manual of Systematic Bacteriology. 2005. 2da Edición, Release 5.0. [En línea] <http://www.dx.doi.org/10.1007/bergesoutline200310.2005> [Consultado: 7 de Febrero de 2009].
- Drevon, M. 2009. Manual técnico de la fijación biológica del nitrógeno, Leguminosa/*Rhizobium*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma 1-5p. [En línea] [Consultado: 25 Marzo 2011].
- Ernst, O. 2004. Leguminosas como cultivo de cobertura. *Informaciones agronómicas del Cono Sur*. 2: 1-9.
- Estrada, A.; Bonilla, R.; Baldani, V. 2009. Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. *Corpoica Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10(2): 205-213.
- Fenalce. 2010. El cultivo de la arveja, historia e importancia. [En línea] http://www. fenalce.org/arch_public/soya94.pdf [Consultado: 21 de Mayo del 2014].
- Ferrera, R.; Alarcón, A. 2007. Microbiología agrícola. Primera edición. Editorial Trillas, México D.F. 225-236 p.
- George, T.; Singleton, P. 1992. Nitrogen Assimilation Traits and Dinitrogen Fixation in Soybean and Common Bean. *Agronomy Journal*. 84 (6): 62-67.
- Guerrero, R. 1993. Fertilización de cultivos de clima cálido. En: Revista Monómeros Colombo Venezolano S.A. Barranquilla, Atlántico, 276 p.
- Gutiérrez, E.; Forero, M. 2007. Soya (*Glycine max*) Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquía Colombiana. Plan estratégico de investigación y desarrollo tecnológico de soya. Boletín informativo, Villavicencio, Meta. 24 p.
- Hungría, M.; Loureiro, M.; Mendes, I.; Campo, R.; Graham, H. 2005. Inoculant preparation, production and application. *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environmental*. 223-253.
- Jiménez, M. 2007. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para la sombra de café en Puerto Rico. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico. Facultad de Ciencias en Agronomía. 103p.
- Kremer, R.; Peterson H. 1983. Effects of Carrier and Temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in Legume Inocula: Development of an Improved Type of Inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. 45 (6): 1790-1794.
- Kuykendall, D.; Young, J.; Martinez, E.; Kerr, A.; Sawada, H. 2005. *Rhizobium*. Frank 1889, 338. En *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US Vol. II 2da Edition.
- León, E.; Acuña, O.; Ramírez, C. 1986. Evaluación de la reproducción y sobrevivencia de bacterias del género *Rhizobium* en suelo de turba de la zona de medio queso, Los chiles, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 10 (1/2): 33-41.
- León, O.; Silva, P.; Acevedo, P. 2002. Respuesta a la inoculación de *Rhizobium* en dos especies de *Lupinus* (*Lupinus álbium* L y *Lupinus angustifolius* L.). Universidad de Chile. Facultad de ciencias agronómicas.
- Lindström, K.; Murwira, M.; Willems, A.; Altier, N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. 161 (6) 453-463.
- Manassila, M.; Nuntajij, A.; Kotepong, S.; Boonkerd, N.; Teamroong, N. 2007. Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. *African Journal of Biotechnology*. 6 (12):1393-1402.
- Manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes. Corpoica, 2007. Documento interno, Laboratorio Microbiología de suelos.
- Munévar, F.; Ramírez, M. 1990. Uso correcto de inoculantes para soya. Plegable divulgativo Nº 223. Bogotá - Colombia.
- Peñaranda, A. 2004. Evaluación de las interacciones *Rhizobium* y Micorrizas Arbusculares en el cultivo de la Arveja (*Pisum sativum* var. arvense). Tesis de Pregrado. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de ciencias agrarias y del ambiente.
- Racca, W.; Collino, D. 2004. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soya. IFFIVE-INTA. Córdoba.
- Ramírez, M.; Valbuena, I.; Arguelles, J. 2007. Ensayo de Eficacia de la cepa ICA L9 de *Rhizobium leguminosarum* en Arveja. Centro de Investigación Corpoica - Tibaitatá. Bogotá, Colombia. 23 p.
- Rey, A.; Chamorro, D.; Ramírez, M. 2005. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas en la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucocephala*. *Corpoica Revista Ciencia y Tecnología*. 6 (2): 52-59.
- Reyes, I.; Álvarez, L.; Hind, E.; Alexis, V. 2008. Selección y Evaluación de Rhizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. *Revista Bioagro*. 20(1):37-48.
- Rossi, A. 2005. Producción y control de calidad de inoculantes. Programa y resúmenes: I Taller latinoamericano sobre normatividad y control de calidad de inoculantes para la agricultura. Centro de pesquisas Gonzalo Moniz-Brasil.
- Temprano, J.; Albareda, M.; Camacho, M.; Daza, A. 2002. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *Int. Microbiol.* 5: 81-86.
- Trainer, M.; Trevor, C. 2006. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 3 (7): 377 - 386.
- Variedad de soya Corpoica superior 6. 2006. Plegable divulgativo. Corpoica C.I La Libertad.
- Zambrano, C.; Riaño, P. 2008. Rentabilidad de las empresas productoras de bioinsumos registradas ante el ICA. IICA. Bogotá, 25p.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Diversidad y estructura genética de accesiones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) provenientes de Camerún

Diversity and genetic structure of oil palm accession (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Cameroon

Estiben Pacheco*, Diana Arias**, Zaida Ojeda***, Hernán Romero****

Resumen

La palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. posee gran importancia debido al aceite que se extrae de sus frutos, del cual se obtienen derivados refinados de gran valor comercial como el biodiesel, entre otros. Esta investigación buscó determinar la estructura y diversidad genética de 311 muestras de palma de aceite proveniente de la República de Camerún mediante 10 marcadores microsatélite. Los resultados mostraron valores promedio para el número medio de alelos por locus de $N_a=8.433$ y un número efectivo de alelos por locus de $N_e=4.756$; las diferencias entre estos valores permiten inferir que los 106 alelos encontrados para estas poblaciones son considerados alelos raros. Adicionalmente, el valor de diversidad genética fue alto (valor medio de $H_e=0.781$) respecto a reportes de varios autores. La varianza molecular obtenida evidenció que el mayor porcentaje (80 %) se encuentra dentro de los individuos. Los análisis mostraron que no se definió ningún tipo de estructura poblacional, lo que permitió inferir un alto flujo genético entre las zonas geográficas, esto corroborado por los altos valores de diversidad genética obtenidos. Los 311 genotipos evaluados fueron definidos como una población natural heterogénea heterocigota, apta para favorecer el aumento de la base genética de las poblaciones cultivadas de palma de aceite.

Palabras clave: *Elaeis guineensis* Jacq., marcadores microsatélite, alelos, flujo genético.

Abstract

Oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. is of great importance because of the oil extracted from its fruits, whose refined derivatives are commercially valuable as biodiesel, among others uses. This study sought to determine the structure and genetic diversity of 311 oil palm samples from the Republic of Cameroon with 10 microsatellite markers. The results showed values for the average number of alleles per locus of $N_a=8.433$ and effective number of alleles per locus of $N_e=4.756$; from the differences between these values, it can be inferred that the 106 alleles found for these populations could be considered rare alleles. Additionally the value of genetic diversity was high (mean value of $H_e=0.781$) compared to reports of several authors. The obtained molecular variance showed that the highest percentage (80 %) was found within the individuals. The analysis did not show any defined population structure, which allowed us to infer a high gene flow among the geographic zones, corroborated it by the high genetic diversity values obtained. The 311 genotypes were defined as a heterogeneous heterozygous natural population suitable to increase the genetic base of oil palm cultivated populations.

Key words: *Elaeis guineensis* Jacq., microsatellite markers, alleles, gene flow.

Recibido: diciembre 20 de 2013

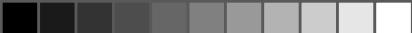
Aprobado: octubre 20 de 2014

* BSc. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. estiby88@hotmail.com

** BSc., MSc. Investigador Asociado. Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma. Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma. dianaris2002@gmail.com

*** Lic., MSc. Docente Asistente. Escuela de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biotecnología Vegetal BIOPLASMA. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja. zaida.ojeda@uptc.edu.co

**** BSc., MSc., PhD. Coordinador del Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma. Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma. Profesor Asociado. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. hromero@cenipalma.org



Introducción

La palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una especie perenne originaria de África Central y Occidental; su cultivo es propio de las tierras bajas húmedas del trópico. La palma de aceite africana posee gran importancia comercial gracias al aceite que se extrae del mesocarpio, ya que de este tejido se obtiene el aceite para generar los productos para la industria alimenticia. Por otra parte se extraen otros ácidos grasos que están presentes en el endospermo de sus frutos, que también son importantes para la industria, por ejemplo para obtener la harina de coquito. Adicionalmente el aceite de palma, está siendo utilizado en la obtención de biodiesel a través de una reacción de trans-esterificación (FE-DEPALMA, 2009). Gracias al crecimiento de la industria, los programas de mejoramiento de la palma han cobrado importancia como una alternativa para contribuir al aumento de la rentabilidad de las plantaciones, mejorar la características como la calidad del aceite o la introducción de resistencia tanto a plagas como a enfermedades (Corley y Tinker, 2003).

La historia muestra que el material comercial sembrado mundialmente proviene de cuatro plantas cultivadas en el Jardín Botánico de Bogor de Java (Indonesia) en 1884, hecho que ha provocado uniformidad en el material productivo, generándose un efecto de estrechez en la base genética (Bakoumé et al., 2007; Cochard et al., 2009). Esto ha provocado la homogenización del cultivo, evidenciando la necesidad de ampliar la base genética de la palma de aceite, garantizando la obtención y conservación de una amplia gama de recursos genéticos, lo cual justifica la exploración y estudio de diversidad genética de materiales de palma provenientes del continente africano, en especial de Camerún, uno de los países centro de origen de esta especie. El Centro de investigación en palma de aceite (Cenipalma) hacia mediados del año 2007 con la cooperación científica del *Institute for Agricultural Research and Development* (IARD) de Camerún y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), llevó a cabo la prospección y colecta de accesiones silvestres de palma de aceite en 6 zonas geográficas de la república de Camerún, estos materiales fueron sembrados en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína (Arias et al., 2011). Una de las herramientas utilizadas en el proceso de mejoramiento vegetal es el uso de marcadores moleculares, los cuales permiten dilucidar la diversidad genética de materiales silvestres, con el fin de acelerar la selección de individuos que van a ser incorporados en etapas de pre-mejoramiento.

La diversidad genética de una especie se puede analizar mediante el uso de marcadores moleculares, los cuales se definen como secuencias dentro de un genoma que permiten detectar las diferencias genotípicas (Mayes et al., 2000). Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para la detección de variabilidad genética, entre los cuales se encuentran los basados en electroforesis de proteínas (Aloenzimas), hi-

bridación de sondas "Southern Blot", RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), minisatélites o VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y los basados en PCR como PCR-RFLP, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los microsatélites que son Secuencias Simples Repetidas, conocidos como SSR. Estos últimos son los marcadores más utilizados para estudios de estructura y diversidad genética ya que presentan secuencias altamente conservadas (Rocha y Gómez, 2003), son codominantes, presentan multialelismo, y su distribución es al azar dentro del genoma. Algunos de los más importantes estudios dentro del género *Elaeis* son los realizados por Billotte et al. (2001), Bokumé et al. (2007) y Cochard et al. (2009) entre otros, quienes proyectan sus resultados en la aplicabilidad al interior de los programas de fitomejoramiento de esta especie. En este contexto, los estudios de diversidad genética de poblaciones naturales, mediante la utilización de técnicas moleculares, representan una herramienta útil en los programas de mejoramiento genético, en la medida que se involucran materiales no explotados comercialmente y con posible potencial agronómico. Así, la finalidad de este proyecto fue determinar tanto la estructura como la diversidad genética de materiales de palma de aceite provenientes de Camerún, resaltando su importancia como centro de origen.

Materiales y Métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado consistió de 311 genotípos de palma de aceite *Elaeis guineensis* (en estado de vivero), colectado en seis zonas geográficas de la República de Camerún (figura 1). Actualmente estas accesiones se encuentran sembradas en el Centro Experimental Palmar de la Vizcaína (Barrancabermeja-Santander) y hacen parte de la colección *ex situ* de Cenipalma. La estrategia de prospección de las palmas colectadas en Camerún, fue llevada a cabo inicialmente mediante un recorrido de 9700 km por tierra, para la identificación y selección de regiones geográficas con base a las condiciones climáticas, vegetación, suelos y altitud. En las zonas escogidas se tomaron muestras de racimos maduros, los cuales fueron organizados de acuerdo con las poblaciones espontáneas encontradas. Cada población espontánea fue catalogada como población independiente, si se delimitaba y se verificaba que por lo menos a más de 100 metros no hubiera más palmas. Posteriormente dentro de cada área se colectó un racimo por palma, al cual se le realizó una caracterización morfo-agronómica (Arias et al., 2011).

Extracción y cuantificación del ADN

El tejido foliar colectado en cada uno de los 311 genotípos, fue triturado utilizando nitrógeno líquido y posteriormente la extracción del ADN se realizó uti-

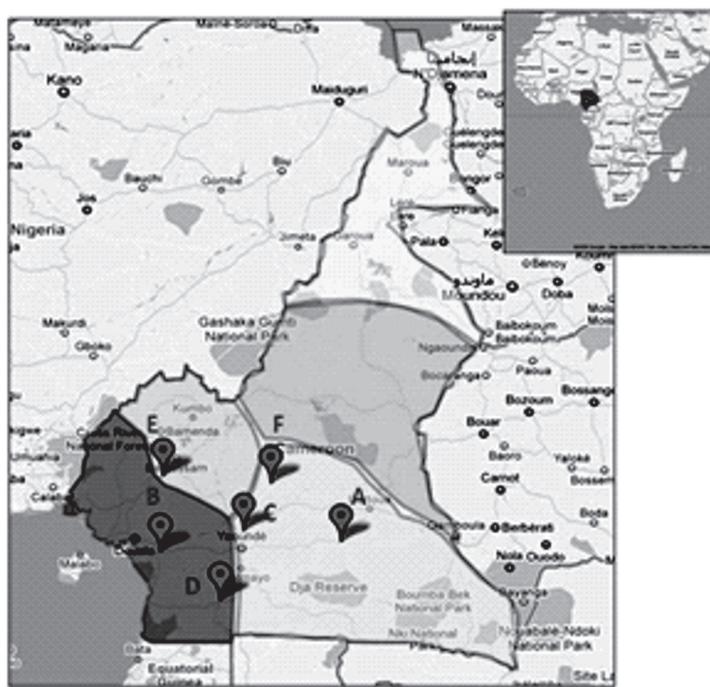


Figura 1. Mapa de localización de las seis zonas geográficas de la república de Camerún, en donde se realizó la colecta de las accesiones de palma de aceite. **A.** Abong-Mbang **B.** Edea **C.** Obala **D.** Ebolowa **E.** Bafang **F.** Mankim.

lizando el kit DNeasy Plant Mini kit (250) ref: 69106 de QIAGEN, según las indicaciones del fabricante. El proceso para verificar la calidad y estimar la cantidad del ADN obtenido se realizó mediante dos metodologías; la primera fue la visualización de la muestra en gel de agarosa y su cuantificación por comparación de la fluorescencia de las bandas, observadas en el Fotodocumentador BioRad- Universal Hood II. El segundo método utilizado, fue un procedimiento de espectrofotometría UV-visible a través de un espectrofotómetro JENWAY 6405 Uv/vis, utilizando una longitud de onda de 260 nm. Para verificar la calidad del ADN se observó la relación entre la longitud de onda de 260nm y 280nm. Las lecturas obtenidas por espectrofotometría se usaron para calcular la concentración de ADN obtenida para cada muestra y a partir de estas se realizaron las diluciones para uniformar la concentración de ADN de cada muestra a 5 ng/μl.

Amplificación SSR

La reacción de amplificación de SSR contenía una concentración final de 25 ng/μl de ADN, empleando 10 marcadores microsatélites reportados por Billotte *et al.* (2001), Billotte *et al.* (2005) y Singh *et al.* (2008). La amplificación de microsatélites mediante PCR se llevó a cabo en un volumen final de 15 μl que contenía una solución amortiguadora de PCR 1X (20mM de Tris HCl, pH8.4 y 50 mM de KCl); 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cada dNTP y 1U de Taq DNA polimerasa

(Invitrogen Life Technologies). Las condiciones de amplificación fueron: 1 minuto a 95°C (desnaturalización inicial), seguido por 35 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por intervalos de temperatura a 94 °C durante 2 min, 52 °C por 30 seg, y 72 °C por 90 seg. Un paso de extensión final durante 8 min a 72 °C. La verificación de los productos amplificados, se realizó mediante electroforesis en gel denaturizante de poliacrilamida al 6 % y 5M de urea. Posteriormente, el gel fue teñido con nitrato de plata.

Análisis de datos

Para cada locus se determinó el número de alelos amplificados, utilizando como referencia los patrones de amplificación reportados por los autores. Para estimar la diversidad genética se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: frecuencia alélica (*f*), Número medio de alelos por locus (*N_a*), número efectivo de alelos por locus (*N_e*), heterocigosidad observada (*H_o*), heterocigosidad esperada (*H_e*) (parámetro utilizado para cuantificar la diversidad genética) bajo el índice de Nei (1978), porcentaje de loci polimórficos (%P) e Índice de fijación (*F*). Para obtener esta información se hizo uso de los algoritmos incluidos en el programa GenALEX 6.1 (Peakall y Smouse, 2006). La estructura y diferenciación genética entre zonas se calculó mediante los estadísticos *F* (*F_{ST}*, *F_{IS}* y *F_{IT}*) de diferenciación de Wright (1965) y el Flujo genético (*N_m*) (Nei, 1987), fue estimado indirectamente a partir de *F_{ST}* (Wright, 1965) utilizando el programa GenALEX 6.1 (Peakall y



Smouse, 2006). Para evaluar la estructura poblacional se realizó un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) con fuentes de variación entre y dentro de zonas geográficas. Con esta AMOVA se calcularon los estadísticos *F*. El test de significancia estadística se realizó a través de 999 permutaciones con el programa GenALEX 6.1 (Peakall y Smouse, 2006). Para conocer el tipo de relaciones genéticas entre zonas geográficas se realizó un Análisis de Coordenadas Principales, mediante el programa GenALEX 6.1 (Peakall y Smouse, 2006), utilizando la matriz de distancia genética de Nei (1972). Adicionalmente se realizó un Análisis de Coordenadas Principales, tomando como unidades los individuos y/o accesiones para el cual se utilizó la matriz de similitud genética de Nei y Li (1979); este análisis fue realizado mediante el programa NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000).

Resultados y discusión

Polimorfismo

Los 10 SSR analizados presentaron un excelente resultado en la amplificación (figura 2), hecho que facilitó la obtención de la información. Para determinar la longitud de cada alelo y evitar la lectura de alelos falsos, se tuvieron en cuenta los rangos de longitud reportados por Billotte *et al.* (2001), Billotte *et al.* (2005), Bakoume *et al.* (2007) y Singh *et al.* (2008), pudiéndose verificar que los alelos observados en este trabajo se encontraron dentro de los rangos de amplificación reportados (tabla 1). Sin embargo los alelos observados para los loci sEg00066 y mEgCIR3282, se encuentran por encima del rango reportado por los autores. Lo anterior evidencia que aunque la longitud de los alelos reportados por otros autores, sirven como una guía para realizar una correcta lectura; no es una regla general. Debido a que el número de repeticiones de cada lo-

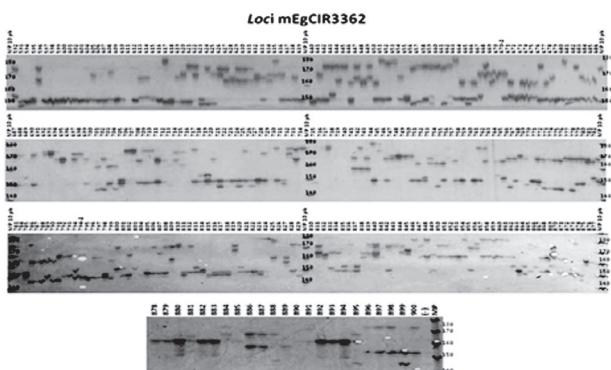


Figura 2. Patrón de amplificación del Locus mEgCIR3362. En cada columna se indica el patrón de amplificación de cada una de las 311 muestras de palma de aceite de Camerún. Donde MP representa el patrón de bandas del marcador de peso molecular y (-) es la columna correspondiente al control negativo.

cus, así como el número de los alelos detectados depende de la naturaleza del germoplasma y por ende de su variabilidad.

Tabla 1. Rangos de amplificación reportados y observados para los 10 SSR evaluados.

Loci SSR	Motivo de Repetición	Rango de longitud reportado (pb)	Rango de longitud observado (pb)
mEgCIR0008	(GA) ₁₈	200-225	200-225
mEgCIR0067	(GA) ₁₇	135-187	145-175
sEg00066	(AT) ₈	192-215	238-260
mEgCIR0173	(GA) ₁₈	124-158	110-140
mEgCIR0802	(GA) ₁₂	236-272	218-242
mEgCIR1730	(CT) ₁₇ (GT) ₅	248-274	248-274
mEgCIR3282	(GA) ₂₀	162-206	218-240
mEgCIR3362	(GA) ₁₉	146-178	146-178
mEgCIR3363	(GA) ₁₇	186-228	166-204
mEgCIR3546	(GA) ₅ GT(GA) ₂₀	286-336	262-310

El número de alelos obtenido por locus varió en un rango de 8 a 16, con un total de 106 alelos (tabla 2). En los loci mEgCIR0008 y mEgCIR0067 evaluados en este estudio se obtuvo un número mayor de alelos al reportado por Billotte *et al.* (2001). Estos autores indican que para el locus mEgCIR0008 amplificaron 6 alelos y para el locus mEgCIR0067 8 alelos, en 18 muestras de palma de aceite *E. guineensis* de diferentes orígenes incluyendo Camerún. Para el marcador microsatélite sEg00066 se obtuvo un número menor de alelos al reportado por Sing *et al.* (2008), quienes indicaron que para este marcador amplificaron 10 alelos, en 76 muestras de *E. guineensis* de diferentes orígenes incluyendo Camerún. La cantidad de datos faltantes para los accesiones analizadas, alcanzó un porcentaje muy bajo (0.19%), en los 10 locus analizados para los 311 individuos, razón por la cual todos los marcadores fueron incluidos en el análisis de datos.

Al comparar el número de alelos obtenido en esta investigación con los reportados por Bakoumé *et al.* (2007), quienes evaluaron 494 muestras de *E. guineensis* de 10 países Africanos, los loci mEgCIR1730 y mEgCIR3546 mostraron un número mayor de alelos; mEgCIR0173 evidenció el mismo número de alelos al reportado, mientras que para los demás loci el número de alelos fue menor al reportado. Los resultados anteriores mostraron que la cantidad de alelos está directamente relacionada con el número de muestras y con los diferentes orígenes utilizados en un estudio. Es



Tabla 2. Número total de alelos, frecuencia de alelos y porcentaje de datos faltantes para 10 SSR evaluados.

Locus SSR	No. de alelos reportados	No. de alelos amplificados	Alelos >5%	Alelos <5%	Datos faltantes (%)
mEgCIR0008	6	8	0	8	0.60
mEgCIR0067	8	11	0	11	0.00
sEg00066	10	8	0	8	0.30
mEgCIR0173	11	11	0	11	0.00
mEgCIR0802	12	9	0	9	0.60
mEgCIR1730	8	10	0	10	0.30
mEgCIR3282	12	8	0	8	0.00
mEgCIR3362	22	16	0	16	0.00
mEgCIR3363	17	12	0	12	0.00
mEgCIR3546	12	13	0	13	0.00
Total	118	106	0	106	0.19

importante reconocer que las 311 muestras de palma de aceite presentaron un alto número de alelos a pesar de incluirse un solo país de origen (Camerún), observación que concuerda con Bakoumé et al. (2007). Por otra parte las frecuencias reportadas en este estudio, mostraron que ninguno de los alelos encontrados para los loci analizados se presentó recurrentemente en porcentajes mayores al 5% (tabla 3). Al respecto, Kimura (1983) y Joyce y Tavaré (1995) consideran que si la frecuencia de una alelo, medida bajo su frecuencia relativa, resulta menor que el valor establecido para q (0.5), como en este caso, los 106 alelos encontrados serán descritos como alelos raros.

Por otra parte la prueba de chi-cuadrada aplicada para todos los loci, excepto para el locus mEgCIR3282, fue altamente significativa ($p < 0.001$) (tabla 3). Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de que la distribución de las frecuencias es rectangular y se acepta la hipótesis alterna de que la distribución de las frecuencias no es rectangular o uniforme.

Diversidad genética dentro de cada zona geográfica

Como resultados relevantes se obtuvieron los valores promedio para el número medio de alelos por locus ($N_a=8.433$) y el número efectivo de alelos por locus ($N_e=4.756$) (tabla 4). Laurentin (2009) indica que cuando estos valores son muy cercanos, las frecuencias alélicas son similares. Sin embargo, las amplias diferencias entre los valores de N_a y N_e permiten inferir que los 106 alelos encontrados para estas poblaciones son considerados como alelos raros, confirmando los resultados obtenidos para el porcentaje de las frecuencias alélicas. Bakoumé et al. (2007) reportaron valores para el número medio de alelos por locus (N_a) con

rangos entre 4.4 a 5.5 y el número efectivo de alelos por locus (N_e) con rangos entre 2.5 a 3.9, para 102 materiales de palma de aceite de Camerún, valores que son menores a los reportados en esta investigación. El alto porcentaje de alelos raros encontrados podría estar relacionado con el porcentaje de loci polimórfico (%P), ya que todos los loci estudiados para las 6 zonas mostraron un 100% de polimorfismo bajo el criterio del 0.99. Es importante resaltar que la selección de los marcadores SSR fue influenciada por los reportes de los autores quienes diseñaron y describieron preliminarmente estos 10 cebadores como los más polimórficos dentro de sus investigaciones.

Por otra parte, la media de la heterocigosidad observada (H_o) para las 6 zonas estudiadas fue 0.644. La zona F presentó la H_o más alta (0.710) mientras que la zona C presentó la más baja (0.585). Bakoumé et al. (2007) reportaron un valor medio de $H_o = 0.405$ para 102 materiales procedentes de Camerún. Singh et al. (2008) reportaron un valor de $H_o = 0.338$ para 10 materiales procedentes de Camerún.

El valor de diversidad genética encontrado es similar entre las 6 zonas geográficas de Camerún, presentando valores de H_e que oscilan entre 0.746 y 0.798, con un valor medio de 0.781. Estos valores son mayores a los reportados por Billote et al. (2001) quienes presentaron un valor medio de $H_e = 0.680$ para 18 muestras de *E. guineensis* de diferentes orígenes, evaluadas con 21 SSR. Montoya et al. (2005) reportaron un valor de $H_e = 0.454$ para 48 muestras de palma de aceite provenientes de Angola evaluadas con 11 SSR. Bakoumé et al. (2007) reporta un valor de $H_e = 0.660$, para 102 materiales de Camerún y $H_e = 0.644$ para 494 muestras provenientes de 10 países Africanos evaluados



Tabla 3. Frecuencia alélica, desviación estándar y prueba de chi-cuadrado para los loci evaluados.

Locus	Alelo	Frecuencia	Desviación Estándar	gl	Chi-cuadrado	Probabilidad	Significancia
mEgCIR0008	200	0.421	0.330	36	371.778	0.000	***
	207	0.023	-0.069				
	210	0.228	0.137				
	212	0.154	0.063				
	215	0.043	-0.048				
	218	0.026	-0.066				
	220	0.074	-0.018				
	225	0.024	-0.068				
mEgCIR0067	145	0.071	-0.021	55	264.398	0.000	***
	148	0.098	0.006				
	150	0.051	-0.040				
	155	0.180	0.088				
	157	0.241	0.150				
	158	0.235	0.143				
	160	0.103	0.011				
	162	0.013	-0.079				
	168	0.002	-0.090				
	172	0.005	-0.087				
	175	0.002	-0.090				
sEg00066	238	0.180	0.088	36	447.966	0.000	***
	240	0.058	-0.034				
	246	0.106	0.014				
	249	0.178	0.087				
	250	0.206	0.114				
	252	0.154	0.063				
	258	0.103	0.011				
	260	0.011	-0.080				
mEgCIR0173	110	0.024	-0.067	55	692.959	0.000	***
	112	0.163	0.072				
	114	0.261	0.169				
	116	0.460	0.368				
	118	0.019	-0.072				
	120	0.036	-0.056				
	124	0.005	-0.087				
	130	0.005	-0.087				
	132	0.018	-0.074				
	134	0.003	-0.088				
	140	0.006	-0.085				
mEgCIR0802	218	0.021	-0.071	45	618.643	0.000	***
	220	0.172	0.080				
	222	0.037	-0.055				
	226	0.116	0.024				
	228	0.232	0.140				
	230	0.201	0.109				
	238	0.084	-0.008				
	240	0.108	0.016				
	242	0.024	-0.068				

gl: grados de libertad; ns: no significativo; *** p < 0.001



Continuación **Tabla 3.**

Locus	Alelos	Frecuencia	Desviación Estándar	GL	Chi-cuadrado	Probabilidad	Significancia
mEgCIR1730	248	0.109	0.015	55	458.346	0.000	***
	250	0.076	-0.019				
	252	0.031	-0.064				
	256	0.137	0.043				
	258	0.233	0.139				
	260	0.270	0.176				
	262	0.087	-0.007				
	264	0.043	-0.051				
	270	0.005	-0.089				
	274	0.006	-0.088				
mEgCIR3282	218	0.016	-0.078	28	27.659	0.483	ns
	220	0.421	0.327				
	224	0.063	-0.031				
	228	0.230	0.136				
	230	0.180	0.086				
	234	0.039	-0.056				
	236	0.042	-0.052				
	240	0.010	-0.084				
mEgCIR3362	146	0.090	-0.004	120	297.717	0.000	***
	150	0.291	0.197				
	152	0.034	-0.060				
	154	0.035	-0.059				
	156	0.013	-0.081				
	158	0.021	-0.073				
	160	0.084	-0.011				
	162	0.047	-0.047				
	164	0.072	-0.022				
	166	0.064	-0.030				
	168	0.035	-0.059				
	170	0.027	-0.067				
	172	0.064	-0.030				
	174	0.085	-0.009				
	176	0.013	-0.081				
	178	0.024	-0.070				
mEgCIR1730	180	0.090	-0.002	55	458.346	0.000	***
	182	0.177	0.085				
	184	0.262	0.170				
	186	0.206	0.114				
	188	0.071	-0.021				
	190	0.061	-0.031				
	192	0.079	-0.013				
	194	0.039	-0.053				
	196	0.003	-0.088				
	198	0.002	-0.090				
	200	0.005	-0.087				
	204	0.002	-0.090				
mEgCIR3546	228	0.002	-0.092	78	220.665	0.000	***
	262	0.013	-0.081				
	272	0.023	-0.072				
	274	0.105	0.010				
	280	0.016	-0.078				
	282	0.016	-0.078				
	284	0.064	-0.030				
	288	0.262	0.168				
	290	0.220	0.126				
	292	0.121	0.026				
	294	0.095	0.001				
	300	0.024	-0.070				
	310	0.040	-0.054				

gl: grados de libertad; ns: no significativo; *** p < 0.001



con 16 SSR. Por otra parte Singh *et al.* (2008) reportaron para 10 muestras de palma de aceite provenientes de Camerún un valor de $H_e=0.328$ y una media de $H_e= 0.356$, para 76 muestras provenientes de países africanos evaluados con 10 EST (Expressed Sequence Tags)-SSR. Sin embargo no es posible realizar una comparación equitativa con nuestros resultados, puesto que por su naturaleza los marcadores EST-SSR, tienden a ser menos polimórficos, debido a que estos son obtenidos a partir de genes transcritos con una función putativa. Actualmente estos marcadores están siendo utilizados para la selección asistida por marcadores, especialmente cuando residen en los genes responsables de un rasgo fenotípico (Varshney *et al.*, 2005). Caso contrario ocurre con los marcadores SSR obtenidos a partir del ADN genómico, que debido a esta característica son altamente polimórficos.

La diversidad genética en palma de aceite ha sido evaluada mediante otro tipo de marcadores moleculares como isoenzimas (Hayati *et al.*, 2004 y Purba *et al.*, 2000), RFLP (Maizura *et al.*, 2006) y AFLP (Barcelos *et al.*, 2002), que muestran valores de heterocigocidad esperada (H_e) para estas técnicas, generalmente menores a los valores de H_e obtenidos mediante marcadores tipo microsatélite. Por esto los marcadores SSR son reconocidos como una excelente y poderosa herramienta para estudios de diversidad genética (Weising *et al.*, 2005 y Datta *et al.*, 2009). El índice de fijación (F) obtenido corresponde a 0.165 para todas las poblaciones. Siendo que estos valores se miden en un rango que varía entre -1 que indica un alto grado de heterocigosidad y 1 que indica un alto grado de homocigosidad, se infiere el entrecruzamiento entre individuos, provocado un exceso de homocigotos. Estas desviaciones positivas pueden ser provocadas por tres factores esenciales: (1) altos niveles de endogamia, (2) cualidades de la estructura o subestructura poblacional, (3) el número limitado de individuos que conforman la población versus la cantidad de alelos obtenidos (Romero *et al.*, 2003). Para este estudio el exceso de homocigotos podría estar asociado a las cualidades de la estructura o subestructura poblacional. Lo anterior ha sido sustentado por los valores de F (F_{ST} , F_{ST} y F_{IS}), los cuales revelaron un déficit de heterocigotos entre las zonas geográficas evaluadas (tabla 5).

Estructura Genética entre zonas geográficas

Los rangos de interpretación propuestos por Wright (1965), indicaron un bajo grado de diferenciación genética entre las 6 zonas geográficas, pues los valores obtenidos para el índice F_{ST} se encuentran distribuidos en un rango que oscila entre 0.013 a 0.049, los cuales son estadísticamente significativos. Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) muestran que el mayor porcentaje de la varianza (80%), se encuentra dentro de las zonas geográficas, mientras que el porcentaje restante se encuentra distribuido entre

zonas geográficas (3%) y entre individuos (17%). Estos resultados son similares a los encontrados por Cochard *et al.* (2009) obteniendo como resultado que el 90.16 % de la varianza se encontraba distribuida dentro de orígenes. El término "origen" fue designado por estos autores, para referirse al sitio o zona geográfica en donde realizaron la colecta de las 318 accesiones analizadas con 14 marcadores SSR.

Los rangos de interpretación propuestos por Wright (1965) indicaron que el grado de diferenciación genética entre las 6 zonas es bajo, $F_{ST}= 0.030$ ($p > 0.001$) (tabla 5), lo cual podría estar asociado con el alto número de migrantes entre poblaciones $N_m = 8.093$, evidenciando que existe recombinación genética entre las poblaciones evaluadas, sobreponiendo los efectos de deriva e impidiendo diferenciación local (Slatkin, 1994). Por su parte los valores de $F_{IT}=0.204$ ($p > 0.001$) y $F_{IS}=0.180$ ($p > 0.001$) fueron positivos y significativos, indicando un déficit de heterocigosidad en la población como en cada sub población respectivamente, o la presencia de alelos nulos en la población que no pudieron ser detectados. De Vicente *et al.* (2004) explica que estos valores (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}) tienden a modificarse en función de la cantidad de individuos estudiados, influyendo en la lectura real del flujo de genes que tiene lugar en la población.

Relaciones genéticas entre zonas geográficas

En el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz de distancia genética de Nei (1972), mostró que las dos primeras coordenadas explican el 64.9% del total de la variación, la primera componente explica 34.47% y la segunda 30.45%. Dos grupos fueron visibles en las dos componentes (figura 3).

El grupo I está conformado por las zonas E y F. El grupo II está formado por tres zonas A, B y D. La zona C es la más distante a nivel genético. La matriz de la distancia genética de Nei (1972) fue interpretada con valores entre 0 (máxima igualdad genética) y 1 (máxima distancia genética). Según los valores obtenidos

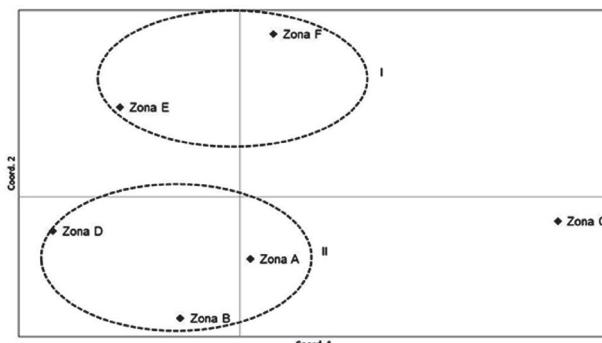


Figura 3. Dispersión de las seis zonas geográficas revelado a través del análisis de coordenadas principales.



Tabla 4. Media y desviación estándar para los parámetros de diversidad genética por zona geográfica.

Zona geográfica	N	N_a	N_e	%P	H_o	H_e	F
Zona A	81	9.400 ^a	4.682	100	0.605	0.779	0.221
		0.819 ^b	0.348	-	0.054	0.019	0.066
Zona B	44	8.200	5.049	100	0.636	0.794	0.185
		0.593	0.422	-	0.047	0.023	0.061
Zona C	20	6.500	3.970	100	0.585	0.746	0.192
		0.428	0.326	-	0.069	0.029	0.103
Zona D	70	9.400	4.963	100	0.679	0.789	0.132
		0.748	0.433	-	0.025	0.019	0.031
Zona E	60	8.700	5.169	100	0.647	0.798	0.182
		0.539	0.482	-	0.034	0.019	0.037
Zona F	36	8.400	4.705	100	0.710	0.779	0.076
		0.636	0.443	-	0.035	0.024	0.036
Total	311	8.433	4.756	100	0.644	0.781	0.165
		0.281	0.169	-	0.019	0.009	0.025

muestran que las zonas geográficas B y D son las más cercanas (0.0934), mientras que las zonas C y D fueron las más distantes (0.2441). De alguna forma lo anterior se ve reflejado en el mapa de localización de las zonas geográficas (figura 1), en donde las poblaciones B y D presentan la menor distancia geográfica entre ellas. La cercanía geográfica entre las zonas, facilita de cierta manera la dispersión de semilla, lo cual podría estar asociado con el alto número de migrantes ($N_m = 8.149$) encontrado en este estudio, que actúa como un efecto en la homogenización de la variación genética entre los grupos y sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local (Hedrick, 2005).

Tabla 5. Valores totales del estadístico F y Flujo genético (N_m) entre zonas geográficas.

Estadísticos F	Valor	P(rand \geq data)
F_{ST}	0.030	0.001
F_{IS}	0.180	0.001
F_{IT}	0.204	0.001
N_m	8.149	

Por su parte los análisis de coordenadas principales tomando como unidades las 311 accesiones de palma de aceite, utilizando el coeficiente de similaridad genética de Nei & Li (1979) (figura 4) y el análisis de

asignación de poblaciones (figura 5), mostraron a nivel espacial la conformación de un solo grupo; en donde no presentó ninguna asociación con los orígenes geográficos en donde fueron colectadas las palmas.

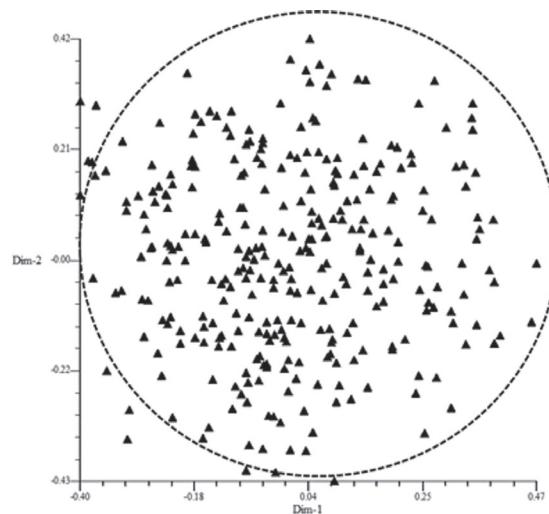


Figura 4. Análisis de coordenadas principales para 311 individuos de palma de aceite de Camerún.

Según estos resultados, se evidencia la ausencia de estructura poblacional definida, permitiendo inferir que existe un alto flujo genético entre los individuos, po-

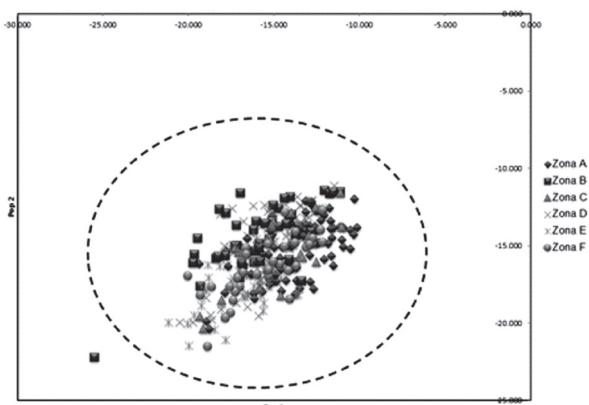


Figura 5. Análisis de asignación de poblaciones para 311 individuos de palma de aceite de Camerún.

siblemente sustentado por los altos valores de diversidad genética obtenidos. Epperson (2003) corrobora esta información revelando que la estructura genética puede ser difícil de identificar cuando aumenta la diversidad genética, o ser concreta cuando ésta disminuye. Además Slatkin (1994) y Neigel (1997), muestran que el flujo genético puede influenciar en la modificación de la distribución espacial de los genes, e intervenir en procesos como selección, recombinación y la mutación. Particularmente en la palma de aceite, el flujo genético podría estar directamente relacionado con el nivel de migración del polen (debida principalmente a dispersores aéreos) y a una activa dispersión de semillas, evitando la estructuración de las poblaciones y favoreciendo la diversidad genética de la especie (Ennos, 1994 y Corley y Tinker, 2003). Los resultados de esta investigación coinciden con Billote *et al.* (2001) y Montoya *et al.* (2005), quienes reportaron que las muestras analizadas no presentaron ningún tipo de estructura genética. Estos resultados han sido confirmados por Barcelos *et al.* (2002) quienes estudiando 38 accesiones de *E. guineensis* analizados a través de RFLP y 22 accesiones de palma de aceite analizados a través de AFLP, reportan un bajo nivel de estructuración genética dentro de todos los orígenes evaluados, lo que fue atribuido a la dispersión de material sin barreras geográficas en el continente africano. Maizura *et al.* (2006) a través de RFLP analizando 359 accesiones de palma de aceite provenientes de 11 países africanos encontró que las poblaciones incluidas en el estudio pudieron haber experimentado el flujo de genes entre las poblaciones dando lugar al alto nivel de heterocigosidad (H_e), atribuido a la dispersión de semillas a través de los ríos. En relación con estructura genética, los resultados de Hayati *et al.* (2004) contradicen lo reportado, indicando que el flujo genético obtenido (0.56) es bajo, denotando que de los 26 orígenes en los 10 países muestreados, la diferenciación genética entre las poblaciones de palma de aceite disminuyó a lo largo de una línea hacia el este de África, lo que

indica que las poblaciones de África central y occidental son más similares entre sí que con las poblaciones de África oriental. Sin embargo, es importante anotar que se incluyeron materiales de palma de aceite provenientes de la isla de Madagascar, lo cual pudo haber afectado la estimación del flujo genético y por ende la diferenciación genética.

Conclusiones

Los diferentes análisis realizados en esta investigación evidenciaron la ausencia de estructura poblacional en las 311 muestras de palma de aceite *E. guineensis* provenientes de Camerún, infiriendo un alto flujo genético entre los individuos, apoyado por los altos valores de diversidad genética encontrados. Estos resultados permiten referirse a los genotipos evaluados como una población natural heterogénea heterocigota, apta para favorecer el aumento de la base genética de las poblaciones cultivadas de palma de aceite.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación Colciencias, por su apoyo financiero para la realización de este trabajo bajo el Contrato No. 626-2009. A Myriam Cristina Duque, Investigadora del Centro International de Agricultura Tropical (CIAT) y a Eloina Mesa, por la asesoría en el análisis de datos. Los autores también agradecemos a los doctores: Leonardo Rey y Claude Bakoumé, quienes realizaron la colecta de las accesiones de palma de aceite en Camerún. La investigación de Cenipalma es financiada por el Fondo de Fomento Palmero (FFP) administrado por Fedepalma.

Referencias bibliográficas

- Arias, D.; Daza, E.; Montoya, C.; Romero, H. 2011. Colección genética de materiales de palma de aceite provenientes de Camerún. *Rev. Palmas.* 32(3): 27-36.
- Bakoumé, C.; Wickneswari, R.; Rajanayagam, N.; Kushairi, A.; Amblard, P.; Billotte, N. 2007. Allelic diversity of natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) populations detected by microsatellite markers. Implications in conservation. *Rev. Palmas.* 28(1): 149-158.
- Barcelos, E.; Amblard, P.; Berthaud, J.; Seguin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesq. Agropec. Bras.* 37(8): 1105-1114.
- Billotte, N.; Rusterucci, A.; Barcelos, E.; Noyer, J.; Amblard, P.; and Baurens, F. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome.* 44 (3): 413-425.
- Billotte, N.; Marseillac, N.; Rusterucci, A. M.; Adon, B.; Brottier, P.; Baurens, F. C.; ... & Charrier, A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics.* 110(4): 754-765.
- Cochard, B.; Adon, B.; Rekima, S.; Billotte, N.; Desmier de Chene, R.; Koutou, A.; Nouy, B.; Omoré, A.; Purba, A.; Glazmann, J.; Noyer, J. 2009. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. *Tree genetics & genomes.* 5:493-504



- Corley, R.H.V.; and Tinker, PB. 2003. The oil palm. 4th Ed. World Agricultural Series. Blackwell Publishers Ltd, Oxford, UK.
- Datta, S.; Kaashyap, M.; Kumar, S. 2009. Amplification of chickpea-specific SSR primers in *Cajanus* species and their validity in diversity analysis. *Plant Breeding*. 129(3): 334-340. doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01678.x.
- De Vicente, M.; López, C.; Fulton, T. 2004. Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Ennos, R. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*. 72: 250-259.
- Epperson, B. 2003. Geographical Genetics. Princeton University Press: Englewood Cliffs, NJ.
- Fedepalma. 2009. La Agroindustria de la palma de aceite en Colombia y el mundo. ISBN: 9789589834169.
- Hayati, A.; Wickneswari, R.; Maizura, I.; Rajanaidu, N. 2004. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) germplasm collections from Africa: implications from improvement and conservation of genetic resources. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1274-1284.
- Hedrick, P.W. 2005. Genetics of Populations (Third Edition). Jones and Bartlett, Boston.
- Joyce, P.; Tavaré, S. 1995. The distribution of rare alleles. *J. Math. Biol.* 33: 602-618
- Kimura, M. 1983. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Mol. Biol. Evol.* 1: 84-93.
- Laurentin, H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56(2): 277-292.
- Maizura, I.; Rajanaidu, N.; Zakri, A.; Cheah, S. 2006. Assessment of Genetic Diversity in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq) using restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Genet. Resourc. Crop. Evol.* 53(1):187-195(9).
- Mayes, S.; Jack, P.L.; Corley, RHV. 2000. The use molecular markers to investigate the genetic structure of an oil palm breeding programme. *Heredity*. 85:288-293.
- Montoya, C.; Arias, D.; Rey, L.; Rocha, P. 2005. Caracterización molecular de materiales de *E. guineensis* Jacq. Procedentes de Angola. *Fitotecnia Colombiana*. 5(2):1-10.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*. 89:583-590.
- Nei, M and Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science*. 76: 5269-5273
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press.
- Neigel, J. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:105-128.
- Peakall, R.; Smouse, P. 2006. GenAIEx version 6.0: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*. 6: 288-295.
- Purba, A.; Glazmann, J.; Noye, J. 2000. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. Doi: 10.1007/s11295-009-0203-3.
- Rocha, P.; Gomez, P. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*. 24(2):9-25.
- Rohlf, F. 2000. NTSYS pc: Numerical taxonomy and multivariate system, ver. 2.1, computer program. Setakuet, New York: Exeter Publishing.
- Singh, R.; Zaki, N.; Ting, N.; Rosli, R.; Tan, S.; Low, E.; Maizura, I.; Cheah, S. 2008. Exploiting an oil palm EST database for the development of gene-derived SSR markers and their exploitation for assessment of genetic diversity Biologic. *Biol. Cell. Mol.* 63(2): 227-235.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. pp. 3-17. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Romero, C.; Pedryc, A.; Muñoz, V.; Llácer, G.; Badenes, M. 2003. Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*. 46: 244-252.
- Varshney, K.R.; Graner, A.; Sorrells, M.E. 2005. Genomic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. 23(1): 48-55.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications, Second Edition. Taylor & Francis Group. United Estates.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. 19: 395-420.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Cultivo por lote de *Wickerhamomyces anomalus* en un biorreactor a escala laboratorio para la producción de una poligalacturonasa

Batch culture of *Wickerhamomyces anomalus* in a lab scale bioreactor for poligalacturonase production

Maria Alicia Martos*, Ana Paula Butiuk*, Natalia Lorena Rojas**, Roque Alberto Hours**

Resumen

Wickerhamomyces anomalus, una levadura aislada de frutas cítricas en la provincia de Misiones, Argentina, produce una poligalacturonasa (endo-PG) con capacidad macerante de tejidos vegetales. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *W. anomalus* y la producción de la enzima poligalacturonasa en un medio de cultivo sintético, operado en sistema por lote, en un biorreactor a escala laboratorio. Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 4 l que contenía 3 l de un medio sintético compuesto por glucosa, pectina de citrus, vitaminas, aminoácidos, sulfato de amonio y sales, y se incubaron con agitación y aireación, a 30 °C durante 12 h. El transcurso del proceso fermentativo se siguió por medidas de biomasa, glucosa residual, actividad poligalacturonasa y contenido de O₂ y CO₂ de los gases a la salida del reactor. La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) de *W. anomalus* fue de 0,337 h⁻¹ y el rendimiento de biomasa producida ($Y_{X/S}$) de 0,401 g_x/g_s. Al finalizar el cultivo, la actividad PG en el sobrenadante fue de PG de ~ 83,7 UE/ml. La actividad específica y la productividad obtenidas fueron de ~ 1,91. 10⁴ UE/g_x y ~ 9.301 UE/l.h, respectivamente. El cociente respiratorio fue cercano a 1 durante el proceso fermentativo. No se formó ningún otro producto, además de biomasa y CO₂. El cultivo por lote resultó ser una buena alternativa para la producción de PG a partir de *W. anomalus*, obteniéndose un extracto con elevada actividad enzimática, en un medio de cultivo sintético y de bajo costo.

Palabras clave: *Wickerhamomyces anomalus*, poligalacturonasa, cultivo por lote, parámetros estequiométricos, parámetros cinéticos.

Abstract

Wickerhamomyces anomalus, a yeast isolated from citrus fruit peels in the province of Misiones, Argentina, produces a polygalacturonase (endo-PG) with maceration activity of vegetable tissues. The objective of the present work was to determine kinetic and stoichiometric parameters of *W. anomalus* growth and polygalacturonase production in a synthetic culture medium, operating in a batch-type bioreactor at laboratory scale. Cultures were performed in a bioreactor of 4 l, containing 3 l of a synthetic medium composed of glucose, citrus pectin, vitamins, amino acids, ammonium sulfate and salts, and were incubated with agitation (450 rpm) and aeration at 30 °C, during 12 h. The course of the fermentation process was followed by measuring biomass, residual glucose, polygalacturonase activity and O₂ and CO₂ content of outlet gases from the reactor. The maximum specific growth rate (μ_m) of *W. anomalus* was 0.337 h⁻¹ and the biomass yield ($Y_{X/S}$) was 0.40 g_x/g_s. At the end of the culture, PG activity in the supernatant was ~84 UE/ml. The specific activity and the productivity obtained were ~1.91 10⁴ UE/g_x and ~9,301 UE/l.h, respectively. Respiratory quotient was approximately 1.0 throughout the fermentation process. No other product different from biomass and CO₂ was detected. Batch culture could be an adequate alternative for the production of polygalacturonase from *W. anomalus* and an extract with high enzymatic activity using a synthetic and economic culture medium could be obtained.

Key words: *Wickerhamomyces anomalus*, polygalacturonase, batch culture, kinetic parameters, stoichiometric parameters.

Recibido: febrero 5 de 2014

Aprobado: octubre 20 de 2014

* Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina. amartos@fceqyn.unam.edu.ar.

** Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata - CONICET, La Plata, Argentina.



Introducción

Las enzimas pécticas son las responsables de la degradación de las pectinas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasa (PG), pectinesterasa (PE), pectinliasa (PL) y pectatolliasa (PAL). Algunas pectininas tienen la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños, proceso denominado maceración. De este modo las células conservan muchos de sus compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan carotenoides, vitaminas (C, B₆, B₉ y E) y flavonoides, compuestos que poseen reconocidos beneficios sobre la salud. El proceso de maceración mediante enzimas pécticas es empleado en la industria alimenticia para la obtención de alimentos destinados a niños y adultos mayores (Jayani et al., 2005; Tari et al., 2007).

Las enzimas pécticas son producidas por una gran variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La producción de pectininas de levaduras tiene algunas ventajas en comparación con la producción a partir de hongos filamentosos. Las levaduras son organismos unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y fácil de cambiar de escala y a muchas de ellas se las considera como microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) (Souza et al., 2003; da Silva et al., 2005).

Teniendo en cuenta que el costo de los medios de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de enzimas pécticas, es importante formular medios de cultivos con el menor costo posible y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción enzimática (Nighojkar et al., 2006). Los medios de cultivos definidos son convenientes porque brindan no solo reproducibilidad al sistema, sino también pureza para las proteínas que son secretadas al medio.

Una levadura pectinolítica fue aislada a partir de cáscaras de frutas cítricas en la Provincia de Misiones, Argentina, la cual fue identificada como *Wickerhamomyces anomalus*, reclasificación de la especie *Pichia anomala* (Passoth et al., 2011). *W. anomalus*, al crecer en un medio de cultivo compuesto por Base Nitrogenada para Levaduras (Yeast Nitrogen Base, YNB), glucosa como fuente de carbono y energía (FCE) y pectina de citrus como inductor, excreta al medio una enzima con actividad poligalacturonasa (endo-PG, EC 3.2.1.15). Esta enzima es de gran importancia industrial ya que posee actividad protopectininas (PPasa) o capacidad maceante de tejidos vegetales (papa, mandioca, zanahoria, etc.) (Martos et al., 2013a, Martos et al., 2013b). La potencial aplicación industrial de esta enzima justifica

la realización de estudios relacionados con su producción a mayor escala.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el crecimiento de *W. anomalus* y la expresión de la enzima poligalacturonasa en un medio de cultivo sintético y de bajo costo en un biorreactor a escala laboratorio, operado en sistema por lote.

Materiales y métodos

Microorganismo

Wickerhamomyces anomalus, aislada a partir de frutas cítricas en la provincia de Misiones, Argentina (Martos et al., 2013a).

Medios de cultivos

a) *Medio de conservación (medio YM)*: extracto de levadura (Sigma), 5 g/l; triptona (Difco-Becton Dickinson), 5 g/l; glucosa bacteriológica (Britania), 10 g/l; agar-agar (Britania) 18 g/l, a pH 5,0.

b) *Medio de fermentación*: glucosa bacteriológica (Britania), 10 g/l; pectina de citrus (Parafarm), 5 g/l; (NH₄)₂SO₄, 3 g/l; KH₂PO₄, 1 g/l; MgSO₄, 0,5 g/l; CaCl₂, 0,1 g/l; solución de vitaminas (1000 ×), 1 ml/l; solución de aminoácidos (100 ×), 10 ml/l; solución de microelementos 1000 ×, 1 ml/l; pH 5,0.

Solución (1000 ×) de vitaminas (Sigma) (μg/l): biotina, 2; pantotenoato de Ca, 400; ácido fólico, 2; inositol, 2000; niacina, 400; ácido p-aminobenzoico, 200; pirodoxina, 400; riboflavina, 200; tiamina, 400.

Solución (100 ×) de aminoácidos (Sigma) (mg/l): histidina, 10; metionina, 20 y triptófano, 20.

Solución de microelementos 1000 × (μg/l): H₃BO₃, 500; CuSO₄·5H₂O, 40; KI, 100; FeCl₃·6 H₂O, 200; MnSO₄·H₂O, 400; NaMoO₄·2H₂O, 200; ZnSO₄·7H₂O, 400.

La FCE (glucosa y pectina), el sulfato de amonio, los fosfatos, el resto de las sales (MgSO₄, CaCl₂, solución de microelementos) y los aminoácidos, fueron esterilizados por separado, en autoclave 15 min a 121 °C, previo ajuste del pH a 5,0. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración utilizando membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius). Antes de su utilización, se mezclaron las cantidades correspondientes de cada una de las soluciones en forma aséptica y se midió el pH del medio completo.

Crecimiento de *W. anomalus* en un biorreactor a escala laboratorio

Inóculo: se inocularon tres frascos Erlenmeyers de 500 ml que contenían 95 ml del medio de fermentación,



con 5 ml de inóculo ($DO_{620} = 0,96$) proveniente de un cultivo joven (24 h) de *W. anomalus* en medio YM. Los mismos se incubaron a 30 °C con agitación (180 rpm), durante 20 h. Al cabo de este tiempo, los cultivos (300 ml) se cosecharon por centrifugación a 4068 $\times g$ a 5 °C, durante 10 min. El sobrenadante se descartó y las células se suspendieron en 100 ml de agua destilada estéril.

Fermentación: Se utilizó un biorreactor LKB (Bromma, Suecia) de 4 l de capacidad. El mismo fue esterilizado en autoclave (121 °C, 15 min) con la solución de glucosa y pectina a la que se le agregó 500 μ l de aceite de silicona como antiespumante (Sigma). El resto de las soluciones de nutrientes (aminoácidos, vitaminas, sales) y la suspensión de células se mezclaron, antes de su utilización, en un frasco Erlenmeyer de 1000 ml con salida lateral y se utilizó inmediatamente para inocular el biorreactor e iniciar el proceso fermentativo, obteniéndose un volumen final de 3 l. El cultivo se agitó a 450 rpm y se le suministró aire estéril con un caudal de 2,82 l/min.

Luego de 5 min se comenzaron a tomar muestras; las mismas fueron centrifugadas a 6505 $\times g$, durante 5 min a 5 °C. Las células decantadas se usaron para medir biomasa por peso seco y el sobrenadante se utilizó para medir pH, glucosa residual y actividad PG.

Los cultivos se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

Medida de gases: Las medidas del contenido en O_2 y en CO_2 de los gases de salida del reactor fueron realizadas mediante un detector de tipo paramagnético (Servomex, UK) y un detector infrarrojo (Horiba Pir 2000, Japón), respectivamente. Con estos datos y el valor del caudal de aire se determinaron las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 , en condiciones normales de presión y temperatura, mediante las siguientes ecuaciones que surgen de balances de materia en fase gaseosa y líquida, planteadas por Cooney et al. (1977) (ec. 1 y ec. 2):

$$r_{O_2} = \frac{F_G \cdot 0,79 \cdot 60}{V_L} \cdot \frac{T_0 \cdot P}{T \cdot 22,4 \cdot P_0} \cdot \left[\frac{\frac{(X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1}}{\frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2}} - \right] \quad (\text{ec. 1})$$

$$r_{CO_2} = \frac{F_G \cdot 0,79 \cdot 60}{V_L} \cdot \frac{T_0 \cdot P}{T \cdot 22,4 \cdot P_0} \cdot \left[\frac{\frac{(X_{CO_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1}}{\frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2}} - \right] \quad (\text{ec. 2})$$

Los subíndices 1 y 2 representan valores a la entrada y salida del reactor respectivamente.

Siendo:

- r_{O_2} : velocidad de consumo de O_2 (moles/l.h).
- r_{CO_2} : velocidad de producción de CO_2 (moles/l.h).
- F_G : caudal de aire (l/min).
- 0,79: fracción molar de nitrógeno en el aire.
- 60: factor que convierte minutos a hora.

V_L : volumen de medio (l).

T_0 y T : 273 °K y temperatura de trabajo respectivamente.

P_0 y P : 760 mmHg y presión de trabajo respectivamente.

22,4: volumen (l) ocupado por un mol de gas en condiciones normales de temperatura y presión.

X_{O_2} y fracción molar de oxígeno y anhídrido carbónico,

X_{CO_2} : respectivamente.

El coeficiente respiratorio (CR) se calculó como la relación entre la velocidad de formación de CO_2 (r_{CO_2}) y la velocidad de consumo de O_2 (r_{O_2}).

La cantidad total de O_2 consumido y de CO_2 producido durante el cultivo se calculó como la integral de las respectivas velocidades en función del tiempo, empleando el programa Sigma Plot:

Determinaciones analíticas

Actividad poligalacturonasa: la actividad PG se midió

$$O_2 \text{ total consumido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{O_2} \cdot dt$$

$$CO_2 \text{ total producido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{CO_2} \cdot dt$$

utilizando como sustrato 2 g/l de ácido poligalacturónico (APG, Sigma), en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,2 M, pH 5,0. La reacción se efectuó a 37 °C, 10 min y se determinaron los grupos reductores liberados por el método del DNS (Miller, 1959). Como referencia se utilizó ácido galacturónico (Sigma). Una unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mmol del monómero correspondiente por min en las condiciones de ensayo.

Determinación de biomasa: el crecimiento microbiano (g/l) se determinó por medidas de peso seco. Luego del proceso de centrifugación, las células fueron lavadas con agua destilada, centrifugadas y colocadas en estufa a 80 °C, hasta peso constante (Cavalitto et al., 2000).

Glucosa residual: se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina).

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

Resultados y discusión

En la figura 1 se presentan los perfiles de crecimiento y concentración remanente de la FCE (glucosa) y en la figura 2 los valores de actividad PG y pH, durante el cultivo de *W. anomalus* en el biorreactor, operado en sistema de lote.

En la figura 1 se observa que a las 8 h de cultivo se consume la mayor parte de la FCE y finaliza el crecimiento exponencial. La biomasa total producida fue de 4,013 \pm 0,26 g/l, obteniéndose un rendimiento ($Y_{x/s}$) de 0,401 g_x/g_s ($y_{x/s} = 0,466 \text{ C-mol}_x/\text{C-mol}_s$) en base a glucosa. De la curva de crecimiento microbiano se deter-

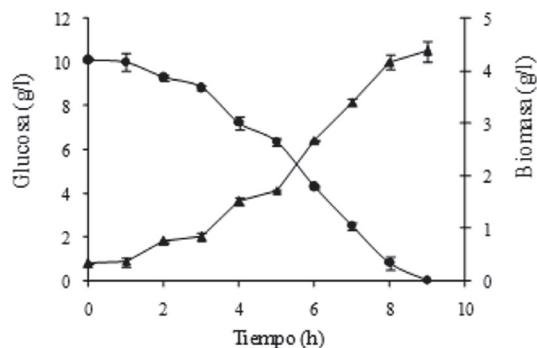


Figura 1: Evolución del cultivo de *W. anomalus*. Símbolos: biomasa (▲), glucosa (●).

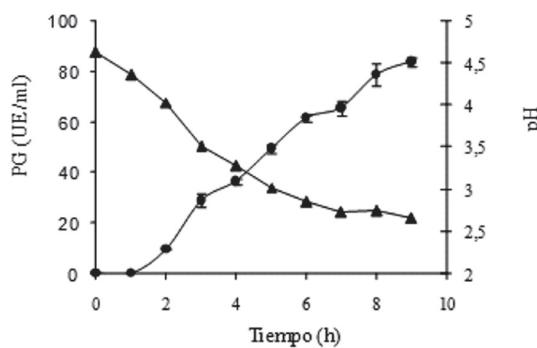


Figura 2: Producción de PG y valores de pH en el cultivo de *W. anomalus*. Símbolos: actividad PG (●), pH (▲).

minó un valor de μ_m de $0,337 \text{ h}^{-1}$ ($R^2: 0,920$), similar al reportado en trabajos anteriores para el cultivo de *W. anomalus* en frascos agitados, usando el medio YNB, adicionado con glucosa y pectina de citrus ($\mu_m: 0,346 \text{ h}^{-1}$) (Martos et al., 2013a).

Los valores de μ_m y rendimiento obtenidos en el presente estudio son similares a los informados para el crecimiento de la mayoría de las levaduras sobre monosacáridos. Así, *Geotrichum klebahnii*, al crecer en un medio sintético, presentó un rendimiento ($Y_{x/s}$) de $0,49 \text{ g/g}_s$, y un valor de μ_m de $0,47 \text{ h}^{-1}$ (Cavalitto et al., 2000), mientras que una cepa de *S. cerevisiae* Narince 3, aislada de uvas presentó un valor de μ_m de $0,535 \text{ h}^{-1}$ al crecer en un medio de cultivo que contenía glucosa, extracto de levadura y sales (Karasu Yalçın & Özbas, 2004).

En la figura 2 se observa que la producción detectable de PG comenzó a las 2 h, obteniéndose al finalizar el cultivo un valor de actividad PG de $83,7 \pm 1,79 \text{ UE/ml}$. La síntesis de la enzima estuvo directamente asociada al crecimiento.

En este cultivo se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno. Si bien el uso de una sal de amonio simplifica el proceso de esterilización (puede hacerse en autoclave conjuntamente con el resto del medio), es sabido que el consumo de amonio implica el incre-

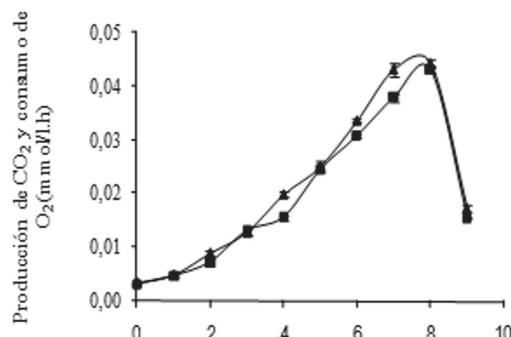
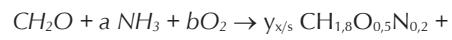


Figura 3: Velocidad de consumo de O_2 (r_{O_2}) y velocidad de formación de CO_2 (r_{CO_2}) durante el cultivo de *W. anomalus*. Símbolos: r_{O_2} (▲) y r_{CO_2} (■).

mento equivalente en la concentración de protones en el medio de cultivo, con el consiguiente descenso continuo en el pH, resultado que efectivamente se observó considerando que el mismo disminuyó en el transcurso de la fermentación desde un valor inicial de 4,72 hasta valores cercanos a 2,6 al finalizar el cultivo (Fig. 2). Estos bajos valores de pH alcanzados, podrían, de prolongarse el cultivo, afectar la estabilidad de la enzima PG, ya que en estudios previos se determinó que la enzima permanece estable en un rango de pH entre 3,0 a 6,0 (Martos et al., 2013b).

En la figura 3 se presentan las respectivas velocidades de consumo de O_2 (r_{O_2}) y formación de CO_2 (r_{CO_2}), en el transcurso del cultivo. Como puede observarse, los picos de las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 se obtuvieron alrededor de las 8 h y luego disminuyeron al consumirse totalmente la glucosa. Las curvas de r_{O_2} y r_{CO_2} corrieron paralelas, indicando que el CR fue cercano a 1 durante todo el tiempo de fermentación, valor razonable para un metabolismo completamente respiratorio.

Estudios previos indicaron que la levadura *W. anomalus* es incapaz de utilizar pectina, ácido poligalacturónico o sus productos de hidrólisis (ácido galacturónico) como FCE pero los necesita para inducir la síntesis de la enzima (Martos et al., 2003a). Por lo tanto, el crecimiento de *W. anomalus* en el medio sintético, utilizando glucosa como FCE, amonio como fuente de nitrógeno y asumiendo biomasa estándar ($\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$), puede ser representado mediante la siguiente ecuación estequiométrica (expresada en C-mol):



Siendo:

- a: moles de nitrógeno consumido/C-mol de FCE
b: moles totales de O_2 consumido/C-mol de FCE
 $y_{x/s}$: C-mol de biomasa producida /C-mol de FCE (rendimiento de biomasa)



$\gamma_{CO_2/s}$: moles totales de CO_2 producidos/C-mol de FCE.
 $\gamma_{p/s}$: C-moles de producto/C-mol de FCE.

Aplicando balances de carbono y grado de reducción a la ecuación de crecimiento microbiano se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$1 = \gamma_{x/s} + \gamma_{p/s} + \gamma_{CO_2/s} \quad (\text{ec. 3})$$

$$\gamma_{x/s} \cdot \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + \gamma_{p/s} \cdot \frac{\gamma_p}{\gamma_s} + \frac{4 \cdot b}{\gamma_s} = 1 \quad (\text{ec. 4})$$

Siendo γ_s grado de reducción del sustrato; γ_x grado de reducción de la biomasa, γ_p grado de reducción del producto.

La tabla 1 muestra los valores de los parámetros estequiométricos del cultivo y los resultados del balance de carbono (ec. 3) y balance de grado de reducción (ec. 4), los que permiten determinar si se formó algún producto y si hubo consistencia interna en los resultados experimentales obtenidos. Los valores de grado de reducción se determinaron considerando NH_3 como nivel de referencia.

Los resultados obtenidos en los balances de carbono (ec. 3) y grado de reducción (ec. 4) indican que, en las condiciones de crecimiento, no hubo generación de ningún producto carbonado diferente a la biomasa y CO_2 . Según fue informado por otros autores, *P. anomala* (*W. anomalus*) es producida de manera eficiente considerando que es una levadura que presenta efecto Crabtree negativo, es decir que respira y produce biomasa en presencia de O_2 , independientemente de la concentración de azúcar presente en el medio (Passoth et al., 2011).

La actividad específica obtenida fue de $1,91 \cdot 10^4 \pm 290$ UE/g_x y la productividad de 9.301 ± 140 UE/l.h.

Al hacer una estimación de costos, se obtuvo un valor de \sim US\$ 2, para 4 l de medio de cultivo utilizado en el presente estudio (*medio de fermentación*).

Considerando que la síntesis de la enzima estuvo directamente asociada al crecimiento, los datos cinéticos obtenidos en el presente estudio se podrían utilizar para el diseño de un cultivo por lote alimentado. En dichos cultivos, la alimentación restricta del nutriente limitante permite que las células crezcan a una

alta densidad, lo que podría potenciar la expresión de la enzima, aumentando la productividad del proceso.

Conclusiones

El crecimiento de *Wickerhamomyces anomalus* en un biorreactor de 4 l, operado mediante sistema tipo por lote y usando un medio de cultivo a base de glucosa como FCE, pectina Cooney como inductor y sulfato de amonio como FN, se desarrolló con una velocidad de crecimiento máxima de $0,337 \text{ h}^{-1}$. Se alcanzó un rendimiento de biomasa de $0,401 \text{ g}_x/\text{g}_s$ y una actividad enzimática de ~ 84 UE/ml. Además, se obtuvo una actividad específica de $\sim 1,91 \cdot 10^4$ UE/g_x y una productividad de ~ 9.301 UE/l.h. Bajo estas condiciones de operación no se presentó formación de productos carbonados diferentes a biomasa y CO_2 .

El cultivo en sistema por lote resultó ser una buena alternativa para la producción de PG por *W. anomalus*, obteniéndose un extracto enzimático con elevada actividad enzimática en un medio de cultivo sintético y de bajo costo.

Referencias bibliográficas

- Cavalitto, S.F.; Hours, R.A.; Mignone, C.F. 2000. Growth and proto-pectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 25: 260-265.
- Cooney, C.; Wang, H.; Wang, D. 1977. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 19: 55-67.
- Da Silva, E.G.; de Fátima Borges, M.; Medina, C.; Piccoli, R.H.; Schwan, R. F. 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.* 5(9): 859-865.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40(9): 2931-2944.
- Karasu, Yalçın S.; Özbas, Z.Y. 2004. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochem.* 39(10): 1285-1291.
- Martos, M.A.; Zubreski, E.R.; Combina, M.; Garro, O.A.; Hours, R.A. 2013a. Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava tissues. *Food Sci Technol.* 33 (2): 332-338.
- Martos, M.A.; Zubreski, E.R.; Garro, O.A.; Hours, R.A. 2013b. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnol Res Int.* 1: 1-7.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31(3): 426-428.

Tabla 1: Parámetros estequiométricos del cultivo de *W. anomalus*

O ₂ total (moles)	CO ₂ total (moles)	$\gamma_{x/s}$ (C-mol)	$\gamma_{CO_2/s}$ (mol _{CO₂} /C-mol _{FCE})	b (mol _{O₂} /C-mol _{FCE})	Bal. C	Bal. γ
0,187	0,182	0,466	0,543	0,555	1,008	1,043

Bal. C: balance de carbono. Bal. γ : balance de grado de reducción.



- Nighojkar, S.; Phanse, Y.; Sinha, D.; Nighojkar, A.; Kumar, A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochem.* 41(5):1136-1140.
- Passoth, V.; Olstorpe, M.; Schnürer, J. 2011. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 99(1): 121-125.
- Souza, J.V.B.; Silva, E.S.; Maia, M.L.S.; Teixeira, M.F. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Paecilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochem.* 39:455-458.
- Tari, C.; Gögus, N.; Tokatlı, F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme Microbial Technol.* 40(5): 1108-1116.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Organogénesis y embriogénesis en *Curcuma longa* L. a partir de capas delgadas de células, segmentos y bases de hoja

Curcuma longa L. embryogenesis and organogenesis from thin cell layers, leaf segments and bases of leaf

Zulma Isabel Monsalve Fonseca*, **Aura Inés Urrea Trujillo***, **Alejandra Canal Morales****

Resumen

A pesar de sus propiedades farmacológicas, alimenticias e industriales y su gran potencial de mercado, *Curcuma longa* L. no ha sido comercializada en la medida en que se esperaría. La dificultad de propagación de la especie, que se da exclusivamente por vía vegetativa al ser un triploide estéril, aunada a las exigencias ambientales de su cultivo y su alta susceptibilidad al ataque de distintos patógenos han sido las causas por las cuales no se ha dado un aprovechamiento acorde a las propiedades y potenciales de la planta. Como estrategia para la obtención de gran cantidad de germoplasma con características fitosanitarias óptimas, se han implementado diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, incluyendo la formación de microrizomas y la micropagación de plantas. Sin embargo, aún no se dispone de métodos eficientes para la inducción de procesos de organogénesis y embriogénesis somática. En el presente estudio se reporta el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal y sus combinaciones sobre segmentos de hojas, bases de hoja y capas delgadas de células (*thin cell layers - TCL*) de *Curcuma longa* L. para la inducción de callos y embriones. Los tejidos evaluados mostraron una respuesta diferencial de acuerdo con sus características y los reguladores de crecimiento vegetal adicionados. En las bases de hoja y TCLs se obtuvo particularmente una respuesta embriogénica. De otro lado, fue posible inducir morfogénesis caulinar y radicular simultáneamente en todos los tejidos evaluados. Las plantas regeneradas a partir de las bases de hoja fueron mucho más vigorosas que las de los otros tejidos.

Palabras clave: micropagación, embriogénesis, organogénesis, reguladores de crecimiento vegetal.

Abstract

In spite of its pharmacological, nutritional and industrial properties and its great potential market, *Curcuma longa* L. has not been commercialized to the extent that would be expected. The difficulty of propagation of the species, which is provided exclusively by vegetative to be a sterile triploid, coupled with the environmental requirements of the crop and its high susceptibility to attack by different pathogens, have been the causes for which has not been given a use according to the properties and potential of the plant. As a strategy for obtaining large numbers of germplasm with optimal phytosanitary characteristics, different techniques have been implemented *in vitro* culture, including the formation of microrizomas and micropagation of plants. However, not yet available efficient methods for somatic embryogenesis and organogenesis induction processes. In this study, we report the effect of different plant growth regulators and their combinations on the leaf segments, leaf bases and thin cells layers (TCL) of *Curcuma longa* L. for the callus and embryos induction. The evaluated tissues showed a differential response, according to its characteristics and the plant growth regulators added. Embryogenic response was particularly obtained in leaf bases and TCL. On the other hand, it was possible to induce cauline and root morphogenesis simultaneously in all evaluated tissue. Regenerated plants from leaf bases were more vigorous than the others tissues.

Keywords: micropagation, embryogenesis, organogenesis, plant growth regulators.

Recibido: febrero 15 de 2014

Aprobado: octubre 22 de 2014

* Ph.D en Biotecnología, Investigadora grupo AgroBiotecnología y docente Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, calle 67 N° 53-108 oficina 7-104, A.A. 1226 Medellín, Colombia.
zmonsalve@gmail.com, zulma.monsalve@udea.edu.co

** Estudiante Maestría en Biología, Universidad de Antioquia.



Introducción

Curcuma longa L. (Zingiberaceae) es una de las especies de mayor importancia en aplicaciones cosméticas, alimentarias (como conservante y condimento), ornamentales y medicinales incluyendo su uso como anticancerígeno, antidiabético, antiinflamatorio, inmunomodulador, antioxidante, antiparasitario y en la prevención y tratamiento del Alzheimer y la fibrosis cística, entre otras (Abd-Elraheim et al., 2013; Alvis et al., 2012; Tehranipour y Erfani, 2012; Jaggi Lal, 2012; Jantan et al., 2012; Ji et al., 2012; ; Panditrao y Nayak, 2012; Zhou et al., 2011; Jurenka, 2009). Tiene un gran potencial de mercado e impacto económico, con una demanda mundial creciente y una pequeña oferta, siendo los principales productores y exportadores India, China, Indonesia, Bangladesh y Tailandia (Kumar et al., 2010). La India cuenta con un cultivo de 150,000 hectáreas, lo que representa un 93,7% de la producción mundial, de los cuales el 92% es empleado en consumo doméstico y solo el 8% restante es exportado (Velayudhan et al., 2012).

Los rizomas son la principal fuente de curcuminoïdes (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina), en los cuales llegan a representar más del 3 % de su peso seco (Xiaoqiang y Gang, 2006). Estos pigmentos polifenólicos le confieren el color amarillo brillante característico a este órgano de almacenamiento, y junto con algunos sesquiterpenos y otros diarilheptanoides, han sido postulados como responsables de gran parte de la actividad biológica de la especie.

Uno de los grandes problemas en la comercialización masiva de estas plantas, es su dificultad en la propagación. En las zingiberáceas, los rizomas son generalmente usados como propágulos, ya que la propagación por semillas es muy complicada debido a que tienen un periodo de dormancia superior a los 12 meses (Bejoy et al., 2012). En el caso particular de Cúrcuma, la propagación es llevada a cabo exclusivamente por esta vía asexual, dado que es una especie triploide ($2n = 3x = 63$) básicamente estéril. Adicional a esto, las condiciones para su cultivo tales como la altitud (1300 a 1800 msnm), el requerimiento de agua (1000 mm mínimo), la elevada temperatura y el suelo rico en materia orgánica, limitan de manera considerable la producción masiva (Urrea et al., 2011).

Otro de los problemas asociados al cultivo es su alta susceptibilidad a bacterias como *Pseudomonas solanacearum* y *Fusarium oxysporum*, además de nematodos como *Meloidogyne incognita* (Dohroo, 1989) y Oomicetes como *Phythium* sp., patógenos que son diseminados a través de los rizomas (Xiaoqiang y Gang, 2006), representando un gran problema para la conservación y almacenamiento de este germoplasma.

Por lo anterior, las técnicas de cultivo *in vitro* han sido consideradas como la mejor alternativa para la obtención de gran cantidad de plantas de estas especies con

las características fitosanitarias y de estabilidad genética óptimas para su comercialización.

En Cúrcuma, se han empleado técnicas de cultivo de tejidos con diferentes fines, particularmente en la propagación vía morfogénesis e inducción de microrizomas (Singh et al., 2011; Cousins y Adelberg, 2008; Tyagi et al., 2004; Mrudul et al., 2001; Salvi et al., 2001; Dekkers et al., 1991; Balachandran et al., 1990; Nadgauda et al., 1978). Por ejemplo, se han micropropagado plantas de *C. zedoaria*, *C. aromatic* (Anisuzzaman et al., 2008; Yasuda et al., 1987), *C. amada* (Prakash et al., 2004; Barthakur y Bordoloi, 1992), *C. angustifolia* (Shukla et al., 2007), *C. aeruginosa*, *C. caesia* (Balachandran et al., 1990) y *C. longa* (Rahman et al., 2004), entre otras.

En *Curcuma longa* L., específicamente, se ha logrado la formación de 4,7 brotes/explant en el medio MS suplementado con 3,0 mg/L de 6-benziladenina (BA) (Nayak y Kumar, 2006). Posteriormente, Urrea et al. (2011) empleando BAP a 2,0 mg/L logró incrementar este número a 11,0 brotes/explant.

Considerando que el tipo y cantidad de metabolitos sintetizados por la planta varía según las condiciones de cultivo, también se ha comparado el perfil metabólico de plantas de *Curcuma longa* propagadas por métodos convencionales y por cultivo de tejidos sin encontrar diferencias significativas entre ellas (Xiaoqiang y Gang, 2006).

Sin embargo, en Cúrcuma a la fecha son pocos los trabajos realizados para el establecimiento de métodos eficientes para la inducción de procesos de organogénesis, embriogénesis y regeneración de plantas completas a partir de diferentes explantes, entre ellos segmentos de hojas, bases de hoja y capas delgadas de células (TCL, por sus siglas en inglés).

En el presente estudio se describen los resultados obtenidos con diferentes reguladores de crecimiento vegetal y su combinación en varias concentraciones en la inducción procesos de organogénesis y embriogénesis a partir de distintos tipos de tejidos de *Curcuma longa* L.

Materiales y métodos

Material vegetal

Rizomas de *Curcuma longa* L. fueron usados como explantes para la obtención de plantas completas. Los rizomas con brotes fueron individualizados y cultivados bajo condiciones de vivero, usando una mezcla tierra arena (2:1) previamente esterilizada y fertilizando con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de la concentración de su fórmula cada 30 días. Plantas con un tamaño entre 10 y 15 cm se escindieron desde la base del rizoma, posteriormente fueron desinfectadas según lo descrito por Urrea et al. (2011).



Propagación *in vitro*

Después de la desinfección del material, se procedió a sembrar los explantes en medio basal MS suplementado con 6-benzil aminopurina (BAP 2,0 mg/L), sacarosa (30,0 g/L) y gelrite (1,8 g/L), ajustando el pH a 5,7 antes de esterilizar en autoclave a 121 °C a 20 lb de presión por 15 mi. Las condiciones de incubación fueron mantenidas, según Urrea *et al.* (2011), a una temperatura de 24 ± 2 °C con fotoperíodo de 16h luz (28-35 µmol m-2 s-1) y 8h oscuridad, logrando después de 90 días una adecuada micropagación del material con características morfológicas óptimas para los ensayos posteriores.

Formación de callos y embriones

Los ensayos fueron llevados a cabo sobre distintos tipos de tejido vegetal: base de hoja, hoja y *thin cell layers* (TCL) obtenidos a partir de plantas micropagadas como se describió anteriormente.

Para las bases de hoja se tomó el segmento basal incluyendo el meristemo apical de aproximadamente 0,5 cm². Los segmentos de hoja de aproximadamente 0,5 cm² fueron tomados a partir de hojas jóvenes. Las TLC fueron obtenidas a partir de pseudotallo de la parte basal incluyendo el meristemo apical con un tamaño aproximado de 0,2 cm².

Para establecer el tratamiento más adecuado para inducir la regeneración, se evaluó el efecto de algunos reguladores del crecimiento (auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) y ácido naftalenacético (ANA); citokininas: BAP y Kinetina (KIN)) en distintas concentraciones y combinaciones, adicionándolos al medio de cultivo basal MS suplementado con sacarosa (30,0 g/L) y gelrite (1,8 g/L), como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Reguladores de crecimiento vegetal y combinaciones evaluadas en la inducción de regeneración. 2,4D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-benzil aminopurina; KIN: Kinetina.

Regulador de crecimiento mg/L	BAP		KIN		
	1,0	2,0	0,5	1,0	
2,4 D	0,5	M1	M3	M5	M6
	1,0	M2	M4	M7	M8
ANA	1,0	M9	M10	M13	M14
	2,0	M11	M12	M15	M16

En cada caso se incluyeron los respectivos controles sin adición de reguladores de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 24 ± 2 °C bajo condiciones de oscuridad constante por un periodo

de 30 días. El tamaño de muestra fue de 12 explantes por tratamiento distribuidos en cajas de Petri con 4 explantes por caja y 3 repeticiones. Como indicadores de respuesta se evaluaron la formación y tipo de callo (granular, nodular, fibroso o embriogénico), formación de brotes y formación de raíces.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza simple (ANOVA). La determinación de grupos homogéneos y significativamente diferentes se llevó a cabo mediante la prueba de Rangos Múltiples y Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95 %, usando el programa Statgraphics 5 plus.

Resultados y discusión

Formación de callos y embriones somáticos.

Cuando se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento en diferentes explantes se encontró una marcada diferencia en la respuesta de los segmentos de hoja con respecto a las bases de hoja y las TCL.

En los segmentos de hoja se obtuvo una incipiente formación de callo, ubicado en general en los bordes y la superficie del tejido y principalmente con características de callo fibroso y granular en los tratamientos M1 a M8 (tabla 2).

A diferencia de esto, con los mismos tratamientos, en las TCL y las bases de hoja predominó la formación de callo granular, nodular y embriogénico (tabla 2).

Con la combinación BAP 1,0 mg/L y 2,4 D a 0,5 mg/L (M1) solamente se encontró callo embriogénico en las TCL, en los demás tejidos se favoreció la formación de callo granular, nodular y fibroso (figura 1). A diferencia de esto, la misma combinación de reguladores de crecimiento pero en mayor concentración (BAP 2,0 mg/L y 2,4 D a 1,0 mg/L; M4) permitió la formación de callo embriogénico en los tres tipos de explante (figura 1).

Los tratamientos M2, M3, M5, M6, M7 y M8 en segmento de hoja condujeron a la formación de todos los tipos de callo excepto el embriogénico; en tanto que, con los mismos medios, pero en TCL y bases de hoja, este fue el tipo de callo que predominó (figura 1).

Considerando las características fisiológicas de los tres tipos de tejidos evaluados, no es sorprendente la diferencia encontrada en la respuesta a los tratamientos con los reguladores de crecimiento entre los segmentos de hoja y los demás explantes. Los segmentos de hoja presentan un mayor grado de diferenciación en comparación con las bases de hoja y las TCL. Estas últimas son muy similares entre ellas y presentan, en general, un estado metabólico más activo caracterizado



Tabla 2. Respuesta de los diferentes tejidos a los tratamientos evaluados. TCL: *thin cell layers*; M1 – M8: reguladores de crecimiento vegetal y combinaciones evaluadas como se describió en la tabla 1.

	Segmento de hoja	Base de hoja	TCL
M1	Callos granular y fibroso en los bordes del explante	Callos fibroso y nodular	Callos nodular y embriogénico
M2	Callos incipientes en los bordes del explante	Callos fibroso, nodular y embriogénico	Callos nodular en haces vasculares y embriones
M3	Callos incipientes en los bordes del explante	Callos fibroso, nodular y embriogénico	Callos fibroso, granular y embriogénico
M4	Estructuras similares a embriones	Callos fibroso, granular, nodular y embriogénico	Callos fibroso, granular, nodular y embriogénico
M5	Callos incipientes y granular en la superficie y bordes del explante	Callos fibroso, granular, nodular y embriogénico	Callos granular, nodular y embriogénico
M6	Callos granulares en la superficie y bordes del explante	Callos granular, nodular y embriogénico	Callos granular, nodular y embriogénico
M7	Sin respuesta	Callos fibroso y embriogénico	Embriones
M8	Callos incipientes en bordes y superficie	Callos granular, fibroso y embriogénico	Callos nodular, granular y embriogénico

por una rápida proliferación celular dado que provienen de tejido en desarrollo. Esto podría explicar que en los segmentos de hoja la respuesta fuera menos contundente en la formación de callos que la obtenida en los explantes menos diferenciados.

En las bases de hoja y las TCL se registró la formación de todos los tipos de callo, un reflejo de la gran capacidad de estos tejidos para sufrir des-diferenciación y/o re-diferenciación ante el tratamiento con reguladores del crecimiento vegetal, máxime si se tiene en cuenta que estos son explantes ricos en elementos vasculares, caracterizados por su gran sensibilidad a estímulos ocasionados por señales reguladoras (Teixeira, 2003).

La respuesta obtenida en la combinación de 2,4 D y BAP o con KIN fue indistinta, sugiriendo que el efecto obtenido es debido a las características de los tejidos más que al tipo de citoquinina evaluada.

La combinación entre 2,4 D y BAP también ha mostrado buenos resultados en la inducción de embriones somáticos en otras especies de la familia Zingiberace. Por ejemplo, en *Curcuma amada*, Soundar-Raju *et al.* (2013) lograron la formación de callos embriogénicos a partir de segmentos de hoja mediante el cultivo en medio MS suplementado con 2,4 D a 2,0 mg/L y BAP 0,5 mg/L.

Por otro lado, en *Curcuma attenuata*, los porcentajes más altos (33,3 %) en la inducción de callos fue obtenida mediante el cultivo en medio suplementado con 2,4 D a 3,0 mg/L y KIN 0,5 mg/L (Kou *et al.*, 2013) partiendo de anteras como explante; no obstante, las características de los callos descritas no corresponden

a las de un callo embriogénico. A diferencia de esto, en el presente reporte, esta combinación de reguladores favoreció la inducción de callo embriogénico, sin embargo no se debe perder de vista que se partió de explantes muy diferentes, por lo tanto es de esperar que la respuesta sea diferente, muy probablemente como consecuencia de la carga hormonal endógena y las potencialidad del tejido mismo.

Cabe resaltar que la obtención de callos embriogénicos lograda en este estudio representa un aporte muy significativo para la obtención de regenerantes, como paso indispensable en los programas de mejoramiento mediante técnicas biotecnológicas en esta especie.

Regeneración vía organogénesis

El análisis de varianza permitió comparar el efecto de nueve de los tratamientos evaluados (M9 a M16 y control), tanto en base de hoja como en TCL, considerando el número de brotes y raíces como indicadores del efecto.

Con respecto al número de brotes, la razón-F fue de 3,40274 para las bases de hoja y de 3,03774 para las TCLs, demostrando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de este indicador según los tratamientos evaluados (tabla 3). Para el indicador número de raíces, usando las bases de hoja como explante la razón-F fue de 2,89665, y de 2,26317 en TCL, demostrando nuevamente diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos M9 a M16 (tabla 3). En todos los casos se obtuvo un

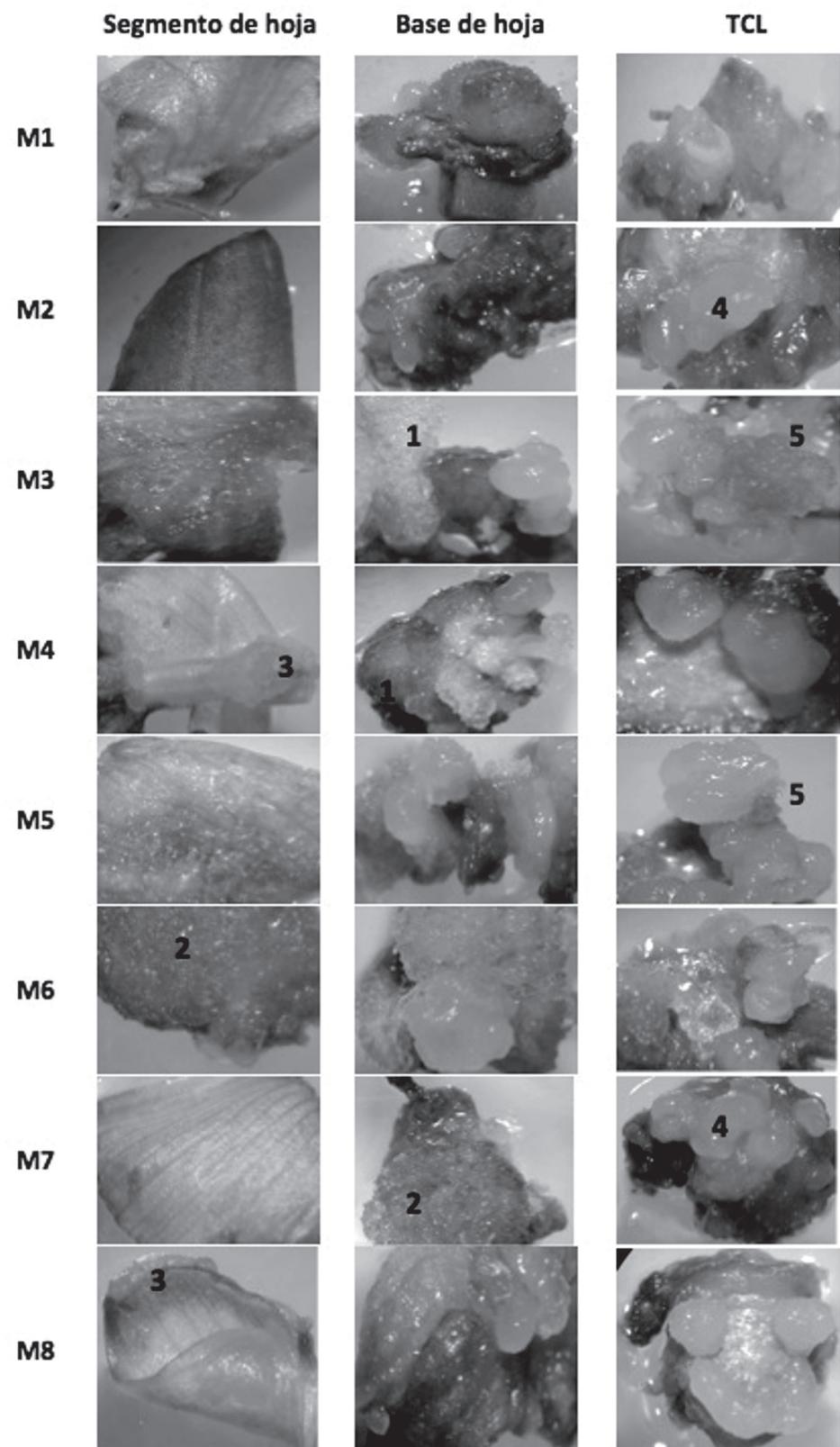


Figura 1. Respuesta de los tejidos a los tratamientos con reguladores de crecimiento. TCL: *thin cell layers*; M1 – M8: reguladores de crecimiento vegetal y combinaciones evaluadas como se describió en la tabla 1.1. Callo fibroso; 2. Callo granular; 3. Callo incipiente; 4. Embriones; 5. Callo nodular.



Tabla 3. ANOVA para las variables Número de brotes y Número de raíces en bases de hoja y TCL. TCL: *thin cell layers*; SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; R-F: razón F; V-P: valor P.

Número de brotes por tratamiento					Número de raíces por tratamiento						
Bases de hoja					Bases de hoja						
Fuente	SC	Gl	CM	R-F	V-P	Fuente	SC	Gl	CM	R-F	V-P
Entre grupos	87,0046	8	10,8756	3,40	0,0017	Entre grupos	407,993	8	50,9991	2,90	0,0061
Intra grupos	313,22	98	3,19612			Intra grupos	1725,41	98	17,6062		
Total (Corr.)	400,224	106				Total (Corr.)	2133,4	106			
TCL											
Fuente	SC	Gl	CM	R-F	V-P	Fuente	SC	Gl	CM	R-F	V-P
Entre grupos	24,253	8	3,03163	3,04	0,0043	Entre grupos	163,916	8	20,4896	2,26	0,0290
Intra grupos	97,803	98	0,99799			Intra grupos	887,242	98	9,05349		
Total (Corr.)	122,056	106				Total (Corr.)	1051,16	106			

valor-P menor que 0,05 a un nivel de confianza del 95,0 %.

Ahora bien, con la prueba de Rangos Múltiples se logró identificar dos grupos homogéneos cuando se emplearon bases de hoja como explante. Uno conformado por los tratamientos M11, M13, M14, M15 y M16, y el otro con el control y el tratamiento M9, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, con un nivel del 95,0 % de confianza (figura 2). Los mejores resultados en cuanto a número de brotes fue obtenido cuando el explante se cultivó en el medio MS exento de reguladores de crecimiento (3,1 brotes en promedio) y cuando fue suplementado con 1,0 mg/L de ANA y la misma concentración de BAP (2,9 brotes en promedio). Estos resultados fueron corroborados mediante la comparación de medianas con la prueba de Kruskal-Wallis, obteniendo un valor-P de 0,0104335 con un nivel del 95,0 % de confianza.

Cuando se emplearon TCL como explante se identificaron tres grupos homogéneos. El primero conformado por los tratamientos M16, M13 y M9, el segundo entre M11, M10, M15 y M14, y el tercero con el tratamiento control y el M12 (figura 2). Para este explante el mayor número promedio de brotes fue obtenido cuando se cultivo en el medio MS sin reguladores de crecimiento (1,8 brotes en promedio) y cuando fue suplementado con ANA y BAP ambos a 2,0 mg/L (1,3 brotes en promedio). La comparación de medianas con la prueba de Kruskal-Wallis, permitió verificar estas diferencias con un valor-P de 0,0112683 a un nivel de confianza del 95,0 %.

Para el indicador número de raíces, empleando las bases de hoja, se identificaron dos grupos homogéneos. El primero conformado por los tratamientos M15, M11, M16, M10, M12 y M14, y el segundo con el

control y M9; en el último caso con un número promedio de raíces de 7,1 y 7,25, respectivamente (figura 3).

En el caso de las TCL se separaron dos grupos, el primero compuesto por los tratamientos M11, M10, M16, M9, M15, M12 y M14 y el segundo por M12, M14 y M13 y el control; el mayor número promedio de raíces fue obtenido empleando el medio MS sin reguladores de crecimiento (4,9 raíces; figura 4) y cuando fue suplementado con ANA a 1,0 mg/L y KIN a 0,5 mg/L (4,6 raíces en promedio) (figura 3).

Sin embargo para este indicador, con las bases de hoja el valor-P fue de 0,207962 y de 0,0682319 en TCL, demostrando que para ambos explantes no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados con un nivel del 95,0 % de confianza.

En las bases de hoja, tanto la inducción de brotes como de raíces, tuvo la mejor respuesta en el medio contenido ANA a 1,0 mg/L y BAP a 1,0 mg/L y en el control exento de reguladores de crecimiento. Es de resaltar que la inducción lograda en morfogénesis, tanto caulinar como radicular, empleando los mismos tratamientos tiene una gran implicación en la regeneración de esta especie, ya que permite obtener plantas completas en un solo paso. Más aún, considerando que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el medio M9 y el control, y dado el impacto que pueden desencadenar los tratamientos con fitohormonas, es de elección el empleo del medio sin suplementos (medio basal MS).

A diferencia de lo reportado en este estudio, la respuesta organogénica o morfogénica se ha logrado mediante el cultivo con diferentes reguladores de crecimiento. En *Zingiber officinale* Rosc., con segmentos de rizoma se obtuvieron múltiples brotes empleando

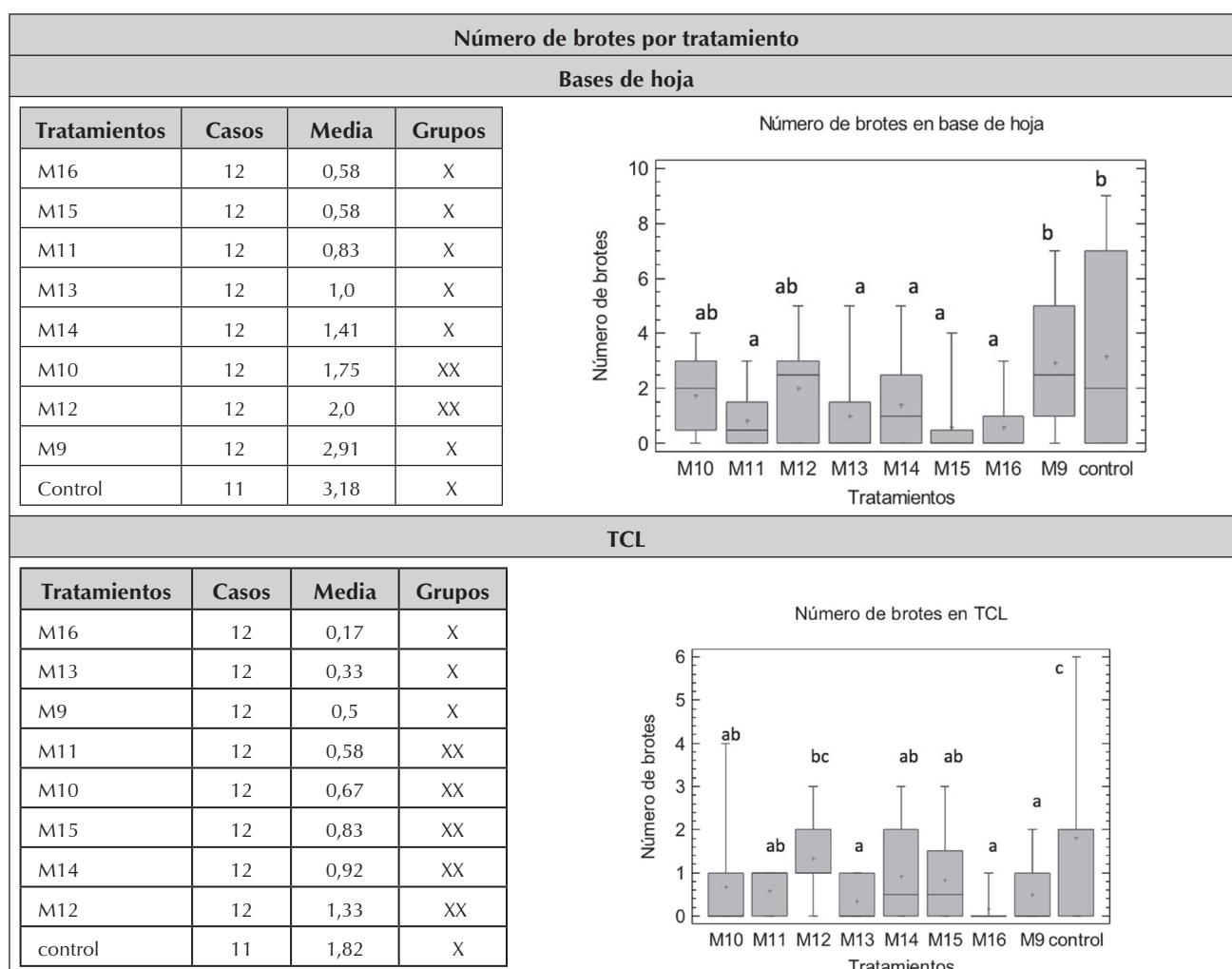


Figura 2. Prueba de Rangos Múltiples para la variable Número de brotes por tratamiento. Método: 95,0 % de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD)

BAP (5,0 mg/L) y ANA (0,5 mg/L), los cuales fueron luego elongados con BAP (3,0 mg/L) y ANA (0,5 mg/L) (Sarhyagowri y Seran, 2011). En el caso *Cúrcuma so-loensis* (Zhanga *et al.*, 2011) fue necesario un tratamiento combinado de BA (1,0 mg/L) y ANA (0,1 mg/L) para lograr la iniciación de los brotes (elongación sin formación de brotes laterales).

Kou *et al.* (2013), en *Cúrcuma attenuatta*, solo lograron la formación de brotes y raíces mediante el tratamiento combinado de BA 2,0 mg/L, ANA 0,5 mg/L y TDZ 0,3 mg/L en callos obtenidos a partir de anteras tratadas con 2,4 D 3,0 mg/L y KIN 0,5 mg/L. En otros géneros de la familia Zingiberaceae, también se ha reportado la regeneración indirecta empleando diferentes concentraciones y combinaciones hormonales. Por ejemplo, en *Cornukaempferia aurantiflora*, Saensouk (2011) se obtuvo callos a partir de explantes foliares mediante el tratamiento con 2,4 D a 2,0 mg/L, y se logró la regeneración de plantas cultiván-

dolos en medio MS suplementado con 2,4 D a 0,1 mg/L y BA a 5,0 mg/L.

Específicamente en *Cúrcuma longa*, se han empleado bases de hoja como explante para la formación de callos granulares mediante tratamientos con BA 0,5 mg/L y ANA a 5,0 mg/L; BA 0,5 mg/L y Dicamba (ácido 2-metoxi-3,6 diclorobenzoico) a 2,0 mg/L; y BA 0,5 mg/L y Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxílico) a 2,0 mg/L. Para la obtención de brotes a partir de estos callos, fue necesario el tratamiento combinado con BA 5,0 mg/L y TIBA (ácido 2,3,5 triiodobenzoico) a 0,1 mg/L o BA 5,0 mg/L y 2,4 D a 0,1 mg/L, resaltando que con este último tratamiento no fue posible la organogénesis a partir de los callos inducidos con ANA (Salvi *et al.*, 2001).

En la inducción de brotes se encontró una respuesta diferencial según el explante, TCL y base de hoja. Aunque en ambos casos la mejor respuesta fue obtenida con el tratamiento control y el medio contenido

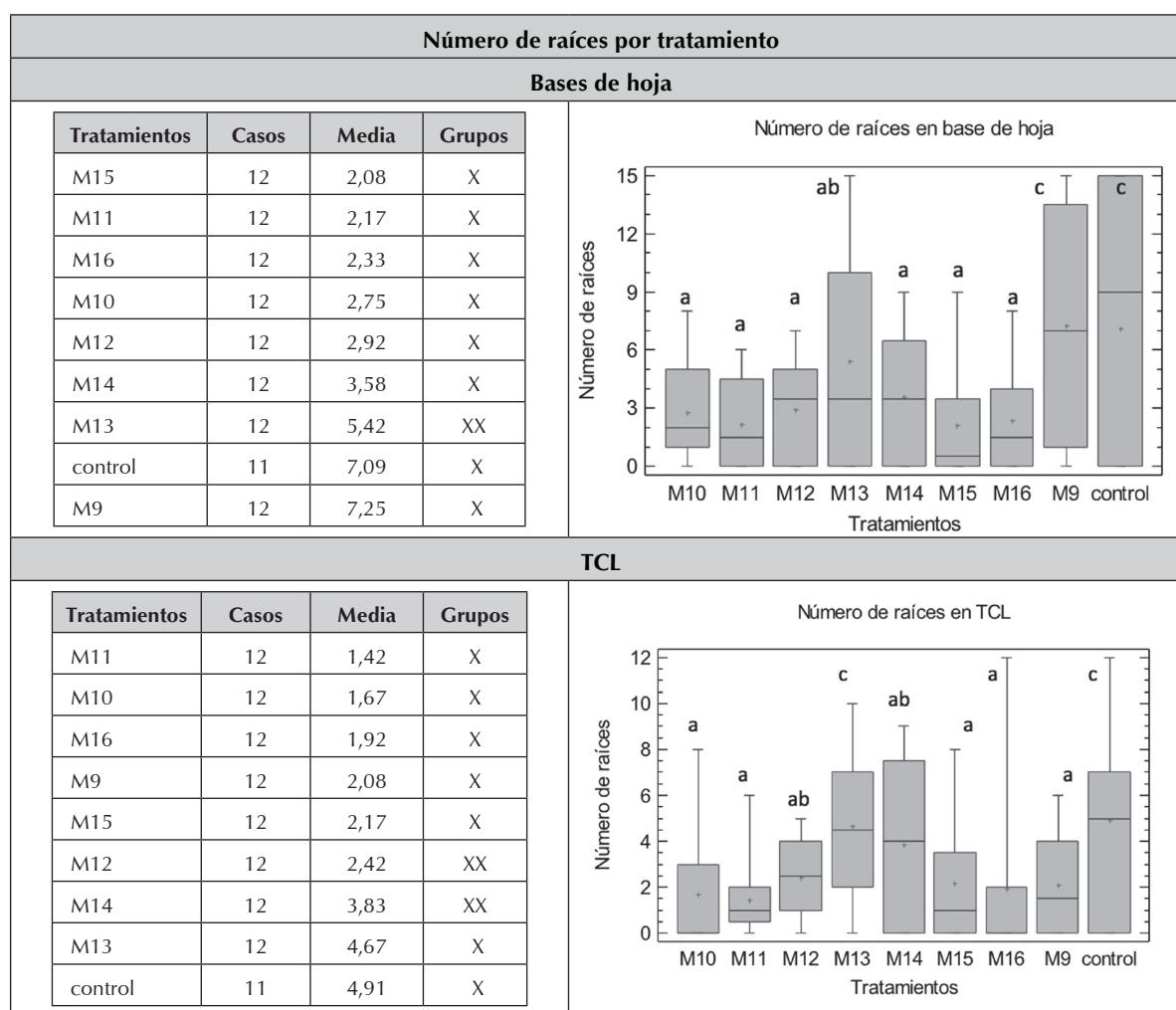


Figura 3. Prueba de Rangos Múltiples para la variable Número de raíces por tratamiento. Método: 95,0 % de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD)

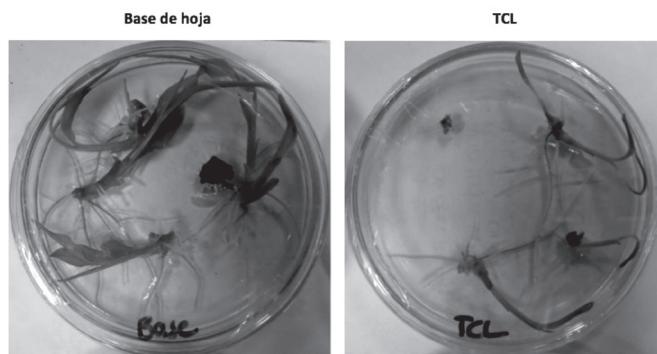


Figura 4. Respuesta morfogénica de las bases de hoja y TCL en medio exento de reguladores de crecimiento. TCL; *thin cell layers*.

ANA y BAP, llama la atención que en TCL se requiera una mayor concentración de ambos reguladores (2,0 mg/L de cada uno) aún manteniéndose la proporción entre ellos (1:1). Sin embargo, en este tejido siempre se obtuvo una menor cantidad de brotes con respecto a las bases de hoja, es probable que este comportamiento sea un reflejo de la concentración hormonal endógena y sensibilidad propias del tejido.

Las características fisiológicas y morfológicas de las TCL permiten suponer que la respuesta de este tejido al tratamiento hormonal se presentaría a una menor



concentración, sin embargo, en los resultados obtenidos se evidencio lo contrario. No obstante, el mayor número de brotes se encontró en el medio basal, dejando abierta la posibilidad que se esté presentando un detrimiento en la respuesta por el tratamiento hormonal mismo, sin embargo con las condiciones evaluadas no es posible afirmar o refutar esta hipótesis.

Conclusiones

Mediante la evaluación del efecto de reguladores de crecimiento vegetal, en distintas concentraciones y combinaciones, sobre segmentos de hojas, bases de hoja y TCL fue posible inducir la formación de callo embriogénico y obtener plantas completas de *Curcuma longa* vía organogénesis.

Se encontró una respuesta diferencial de los tejidos evaluados ante los distintos tratamientos con reguladores de crecimiento, muy probablemente como un reflejo de las características fisiológicas y metabólicas de los explantes. Con el medio conteniendo BAP 1,0 mg/L y 2,4 D a 0,5 mg/L se logró la formación de callo embriogénico exclusivamente en TCL; a diferencia de ello, con el medio conteniendo BAP 2,0 mg/L y 2,4 D a 1,0 mg/L fue posible inducir la formación de callo con características embriogénicas de manera independiente del tipo de explante.

Se indujo simultáneamente la organogénesis caulinar y radicular, con mejores resultados en vigor cuando se usaron bases de hoja. En este tejido se obtuvo el mayor número de brotes tanto cuando el medio fue adicionado con 1,0 mg/L de ANA y BAP, como cuando se mantiene exento de reguladores de crecimiento.

Agradecimientos

Agradecemos al soporte financiero del proyecto "Transformación genética transitoria, propagación y regeneración *in vitro* de plantas de *Curcuma longa* L", financiado por el CODI, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia.

Referencias bibliográficas

- Abd-Elraheim, A.E.; Mohi El-din, M.M.; Ali Salman, M.M. and Abdel-Rahman, R.A. 2013. Patho-physiological studies on the reverse effect of Curcumin (*Curcuma longa*, Zingiberaceae), and Ursodeoxycholic acid) against the toxicity of carbon tetrachloride on albino rats. *American Journal of Research Communication*. ISSN: 2325-4076.
- Alvis, A.; Arrazola, G. y Martínez, W. 2012. Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Curcuma longa*). *Información Tecnológica*. 23 (2): 11-18.
- Anisuzzaman, M.; Sharmin, S.; Mondal, S.; Sultana, R.; Khalekuzzaman, M.; Alam, I. and Alam, M. 2008. *In vitro* microrhizome induction in *Cúrcuma zedoaria* (Christm.) Roscoea conservation prioritized medical plant. *Journal of Biological Sciences*. 8: 1216-1220.
- Balachandran, S.; Bhat, S. and Chandel, K. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma spp.*) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Report*. 8: 521-524.
- Barthakur, M. and Bordoloi, D. 1992. Micropropagation of *Curcuma amada* (Roxb.). *Spices Aromatic Crops*. 1: 154-156.
- Bejoy, M.; Dam, M.; Anish, N.; Nair, A.; Radhika, B. and Manesh, K. 2012. Micropropagation of an Indian Ginger (*Cúrcuma vamana* Sabu and Mangaly): A wild relative of Turmeric. *Biotechnology*. 11 (6): 333-338.
- Cousins, M. and Adelberg, J. 2008. Short-term and long-term time course studies of turmeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 93: 283-293.
- Dekkers, A.; Rao, A. and Goh CJ. 1991. *In vitro* storage of multiple shoot cultures of gingers at ambient temperatures of 24-29 °C. *Scientia Horticulturae*. 47: 157-167.
- Dohroo, N. 1989. Seed transmission of pre-emergence rot and yellows in ginger. *Plant Disease Research* 4:73-74.
- Jaggi, Lal. 2012. Turmeric, Curcumin and Our Life: A Review. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 1 (7): 11 - 17.
- Jantan, I.; Chany Saputri, F.; Naeem Qaisar, M. and Buang, F. 2012. Correlation between Chemical Composition of *Cúrcuma domestica* and *Cúrcuma xanthorrhiza* and Their Antioxidant Effect on Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Ji H., Kim; Subash C., Gupta; Byoungduck, Park; Vivek R., Yadav and Bharat B. Aggarwal. 2012. Turmeric (*Curcuma longa*) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)- κ B and NF- κ B regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56: 454-465.
- Jurenka, J.S. 2009. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Alternative Medicine Review*. 14: 2.
- Kou, Y.; Guohua, M.; Teixeira da Silva, J. and Liu, N. 2013. Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuata* Wall. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 112: 1-7.
- Kumar Joshi, R.; Kuanar, A.; Mohanty, S.; Subudhi, E. and Nayak, S. 2010. Mining and characterization of EST derived microsatellites in *Curcuma longa* L. *Bioinformation*. 5 (3): 128-131.
- Mrudul V., Shirgurkar, C.K. John and Rajani S. Nadgauda. 2001. Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64: 5-11.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:437-497.
- Nadgauda, R.; Mascarenhas, A.; Hendre, R. and Jagannathan, V. 1978. Rapid multiplication of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) plants by tissue culture. *Indian Journal of Experimental Biology*. 16: 120-122.
- Nayak, S. and Kumar Naik, P. 2006. Factors effecting *in vitro* microrhizome formation and growth in *Curcuma longa* L. and improved field performance of micropropagated plants. *Science Asia*. 32: 31-37.
- Panditrao, Palve, Y. and Nayak, P.L. 2012. Curcumin: A wonder anti-cancer drug. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*. 3 (2): 60-69.
- Prakash, S.; Elongomathavan, R.; Seshadri, S.; Kathiaravan, K. and Ignacimuthu, S. 2004. Efficient regeneration of *Curcuma ananda* Roxb. plantlets from rhizome and leaf sheath explants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 78: 159-165.
- Rahman, M.; Amin, M.; Jahan, H. and Ahmed, R. 2004. *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. A valuable spice plant in Bangladesh. *Asian Journal of Plant Sciences*. 3: 306-309.
- Saensouk, P. 2011. Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Cornucaempferia aurantiiflora* mood & larsen. *Pakistani Journal of Botany*. 43 (5): 2415-2418.
- Salvi, N.; George, L. and Eapen, S. 2001. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 113-119.



- Sarhyagowri, S. and Seran, T. 2011. *In vitro* plant regeneration of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with emphasis on initial culture establishment. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1 (3): 195-202.
- Shukla, S.; Shukla, S.; Kocha, V. and Mishra, S. 2007. *In vitro* propagation of tikhur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): a starch yielding plant. *Indian Journal of Biotechnology*. 6: 274-276.
- Singh, S.; Kuanar, A.; Mohanty, S.; Subudhi, E. and Nayak, S. 2011. Evaluation of phytomedicinal yield potential and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown turmeric (*Curcuma longa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104 (2): 263-269.
- Soundar-Raju, C.; Kathiravan, K.; Aslam, A. and Shahajan, A. 2013. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 112 (3): 387-393.
- Tehranipour, M.; and Erfani, M. 2012. The effect of *Curcuma longa* alcoholic extract on cell regeneration (neurons and neuroglia) after sciatic nerve injury in diabetic rats. *Pharmacologia*. 3 (8): 2999-305.
- Teixeira, J. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12): 683-691.
- Tyagi, R.; Yusuf, A.; Dua, P. and Agrawal, A. 2004. *In vitro* plant regeneration and genotype conservation of eight wild species of Curcuma. *Biologia Plantarum*. 48 (1): 129-132.
- Urrea, A.; Canal-Morales, A. y Monsalve-Fonnegra, Z. 2011. Micropropagación e inducción de órganos de almacenamiento en *Curcuma longa* L. *Actualidades Biológicas*. 33 (94): 5-15.
- Velayudhan, K.; Dikshit, N. and Abdul, M. 2012. Ethnobotany of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 11 (4): 607-614.
- Xiaoqiang, M.; and Gang, D. 2006. Metabolic Profiling of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Plants Derived from *in Vitro* Micropropagation and Conventional Greenhouse Cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (25): 9573-9583.
- Yasuda, K.; Tsuda, T.; Shimazu, H. and Sugaya, A. 1987. Multiplication of Curcuma species by tissue culture. *Plant Med*. 54: 75-78.
- Zhang, S.; Liua, N.; Shenga, A.; Mab, G.; and Wub, G. 2011. Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* Valleton (Zingiberaceae) and *ex vitro* performance of regenerated plants. *Scientia Horticulturae*. 130: 899-905.
- Zhou, H.; Beevers, C. S.; and Huang, S. 2011. The targets of curcumin. *Current Drug Targets*. 12 (3): 332-347.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe colombiana en *Vigna unguiculata*

Infectivity and effectiveness of isolated rhizobia from colombian Caribbean Soils in *Vigna unguiculata*

Jonathan Alberto Mendoza Labrador*, **Ruth Rebeca Bonilla Buitrago***

Resumen

Es el primer estudio en Colombia que abarca una evaluación de rizobios nativos asociados a frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en los departamentos del Cesar y la Guajira. En esta investigación, se demostró que la utilización de aislamientos de rizobios nativos aislados a partir de nódulos, mejoraron el desarrollo del frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), siendo estas bacterias más eficientes que los tratamientos químicos y absolutos (sin inóculo ni fertilización) y que las cepas inducidas mejorando además, la fijación biológica de nitrógeno y la tasa fotosintética. Como aportes del estudio, se determinó que en condiciones de invernadero la fertilización biológica fue más eficiente que la química y que, de acuerdo a los resultados obtenidos de las diferentes variables agronómicas evaluadas, esto podría influir positivamente en los rendimientos nutricionales del cultivo, base alimentaria de los sistemas ganaderos de estas regiones del país y fuente alimenticia de la comunidad indígena y de bajos recursos económicos.

Palabras clave: Nodulación, fijación Biológica de Nitrógeno, Fertilización, Tasa Fotosintética.

Abstract

This is the first study in Colombia which covers an evaluation of native rhizobium associated to the Caupí bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in the departments of Cesar and Guajira. In this research it was demonstrated that the use of native rhizobium isolated from nodes, improved the development of the Caupí bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.), being this bacteria more efficient than the chemical and absolute treatments (without inoculum and fertilization) also improving the biological nitrogen fixation and the photosynthetic rate. As contribution of the study, it was determined that in greenhouse conditions and according to the results obtained from different measured agronomic variables, this could influence positively in the nutritional performance of the crop, basis of food of the cattle system of this regions of the country and the food source of the indigenous community of low economic income.

Key words: Native Rhizobium, biological nitrogen fixation, fertilization, photosynthetic rate.

Recibido: febrero 3 de 2014

Aprobado: octubre 10 de 2014

Introducción

Los suelos de los departamentos del Cesar y La Guajira (Colombia), han sufrido un proceso de deterioro, debido al mal manejo al cual fueron sometidos al realizar actividades agrícolas y ganaderas, derivando, entre otros efectos, en un aumento de la erosión, compactación, disminución de la fertilidad y biodiversidad (Garrido, 2007).

Algunos de los problemas que se presentan son ocasionados por el uso indiscriminado de fertilizantes minerales, principalmente fuentes de nitrógeno, por la necesidad de suplir este nutriente que es limitante.

Por otra parte, el nitrógeno atmosférico (N_2) es la reserva más abundante en la biosfera y aunque es prácticamente ilimitada, ésta no es directamente utilizada por plantas y animales pues para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido por el rompi-

* Ingeniero Biotecnológico. Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpocaja Km 14 Mosquera. jonathan-mendoza@hotmail.com. B., PhD. Laboratorio de Microbiología de Suelos rbonilla@corpocaja.org.co Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpocaja, Mosquera Cundinamarca Colombia.



miento del triple enlace que une los dos átomos de N, dando lugar a la formación del amonio. Sin embargo, los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción están presentes en los dominios Bacteria y Archaea gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa (Baca et al., 2000).

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) que se lleva a cabo en las plantas por dichos microorganismos constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno. Para mitigar el impacto ambiental causado por los fertilizantes minerales, se deben aplicar prácticas agrícolas sostenibles que aumenten la eficiencia y la sostenibilidad de la producción de cultivos de necesidad alimentaria, tales como el frijol, al maximizar la fijación biológica de nitrógeno mediante la incorporación de cultivos de leguminosas capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios (Burow et al., 2004).

Esta investigación se realizó con el objetivo de demostrar la posibilidad que existe de mejorar la producción de frijol Caupí, evaluando el efecto de la inoculación de los rizobios aislados de los departamentos del Cesar y la Guajira; evidenciando que se puede llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, dando resultados positivos en el desarrollo de la leguminosa, dicha información preliminar es de gran importancia para establecer la posibilidad de una mayor utilización de biofertilizantes para leguminosas en Colombia.

Materiales y métodos

Aislamiento de rizobios nativos de frijol Caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Se recolectaron raíces noduladas de frijol Caupí en las fincas Campo Alegre del departamento de la Guajira (*Latitud* ($^{\circ}$ n): 10, 88904, *longitud* ($^{\circ}$ w): 72, 87864, *altura* (m): 215, *presión* (mm/hg): 741, *edad del cultivo* 36 días) y El Paraíso del departamento del Cesar (*Latitud* ($^{\circ}$ n): 10, 38755, *longitud* ($^{\circ}$ w): 73, 17681, *altura* (m): 158, *presión* (mm/hg): 746, *edad del cultivo* 36 días). Para el aislamiento se realizó una muestra compuesta por 12 raíces para cada una de las fincas. Las raíces fueron tomadas en forma de zig-zag de tres lotes diferentes seleccionados de acuerdo a su homogeneidad.

Se retiraron los nódulos de las muestras compuestas de cada una de las fincas y se rehidrataron en solución salina estéril (NaCl 0,85 %) durante una hora. Posteriormente, se desinfectaron sumergiéndolos en etanol (95 %) durante 1 min, se hizo un enjuague con agua estéril y después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (70 %) con el fin de desinfectarlos por 2 min y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para retirar los residuos de las soluciones desinfectantes (Beck et al. 1993).

Los nódulos fueron puestos en condiciones de esterilidad en un crisol con 1 ml de solución salina (NaCl 0,85 %) y macerados mecánicamente para liberar los bacteroides. La solución bacteriana obtenida se sembró en placas con medio de cultivo YMA (levadura-manitol) (Vincent, 1970) suplementado con rojo congo y se incubó a 30 $^{\circ}$ ± 2 °C por un periodo de 15 días. Posteriormente, se realizaron siembras por agotamiento de las colonias obtenidas en nuevas placas con medio YMA con el objetivo de tener cultivos puros verificados con tinción de Gram.

Caracterización fenotípica de los aislamientos

Los aislamientos obtenidos fueron sembrados en YMA con azul de bromotimol para observar la formación de ácido o alcalinización del medio. Además, en este medio se determinó el tiempo de crecimiento, color, diámetro, transparencia, elevación, forma, formación y elasticidad de la mucosidad de las colonias. Se realizó tinción diferencial de Gram para validar la morfología bacteriana característica de los rizobios (Valero, 2002).

Efecto de los aislamientos sobre el desarrollo del frijol Caupí

Se utilizaron semillas sanas provenientes de cada una de las fincas donde se realizaron los muestreos. Las semillas fueron desinfectadas usando el protocolo propuesto por (Beck et al. 1993). En el invernadero se realizaron pruebas de nodulación por triplicado en materas de icopor de 24 oz, empleando como sustrato vermiculita y arena en una relación (2:1) (v/v) con tres ciclos de esterilización consecutivos y tiempo de esterilización de 2 h a una temperatura de 120 °C. Las condiciones del invernadero fueron 32 °C y una humedad relativa de 60 %.

Se aplicó un diseño completamente al azar con 27 tratamientos: uno por cada aislamiento realizado, un testigo absoluto (sin fertilizar), un testigo químico (suplementado con 200 ppm de KNO_3) y dos cepas de referencia (UFLA 1 y UFLA 2). Las cepas de referencias fueron aisladas de frijol Caupí por Marra 2011 de la Universidad Federal de Lavras de Brasil.

Para el inóculo se preparó una suspensión celular de los aislados obtenidos en 5 ml de YMA líquido y se incubó a 30 °C y 120 rpm durante 7 días hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0,5 que equivale a 1 x 10^8 UFC/ml. Después de 60 días de la inoculación se midió la longitud de la parte aérea, longitud de la raíz principal, peso fresco y peso seco de la parte aérea, peso fresco y peso seco de la raíz, número de nódulos y tasa fotosintética de las plantas. La medición de la tasa fotosintética se realizó mediante el uso de un fotosintetizador portátil TPS- 2, que da una unidad de medida de la asimilación de CO_2 (fotosíntesis y respiración) (Clesceri, et al., 1998).



Prueba de reducción de acetileno (ARA) para la determinación de la actividad nitrogenasa

Se tomó una única muestra de raíces noduladas por cada uno de los aislamientos evaluados y se introdujeron en frascos de 280 ml. Los frascos se cerraron herméticamente y se les retiró por completo todo el oxígeno con una jeringa. Se sustituyó el 10% del volumen, correspondiente a 28 ml de la atmósfera del frasco con acetileno y se incubó durante 1 hora a 32° C. Posteriormente, con el fin de medir la concentración de etileno, 1 ml de gas fue tomado como muestra e inyectado en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, USA) con detector de ionización de llama y una columna Poropak N con malla de 200/300 de 1.82 m y 3 mm de diámetro (Eckert et al., 2001). Las condiciones del cromatógrafo para realizar esta prueba fueron, nitrógeno en el tanque y el equipo de 30 psi, aire en el tanque 40 psi y el equipo 30 psi y el hidrógeno en el tanque 30 psi y el equipo 22 psi.

Análisis estadístico

Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el software SPSS 17.0 y posteriormente se realizó la prueba de comparación de medias empleando la prueba de Tukey.

Resultados

Aislamiento y caracterización fenotípica de rizobios a partir de nódulos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Se obtuvieron 23 aislamientos rizobianos: 11 a partir de los nódulos de las muestras de la Guajira y 12 del Cesar. Del total, 9 presentaron crecimiento lento (crecimiento en medio YMA sólido en 7 días), los cuales también presentaron alcalinización en el medio de cultivo YMA más azul de bromotimol y 14 presentaron crecimiento rápido (crecimiento en medio YMA en 2 días), presentando acidificación en el medio de cultivo. En la tabla 1, se muestran los diferentes diámetros de la colonia que presentan los 23 aislamientos. Las características culturales de las colonias rizobianas como lo son el tiempo de crecimiento (rápido, intermedio, lento y muy lento), cambios de pH (acidificación y al-

calinización) y el diámetro de la colonia, son importantes para suponer que los aislamientos pueden de diferentes géneros y especies de rizobios.

Los cambios de pH en el medio de cultivo se deben a la utilización preferencial de azúcares por las especies de crecimiento rápido seguida de la excreción de ácidos orgánicos. Ciertas combinaciones de aminoácidos y azúcares (en general glutamina y galactosa) promueven una acidificación del medio después del crecimiento de dichos microorganismos. Mientras que los microorganismos de crecimiento lento alcalinizan el medio, ya que sintetizan compuestos nitrogenados y liberan cationes. Además con relación a las fuentes de nitrógeno, estos microorganismos metabolizan más glutamato y α -ceto-glutarato que los microorganismos de crecimiento rápido, en cuanto que el manitol es utilizado del mismo modo por ambos (Tan et al., 1981).

Prell et al., (2006), estudiaron el metabolismo del nódulo observando diferencias en la utilización de carbohidratos por diversas especies de rizobios, así como diferencias enzimáticas entre especies rápidas y lentas asociadas a las más importantes enzimas de las cuatro principales vías metabólicas de los carbohidratos. Estos autores concluyeron que especies de crecimiento rápido poseen enzimas correspondientes al ciclo de la hexosa monofosfato, se hace referencia a lo anterior por las diferencias presentadas de los aislamientos en el tiempo de crecimiento y los cambios de pH en el medio de cultivo YMA con azul de bromotimol.

Pruebas de Nodulación

Los resultados del análisis estadístico presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los siguientes parámetros evaluados en condiciones de invernadero, longitud de la parte aérea, peso fresco de la raíz, número de nódulos, peso seco de la raíz y medición de la tasa fotosintética. En la Figura 1, se puede observar el comportamiento positivo de los aislamientos G58A, CC01, CB02, CD01 donde se presentaron diferencias significativas y se compararon con los testigos químico, absoluto y la cepa de referencia UFLA 1.

Los resultados de la variable tasa fotosintética, coinciden con los aislamientos que presentaron un mejor crecimiento de la planta *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Tabla 1. Característica cultural de las colonias de los 23 aislamientos del departamento de la Guajira y del Cesar.

Cepas Guajira	G51A	G52A	G53A	G53B	G54A	G54B	G56A	G56B	G57A	G57B	G58A	
DDC	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	
Cepas Cesar	CA01	CA02	CB01	CB02	CC01	CC02	CD01	CD02	CE01	CE02	CF01	CF02
DDC	0,4	≤ 1	0,6	≤ 1	0,5	≤ 1						

DDC - Diametro de las colonias en cm medido después de 7 días de crecimiento en el medio de cultivo
YMA con azul de bromotimol.

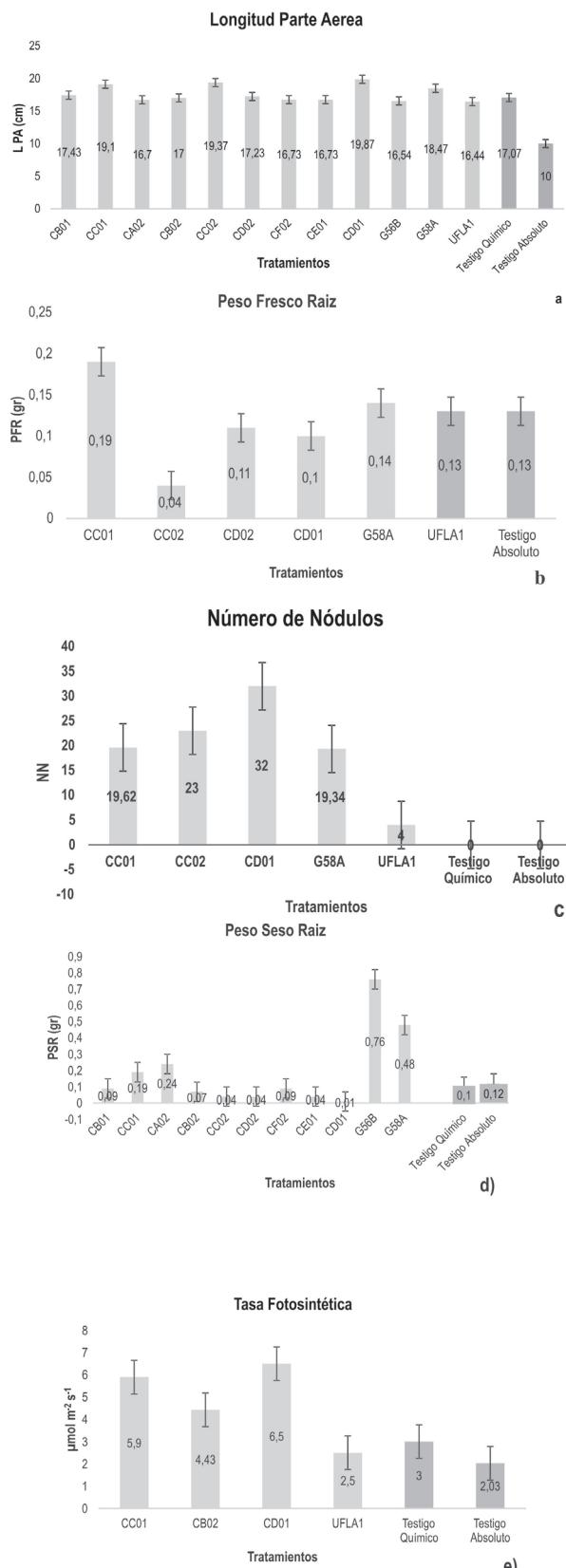


Figura 1. Diferencias estadísticamente significativas en relación a cada parámetro evaluado de acuerdo a la prueba de Tukey HSD, a) Longitud parte aérea b) Peso fresco raíz c) Número de nódulos d) Peso seco raíz e) Tasa fotosintética.



en las pruebas de nodulación. El aislamiento del Cesar CD01 con una longitud de la parte aérea de 19,86 cm y longitud de la raíz de 19,80 cm presenta un valor en la tasa fotosintética de $6,50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figura 1), el aislado CD01 duplica los testigos químicos absoluto y la cepa de referencia UFLA 1, esto se debe a que está planta inoculada con la cepa CD01 que obtuvo un mejor crecimiento que pudo ser influenciado por la fijación biológica de nitrógeno.

El aislamiento de la Guajira G58A presentó valores altos comparados con los datos obtenidos del testigo absoluto y evidenció actividad nitrogenasa en la prueba de reducción de acetileno, también mostró valores altos en la medición de la tasa fotosintética $2,83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que demuestra una relación directa entre la fijación biológica de nitrógeno y el proceso de fotosíntesis, gracias a la relación mutualista que existe entre los rizobios y la leguminosa fríjol Caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Prueba Cualitativa de reducción de Acetileno (ARA)

Esta prueba de reducción de acetileno es un método indirecto de medición de la fijación biológica de nitrógeno ya que lo que se mide es la actividad de la enzima nitrogenasa, los resultados de esta prueba cualitativa demostraron que las raíces noduladas por cada uno de los aislamientos obtenidos tanto del departamento del César como de la Guajira presentaron picos de etileno en la lectura realizada por cromatografía de gases, lo cual se podría deducir que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y por ende pueden contribuir a mejorar el crecimiento del frijol Caupí en estos dos departamentos de Colombia.

Aunque se realizó una sola medición, los resultados más altos comparados con los testigos químico y absoluto fueron los siguientes, los aislamientos obtenidos a partir de muestras de nódulos de la Guajira, G56A: 8558.97 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, G54B: 3216.23 nmol C₂H₄ h⁻¹, mL⁻¹, y los aislados del Cesar fueron CA01: 6082.69 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, CB02: 3211.79 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹.

Conclusiones

Con esta investigación se evidencia la presencia de fijadores de nitrógeno simbóticos en esta región de Colombia. Para conocer otro tipo de microorganismos con potencial biofertilizante, es necesario realizar estudios a nivel molecular, pues existe una gran diversidad de microorganismos que han sido poco estudiados.

Los resultados del análisis estadístico muestran que los mejores aislamientos fueron G58A, CC01, CB02 y CD01, los cuales pueden ser punto de partida para la producción de un biofertilizante mixto que permita mejorar la productividad y rentabilidad por hectárea

del frijol Caupí, y de esta manera contribuir a la seguridad alimentaria de comunidades indígenas y pequeños productores de estos dos departamentos de Colombia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica-, y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -MADR-, por su financiación. Al señor Mauricio Barón y la señora Inés Roldan por su gran colaboración.

Referencias bibliográficas

- Baca, B.; Soto, L.; Pardo, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*. 38: 39-49.
- Barnet, Y.; Catt, P. 1991. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil*. Dordrecht. 135: 109-120.
- Beck, D.; Materon, L.; Afandi, F. 1993. Practical rhizobium-legume technology manual. Icarda. Syria. p. 55.
- Burow, M.E.; Fox, J.E.; Jones, P.; McLachlan, J.; Starcevic, M. 2004. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 112: 672-677.
- Campillo, R.; Urquiza, I.; Montenegro, A. 2003. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del N15. *Agricultura Técnica* 63:169-179.
- Carreño, R.; Campos, N.; Elmerich, C.; Baca, B. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Molecular General Genetics*. 264: 521-530.
- Clesceri, L.; Greenberg, A.; Eaton, A. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. (APHA, American Public Health Association, Washington D.C.) 6: 467-476.
- De Lima, S.; André, L.; Resende, P.; Andrade, F.; Ademar, P.; Do Vale, M.; Helson, M.; Silva, A.; Messias, B.; De Souza M, F. M. 2006. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (mg). i - caupi. Seção III - Biologia do Solo. 30:803-811.
- De Souza, A.; Burity, A.; Figueiredo, M. 1999. Eficiência simbótica de estípites *hup⁺*, *hup^{hr}* e hupde *bradyrhizobium japonicum* e *bradyrhizobium elkanii* em cultivares de caupi¹. Centro de citricultura. *Pesq. Agropec. Bras.* 34:1925-1931.
- Eckert, B.; Baller, O.; Kirchhof, G.; Halbritter, A.; Stoffels, M.; Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereinerae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 17-26.
- EMBRAPA. 1994. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiología Agrícola.
- Gallardo, I.; Celis, L. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Agrícola y Veterinaria. 45-121.
- Garrido, R.; M, F. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos en dos épocas climáticas del valle y sabana del Cesar. Universidad Militar Nueva Granada. *Biología Aplicada*. 21-65.
- Kahindi, J.H.P. 1997. Agricultural intensification, soil diversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied soil ecology*. 6:55-76.
- Marra, L.; Oliveria, M.; Soares, C.; Moreira, F. 2011. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Ciencia do solo*. 68:5 603-609.



- Prell, J.; Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14(4), 161–8. doi:10.1016/j.tim.2006.02.005
- Qué es CORPOICA ? (s.f.). Recuperado el 18 de enero de 2014. De <http://www.angelfire.com/ia/Turipana/queescorp.html>.
- Sosa, A.; Elías, A.; García, O. A.; Sarmiento, M. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38:197–201.
- Sprent, J. 1994. Evolution and diversity in the legume- rhizobium symbiosis: Chaos theory. *Plant and soil*. Dordrecht. 161: 1-10.
- Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487-506.
- Tan, I. K. P.; Broughton, W.J. 1981. Rhizobia in tropical legumes XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biology and Biochemistry Oxford*. 13: 389-393.
- Valarini, M.J.; Gogoy, R. 1994. Contribuição da fixação simbótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Instituto de zootecnia EMBRAPA. *Sci. Agric., Piracicaba*. 51 (3): 500-503.
- Valero, N. 2002. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Universidad Nacional de Colombia. Maestría Interfacultades en Microbiología. Bogotá, D.C.
- Vincent, J. M. (James Matthew) & International Biological Programme. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific, Oxford.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Finding of a novel fungal immunomodulatory protein coding sequence in *Ganoderma australe*

Hallazgo de una nueva secuencia codificadora para una proteína inmunomoduladora de origen fúngico en *Ganoderma australe*

*Andrea González Muñoz**, *Kelly Johana Botero Orozco***, *Germán Ariel López Gartner****

Abstract

Among the most common human diseases with immune system compromise are autoimmune diseases, cancer, and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Many of these diseases still have no treatment or their therapies have undesirable side effects. This has aroused a great interest in the search for new natural products with therapeutic potential and scientifically proven effects, showing minimal side effects. Formal clinical and pharmacological investigation in various medicinal fungi of the genus *Ganoderma* (Ganodermataceae) has shown immunomodulatory effects and tumor growth inhibition in mammals, attributable to the presence of immunomodulatory proteins and other secondary metabolites. To date, six fungal immunomodulatory proteins (FIPs) have been reported in *Ganoderma*. This paper seeks to advance in the discovery of immunomodulatory proteins present in *Ganoderma australe*, through mycelium transcriptome 454 Roche® pyrosequencing (RNA-seq) and bioinformatics analyses. The results suggest the presence of gene sequences related to an immunomodulatory protein which has been reported in another fungal species *Taiwanofungus camphoratus*. The candidate gene sequences found in *G. australe* exhibit high identity values in their amino acid composition and predicted protein secondary structure with the protein reported for *Tai. camphoratus*. According to present knowledge about the action mechanisms of these proteins, it is possible to suggest that this is a promising molecule for the treatment and prevention of diseases associated with certain immune deficiencies, cancer, and other diseases with compromised immune systems. Future studies are proposed in order to determine its immunomodulatory potential using *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: *Ganoderma*, fungal immunomodulatory protein, immunomodulation, transcriptome, therapeutic.

Resumen

Enfermedades comunes como las autoinmunes, el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida aún no tienen tratamiento o sus terapias tienen efectos secundarios indeseables. Esto ha suscitado el interés en la investigación de bioproductos con potencial terapéutico, que no impliquen efectos secundarios. Investigaciones farmacológicas y clínicas en algunos hongos medicinales del género *Ganoderma* (Ganodermataceae) han comprobado efectos inmunomoduladores e inhibidores de crecimiento tumoral en mamíferos, atribuibles a la presencia de proteínas fúngicas inmunomoduladoras (FIPs) y otros metabolitos secundarios. Este trabajo busca avanzar en el descubrimiento de proteínas inmunomoduladoras presentes en *Ganoderma australe*, mediante la secuenciación del transcriptoma de micelio por tecnología de pirosecuenciación 454 Roche® (RNA-seq) y análisis bioinformáticos. Los resultados sugieren la presencia de secuencias génicas relacionadas con una proteína inmunomoduladora que se ha reportado en la especie de hongos *Taiwanofungus camphoratus*. Las secuencias génicas candidatas halladas en *G. australe* exhiben altos valores de similitud en sus predicciones de composición aminoácida y estructura secundaria proteica con la proteína reportada para *Tai. camphoratus*. Los mecanismos de acción de este tipo de proteínas inmunomoduladoras sugieren que se trata de una molécula con potencial promisorio para el tratamiento y prevención de enfermedades con compromiso del sistema inmunológico y el cáncer. Se proponen nuevos estudios que permitan determinar el potencial inmunomodulador de la proteína hipotética hallada mediante estudios *in vivo* e *in vitro*.

Palabras clave: *Ganoderma*, proteína fúngica inmunomoduladora, inmunomodulación, transcriptoma, terapéutica.

Recibido: febrero 18 de 2014

Aprobado: octubre 10 de 2014

* Biologist, Universidad de Caldas; Master's Fellow in Science-Biology, Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Genética, Bogotá. E-mail: andrea_gmu@hotmail.com

** Biologist, Universidad de Caldas; Investigator, Centro de Bioinformática y Biología Computacional de Colombia, Manizales. E-mail: kelly.botero@cbbc.org.co

*** Professor and Investigator, Faculty of Exact and Natural Sciences, Universidad de Caldas, Manizales. german.lopez@ucaldas.edu.co



Introduction

The Fungi kingdom is considered one of the great biodiversity resources, carrying out important roles in ecosystems and producing chemically diverse secondary metabolites that contribute to a wide variety of bioactive properties in many fungal species. Therefore, fungi are promising resources for the discovery of novel bioproducts with high potential for diverse biotechnological applications.

Interest in the use of therapeutic fungi has been historically restricted to popular medicine and to the manufacture of dietary supplements with health benefits. Moreover, until a few decades ago, the biological potential of these organisms stood as an unexploited resource in formal scientific investigation (Stamets, 1993). However, scientific interest in fungi, as biological resources with biotechnological and therapeutic applications, has increased considerably in the last few decades.

In particular, *Ganoderma* P. Karsten (1881) is a genus of ancient medicinal fungi, which has been used in traditional medicine for over 4,000 years (McMeekin, 2004) and is considered a "spiritual herb" or "fungi of immortality" in oriental cultures. Within the genus, the species *Ganoderma lucidum* has been the object of interest of most pharmacological investigations. It has been proven that its extracts and pure biomolecules inhibit cancer cell growth and promote an *in vivo* immune response through inducing immunoglobulin and cytokine production (Chang *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2006); in addition, its metabolites can be effective antivirals against the human immunodeficiency virus (HIV) (Gao *et al.*, 2003). Recently, one of these species' bioactive therapeutic proteins has been cloned and efficiently expressed in molecular vectors (Wu *et al.*, 2013). Furthermore, other *Ganoderma* species have also been shown to be effective in diverse biotechnological applications for medicinal use. *Ganoderma applanatum*, *G. tsugae*, *G. sinense*, and *G. microsporum* also promote antitumor and immunomodulatory activities (Jeong *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010a; Lin *et al.*, 2010), and *G. australe* has been reported to possess antimicrobial functions as well (Albino-Smania *et al.*, 2007). The most recent biotechnological applications in this genus include the development of recombinant fungal immunomodulatory proteins (Bastiaan-Net *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013) and nanoparticle mycosynthesis for the directed modulation of antibiotic and antimicrobial (Karwa *et al.*, 2011) and antitumor activities (Li *et al.*, 2010a, 2010b).

Pharmacological and formal clinical studies on *Ganoderma* have investigated its therapeutic activity with further detail and have scientifically evaluated its capacity for modulating the activation and expression of cells and messengers involved in the immune response. This immunomodulation is mediated in part by proteins of the Fungal Immunomodulatory Protein

(FIP) family, among other therapeutic secondary metabolites. The biological function and action mechanisms of these proteins have been reported extensively in diverse studies (Li *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2010a; Lin, 2005), classifying them as possible effective agents for treating and preventing diseases originated by certain immunodeficiencies and other states of immune dysfunction.

In general, mature FIPs have been defined as a family of proteins with a molecular weight of around 13 kDa, with 110 to 114 amino acid residues, and exist as homodimers (Lin *et al.*, 1997), except for FIP-gmi which is a tetramer (Wu *et al.*, 2008). In addition, these proteins exhibit a high structural and functional similarity with the immunoglobulin superfamily (Li *et al.*, 2011a). Since the first FIP was isolated and characterized from *G. lucidum* (LZ-8) (Tanaka *et al.*, 1989), its biological functions have been intensively explored and its DNA and protein sequences have served as references for the identification of new FIPs in other fungi, through homology hypotheses. To date, a total of nine FIPs have been reported from diverse basidiomycetes: FIP-fve, from *Flammulina velutipes* (Ko *et al.*, 1995); FIP-vvo, *Volvariella volvacea* (Hsu *et al.*, 1997); FIP-tve, *Trametes versicolor* (Li *et al.*, 2011b); LZ-8, *G. lucidum* (Murasugi *et al.*, 1991; Kino *et al.*, 1989); FIP-gts, *G. tsugae* (Lin *et al.*, 1997); FIP-gsi, *G. sinense* (Zhou *et al.*, 2007, 2009); FIP-gja, *G. japonicum* (GenBank accession AAX98241); FIP-gmi, *G. microsporum* (Wu *et al.*, 2007); and FIP-gap, *G. applanatum* (GenBank accession AEP68179).

The use of high-throughput genomic and transcriptome sequencing technologies has generated high volumes of biological information, and the increasing development of bioinformatics tools has built the way to finding and identifying novel genes related to proteins of specific interest, as in the case of therapeutic proteins in fungi (Zhou *et al.*, 2009). The main objective of this work is to identify genetic sequences related to fungal immunomodulatory proteins in *G. australe*, through transcriptome sequencing (RNA-seq) by next generation sequencing technologies (454 Roche® pyrosequencing) and bioinformatics tools. We report the finding of a candidate coding sequence for an immunomodulatory protein in *G. australe*, exhibiting high sequence identity and secondary structure similarity to a reported immunomodulatory protein in *Taiwanofungus camphoratus*. The results motivate further detailed biochemical and functional studies of this predicted hypothetical immunomodulatory protein.

Materials and Methods

Fungal culture

A mycelium sample of *Ganoderma australe* grown on potato-dextrose agar (PDA) was received as a donation from the Universidad Tecnológica de Chocó, Colom-



bia. For biomass production, the fungus was replicated on PDA and malt-extract agar (MEA). Then, these cultures were used to inoculate a liquid culture medium enriched and optimized for *Ganoderma*, according to the protocol described by Zhou et al. (2007), in order to obtain a clean and pure sample for RNA extraction from mycelium.

cDNA library preparation

Total RNA extraction and messenger RNA (mRNA) purification, copy DNA (cDNA) library preparation, and 454 GS FLX (Roche®) transcriptome sequencing was performed at the Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG), Sede de Investigación Universitaria (SIU), at the Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Total RNA extraction and mRNA purification from a mycelium sample of *G. australis* was done using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen), respectively, according to the manufacturer's instructions. Total RNA and mRNA quantification was carried out on a TBS 380 fluorometer (Turner Biosystems) and quality was determined through capillary electrophoresis on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Once optimal mRNA concentration and quality was determined, cDNA library preparation was done according to the Roche® manufacturer protocol. Library quality was determined through capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) and sequencing was performed on half a plate of the 454 Sequencing System GS FLX platform (Roche®).

De novo transcriptome assembly and bioinformatics analyses

Sequenced reads were assembled using the bioinformatics algorithms employed by the Newbler 2.6 assembler (Roche®). In order to identify mRNA transcripts related to the expression of immunomodulatory proteins in *G. australis* mycelium, a local BLAST (tblastn) search was performed against a database of GenBank-reported FIPs and other immunomodulatory proteins of other protein families, in order to broaden the search for immunomodulatory proteins in *G. australis*. Non-FIP family proteins were included if they belonged to fungal species and showed significant alignment e-values and high sequence identities to the reported FIPs.

The transcripts with the highest identity to reported immunomodulatory proteins were selected for further bioinformatics analyses using online programs and servers, such as: Translate, for translating a DNA sequence to its six open reading frames and selecting the most probable coded protein (<http://web.expasy.org/translate/>); MUSCLE (Edgar, 2004), for multiple alignments between the selected translated protein sequences

and reported immunomodulatory proteins; Interpro, to predict protein domain architecture of the candidate translated sequences (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>); and PSI-PRED v3.0, for predicting secondary protein structure (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Results and discussion

A total of 712,683 raw reads were obtained from the transcriptome sequencing of the mycelium sample of *G. australis*. Preprocessing and quality control filtered 679,023 reads that were used for *de novo* assembly. Table 1 summarizes the *de novo* assembly results.

Table 1. Summary of *Ganoderma australis* transcriptome sequencing and assembly.

Sequencing	
Total reads	712,683
QC-passed reads	679,023
Amount of information	277 MB
De novo assembly	
Total contigs	10,257
N50 (bp ^b)	918
Number of large contigs ^c	4,692
Mean size of large contigs (bp)	893
Largest contig size (bp)	4,933

^a Quality control-passed

^b bp: base pairs

^c Contigs of at least 500bp

The search for transcripts (contigs) potentially related to immunomodulatory proteins allowed for the identification of 24 initial candidate sequences showing significant alignments to non-FIP immunomodulatory proteins (data not shown). A further BLAST search against GenBank non-redundant nucleotide and protein databases filtered 12 of these transcripts, showing homology to non-FIP immunomodulatory proteins reported in the basidiomycetes *Trametes versicolor* (GenBank Accession AGH06133.1) and *Taiwanofungus camphoratus* (GenBank Accession AAT11911.1), which were not included in our initial protein database, since they showed no significant hit to the FIP family. Although *Trametes versicolor* has a reported FIP, homology was found with a different non-FIP immunomodulatory protein reported for this species.

Finally, only the transcripts with the highest identity were selected as definite candidates, which resulted in three candidate contigs: c2535 (e-value=3e-37), c725 (e-value=1e-41), and c13717 (e-value=6e-48), with 69%, 68%, and 66% identities, respectively, to the *Tai. camphoratus* protein. Subsequent analyses of the



candidates were performed in comparison to this particular *Tai. camphoratus* protein, due to showing higher identity values than the *Tra. versicolor* protein.

The selected contigs were translated to protein sequences (139 aa, 137 aa, and 137 aa for c2535, c725, and c13717, respectively) and a MUSCLE alignment was performed against the *Tai. camphoratus* immunomodulatory protein (figure 1). The alignment shows conserved sequence regions between the translated proteins and the reported protein. Furthermore, many mismatch positions included substitutions between amino acid residues with similar biochemical properties.

Secondary structure prediction of the hypothetical proteins showed high structural similarity between the three predicted proteins (figure 2). The protein from c13717 was further selected to be compared to the predicted secondary structure of the *Tai. camphoratus* immunomodulatory protein (figure 3), because it showed the highest prediction confidence level compared to the other two candidates. Both *G. australe* c13717 and *Tai. camphoratus* proteins consisted of two α helices and seven β sheets, with the exception of a short additional β sheet in c13717, which was considered non-significant, due to a low prediction

confidence level, as represented by the height of the bars above the predicted structure (figure 3). Although secondary structure is not conclusive for determining protein function, it is nevertheless an indicator of a similar folding pattern which could give insight into similar structural motifs between the proteins, as well potential similar function.

Interestingly, the immunomodulatory protein from *Tai. camphoratus* was isolated by Sheu et al. (2009) from a mycelium extract and reported as a glycoprotein with a molecular weight of 27 kDa and 136 amino acid residues. Its immunomodulatory function is promoted through macrophage activation of a pro-inflammatory response (Sheu et al., 2009). Furthermore, it has been reported that this protein does not promote hemagglutination in humans or mice (Sheu et al., 2009), which makes it promising for therapeutic application.

The immunomodulatory protein from *G. australe*, inferred from contig c13717 in this study, as well as those reported from *Tai. camphoratus* and *Tra. versicolor*, show a predicted protein architecture composed of an 18 amino acid residues signal peptide and a cerato-platinin conserved domain, which is present in proteins within the cerato-platinin protein family. This family contains phytotoxic proteins of approximately 150 ami-



Figure 1. MUSCLE alignment between translated protein sequences of the candidate immunomodulatory proteins from *Ganoderma australe* against the immunomodulatory protein sequence from *Taiwanofungus camphoratus*.

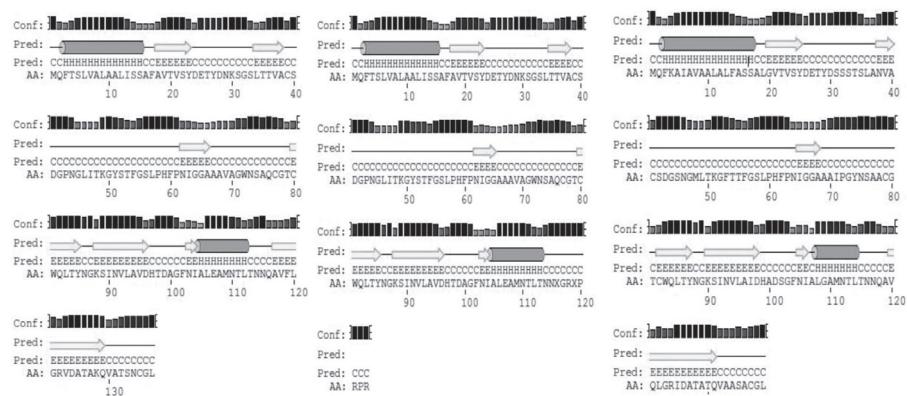


Figure 2. Predicted primary and secondary protein structures of the candidate immunomodulatory hypothetical proteins founded in *Ganoderma australe*. From left to right, blocks represent contigs: c13717, c725, and c2535, respectively. For each block: 1st row, bars indicate confidence levels and a higher confidence level of the predicted structure is indicated by a greater height of the bars. 2nd row, secondary structure predictions are indicated by two figures; cylinders represent α helices, arrows represent β sheets and straight lines represent random coils. 3rd row, strings of letters H, E and C, represent the same structures as in 2nd row, respectively. 4th row, amino acids are indicated individually by single letter code. 5th row, amino acid residues positions are numbered.

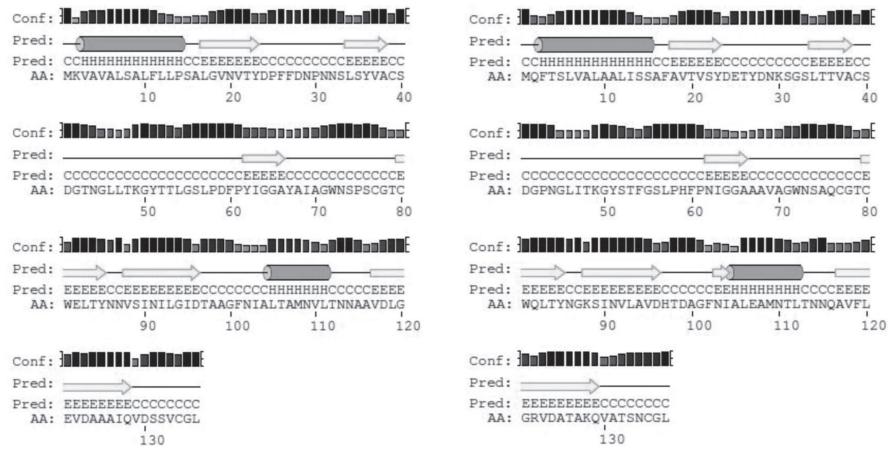


Figure 3. Comparison of primary and secondary immunomodulatory protein structures of the *Taiwanofungus camphoratus* immunomodulatory protein (left block) and the *Ganoderma australe* hypothetical immunomodulatory protein (right block), inferred from contig c13717 in this study. Key descriptions for each row same as in figure 2.

no acid residues, with four cysteine residues that form two disulfide bridges contributing to protein structure (Pazzaglia *et al.*, 1999). Indeed, the immunomodulatory protein predicted from *G. australe* is not, in a strict sense, an immunomodulatory protein belonging to the FIP family, like other proteins previously reported for *Ganoderma*. To this respect, strictly speaking FIPs have a molecular architecture composed of immunoglobulin-like beta-sandwich folds, characteristic of proteins within the immunomodulatory fungal family (FIP-fve), which is not the case with the *G. australe* protein reported in this study. Furthermore, the hypothesized *G. australe* protein exhibits substantial identity and structural similarity with the *Tai. camphoratus* protein, and both contain methionine, cysteine, and histidine residues that FIP-fve and LZ-8-like prototypes do not contain. This evidence supports that the *G. australe* hypothetical protein reported and modeled in this work is not properly an immunomodulatory protein belonging to the FIP family as traditionally defined, like those reported in other *Ganoderma* species and other mushrooms, but rather a novel type of immunomodulatory protein with potentially similar functionalities based on its structure.

Finally, the observed homology of the hypothetical protein from *G. australe* with the immunomodulatory protein from *Tai. camphoratus* is an interesting finding from a taxonomic perspective, since *Tai. camphoratus* has shared a taxonomic relation with the genus *Ganoderma* in the past. *G. australe* was initially described as *Ganoderma comphoratum* Zang & Su (1990), yet, due to morphological aspects of the fruiting body, it was reclassified under the genus *Taiwanofungus* (Polyporaceae) in 1994, with *Taiwanofungus camphoratus* as the only species in this genus, endemic to Taiwan (Wu et al., 2004).

Further analyses should include the genomic sequencing of *G. australe* and the *in vitro* testing of this sequence by means of molecular cloning of the complete

gene into an appropriated vector, for example *Pichia pastoris*, or any other commercial expression vector, in order to further evaluate the therapeutic potential of the gene product through the implementation of protein recombination technology and bioassays approaches using a model organism.

Conclusions

In this study, the presence of a candidate genetic sequence coding for a hypothetical immunomodulatory protein in the mycelium of *Ganoderma australe* is reported. Moreover, transcriptome sequencing and assembly performed in this study allow an estimation of at least 8,000 to 10,000 genes in *G. australe*. In order to confirm the presence of the predicted protein and experimentally determine its potential bioactive properties, future prospects include protein isolation and purification, recombinant expression, and possible *in vitro* and *in vivo* evaluations of the predicted immunomodulatory function.

Acknowledgements

To the Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados of the Universidad de Caldas for financial support to this project. To Mabel Giselle Torres PhD of the Universidad Tecnológica del Chocó for the donation of the *Ganoderma* strains and her guidance in fungal culture. To Juan Fernando Alzate PhD and Juan Pablo Isaza of the Centro Nacional de Secuenciación Genómica at the Sede de Investigación Universitaria (SIU) of the Universidad de Antioquia for the sequencing service, transcriptome assembly, and sequence analysis training.

References

- Albino-Smania, E.F.; Monache, F.D.; Yunes, R.A.; Paultert, R.; Smania-Junior, A. 2007. Antimicrobial activity of methyl australate



- from *Ganoderma australe*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17(1):14-16.
- Bastiaan-Net, S.; Chanput, W.; Hertz, A.; Zwittink, R.D.; Mes, J.J.; Wicher, H.J. 2013. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *International Immunopharmacology*. 15(1):167-175.
- Chang, Y.; Yang, J.S.; Yang, J.L.; Wu, C.; Chang, S.; Lu, K.; Lin, J.; Hsia, T.; Lin, Y.; Ho, C.; Wood, W.G.; Chung, J. 2009. *Ganoderma lucidum* extracts inhibited leukemia WEHI-3 cells in BALB-c mice and promoted an immune response *in vivo*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73(12):2589-2594.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797.
- Gao, Y.; Zhou, S.H.; Huang, M.; Xu, A. 2003. Antibacterial and anti-viral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllophoromycetidae): a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 5(3):235-246.
- Hsu, H.; Hsu, C.; Lin, R.; Kao, C.; Lin, J. 1997. FIP-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochemistry Journal*. 323:557-565.
- Jeong, Y.; Yang, B.; Jeong, S.; Kim, S.; Song, C. 2008. *Ganoderma applanatum*: A promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytotherapy Research*. 22:614-619.
- Karwa, A.; Gaikwad, S.; Rai, M.K. 2011. Mycosynthesis of silver nanoparticles using Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. and their roles as antimicrobials and antibiotic activity enhancers. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13(5):483-91.
- Kino, K.; Yamashita, A.; Yamaoka, K.; Watanabe, J.; Tanaka, S.; Kerry, K.; Shimizu, K.; Tsunoo, H. 1989. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 from *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 264(1):472-478.
- Ko, J.; Hsu, C.; Lin, R.; Kao, C.; Lin, J. 1995. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve, isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes*, and its complete amino acid sequence. *European Journal of Biochemistry*. 228:244-249.
- Li, Q.; Wang, X.; Zhou, X. 2011a. Recent status and prospects of the fungal immunomodulatory protein family. *Critical Reviews in Biotechnology*. 31(4):365-375.
- Li, F.; Wen, H.; Zhang, Y.; Aa, M.; Liu, X. 2011b. Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor*. *Science China Life Sciences*. 54(4):379-385.
- Li, Q.; Wang, X.; Chen, Y.; Lin, J.; Zhou, X. 2010a. Cytokines expression induced by *Ganoderma sinensis* fungal immunomodulatory proteins (FIP-gsi) in mouse spleen cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162(5):1403-1413.
- Li, N.; Hu, Y.L.; He, C.X.; Hu, C.J.; Zhou, J.; Tang, G.P.; Gao, J.Q. 2010b. Preparation, characterization, and anti-tumour activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62(1):139-144.
- Li, S.L.; Hu, Y.P.; Su, J.C.; Song, J.; Guo, Y.W.; Qi, Z.G. 2009. Cloning and expression of LZ-8 gene from *Ganoderma lucidum*, an immunomodulatory protein. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)*. 33:677-681.
- Liao, C.; Hsiao, Y.; Lin, C. 2008. Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Food and Chemical Toxicology*. 46:1851-1859.
- Lin, C.; Sheu, G.; Lin, Y.; Yeh, C.; Huang, Y.; Lai, Y.; Chang, J.; Ko, J. 2010. A new immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* inhibits epidermal growth factor mediated migration and invasion in A549 lung cancer cells. *Process Biochemistry*. 45:1537-1542.
- Lin, K.; Kao, Y.; Kuo, H.; Yang, W.; Chou, A.; Lin, H.; Yu, A.L.; Wong, C. 2006. Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34):24111-24123.
- Lin, Z. 2005. Cellular and molecular mechanisms of immune-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Science*. 99:144-153.
- Lin, W.; Hung, C.; Hsu, C.; Lin, J. 1997. Dimerization of the N-terminal Amphipathic α -helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (32):20044-20048.
- McMeekin, D. 2004. The perception of *Ganoderma lucidum* in Chinese and Western culture. *Mycologist*. 18(4):165-169.
- Murasugi, A.; Tanaka, S.; Komiyama, N.; Iwata, N.; Kino, K.; Tsunoo, H.; Sakuma, S. 1991. Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(4):2486-2493.
- Pazzaglia, L.; Cappugi, G.; Manao, G.; Camici, G.; Santini, A.; Scala, A. 1999. Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatatin, a new phytotoxic protein from *Ceratostoma fimbriata* f. sp. *platani*. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 24959-24964.
- Sheu, F.; Chien, P.; Hsieh, K.; Chin, K.; Huang, W.; Tsao, C.; Chen, Y.; Cheng, H.; Chang, H. 2009. Purification, Cloning, and Functional Characterization of a Novel Immunomodulatory Protein from *Antrodia camphorata* (Bitter Mushroom) That Exhibits TLR2-Dependent NF-KB Activation and M1 Polarization within Murine Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:4130-4141.
- Tanaka, S.; Ko, K.; Kino, K.; Tsuchiya, K.; Yamashita, A.; Murasugi, A.; Sakuma, S.; Tsunoo, H. 1989. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, Ling-Zhi 8 (LZ-8). *The Journal of Biological Chemistry*. 264(28):16372-16377.
- Wu, T.Y.; Chen, H.A.; Li, F.Y.; Lin, C.T.; Wu, C.M.; Hsieh, F.C.; Tzen, J.T.; Hsieh, S.K.; Ko, J.L.; Jinn, T.R. 2013. High-level expression, purification and production of the fungal immunomodulatory protein-gts in baculovirus-infected insect larva. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. 169(3):976-89.
- Wu, C.M.; Wu, T.Y.; Kao, S.S.; Ko, J.L.; Jinn, T.R. 2008. Expression and purification of a recombinant Fip-fve protein from *Flammulina velutipes* in baculovirus-infected insect cells. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1354-1362.
- Wu, M.Y.; Hsu, M.F.; Huang, C.S.; Fu, H.Y.; Huang, C.T.; Yang, C.S. 2007. A 2.0 Å structure of GMI, a member of the fungal immunomodulatory protein family from *Ganoderma microsporum*. *Protein Crystallography*. II-132.
- Wu, S.; Yu, Z.; Dai, Y.; Chen, C.; Su, C.; Chen, L.; Hsu, W.; Hwang, G. 2004. *Taiwanofungus*, a polypore new genus. *Fungal Science*. 19(3-4):109-116.
- Zhang, M.; Su, C. 1990. *Ganoderma comphoratum*. *Acta Botanica Yunnanica*. 12(4): 395.
- Zhang, X.; Sun, F.; Liu, Z.; Zhang, S.; Liang, C. 2013. Recombinant *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein modified with polyethylene glycol. *Molecular Medicine Reports*. 7(3):975-980.
- Zhou, X.; Li, Q.; Zhao, J.; Tang, K.; Lin, J.; Yin, Y. 2007. Comparison of Rapid DNA Extraction Methods Applied to PCR Identification of Medicinal Mushroom *Ganoderma* spp. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 37: 369-380.
- Zhou, X.; Xie, M.; Hong, F.; Li, Q.; Lin, J. 2009. Genomic cloning and characterization of a FIP-gsi gene encoding a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma sinense* Zhao et al. (Aphyllophoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 11(1):77-86.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal

In vitro multiplication of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems

Jorge Vilchez*, Nilca Albany**

Resumen

La introducción de nuevos cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.) amerita su propagación masiva, lo cual solo puede ser satisfecho mediante la micropagación. Sin embargo la micropagación convencional dejó de ser económicamente eficiente, debido al uso de agentes gelificantes y el elevado número de operaciones manuales, por esta razón se planteó en esta investigación, generar una metodología que permita disminuir los costos de producción por la exclusión del gelificante en los medios de cultivo, evaluando los sistemas de inmersión temporal (SIT) en la multiplicación *in vitro* de guayabo. Para lo cual, se evaluó el efecto del cultivo en SIT, se comparó los SIT tipo BIT® y RITA® y se evaluó el tiempo (1 y 2 min) y frecuencia (3 y 4 veces/día) de inmersión. Luego de seis semanas de cultivo se evaluó: número de brotes (NB), número de nudos (NN), longitud de brote (LB) y coeficiente de multiplicación (CM). Con el empleo de SIT se logró valores superiores para NB (2,17), NN (3,5), LB (10,7 mm) y CM (2,8). En la comparación entre SIT tipo RITA y BIT, valores superiores se obtuvieron con el RITA® para NB (3,8), NN (3,8), LB (16,6 mm) y CM (10,4). Se determinó que con 2 min de inmersión se logró los mayores valores de NB (3,7), NN (13,4), LB (15,3 mm) y con 2 min de inmersión 3-4 veces/día el mayor CM (9,4 y 10,4). Se concluye que el cultivo en RITA® en la multiplicación favoreció crecimiento y la proliferación de brotes de guayabo.

Palabras clave: BIT®, guayabo, medio de cultivo líquido, micropagación, RITA®.

Abstract

The introduction of new cultivars of guava (*Psidium guajava* L.) deserves its mass propagation, which can only be satisfied by micropagation. However conventional micropagation stopped being economically efficient due to the use of gelling agents and the high number of manual operations. For this reason was considered in this research, generate a methodology to reduce production costs by exclusion of gelling in culture media, assessing temporary immersion systems (TIS) in the *in vitro* multiplication of guava. For which, the effect of the culture way was evaluated in TIS, type TIB® and RITA® compared the TIS and was evaluated the time (1 and 2 min) and frequency (3 and 4 times / day) of immersions. After six weeks of culture were evaluated: shoots number (NS), nodes number (NN), shoot length (SL) and multiplication rate (MR). With the use of TIS higher values for NS (2.17), NN (3.5), SL (10.7 mm) and MC (2.8) was achieved. When comparing RITA® and TIB, higher values were obtained with the RITA® for NS (3.8), NN (3.8), SL (16.6 mm) and MC (10.4). It was determined that 2 min of immersion with the highest values of NS (3.7), NN (13.4), SL (15.3 mm) and 2 min immersion 3-4 times/day achieved the highest MC (9.4 and 10.4). We conclude that the RITA® culture favored the multiplication in growth and proliferation of shoots of guava.

Keys words: guava, micropagation, liquid culture media, RITA®, TIB®.

Recibido: febrero 19 de 2014

Aprobado: octubre 10 de 2014

* Profesor Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología Vegetal “Merylin Marin” Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. jvilchezp@fa.luz.edu.ve

** Profesora Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela. nalbany@fa.luz.edu.ve



Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) constituye la Myrtaceae más valiosa de todo el género *Psidium* (Peña et al., 1996) y representa una importante inversión como agronegocio (Cañizares y Puesme, 2003), entre otras razones, por su gran aceptación como fruta fresca debido a su contenido nutricional y su posibilidad de industrialización (Aular y Casares, 2011). Además en los últimos años sus frutos y hojas se han estudiado para uso en el campo de la medicina natural y tradicional en el tratamiento de la gastroenteritis, diarreas y disenterías (Waghode, 2014; Choudhury et al., 2013; Joseph y Priya, 2011).

En Venezuela hay pocos cultivares y los principales son el 'Criolla Roja', que se utiliza también como porta injerto, el 'San Miguel' y el 'Río Chiquito' (Aular y Casares, 2011). En el año 2007 en el marco del Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela se introdujo desde la República de Cuba el cultivar "Enana Roja Cubana EEA 18-40", el cual es de alto potencial productivo con más de 70 t·ha⁻¹·año⁻¹ a densidades superiores a las 800 plantas por hectárea en los primeros 5 años de plantada (Vento, 2011), del cual se sembraron en el país lotes pruebas para su producción agrícola y propagación. La introducción de este cultivar plantea la necesidad de desarrollar protocolos de propagación para la misma.

En general la propagación convencional presenta limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proveer un individuo elite o superior (Peña et al., 1996), este aspecto hace más lenta la introducción de nuevos cultivares a escalas productivas. Teniendo en cuenta estos problemas y el significado que tiene este frutal tropical en la producción y exportación de alimentos, se han dedicado numerosos esfuerzos y recursos a aplicar técnicas biotecnológicas en este grupo de plantas (Litz y Jaiswal, 1991; Akhtar et al., 2000). La mayoría de estos trabajos estuvieron dirigidos a desarrollar procedimientos para la micropropagación, utilizando la organogénesis a partir de segmentos nodales y brotación axilar (Meghwal et al., 2010; Rai et al., 2009; Ocampo y Nuñez, 2007; Mishra et al., 2007; Concepción et al., 2004; Ali et al., 2003; Singh et al., 2002; Amin y Jaiswal 1987, 1988, 1989; Jaiswal y Amin, 1987).

Algunos investigadores señalan que desde el punto de vista comercial, la micropropagación convencional ha dejado de ser un proceso económicamente eficiente, coincidiendo que la causa fundamental es debida al uso de agentes gelificantes como soportes de los explantes y el elevado número de operaciones manuales, que implican un alto costo por mano de obra (Quiala et al., 2012; Cruzat, 2009; Pérez et al., 1998). Particularmente en la micropropagación de algunos vegetales y frutales, los altos costos por mano de obra están alrededor del 65-70% de los costos totales de producción (Cruzat, 2009; Alchanatis et al., 1994) y el empleo de

medios de cultivos semisólido o gelificados con agar o polímeros similares son el componente más caro de medios de cultivo y representan alrededor del 80% del costo total (Cruzat, 2009; Adelberg et al., 2007; Pérez et al., 1998). Nuevos estudios sobre la propagación *in vitro* utilizando diferentes condiciones de cultivo pueden contribuir a una mayor optimización de la procesar y una reducción en los costos de producción (Ziv, 2005).

El uso de medios líquidos en procesos de micropropagación se considera la solución ideal para reducir los costos de producción de plántulas y permitir la automatización (Preil, 2005; Ziv, 2005). Entre otras ventajas porque los sistemas de cultivo líquidos proporcionan condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente sin necesidad de cambiar de recipiente, la limpieza del recipiente luego de un período de cultivo es más fácil y se reducen los subcultivos (Adelberg, 2004). Su uso a menudo resulta en mayores tasas de crecimiento en relación con el medio semisólido. Esto se debe a que una mayor superficie del explante está en contacto con el medio, y cuando es aireado o agitado se reducen los gradientes de difusión entre éste y el explante (Etienne y Berthouly, 2002). Estos dos factores combinados permiten una toma de nutrientes y reguladores de crecimiento más eficiente, de modo que en algunas especies es posible emplear medios de cultivo desprovistos de reguladores. Al mismo tiempo, los metabolitos tóxicos que pueden acumularse en la proximidad de los tejidos, son eficientemente dispersados (George, 1993).

Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de estrés oxidativo producto del incremento de los niveles H₂O₂ debido a los bajos niveles de oxígeno en el medio (Saher et al., 2004; Damiano et al., 2003) e hiperhidratación de los tejidos o vitrificación, desorden morfológico y fisiológico que provoca una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado (Posada et al., 2003). Para solucionar estos problemas en la actualidad se disponen de equipos para la propagación masiva basados en una inmersión temporal de los explantes, en los cuales la intervención de la mano de obra se minimiza, (Berthouly y Etienne, 2005; Teisson y Alvard, 1994; Alvard et al., 1993; Aitken-Christie, 1991) y la hiperhidratación puede ser controlada, incluso suprimirse, controlando factores tales como la concentración de carbohidratos, macronutrientes en el medio, así como el tiempo y frecuencia de inmersión (Castro y González, 2002). Las ventajas de estos sistemas sobre la micropropagación tradicional en medios gelificados parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo y que han sido señaladas por varios autores (Posada et al., 2003; Etienne y Berthouly, 2002; Alvard et al., 1993).

El sistema RITA®, Recipiente para inmersión temporal automatizado (figura 1b) desarrollado por el Labora-



torio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia, es el más difundido en el mundo y se ha utilizado exitosamente para la propagación de varias especies de interés agrícola, ornamental y medicinal (Berthouly y Etienne, 2005) tanto por organogénesis como embriogénesis. El diseño de los RITA® consiste en un envase de cultivo de 1 L de capacidad en cuyo interior se encuentra una estructura que divide el envase de cultivo en dos compartimientos, el superior aloja material vegetal y el inferior el medio de cultivo, ambos compartimientos están conectados mediante un tubo central unido a un filtro de aire (22 µm) esterilizable. En cada inmersión se aplica una presión de aire al compartimiento inferior se hace subir el medio de cultivo que baña periódicamente el material vegetal y renueva en ambiente gaseoso del compartimiento de cultivo. De acuerdo a un programa predeterminado (tiempo de inmersión y frecuencia) que es controlado mediante un controlador de tiempo automatizado y válvulas solenoides controlan la inyección del aire o inmersión.

El BIT®, bioreactor de inmersión temporal (Escalona et al., 1999) o recipientes gemelos de inmersión temporal (Berthouly y Etienne, 2005), es una unidad de inmersión temporal que consiste en dos recipientes interconectados por tubos de silicona (figura 2). Uno se usa para la contener del medio de cultivo y el otro para el cultivo del material vegetal. Para la ventilación se ajusta un filtro esterilizable (22 µm) en cada recipiente. El número de veces (frecuencia) y el tiempo que las plantas son inmersas en el medio se regulan mediante un programador conectado a válvulas solenoides. Al abrir una de las válvulas el medio es inyectado desde el recipiente que contiene al medio de cultivo al que contiene los explantes; al abrirla otra vez, el medio vuelve al recipiente que contiene el medio de cultivo. Con este sistema los explantes son inmersos en el medio de cultivo sólo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por toda su superficie (Alvarez et al., 1993). El intercambio gaseoso se restaura cuando el medio de cultivo es trasladado a recipiente que contiene el medio de cultivo. De los BIT® se han propuesto algunas variantes para los tamaño de los recipientes de cultivo, afín de mejorar la eficiencia de la micropagación, como Jiménez (2005) en caña de azúcar Albany et al. (2005) en banana, quienes utilizaron envases de 10 L Clearboy de Nalgene®.

Con el propósito de generar una metodología que permita disminuir los costos de producción por la exclusión del gelificante en los medios de cultivo, se evaluó el cultivo en sistemas de inmersión temporal en la fase de multiplicación *in vitro* de guayabo cv Enana Roja Cubana EEA-1840.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología "Profa. Silvia León de Sie-

rralta" de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela.

Material vegetal

Como material vegetal se emplearon microesquejes de guayabo del cultivar "Enana Roja Cubana EEA 1840" de 1 cm de longitud con un solo nudo. Los microesquejes fueron tomados de vitroplantas obtenidas vía germinación de embriones somáticos, cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) al 50% de las sales mayores y suplementado con 0,25 mg.L⁻¹ de BAP (N⁶-bencilaminopurina); 0,01 mg.L⁻¹ de DI-31 (análogo de brasinoesteroide) y 3% de sacarosa.

En todos experimentos el medio de cultivo, el pH se ajustó 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N según el caso, antes de la esterilización en autoclave a 121°C y 1,2 Kg·cm⁻² durante 20 min. Todas las manipulaciones de los explantes se realizaron bajo condiciones de asepsia empleando una cámara de flujo laminar horizontal (ESCO®) con un flujo constante de aire de 0,5 PSI. El instrumental (pinzas y bisturí) fueron desinfectado con una solución de NaClO al 1% (v/v) durante 15 min y capsulas de Petri esterilizadas en autoclave a 121°C y 1,2 Kg·cm⁻² de presión durante 30 min y secadas en estufa a 70°C por 8 h. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, bajo luz blanca fluorescente continua con una radiación fotosintéticamente activa de 200 µmol·m⁻²·s⁻¹, temperatura de 26 ± 1°C y humedad relativa promedio de 46 %.

Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Para comparar la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840, en sistemas de inmersión temporal (SIT) y en medio semisólido, se evaluó el cultivo de los microesquejes en SIT tipo bioreactor de inmersión temporal (BIT®) y el cultivo en medio gelificado con 6 g.L⁻¹ de Agargel. Para el tratamiento de cultivo en SIT se utilizaron 5 BIT® de 500 mL de capacidad y 200 mL de medio de cultivo, en los cuales se sembraron 20 microesquejes por cada BIT®. Se utilizó una inmersión de 1 min cada 6 h. Para el medio semisólido se utilizaron 20 frascos biotecnológicos de 250 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo, en los cuales se sembraron 5 microesquejes por frasco, con 25 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el WPM (Woody Plant Medium) propuesto por Lloyd y McCow (1981), suplementados con 1 mg.L⁻¹ de BAP; 0,01 mg.L⁻¹ de DI-31, 3% de sacarosa. Las variables evaluadas después de seis semanas de cultivo fueron: número de brotes (NB), número de nudos (NN), longitud de brote (LB) y coeficiente de multiplicación (CM). El CM se calculó mediante la siguiente fórmula: CM=NNT-1, donde en



NNT es el número de nudos totales. Se utilizó un diseño completamente al azar.

Comparación del cultivo en SIT tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Para comparar la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840, en SIT tipo BIT® y RITA® se sembraron 5 repeticiones de cada tipo. En cada SIT se sembraron 20 explantes y contenía 200 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado, así como las variables, el tiempo de evaluación y el diseño experimental utilizado fueron similares al del experimento 1.

Determinación del Tiempo y frecuencia de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en RITA®

Para desarrollar un método de micropagación eficiente en sistemas de inmersión temporal es esencial optimizar los parámetros técnicos para cada cultivo, siendo el tiempo y la frecuencia de inmersión los parámetros más críticos del sistema. Para determinar dichos parámetros mediante un diseño factorial se evaluaron dos frecuencias (3 y 4 veces al día) y dos tiempos de inmersión (1 y 2 min), para un total de cuatro tratamientos, cada uno con 5 repeticiones y 20 microesquejes por cada RITA®. El medio de cultivo utilizado, así como las variables, el tiempo de evaluación y el diseño experimental utilizado fueron similares al del experimento 1.

Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de los efectos de los factores de estudio se utilizó un análisis de la varianza simple (ANOVA) y en aquellos casos donde el efecto del factor de estudio y/o su interacción resultó significativa estadísticamente ($p \leq 0,05$) se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando software analítico Statistix® versión 8.0.

Resultados y discusión

Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Los análisis estadísticos detectaron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre los dos sistemas de cultivo evaluados, para las variables NB y NN. Cuando se usaron los BIT® los valores en estas variables fueron superiores a los del cultivo de medio semisólido (tabla

1). Estas diferencias pudieran explicarse en función de que al multiplicar los brotes en medio semisólido la absorción de nutrientes es reducida, por la baja tasa de difusión del mismo (Scherwinski y De Luces, 2003) en comparación con los medios líquidos en los que la ausencia de agente gelificante puede incrementar la absorción de agua y nutrientes por el explante (Etienne y Berthouly, 2002; Alvard et al., 1993).

Tabla 1. Efecto del cultivo en sistemas de inmersión temporal sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. NB: número de brotes, NN: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Sistema de cultivo	NB	NN	CM	LB (mm)
Semisólido	1,78 b	2,5 b	4,36 ns	10,38 ns
BIT	2,17 a	3,5 a	4,90 ns	10,74 ns

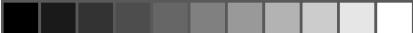
Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

Por otro lado en los sistemas de inmersión temporal los explantes están en contacto intermitente con el medio de cultivo y esto causa una estimulación de la absorción de nutrientes por parte de los explantes, además los explantes están cubiertos la mayoría del tiempo por una fina capa de medio de cultivo que impide la desecación y por ende, la resistencia a la difusión de gases entre la atmósfera y el explante es menor, en consecuencia hay un mayor desarrollo de los explantes (Etienne y Berthouly, 2005). Es indudable que la mayor relación de volumen de medio nutritivo, microatmósfera versus explantes, favoreció notablemente la mayor diferenciación.

El cultivo en SIT ha sido exitoso en la mayoría de los cultivos en los cuales se ha probado (Mallón et al., 2012; Quiala et al., 2012; Watt, 2012; Steinmacher et al., 2011; Peña et al., 2010; Aragón et al., 2009), sin embargo en el guayabo existe pocos reportes de su uso.

Comparación del cultivo en sistemas de inmersión temporal tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840

Después de seis semanas de cultivo, el análisis estadístico detectó diferencias estadísticas ($p > 0,001$) entre los dos SIT estudiados; lográndose los mayores valores en las variables evaluadas con el empleo del SIT tipo RITA® (tabla 2). Aunque ambos SIT utilizados en este experimento tienen la misma capacidad del reservorio que contiene el medio de cultivo (500 mL), así como la



misma relación volumen de medio/explantante (10 mL/explantante) y similar principio de funcionamiento, difieren en las capacidades de sus reservorios que contienen los brotes y siendo este uno de los parámetros que afectan la eficiencia de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005). En los RITA® (figura 4, b y d) la sección donde se cultivan los explantes es aproximadamente 50 mL mayor al de los BIT (figura 4, a y c), lo cual determina un mayor contacto entre los explantes.

Tabla 2. Comparación del cultivo en sistemas de inmersión temporal tipo BIT y RITA® sobre la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Sistema de cultivo	NB	ND	CM	LB (mm)
BIT	2,17 b	2,5 b	4,36 b	10,74 b
RITA®	3,85 a	3,86 a	13,33 a	16,62 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($p<0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

En los BIT® permanece una pequeña lámina de medio de cultivo que no regresa a su reservorio durante cada inmersión (figura 1, e), en el cual los microesquejes de guayabo permanecen en contacto permanente con el medio de cultivo, pudiendo ocasionar un bajo intercambio entre los explantes sumergidos en el medio de cultivo y el recipiente de cultivo. Según Jackson (2003) las tasas de difusión de gas son aproximadamente 10.000 veces más lentas en el agua que en el aire, ocasionando una reducción de en la fotosíntesis y respiración. Esta condición pudo incidir en una menor inducción de la brotación por ende un menor valor de las variables estudiadas (figura 1, f). En este sentido (Orellana, 1998) y Alvard et al. (1993), señala que la falta de oxígeno en el medio líquido es el factor limitante y responsable para bajo crecimiento y multiplicación de explantes, hecho que es evidente para el caso de los microesquejes de guayabo, lo cual pudiera estar relacionado con un estrés oxidativo producto del incremento de los niveles H_2O_2 debido a los bajos niveles de oxígeno en el medio (Afanador, 2005). El efecto de la hipoxia en la multiplicación *in vitro* también ha sido señalado en otros cultivos como en piña variedad Golden (Molina y Cabrera, 2013), *Achyrocline flaccida* (Ross y Castillo, 2010), *Chrybdis* (Wawrosch et al., 2005) y pino (Aitken-Christe et al., 1985).

En la multiplicación *in vitro* de *Musa AAA* cv. Williams Giménez y Colmenares (2007) compararon el empleo de los dos SIT, el RITA® y un prototipo de SIT muy similar al BIT® y no encontraron diferencias en el índice de multiplicación, pero señalan que la mayor diferencia radica en que el costo de los prototipos similares

a los BIT® es $1/4$ del costo de los RITA® además son fáciles de mantener y pueden escalarse con facilidad.

Determinación del tiempo y frecuencia de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®

El análisis estadístico detectó diferencias para el factor de estudio tiempo de inmersión para todas las variables estudiadas (tabla 3) y para la interacción tiempo y frecuencia de inmersión (tabla 4) para la variable CM, luego de seis semanas de cultivo.

Etienne y Berthouly (2005) señalan que en el cultivo en SIT es claro que el tiempo de inmersión es muy importante, ya este gobierna la absorción de nutrientes y la expresión de la hiperhidratación de los tejidos.

Tabla 3. Efecto del Tiempo de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Tiempo de inmersión	NB	ND	CM	LB (mm)
1 min	2,85 b	10,04 b	34,37 b	13,21 b
2 min	3,70 a	13,38 a	52,57 a	15,32 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($p<0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

En este experimento se observó que con un tiempo de inmersión de 2 min, los valores de las variables estudiadas fueron superiores y estadísticamente diferentes ($p<0,05$) a los obtenidos con el tiempo de inmersión de 1 min. Siendo esta tendencia de los resultados similar a la reportada por Gonzalez et al., (2011) quienes encontraron que la tasa de multiplicación de microesquejes de *Eucalyptus globulus* fue significativamente mayor al aumentar el tiempo de inmersión de 1 a 2 minutos. Sin embargo investigadores en otros cultivos han encontrado una reducción en la variables de crecimiento y/o en la tasa de multiplicación a medida que se incrementa el tiempo de inmersión (Basail et al. 2013; Vilchez et al. 2011). Esto demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (Escalona, 2006; Berthouly y Etienne, 2005).

Las diferencias encontradas en este experimento en la variables evaluadas con respecto al tiempo de inmersión pudieran explicarse debido a que a un ma-

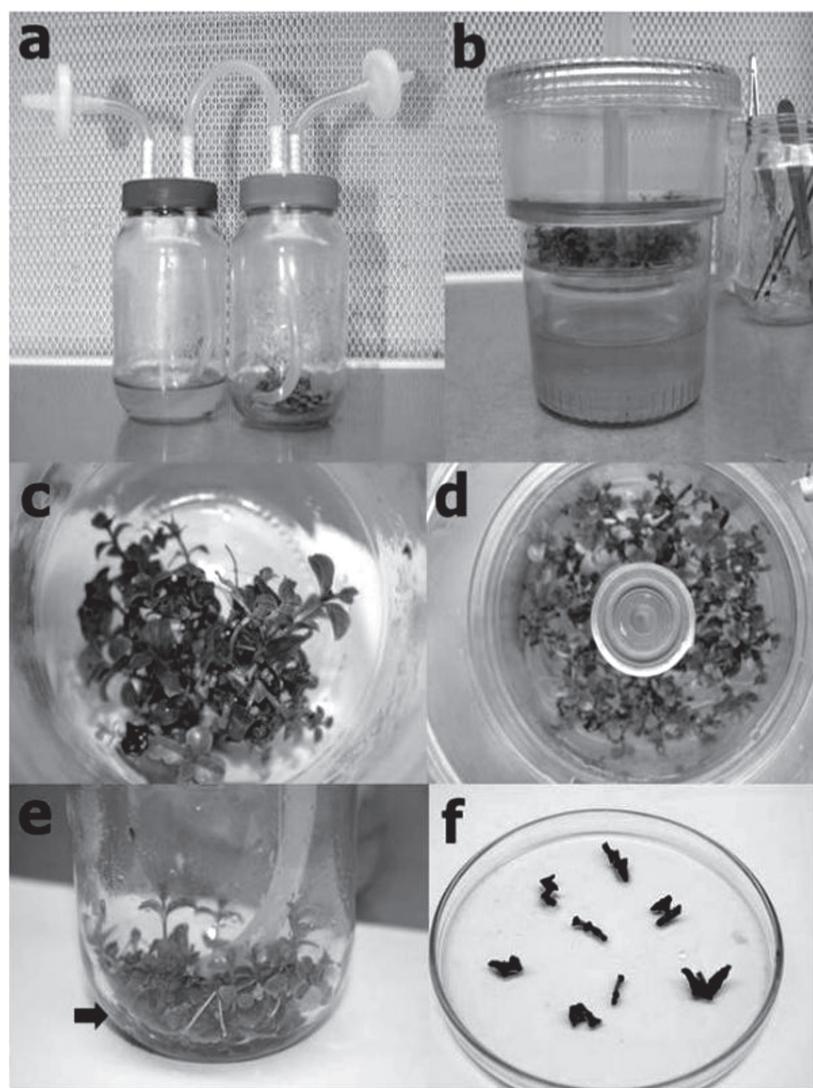


Figura 1. Aspecto general de la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 multiplicándose en sistemas de inmersión temporal: (a) multiplicación en BIT®, (b) multiplicación en RITA®, (c) brotación en BIT®, (d) brotación en RITA®, (e) la flecha negra indica la permanencia de una lámina de medio de cultivo luego de cada inmersión y (f) brotes que crecieron en la lámina de medio de cultivo.

yor tiempo de contacto entre los microesquejes y el medio de cultivo proporciona un mayor suministro de nutrientes y reguladores de crecimiento a los explantes (Santos *et al.*, 2011), lo que puede maximizar su desarrollo (Preil, 2005). Además con cada inmersión el ambiente del recipiente de cultivo es renovado con el fin de eliminar compuestos volátiles tales como etileno (Roels *et al.*, 2006) y promoviendo la recirculación de dióxido de carbono necesaria para la fotosíntesis mejorando aún más el metabolismo autotrófico del carbono en las hojas (Aragón *et al.*, 2014).

El análisis estadístico detectó diferencias para la interacción tiempo y frecuencia de inmersión (tabla 4) en la variable CM. Los mayores valores de CM se consiguieron con la combinación de tiempo y frecuencia de inmersión de 2 min y 3 ó 4 veces al día (51,72 y 62,82,

respectivamente), siendo estos valores superiores a los señalados por De Feria *et al.* (2003) quien reporta un CM de 44,7 utilizando SIT tipo BIT, 20 microesquejes como inoculo inicial y un tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 6 h, pero con una renovación y aumento del medio (de 200 mL a 500 mL) de cultivo a los 21 días. Etienne y Berthouly (2002), plantearon que el movimiento de los explantes dentro del recipiente de cultivo durante el momento de la inmersión, elimina en muchos casos la dominancia apical y/o provoca la separación de los explantes, con lo cual se favorece la producción de nuevos brotes y con ello un incremento del CM. Por otra parte, CM decrece si la frecuencia de inmersión disminuye, comportamiento también observado en *E. globulus* por Gonzalez *et al.* (2013).



Tabla 4. Efecto de la interacción entre el Tiempo y la frecuencia de inmersión en la multiplicación de microesquejes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal tipo RITA®. NB: número de brotes, ND: número de nudos, CM: coeficiente de multiplicación y LB: longitud de brotes.

Tiempo de inmersión (min)	Frecuencia de inmersión (veces/día)	CM
1 min	3	35,60 c
1 min	4	33,14 c
2 min	3	51,72 b
2 min	4	62,82 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($p<0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

Conclusiones

El cultivo en sistema de inmersión temporal en la fase de multiplicación favoreció crecimiento y la proliferación de brotes de guayabo cultivar Enana Roja Cubana EEA-1840. Se determinó que el empleo de sistemas de inmersión temporal tipo RITA® con 3 ó 4 inmersiones al día de 2 min duración mejoró la inducción de brotes y el coeficiente de multiplicación en la fase multiplicación *in vitro*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el financiamiento del Proyecto del VAC-CONDES-CC-00576-10 con el cual se llevó a cabo esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Adelberg, J.; Naylor-Adelberg, J.; Tascan M. 2007. Larger Plants From Liquid-Based Micropropagation: A Case Study With *Hydrangea quercifolia* Bartr. 'Sikes Dwarf'. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*. 57:1-10.
- Aitken-Christie, J.; Jones, C.; Bond S. 1985. Wet and shoots in radiate pine micropropagation. *Acta Horticulturae*. 166:93-100
- Aitken-Christie, J. 1991. Automation. En: *Micropropagation*. Compilado por: Debergh P.C. y Zimmerman R. H. Firth edition. Dordrecht, The Netherland. pp 358-363. Kluwer Academic Publishers.
- Akhtar, N.; Kumari, N.; Pandey, S.; Ara, H.; Singh, M.; Jaiswal, U.; Jain S.M. 2000. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. En: *Somatic embryogenesis in woody plants*. pp. 93-131. Springer Netherlands.
- Albany, N.; Jiménez, E.; Vilchez, J.; García, L.; De Feria, M.; Pérez, N.; Sarria Z., Pérez B.; Clavero, J. 2005. Use of growth retardants for banana (*Musa AAA* cv. *Grand Naine*) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Compilado por: Hvoslef-Eide A. y Preil W. Firth edition. Dordrecht, The Netherland. pp 213-224. Springer.
- Alchanatis, V.; Peleg, K.; and Ziv, M. 1994. Morphological control and mensuration of potato plants from tissue cultures for automated micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 331-338.
- Ali, N. R.M.S.; Mulwa, M.A.; Mortan, R.M., Skirvin. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78(5): 739-741.
- Alvard, D.; Cote, F.; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.
- Amin, M.N.; V.S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae*. 36: 89-95.
- Amin, MN; Jaiswal, VS 1987 Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 9 (3): 235-243
- Amin, MN.; Jaiswal, VS. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Horticulturae*. 36: 89-95
- Amin, MN.; Jaiswal, VS. 1989. *In vitro* propagation of guava (*Psidium guajava* L.): effects of sucrose, agar and pH on growth and proliferation of shoots. *Bangladesh Journal Botany*. 18(1): 1-8
- Amin, M.N.; Jaiswal, V.S. 1987. Clonal propagation of guava through *In vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 9: 235-244.
- Aragón, C.; Escalona, M.; Rodríguez, R.; Cañal, M.; Capote, I.; Pina, D.; González-Olmedo, J. 2009. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46(1): 89-94.
- Aragón, C.; Sánchez, C.; González-Olmedo, J.; Escalona, M.; Carvalho, L.; Amâncio S. 2014. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biología Plantarum*. 58(1): 29-38.
- Aular, J.; María Casares, M. 2011. Consideraciones Sobre La Producción De Frutas En Venezuela. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - Sp*, Volumen Especial, E. 187-198.
- Basail, M.; Medero, V.; Torres, M.; López, J.; Santos, A.; Rayas, A.; Bauta, M.; Beovidez, Y.; Ortega, A. 2013. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011" (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1): 98-107
- Berthouly, M.; Etienne, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. pp 165-195. Springer Netherlands.
- Cañizares, D. L.; Puesme R. 2003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, Estado Monagas, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*. 3(1): 34-38.
- Castro, D.; González, J. 2002. *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica*. 62(1): 68-78.
- Choudhury, S.; Sharan, L.; Sinha M. 2013. Pharmacological efficacy of some medicinal plants used for treatment of gastrointestinal diseases. *The Ecoscan 3* (special issue): 111-116.
- Concepción, O.; Nápoles, L.; Pérez, A.; Peralta, N.; Trujillo R. 2004. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(2): 54-61
- Cruzat, GR. 2009. Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Proyecto de Innovación en las Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de Los Ríos. Chile. Ograma Ltda. p. 37-46. La publicación *Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides* se encuentra disponible a texto completo en el sitio de FIA en Internet (www.fia.gob.cl), en la sección Banco de Negocios FIA.
- Damiano, C.; Gentile, A.; La Starza, S.R.; Frattarelli A.; Monticelli, S. 2003. Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*. 616: 359-364.
- De Feria, M.; Chávez, M.; Quiala, E.; Jiménez, E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. 3(3): 149 - 154.



- Escalona, M.; Lorenzo, J.; González, B.; Daquinta, M.; Barroto, C.; González, J.; Desjardines, Y. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Report*. 18(9):743-748.
- Escalona, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*. 48-50.
- Etienne, H.; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in the plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture; Part 1: The Technology. Second Edition. Great Britain, Exegetics Ltd. 574 p.
- Giménez, C.; Colmenares, M. 2004. Sistemas prototípicos para la micropropagación por inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 21 Supl. 1: 1-7
- González, R.; Ríos, D.; Avilés, F.; Sánchez M. 2011. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque*. 32(2): 147-154
- Jackson, M.B. 2003. Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. Special Issue: 96-105.
- Jaiswal, V.S.; Amin, M.N. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture mature trees. *Journal Plant Physiolog*. 130(1): 7-12.
- Jiménez, E. 2005. Mass propagation of tropical crops. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Compilado por: Hvoslef-Eide A. y Preil W. Firth edition. pp 197-211. Dordrecht, The Netherland. Springer.
- Joseph, B.; Priya, M. 2011. Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of guava (*Psidium Guajava* Linn.). *International Journal of pharma and bio sciences*. 2: 53-69.
- Litz, R.E.; y Jaiswal, V.S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: Micropropagation. pp 247-263. Springer Netherlands.
- Mallón, R.; Covelo, P.; Vieitez, A. M. 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees*. 26(3): 731-741.
- Mccown, B.; Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience*. 16:453.
- Meghwal, P. R.; Sharma, H. C.; Singh, S. K. 2010. Micropropagation studies on guava. *Indian Journal of Horticulture*. 67(4): 55-58.
- Mishra, M.; Chandra, R.; Pati, R.; Bajpai A. 2007. Micropropagation of Guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticultae*. 735: 155-158.
- Molina, J.; González, J. 2005. Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden. Universidad de El Salvador, El Salvador, disponible en internet: <http://ri.ues.edu.sv/4705/1/13101484-1.pdf>
- Murashige, T; Skoog, F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3):473-497.
- Ocampo, F.; Nuñez, V.M. 2007. Propagación *in vitro* de (*Psidium guajava* L.) mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(1): 22-27.
- Orellana, P. 1998b. Introducción a la propagación masiva. pp 125-133. En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Peña, H. A.; Díaz, J. A.; Martínez, T. R. 1996. Fruticultura Tropical. 2^{da} parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.
- Pérez, J.; Jiménez, E.; Agramante, D. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. p. 179-190 En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Posada, L; Gómez, R; Reyes, M; Alvares, L. 2003. Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA®) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biología Vegetal*. 3(1):3-8
- Preil, W. 2005 General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. p 1-18. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.
- Preil W (Ed) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.
- Quiala, E.; Cañal, M. J.; Meijón, M.; Rodríguez, R.; Chávez, M.; Valledor, L.; Barbón R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109(2): 223-234.
- Rai, M. K.; Jaiswal, V.S.; Jaiswal U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 17(1):29-38
- Roels, S.; Noceda, C.; Escalona, M.; Sandoval, J.; Cañal, M.; Rodríguez, R.; Debergh, P. 2006. The effects of headspace renewal in a temporary immersion biorreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 84: 138-146.
- Ross, S.; Castillo, A. 2010. Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia (Uruguay)*. 14(1): 1-7.
- Saher, S.; Piqueras, A.; Hellin, E.; Olmos E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 120(1): 152-161.
- Santos, A.; Cabrera, M.; Gómez, R.; López, J.; Rayas, M.; Basail, M.; Beovides, Y. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(2): 97-1
- Scherwinski, J.; De Luces, G. 2003. Protocolo para producción de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38 (9): 1035-1043.
- Singh, S.K.; Meghwal, P.R.; Sharma, H.C.; Singh, S.P. 2002. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *In vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. Cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*. 95: 213-221.
- Statistix8. 2003. *Statistix8: Analytical Software User's Manual*. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- Steinmacher, D. A.; Guerra, M. P.; Saare-Surminski, K.; Lieberei, R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*. 108(8): 1463-1475.
- Teisson, C. y Alvard, D. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary inmersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. *Book of Abstracts*. 25.
- Vento, O.Y. 2011. Instructivo técnico para el cultivo de la guayaba. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba. 44 p. Disponible online:<http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/4330/index.pdf>
- Vilchez, J.; Albany, N.; Martínez, L.; Molina, M.; Pirela, C.; Molina, M.; Alvarez, C. Chirinos, J. 2011 Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocoño blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(1): 94-102
- Waghode, S. M. 2014. Antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn (guava) leaves extracts on bacterial pathogens. *International Journal of Bioassays*. 3(2): 1794-1796.
- Watt, M. P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 11: 14025-14035.
- Wawrosch, C.; Kongbangkerd, A.; Köpf, A. y Kopp B. 2005. Shoot regeneration from nodules of *Charybdis* sp.: a comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems. pp. 275-280. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer Netherlands.
- Ziv, M. 1992. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of *in vitro* plants. Pp 809-817. En: Progress in plant growth regulation. Karsen, C.M.; L.C. Van Loon y D. Vreugdenhil (Eds.). Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. pp 79-94. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Análisis genómico del resistoma de la cepa de *Acinetobacter baumannii* ABIBUN 107m multi-resistente y persistente en hospitales colombianos

Genomic analysis of the resistome of the strain of *Acinetobacter baumannii* ABIBUN 107m multi-resistant and persistent in colombian hospitals

Ma. Teresa Reguero*, **Vanessa Flores***, **Laura Patricia Uribe***, **Elsa Beatriz González***,
José Ramón Mantilla*, **Emilia María Valenzuela de Silva***, **Laurent Falquet****,
Emiliano Barreto-Hernández*

Resumen

Acinetobacter baumannii es una bacteria, causante de infecciones asociadas a la atención en salud como neumonía, septicemia, meningitis e infecciones urinarias entre otras. Se caracteriza por su capacidad para desarrollar y acumular rápidamente una gran variedad de mecanismos de resistencia a antibióticos. En esta investigación se realizó el análisis genómico de una cepa de *A. baumannii* ABIBUN 107m que forma parte de un clon persistente en hospitales colombianos, resistente a los antibióticos carbapenémicos (imipenem y meropenem), antibióticos de elección en el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo. El genoma de esta bacteria fue secuenciado utilizando técnicas de alto rendimiento, ensamblado y anotado, obteniéndose un genoma constituido por 3954000 pb con 56 contigs; consta de 4256 genes con un tamaño promedio de 912 pb; 3796 CDS de los cuales por anotación 2884 se asignaron a COG; 57 tRNA y un porcentaje de GC de 38,74%. *A. baumannii* ABIBUN 107m es resistente a β-lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, tetraciclina, sulfonamida y colistina. En su genoma se localizaron genes asociados con el perfil de resistencia ya que presenta serin β-lactamasas (*bla*_{ADC-38}, *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{ampC-like}, *bla*_{amp(H)-like}), metalo β-lactamasa_B; proteínas de unión a penicilina de elevada masa molecular, secuencias de inserción tipo ISAb1; mutaciones en los genes de DNA girasa y topoisomerasa IV subunidad A (*gyrA* y *parC*); enzimas modificadoras de aminoglicósidos (*aphA-like*, *aadA-like*); cloranfenicol aciltransferasa (*cat*) y dehidropteroato sintasa (*sul-1*). Se identificaron genes pertenecientes a cinco familias de sistemas de eflujo (RND, MATE, MSF, ATP, SMR).

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii* MDR, resistoma, Colombia

Abstract

Acinetobacter baumannii is a bacterium causing health care associated infections such as pneumonia, septicemia, meningitis and urinary infections amongst others. It has great capacity to quickly develop and gather a big variety of drug resistance mechanisms. In this research, the genome of strain *A. baumannii* ABIBUN 107m was analyzed which forms part of a persistent clone in Colombian hospitals and it's also resistant to carbapenems (imipenem and meropenem), which are the election antibiotics for treatment of infections caused by this microorganism. The genome was sequenced using high performance technology, assembled and annotated. As a result, we obtained a 3954000 bp genome, with 56 contigs; 4256 genes with average size of 912 bp; 3796 CDS; 2884 were assigned to COG; 57 tRNA and GC percentage of 38,74%. The *A. baumannii* strain ABIBUN 107m, is resistant to the following antibiotic groups: β-lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracycline, sulfonamide and colistin. Genes associated with this resistance profile were found in *A. baumannii* ABIBUN 107m genome serino β-lactamasas (*bla*_{ADC-38}, *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{ampC-like}, *bla*_{amp(H)-like}), metalo β-lactamase_B; High Molecular Mass penicillin binding proteins, ISAb1 type insertion sequences, mutations of DNA gyrase and topoisomerase IV subunit A (*gyrA* and *parC*); aminoglycoside modifying enzymes (*aphA-like*, *aadA-like*); chloramphenicol acyltransferase (*cat*) and dehydropteroate synthase (*sul-1*). Genes belonging to five different efflux systems were identified (RND, MATE, MSF, ATP, SMR).

Key words: *Acinetobacter baumannii* MDR, resistome, Colombia

Recibido: febrero 26 de 2014

Aprobado: octubre 17 de 2014

* Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. mtregueror@unal.edu.co, ebarretoh@unal.edu.co.

** University of Fribourg and Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland. laurent.falquet@unifr.ch.



Introducción

Según un reporte de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) al menos 2 millones de personas en ese país desarrollan al año infecciones bacterianas graves, que son resistentes a uno o más tipos de antibióticos y alrededor de 23000 mueren por esa causa (Steenhuyzen, 2013). Durante las últimas décadas, se han hecho grandes esfuerzos para combatir a las bacterias multi-resistentes causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). Dentro de estos microorganismos multi-resistentes, de difícil erradicación, se destacan algunas especies del género *Acinetobacter* (Giske et al., 2008; Garnacho-Montero & Amaya-Villar, 2010). Estas bacterias son patógenos oportunistas y han surgido como uno de los agentes causantes de IAAS, principalmente en pacientes de unidades de cuidado intensivo-UCIs (Enoch et al., 2008; Munoz-Price & Weinstein, 2008). *Acinetobacter* presenta, entre sus características, la habilidad para adquirir genes de resistencia a antibióticos por su competencia natural para la transformación genética, y la capacidad para sobrevivir sobre superficies abioticas. Estas características lo han convertido en una amenaza para las instituciones de salud, con reportes de bacterias pan-resistentes que dejan muy pocas opciones terapéuticas disponibles (Park et al., 2009; Turton et al., 2010; Hart et al., 2010). Durante los últimos cinco años se ha reportado un aumento en la resistencia a la mayoría de los antibióticos de uso clínico, haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones por cepas multi-resistentes de *A. baumannii* causantes de brotes, en UCIs. (Ramírez-Sandoval et al., 2013; Kempf & Rollain, 2012; Magiorakos et al., 2012; Poirel et al., 2011; Boucher et al., 2009; Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2013; Vila & Pachón, 2008; Pérez et al., 2007; Hernández-Torres et al., 2010).

En Latinoamérica, los *acinetobacter* son una de las principales bacterias causantes de IAAS con elevada resistencia a los antibióticos. En un estudio ya publicado, Gales y cols. (2012) evaluaron la frecuencia y resistencia de patógenos Gram negativos, aislados de diversos países de Latinoamérica adscritos al programa SENTRY, durante 2008-2010 y caracterizaron molecularmente las cepas productoras de carbapenemas. *Acinetobacter spp.* fue uno de los 10 patógenos más prevalentes como causa de bacteremias, neumonía e infecciones de piel y tejidos blandos en pacientes hospitalizados. En otro estudio Opazo y cols. (2012) se informa que en Suramérica, particularmente en Chile, *A. baumannii* ha incrementado su resistencia a carbapenémicos debido a la presencia de carbapenemas del tipo OXA.

Los estudios encaminados a establecer las bases moleculares de su resistencia se realizan utilizando técnicas de secuenciación de última generación de genomas bacterianos de algunas cepas, con la finalidad de comprender la biología, diversidad y determinantes de vi-

rulencia. (Medini et al., 2005; Falush, 2009; Tettelin et al., 2005). En la actualidad se encuentran registrados, en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), 292 proyectos de secuenciación de genomas de *A. baumannii*, de los cuales 16 corresponden a genomas completos e incluyen 26 plásmidos; 233 tienen resultados parciales (*contigs* o *scaffolds*); 44 secuencias sin ensamblar y 696 proyectos de secuenciación sin datos (NCBI, 2014).

A. baumannii tiene la habilidad de acumular una gran variedad de mecanismos de resistencia, tanto por mutaciones como por la adquisición de elementos genéticos, plásmidos, integrones, transposones o aun islas de resistencia (Roca et al., 2012). En particular, los mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos se atribuyen a la presencia de β -lactamasas, cambios en la afinidad de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), alteraciones en la estructura y expresión de porinas que reducen la permeabilidad de antibióticos y/o sistemas de eflujo que disminuyen la concentración del antibiótico en el espacio periplásmico (Zhu et al., 2010).

En cuanto a sistemas de eflujo presentes en *A. baumannii* multi-resistente, Coyne y cols. (2011) indican que la familia RND es el sistema más prevalente en estos aislamientos y que, adicionalmente, se presenta una sobreexpresión de AdeABC, además de mutaciones en los genes adeRS, que codifican para un sistema regulador de dos componentes, siendo este uno de los mecanismos que más contribuye a la multi-resistencia en *A. baumannii*. Los sistemas RND tienen un amplio rango de sustratos, particularmente AdeABC y AdelJK expulsan antibióticos; AdelJK es intrínseco a esta especie y es el responsable, al menos en parte, de la resistencia natural que presenta *Acinetobacter*. (Coyne et al., 2010; Rajamohan et al., 2010; Magnet et al., 2001; Damier-Piolle et al., 2008)

En Colombia, estudios preliminares han mostrado que *A. baumannii* es la especie del género aislada con mayor frecuencia (Saavedra et al., 2008; Hernández et al., 2011). Estudios preliminares sobre las bases moleculares de la resistencia han detectado genes codificantes de resistencia a cefalosporinas, carbapenémicos, quinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas y la participación de mecanismos de eflujo en los fenotipos de multi-resistencia observados en estos aislamientos (Villalba & Hartstein, 2003).

Se presenta, en este trabajo, el análisis del repertorio de genes de resistencia que conforman el resistoma (Wright, 2007) de *A. baumannii* ABIBUN 107m, aislado de hospitales colombianos. La cepa ABIBUN 107m, se seleccionó como representativa de un clon asociado a un brote epidémico, obtenido inicialmente en 2005 y posteriormente en el 2009, procedente de diferentes hospitales de 3er nivel de la ciudad de Bogotá, Colombia (Saavedra et al., 2008). La tipificación de las cepas



pertenecientes al clon, incluida la cepa ABIBUN 107m, fue realizada por el grupo de Epidemiología Molecular (Hernández *et al.*, 2011).

Materiales y métodos

Características del aislamiento

A. baumannii ABIBUN 107m se obtuvo de un hemocultivo que procedía de un paciente con IAAS, en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá. El mismo clon fue encontrado previamente en otro hospital diferente en 2005 (Saavedra *et al.*, 2008).

Perfil de resistencia en el aislamiento de *A. baumannii* ABIBUN 107m

La evaluación del perfil de resistencia de *A. baumannii* ABIBUN 107m se realizó por el método de difusión en disco y mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), según las recomendaciones y criterios de interpretación del CLSI, 2012 (excepto para colistina). Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 1.

Obtención del DNA

A. baumannii ABIBUN 107m se cultivo en placas de agar Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C toda la noche. Cinco colonias fueron inoculadas en 15 mL de caldo Luria Bertani en un matraz, y se en un agitador mecánico giratorio (150 rpm) a 37 °C, hasta obtener una densidad óptica entre 0,8 a 1 (λ 600 nm). La obtención del DNA se realizó disponiendo todo el cultivo en un tubo Falcon y centrifugando a 3500 xg por 2 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1,5 mL de solución salina (hipertónica). Esta suspensión se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se centrifugó a 5345 xg por 2 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500 μ L de buffer TE estéril y se centrifugó a temperatura ambiente (15 °C) por 5 min a 4000 xg. Después de obtener el pellet, se procedió a realizar la lisis celular, siguiendo las indicaciones del fabricante del QIAamp DNA Mini Kit®. La purificación del DNA se realizó utilizando una columna del kit Quiagen® siguiendo las instrucciones consignadas en el manual del fabricante. La cuantificación se hizo por fluorometría utilizando el fluorómetro Qubit de Invitrogen mediante el Kit Quant iT dsDNA y por el Nano-drop utilizando el sistema de Thermo Scientific NanoDrop 2000®.

Secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma de *A. baumannii* ABIBUN 107m

El DNA obtenido fue secuenciado inicialmente con el secuenciador de alto rendimiento Illumina HiSeq

2000 sobre librerías *paired-end* y adicionalmente con el secuenciador Roche 454 GS FLX sobre librerías *mate-pair* de 7,5 kb. Una vez obtenidos los *reads* se sometieron a control de calidad con los programas FASTQC (Babraham Institute, 2013) y *fastx_toolkit* (Pearson *et al.*, 1997). Para el ensamblaje *de novo* de los *reads* obtenidos por Illumina, se utilizó el programa Velvet (1.2.10) y el *scaffolding*, se realizó alineando los *contigs* previamente ensamblados en el programa Velvet con los *reads* obtenidos por Roche 454, utilizando el programa Newbler 2.7 (Roche Diagnostics Corporation®). Estos alineamientos fueron visualizados utilizando el programa IGV 2.3 (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2012). El genoma ensamblado fue anotado automáticamente utilizando el NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP) (Anguoli *et al.*, 2008) y el servidor NMPDR RAST 4.0 (Aziz *et al.*, 2008) y posteriormente se hizo la verificación de la anotación, en forma manual, utilizando el programa Artemis 16 (Rutherford *et al.*, 2000).

Identificación y ubicación de los genes de resistencia en el genoma de *A. baumannii* 107m

• Genes que codifican para sistemas enzimáticos asociados con resistencia

La identificación de los genes de resistencia se realizó a partir de la anotación del genoma. Las proteínas codificadas por los genes de resistencia encontrados, fueron comparadas con las secuencias de las proteínas correspondientes, presentes en cepas de referencia (*A. baumannii* ATCC17978; AYE; ACICU y OIFC143) obtenidas de la base de datos de proteínas del NCBI, mediante alineamiento global, utilizando el programa Needle – EMBOSS 6.5.7 (Rice *et al.*, 2000), con el fin de evaluar el porcentaje de identidad y el tamaño de las proteínas. En la tabla 2 se consignan los resultados obtenidos.

• Genes que codifican para sistemas no enzimáticos asociados con resistencia

Mutación de genes

Con el propósito de evidenciar las mutaciones que presentan los genes *gyrA* y *parC* se realizó un alineamiento global usando el programa Needle – EMBOSS 6.5.7 (Rice *et al.*, 2000) de cada una de las secuencias de las proteínas codificadas por estos genes en el genoma en estudio, con sus correspondientes proteínas *gyrA* (GI:NC010400) y *parC* (GI:EU886740) no mutadas, obtenida de la base de datos de proteínas del NCBI. Resultados no mostrados.

Sistemas de eflujo

Para localizar los genes que codifican para proteínas que forman parte de los sistemas de eflujo el genoma de *A. baumannii* ABIBUN 107m, se realizó el mismo



procedimiento utilizado para los genes que codifican para sistema enzimáticos asociados con resistencia. En este caso, sin embargo, se utilizó como cepa de referencia *A. baumannii* ATCC17978. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Resultados y Discusión

Acinetobacter baumannii uno de los microorganismos más frecuentemente asociados con IAAS y presenta una resistencia varios tipos de antibióticos. La caracterización del perfil de resistencia optimiza, de ser realizada en forma rápida, la terapia antibiótica óptima para cada paciente (Turton *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007), y su conocimiento permite, además, la selección de tratamientos empíricos racionales antes de su generación.

ABIBUN 107m es resistente a antibióticos β -lactámicos (ampicilina, cefotaxima, imipenem y meropenem), aminoglicósidos (amikacina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), lipopéptidos (colistina) y tetraciclina. Si bien no está definido un punto de corte para cloranfenicol, la CMI de este fármaco es claramente elevada. Dada la resistencia a más de tres familias de antibióticos este microorganismo es clasificado como multi-resistente. Tabla 1.

La secuenciación de alto rendimiento y el ensamblaje del genoma de *Acinetobacter baumannii* ABIBUN 107m dieron como resultado 56 contigs que pudieron ser organizados en un super-scaffold constituido por 3,954,000 bp con una porcentaje de GC de 38,74%, que consta de 3.796 CDS (Coding Sequence), dentro de los que hay 57 tRNA y 3.735 genes predichos con un tamaño promedio de 912 pb, de los cuales

por anotación 2.884 se asignaron a COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins, database), lo cual es coherente con los datos reportados para este género (Farrugia *et al.*, 2013). La cepa de este estudio tiene un plásmido (p1ABIBUN) de 8731 pb (ID:HG380023 de la base de datos GENOME del EBI) que es idéntico al plásmido p1 ABTCDC0715 de *Acinetobacter baumannii* TCDC0715 (número de acceso CP 002523.1). Una característica a resaltar del plásmido p1ABIBUN es que no contiene genes de resistencia. Este proyecto de secuenciación del genoma completo fue depositado en el DDBJ/EMBL/GenBank bajo el siguiente número de acceso: *A. baumannii* ABIBUN 107m (CBSG00000000).

Los tres principales mecanismos que generalmente determinan la resistencia de *A. baumannii* a aminoglicósidos, disminución de la concentración intracelular del antibiótico (presencia de genes que codifican para sistemas de eflujo adeABC-RND), alteraciones en los sitios de unión al ribosoma 16s RNA por la adquisición del gen *armA* y la producción de enzimas modificadoras de aminoglicósidos (AMEs) (Zhu *et al.*, 2010). La resistencia que presenta *A. baumannii* ABIBUN 107m a aminoglicósidos (gentamicina y amikacina) se puede atribuir a la presencia de dos genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglicósidos aminoglicosido fosfotransferasas y al gen *aadA-like* que codifica para una nucleotidil transferasa, específicamente la estreptomicina 3''-adenilil transferasa. La presencia de los genes que codifican para estas enzimas, permite postular que la resistencia de la cepa a aminoglicósidos estaría determinada por estos genes, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura (Zhu *et al.*, 2013).

Tabla 1. Perfil de resistencia de *A. baumannii* ABIBUN 107m

Antibiótico *	Halo de inhibición (mm)**	CMI mg/L	Clasificación
Ampicilina (10 mg)	-	128	Resistente
Cefotaxima (30 mg)	10	64	Resistente
Imipenem (10 mg)	10	16	Resistente
Meropenem (10 mg)	-	16	Resistente
Amikacina (30 mg)	-	64	Resistente
Gentamicina (10 mg)	-	1024	Resistente
Ciprofloxacina (10 mg)	-	1024	Resistente
Colistina (10 mg)	-	32	Resistente**
Tetraciclina (30 mg)	-	128	Resistente
Cloranfenicol (30 mg)	20	128	

* Entre paréntesis aparece la cantidad de antibiótico cargado en el sensidisco

** No se presenta halo de inhibición



Tabla 2. Análisis comparativo de los genes de resistencia a antibióticos presentes en la cepa *A. baumannii* ABIBUN 107m versus ATCC 17978, AYE, ACICU, OIFC143.

Proteínas asociadas a resistencia			Localización en el genoma <i>A. baumannii</i> 107m		Cepas de referencia			
Clases	Función	Resistencia frente a	Contig	Localización en el genoma	ATCC 17978	AYE	ACICU	OIFC143
					% identidad	% identidad	% identidad	% identidad
Enzimas modificadoras de amino-glicósidos (AMEs)	Aminoglicósido fosfotransferasa putativa	Amikacina, Gentamicina, Estreptomicina	34	Complemento 30401..31390	NP	NP	95	100
	Aminoglicósido fosfotransferasa hipotética	Amikacina, Gentamicina, Estreptomicina	35	Complemento 21917..23038	99	98	90,4	100
	Estreptomicina 3''-adenililtransferasa (aadA-like)	Estreptomicina, Espectinomicina	7	25496..26284	97	98	98	100
Resistencia a β-lactámicos	β-lactamasa clase C ampC (blaADC-38)	Ceftazidima, Cefepime	44	126..1277	99	99	99	99
	β-lactamasa OXA-64	Imipenem	29	Complemento 7087..7911	99	97	98	100
	β-lactamasa OXA-23	Imipenem, Ceftazidima,	13	Complemento 120..941	NP	NP	NP	NP
	β-lactamasa AmpC (ampC-like)	cefalotina, cefazolina, cefoxitina	36	Complemento 98592..99851	99	99	98	100
	β-lactamasa clase C amp(H)-like	cefalotina, cefazolina, cefoxitina	11	Complemento 90876..92174	99	99	99	100
	Metalo β-lactamasa	NI	29	192173..192868	97	97	97	100
	β-lactamasa clase A	Penicilinas	36	130537..131784	96	95	95	100
	PBPs HMM PBP1a [ponA] clase A (subclase A1) Transpeptidasa, glicosiltransferasa.	Disminución afinidad β-lactámicos	55	153506..156061	100	99	99	100
	PBPs HMM PBP1b [mrcB] clase A (subclase A2) Transpeptidasa, glicosiltransferasa.	Disminución afinidad β-lactámicos	43	45941..48337	100	99	99	NP
	PBPs HMM PBP2 (mrdA) Clase B (subclase B2) Transpeptidasa.	Disminución afinidad β-lactámicos	18	Complemento 184482..186500	99	99	100	NP
Resistencia a cloranfenicol	PBPs HMM PBP2 Clase B (subclase B2) Transpeptidasa	Disminución afinidad β-lactámicos	55	Complemento 161330..163162	99	100	99	NP
	Cloranfenicol aciltransferasa (cat)	cloranfenicol	22	162504..163136	96	100	100	100
	Dihidropteroato sintasa	sulfonamidas	47	Complemento 151781..152632	99	98	99	100

NP: Proteína no codificada en el genoma

NI: Sin información sobre su actividad frente a antibióticos β-lactámicos

PBPs HMM: Proteínas de Unión a Penicilina de elevada masa molecular



Las proteínas(asociadas a resistencia) que pudieron ser anotadas en este genoma, están muy conservadas en *A. baumannii*, particularmente con las de la cepa *A. baumannii* OIFC143. Sin embargo, se encuentran diferencias en las β -lactamasas OXA-23 que no se encuentra en los genomas utilizados como referencia, pero que es conservada (100 %) frente a otras cepas de *A. baumannii* como es el caso de *A. baumannii* MDR-ZJ06 y *A. baumannii* TCDC-AB0715, entre otras.

El perfil de resistencia a los antibióticos β -lactámicos se puede explicar por la presencia de los siguientes genes: un gen que codifica para una β -lactamasa clase A ; metalo β -lactamasa (MBL) dependiente de Zn; *bla_{ampC-like}* y *bla_{amp(H)-like}* que codifican para β -lactamasas clase C (cefalosporinas) y los genes *bla_{OXA-23}* y *bla_{OXA-64}* que codifican para enzimas de la clase D. Estos resultados están acordes con lo publicado para otras cepas de *A. baumannii*, en las que se evidencia que la resistencia a carbapenémicos está asociada con la producción de β -lactamasas de la clase D (carbapenemasas OXA) y *bla_{OXA-23}* (Mugnier et al., 2010; Corvec et al., 2007; Jeon et al., 2005; Heritier et al., 2005; Pournaras et al., 2006; Bonomo & Szabo, 2006; Hernández -Torres et al., 2010]. En la cepa ABIBUN 107m se encontraron β -lactamasas pertenecientes a 3 tres (A, C y D) de los cuatro grupos existentes.

El gen *bla_{OXA-23}*, presente en nuestra cepa, se encuentra en el *contig* ABISeq_013 y, corriente arriba (*contig* ABISeq_012) en la posición complementaria 41191-41737, se localizó una secuencia que codifica para una transposasa de la familia ISAb1 (utilizando IS-Finder). La presencia de esta secuencia sugiere la sobreexpresión de la β -lactamasa por las secuencias promotoras, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Lin et al., 2010; Héritier et al., 2006; Mugnier et al., 2009). El gen *bla_{OXA-23}*, que en otras especies de *Acinetobacter* puede estar localizado en el cromosoma o en plásmidos, en el genoma de *A. baumannii* ABIBUN 107m se encuentra exclusivamente en el cromosoma (Mugnier et al., 2010; Zarrilli et al., 2013).

Si bien los antibióticos carbapénemicos constituyen los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii*, es este uso el responsable de la resistencia encontrada en los clones capaces de generar hoy brotes en las UCIs, con el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico. (Zúñiga et al., 2010; Carlet et al., 2011; Lee et al., 2011).

La presencia de 4 genes que codifican para Proteínas de Unión a Penicilina (PBPs) de elevada masa molecular, dos de la clase A, PBP1a [*ponA*] y PBP1b [*mrcB*]), que presentan actividad como transpeptidasas y glicosiltransferasas, y dos de la clase B PBP2 [*pbpA*] y PBP tipo2 que son transpeptidasas, que son blanco de los antibióticos β -lactámicos podrían incrementar la resistencia a este tipo de fármacos debido una disminución de la afinidad como ha sido reportado (Papp-Wallace et al., 2012)

El comportamiento frente a cloranfenicol podría ser explicado, al menos en parte, por la presencia del gen *cat* que codifica para una cloranfenicol aciltransferasa: por otra parte, la resistencia a sulfonamidas se explica por la presencia del gen *sul-1* que codifica para una dehidropteroato sintasa.

La resistencia a fluoroquinolonas (ciprofloxacina) parece originado por las mutaciones encontradas en las proteínas GyrA y ParC. En la secuencia de la proteína GyrA se encontró una mutación del aminoácido en la posición 82 (leucina por serina); la misma mutación se encontró en la proteína ParC pero en la posición 84, una modificación ubicada en el bolsillo de unión de esta proteína a la quinolona (*quinolone-binding pocket*- QBP) lo que podría generar una disminución de la actividad del antibiótico, como se ha reportado para *A. baumannii* y otros microorganismos. (Vila et al., 1995; Vila et al., 1997; Li et al., 2014)

Pudimos identificar la presencia y organización genética de las cinco sistemas de eflujo (RND, MATE, MSF, ATP, SMR) asociados con el perfil de resistencia que presenta este aislamiento, acorde con lo reportado en 2011, por Coyne y cols. El análisis genómico evidenció la presencia de un tipo de la familia RND -AdeABC- lo cual contribuye a la multi-resistencia, ya que los principales sustratos de este sistema son: ciprofloxacina, tetraciclina y colistina. Estos sistemas también pueden remover los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol y tigeciclina (Chau et al., 2004; Munoz-Price & Weinstein, 2008; Adams et al., 2009; Iacono et al., 2008; Smith et al., 2007; Vallenet et al., 2008; Wieczorek et al., 2008). El operón AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux) es el principal sistema RND en *A. baumannii* y codifica para AdeA MFP, transportador multifármacos que se encuentra presente en la cepa ABIBUN 107m (Marchand et al., 2004; Ruzin et al., 2007). En el genoma estudiado se identificó AdelJK que es intrínseco a esta especie y se le asigna la resistencia intrínseca que presenta este género. (Coyne et al., 2010; Rajamohan et al., 2010; Magnet et al., 2001; Damier-Piolle et al., 2008).

Los genes anotados en el genoma tienen una alta correlación con el perfil fenotípico que presenta la cepa en estudio. También se encontró que esta cepa, a diferencia de otras cepas estudiadas, tiene codificados en su genoma todos los genes asociados con resistencia aunque no se encontró evidencia de que formen parte de islas de resistencia.

Conclusiones

La cepa de *A. baumannii* ABIBUN 107m presenta resistencia a varios tipos de antibióticos tales como: β -lactámicos (ampicilina, cefotaxima, imipenem y meropenem); aminoglucósidos (amikacina y gentamicina); fluoroquinolonas (ciprofloxacina); lipopéptidos (colis-



Tabla 3. Genes pertenecientes a sistemas de eflujo en las cepas de *A. baumannii* ABIBUN 107m y ATCC 17978

Genes de sistemas de eflujo			Localización en el genoma <i>A. baumannii</i> 107m		ATCC 17978
Función y categoría	Nombre del gen encontrado	Resistencia frente a	Contig	Posición en el contig	% identidad
Familia RND	adeB	Antibióticos, Detergentes	29	Complemento	99
	ABIBUN_09905			314459..317569	
	adel	Antibióticos, Detergentes	49	40977..42224	99
	ABIBUN_15118				
	adeT	Antibiótico,	1	Complemento	100
	ABIBUN_00030	Regulador		5461..6468	
	adeT	Antibiótico,	1	6724..7728	99
	ABIBUN_00035	Regulador			
	czcD	Metales	1	22634..23608	97
	ABIBUN_00105				
	cusA	Metales	14	51295..54441	91
	ABIBUN_02974				
Familia MFS	Acr3	Metales (arsenito)	14	56293..57333	89
	ABIBUN_02999				
	RND	Antibióticos	7	9966..13616	99
	ABIBUN_00805				
	Cianato	Cianato	25	33205..34383	98
	ABIBUN_07243				
	Cis,cis muconato	Muconato	25	Complemento	NP
	ABIBUN_07588			106082..107332	
	Drogas H+	Transportador de Fármacos	29	122711..124150	94
	ABIBUN_09010				
	EmrB/QacA	Transportador de Fármacos	30	Complemento	99
	ABIBUN_10010			20709..22256	
Familia MATE	Sulfato	Sulfato	35	110974..112428	99
	ABIBUN_11000				
	Metabolitos	Metabolitos	35	176315..177406	99
	ABIBUN_11325				
	Benzoato	Benzoato	40	38161..39516	59
	ABIBUN_12595				
	Metabolitos	Metabolitos	50	111876..113186	100
	ABIBUN_15733				
	NorM	Sodio	29	228470..229813	99
	ABIBUN_18312				
Familia SMR	MatE	Sodio	29	125450..126745	100
	ABIBUN_02072				
Familia ATP	SMR	Antibióticos	16	15420..15740	100
	ABIBUN_03469				
Familia ATP	ATPasa	Transportador de Fármacos	56	Complemento	NP
	ABIBUN_17387			31392..33083	
	ATPasa	Componente transportadores ABC	56	Complemento	100
	ABIBUN_17312			12354..14015	
	ATPasa	Componente transportadores ABC	1	7981..9912	100
	ABIBUN_00040				

NP: No presente en la cepa ATCC 17978



tina); tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, por lo cual se puede clasificar como multi-resistente.

El genoma de esta bacteria fue secuenciado utilizando técnicas de alto rendimiento, ensamblado y anotado, obteniéndose un genoma constituido por 3954000 bp con 56 contigs; consta de 4256 genes con un tamaño promedio de 912 pb; 3796 CDS de los cuales por anotación 2884 se asignaron a COG; 57 tRNA y un porcentaje de GC de 38,74%. Adicionalmente se secuenció el plásmido p1ABIBUN de 8731 pb, el cual no presenta genes de resistencia que puedan contribuir a la resistencia que presenta la cepa ABIBUN 107m.

En el genoma de *A. baumannii* ABIBUN 107m se localizaron genes asociados con el perfil de resistencia que presenta: enzimas modificadoras de aminoglicósidos (*aphA-like*, *aadA-like*); β -lactamasas (*bla_{ADC-38}*, *bla_{OXA-64}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{ampC-like}*, *bla_{ampH-like}*), β -lactamasa clase A; metalo β -lactamasa (MBL) dependiente de Zn; secuencia de inserción tipo ISAb1; mutaciones en las proteínas GyrA (serina por leucina) en la posición 82 y la misma mutación en la posición 84 en la proteína parC codificadas por los genes de la DNA girasa y topoisomerasa IV subunidad A (*gyrA* y *parC*); la resistencia a cloranfenicol se podría explicar, parcialmente, por la presencia del gen *cat* que codifica para la cloranfenicol aciltransferasa y la resistencia a sulfonamidas por el gen *sul-1* que codifica para una dehidropteroato sintasa. Adicionalmente se identificaron 4 PBPs de elevada masa molecular que coadyuvarían a disminuir la afinidad de los antibióticos β -lactámicos con su blanco.

Se localizaron, en *A. baumannii* ABIBUN 107m, genes asociados a cinco sistemas de eflujo (RND, MATE, MSF, ATP, SMR). Particularmente el sistema RND, presenta un amplio rango de sustratos. AdeABC y AdeJK expulsan antibióticos y AdeJK es intrínseco a esta especie y es el responsable de la resistencia natural que presenta *Acinetobacter*. La presencia de estos sistemas ayudarían a la disminución de la concentración de los antibióticos especialmente de los β -lactámicos pero también de fluoroquinolonas, cloranfenicol, colistina y tetraciclinas.

Nuestro análisis sobre los genes que conforman el resistoma de *A. baumannii* ABIBUN 107m, son una referencia en la identificación de los mecanismos moleculares asociados con la resistencia a antibióticos sin embargo, es importante indicar que no se encontró evidencia de que genes se encuentren formando parte de islas de resistencia (datos no reportados) y que la resistencia sería el resultado de una combinación de mecanismos.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por Colciencias (Código 1101 5192 9105; Contrato 300-2010).

Los autores agradecen la colaboración y apoyo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional

de Colombia – Sede Bogotá; Instituto Suizo de Bioinformática; National Center for Biotechnology Information; Centro de Nacional de Biotecnología de España y a la red Freebit del CyTED.

Referencias bibliográficas

- Adams, MD.; Nickel, GC.; Bajaksouzian, S.; Lavender, H.; Murthy, AR.; Jacobs, MR.; Bonomo, RA. 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 53(9): 3628- 3634.
- Angiuoli, SV.; Gussman, A.; Klimke, W.; Cochrane, G.; Field, D.; Garroway, GM.; Kodira, CD.; Kyripides, N.; Madupu, R.; Markowitz, V.; Tatusova, T.; Thomson, N.; White, O. 2008. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS*. 12(2): 137-141.
- Aziz, RK.; Bartels, D.; Best, AA.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, RA.; Formas, K.; Gerdes, S.; Glass, EM.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olen, GJ.; Olson, R.; Osterman, AL.; Overbeek, RA.; McNeil, LK.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, GD.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 9:75 doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- Babraham Institute. 2013. Babraham Bioinformatics -FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Fecha de consulta:13/04/2013.
- Bonomo, RA.; Szabo, D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 43(2): 49-56.
- Boucher, HW.; Talbot, GH.; Bradley, JS.; Edwards, JE.; Rice, LB.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 48(1): 1-12.
- Cantón, R.; Ruiz-Garbajosa, P. 2013. *Acinetobacter baumannii*: Do they still deserve our attention? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31(1): 1-3.
- Carlet, J.; Collignon, P.; Goldman, D.; Goossens, H.; Gyssens, IC.; Harbarth, S.; Jarlier, V.; Levy, SB.; N'Doye, B.; Pittet, D.; Richmann, R.; Seto, WH.; van der Meer, JWM.; Voss, A. 2011. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*. 378(9788): 369- 371.
- Chau, SL.; Chu, YW.; Houang, ET. 2004. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48(10): 4054-4055.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement document M100-S22, x 33(1): 184 p. Wayne, PA.
- Corvec, S.; Poirel, L.; Naas, T.; Drugeon, H.; Nordmann, P. 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla_{OXA-23}* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51(4): 1530-1533.
- Coyne, S.; Rosenfeld, N.; Lambert, T.; Courvalin, P.; Périchon, B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 54(10): 4389- 4393.
- Coyne, S.; Courvalin, P.; Périchon, B. 2011. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 55(3): 947-953.
- Damier-Piolle, L.; Magnet, S.; Bremont, S.; Lambert, T.; Courvalin, P. 2008. AdeJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 52(2): 557-562.
- Enoch, DA.; Summers, C.; Brown, NM.; Moore, L.; Burnstein, RM.; Thaxter, R.; Enoch, LM.; Matta, B.; Sule O. 2008. Investigation



- and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. *Journal of Hospital Infection*. 70(2): 109-118.
- Falush, D. 2009. Towards the use of Genomics to study Microevolutionary Change in Bacteria. *PLoS Genetics*. 5(10): e1000627.
- Farrugia, DN.; Elbourne, LDH.; Hassan, KA.; Eijkelkamp, BA.; Tetu, SG.; Brown, MH.; Shah, BS.; Peleg, AY.; Mabbatt, BC.; Paulsen, IT. 2013. The Complete Genome and Phenome of a Community-Acquired *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. 8(3): e58628.
- Gales, AC.; Castanheira, M.; Jones, RN.; Sader, HS. 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 73(4): 354-360.
- Garnacho-Montero, J.; Amaya-Villar, R. 2010. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: Epidemiology and management. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 23(4): 332-339.
- Giske, CG.; Monnet, DL.; Cars, O.; Carmeli, Y. on behalf of ReAction on Antibiotic Resistance. 2008. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 52(3): 813-821.
- Hart, M.; Espinosa, F.; Halley, MC.; Martínez, ML.; Montes de Oca, Z. 2010. Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". *Revista Cubana de Medicina*. 49(3): 218-227.
- Héritier, C.; Poirel, L.; Lambert, T.; Nordmann, P. 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinas to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49(8): 3198-3202.
- Héritier, C.; Poirel, L.; Nordmann, P. 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 12(2): 123-130.
- Hernández, A.; Valenzuela, EM.; Pulido, IY.; Reguero, MT.; Restrepo, S.; Gualtero, S.; Santofimio, D.; Ramírez, M.; Quintero, E.; Mantilla, JR. 2011. The genomic identification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by RFLP- PCR analysis of 16S-23S rRNA gene spacer region. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(1): 110-114.
- Hernández-Torres, A.; García-Vázquez, AE.; Yagüe, G.; Gómez Gómez, J. 2010. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Revista Española de Quimioterapia*. 23(1):12-19.
- Iacono, M.; Villa, L.; Fortini, D.; Bordoni, R.; Imperi, F.; Bonnal, RJ.; Sicheritz-Ponten, T.; De Bellis, G.; Visca, P.; Cassone, A.; Carratoli, A. 2008. Whole genome pyrosequencing of an Epidemic Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* strain Belonging to the European clone II group. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 52(7): 2616-2625.
- Jeon, BC.; Jeong, SH.; Bae, IK.; Kwon, SB.; Lee, K.; Young, D.; Lee, JH.; Song, JS.; Lee, SH. 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β-lactamase in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(5): 2241-2245.
- Kempf, M.; Rolain, JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39(2): 105-114.
- Lee, Y.; Bae, IK.; Kim, J.; Jeong, SH.; Lee, K. 2011. Dissemination of ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 in Korea. *Journal of Applied Microbiology*. 112(6): 1207-1211.
- Li, J.; Gao, X.; Luo, T.; Wu, J.; Sun, G.; Liu, Q.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Mei, J.; Gao, Q. 2014. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes and Infections*. 3:e19; doi:10.1038/emi.2014.21.
- Lin, YC.; Hsia, K-C.; Chen, Y-C.; Sheng, W-H.; Chang, SC.; Liao, M-H.; Li, S-Y. 2010. Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Clinical Isolates in Taiwan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 54(5): 2078-2084.
- Magiorakos, AP.; Srinivasan, A.; Carey, RB.; Carmel, Y.; Falagas, ME.; Giske, CG.; Harbarth, S.; Hindler, JF.; Kahlmeter, G.; Olson-Liljequist, B.; Paterson, DL.; Rice, LB.; Stelling, J.; Struelens, MJ.; Vatopoulos, A.; Weber, JT.; Monnet, DL. 2012. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3): 268-281.
- Magnet, S.; Courvalin, P.; Lambert, T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45(12): 3375- 3380.
- Marchand, I.; Damier-Piolle, L.; Courvalin, P.; Lambert, T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48(9): 3298-3304.
- Medini, D.; Donati, C.; Tettelin, H. 2005. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*. 15(6): 589-594.
- Mugnier, PD.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. 2009. Functional Analysis of Insertion Sequence IS Aba1, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*. 191(7): 2414-2418.
- Mugnier, PD.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. 2010. Worldwide dissemination of the bla_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*. 16(1): 35-40.
- Munoz-Price, LS.; & Weinstein, RA. 2008. *Acinetobacter* Infection. *New England Journal of Medicine*. 358(12): 1271-1281.
- NCBI. 2014. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 42: D7-D17. Published online 19 November 2013. doi:10.1093/nar/gkt1146.
- Opazo, A.; Domínguez, M.; Bello, H.; Amyes, SGB.; González-Rocha, G. 2012. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Infection Developing Countries*. 6(4): 311-316.
- Park, YK.; Ran-Peck, K.; Cheong, HS.; Chung, DR.; Song, JH.; Ko KS. 2009. Extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units, South Korea. *Emerging Infectious Diseases*. 15(8): 1325-1327.
- Papp-Wallace, KM.; Senkfor, B.; Gatta, J.; Chai, W.; Taracila, M.A.; Shanmu-gasundaram, V.; Han, S.; Zaniewski, R.P.; Lacey, B.M.; Tomaras, A.P.; Skalweit, M.J.; Harris, M.E.; Rice, L.B.; Buynak, J.D.; Bonomo, R.A. 2012. Early insights into the interactions of different β-lactam antibiotics and β-lactamase inhibitors against soluble forms of *Acinetobacter baumannii* PBP1a and *Acinetobacter* sp. PBP3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(11): 5687-5692.
- Pearson, WR.; Wood, T.; Zhang, Z.; Miller, W. 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics*. 46(1): 24-36.
- Perez, F.; Hujer, AM.; Hujer, KM.; Decker, BK.; Rather, PN.; Bonomo, R.A. 2007. Global Challenge of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51(10): 3471-3484.
- Poirel, L.; Bonnín, RA.; Nordmann, P. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology IUBMB Life*. 63(12): 1061-1067.
- Pournaras, S.; Markogiannakis, A.; Ikonomidis, A.; Kondyli, L.; Bethimouti, K.; Maniatis, A.N.; Legakis, N.J.; Tsakris, A. 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 57(3): 557-561.
- Rajamohan, G.; Srinivasan, VB.; Wondwossen, A.; Gebreyes, WA. 2010. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(9): 1919-1925.
- Ramírez-Sandoval, ML.; Aranza-Aguilar, JL.; Varela, MA.; García-González, A.; Vélez-Castro, G.; Salcedo-Romero, R.; Fajardo-



- Luz, MM.; Cruz-Sánchez, M.; Moreno-Pérez, FJ. 2013. Brote de infección nosocomial de vías respiratorias bajas por *Acinetobacter baumannii* en un servicio de Medicina Interna de un hospital general de la Ciudad de México. *Medicina Interna de México*. 29(3): 250-256.
- Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 16(6): 276-277.
- Roca, I.; Espinal, P.; Vila-Farrés, X.; Vila, J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: comensal hospital dweller turned pan-drug-resistance menace. *Frontiers in Microbiology*. 23(3): 148. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148.
- Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.A.; Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 16(10): 944-945.
- Ruzin, A.; Keeney, D.; Bradford, P.A. 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(5): 1001-1004.
- Saavedra, SY.; Nuñez, JC.; Pulido, IY.; González, EB.; Valenzuela, EM.; Reguero, MT.; Mantilla, JR. 2008. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates in a third-level hospital in Bogotá, Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31(4): 389-391.
- Smith, MG.; Gianoulis, TA.; Pukatzki, S.; Mekalanos, JJ.; Ornston, LN.; Gerstein, M.; Snyder, M. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development*. 21: 601-614.
- Steenhuysen, J. 2013. Bacterias resistentes a fármacos son una amenaza urgente: informe EEUU. *MedlinePlus*. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/news/fullstory_140737.html. Fecha de consulta 22 de octubre 2013.
- Tettelin, H.; Masiagnani, V.; Cieslewicz, M.J.; Donati, C.; Medini, D.; Ward, N.L.; Anguoli, S.V.; Crabtree, J.; Jones, A.L.; Durkin, A.S.; Deboy, R.T.; Davidsen, T.M.; Fraser, C.M. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(39): 13950-13955.
- Thorvaldsdóttir, H.; Robinson, J.T.; Mesirov, J.P. 2012. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 14(2): 178-192.
- Turton, JF.; Shah, J.; Ozongwu, C.; Pike, R. 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging species. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(4): 1445-1449.
- Vallenet, D.; Nordmann, P.; Barbe, V.; Poirel, L.; Mangenot, S.; Bataille, E.; Dossat, C.; Gas, S. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE*. 3(3):e1805.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Goñi, P.; Marcos, A.; Jiménez de Anta, T. 1995. Mutation in the *gyrA* Gene of Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(5): 1201-1203.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Goñi, P.; Marcos, A.; Jiménez de Anta, T. 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 757-762.
- Vila, J.; Pachón, J. 2008. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 9(4): 587-599.
- Villegas, MV.; Hartstein, AI. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 24(4): 284-295.
- Wieczorek, P.; Sacha, P.; Hauschild, T.; Zórawski, M.; Krawczyk, M.; Tryniszewska, E. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemical et Cytobiologica*. 46(3): 257-267. doi: 10.2478/v10042-008-0056-x.
- Wright, G.D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 175-186.
- Zarrilli, R.; Pournaras S.; Giannouli M.; Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International Journal Antimicrobial Agents*. 41(1): 11-19.
- Zhu, H-Y.; Wang, Y.; Zhu, Y-V.; Xu, D-x.; Zhang, H-Y. 2010. Detection Rate and Drug Resistance Rate of *Acinetobacter baumannii* during 2005- 2009. *Chinese Journal of Nosocomiology*. 23: 3778-3780.
- Zhu, L.; Yan, Z.; Zhang, Z.; Zhou, Q.; Zhou, J.; Wakeland, E.K.; Fang, X.; Xuan, Z.; Shen, D.; Li, Q-Z. 2013. Complete Genome Analysis of Three *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in China for Insight into the Diversification of Drug Resistance Elements. *PLoS ONE*. 8(6): e66584.
- Zuñiga, AE.; Chávez, M.; Gómez, R.F.; Cabrera, C.E.; Corral, R.E.; López, B. 2010. Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii*. *Nova. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 8(14): 148-162.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Efecto de antioxidantes y señalizadores en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum* bajo condiciones de invernadero

Effect of antioxidants and sing in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) infected with *Candidatus Liberibacter solanacearum* under greenhouse conditions

Areli González Cortés*, **Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez****,
María Alejandra Torres Tapia***, **Víctor Manuel Zamora Villa******,
Isidro Humberto Almeyda León*****

Resumen

En México, las pérdidas ocasionadas en el cultivo de la papa por el síndrome punta morada (PMP), son del orden del 30 al 95 %. Este síndrome ha sido asociado principalmente a la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, la cual, ocasiona reducción en el rendimiento y calidad de la cosecha ya que los tubérculos presentan pardeamiento interno, lo cual, no es deseable ni para el consumo en fresco ni para la industria. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de tres compuestos que actúan como antioxidantes y/o señalizadores para reducir el daño causado en la papa por *Ca. L. solanacearum* bajo condiciones de invernadero. Se utilizaron plantas producidas *in vitro*, infectadas con *Ca. L. solanacearum* y sin infección. Los compuestos evaluados fueron: ácido dehidroascórbico (600 ppm), ácido ascórbico (600 ppm) y peróxido de hidrógeno (1 mM), y se aplicaron en plantas infectadas y no infectadas dos veces por semana. Los controles fueron plantas infectadas y no infectadas sin aplicación de antioxidantes. Para evitar el error experimental en la aplicación de los compuestos evaluados el diseño experimental utilizado fue el de bloques completos al azar. Se observó reducción en el daño ocasionado por *Ca. L. solanacearum* y se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en la producción de tubérculos. El mayor número de tubérculos en los tratamientos que incluyeron plantas no infectadas fue obtenido por la aplicación del peróxido de hidrógeno, superando en un 33 %, 48 % y 59 % a las plantas tratadas con ácido dehidroascórbico, con ácido ascórbico y a las plantas controles respectivamente. De igual manera, el mayor número de tubérculos en tratamientos que incluyeron plantas infectadas se obtuvo con la aplicación de peróxido de hidrógeno, superando en un 33 %, 17 % y 67 % a los tratamientos con ácido dehidroascórbico, con ácido ascórbico y a plantas control respectivamente. Estos resultados demuestran un efecto potencial de los compuestos evaluados en la tolerancia de las plantas de papa contra *Ca. L. solanacearum*, aunque su función no es disminuir el crecimiento o desarrollo de la bacteria.

Palabras clave: ácido dehidroascórbico, ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno, síndrome, punta morada, papa.

Abstract

In Mexico, the losses caused by the purple top syndrome in potato range from 30 to 95%. This syndrome has been greatly associated with the bacterium *Candidatus Liberibacter solanacearum*, which produces reduction in yield and in crop

- * Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No. 1923, Col. Buenavista, CP25315, Saltillo, Coahuila, México, areli_morelos@live.com.mx.
- ** Campo Experimental Saltillo-Centro de Investigación Regional del Noreste-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carr. Saltillo-Zacatecas km. 342+119, Col. Hacienda de Buenavista, CP 25315, Saltillo, Coahuila, México, villavicencio.edith@inifap.gob.mx.
- *** Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No. 1923, Col. Buenavista, CP25315, Saltillo, Coahuila, México, atorres_tapia@hotmail.com.
- **** Departamento de Fitomejoramiento Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No. 1923, Col. Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México, vzamvil@uaaa.mx.
- ***** Centro de Investigación Regional Noreste-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 61 Carr. Matamoros-Reynosa, CP88900, Cd. Río Bravo, Tamaulipas. Autor para correspondencia: almeyda.isidro@inifap.gob.mx.



quality, the tubers have internal browning, which is not desirable either for fresh consumption or for the industry. Present study was conducted to evaluate the efficiency of three products that act as antioxidants and / or signs to reduce damage on potato caused by *Ca. L. solanacearum* under greenhouse conditions. Plants uninfected and infected with the bacterium, produced *in vitro* were used. The products evaluated were: dehydroascorbic acid (600 ppm), ascorbic acid (600 ppm) and hydrogen peroxide (1 mM), and were applied to infected and uninfected plants twice a week. Infected and uninfected plants without application of antioxidants were used as control treatments. To avoid experimental error in the application of the products evaluated the experimental design was a randomized complete block. A reduction of potato damage by *Ca. L. solanacearum* was registered, and there were significant differences among treatments in the tubers production. The largest tuber number in treatments that included uninfected plants was obtained in the hydrogen peroxide application, which exceeded a 33 %, 48 % and 59 % to plants treated with dehydroascorbic acid, with ascorbic acid and the controls respectively. Similarly, the largest tuber number in treatments included infected plants was obtained by hydrogen peroxide, and it exceeded a 33 %, 17 % and 67 % to treatments with dehydroascorbic acid, with ascorbic acid and the controls respectively. These results show a potential effect of the products evaluated to protect potato plants against *Ca. L. solanacearum*, although its function is not to diminish the growth or development of bacteria.

Key words: Dehydroascorbic acid, ascorbic acid, hydrogen peroxide, syndrome, purple top, potato.

Recibido: febrero 10 de 2014

Aprobado: octubre 21 de 2014

Introducción

En México, las pérdidas ocasionadas por el síndrome de la punta morada de la papa (PMP), son del 30 al 95 %, reduciendo el rendimiento y calidad del cultivo (Martínez et al., 2007; Arellano et al., 2010). La disminución directa en la viabilidad de los tubérculos que se usan como semilla se debe a este síndrome, asociado con la presencia de fitoplasmas de los Grupos 16Srl y 16Srl (Leyva et al., 2002) y *Ca. L. solanacearum*, siendo esta bacteria la que más se asocia con la enfermedad (Rubio et al., 2011). Los síntomas típicos de la infección por este patógeno son la reducción de altura de la planta, engrosamiento del tallo, acortamiento de entrenudos, enrollamiento de la hoja apical, coloración púrpura del follaje, clorosis, formación de tubérculos aéreos, baja producción de tubérculos y diferentes grados de pardeamiento de la pulpa del tubérculo, (Hooker, 1981; INIFAP, 2000; Cadena et al., 2003; Secor et al., 2006; Martínez et al., 2007). Considerando que la semilla es el insumo más importante en todo cultivo, la disponibilidad de semilla sana y de buena calidad es uno de los principales factores que limitan la producción de papa.

El síndrome PMP, se ha incrementado notablemente en la región papera de Coahuila y Nuevo León, México, con pérdidas de hasta el 100 %, afectando principalmente la calidad de la papa en cuanto a tamaño, manchado y freído (Flores et al., 2004; Flores y Flores, 2008; Rubio et al., 2006).

El síndrome PMP es un conjunto de síntomas desarrollados principalmente por el ataque de la bacteria *Ca. L. solanacearum* y fitoplasmas (organismos pleomórficos sin pared celular que habitan en el floema de las plantas) (Cadena et al., 2003; Flores et al., 2004; Lee et al., 2004; Herrera et al., 2013; Garzón et al., 2005; Lee et al., 2006; Alarcón, 2007; Martínez et al., 2007; Alarcón et al., 2009; Rubio et al., 2011). En Estados Unidos la enfermedad causada en la papa por *Ca. L. solanacearum* se le conoce como Zebra Chip (ZC) debido al

pardeamiento que ocasiona en la pulpa del tubérculo (Abad et al., 2009; Loeffing et al., 2009), e inicialmente a la bacteria se le nombró *Candidatus Liberibacter psyllaureus* (Hansen et al., 2008). Otro problema sanitario es el Amarillamiento del Psílido (AP), ocasionado según algunos autores por la inyección de toxinas que realiza el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. al alimentarse de la planta (Severin, 1940; Wallis, 1948; Liu et al., 2006), aunque hasta la fecha no se ha realizado la descripción bioquímica de esas toxinas.

Los ensayos realizados por diversos investigadores mencionan una asociación del psílido *B. cockerelli* con la presencia y diseminación de las tres enfermedades antes mencionadas (PMP, ZC y AP); por lo tanto, para asegurar el rendimiento y la calidad de la producción, se han implementado prácticas como el establecimiento de fechas de siembra, eliminación de focos de infestación (plantas de papa con síntomas de PMP y otras hospederas del psílido), uso de semilla-tubérculo sano y de enemigos naturales, así como el uso intensivo de agroquímicos con la finalidad de disminuir las poblaciones del psílido y en consecuencia reducir la incidencia de estas enfermedades (Avilés et al., 2003).

Actualmente las medidas empleadas para combatir la enfermedad no han sido eficientes. Los estudios realizados para la comprensión de mecanismos de patogenicidad de fitoplasmas y *Ca. L. solanacearum* son restrictivos, y la incapacidad de reproducir estos fitopatógenos *in vitro* ha obstaculizado su caracterización bioquímica y pruebas de bioensayos para establecer su control químico (Lee et al., 1998; Seemüller et al., 1998; Poghosyan y Lebshy, 2009; Sánchez, 2010).

El estudio de la naturaleza, función y modo de acción de los agentes causales de la PMP como patógenos de diversos cultivos vegetales es muy difícil, ya que hasta la fecha no existen métodos de aislamiento y cultivo para su experimentación sobre métodos químicos para su control. Una alternativa para reducir el daño ocasionado por los patógenos causantes del síndrome



de punta morada consiste en el incremento de la resistencia o tolerancia de las plantas a estos organismos, ya que la eliminación del patógeno hasta el momento no ha sido posible con ningún tratamiento químico. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como finalidad evaluar la efectividad del ácido dehidroascórbico, del ácido ascórbico y del peróxido de hidrógeno, para atenuar la expresión sintomática del síndrome punta morada de la papa y reducir su efecto en la baja producción y pardeamiento interno de los tubérculos

Materiales y Métodos

El experimento se realizó durante los años 2010 y 2011 en un invernadero del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Saltillo (INIFAP-CEASAL), con una ubicación geográfica de 25° 27' 55.2" latitud N y 101° 00' 09.1" longitud O. Como material vegetal se utilizaron plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Vivaldi que es altamente susceptible al síndrome de punta morada. Las plantas fueron producidas mediante micropagación en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del INIFAP, ubicado en Saltillo, Coahuila, México, bajo el esquema descrito por Espinoza *et al.* (1985) y Villavicencio *et al.* (2010), y se generaron a partir de plantas colectadas en campo con síntomas de PMP y de plantas no infectadas desarrolladas en invernadero (para establecer la sanidad y/o infección del material vegetal utilizado, se realizaron análisis para la detección de *Ca. L. solanacearum* mediante la técnica de PCR). Plantas *in vitro* en etapa de multiplicación con 30 días de edad se sometieron a la etapa de aclimatación durante 15 d, posteriormente se trasplantaron a macetas de 6" (tres plantas por maceta) que contenían una mezcla de 2:1 v/v de "peat moss" y agrolita. Las plantas se mantuvieron en invernadero con temperatura de 14-26 °C bajo fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad. Para evitar la contaminación del material sano, las plantas fueron cubiertas con tela antiafidos con un tamaño del poro de 0.82 mm.

Los compuestos evaluados fueron; ácido dehidroascórbico (600 ppm), ácido ascórbico (600 ppm) y peróxido de hidrógeno (1 mM), los cuales, que fueron seleccionados a partir de los trabajos realizados por Romero y López en el 2009 y Sánchez *et al.*, en el 2011. La aplicación de los compuestos se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sánchez en el 2010, que consistió en aplicar un volumen de 20 mL por maceta, asperjando las plantas con un aspersor Marca Trupper de boquilla de fina (diámetro de gota de 50 a 100 micras), haciendo las aplicaciones dos veces por semana a partir de los 20 d después del trasplante hasta cosecha, realizando en total 32 aplicaciones durante el desarrollo del cultivo, los testigos positivos y negativos se asperjaron con agua destilada, el pH se ajustó a 5.7 con KOH 1N (tabla 1), y se agregó polisorbato 20 (Tween, Reasol) como surfactante

al 0.01% con el propósito de mantener el equilibrio químico y permitir la absorción de los compuestos por las plantas.

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. La detección de la bacteria tanto en plantas no infectadas y con síntomas, se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción del ADN se realizó a partir de las nervaduras de las hojas más nuevas, de acuerdo al protocolo descrito por Almeyda-León *et al.* (2008). En la detección molecular de *Ca. L. solanacearum* se utilizaron los iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R (Hansen *et al.*, 2008), que amplifican un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S de *Ca. L. solanacearum*. Las condiciones de las reacciones y el programa de amplificación utilizado fueron los reportados por Rubio *et al.* (2011).

Tabla 1. Tratamientos y dosis utilizadas en la evaluación de tres compuestos para reducir el daño causado por el síndrome de punta morada de la papa.

Tratamiento	Compuesto Evaluado	Dosis
T1	Plantas con <i>Ca. L. solanacearum</i> + Ácido dehidroascórbico	600 ppm
T2	Plantas con <i>Ca. L. solanacearum</i> + Ácido ascórbico	600 ppm
T3	Plantas con <i>Ca. L. solanacearum</i> + Peróxido de hidrógeno	1 mM
T4	Plantas con <i>Ca. L. solanacearum</i> sin antioxidantes	—
T5	Plantas sin <i>Ca. L. solanacearum</i> + Ácido dehidroascórbico	600 ppm
T6	Plantas sin <i>Ca. L. solanacearum</i> + Ácido ascórbico	600 ppm
T7	Plantas sin <i>Ca. L. solanacearum</i> + Peróxido de hidrógeno	1 mM
T8	Plantas sin <i>Ca. L. solanacearum</i> y sin antioxidantes	-----

Variables agronómicas evaluadas. Las variables evaluadas al final del ciclo fueron: altura de la planta (AP), número de hojas por planta (NHP) y número de foliolos por planta (NFP). En la cosecha, realizada a los 120 días después del trasplante (ddt), al final del ciclo se evaluó el número de tubérculos por planta (NTP), diámetro polar de tubérculos (DPT), diámetro ecuatorial de tubérculos (DET) y peso de los tubérculos por planta (PT). A pesar de su alto grado de variación el DPT, el DET y el PT, se seleccionaron como variables agronómicas a evaluar, ya que se constituyen como las principales características que se toman en consi-



deración para seleccionar las diferentes categorías de tubérculos a nivel comercial.

Análisis estadístico. Para reducir en todo lo posible el error experimental, se utilizó el diseño en bloques al azar, cada tratamiento constó de tres plantas con tres repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico de cada parámetro se llevó a cabo con el GLM del SAS para determinar el ANOVA y la prueba de medias mediante Tukey al $P<0.05$ de probabilidad (SAS, 2001).

Resultados

Detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum*. Las 11 plantas colectadas en campo con síntomas de PMP y a partir de las cuales se obtuvieron las plantas que fueron tratadas con los compuestos evaluados, resultaron positivas por PCR al realizar su análisis para *Ca. L. solanacearum*, amplificando el fragmento esperado de aproximadamente 400 pares de bases (pb) (figura 1). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y comparados con las secuencias de la bacteria reportadas en el Gene Bank (datos no mostrados), corroborándose que las secuencias obtenidas correspondían a *Ca. L. solanacearum*. Posteriormente, a los 30, 60 y 90 ddt, también se realizó el análisis para la detección de la bacteria, confirmándose su presencia en las plantas provenientes de plantas infectadas y la ausencia en las plantas generadas a partir de plantas no infectadas (datos no mostrados).

Variables agronómicas evaluadas Se observaron diferencias significativas al $P<0.05$ de probabilidad entre los tratamientos evaluados. En el T1 (ac. dehidroascórbico aplicado en plantas infectadas), fue donde se registró la mayor altura de planta, este mismo compuesto aplicado en plantas no infectadas (T5), registró una menor altura de planta, pero estadísticamente fueron similares (tabla 2). Todos los tratamientos tuvieron el mismo manejo agronómico (riego, fertilización, etc.), por lo tanto, se puede inferir que los resultados obtenidos corresponden a la aplicación o no aplicación de los productos evaluados y si estaban infectados o no con la bacteria.

En los tratamientos con ac. ascórbico (T2 y T6) y sin aplicación de antioxidantes (T4 y T8), fue donde se obtuvieron los valores más bajos en la altura de planta y presentaron la misma tendencia que en los tratamientos con ac. dehidroascórbico, donde los mayores

valores de altura de planta se registraron en las plantas infectadas. En los tratamientos con peróxido de hidrógeno (T3 y T7), el mayor valor de altura de la planta se registró en las plantas no infectadas, sin embargo no se registró diferencia estadística entre estos dos tratamientos (tabla 2).

Los resultados observados en el número de hojas y número de folíolos por planta, presentaron una tendencia similar a los obtenidos en la altura de planta. Los valores más altos se registraron en los tratamientos T1 y el T5, siendo estadísticamente similares al $P<0.05$ de probabilidad entre ellos, pero diferentes con el resto de los tratamientos a excepción del tratamiento con peróxido de hidrógeno en la variable número de hojas por planta. Los valores más bajos en el número de hojas y número de folíolos por planta se registraron en los tratamientos con ac. ascórbico (T2 y T6) y sin aplicación de antioxidantes (T4 y T8). Los tratamientos con ac. ascórbico y sin aplicación de antioxidantes, presentaron la misma tendencia que en los tratamientos con ac. dehidroascórbico, donde los mayores valores de número de hojas por planta se registraron en las plantas infectadas, excepto con el peróxido de hidrógeno, que mantuvo la tendencia de registrar los mayores valores cuando se aplicó en plantas no infectadas (tabla 2).

Tabla 2. Respuesta de las variables agronómicas evaluadas en la variedad Vivaldi de papa bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	AP (cm)	NHP	NFP
T1	40.55 a	14.44 a	43.33 a
T2	29.00 de	10.88 def	32.77 efg
T3	34.77 bc	12.00 cde	36.77 cde
T4	28.11 e	10.44 efg	31.55 fgh
T5	38.44 ab	13.66 ab	40.44 abc
T6	23.66 fg	8.88 gh	27.55 i
T7	35.77 bc	13.11 abc	37.77 bcd
T8	24.88 ef	9.49 fgh	29.33 hi
NS	**	**	**
X	31.83	11.48	34.61
CV	8.37	8.52	8.25

**= Significativo, X=media y CV= Coeficiente de variación. AP = Altura de planta; NHP = Número de hojas por planta; NFP = Número de foliolos por planta.



Figura 1. Fragmentos amplificados mediante PCR utilizando los iniciadores Lp16S-1F/Lp16S-1R y ADN de plantas de papa provenientes de campo con síntomas del síndrome de punta morada. Carril M= Marcador de peso molecular; Carriles 1-2, 4-12: Plantas de papa con síntomas de infección por PMP, Carril 3: Control negativo, Carril 13: Control Positivo.



El número de tubérculos por planta, manifiesta una tendencia clara con relación al compuesto aplicado. El T7 (aplicación de peróxido de hidrógeno en plantas no infectadas) obtuvo el mayor número de tubérculos por planta y fue estadísticamente diferente del resto de los tratamientos a excepción del T6. El mayor número de tubérculos en plantas infectadas también se registró en el tratamiento de peróxido de hidrógeno y es estadísticamente similar con los tratamientos T1 y T2. El menor número de tubérculo por planta se registró en los tratamientos sin aplicación de ningún compuesto, tanto en plantas no infectadas como en plantas infectadas (figura 1a).

El mayor diámetro polar se registró en plantas no infectadas con aplicación de peróxido de hidrógeno y sin aplicación de antioxidantes (T7 y T8), pero no se observó diferencia estadística al $P<0.05$ de probabilidad con los tratamientos T3, T5 y T6. Los valores más bajos del diámetro polar se registraron en los tratamientos aplicados en plantas infectadas y fueron estadísticamente diferentes con el resto de los tratamientos, excepto el T3 (figura 1b). El mayor diámetro ecuatorial también fue registrado en los tratamientos T7 y T8, pero no se registró diferencia estadística al $P<0.05$ de probabilidad.

dad con el resto de los tratamientos, aunque los valores más bajos registrados con esta variable al igual que con el diámetro polar fue en los tratamientos aplicados en las plantas infectadas (figura 1c).

El peróxido de hidrógeno aplicado a plantas no infectadas, también fue el compuesto que obtuvo el mayor peso de tubérculo, pero no se registró diferencia estadística al $P<0.05$ en esta variable con los otros dos tratamientos aplicados en plantas no infectadas y con plantas no infectadas sin aplicación de ningún compuesto. Tampoco se registró diferencia estadística con el peróxido de hidrógeno aplicado en plantas infectadas (figura 1d).

Discusión

Este estudio se realizó bajo condiciones de invernadero y las plantas infectadas por *Ca. L. solanacearum* que no tuvieron la aplicación de ningún compuesto, presentaron algunos síntomas típicos de infección por este patógeno parecidos a los observados en campo, tales como el engrosamiento del tallo, acortamiento de los entrenudos y baja producción y peso de tubérculos. Sin embargo, otros síntomas inducidos por la bacteria bajo condiciones de campo como el enrro-

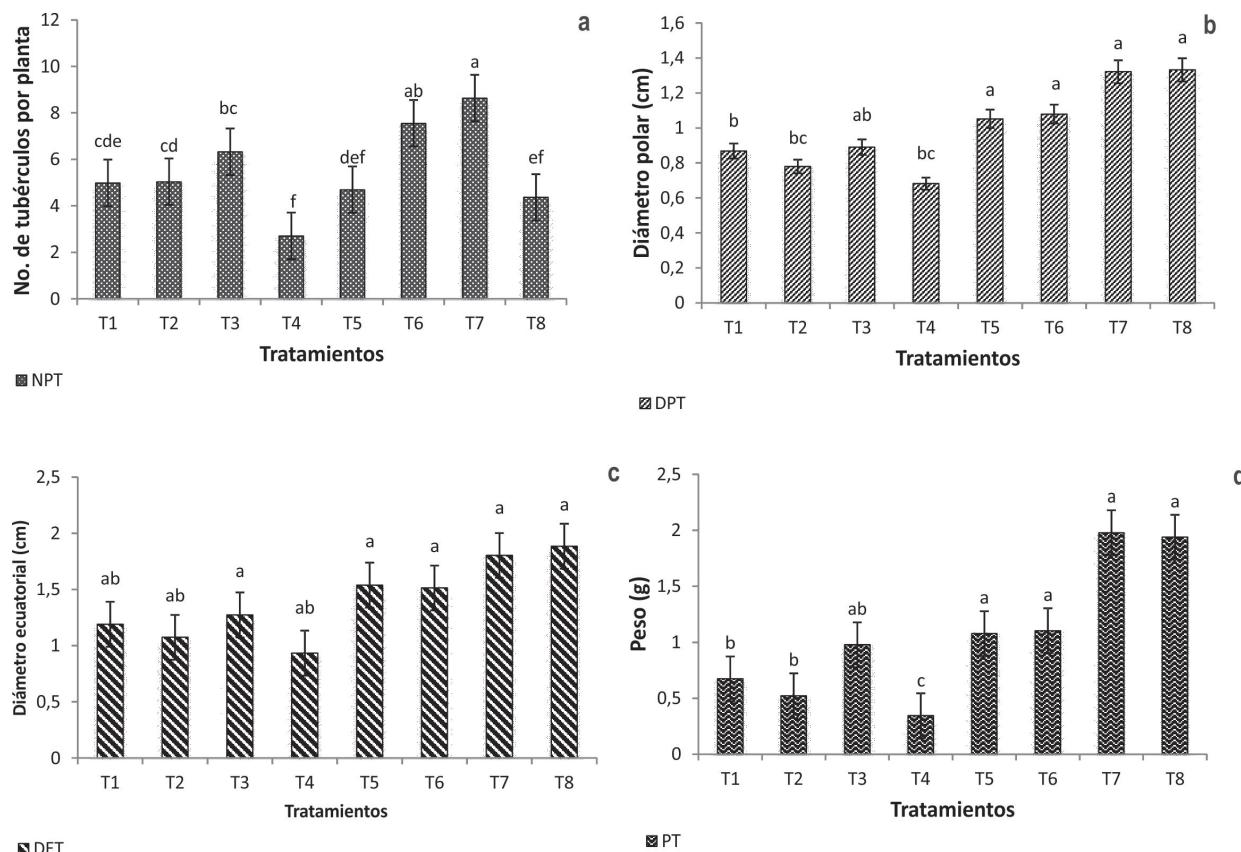


Figura 1. Efecto de antioxidantes y señalizadores en las variables agronómicas de rendimiento de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Vivaldi en invernadero. a) Número de tubérculos por planta (NT); b) Diámetro polar de tubérculo (DPT); c) Diámetro ecuatorial de tubérculo (DET); d) Peso tubérculo (PT).



llamiento de la hoja apical y coloración púrpura, clorosis y formación de tubérculos aéreos (INIFAP, 2000; Cadena et al., 2003; Secor et al., 2006; Martínez et al., 2007), estuvieron ausentes, posiblemente debido a que el ambiente bajo invernadero es más estable en contraste a las condiciones de campo donde se producen cambios ambientales bruscos (Sánchez et al., 2011). Además, bajo condiciones de campo las plantas están expuestas a la colonización constante del vector con el consecuente incremento de la concentración del patógeno, como lo reporta Sánchez (2010), pero en la var. Alpha. Hren et al. (2009), reportan el impacto climático en el incremento de expresión sintomatológica en plantas infectadas por algunos patógenos, como es el caso de la vid infectada por fitoplasmas.

Los tres compuestos evaluados en este estudio presentaron resultados positivos con respecto a la altura de la planta, número de hojas por planta y número de foliolos por planta, pero bajo condiciones diferentes. El ácido dehidroascórbico proporciona mejores resultados cuando se aplica a plantas infectadas, en el ácido ascórbico los mejores resultados se obtuvieron al aplicarlo en plantas no infectadas, mientras que el peróxido de hidrógeno genera una respuesta similar entre plantas no infectadas y plantas infectadas. Lo anterior puede deberse a que las plantas reaccionan al ataque de patógenos con una serie de mecanismos de defensa inducibles e integrados por un sistema complejo de señales, dando lugar a cascadas de fosforilación de proteína y la activación del factor de transcripción (Hayat et al., 2009). También se ha asociado la aplicación exógena del ac. dehidroascórbico a la promoción de la elongación celular y actividad meristematica (Herrera et al., 2013), lo que puede explicar la mayor altura y mayor número de hojas por planta registrada en los tratamientos donde se aplicó este compuesto. El ac. ascórbico, ha sido reportado como responsable en el incremento del número de hojas, de ramas y peso fresco de ramas en berenjena (El-Tohamy et al., 2008); en plantas de papa con o sin PMP se ha demostrado que puede promover el crecimiento vegetal expresado en su desarrollo foliar, lo que permite mayor capacidad fotosintética y puede incrementar la actividad enzimática de la catalasa (Romero y López 2009), sin embargo, en este trabajo fue el compuesto que registró los valores más bajos en las variables agronómicas evaluadas. Se ha establecido que algunos compuestos que actúan como señalizadores como el ac. salicílico son importantes en la inducción de respuestas de resistencia y son reguladores claves en la expresión de genes que promueven la producción de enzimas que protegen a las plantas contra algunos patógenos como virus, hongos y bacterias (Sticher et al., 1997; Dangl y Jones, 2001; Hayat et al., 2009). Estos mecanismos regulados por el ac. salicílico pueden mediar en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico, favoreciendo sus mecanismos de defensa ante la presencia de los

dos tipos de estrés, pero no actúan como insecticidas eliminando al patógeno en el caso del estrés biótico.

Para las cuatro variables relacionadas al rendimiento (NTP, DPT, DET y PT), el mejor tratamiento fue el peróxido de hidrógeno aplicado en plantas no infectadas, ya que superó al testigo sano sin aplicación de antioxidante. Estos resultados indican que este señalizador induce cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas independientemente de algún estrés biótico o abiótico. Sin embargo, en plantas infectadas con *Ca. L. solanacearum*, los compuestos evaluados también redujeron el daño por la infección de la bacteria y los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicó peróxido de hidrógeno. Estos resultados se asocian a las respuestas de defensa de la planta que incluyen la inducción de fitoalexina, la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), la acumulación de lignina y calosa para resistencia estructural, y la mejora antioxidante para contrarrestar pro-oxidantes producidos durante el ataque (Bolwell, 1999; Baker et al., 2005). En este trabajo, al parecer el peróxido de hidrógeno pudo haber sido el compuesto más eficiente en la regulación o promoción de la respuesta de defensa de las plantas, lo cual, se refleja en una menor disminución en la producción del número y peso de tubérculos comparado a los otros tratamientos evaluados en plantas infectadas con la bacteria, pero no se puede decir que su función es eliminar al patógeno. Para reducir al mínimo los efectos perjudiciales de especies reactivas del oxígeno, los organismos aeróbicos involucran antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las defensas no enzimáticas incluyen compuestos con propiedades antioxidantes intrínsecas tales como el ácido ascórbico, glutatión, y β-caroteno. Las defensas puramente enzimáticas, tales como superóxido dismutasa, catalasas y peroxidases protegen al eliminar directamente los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno y los convierten a especies menos reactivas (Scandalios, 2005); de esta manera, se elimina el daño que ocasionan estos compuestos en su calidad de radicales libres, pero cumplen su función previa de activar el sistema de defensa de las plantas debido a algún estrés biótico o abiótico. Sánchez et al. (2011), reportan que el ácido salicílico asperjado activó la respuesta de defensa de la planta de papa contra el ataque de fitoplasma, lo cual redujo los síntomas de la infección, favoreció la translocación de fotosintatos e incrementó la calidad de los tubérculos, la mayor actividad biológica se observó con la aplicación de bajos niveles de ácido salicílico exógeno (0.001 mM), algo similar pudo haber ocurrido en este estudio en relación al H₂O₂, ya que si bien es cierto que este compuesto en altas concentraciones es dañino para la planta, su aplicación exógena fue positiva ya que probablemente activó la respuesta de defensa de la planta mediante la inducción de fitoalexina, la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), la acumulación de lignina y calosa para resistencia estructural, y la mejora antioxidante para con-



trarrestar pro-oxidantes producidos durante el ataque (Bolwell, 1999; Baker et al., 2005). El ácido ascórbico controla el crecimiento y está mediada por contenido el contenido del peróxido de hidrógeno (Pedreira et al., 2004). Por lo tanto, el contenido significativamente alto de peróxido de hidrógeno en la etapa temprana de la planta como fue en este estudio debido a la aplicación exógena del antioxidante, pudo haber sido la condición clave para activar el sistema de defensa de la planta y se diera la reducción del daño de la bacteria y el rendimiento bajo estas condiciones tuviera una menor afectación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que los compuestos evaluados deben ser evaluados a nivel de campo y posteriormente puedan incluirse en el manejo integrado del cultivo, ya que el control de la PMP depende de la capacidad oxidativa del tejido vegetal, mismo que se promueve con la aplicación de estos compuestos, los cuales influyen como cofactores de enzimáticos, fotoprotectores e influyen como donador/dador de electrones a nivel de la membrana plasmática o en los cloroplastos, influyendo en el crecimiento y elongación de la pared celular y en la resistencia a diferentes tipos de estrés abióticos tal como lo señalan Smirnoff y Wheeler (2000) y Davey et al. (2000).

Conclusiones

La aplicación de los tres compuestos evaluados (ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y peróxido de hidrógeno) en plantas de papa sana, favorece el comportamiento de variables morfoagronómicas como la altura de planta, número de hojas por planta y número de foliolos por planta. Pero lo más relevante es que en plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter solanacearum*, los compuestos evaluados posiblemente también reducen el daño ocasionado por la bacteria, destacando el peróxido de hidrógeno, ya que presentó los mejores resultados de producción de tubérculos.

Agradecimientos

A la Fundación Produce Nuevo León, A. C., por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo mediante el proyecto con Folio: 19-2008-0308.

Referencia bibliográficas

- Abad, J.A.; Bandlia, M.; French-Monar, R.D.; Loeffing, L.W., Clover, G.R.G. 2009. First Report of the Detection of "*Candidatus Liberibacter*" species in Zebra Chip Disease-Infected Potato Plant in the United States. *Plant Disease*. 93: 108.
- Alarcón, R.N.M. 2007. Caracterización de DNA de clones de papa y fitoplasmas asociados en el valle de Toluca, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Chapingo, México. 71p.
- Alarcón, R.N.M.; Lozoya, S.H.; Valadez, M.E. 2009. Caracterización de ADN de clones de papa e identificación de fitoplasmas asociados al síndrome de la punta morada. *Agrociencia*. 43: 357-370.
- Almeyda-León, I.H.; Sánchez, S.J.A.; Garzón, T.J.A. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México*. 34: 141-150.
- Arellano, G.M.A.; Villavicencio, G.E. E.; García, G.S.J. 2010. Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. Folleto técnico No.42 MX-0-310702-37-03-15-09-41. ISBN: 978-607-425-301-6. Campo experimental Saltillo CIRNE-INIFAP Coahuila, México. 46pp.
- Avilés, G.M.C.; Garzón, T.J.A.; Marín, J.A.; Caro, M.P.H. 2003. El psílido del tomate *Paratriozza cockerelli* (Sulc.): biología, ecología y su control. En memoria del Taller sobre *Paratriozza cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México. 21-35 pp.
- Baker, C.J.; Whitaker, B.D.; Roberts, D.P.; Mock, N.M.; Rice, C.P.; Deahl, K.L.; Aver'yanov, A.A. 2005. Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant-pathogen interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66: 90-98.
- Bolwell, G.P. 1999. Role of oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 287-294.
- Cadena, H.M.A.; Guzmán, P.R.; Díaz, V.M.; Zavala, Q.T.E.; Almeyda-León, I.H.; López, D.H.A.; Rivera, P.A.; Rubio, C.O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles altos y sierras de los estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 248-258.
- Dangl, J.L.; Jones, J.D. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*. 411: 826-833.
- Davey, M.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Sanmartín, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.J.; Strain, J.J.; Favell, D.; Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80: 825-860.
- El-Tohamy, W.A.; El-Abagy, H.M.; El-Greadly, N.H.M. 2008. Studies on the effect of putrescine, yeast and vitamin C on growth, yield and physiological responses of eggplant (*Solanum melongena* L.) under sandy soil conditions. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 2: 296-300.
- Espinosa, N.; Estrada, N.; Tovar, P.; Bryan, J.; Dodds, H.J. 1985. Cultivo de Tejidos, Micropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa. Dto. Tecn. Especializada 1. Centro Internacional de la Papa (CIP). 17pp.
- Flores, O.A.; Alemán, N.I.A.; Notario, Z.M.I. 2004. Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. In: Flores, O. A.; Gallegos, M., G. y García, M., O. (eds.). *Memorias de Simposio Punta Morada de la Papa*. 40-63pp.
- Flores, O.A.; Flores, J.L.E. 2008. Enfermedades fungosas de la papa. XII Congreso Nacional de Papa. Los Mochis Sinaloa México. 9-25pp
- Garzón, T.J.A.; Garzón, C.J.A.; Velarde, F.S.; Marín, J.A.; Cárdenas, V.O.G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al "Permanente del Tomate" por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. en México. In: Memorias del Congreso Nacional de Entomología. 672-675pp.
- Hansen, A.K.; Trumble, J.T.; Stouthamer, R.; Paine, T.D. 2008. A New Huanglongbing Species, *Candidatus Liberibacter psyllaureus*, found to infect tomato and potato, is vectored by the psylid *Bactericera cockerelli* (Sulc.). Department of Entomology, University of California, Riverside, California. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 5862-5865.
- Hayat, Q.; Hayat, S.; Irfan, M.; Ahmad, A. 2009. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.08.005.
- Herrera, M.S.L.; Mora, M.M.E.; García, V.R.; Gomora, R.J.; Rogel, M.G. 2013. Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. *Terra Latinoamericana*. 31 (3): 193-199.
- Hooker, W.J. 1981. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 166 pp.



- Hren, M.; Nikolic, P.; Roter, A.; Blejec, A.; Terrier, N.; Ravnikar, M.; Dermastia, M.; Gruden, K. 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics.* 10: 460.
- INIFAP. 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México. Centro de Investigación Nacional del Centro. Programa Nacional de Investigaciones en el cultivo de la papa. Pp.1-81.
- Lee, I.-M.; Gundersen-Rindal, D.E.; Davis, R.E.; Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal Systematic Bacteriology.* 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M.; Bottner, K.D.; Munyaneza, J.E.; Secor, G.A.; Gudmestad, N.C. 2004. Clover proliferation group (16SrVI), subgroup a (16SrVI-A) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease.* 88: 429.
- Lee, I.-M.; Bottner, K.D.; Secor, G.A.; Rivera-Varas, V. 2006. "Candidatus phytoplasma americanum", a phytoplasma associated with potato purple top disease complex. *International Journal Systematic Evolution Microbiology.* 56: 1593-1597.
- Leyva-López, N.E.; Ochoa-Sánchez, J.C.; Leal-Klevezas, D.S.; Martínez-Soriano, J.P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology.* 48 (12): 1062-1068.
- Liefting, L.W.; Sutherland, P.W.; Ward, L.I.; Paice, K.L.; Weir, B.S.; Clover, G.R.G. 2009. A new "Candidatus Liberibacter" species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease.* 93: 208-214.
- Liu, D.; Trumble, J.T.; Stouthamer, R. 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomol. Exp. Appl.* 118: 177-183.
- Martínez, S.J.P.; Leyva, L.N.E.; Aviña, P.K.; Ochoa, S.J.C. 2007. La punta morada de la papa en México. *Claridades Agropecuarias.* Pp. 27-33.
- Pedreira, J.; Sanz, N.; Pena, M.J.; Sánchez, M.; Queijeiro, E.; Revilla, G.; Zarra, I. 2004. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. *Plant & Cell Physiology.* 45: 530-534.
- Poghosyan, A.; Lebshy, V. 2009. Microscopía electrónica de barrido: una herramienta esencial para el diagnóstico de fitoplasmas. Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Baja California, México.
- Romero, R.M.T.; López, D.H.A. 2009. Ameliorative effects of hydrogen peroxide, ascorbate and dehydroascorbate in *Solanum tuberosum* infected by phytoplasma. *Am. J. Pot. Res.* 86: 218-226.
- Rubio, C.O.A.; Almeyda-León, I.H.; Ireta, M.J.; Sánchez, S.J.A.; Fernández, S.R.; Borbón, S.J.T.; Díaz, H.C.; Garzón, T.J.A.; Rocha, R.R.; Cadena, H.M.A. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc. en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica en México.* 32: 201-211.
- Rubio, C.O.A.; Almeyda-León, I.H.; Cadena, H.M.A.; Lobato, S.R. 2011. Relación entre la población de *Bactericera cockerelli* Sulc, los síntomas de la punta morada de la papa y la presencia de *Candidatus Liberibacter psyllaorous* en lotes comerciales de papa en Toluca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2 (1): 17-28.
- Sánchez, R.S. 2010. Respuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico en plantas de papa infectadas con fitoplasma. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillos, Texcoco, Ed. de Mex., México. Pp. 3-48.
- Sánchez, R.S.; López, D.H.A.; Mora, H.M.E.; Almeyda-León, I.H.; Zavaleta, M.H.A.; Espinoza, V.D. 2011. Salicylic Acid Protects Potato Plants from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. *American Journal of Potato Research.* 88: 175-183.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 38: 995-1014.
- Smirnoff, N.; Wheeler, G. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 1455-1464.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). 2001. User's Guide Statistic, SAS Institute, Cary, North Carolina. 646 p. (Version 8.1).
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Metraux, J.-P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology.* 35: 235-270.
- Secor, G.A.; Lee, I.-M.; Bottner, K.D.; Rivera-Varas, V.; Gudmestad, N.C. 2006. First report of a defect of processing potatoes in Texas and Nebraska associated with a new phytoplasma. *Plant Disease.* 90: 377.
- Seemüller, E.; Marcone, C.; Lauer, U.; Ragozzino, A.; Göschl, M. 1998. Current status of molecular classifications of the phytoplasmas. *Journal Plant Pathology.* 80: 3-26.
- Severin, H.H.P. 1940. Potato naturally infected with California Aster Yellow. *Phytopathology.* 30: 1049-1051.
- Villavicencio, G.E.E.; Arellano, G.M.A.; García, G.S.J. 2010. Producción de material prenuclear In; Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. Folleto técnico No.42 MX-0-310702-37-03-15-09-41. ISBN: 978-607-425-301-6. Campo experimental Saltillo CIRNE-INIFAP Coahuila, México. Pp.10-25.
- Wallis, R.L. 1948. Time of planting potatoes as a factor in prevention of potato psyllid attack. *Journal of Economic Entomology* 41 (1): 4-5.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston

Effect of plant growth promoting rhizobacteria phosate solubilizing *Lactuca sativa* cultivar White Boston

Diana Beatriz Sánchez López*, **Ana María García Hoyos***, **Felipe Andrés Romero Perdomo***,
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago*

Resumen

En las últimas décadas, la agricultura colombiana se ha visto afectada por la reducción de la productividad en las zonas hortícolas, el incremento de los costos de producción y la dependencia del uso de productos químicos, produciendo un daño irreversible al medio ambiente y la calidad de vida de productores y consumidores. El objetivo de investigación fue evaluar el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Pseudomonas* sp. sobre *Lactuca sativa* cultivar White Boston como solubilizadoras de roca fosfórica. El estudio se realizó en el Centro de Investigación Tibaitatá (Corpoica) ubicado en Mosquera (Cundinamarca-Colombia). Los resultados demostraron que las cepas tienen la capacidad intrínseca para solubilizar fuentes de fósforo de baja solubilidad como la roca fosfórica. La aplicación de inoculantes con base en las cepas: *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp., UVLO27 y *Pseudomonas* sp. LEAV18 arrojaron los mejores resultados. Las cepas *Pseudomonas* sp. FR2, UVLO27 y K35, tienen la capacidad de producir indoles y sideróforos. El experimento en invernadero evidenció que las cepas *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp. FR2 y UVLO27 incrementaron de manera significativa ($P<0.05$) la biomasa y el desarrollo de las plantas. El uso de rocas fosfóricas representa una alternativa económica y ecológica viable, en sistemas de agricultura sostenible.

Palabras clave: *Pseudomonas* sp., biofertilizantes, roca fosfórica, fósforo, indoles totales.

Abstract

In the last decades, Colombian agriculture has been affected by the reduction in productivity in horticultural areas, increase in production costs and the dependence of chemical products usage, causing and irreversible damage to environment and producers and consumers life quality. The aim of this research was to evaluate the effect of plant growth promoting rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* sp. under *Lactuca sativa* cultivar White Boston as phosphate rock solubilizing bacteria. The study took place in the Research Centre Tibaitatá-Corpoica, located in Mosquera (Cundinamarca-Colombia). Results demonstrated that the strains have an intrinsic capacity to solubilize low solubility phosphorus sources as phosphate rock. Inoculants application based on: *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp., UVLO27 and *Pseudomonas* sp. LEAV18 strains displayed the best results. The strains *Pseudomonas* sp. FR2, UVLO27 and K35, are capable of producing indoles and siderophores. The green house experiment showed that strain *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp. FR2 of phosphate rocks represents a viable economic and ecological alternative in sustainable agriculture systems.

Key words: *Pseudomonas* sp., biofertilizer, phosphate rock, phosphorus, total indole

Recibido: febrero 16 de 2014

Aprobado: octubre 16 de 2014

* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Laboratorio Microbiología de Suelos. Telephone +57(1) 4227300 Ext. 1409.
Autor para correspondencia: dbsanchez@corpoica.org.co



Introducción

El incremento de los costos de producción y la dependencia del uso de agroquímicos han ocasionado un daño irreversible al medio ambiente, a los agricultores y a los consumidores (Elkoca et al., 2010). De acuerdo a Pinzon et al. (1993), estos sistemas de fertilización, llevan a la no sostenibilidad a través del tiempo; un claro ejemplo de esta situación se ha observado durante el proceso de producción del cultivo de *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Esta hortaliza de hoja es considerada como la más importante a nivel nacional, contando con un área aproximada de siembra de 3.500 hectáreas con un valor de producción de \$245 millones (Pinzon et al., 1993).

En cuanto a los requerimientos nutricionales del cultivo, el fósforo (P) es uno de los macronutrientes más importantes para el desarrollo del mismo (Yadav, Dadarwal, 1997). Lo anterior ha generado una problemática por la forma indiscriminada que se aplica al cultivo y su rápida inmovilización por la reacción con iones calcio, hierro o aluminio, dejando de estar disponible para la planta (Alkhader et al., 2013; Omar 1997). Algunos microorganismos juegan un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos. Mejoran la disponibilidad de P para las plantas por mineralización de P orgánico mediante fosfatases en el suelo y la solubilización de fosfatos minerales a través de ácidos orgánicos (Toro et al., 2013; (Makoi et al., 2010; Rodríguez y Fraga, 1999). De esta forma el fósforo queda disponible en el suelo y finalmente es absorbido por las plantas y utilizado para su desarrollo (Maseko y Dakora, 2013). Debido al papel que juegan en la colonización de la rizósfera y en la promoción de crecimiento, éstas bacterias se ha denominado Rizobacterias Promotoras De Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Hayat et al., 2010; Kang et al., 2011). Entre ellas se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* entre otros.

La aplicación de P y la inoculación bacteriana afecta el rendimiento de la soya a través de la utilización de este mejorando su efectividad (Khan et al., 2011). Flores-Félix et al. (2013) reportaron que *Rhizobium leguminosarum* (PEPV16) tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas aumentando su biomasa seca de parte aérea y raíces en *Lactuca sativa* y *Daucuscarota* L.; además esta cepa aumentó la absorción del fósforo en la parte comestible de las dos especies y en la microscopía con focal mostró la capacidad de colonizar las raíces de dos cultivos hortícolas. Sin embargo, pocos estudios se han realizado en torno al uso de PGPR, específicamente bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), eficientes que hacen disponibles el fósforo del suelo aplicado en fertilizante de síntesis química en el cultivo *Lactuca sativa*.

El objetivo de ésta investigación fue evaluar el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Pseudomonas* como solubilizadoras de fósforo sobre la producción de *Lactuca sativa* cultivar White Boston, utilizando como fuente fosfórica la roca fosfórica de Pesca (30% de P₂O₅), de muy baja solubilidad, como alternativa para la reducción de costos económicos y ecológicos en cultivos de interés económico.

Materiales y métodos

Condiciones experimentales

Área de estudio. El estudio se realizó en 2013, en el Centro de Investigación Tibaitatá (Corpoica) ubicado en Mosquera (Cundinamarca - Colombia) a una altura de 2543 msnm; localizado geográficamente a 4°41' 43" de latitud norte y 74°12' 30" de latitud oeste.

Material vegetal. Se utilizó para evaluación a nivel de invernadero *Lactuca sativa* cultivar White Boston.

Microorganismos. Las cepas *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp. FR2, UVLO27, LEAV18, K35 y UVLO25 fueron provistas por el banco de microorganismos de trabajo del laboratorio de microbiología de suelo, Corpoica. Estas cepas fueron reactivadas en medio de cultivo King-B (King et al., 1954).

Roca fosfórica (RF). Se utilizó roca fosfórica originaria de Pesca-Boyacá (Colombia) con la siguiente composición: 30% P₂O₅, 40% Ca, 12% Si, 0.1% Mg, 40 ppm Mn, 30 ppm Cu, 10 ppm Mo, 300 ppm Zn y un 3% de humedad.

Caracterización de las cepas

Evaluación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica. La determinación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica se realizó en medio de cultivo líquido SRSM-PR con un tiempo de incubación de 5 d a 30±2 °C a 150 rpm. Los sobrenadantes a partir del cultivo se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. El fósforo soluble en el sobrenadante fue estimado por el método del azul de fosfomolibdato (Fiske y Subbarow 1925).

Síntesis de sideróforos. Se realizó una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en estudio en NaCl 0.85 % a un $OD_{600} = 0.500$. Se tomaron alícuotas de 10 μ L de la suspensión, y se sembraron por triplicado sobre una placa de petri con agar CAS a razón de una microgota por caja, por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 30±2 °C (Schwyn y Neilands, 1987).

Producción de indoles totales. Los compuestos indólicos se determinaron mediante el ensayo colorimétrico descrito por (Glickman y Dessaix, 1995) empleando el medio de cultivo K-lactato suplementado con trip-



tófano a 100 mg/L. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 150 rpm en oscuridad. La lectura se realizó utilizando el reactivo de Salkowsky ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12g/L en H_2SO_4 7.9M) en una relación 1:1 con la suspensión bacteriana, dejándose reaccionar durante 30 min en la oscuridad. La lectura se realizó a una absorbancia de 540 nm.

Evaluación de las cepas en *Lactuca sativa* cultivar White Boston en condiciones de invernadero

Evaluación del efecto de los microorganismos en plantas de *Lactuca sativa* cultivar White Boston bajo condiciones de invernadero. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 5% y etanol 70% (1:1) durante 5 min, seguido de varios enjuagues con agua destilada estéril. Luego fueron pre-germinadas en turba no estéril por tres semanas. Se utilizó un suelo sin esterilizar de pH=5.50, textura franco limoso, 12,23% MO; 2,7 P ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 0,72 K; 1,20 Mg; 2,32 Ca ($\text{Cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Las plántulas se colocaron en materas con capacidad de 4 kg y se inoculó directamente el suelo de cada planta con 5 mL de la suspensión bacteriana correspondiente, a una concentración celular de $1 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ en medio King-B (King et al., 1954). El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero por un período de dos meses. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Se evaluaron ocho tratamientos (tabla 1.).

Tabla 1. Tratamientos evaluados en invernadero

Tratamientos	Identificación
T1-Testigo absoluto	T1
T2-Testigo químico (RF 100%)	T2
T3-FR01+100%(RF)	T3
T4-FR02+100%(RF)	T4
T5-UVLO27+100% (RF)	T5
T6-LEAV18 + 100% (RF)	T6
T7-K35+100%(RF)	T7
T8-UVLO25+100%(RF)	T8

Las variables evaluadas de respuesta vegetal fueron: Longitud de la parte área (cm), longitud radical (cm), masa seca de la parte aérea (g), masa seca de la raíz (g), masa fresca de la parte área (g), masa fresca de raíz (g), área foliar (cm^2) y fósforo foliar (%). Se realizaron dos muestreos destructivos, uno al mes de establecido el ensayo y el otro al finalizar el período de evaluación. El área foliar se determinó con tres hojas por plantas seleccionadas aleatoriamente por cada repetición. Estas hojas fueron luego escaneadas, obteniéndose el área

foliar mediante la utilización de un medidor de área foliar CI-202 Portable Leaf Area Meter (Bio-Science).

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a una evaluación estadística empleando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba HSD de Tukey con un 95% de confianza.

Resultados y discusión

Evaluación cuantitativa de la solubilización de roca fosfórica. Las cepas *Pseudomonas fluorescens* FR1 (26.57 ppm), *Pseudomonas* sp. UVLO27 (25.93 ppm) y LEAV18 (22.79 ppm) presentaron los mejores resultados ($p \leq 0.05$) (tabla 2). Sánchez et al. (2012), reportaron valores superiores de solubilización de fósforo para la cepa *P. putida* de 144.0 ppm, y sugieren también que la capacidad de solubilización está directamente relacionada con la solubilidad de la roca empleada y con el fósforo disponible liberado. Babana et al. (2013) cuantificaron concentraciones de 90.0 ppm de fósforo por *Pseudomonas* sp. BR2 aislada de cultivos de trigo.

Entre los géneros más estudiados como solubilizadores de fosfatos se encuentra el género *Pseudomonas* sp. (Rodríguez y Fraga, 1999). La actividad de este tipo de bacterias no sólo contribuye en la solubilización de fosfatos, sino también intervienen directamente en el incremento de la capacidad de crecimiento de las especies vegetales en las que son inoculadas (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2012). Como ejemplo de estas bacterias benéficas, se tiene *P. aurantiaca* (Rosas et al., 2009), *Pseudomonas fluorescens* (Vikram, 2007), las cuales tienen la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de fuentes inorgánicas insolubles (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2012).

Producción de AIA y Producción de sideróforos. Al evaluar la producción de compuestos indólicos de las cepas en estudio, los mejores resultados fueron obtenidos a partir de las cepas *Pseudomonas* sp. UVLO25 (7.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$), UVLO27 (5.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y K 35 (4.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($p \leq 0.05$) (tabla 2). Varios estudios han reportado que la producción *in vitro* de AIA y otras hormonas fisiológicamente activas derivadas del L-triptófano, son una característica de las PGPR. (Merzaeva y Shirokikh, 2010; Sánchez et al., 2012). El ácido indol-3-acético (AIA) es producido por varios microorganismos del suelo, el cual se conoce como estimulante de la elongación, la división y la diferenciación celular (Khan et al., 2009; González-Mendoza, et al., 2013). Bajo condiciones naturales del suelo, es posible que estos microorganismos sintetizan mayor cantidad de AIA en comparación con cultivos puros en condiciones de laboratorio, posiblemente por efectos sinérgicos con otros microorganismos e interacciones con la materia orgánica del suelo (Sánchez et al., 2005).



La síntesis de sideróforos, se evidenció en las cepas *Pseudomonas* sp. FR2 (2.15 mm), *Pseudomonas* sp. UVLO27 (2.14 mm) y *Pseudomonas* sp. K35 (2.52 mm) (tabla 2.). De acuerdo con Kloepfer et al. (1980) y Farías et al. (1990), estos metabolitos tienen la capacidad de secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que esté disponible para los patógenos. Así, las bacterias del género *Pseudomonas* que sintetizan sideróforos, tienen ventajas en el suelo, al comportándose como controladores de enfermedades. Estudios realizados por Parani y Saha (2012) demostraron que la capacidad de producción de sideróforos es llevada a cabo por especies del género *Pseudomonas* sp. como *P. trivalis* BIHB 745 y *P. fluorescens* 1773/K.

Respuesta vegetal: Altura de las plantas y Longitud de la raíz. Los resultados con relación a la altura de planta mostraron que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el primer mes de muestreo respecto al testigo químico. El tratamiento T3 superó este parámetro en un 107 % (figura 1). En el segundo mes de muestreo no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (figura 1). De acuerdo con lo anterior, es importante tener en cuenta que algunas condiciones abióticas pueden afectar la eficiencia de estos microorganismos, por ejemplo la influencia de las temperaturas o los tipos de suelos y condiciones bióticas como las respuestas sinérgicas antagónicas (Bhattacharyya y Jha, 2012) o el estado fenológico de la planta a la cual están asociados (Piromyou et al., 2011).

En cuanto a la longitud de la raíz no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el primer mes de muestreo respecto al testigo químico. A pesar de esto, los tratamientos T7 y T5 mostraron un aumento respecto al testigo químico de 124 % y 117 % respectivamente. En el segundo muestreo no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto al T2, pero se presentó un incremento del el tratamiento T5 con un 99 %.

La inoculación con bacterias podría mejorar el desarrollo de la planta a través de la producción de los reguladores de crecimiento por los microorganismos en la interface de raíces, estimulando el desarrollo radicular permitiendo una mejor absorción de agua y nutrientes del suelo (Cassán et al., 2011). Existen varios mecanismos por los cuales se puede estimular el crecimiento de las plantas, entre los que se pueden destacar la producción de reguladores de crecimiento, fijación de nitrógeno y la supresión de enfermedades causadas por microorganismos (Egamberdiyeva, 2007; Porcel et al., 2013). Las cepas de *Pseudomonas* sp. aumentaron la longitud de la raíz y elongación en *Lactuca sativa* (Glick et al., 1997). Someya et al. (2008), reportaron promoción de crecimiento en esta planta cuando se utilizó como inoculante bacteriano *P. fluorescens* LRB3W, lo que corrobora su capacidad de crecimiento vegetal y por tanto un alto potencial como biofertilizante.

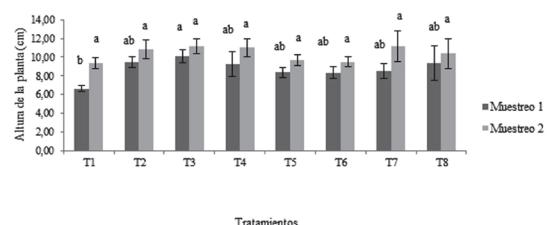


Figura 1. Altura de las plantas de *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$)

Masa seca de la plantas. En el primer mes de muestreo, en la variable masa aérea los tratamientos T3 y T4 presentaron un aumento en la biomasa aérea respecto al testigo químico; sin embargo, no fue estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) (figura 3.). En el segundo mes

Tabla 2. Caracterización de la promoción de crecimiento *in vitro* de las cepas bacterianas.

Cepas Bacteriana	Fósforo disponible (ppm)	Indoles totales ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	Halos Sideróforos (mm)
FR1	26.57 ± 0.24^a	0.33 ± 0.03^d	0.00 ± 0.00
FR2	16.85 ± 4.36^b	3.23 ± 1.28^c	2.15 ± 0.05^b
UVLO27	25.93 ± 4.45^a	5.72 ± 0.56^{ab}	2.14 ± 0.03^b
LEAV18	22.79 ± 1.15^{ab}	0.35 ± 0.06^d	0.00 ± 0.00
K35	5.79 ± 0.29^c	4.45 ± 1.24^{bc}	2.52 ± 0.08^a
UVLO25	16.47 ± 2.69^b	7.08 ± 0.66^a	0.00 ± 0.00

Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$)

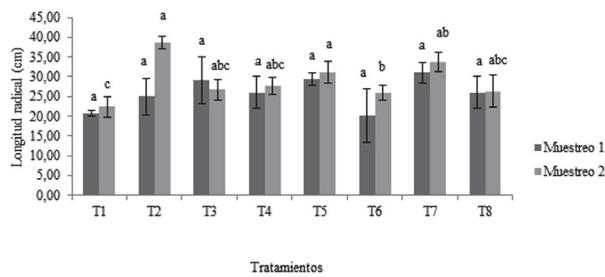


Figura 2. Longitud radical de las plantas de *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$).

de muestreo los tratamientos T3 y T4 presentaron un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 105 % y 102 % respecto a T2 (figura 3).

Con relación a la masa seca radicular en el primer y segundo mes de muestreo los tratamientos con mayores valores, T3 y T4 no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en comparación con el T2; aunque mostraron un aumento de masa seca en un 150 %, 131 %, 103 % y 115 % respectivamente (figura 4).

El aumento de masa seca, mediado por bacterias, es comúnmente reportado como una respuesta a la inoculación, lo que permite un mejor acceso de los nutrientes del suelo a la planta (Sharan y Nehra, 2011). Por otra parte, la capacidad de absorción de las raíces promovida por rizobacterias se basa en la posible conversión de los exudados radiculares en sustancias promotoras de crecimiento vegetal como auxinas y citoquininas (Cassán et al., 2014). En diversos estudios, se ha encontrado que las bacterias del género *Pseudomonas* sp. poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuya principal ventaja es inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares (Diyansah et al., 2014).

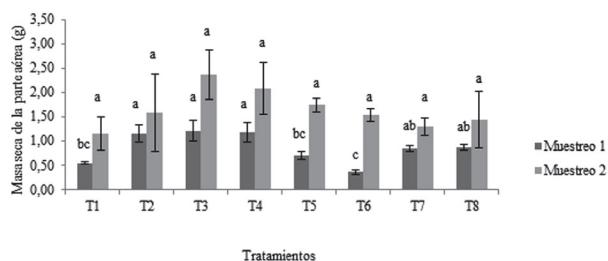


Figura 3. Masa seca de la parte aérea de las plantas *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$).

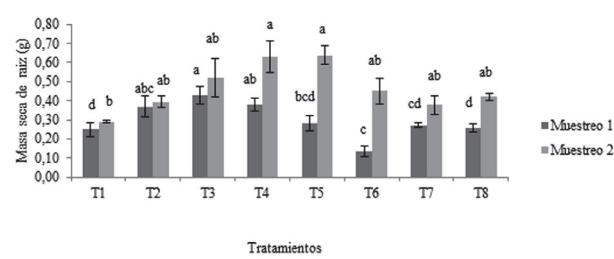


Figura 4. Masa seca de raíz de las plantas *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$).

Área foliar. En el primer mes, el tratamiento T3 presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en comparación con el T2 con un incremento del 115 %. En el segundo mes de muestreo no se presentaron diferencias significativas respecto al T2. De acuerdo con Sharan y Nehra (2011), la inoculación con PGPR en estadios tempranos de desarrollo mejora la producción de biomasa a través de efectos directos en el crecimiento de la raíz y de la plántula. La inoculación de plantas ornamentales, arboles maderables, vegetales y cultivos agrícolas con PGPR puede resultar en múltiples efectos en la fase temprana de crecimiento, como en la potencialización de la emergencia del vástago, salud, vigor, altura y peso de la planta. De igual forma en esta fase temprana el contenido de nutrientes y clorofila aumenta. Lo anteriormente expuesto explica el porqué no hubo diferencias significativas en el segundo muestreo, donde las plantas ya pasan su fase inicial con incrementos posiblemente por el efecto de los microorganismos. Sin embargo, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el T1, evidenciándose un aumento en la respuesta con los tratamientos T4 y T5 en un 204 % y 171 % respectivamente. Teniendo en cuenta que el aumento en área foliar es un indicador de incremento en la tasa de actividad fotosintética en las plantas debido a aumentos en los niveles de contenido de carbono (Taiz y Zeiger, 2010), la cepa FR1 representa una alternativa para posible uso en la promoción de crecimiento en el cultivo de *Lactuca sativa* cultivar White Boston, dada la importancia de esta variable agronómica en la calidad del producto. En diferentes estudios, se ha determinado el efecto positivo de bacterias del género *Pseudomonas* sp. en *Lactuca sativa* sobre la promoción de crecimiento de esta especie (Someya et al., 2008; Kohler, 2006).

Es importante resaltar que la selección de rizobacterias promotoras de crecimiento es bastante crítica debido a que la respuesta de la planta es muy variable dependiendo de la cepa bacteriana, genotipo de la planta y condiciones del experimento en invernadero (Khalid et al., 2009).

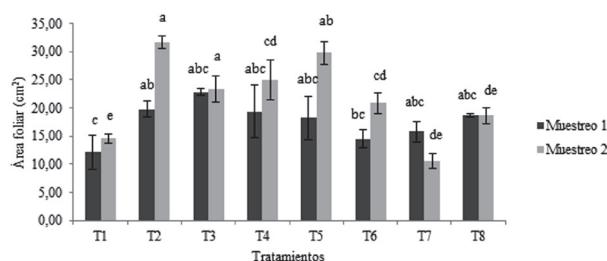


Figura 5. Área foliar plantas *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$)

Fósforo Foliar. Los resultados del porcentaje de fósforo foliar no revelan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en comparación con el T2. Sin embargo, el tratamiento T7 presentó un incremento de 106% respecto al T2 y de 154 % con respecto al testigo absoluto con el primer mes de muestreo. En el segundo mes de muestreo los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al T2; por el contrario, al T4 y T8 presentaron diferencias significativas respecto al T1 de 123 % y 118 % respectivamente. A partir del análisis realizado, se obtuvieron valores de fósforo en tejido foliar entre 0,10 y 0,16% en el primer muestreo y en el segundo muestreo 0,11 y 0,20% (figura 5). De acuerdo con Jones *et al.* (1991), estos valores son considerados bajos. Es importante resaltar que la roca fosfórica es de muy baja solubilización, lo que trae como consecuencia una liberación más lenta (Xiao *et al.*, 2012) y esto puede inferir un efecto residual para los cultivos. En los resultados obtenidos, se evidencian diferencias de tipo numérico entre el primer y segundo muestreo. Con base en lo anterior, sería adecuado evaluar la solubilización de esta fuente en un tiempo mayor o en una siembra posterior.

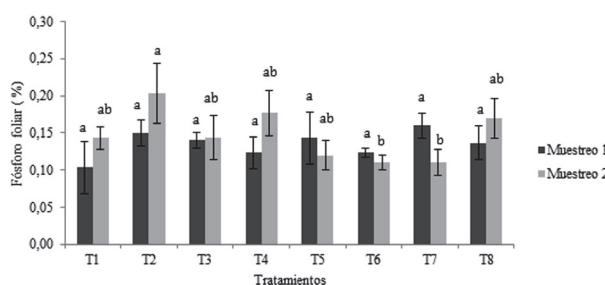


Figura 6. Fósforo foliar de las plantas *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Las barras de error representan la desviación estándar. Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=3$)

Conclusión

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp. UVLO27 y *Pseudomonas* sp. LEAV18 tiene la capacidad de producir ídoles, sideróforos y además solubilizar P de fuentes muy poco solubles como la roca fosfórica y estimuló el crecimiento en las plantas de *Lactuca sativa* cultivar White Boston.

Sin embargo, la absorción de nutrientes, favorecido por este género de bacterias, no es el único factor que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas, factores ambientales como la luz, temperatura y humedad son importantes sobre la respuesta, por ende en esta investigación se mantuvieron condiciones controladas, lo que no indica que hayan sido las condiciones ideales y óptimas durante todo el tiempo del estudio. Se recomienda realizar análisis de fósforo en suelo una vez terminado el período de evaluación de crecimiento y así poder relacionar estos valores con el contenido de fósforo foliar y conocer la dinámica de solubilización de este elemento en el tiempo. Igualmente repetir experimento con los mismos microorganismos en el mismo suelo con la misma especie.

Agradecimientos

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano - Laboratorio de Microbiología de Suelos -CORPOICA.

Referencias bibliográficas

- Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R. 2012. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 26 (2): 191-203.
- Alkhader, A.; Rayyan, A.; Rusan, M. 2013. The effect of phosphorus fertilizers on the growth and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under greenhouse and field conditions. *Journal of Food, Agriculture & Environment.* 11 (2): 777-783.
- Babana, A.; Dicko, A.; Maïga, K.; Traoré, D. 2013. Characterization of rock phosphate-solubilizing microorganisms isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere in Mali. *Journal of Microbiology and Microbial Research.* 1(1):1-6.
- Bhattacharyya, P.; Jha, D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Luna, V. 2011. Chapter 7. Basic and Technological Aspects of Phytohormone production by Microorganisms: *Azospirillum* sp. as a Model of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. En: Maheshwari, D (ed). *Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management.* 141-182.
- Cassán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation.* 33(2): 440-459.
- Diyansah, B.; Aini, L.; Hadiastono, T. 2014. The effect of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* On Leaf Mustard Plant (*Brassica juncea* L.) Infected by TuMV (*Turnip Mosaic Virus*). *Journal of Tropical Plant Protection.* 1(1): 30-38.
- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology.* 36(2): 184-189.



- Elkoca, E.; Turan, M.; Donmez, M. 2010. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* rumbv. phaseoli on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). *Journal of Plant Nutrition*. 33 (14) : 2104-2119.
- Farías, R.; Soriano, E.; Cervantes, C. 1990. Los sideróforos microbianos y su influencia en el desarrollo vegetal. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 56: 662-676.
- Fiske, C.; Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. 66:375-400.
- Flores-Félix, J.; Menéndez, E.; Rivera, L.; Marcos-García, M.; Martínez-Hidalgo, P.; Mateos, P.; Martínez-Molina, E.; Velázquez, M.; García-Fraile, P.; Rivas, R. 2013. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 176(6): 876-882.
- Glick, B.; Changping, L.; Sibdas, G. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology and Biochemistry*. 29:1233-1239.
- Glickman, E.; Dessaux, Y. 1995. A Critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2): 793-796.
- González-Mendoza, V.; Zurita-Silva, A.; Sánchez-Calderón, L.; Sánchez-Sandoval, M. E.; Oropeza-Aburto, A.; Gutiérrez-Alanís, D.; Herrera-Estrella, L. 2013. APSR1 a novel gene required for meristem maintenance, is negatively regulated by low phosphate availability. *Plant Science*. 205: 2-12.
- Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U.; Khalid, R.; Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60(4):579-598.
- Jones, J.; Wolf, B.; Mills, H. 1991. Plant Analysis Handbook: a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Georgia: Micro-Macro Publishing, p. 213.
- Khalid, A.; Arshad, M.; Shahroona, B.; Mahmood, T. 2009. Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Sustainable Agriculture En: Khan, M.; Zaidi, A.; Musarrat, J. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. E-book: Springer Berlin Heidelberg. p. 371.
- Khan, A.L.; Hamayun, M.; Khan, S.A.; Shinwari, Z.K.; Kamaran, M.; Kang, S.M.; Kim, J.G.; Lee, I.J. 2011. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reporgams soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J. Microb. Biotech.* 28(4): 1483-94.
- Khan, M.; Zaidi, A.; Wani, P.; Ahemad, M.; Oves, M. 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: Current Status. En: Khan, M.; Zaidi, A.; Musarrat, J. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. E-book: Springer Berlin Heidelberg. pp.105-132.
- King, E.; Ward, M.; Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresce. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301.
- Kloepper, J.; Leong, J.; Teintze, M.; Schroth, M. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286: 885-886.
- Kohler, J.; Caravaca, F.; Carrasco, L.; Roldán, A. 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use and Management*. 22: 298-304.
- Makoi, J. H.; Chimphango, S. B.; Dakora, F. D. 2010. Elevated levels of acid and alkaline phosphatase activity in roots and rhizosphere of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes grown in mixed culture and at different densities with sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Crop and Pasture Science*. 61(4): 279-286.
- Maseko, S. T.; Dakora, F. 2013. Plant Enzymes, root exudates, cluster roots and mycorrhizal symbiosis are the driver of P nutrition in native legumes growing in P deficient soil of the Cape Fynbos in South Africa. *Journal of Agricultural Science and Technology*. (3):331-340.
- Merzaeva, O.; Shirokikh, I. 2010. The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 46:44-40.
- Omar, S.A. 1997. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14 (2): 211-218.
- Parani, K.; Saha, B. 2012. Prospects of Using Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* as Bio Fertilizer. *European Journal of Biological Sciences*. 4(2): 40-44.
- Pinzon, H.; Laverde, H.; Clavijo, J. 1993. Producción de semilla de Lechuga en Colombia. *Agronomía Colombiana*. 2: 105-113.
- Piromyou, P.; Buranabanyat, B.; Tantasawat, P.; Tittabutr, P.; Boonkerd, N.; Teamuorong, N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*. 47: 44-54.
- Porcel, R.; Zamarreño, Á.; García-Mina, J.; Aroca, R. 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC plant biology* 14 (1): 36.
- Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 17(4): 319-339.
- Rosas, S.; Avanzini, G.; Carlier, E.; Pasluosta, C.; Pastor, N.; Rovera, M. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry*. 41(9): 1802-1806.
- Saharan, B.; Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. 2011:1-30. Disponible online: <http://astonjournals.com/lsmr>.
- Sánchez, D.; Gómez, R.; Garrido, M.; Bonilla, R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3 (7):1401-1415.
- Sánchez, J.; Valencia, H.; Valero, N. 2005. Producción de ácido indolil cético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de Espeletia grandiflora y Calamagrostis effusa del páramo El Granizo. En: Bonilla, M. *Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque alto andino en la cordillera Oriental de Colombia*. Unibiblos. 11: p.177-193.
- Schwyn, B.; Neilands, J. 1987. Universal chemical assays for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160:47-56.
- Someya, N.; Tsuchiya, K.; Sugisawa, S.; Noguchi, M.; Yoshida, T. 2008. Growth Promotion of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by a *Rhizobacterium Pseudomonas fluorescens* Strain LRB3W1 under Iron-Limiting Condition. *Environmental Control in Biology*. 46(2):139-146.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology*. 2010. Edition 5º. (USA): Sinauer Associates, Inc. Publishers. p. 782.
- Toro, M.; Blones, J.; Hernández Valencia, I. 2013. Dinámica del fósforo y actividad biológica en las micorrizósferas de dos ecosistemas adyacentes con vegetación y suelos contrastantes. *Acta Biológica Venezolana*. 21(2): 21-28.
- Vikram, A. 2007. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. *Research Journal of Microbiology*. 2: 550-559.
- Xiao, C.; Chi, R.; Pan, X.; Liu, F.; He, J. 2012. Rock phosphate solubilization by four yeast strains. *Annals of Microbiology*. 63(1): 173-178.
- Yadav, K.; Dadarwal, K. 1997. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. India: Jodhpur. *Scientific publishers*. pp. 293-308.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento Colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

Characterization of a Colombian isolate of *Erinnyis ello* granulovirus (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

Gloria Barrera*, Juliana Gómez**, Paola Cuartas**, Guillermo León***, Laura Villamizar****

Resumen

El gusano cachón *Erinnyis ello* (L.) es una plaga polífaga que puede causar graves pérdidas en cultivos de caucho. El uso de granulovirus representa una alternativa interesante para el control biológico de este insecto. Tres aislamientos colombianos del granulovirus de *E. ello* (EeGV) recuperados en larvas de campo, fueron caracterizados morfológica y molecularmente. Los cuerpos de inclusión de los tres aislamientos presentaron forma ovoide con una única nucleocápside, con tamaño promedio de $302,9 \pm 22 \times 181,5 \pm 16$ nm. El análisis de los perfiles de restricción con diferentes endonucleasas no mostró diferencias entre los tres aislamientos, lo cual sugiere que son muestras de la misma cepa viral, denominada VG010, cuyo tamaño del genoma se estimó en 88,7 Kb. El análisis de las relaciones filogenéticas basado en las secuencias de *lef-8*, *lef-9* y *gran* mostró con alta consistencia la estrecha relación entre VG010 y un aislamiento de EeGV (M34-4) previamente descrito, lo cual sugiere que son variantes genotípicas de la misma especie viral. La eficacia del aislamiento VG010 en condiciones de laboratorio sobre larvas de segundo y cuarto estadio fue de 100 % y 64 % respectivamente, mientras que la concentración letal media (LC_{50}) fue $4,3 \times 10^3$ CI/mL. La productividad viral, osciló entre $2,1 \times 10^9$ y $3,8 \times 10^9$ CI/gramo de larva. Estos resultados representan la base para el desarrollo de un nuevo bioinsecticida para el control de la plaga en campo.

Palabras clave: gusano cachón, baculovirus, control biológico, filogenia.

Abstract

Erinnyis ello (L.) is a polyphagous lepidopteran pest that may cause serious annual losses in the rubber industry. The use of granulovirus represents an interesting alternative as a biological control agent for this insect. Three Colombian isolates of granulovirus for *E. ello* (EeGV) were obtained from field larvae and characterized at morphological, biological and molecular level. Occlusion bodies (OB) of the three isolates showed an oval morphology with a unique nucleocapsid, with a size of $302.9 \pm 22 \times 181.5 \pm 16$ nm. Analysis of DNA endonuclease restriction profiles did not show differences among the three viral isolates, which means that they correspond to samples of the same viral strain, denominated VG010. The VG010 viral genome size was estimated to be approximately 88.7 kb. The analysis of the phylogenetic relationships based on selected gene sequences *lef-8*, *lef-9* and *gran* showed a close relationship between VG010 and the previously described isolate EeGV (M34-4). These sequence similarities suggest that the three isolates are genotypic variants of the same viral species. The *in vitro* efficacy of the VG010 isolate against second and fourth instar larvae was 100 and 64%, respectively, while the mean lethal concentration (LC_{50}) was $4,3 \times 10^3$ OB/mL. The viral productivity ranged between 2.1×10^9 and 3.8×10^9 OB/g of larvae. These results represent the basis to develop a new biopesticide control agent for the pest in the field.

Key words: hornworm, baculovirus, biological control, biopesticide.

Recibido: enero 24 de 2014

Aprobado: octubre 26 de 2014

* Ph.D. Corpóica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. gbarrera@corpóica.org.co. (Autor para correspondencia).

** Microbiólogo. Corpóica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. jagomez@corpóica.org.co. pcuartas@corpóica.org.co.

*** Ph.D. (c). Corpóica. Km 17 Vía Puerto López, Meta. Colombia. gleon@corpóica.org.co

**** Ph.D. Corpóica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. lvillamizar@corpóica.org.co.



Introducción

Erinnys ello (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) es una plaga polífaga con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales de América desde el sureste de Brasil, Argentina y Paraguay hasta el sureste de Estados Unidos (Bellotti et al., 1999). Esta especie posee un amplio rango de hospederos con descripciones en más de 35 plantas diferentes, los cuales incluyen cultivos con importancia económica como tomate, tabaco y algodón, siendo muy frecuentes los ataques a plantaciones de yuca y caucho (Winder, 1976).

En caucho, las larvas de *E. ello* también conocido como gusano cachón, se alimentan inicialmente de las hojas más jóvenes de las plantas y en casos severos de infestación pasan a hojas de mayor edad, causando defoliaciones totales con reducción en la producción de látex. El impacto económico negativo que puede causar la plaga en el cultivo de caucho en Colombia es de gran relevancia, teniendo en cuenta que se encuentra dentro de la apuesta exportadora del país y que sus áreas cultivadas se han incrementado vertiginosamente durante los últimos 10 años. Aproximadamente 40 enemigos naturales de *E. ello* han sido identificados incluyendo parasitoides de huevos y larvas, depredadores en huevos, larvas y pupas, además de hongos, bacterias y virus. Sin embargo, debido al comportamiento migratorio de los adultos, la abundancia de enemigos naturales no previene las explosiones periódicas de la plaga (Bellotti et al., 1992).

Entre los organismos entomopatógenos que afectan este insecto, se encuentra el Granulovirus de *E. ello* (EeGV), el cual presenta alta especificidad y virulencia. El virus EeGV pertenece a la familia Baculoviridae, que incluye el género *Betabaculovirus*, (ICTV, 2012) correspondientes a granulovirus que infectan insectos del orden Lepidoptera. Su ADN es circular de doble cadena, cuyo tamaño se encuentra entre 99 y 178 Kb. Los granulovirus se caracterizan por formar cuerpos de inclusión (CI) proteicos con forma de gránulo y generalmente, un único virión ocluido, lo cual lo protege de las condiciones medioambientales, favoreciendo la transmisión horizontal del virus (Rohrmann, 2010).

La diversidad de los granulovirus ha sido ampliamente estudiada, principalmente en virus que infectan insectos plaga de cultivos agrícolas de importancia económica. Existen varios reportes acerca del análisis con endonucleasas de restricción (REN) de diversos granulovirus y en la actualidad 15 especies tienen secuenciado su genoma completo. El perfil REN es una metodología sencilla, ampliamente utilizada para diferenciar cepas o aislamientos geográficos de Baculovirus (Barrera et al., 2011; Berretta et al., 1998; Escribano et al., 1999), los cuales a pesar de ser de la misma especie pueden variar su perfil REN por mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o delecciones (Erlandson, 2009). Estas diferencias a nivel genómico

frecuentemente influyen en la patogenicidad y la virulencia de los diferentes aislamientos (Cory and Myers, 2003; Erlandson et al., 2007).

Varios aislamientos de EeGV provenientes de cultivos de yuca se han utilizado para el control de *E. ello* en Brasil, Colombia y Venezuela, con eficacias superiores al 90% (Schmitt, 1988). El análisis molecular de un aislamiento colombiano de EeGV demostró diferencias con respecto a otros granulovirus aislados de diferentes especies de insectos (Finnerty et al., 2000) y el análisis REN de diferentes aislamientos de EeGV en una región geográfica de Brasil demostró la presencia de genotipos distintos en diferentes períodos de tiempo (Costa et al., 2005). El objetivo del presente estudio fue caracterizar tres aislamientos colombianos de EeGV, como base para el posible desarrollo de un bioinsecticida para el control del gusano cachón en Colombia.

Materiales y métodos

Cría de insectos de *E. ello*

La cría de larvas de *E. ello* se estableció en condiciones controladas en el Centro de Investigación La Libertad, de Corpocica (Villavicencio, Colombia), utilizando follaje de yuca como fuente de alimentación. En el interior de una casa de malla, se establecieron tres módulos de anjeo de 2m x 3m x 2m, dentro de los cuales se sembraron plantas de yuca en diferentes épocas del año. Se colectaron huevos de *E. ello* en campo y se mantuvieron en cajas plásticas hasta su eclosión. Las larvas neonatas se ubicaron en recipientes plásticos dotados de la fuente alimenticia y se mantuvieron hasta que alcanzaron el segundo estadio bajo condiciones de laboratorio (28 °C y Humedad relativa 75 %). Para completar las fases siguientes de desarrollo del insecto, las larvas se ubicaron sobre las plantas de yuca mantenidas en casa de malla. Las pupas formadas se colectaron en cajas plásticas con aserrín, hasta la emergencia de los adultos, los cuales se confinaron en los módulos de anjeo con plantas de yuca para cumplir en ellas sus etapas de cópula y oviposición.

Propagación y purificación viral

Tres aislamientos virales se multiplicaron en larvas de tercer estadio (L3) de *E. ello*. Para tal fin, se inocularon 10 hojas de yuca mediante la aspersión de 10 mL de una suspensión viral ajustada a 1×10^7 CI/mL. Cada hoja se introdujo en un frasco de vidrio y se infestó con 10 larvas sanas de *E. ello* provenientes de la colonia en laboratorio, los cuales se incubaron a 28 °C y Humedad relativa 75 %. Diariamente se recolectaron las larvas muertas en cada tratamiento, se codificaron y se procedió a la extracción de los CIs. Para la purificación de los CIs, las larvas muertas por granulovirus se homogenizaron con agua destilada en proporción



1:1 (1 mL de agua por cada gramo de larva) y la mezcla obtenida se filtró a través de una muselina para retirar restos de tejido del insecto. Los Cls se purificaron siguiendo la metodología descrita por Caballero et al. (1992) y se resuspendieron en agua ultrapura, para su posterior cuantificación por espectrofotometría con extrapolación del resultado en una curva de calibración previamente estandarizada.

Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica, los tres aislamientos de EeGV fueron procesados para su observación bajo el microscopio electrónico de transmisión. Se fijaron 100 μ L de suspensión viral con igual volumen de fijador (formaldehido 4 %, glutaraldehido 1 % en tampón fosfato pH 7,4). Las muestras se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con resina Fomvar y se realizó una tinción negativa con ácido fosfatúngstico al 2 % para su observación en un microscopio electrónico Philips CM10. El tamaño de los cuerpos de inclusión se determinó mediante el programa NIS-elements (Nikon).

Caracterización molecular

Para la extracción de ADN viral se tomó una suspensión purificada de Cls (1×10^8 Cls/mL) a la cual se añadió 2,5 vol. de agua, 1 vol. de Na_2CO_3 (0,5 M, pH 7,2) y 0,5 vol. de SDS (10 %) y se incubó durante 10 min. a 60°C. La muestra se centrifugó a 2500 g durante 5 min. y se recogió el sobrenadante que contenía los viriones. Se añadieron 50 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó durante 30 min. a 50°C. La extracción del ADN se realizó mediante dos pasos con fenol-cloroformo y la posterior precipitación con etanol. El ADN precipitado se resuspendió en 200 μ L de tampón TE 0,1x (Tris-EDTA) y el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría.

Para realizar los perfiles de restricción, se utilizaron 2 μ g de ADN viral para la digestión con las enzimas *Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Bg*II y *Kpn*I (Takara, Shiga, Japán) durante 4-12 horas a 37 °C. Las reacciones se mezclaron con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, sacarosa 40% p/v) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M y EDTA 0,001 M). La electroforesis se realizó a 20 Voltios durante 12 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en luz UV (Chemidoc, BioRad, California, USA). Para el análisis de los tamaños de los fragmentos generados se utilizó el programa QuantityOne versión 4.2.1 de Biorad.

Amplificación y secuenciación genes *gran*, *lef-8* y *lef-9*

Se amplificaron fragmentos parciales de los genes *gran*, *lef-8* y *lef-9* utilizando parejas de cebadores degenerados. Para el gen *gran* se utilizaron los cebadores directo

Gran-F (5'-ATGGGATAYAAYAAWCDYT-3') y reverso Gran-R (5'-TYARTANGCBGGDCCVGTRAA-3') (Barreira et al., 2009). Para *lef-8* se utilizaron los cebadores prL8-1 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCCAYGGHGARTGAC-3') y prL8-2 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCAYR-TASGGRTCYTCSGC-3'), para *lef-9* se utilizaron los cebadores prL9-1 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCAA-RAAYGGITAYGCBG-3') y prL9-2 (5'-TGTAAAACGACGCCAGTTGTCDCCRTCRCARTC-3) (Jehle et al., 2006). El programa de amplificación por PCR consistió de un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 4 min y 35 ciclos así: 95 °C por 30 seg, anillamiento a 52 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 seg. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Cada 25 μ L de reacción de PCR contenían 50-100 ng de ADN genómico, dNTPs 200 μ M, 0,5 μ M de cada cebador, MgCl_2 2,0 mM y tampón 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 9,0, 0,1% Nonidet). La reacción se llevó a cabo con 2U de Taq polimerasa (Promega M1665). Se verificó cada producto de amplificación mediante gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-safe (Invitrogen). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados directamente para las dos hebras.

Análisis filogenético

Las secuencias parciales de nucleótidos de los tres genes secuenciados (*gran*, *lef-8* y *lef-9*) se alinearon independientemente con secuencias homólogas de 26 granulovirus depositadas en el Genbank, mediante el programa CLUSTAL W (Larkin et al., 2007). Los alineamientos de las secuencias se concatenaron y analizaron mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura et al., 2011). Para el cálculo de la distancia genética se utilizó el modelo de substitución nucleotídica Kimura-2 parámetros (Tamura et al., 2011). Se construyó un fenograma de relaciones filogenéticas basado en las secuencias peptídicas concatenadas de los tres genes secuenciados.

Perfil de proteínas SDS-PAGE

Se tomaron 7 μ L de viriones de una suspensión de 10^9 Cls/mL y se mezclaron con 5 μ L de tampón de carga (Tris-HCl 125 mM; SDS 2%; pH 6,2; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,004 % y 2-mercaptoetanol 5 %). La mezcla se calentó hasta ebullición durante tres minutos. Posteriormente, las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturizante (grado 10-12 %), corrido a 80 v durante 4 h. La tinción de las bandas de proteínas se realizó con azul brillante de Commassie 0,1 % (Laemmli, 1970).

Caracterización biológica

Se determinó la patogenicidad en términos de concentración letal media del aislamiento VG010 mediante un bioensayo en laboratorio. A partir de virus purifi-



cado se prepararon suspensiones ajustadas a cinco concentraciones desde 2×10^4 hasta 2×10^8 Cl/mL, empleando una curva de calibración estandarizada previamente (Datos no mostrados). Se tomaron 200 μL de cada suspensión y se mezclaron con 200 μL de una solución de sacarosa al 4% con un colorante azul de alimentos Tuska® (Azul No. 1 y Azul No. 2) al 1%. Con cada concentración se inocularon 24 larvas neonatas de *E. ello* colocadas previamente en una copa plástica de 2 onzas siguiendo el método de la gota descrito previamente por Hughes y Wood (1981). Para la inoculación de los insectos, se dispensaron gotas de 2 μL dentro de cada copa y se esperó hasta que la larva bebió la suspensión de virus, lo que se evidenció por la coloración azul en el cuerpo de la larva como consecuencia de la ingestión del tratamiento (virus + solución colorante). Una vez se observó la coloración azul en el cuerpo de las larvas, se alimentaron con un fragmento de hoja de yuca previamente desinfectada (NaClO al 0,5%). Se contó con un testigo absoluto correspondiente a larvas neonatas alimentadas con dieta natural sin aplicar ningún tratamiento. Las larvas se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio (28 °C y 75 % HR). La mortalidad de las larvas se registró a los siete días después del montaje del bioensayo. Las larvas muertas se recolectaron y almacenaron a -20 °C. El diseño experimental fue completamente al azar y con cuatro repeticiones por tratamiento, cada una compuesta por 6 larvas. Los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis Probit (Finney, 1952) mediante el programa BioStat (2007) para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y noventa (CL₉₀).

Se determinó la productividad del aislamiento VG010, como el promedio de Cls producidos por gramo de peso larval. Para tal fin, se tomaron hojas de yuca y se asperjaron con una suspensión viral ajustada a $7,2 \times 10^7$ Cls/mL, utilizando un volumen de 1 mL por hoja. Las hojas inoculadas fueron dispuestas en recipientes plásticos de 4 L y se infestaron con 30 larvas de *E. ello* de tercer estadio provenientes de la cría. Los recipientes se incubaron bajo condiciones controladas de humedad (75 %) y temperatura (28 °C). Cada larva muerta por infección viral fue pesada individualmente, macerada y diluida en un volumen de agua estéril conocido. Las suspensiones virales se pasaron por una capa de muselina para retirar los restos de tejido larval. A partir del filtrado obtenido se realizaron diluciones para su cuantificación a 280 nm, con un espectrofotómetro Nanodrop®. La concentración viral se estimó por extrapolación de las mediciones en una curva de calibración previamente estandarizada.

Se determinó la eficacia de VG010 bajo condiciones de laboratorio, en larvas de segundo (L2) y cuarto estadio (L4). Cinco hojas de yuca, previamente asperjadas con una suspensión de VG010 (7.2×10^7 Cls/mL) se colocaron en un recipiente de vidrio y se infestaron con 10 larvas, lo cual se tomó como unidad experi-

mental. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Se contó con un tratamiento control consistente en larvas alimentadas con hojas sin inocular. La evaluación de mortalidad se realizó 3 y 5 días después de la inoculación. La mortalidad en los tratamientos fue corregida con respecto al testigo mediante el cálculo del porcentaje de eficacia utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947).

$$\text{Eficacia} = ((A-B)/(100-B)) \times 100$$

donde, A es la mortalidad larval obtenida en el tratamiento y B es la mortalidad obtenida en el control negativo.

La eficacia en campo se determinó en una plantación comercial de caucho (MAVALLE S.A), en un área de 16,4 ha y con presencia de larvas de *E. ello* entre primer y tercer estadío. Se asperjaron 2.9×10^7 Cls/ha del aislamiento viral VG010, suspendidos en 250 L de agua, mediante una pulverizadora Jacto AJ-401LH. El diseño fue completamente al azar y cada unidad experimental consistió en 4 surcos, cada uno con 50 árboles, de los cuales se escogieron 20 árboles al azar con presencia de larvas para hacer los muestreos. De los 20 árboles por repetición, 18 se evaluaron en el tercio medio del árbol y 2 en el tercio superior, contabilizando la población natural de larvas vivas antes de la aplicación. Posteriormente se contabilizó el número de larvas vivas y el número de larvas muertas con sintomatología viral, 1, 3 y 5 días después de la aplicación. El tratamiento control se realizó sobre un área de 2 ha, en la cual no se aplicó virus. Los resultados fueron transformados mediante la fórmula Henderson y Tilton (1955) para el cálculo de la eficacia.

Resultados y discusión

Caracterización morfológica

Los cuerpos de inclusión presentaron forma típica de gránulo con un único virión interno. El tamaño de los gránulos fue de $302,9 \pm 22 \times 181,5 \pm 16$ nm sin presentarse diferencias significativas entre los tres aislamientos de EeGV analizados ($P > 0,05$). La morfología y el tamaño coincide con lo observado por Finnerty y colaboradores (2000) en un aislamiento colombiano recuperado en plantas de yuca (figura 1)

Caracterización molecular

Los perfiles de restricción de los tres aislamientos de granulovirus de *E. ello* fueron similares, sin diferencias evidentes en el tamaño y número de bandas generadas, por lo cual se consideraron pertenecientes a la misma cepa viral, la cual se denominó VG010. Los perfiles de restricción con diferentes enzimas mostraron entre 6 y 16 fragmentos de diferente tamaño, los cuales se designaron alfabéticamente asignando la letra A a los de mayor tamaño para cada endonucleasa (figura

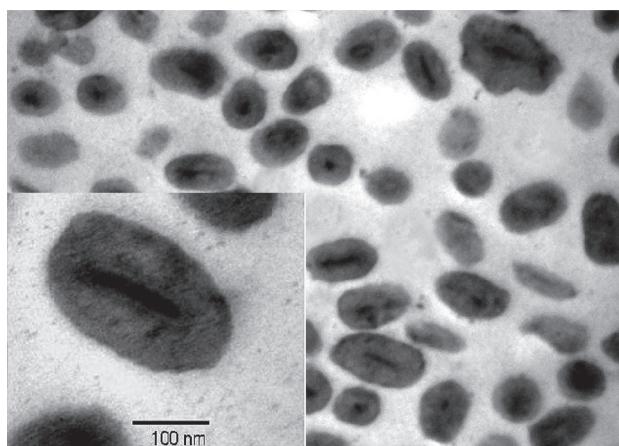


Figura 1. Micrografía electrónica de gránulos de un aislamiento colombiano de EeGV. La micrografía interna muestra en mayor aumento un gránulo con único virión interno y barra de 100 nm de longitud.

2; tabla 1). Los fragmentos con migración similar se detectaron por la intensidad de la banda generada y se encontraron en los perfiles generados con *PstI* (A-B y C-D), *HindIII* (A-B), *BgIII* (A-B y E-F) y *EcoRI* (C-D). De acuerdo con lo anterior se calculó el tamaño del genoma total de aproximadamente 88,7 Kb, el cual es pequeño, comparado con los tamaños de los betabaculovirus secuenciados a la fecha y similar al estimado por perfiles REN para otro aislamiento de granulovirus de *E. ello* proveniente de Colombia (Finnerty et al.,

2000). Las diferencias entre el aislamiento VG010 y el aislamiento previamente publicado se presentaron en el número y tamaño de bandas generadas con las enzimas *KpnI*, *EcoRI* y *HindIII*, lo que sugiere que se trata de variantes genotípicas de la misma especie viral. Trabajos previos con perfiles de restricción en baculovirus han servido para determinar la diversidad genética entre aislamientos de la misma especie que provienen de diferentes regiones geográficas e inclusive para determinar la variedad genotípica en aislamientos de un solo individuo hospedero (Barrera et al., 2011; Rowley et al., 2010). La diversidad genética observada entre los aislamientos de EeGV puede ser resultado de procesos de recombinación en eventos de infección múltiple o podría ser resultado de la deriva genética por mutaciones durante el ciclo infeccioso y puede ser la fuente para la selección natural, debido a que los cambios en el genoma producen cambios en patogenicidad y virulencia (Erlandson, 2009).

Para analizar las relaciones filogenéticas del aislamiento VG010 se secuenciaron regiones de tres genes altamente conservados en baculovirus, *gran*, *lef-8* y *lef-9* (Jehle et al., 2006). El tamaño de la secuencia obtenida para el gen *gran* fue de 735pb, representando el 100% del gen, mientras que los fragmentos secuenciados de *lef-8* y *lef-9* fueron de 785 y 311 pb respectivamente, similares al tamaño de los fragmentos obtenidos con los mismos cebadores en otros granulovirus (Jehle et al., 2006).

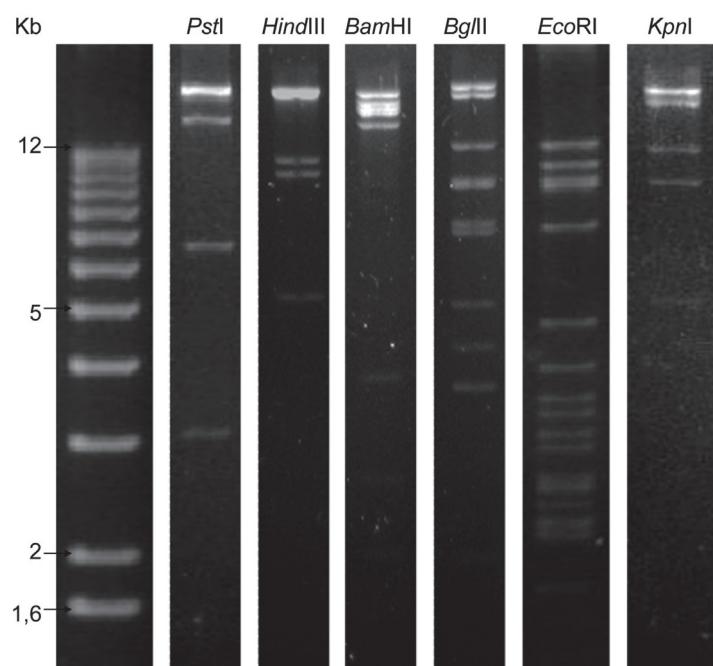


Figura 2. Perfiles de restricción de un aislamiento Colombiano de EeGV (VG010) con las endonucleasas *PstI*, *HindIII*, *BamHI*, *BgIII*, *EcoRI* y *KpnI* como se indica en la parte superior de cada carril. En el primer carril se indica el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).



Tabla 1. Tamaños estimados de los fragmentos de restricción generados por la digestión del ADN genómico de un aislamiento Colombiano de EeGV (VG010) con las endonucleasas *PstI*, *HindIII*, *BgIII*, *EcoRI*.

Frag- mento	Fragmentos de restricción			
	<i>PstI</i>	<i>HindIII</i>	<i>BgIII</i>	<i>EcoRI</i>
A	17.900	22.064	15.921	14.750
B	17.369	22.000	14.280	11.740
C	17.200	20.226	8.814	10.070
D	17.000	9.345	7.081	10.000
E	11.120	9.514	7.000	7.548
F	5.490	4.614	7.000	4.781
G	2.594		5.768	4.000
H			5.700	3.583
I			5.572	3.363
J			4.126	3.129
K			3.553	2.974
L			3.077	2.650
M				2.529
N				2.423
O				2.244
P				2.200
Total	88.673	87.763	87.892	87.984

Las principales diferencias entre los aislamientos de granulovirus de *E. ello* M34-4 (Jehle et al., 2006) y VG010 se encontraron en la secuencia del gen *lef-8*, donde se observaron 11 substituciones no sinónimas. El gen *gran* presentó un alto grado de conservación

entre los dos aislamientos, con sólo tres substituciones sinónimas presentes. Debido a su alto grado de conservación y por ser la proteína mayoritaria dentro del género betabaculovirus, la granulina ha sido de gran utilidad para el desarrollo de sistemas de detección por técnicas moleculares (Barrera et al., 2011) e inmunoenzimáticas (Parola et al., 2003). Adicionalmente, los genes *lef-8*, *lef-9* y *gran* son de gran utilidad para la inferencia filogenética basada en las distancias genéticas (Jehle et al., 2006). Existe un límite establecido de 0,015 como la mayor distancia existente entre dos aislamientos para ser considerados de la misma especie. En contraste, distancias superiores a 0,050 se consideran de diferente especie (Jehle et al., 2006). En el presente trabajo, las distancias genéticas entre los aislamientos VG010 y M34-4 fueron bajas (0,014), por lo cual se puede sugerir que son variantes genotípicas de la misma especie. De forma similar, se observó que aislamientos pertenecientes a la misma especie de hospedero como los granulovirus de *Agrotis segetum*, *Adoxophyes orana* y *Cydia pomonella* presentaron distancias bajas (<0,01) (tabla 2).

Las diferencias genéticas entre aislamientos de baculovirus se relaciona con el tipo de planta de la cual se alimenta el insecto hospedero (Hodgson et al., 2002). La distancia genética entre VG010 y M34-4 indica que existen diferencias genéticas para ser considerados cepas diferentes, lo cual podría relacionarse con el tipo de cultivo de sus hospederos originarios. El aislamiento VG010 fue obtenido de larvas colectadas en un cultivo de caucho, mientras que el aislamiento M34-4 proviene de larvas colectadas en un cultivo de yuca. El cladograma de relaciones filogenéticas basado en las secuencias concatenadas de las proteínas granulina, *lef-8* y *lef-9* mostró una topología compatible con la descrita para baculovirus por otros autores con estos tres genes (Jehle et al., 2006) y con 31 genes núcleo (Miele et al., 2011) (figura 3). El granulovirus de *E. ello* VG010 se agrupó en un clado junto con el aislamiento

Tabla 2. Matriz de distancia de las secuencias de nucleótidos de los genes concatenados *gran*, *lef-8* y *lef-9* calculados en MEGA (Modelo Kimura-2 parámetros). Valores en gris son considerados aislamientos de la misma especie.

Aislamientos	1	2	3	4	5	6	7	8
1 ErelGV_VG010	0	0,014	0,355	0,355	0,355	0,311	0,311	0,311
2 ErelGV_(M34-4)	0,014	0	0,344	0,344	0,344	0,294	0,294	0,294
3 AgexGV_(S46)	0,355	0,344	0	<0,01	<0,01	0,359	0,359	0,359
4 AgseGV_(A17-5)	0,355	0,344	<0,01	0	<0,01	0,359	0,359	0,359
5 AgseGV_(S47)	0,355	0,344	<0,01	<0,01	0	0,359	0,359	0,359
6 CpGV_(A11-2)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0	0,001	0,001
7 CpGV_(M39-1)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0,001	0	<0,01
8 CpGV_(A6-4)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0,001	<0,01	0

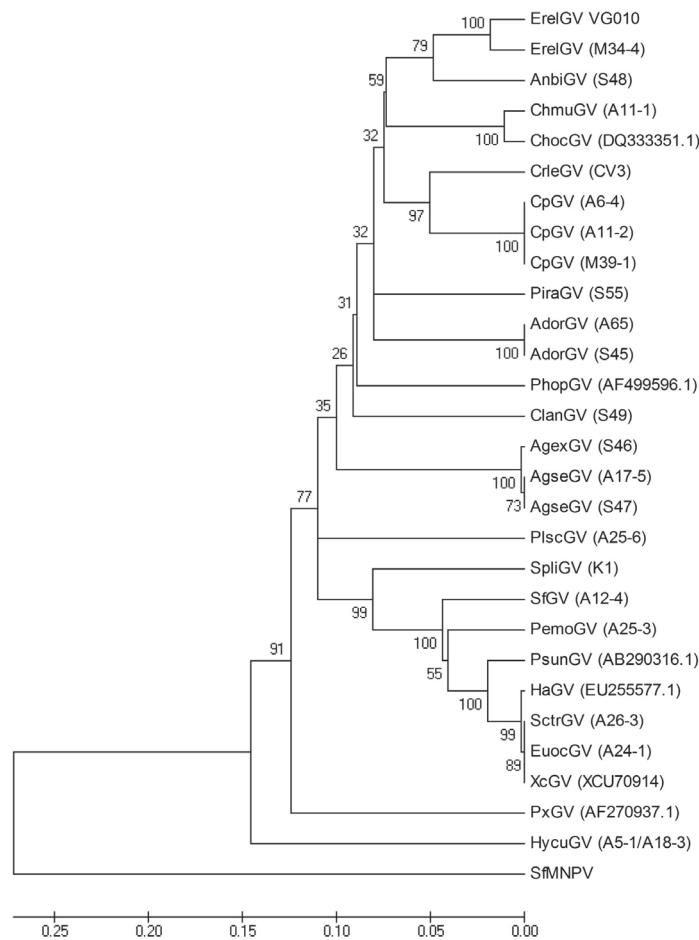


Figura 3. Cladograma de relaciones filogenéticas (UPGMA) basado en secuencias proteicas concatenadas de granulina, lef-8 y lef-9. El número encima de cada nodo indica el valor de bootstrap (1000 réplicas).

M34-4 con un alto valor de soporte (100%). A su vez, los granulovirus de *E. ello* (Sphingidae) se agruparon con granulovirus de *Andracia bipunctata* (Bombycidae) con alto valor de soporte (79%).

El perfil de proteínas del granulovirus de *E. ello* VG010 evidenció una banda intensa con peso molecular de 34,50 kDa similar a la observada en el perfil proteico de un aislamiento del granulovirus de *P. operculella* (figura 4). El tamaño y la intensidad de la banda generada coincide con la proteína granulina, mayoritaria en el género betabaculovirus, la cual oscila entre 29 a 38 kDa (Caballero et al., 2001). El perfil proteico de un aislamiento colombiano del granulovirus *E. ello* previamente descrito, presentó 10 bandas de diferente tamaño, una de ellas en mayor cantidad correspondió a la granulina, con un tamaño similar al encontrado en VG010 (Finnerty et al., 2000). Esta proteína altamente conservada ha sido descrita en perfiles proteicos de diferentes granulovirus (Sciocco-Cap et al., 2001). Adicionalmente, en VG010 se observaron proteínas de mayor tamaño y menor concentración, similares a las

descritas por Finnerty et al., (2000) para un aislamiento de EeGV, una de ellas con tamaño (37 kDa) compatible con una proteína de cápside viral.

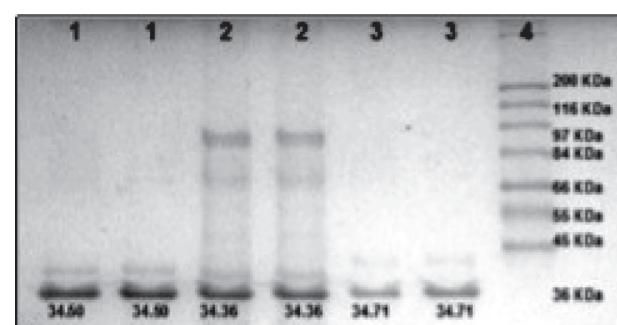


Figura 4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida. Carriles 1 corresponden al granulovirus de *Erinnyis ello* VG010, carriles 2 corresponden al granulovirus de *Erinnyis ello* VG011, carriles 3 corresponden al granulovirus de *Phthorimaea operculella* VG003 y carril 4 presenta el marcador de peso molecular.



Caracterización biológica

Patogenicidad

Los valores de P obtenidos del análisis Probit fueron superiores a 0,05 (tabla 3), lo cual sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis viral y la mortalidad de las larvas. Adicionalmente, los bajos valores de Chi-cuadrado (χ^2) indican homogeneidad entre los datos, es decir que la distribución experimental se ajustó a la teórica (Zar, 1999) (tabla 3).

Bajo las condiciones experimentales evaluadas en este estudio, la mortalidad de las larvas se afectó por la concentración viral utilizada, siendo la concentración letal media (CL_{50}) de $4,3 \times 10^3$ Cl/mL y la concentración letal noventa (CL_{90}) de $5,5 \times 10^4$ Cl/mL (tabla 3). En todos los tratamientos inoculados con el virus se observaron larvas con síntomas típicos de infección por granulovirus como cambio en la coloración, pérdida de movimiento y de alimentación, pérdida de turgencia en el cuerpo de la larva y ruptura de la epidermis, al igual que lo reportado por otros autores para este virus (León et al., 2010).

Aunque en la literatura no se han reportado valores de concentraciones letales de aislamientos de granulovirus de *E. ello*, si se encuentran datos de otros aislamientos de granulovirus sobre larvas de otros lepidópteros. Sciocco-Cap et al., (2001) utilizando una técnica de bioensayo similar a la de este trabajo, encontraron valores de CL_{50} entre 4 y $5,6 \times 10^3$ Cl/mL empleando un aislamiento de granulovirus de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) sobre larvas de este insecto; estos valores de CL_{50} fueron similares a lo encontrado en este trabajo. Por el contrario, para la mayoría de aislamientos de granulovirus como los de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) se han encontrado rangos más altos con valores de CL_{50} de $6,9 \times 10^5$ Cl/mL, $3,6 \times 10^6$ Cl/mL y $3,4 \times 10^6$ Cl/mL, respectivamente (Espinel-Correal et al., 2009; Hatem et al., 2011).

Las variaciones de CL_{50} entre aislamientos de granulovirus de diferentes especies de insectos plaga se puede deber principalmente al hospedero y por ende a la adaptación del virus al mismo; adicionalmente dentro del género betabaculoviridae donde se encuentran los granulovirus de lepidópteros (Jehle et al., 2006), se

agrupan tres tipos de virus diferentes según el tipo de infección que ocasionen y los tejidos susceptibles del insecto a la infección; estas variaciones en el proceso de infección repercuten directamente en la patogenicidad y en la virulencia del aislamiento viral (Caballero et al., 2001; Rohrmann, 2010; Wang et al., 2008).

Las cepas de alta patogenicidad como VG010 poseen ventajas como agentes de control y serían muy adecuadas para el control de plagas en cultivos de ciclo anual. Sin embargo, la patogenicidad no puede ser considerada de forma aislada, pero sí relacionada con otros aspectos del ciclo de vida del patógeno, como su tasa de transmisión y su capacidad de persistir en el ambiente (Caballero et al., 2001).

Productividad

Se determinó la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos por gramo de tejido larval con el aislamiento de granulovirus VG010, la cual osciló entre $2,1 \times 10^9$ y $3,8 \times 10^9$ Cls/g. El resultado obtenido en el presente trabajo coincide con lo descrito por Hodgson y colaboradores (2001), quienes concluyeron que para la mayoría de larvas de lepidópteros infectadas por un virus de la familia Baculoviridae, el rendimiento promedio es de 10^9 Cls/g de larvas, presentándose la invasión de una gran variedad de tejidos del hospedero durante el ciclo de infección. Teniendo en cuenta que una larva de último estadio de *E. ello* puede pesar aproximadamente 7 g, una sola larva podría producir más de 10^{10} Cls, valor significativamente alto si se compara con los valores descritos para los granulovirus de otras especies de polillas como *P. operculella* para la cual la producción fue de $2,35 \times 10^9$ Cls/larva (Zeddam et al., 2003) y *Tecia solanivora* para la cual la productividad se ha estimado en 1×10^9 Cls/larva (Gómez et al., 2009). Esta alta productividad representa una ventaja desde el punto de vista tecnológico para el desarrollo de un bioplaguicida (Vásquez et al., 2002), ya que una de las principales limitantes de estos bioplaguicidas es la producción del virus a gran escala y a un costo aceptable, teniendo en cuenta que la producción se hace *in vivo* sobre el hospedero susceptible (Caballero et al., 2009), actividad altamente demandante de mano de obra que incrementa los costos del ingrediente activo. Por otra parte, la alta productividad viral mejora el potencial económico de un bioplaguicida, ya que reduce el número de insectos necesarios para producir una dosis de aplicación

Tabla 3. Concentración letal media CL_{50} Cl/mL y noventa CL_{90} Cl/mL del aislamiento de granulovirus de *E. ello* VG010.

Aislamiento	CL50 (Cl/mL)	Límites de confianza de la CL50 95% (Cl/mL)		CL90 (Cl/mL)	P	Heterogeneidad	
		Inferior	Superior			χ^2	gl
VG010	$4,3 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	0,99	0,0485	3



en campo (Grzywacz et al., 2001) y esto disminuye también el precio del producto por unidad comercial.

El rendimiento de un virus se ve afectado por muchos factores involucrados en el ciclo de infección sobre el insecto hospedero como el tiempo letal y la virulencia (Kamiya et al., 2004). Por ejemplo, Cherry y colaboradores (2002) evaluaron entre otros factores, el rendimiento de un granulovirus en larvas de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), encontrando que a pesar de la alta patogenicidad del aislamiento de granulovirus empleado, la cual fue reflejada en la dosis letal media, los rendimientos fueron bajos posiblemente debido a la reducción de los tiempos de mortalidad. Al igual que el tiempo letal, la dosis proporcionada a las larvas y el aumento del peso y el tamaño inicial, son factores que pueden afectar el rendimiento del virus, obteniéndose menores rendimientos cuando el insecto se infecta consumiendo altas concentraciones virales debido a que su muerte ocurre más rápidamente (Boucias et al., 1980; Hodgson et al., 2001).

Otros factores importantes en la productividad viral están relacionados con el sistema de propagación, en el cual se debe tener en cuenta la dosis de inoculación, la edad de las larvas, el tiempo de recolección y la temperatura de incubación de las larvas, entre otros (Caballero et al., 2001; 2008). En un estudio realizado por Grzywacz y colaboradores (1998), en el cual se optimizó el sistema de producción del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), determinaron que uno de los factores más importantes para la productividad viral es el momento de la recolección de las larvas, el cual se encuentra relacionado con la cantidad máxima de producción de partículas virales y con la presencia de altos niveles de contaminación bacteriana cuando esta actividad se realiza después de la muerte del insecto.

Con respecto a la temperatura, éste es un factor que influencia tanto el crecimiento de las larvas como la replicación del virus y su capacidad infectiva (Sajap et al., 2007), por tal razón este factor se debe controlar para aumentar la productividad, siendo recomendada una temperatura de incubación entre 25 °C y 28 °C después de la inoculación con el virus (Subramanian et al., 2006).

En el caso del granulovirus de *E. ello*, a pesar del gran tamaño de las larvas que permiten obtener grandes cantidades de virus, es necesario estandarizar las condiciones tanto de cría masiva del insecto como de producción viral con el fin de aumentar la productividad y disminuir los costos, factores claves en la viabilidad económica de un producto comercial.

Evaluación de eficacia en laboratorio

Los resultados de eficacia (mortalidad corregida) en condiciones de laboratorio se muestran en la figura 5,

donde se puede observar que se presentó una mayor mortalidad de larvas cuando éstas fueron inoculadas en segundo estadio (L2) en comparación con la mortalidad obtenida con larvas de mayor edad (L4) (figura 5). La mortalidad de individuos a los tres días después de la infección fue del 23% para larvas L2 y del 20% para larvas L4. Cinco días después de la inoculación estos valores aumentaron alcanzando el 100% para larvas L2 y el 64% para larvas L4.

La mayor susceptibilidad de larvas más jóvenes a la infección viral ha sido descrita por otros autores como Schmitt (1988), quien recomendó la infección de larvas en segundo y tercer estadio para asegurar la infección eficiente de las mismas. Las diferencias en susceptibilidad a los baculovirus dependiendo de la edad de las larvas también han sido evidenciadas en varios trabajos (Hochberg, 1991; Sporleder et al., 2007; Teakle et al., 1986) y para otros patógenos de este insecto como la bacteria *Bacillus thuringiensis* (CIAT, 1989).

En trabajos realizados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en los años 80s se obtuvieron resultados similares a los del presente estudio en laboratorio, alcanzándose un 100% de mortalidad de larvas de los primeros estadios, tres días después de la inoculación del sustrato de alimentación consistente en hojas de yuca (CIAT, 1989). La mortalidad de las larvas aumentó progresivamente a medida que pasó el tiempo después de la inoculación. Se obtuvo una eficacia significativamente superior a los cinco días después de la inoculación con respecto a las mediciones anteriores, tanto para larvas en segundo como en cuarto estadio ($F=94,2$; $P=0,0001$; $gl=17$). La rápida mortalidad de las larvas infectadas con este virus, que alcanza el 100% a los cinco días de la inoculación de larvas L2, demuestra una alta virulencia, en comparación con granulovirus de otras especies que requieren un mayor tiempo para evidenciar su letalidad. Por ejemplo, un aislamiento del granulovirus de *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae) mostró un tiempo letal medio de 37 días en larvas de primer estadio según lo determinaron Hilton y Winstanley (2008). Para el granulovirus de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) también se han establecido tiempos letales medios prolongados que oscilan entre 15 y 27 días dependiendo de la edad de larvas al ser inoculadas (Hatem et al., 2011). En el caso del granulovirus de *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) se estimaron tiempos letales medios entre 15 y 21 días dependiendo de la calidad de la dieta de alimentación (McVean et al., 2002).

Las cepas muy virulentas naturalmente poseen ventajas como agentes de control y serían muy adecuadas para el control de plagas en cultivos de ciclo anual. Sin embargo, la virulencia no puede ser considerada de forma aislada, pero sí relacionada con otros aspectos del ciclo de vida del patógeno, como su tasa de

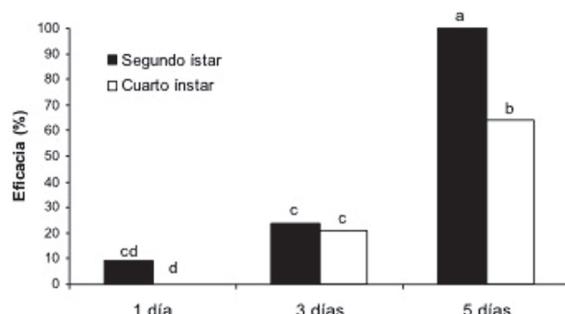


Figura 5. Eficacia en laboratorio del aislamiento VG010 de EeGV sobre larvas del gusano cachón, diferentes días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según DMS (95%).

transmisión y su capacidad de persistir en el ambiente (Caballero *et al.*, 2002).

Evaluación de eficacia en campo

En las evaluaciones realizadas en cultivos de caucho después de aplicar el aislamiento de granulovirus VG010 se encontraron larvas con sintomatología típica de la infección (Figura 6), la cual se caracteriza por la presencia de larvas muertas colgando de las ramas por sus pseudopatas anales y evidenciando un tegumento frágil con licuefacción de los tejidos internos (Mukhopadhyay and Dev, 2009).

Cuando el aislamiento viral fue aplicado en un cultivo de caucho se observó mortalidad de las larvas a partir de las 24 horas post inoculación con valores de eficacia entre el 7 % y el 30 % para el tercio superior y medio respectivamente (figura 7). Pasados tres días se detectó un incremento significativo de la eficacia ($F=8,23$; $P=0,0001$; $gl=31$), con valores del 54 % y 71 % para los tercios superior y medio respectivamente. La población de larvas en el tercio medio de los árboles fue mayor (18 a 66 larvas/árbol) a la encontrada en el tercio superior de estos (entre 6 y 17 larvas/árbol), lo cual sugiere que las larvas prefieren alimentarse de hojas del tercio medio de los árboles. A medida que transcurrió el tiempo, la mortalidad de los individuos aumentó progresivamente sin presentar diferencias estadísticas entre los valores de eficacia obtenidos en las dos alturas de los árboles a los tres, cinco y siete días después de la aspersión del virus.

Después de siete días de haber realizado la aspersión del tratamiento, la eficacia osciló entre el 76 % y el 83 % para los tercios medio y superior respectivamente, sin detectarse diferencias significativas entre las dos alturas, lo que podría sugerir que la aspersión del virus fue homogénea a lo largo de los árboles. La homogeneidad en la aplicación en campo es de gran importancia para estos organismos debido a su actividad



Figura 6. Larva de *Erinnyis ello* (L.) mostrando los síntomas típicos de muerte por causa del EeGV

mediante infección oral, que requiere una alta cobertura para aumentar la posibilidad de infección de los individuos susceptibles (Caballero *et al.*, 2002).

La alta eficacia de este virus sobre larvas del gusano cachón también ha sido demostrada en campo en cultivos de yuca, en los cuales se han alcanzado mortalidades del 100 %, cinco días después de la aplicación con bomba de espalda (CIAT, 1989).

El uso de este baculovirus se generalizó en países como Brasil, donde tuvo un gran auge en la década de los 80s y luego decayó, aunque aún se pueden conseguir algunos productos a nivel semicomercial para el control del gusano cachón en cultivos de yuca principalmente (Souza, 2001).

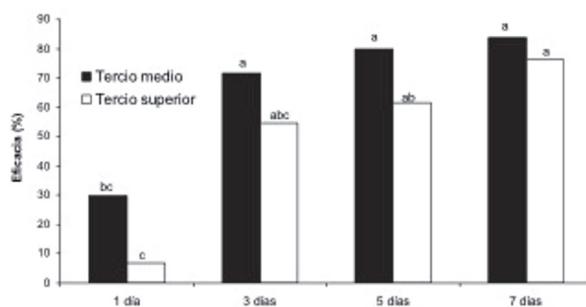


Figura 7. Eficacia en campo del baculovirus de *E. ello* aislamiento VG010 sobre larvas del gusano cachón, a diferentes días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según Tukey (95 %).



Conclusiones

El análisis de la morfología de los cuerpos de inclusión de los aislamientos analizados demostró que pertenecen al género betabaculovirus por sus características típicas de gránulo y virión único. Los perfiles de restricción de los tres aislamientos colombianos de *E. ello* analizados en el presente trabajo, no presentaron diferencias entre ellos, por lo cual se consideraron como una misma especie viral. Los perfiles de restricción y el análisis de la secuencia de genes altamente conservados de VG010 demostró diferencias genéticas comparadas con aislamientos de Granulovirus de *E. ello* previamente reportados, lo cual sugiere que se trata de un aislamiento nuevo. La caracterización biológica del aislamiento VG010 demostró su efectividad para el control de la plaga en condiciones de laboratorio y campo, especialmente en los primeros estadios larvales. Estos resultados representan la base para el desarrollo de un bioinsecticida para el control de *E. ello* en caucho.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo financiero del presente trabajo.

Referencias bibliográficas

- Barrera, G.; Cuartas, P.; Villamizar, L. 2009. Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes", Pamplona, Spain, 22-25 June 2009. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB). pp. 129-132.
- Barrera, G.; Simón, O.; Villamizar, L.; Williams, T.; Caballero, P. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol Control*. 58: 113-120.
- Bellotti, A.; Arias, B.; Guzmán, O. 1992. Biological control of the cassava hornworm *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). *Flor Entomol*. 506-515.
- Bellotti, A.C.; Smith, L.; Lapointe, S.L. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Ann Rev Entomol*. 44: 343-370.
- Berretta, M.F.; Rios, M.L.; Sciacchitano de Cap, A. 1998. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *J Invert Pathol*. 71: 280-282.
- Boucias, D.; Johnson, D.; Allen, G. 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Environ Entomol*. 9: 59-61.
- Caballero, P.; Zuidema, D.; Santiago-Alvarez, C.; Vlak, J.M. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci Tech*. 2: 145-157.
- Caballero, P.; Williams, T.I.; López-Ferber, M. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. *Phytoma-España*.
- Caballero, P.; Williams, T. 2008. Virus entomopatógenos, 121-135. En: Jacas, J. y Urbaneja, A. (eds.). Control biológico de plagas agrícolas Unidad Asociada de Entomología UJI-IVIA-CIB. Editorial M.V. Phytoma, España.
- Caballero, P.; Murillo, R.; Muñoz, D.; Williams, T. 2009. El nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioinsecticida: análisis de avances recientes en España. *Rev Col Entomol*. 35: 105-115.
- Cherry, A.; Osae, M.; Djegui, D. 2002. Relative potency, yield and transmission of a Kenyan isolate of *Plutella xylostella* granulovirus in a population of diamondback moth from Benin, West Africa. Memorias del primer simposio internacional de mejoramiento del control biológico de *Plutella xylostella*. Cirad (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier, Francia. En: <http://dbm2002.cirad.fr/papers/cherry.doc> (Consulta: marzo de 2009).
- CIAT. 1989. Manejo integrado de *Erinnyis ello* (L) (gusano cachón de la yuca): guía de estudio. Serie: 04SC-04.01. 04.
- Cory, J.S.; Myers, J.H. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Ann Rev Ecol Evol Syst*. 34: 239-272.
- Costa, N.; Castro, M.; Sihler, W.; Pegoraro, R.; Souza, M. 2005. Análise da estabilidade genética do *Erinnyis ello* granulovirus aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. p. 110.
- Erlandson, M.; Newhouse, S.; Moore, K.; Janmaat, A.; Myers, J.; Theilmann, D. 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia* in populations from vegetable greenhouses. *Biol Control*. 41: 256-263.
- Erlandson, M.A. 2009. Genetic variation in field populations of baculoviruses: Mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virol Sinica*. 24: 458-469.
- Escribano, A.; Williams, T.; Goulson, D.; Cave, R.D.; Chapman, J.W.; Caballero, P. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J Econ Entomol*. 92: 1079-1085.
- Espinel-Correal, C.; Gómez, J.; Villamizar, L.; Cotes, A.; Léry, X.; López-Ferber, M. 2009. Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *IOBC/wprs Bulletin*. 45: 145-148.
- Finnerty, C.M.; Li, G.; Granados, R.R. 2000. Characterization of a Granulovirus from the Cassava Hornworm (*Erinnyis ello*: Sphingidae). *J Invertebr Pathol*. 75: 273-278.
- Finney, D. 1952. Probit analysis. London: Cambridge University Press.
- Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Cotes, A.M. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10: 152-158.
- Grzywacz, D.; Jones, K.; Moawad, G.; Cherry, A.; 1998. The *in vivo* production of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol Methods*. 71: 115-122.
- Grzywacz, D.; Parnell, M.; Kibata, G.; Oduor, G.; Ongutu, W.; Miano, D.; Winstanley, D. 2001. The development of endemic baculoviruses of *Plutella xylostella* (diamondback moth, DBM) for control of DBM in East Africa. The Management of Diamondback Moth and other Cruciferous Pests (Proceedings of the Fourth International Workshop on Diamondback Moth, Melbourne University), pp. 179-183.
- Hatem, A.E.S.; Aldebis, H.K.; Vargas Osuna, E. 2011. Effects of the *Spodoptera littoralis* granulovirus on the development and reproduction of cotton leafworm *S. littoralis*. *Biol Control*. 59: 192-199.
- Henderson, C.; Tilton, E. 1955. Tests with acaricides against the white flour mite. *J Econ Entomol*. 48: 157-161.
- Hilton, S.; Winstanley, D. 2008. Biological characterization of an English granulovirus from the summer fruit tortrix moth, *Adoxophyes orana*. *J Invertebr Pathol*. 97: 298-305.
- Hochberg, M.E.; 1991. Intra-host interactions between a braconid endoparasitoid, *Apanteles glomeratus*, and a baculovirus for larvae of *Pieris brassicae*. *J An Ecol*. 51-63.
- Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Watt, A.D.; Hails, R.S.; Cory, J.S. 2001. Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. *Evol Ecol Res*. 3: 687-701.



- Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Watt, A.D.; Hartley, S.E.; Hails, R.S.; Cory, J.S. 2002. Differential selection of baculoviruses genotypes mediated by different species of host food plant. *Ecol Letters.* 5: 512-518.
- Hughes, P.; Wood, H. 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect virus. *J Invertebr Pathol.* 37: 154-159.
- ICTV, 2012. International Committee on Taxonomy of viruses.
- Jehele, J.A.; Lange, M.; Wang, H.L.; Hu, Z.H.; Wang, Y.J.; Hauschild, W., 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology.* 346: 180-193.
- Kamiya, K.; Zhu, J.; Murata, M.; Laviña-Caoili, B.A.; Ikeda, M.; Kobayashi, M.; Kawamura, S. 2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biol Control.* 31: 38-48.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentini, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23: 2947-2948.
- León, G.; Beltrán, J.; Campos, J. 2010. Enemigos naturales y manejo integrado del gusano cachón (*Erinnyis ello*) en el cultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*), Primera ed. Produmedios.
- McVean, R.; Sait, S.; Thompson, D.; Begon, M. 2002. Dietary stress reduces the susceptibility of *Plodia interpunctella* to infection by a granulovirus. *Biol Control.* 25: 81-84.
- Miele, S.A.B.; Garavaglia, M.J.; Belaich, M.N.; Ghiringhelli, P.D. 2011. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. *Int J Evol Biol.* 211, 37.
- Mukhopadhyay, A.; Dev, D. 2009. Pathogenecity of a baculovirus isolated from *Arctornis submarginata* (Walker) (Lepidoptera: Lymantriidae), a potential pest of tea growing in the Darjeeling foothills of India. *J Invertebr Pathol.* 100: 57-60.
- Parola, A.D.; Sciocco-Cap, A.; Glikmann, G.; Romanowski, V. 2003. An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). *J Virol Meth.* 112: 13-21.
- Rohrmann, G.F. 2010. Baculovirus molecular biology. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
- Rowley, D.L.; Farrar, R.R., Jr; Blackburn, M.B.; Harrison, R.L. 2010. Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Genes.* 40: 458-468.
- Sajap, A.S.; Bakir, M.; Kadir, H.; Samad, N. 2007. Effect of pH, rearing temperature and sunlight on infectivity of Malaysian isolate of nucleopolyhedrovirus to larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Trop Ins Science.* 27: 108.
- Schmitt, A. 1988. Uso de Baculovirus *erinnys* para el control biológico del gusano cachón de la yuca. *Yuca Boletín Informativo.* 12: 1-4.
- Schneider-Orelli, O. 1947. Entomologisches Praktikum – Einführung in die land- un forstwirtschaftliche Insektenkunde. Sauerländer & Co, Aarau, Germany.
- Sciocco-Cap, A.; Parola, A.D.; Goldberg, A.V.; Ghiringhelli, P.D.; Romanowski, V.A. 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3702-3706.
- Souza, M. 2001. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotec Ciência e Desenvol.* 21: 28-31.
- Sporleder, M.; Rodriguez Cauti, E.M.; Huber, J.; Kroschel, J. 2007. Susceptibility of *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera; Gelechiidae) to its granulovirus PoGV with larval age. *Agricul Forest Entomol.* 9: 271-278.
- Subramanian, S.; Santharam, G.; Sathiah, N.; Kennedy, J.; Rabindra, R. 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biol Control.* 37: 367-374.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.
- Teakle, R.; Jensen, J.; Giles, J. 1986. Age-related susceptibility of *Heliothis punctiger* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol.* 47: 82-92.
- Vásquez, J.; Zeddam, J.; Tresierra, A. 2002. Control biológico del "cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus. *Folia Amazónica.* 13: 25-39.
- Wang, Y.; Choi, J. Y.; Roh, J. Y.; Woo, S. D.; Jin, B. R.; Je, Y. H. 2008. Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. *J Microbiol.* 46: 704-8.
- Winder, J.A. 1976. Ecology and control of *Erinnyis ello* and *E. alope*, important insect pests in the New World. *Int J Pest Manag.* 22: 449-466.
- Zar, J., 1999. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall.
- Zeddam, J.-L.; Vasquez Soberon, R.; Vargas Ramos, Z.; Lagnaoui, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas.* 29: 659-667.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Antibiotic- and heavy-metal resistance in bacteria isolated from deep subsurface in El Callao region, Venezuela

Resistencia a antibioticos y metales pesados en bacterias aisladas de subsuelo en la región El Callao, Venezuela

Maura Lina Rojas Pirela*, Wilmar Alirio Botello Suárez*, María Mercedes Ball Vargas*

Resumen

Se investigó el efecto de la contaminación con mercurio (Hg) en las comunidades bacterianas del subsuelo profundo en la región de El Callao (Estado Bolívar, Venezuela). Se estudiaron comunidades bacterianas de dos niveles de profundidad (-288 m y -388 m) en una mina de oro con el propósito de describir las características más relevantes de las bacterias indígenas cultivables que colonizaban esta mina. Se evaluaron los patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados, presencia del gen *merA* y plásmidos en aislados resistentes. Se encontró una elevada frecuencia de bacterias indígenas resistentes al Hg y otros metales pesados. De 76 aislados Hg-resistentes probados 73.7 % fueron adicionalmente resistentes a ampicilina; 86.8 % a cloranfenicol; 67.1 % a tetraciclina; 56.6 % a estreptomicina y 51.3 % a kanamicina. Además, se encontró que 40.74 % (-328 m) y 26.53 % (-388 m) de las bacterias Hg-resistentes fueron simultáneamente resistentes tanto a cuatro como a cinco de estos antibióticos. Se detectó la presencia de plásmidos de alto y bajo peso molecular y, a pesar de que los aislados mostraban resistencia a compuestos mercuriales, la presencia del gen *merA* fue detectada solo en 71.05 % de los cepas. Estos resultados sugieren que la exposición a Hg podría ser una presión selectiva en la proliferación de bacterias resistentes a antibióticos y promover el mantenimiento y propagación de estos genes de resistencia. Sin embargo, la existencia de tales resistencias a estas profundidades podría también apoyar la idea de que la resistencia a antibióticos en estas bacterias es natural y tiene un origen más antiguo que su exposición al Hg.

Palabras clave: bacterias del subsuelo, resistencia, mercurio, antibióticos, plásmidos.

Abstract

The effect of contamination with mercury (Hg) in the deep subsurface bacterial communities in the region of El Callao (Bolívar State, Venezuela) was investigated. Bacterial communities from two deep levels (-288 m and -388 m) in a gold mine were studied with the aim of describe the most relevant features of their colonizing indigenous culturable bacteria. Antibiotic and heavy metals resistance patterns, presence of the *merA* gene and plasmids in resistant isolates were evaluated. A high frequency of resistant indigenous bacteria to Hg and other heavy metals was found. From 76 Hg-resistant isolates tested 73.7 % were, in addition, resistant to ampicillin, 86.8% to chloramphenicol, 67.1 % for tetracycline, 56.6 % streptomycin, and 51.3 % kanamycin. Furthermore, it was found that 40.74 % (-328 mm) and 26.53 % (-388 m) of Hg-resistant bacteria were simultaneously resistant to both four and five of these antibiotics. The presence of low and high molecular weight plasmids was detected and, despite that isolated showed resistance to mercurial compounds, the presence of the gene *merA* was detected only in 71.05 % of strains. These results suggest that exposure to Hg could be a selective pressure on the proliferation of antibiotic-resistant bacteria and promote the preservation and propagation of these resistance genes. However, the existence of such resistances to these depths could also support the idea that antibiotic resistance in these bacteria is natural and has a more ancient origin than their exposure to Hg.

Keywords: subsurface bacteria, resistance, mercury, antibiotic, plasmid.

Recibido: febrero 10 de 2014

Aprobado: octubre 20 de 2014

* Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela. maura.r@ula.ve, mball@ula.ve, wbotello@unisangil.co. Corresponding author: Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela. mball@ula.ve.



Introduction

In the past decades it was thought that life of prokaryotic-type organisms was only possible in the shallow subsurface, these being not capable of living to great depths of the surface. However, now it is known that the deep subsurface represents one of the most promising reservoirs of living organisms, mainly prokaryotes, which may exhibit unexpected metabolic abilities (Moser et al., 2005; Parkes et al., 2010) Nowadays, the study of subsurface microorganisms has bright future, and is considered an emerging frontier in the fields of microbial biodiversity and life at extreme environments (Fredrickson and Balkwill, 2006; Wang et al., 2013).

On the other hand, the potential application of subsoil bacteria in bioremediation of contaminated environments is receiving increasing attention. In this regard, gold mines offer an excellent opportunity to study subterranean microbial communities because they provide an easy access (sometimes >8000 ft.) to greater depths of terrestrial subsurface, allowing thus cheaper and aseptic-horizontal drilling of deeper strata. Furthermore, by this route it is possible to have multiple access points at different depths to follow the evolutionary history of microbial populations, some of which may have stayed isolated from terrestrial surface by thousands of years. Moreover, the enormous amount of geologic and hydrologic information accumulated by mining companies can be easily integrated with biological results. To date, gold mines from South Africa (Takai et al., 2001; Chivian et al., 2008), Japan (Hirayama et al., 2005), USA (Rastogi et al., 2010; Rastogi et al., 2013) and Australia (Adams et al., 2013) have been screened for subsurface life.

Gold reservoirs in the El Callao area (Bolívar State, Venezuela) have been exploited since 1850, with over 200 metric tons produced (Hildebrand, 2005). Colombia Mine, a gold reservoir located near to El Callao town, is a >500m deep, active gold mine. A vast area surrounding Colombia Mine is highly contaminated with mercury (Hg). Indeed, this contaminant is discharged by artisanal miners in its metallic form into hundreds of artificial ponds ("tailing-ponds") spread over several square kilometers. Mercury emission in El Callao area has been estimated over 12tons/y (Veiga et al., 2005). As a consequence, bacteria thriving in natural water-bodies and/or tailing-ponds exhibit high frequencies of Hg-resistance, as it have been shown in our previous work (Ball et al., 2007; Gómez et al., 2013).

Material and methods

Site and sampling methods

Colombia Mine is located near to El Callao town (Bolívar State, Venezuela; latitude: 7° 21' 00"; longitude: -61° 49' 00"). Most water samples were collected from

existing exploratory boreholes and roof fractures located at -288m (level IV) and -388m (level VI) below the mine entrance (22m above the sea level and -78m below the sea level, respectively). The flowing boreholes, with different configurations and ages ranging from 10 to 50 years at the sampling time, exhibited high flow rates (i.e. tens of liters.h-1). Water samples were collected directly from the flowing boreholes into sterile glass tubes.

Chemical analysis

Chemical analysis of major cations and trace metals, i.e. Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Se, Ni, Pb and Zn, in the water samples was conducted at the Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (LARSA, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela). All water samples were prefiltered with a 0.45 µm filter and analyzed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy on a Varian Liberty AX instrument. Mercury was detected on aliquots of each sample, previously acidified by adding a few drops of pure HCl, by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), using a recently developed method (Duran et al., 2005).

Isolation of pure cultures

This study focused specifically on aerobic chemo-heterotrophic bacteria. Therefore, bacterial strains were isolated from water samples at each sampling site for further study by serially diluting and spreading on 1/3-strength Luria-Bertani agar (LB(1:3); tryptone 3.3g/L, yeast extract 1.6g/L, NaCl 3.3g/L, agar 15.0g/L). The plates were incubated at 30°C and colony forming units (CFU) were enumerated after 48h of growth. Morphologically distinct colony types were selected for further studies. The isolates were subsequently streaked and re-streaked on fresh plates in order to obtain axenic cultures. Then, the isolated strains were grown in liquid LB (1:3) and frozen in 20% glycerol at -80 °C.

Determination of heavy metal and antibiotic-resistance

Mercury-resistance for each isolate was determined by streaking the cells onto 1/3-strength LB agar plates amended with a) mercuric chloride (HgCl₂) (from 10 to 80mg/L) and b) methyl mercury (Me-Hg) (from 3 to 5mg/L). Stock solutions of HgCl₂ and Me-Hg were sterilized by ultra-filtration, kept cold in the dark, and added to the medium after autoclaving and cooling. The minimum HgCl₂ concentration which allowed distinguishing resistant from sensitive isolates was determined by performing preliminary assays using reference strains. These consisted of strains carrying characterized Hg-resistance determinants (*Pseudomonas stutzeri* OX and *Bacillus cereus* 5) (Izaki, 1981; Reniero, 1998) and either their sensitive mutants or phylogenetically



related strains (*Pseudomonas stutzeri* OX 1 and *Bacillus cereus* ATCC 14579) (Benyehuda et al., 2003).

Therefore, strains resistant to at least 10mg/L of $HgCl_2$ were considered as Hg^R and selected for further studies. On the other hand, heterotrophic isolates were grown in the presence of either 2 or 5mM of the following metals: Cu^{2+} (used as $CuSO_4$), Pb^{2+} (used as $Pb(NO_3)_2$), Ni^{2+} (used as $NiSO_4$) and Zn^{2+} (used as $ZnCl_2$). The plates were incubated at 30°C during 48h. Strains DH5 α and JM101 of *E. coli* K-12 were used as negative controls (= sensitive strains).

All subsurface isolates were screened also for resistance to a wide range of classes of antibiotics: tetracycline (Tet) (30 μ g/ml), chloramphenicol (Cam) (30 μ g/ml), kanamycin (Kan) (30 μ g/ml), streptomycin (Strp) (30 μ g/ml), and ampicillin (Amp) (40 μ g/ml). Selective media were prepared by incorporating the antimicrobial agent into the 1/3-strength LB agar. Concentrations used were above the highest inhibitory concentration listed in the Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2005), except for kanamycin. The strains were reactivated from frozen stocks, plated on selective media (triplicate) and checked for growth after 24, 48, and 72h. Results were recorded as sensitive or resistant; intermediate growth was not considered.

Minimum Inhibitory Concentration Assays

In order to establish the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for Hg , the Hg^R strains were assayed with an Hg^{2+} concentration series in 1/3-strength LB broth using a 96-well microtiter plate. The well contained 200 μ l of broth and Hg at concentrations ranging from 10, 20, 40 and 80 μ M (2.72 to 21.8 mg/L $HgCl_2$). Each well was inoculated with a 10 μ l aliquot of the correspondent Hg^R strain in the late exponential phase, at an initial optical density at 600nm (OD600) of 0.03, and the plates were incubated at 30°C for 24h. Each experiment was performed in triplicate. The lowest concentration of the metallic compound that caused no visible growth was considered as the MIC. The isolates were considered resistant if the MIC value exceeded that of the *E. coli* K-12 strain, which was used as the control (Akinbowale et al., 2007).

Detection of *merA* orthologs

The *merA* gene, which belongs to the *mer* operon and encodes a cytoplasmic mercuric reductase, was amplified using degenerate primers A1s-n.F

(5' TCCGCAAGTNGCVACBGTNGG3') and A5-n.R

(5' ACCATCGTCAGRTARGGAAVA3') and cycling conditions previously reported (Ni Chadhain et al., 2006). PCR reactions were prepared in 10 μ l volumes containing 1 \times PCR buffer, 0.8 mM each forward and reverse primers, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.025

U/ml Taq Polymerase (Promega). Whole cell suspensions in sterile distilled water were used as source of genomic DNA (1 μ l per reaction). Amplifications were performed as follows: an initial denaturalization step of 94°C for 5 min, followed by 45 cycles of 94 °C for 10 s, 54 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s, and by a final extension of 72 °C for 7 min.

In preliminary experiments, fragments of the expected size (~285 bp) were purified from 1% agarose gels (NucleoSpin Extract, Macherey-Nagel) and sequenced (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). The results obtained validated the PCR protocol described above. Therefore, PCR products of the expected size were considered to belong to putative *merA* orthologs.

Plasmid isolation

Some selected Hg^R isolates were screened for the presence of plasmids as previously described by Ball et al. (2007).

Results

Chemical analysis

This indicated that, even though several dozens processing centers with their respective, heavily-contaminated tailing ponds are located in the area surrounding Colombia Mine, neither Hg nor any other heavy metal (except manganese) was present at detectable concentrations on groundwater collected at both subsurface levels (table 1). Calcium was found in both levels.

Table 1. Characteristics of the water samples at each level.

Level	Depth	pH	Temp	Ca (ppm)	Mn (ppm)
IV	288	7.4	26.9	96.67±0.81	<LOD
VI	388	8.0	27.1	98.70±0.96	0.59±0.01

<LOD= below the detection level

Resistance to mercury and others metals

The total number of heterotrophic, cultivable bacteria in each one of the two levels monitored varied between 1.9-103CFU/ml (level IV) and 2.5-103CFU/ml (level VI). Resistance to $HgCl_2$ (10mg/L), tested among pure isolates, varied between 83 to 90%, depending on the level being monitored (Table 1). Under these conditions, control strains *B. cereus* ATCC 14579 and *P. stutzeri* OX1 were unable to grow at concentration above 5mg/L of $HgCl_2$, while strains *B. cereus* 5 and *P. stutzeri* OX grew up to 80mg/L of $HgCl_2$. On the other hand, resistance to MeHg (3mg/L) varied between



13.33% and 18.64% (table 1). Strikingly, nearly 6% of isolates were resistant up to 5mg/L of MeHg in the deeper stratus. A total of 27 strains (90%) from level IV and 49 strains (83.05%) from level VI, resistant to at least 10mg/L of HgCl₂, were isolated and purified from the primary cultures to be further tested.

It is well known that resistance values obtained by growing strains in Hg-supplemented agar media may cause an overestimation of this parameter. Thereby, the values for MIC of Hg²⁺ for each strain were estimated in liquid medium. The 76 HgR strains were incubated in 1/3-strength LB broth containing HgCl₂ concentrations ranging from 2.72mg/L (10µM Hg²⁺) to 21.8mg/L (80µM Hg²⁺) of HgCl₂. 59.25% of the isolates tested from water samples from level IV were resistant to Hg²⁺ 10µM, while in level VI this value attained 100% (table 2).

When the combined results of both levels are considered it is clear that the great majority of the strains tested (85.52 %) were able to grow in the presence of Hg²⁺ 10µM; on the other hand, only 3 out of 76 strains tested (3.94%) were resistant to Hg²⁺ 80µM (table 3).

It was also demonstrated that these strains showed resistance to other heavy metals, including Cu²⁺, Pb²⁺,

Ni²⁺ and Zn²⁺ (table 4). Strikingly, a great majority of the isolates (between 76.31 and 100%) were able to grow in the presence of 2 mM of each one of the metals tested, a concentration which inhibited growth of the control strain of *E. coli* (table 4).

As expected, the frequencies of resistant isolates decreased when increasing the concentration of the toxic element. A general tendency can be also appreciated, indicating that most isolates were more susceptible, under similar concentrations, to Pb²⁺ than Cu²⁺ and Ni²⁺, whereas Zn²⁺ turned out the least toxic among the tested metals.

Antibiotic resistance

All of the 76 Hg^R subsurface isolates were screened for resistance to 5 antibiotics through plating on selective media. The highest frequency of resistance was to chloramphenicol (>85 % of the strains in both levels, figure. 1A) and Amp (> 70 % of the strains in both levels). The antibiotic with the highest efficacy was kanamycin, with 62.96% and 44.89 % and streptomycin with 62.96 % and 53.06% of strains showing resistance in levels IV and VI, respectively.

Table 2. Mercury resistance in sub-surface isolates tested in agarized medium.

Level	HgCl ₂ (mg/L)				Me-Hg (mg/L)		
	10	20	40	80	3	5	10
Level IV (n = 30)	27 (90) ^a	12 (40)	4 (13.33)	1 (3.33)	4 (13.33)	4 (13.33)	1 (3.33)
Level VI (n = 59)	49 (83.05)	18 (30.51)	2 (3.39)	0 (0)	11 (18.64)	3 (5.08)	1 (1.69)
Total (n = 89)	76 (85.39)	30 (33.71)	6 (6.74)	1 (1.12)	15 (16.85)	7 (7.86)	2 (2.22)

^a Numbers enclosed by parentheses represents percentages

Table 3. Mercury resistances among sub-surface isolates tested in liquid medium.

HgCl ₂ (mg/L)				
	10	20	40	80
Level IV (n=27)	16 (59.25) ^a	7 (25.92)	3 (11.11)	1 (3.70)
Level VI (n=49)	49 (100)	19 (38.77)	3 (6.12)	2 (4.08)
Total (n=76)	65 (85.52)	26 (34.21)	6 (7.89)	3 (3.94)

^a Numbers enclosed by parentheses represents percentages.



Table 4. Heavy metal resistance among sub-surface isolates tested in agarized medium.

Level	Cu (mM)		Pb (mM)		Ni (mM)		Zn (mM)	
	2	5	2	5	2	5	2	5
Level IV (n = 27)	24 (88.88) ^a	6 (22.22)	26 (96.29)	10 (37.03)	27 (100)	6 (22.22)	27 (100)	16 (59.25)
Level VI (n = 49)	36 (73.46)	10 (20.41)	32 (65.31)	15 (30.61)	42 (85.71)	11 (22.45)	49 (100)	18 (36.73)
Total (n = 76)	60 (78.95)	16 (21.05)	58 (76.31)	25 (32.89)	69 (90.78)	17 (22.36)	76 (100)	34 (44.73)

^a Numbers enclosed by parentheses represents percentages.

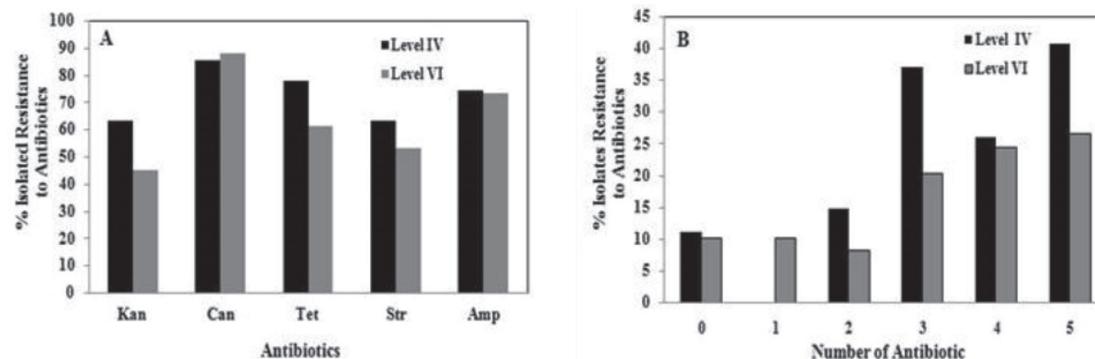


Figure 1. Levels of antibiotic resistance among Hg-resistant strains isolated from different ponds **A**. Antibiotic resistance among Hg^R deep sub-surface isolates. The proportion of strains resistant to kanamycin (Kan), chloramphenicol (Cam), tetracycline (Tet), streptomycin (Str), ampicillin (Amp), in levels IV and VI is shown. **B** Multiple antibiotic resistance among Hg^R deep sub-surface isolates. The proportion of strains resistant to 0, 1, 2, 3, 4, and 5 antibiotics simultaneously is shown.

The two levels (IV and VI) studied showed a high frequency of isolates resistant to more than one antibiotic (figure 1B). In level VI, 26.53% of the strains were resistant to, at least, five antibiotics, while in level IV this value attained 40.74%.

Subsurface strains from each one of the two levels exhibited distinct antibiotic resistance profiles. Nine distinct profiles were detected among 27 Hg^R strains in level IV while in level VI; thirteen distinct profiles were detected among 49 Hg^R isolates (figure 2).

Combined results of the two strains groups shows that 76 Hg^R isolates possess 15 distinct resistance profiles, 12 of which were found in more than one strain (figure 2). Interestingly, 24 isolates (31.58%) showed the same profile of multi-resistance (KCTSA).

Amplification of *merA* gene

In order to detect the presence of the *merA* gene encoding the enzyme responsible for Hg²⁺ reduction, PCR amplification experiments using degenerate primers were performed.

A band corresponding to an internal fragment of putative *merA* orthologs was amplified from the genome for 54 of the 76 isolates (71.05%, figure 3). In level IV this value reach 66.66% while in level VI 73.47% of the isolates exhibited putative *merA* orthologs.

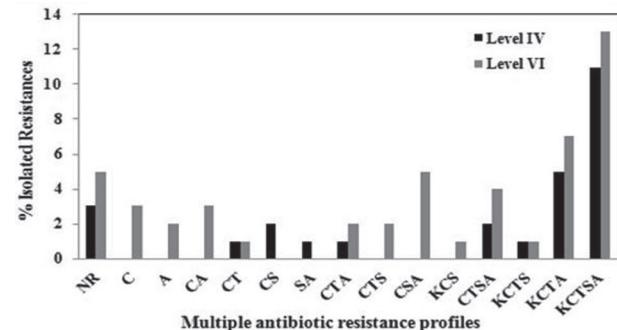


Figure 2. Multiple antibiotic resistance (MAR) profiles of sub-surface isolates C= cloramphenicol; A = ampicillin; T = tetracycline; S = streptomycin; K = kanamycin NR = no resistant isolates to the antibiotics tested.

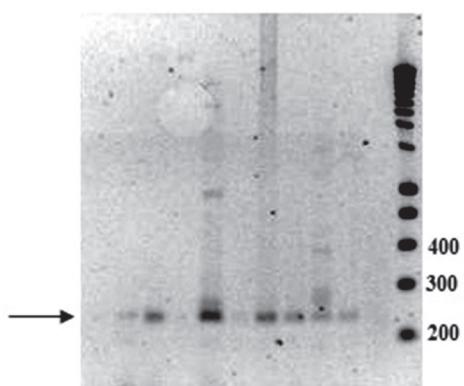


Figure 3. PCR amplification of putative *merA* orthologs. The arrow points towards the position of ~285-bp amplicons which correspond to internal fragments of putative *merA* orthologs.

Plasmid isolation

With the purpose to establishing a possible transfer of heavy metal- and antibiotic-resistance genes by conjugation, 20 Hg^R strains were screened for the presence of large plasmids. Results obtained confirm that 11 isolates (55 %) contained at least one plasmid; 62.9% of them showed plasmid bands with apparent sizes >30 kbp (figure 3). In addition, previous studies in vitro conjugation clearly show the potential for conjugal gene transfer in this indigenous bacteria and this transfer can occur between phylogenetically distant bacteria (unpublished data).

Discussion

Little is known about the impact for Hg contamination of the microbial communities colonizing the deep subsurface in the El Callao region. Results in this study shown that resistance to Hg and others heavy metals is very frequent among chemoheterotrophic bacteria that colonize deep subsurface in this region. This fact may be considered as indicative of a possible exposure of the subsurface microbial communities to Hg, even though chemical analysis of the water do not detected the presence of these heavy metals including mercury. Probably this metal exposure occur through a process of cross-contamination, via filtration of water from rivers, streams and tailings ponds highly contaminated during local rainy season (Ball et al., 2007, Gómez et al., 2013) (from September to February), which is accompanied by major flooding and overflowing of bodies of surface waters polluted (García-Sánchez et al., 2008). Moreover, the absence of detectable concentrations of mercury can be due to the mineralogical composition of the mine (rich in carbonates, oxides and silicate) (Paredes et al., 2007) and pH values (neutral to basic) that may alter the solubility of the metals (Uchimiya et al., 2010; Woodruff et al., 2010) and prevent detection by the used technique. It can be ar-

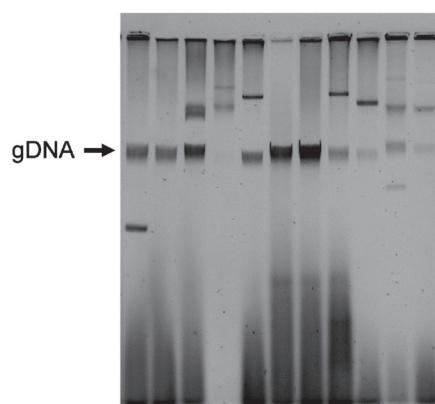


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of plasmidic DNA preparations. The arrow points towards the position of genomic DNA (gDNA) fragments (~30 kb).

gued, however, constant flow unpolluted water would act as natural attenuation events. This could be reflected in the level of tolerance to mercury of the bacterial communities of groundwater. The mercury tolerance level of bacterial communities from polluted surface water is greater than in subsurface communities. This may be due to constant exposure of these bacteria of the surface to high mercury concentrations (Ball et al., 2007, Gómez et al., 2013), while the sporadic exposure to mercury of subsurface bacteria may lead to lower tolerance to this metal. This indicates that subsurface communities pre exposed to mercury could maintain their mercury tolerance even when the current exposure is low. Also, this could indicate a high capacity for acclimation the subsurface communities to mercury.

Additionally, it was found that antibiotic resistance is widespread among subsurface bacteria, a high proportion of isolates exhibited multiple antibiotic resistance (MAR; resistance to two or more antibiotics) in accordance with a previous report (Brown et al., 2009; Diptendu and Gouta, 2013; Stepanauskas et al., 2006). Besides Hg-resistance, the subsurface isolated did also showed resistance to other heavy-metals (Cu, Pb, Ni, Zn) and, several antibiotics. These results are very similar to the results obtained in previous studies in surface waters in the region of El Callao (Ball et al., 2007, Gómez et al., 2013). These results could support the idea that microbial exposure to a toxic substance could result in indirect selection for bacteria with resistance to multiple toxic substances, such as antibiotics (Baker-Austin et al., 2006, Seiler and Berendson, 2012; Telmer et al., 2009). Thus, in other words, exposure to toxic metals may select for bacterial strains resistant to antibiotics and vice versa. Indeed, in a work, Stepanauskas et al. (2006) demonstrated that exposure of freshwater environments to either metals or antibiotics selects for multiresistant microorganisms. It is known that genes conferring resistance to heavy metal, anti-



biotic and other toxic compounds are often genetically linked and located on mobile elements (i.e., conjugative plasmids, transposons, and integrons), some of which are easily exchanged among phylogenetically distant bacteria (Summers, 2002; Davies and Davies, 2010; van Hoek *et al.*, 2011). Therefore, microbial exposure to mercury (even for occasional contamination) can co-select antibiotic resistance and/or induce the maintenance of resistance genes in the absence of the antibiotic selective pressure. These co-selection mechanisms include co-resistance, cross-resistance and indirect but shared regulatory responses to metal and antibiotic exposure, such as biofilm induction, representing potential co-selection mechanisms used by prokaryotes (Baker-Austin *et al.*, 2006; Seiler and Berendonk, 2012). Resistance to multiple antibiotics in bacterial communities studied in this work confirms that this ability is common and widespread among subsurface bacteria, with a high proportion of isolates exhibiting MAR.

The presence of antibiotic-resistance genes in bacterial communities from natural environments, without apparent selection pressure, has been observed. Thus, Bhullar *et al.* (2012) discovered an antibiotic-resistant bacteria community in an isolated cave 400 meters below the Earth's surface. They report that these bacteria were highly resistant to antibiotics and, some strains were resistant up to 14 different antibiotics. Similar results were obtained with bacteria isolated on natural environments in different glacier environments (Segawa *et al.*, 2013) as Siberian permafrost (Mindlin *et al.*, 2008) and the Arctic (Sudha *et al.*, 2013).

Previous results can support the notion that organisms on natural environments are a reservoir of resistance genes and that antibiotic resistance is a natural and dominant component in ancient microbial pangenomes with a long evolutionary past (Bhullar *et al.* 2012). The antibiotic resistance and its occurrence in these subsurface bacterial communities could be due to others reasons. Antibiotic-resistance genes could play different roles in natural environments just like the one studied. i.e., these could have a protective role either in the producer organisms or in some of their coexisting organisms (Laskaris *et al.*, 2010) while some of them could play an important role in the biosynthesis of antibiotics (Allen *et al.*, 2010) and other could be involved in metabolic and signaling of bacterial processes occurring in natural ecosystems (Laskaris *et al.*, 2010) and some others could cooperate in the degradation and use of antibiotics as food (Davies and Davies, 2010).

Owing the environmental conditions of the mine (i.e., low nutrient availability) it is likely that competition for resources can play an important role in the persistence of these bacteria. This competition can be developed through various adaptations such as production of antibiotic to compete with their nutritional antagonists, acquisition and development of defense mechanisms

to enable them growth in the presence of noxious compounds, changes in cell and growth physiology (Bhullar *et al.*, 2012). Hence, it might be thought that antibiotic resistance in these isolates of groundwater is anterior to the emergence of antibiotic.

Information on current mechanisms for horizontal gene transfer (HGT) in depth subsurface environments is scarce. Considering the characteristics of this environment (e.g. low density of microbes) is difficult to imagine how it can occur there. The high frequency of plasmids in Hg^R strains could indicate that elevated levels of metal- and antibiotic-resistance are related to carrying of resistance genes by these plasmids. In studies have observed the plasmid presence and the occurrence of HGT in communities from subsurface environment (although this may occur at a low frequency) (Coombs 2009; Hemme *et al.* 2010). HGT in these communities would play an important role in their gene evolution, which have permitted them survival in hostile environments.

The presence of putative *merA* orthologs in a high proportion (71.5%) of the bacterial isolates analyzed in the present work seem to indicate that bacterial detoxification of mercury proceed via the classical pathway involving ionic-mercury reduction by a mercuric reductase. For the remaining 28.5% of the strains, the resistance seems to be not due to enzymatic volatilization of mercury, another possible mechanism of resistance that could be involved. Some bacteria possess proteins in their plasmatic membranes which alter the mercury permeability inhibit mercury uptake (or binding) by the cells (Pan-Hou *et al.*, 1981). Plasmid-encoded efflux systems have also been suggested as alternative systems to mercury resistance (Reyes *et al.*, 1999).

Conclusions

Bacterial communities found in groundwater from the subsurface mine "Colombia", located on the auriferous reservoirs of El Callao, Venezuela, presented a significant frequency of mercury-resistant strains, to both inorganic (HgCl) and organic (MeHg) markers, at the two levels of depth explored (-288 m and -388m below the mine entrance and -22m and -78m below the sea level, respectively).

Likewise, it can be ascertained that strains carrying Hg^R genes also exhibited resistance to antibiotics and other heavy metals, which may be an indication that heavy metals resistance could assist the co-selection of antibiotics-resistance genes. However, it is important to consider that observation of antibiotic-resistant microorganisms in natural environments free of pollutants has become ever more common, suggesting a origin natural and more ancient of these genes. The presence of low and high molecular weight plasmids of conjugative type in these bacteria, as envisioned in the preliminary studies carried out, could suggest the



occurrence of HGT processes in these communities, allowing a more widespread dissemination of these genes.

The presence of putative orthologs *merA* in a high proportion of bacterial isolates analyzed indicate that detoxification of bacterial mercury proceed via the classical pathway involving ionic mercury-reduction by a mercuric reductase. However, in other isolates the resistance appears to be due to another mechanism of resistance that may be involved.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. Tamar Barkay (Department of Biochemistry and Microbiology at Rutgers University, New Brunswick, NJ) for kindly providing the Hg^R and Hg^S reference strains used in this study. We are also grateful to Dr. Pablo Carrero (Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Venezuela) for performing chemical analysis of water samples (Hg²⁺ and Me-Hg determination) and Dr. Wilfredo Quiñones (Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela) and Dr Cristóbal Lárez Velásquez for his critical revision of this work. We thank CVG-Minerven C.A. for logistic support in El Callao. This work was financed partially by CDCHTULA (project number C-1428-06-03-B).

References

- Adams, A.; Raman, A.; Hodgkins, D.; Nicol, H. 2013. Accumulation of heavy metals by naturally colonizing *Typha domingensis* (Poales Typhaceae) in waste-rock dump leachate storage ponds in a gold-copper mine in the central tablelands of New South Wales, Australia. *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*. 27: (4). 294- 307.
- Allen, H.; Donato, J.; Wang, H.H.; Cloud-Hansen, K.A.; Davies, J.; Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (4):251-59.
- Akinbowale, O.; Peng, H.; Grant, P.; Barton, M. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile Aeromonads and *Pseudomonas* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30(2):177-82.
- Ball, M.; Carrero, P.; Castro, D.; Yarzábal, A. 2007. Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). *Current Microbiology*. 54(2):149-154.
- Baker-Austin, C.; Wright, M.; Stepanauskas, R.; McArthur, J. 2006. Co-selection of antibiotics and metals resistance. *Trends Microbiology*. 14(4): 176-182.
- Benyehuda, G.; Coombs, J.; Ward, P.; Balkwill, D.; Barkay, T. 2003. Metal resistance among aerobic chemoorganotrophic bacterial isolates from the deep terrestrial subsurface. *Canadian Journal of Microbiology*. 49(2):151-156.
- Bhullar, K.; Waglechner, N.; Pawlowski, P.; Koteva, K.; Banks, E.; Johnston, M.; et al., 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*. 7(4):e34953.
- Brown, M.; Balkwill, D. 2009. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microbial Ecology*. 57(3):484-493.
- Coombs, J. 2009. Potential for horizontal gene transfer in subsurface microbial communities. Totowa, New Jersey. In Gogarten M, Gogarten J, Olendzenski L (Eds). *Humana Press. Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*. p 413-433.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA Fifteenth informational supplement, CLSI document M100-S15.
- Chivian, D.; Brodie, E.; Alm, E.; Culley, D.; Dehal, P.; DeSantis, T.; ... & Onstott, T. C. 2008. Environmental genomics reveals a single species ecosystem deep within Earth. *Science*. 322(5899):275-278.
- Davies, J.; Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74 (3): 417-433.
- Diptendu, S.; Goutam, P. 2013. Molecular Characterization of Metal and Antibiotic Resistance Activities in a Bacterial Population Isolated from Waste Water Sample. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 4(1):21-30.
- Durán, F.; Carrero, P.; Rondón, C. 2005. A new method to determine mercury species in water samples through cold vapor generation and atomic absorption spectroscopy detection. Proceedings of the VII Venezuelan Chemistry Congress, Faculty of Sciences. Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela). p 35-37.
- Fredrickson, J.; Balkwill, D. 2006. Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal*. 23(6): 345-356.
- García-Sánchez, A.; Contreras, F.; Adams, M.; Santos, F. 2008. Mercury contamination or surface water and fish in a gold mining region (Cuyuni River Basin, Venezuela). *International Journal of Environmental Pollution*. 33(2/3) 260-274.
- Gómez, W.; Ball, M.; Botello, W.; Yarzábal, A. 2013. Horizontal transfer of heavy metal and antibiotic-resistance markers between indigenous bacteria, colonizing mercury contaminated tailing ponds in southern Venezuela, and human pathogens. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 33: 110-115.
- Hemme, C.; Deng, Y.; Gentry, T.; Fields, M.; Wu, L.; Barua, S.; ... & Zhou, J. 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal - contaminated groundwater microbial community. *Multi-disciplinary Journal of Microbial Ecology*. 4: 660-672.
- Hildebrand, R. 2005. Autochthonous and allochthonous strata of the El Callao greenstone belt: Implications for the nature of the Paleoproterozoic Trans-Amazonian orogeny and the origin of gold-bearing shear zones in the El Callao mining district, Guayana shield, Venezuela. *Precambrian Research*. 143(1): 75-86.
- Hirayama, H.; Takai, K.; Inagaki, F.; Yamato, Y.; Suzuki, M.; Nealon, K.; Horikoshi, K. 2005. Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles*. 9 (2):169-184.
- Izaki, K. 1981. Enzymatic reduction of mercurius and mercuric ions in *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 27:192-197.
- Laskaris, P.; Tolbas, S.; Calvo-Bado, L.; Wellington E. 2010. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environmental Microbiology*. 12(3):783-796.
- Moser, D.; Gihring, T.; Brockman, F.; Fredrickson, J.; Balkwill, D.; Döllhopf, M.; ... & Onstott, T. C. 2005. *Desulfotomaculum* spp. and *Methanobacterium* spp. Dominate a 4 to 5 km Deep Fault. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12):8773-8783.
- Mindlin, S.Z.; Soina, V.S.; Petrova, M.A.; Gorlenko, Zh.M. 2008. Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from eastern Siberia permafrost sediments. *Russian Journal of Genetics*. 44(1): 36-44.
- Ni Chadhain, S.; Schaefer, J.; Crane, S.; Zylstra, G.; Barkay, T. 2006. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. *Environmental Microbiology*. 8(10): 1746-1752.
- Pan-Hou, H.; Nishimoto, M.; Imura, N. 1981 Possible role of membrane protein in mercury resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Archives of Microbiology*. 130(2): 93-95.



- Paredes, S.; Hidalgo-Prada, B.; Ávila, R.; Albornoz, A. 2007. Análisis de mineral aurífero de la mina Colombia, El Callao, Venezuela, mediante MEB/EDX Y DRX. *Acta Microscópica*. 16: s301-302.
- Parkes, R.; Linnane, C.; Webster, G.; Sass, H.; Weightman, A.; Hornbrook, R.; & Horsfield, B. 2011. Prokaryotes stimulate mineral H₂ formation for the deep biosphere and subsequent thermo-genic activity. *Geology*. 39(3): 219-222.
- Rastogi, G.; Osman, S.; Kukkadapu, R.; Engelhard, M.; Vaishampayan, P.; Andersen, G.; Sani, R. 2010. Microbial and mineralogical characterizations of soils collected from the deep biosphere of the former Homestake gold mine, South Dakota. *Microbial Ecology*. 60 (3): 539-550.
- Rastogi, G.; Gurram, R.; Bhalla, A.; Gonzalez, R.; Bischoff, K.; Hughes, S.; Kumar, S.; Sani, R. 2013. Presence of glucose, Xylose, and glycerol fermenting bacteria in the deep biosphere of the Homestake gold mine, South Dakota. *Frontiers in Microbiology*. 9: 18.
- Reniero, D.; Mozzon, E.; Galli, E.; Barbieri, P. 1998. Two aberrant mercury resistance transposons in the *Pseudomonas stutzeri* plasmid pPB. *Gene*. 208(1): 37-42.
- Reyes, N.; Marc, E.; Frischer, M.; Sobekcy, P. 1999. Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 30 (3): 273-284.
- Segawa, T.; Takeuchi, N.; Rivera, A.; Yamada, A.; Yoshimura, Y.; Barcaza, G., ... & Ushida, K. 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental Ecology of Pathogens and Resistances*. 5(1): 127-134.
- Seiler, C.; Berendonk, T. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*. 3:399.
- Sudha, A.; Augustine, N.; Thomas, S. 2013. Emergence of multi-drug resistant bacteria in the Arctic, 790N. *Journal of Cell and Life Sciences*. 1(1): 1-5.
- Summers, A. 2002. Generally Overlooked Fundamentals of Bacterial Genetics and Ecology. *Clinical Infectious Diseases*. 34: s84-s92.
- Stepanauskas, R.; Glenn, T.; Jagoe, C.; Tuckfield, R.; Lindell, A.; King, C.; & McArthur, J. V.. 2006. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*. 8(9): 1510-1514.
- Takai, K.; Moser, D.; Deflaun, M.; Onstott, T.; Fredrickson, J. 2001. Archaeal Diversity in Waters from Deep South African Gold Mines. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12): 5750-5760.
- Telmer, K.; Veiga, M. 2009. World emissions of mercury from artisanal and small scale gold mining. Pirrone N, Mason R (Eds). Springer Science + Business Media, p 131-172.
- Uchimiya, M.; Lima, L.; Thomas, K.; Chang, S.; Wartelle, L.; Rodgers, J. 2010. Immobilization of heavy metal ions (CuII, CdII, NiII, and PbII) by broiler litter-derived biochars in water and soil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 58(9): 5538-5344.
- Veiga, M.; Bermudez, D.; Pacheco-Ferreira, H.; Martins, P.; Gunson, A.; Berrios, G.; Vos, L.; Hiudobro, P.; Roeser, M. 2005. Mercury from artisanal gold mining in Block B, El Callao, Bolívar State, Venezuela. In Pirrone N and Mahaffey K (Eds). Norwell, MA, USA. Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Process and Human Exposure Around the World. Springer Publisher, p. 421-450.
- Wang, F.; Lu, S.; Orcutt, B.; Xie, W.; Chen, P.; Xiao, X.; Edwards, J. 2013. Discovering the roles of subsurface microorganisms: Progress and future of deep biosphere investigation. *Chinese Science Bulletin*. 58 (4-5): 456-467.
- Woodruff, L.; Cannon, W. 2010. Immediate and long-term fire effects on total mercury in forest soils of Northeastern Minnesota. *Environmental Science & Technology*. 44(14): 5371-5376.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín

Characterization of halophilic bacteria producing amylase isolated from San Blas Salterns in Junin

Pamela E. Canales*, **Elizabeth L. Chávez-Hidalgo ****, **Amparo I. Zavaleta *****

Resumen

El objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias halófilas con actividad amilolítica provenientes de las Salinas de San Blas-Junín, ubicadas en los Andes peruanos aproximadamente a 4100 m de altitud. Este estudio se realizó con 34 bacterias aisladas de muestras de suelos las cuales se cultivaron en agar agua de sales (SW) 5 % contenido extracto de levadura 0,5 % y almidón 1 %. El 41 % de bacterias mostró la capacidad de hidrolizar almidón, éstas fueron caracterizadas mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales. Tres bacterias fueron Gram-negativas y once Gram-positivas. El 21 % (3/14) creció en un amplio rango de concentración de sales, entre 5 y 20 %. El 14 % (2/14) de las bacterias presentó actividad lipolítica, proteolítica y nucleolítica, y el 29 % (4/14), presentó actividad proteolítica y nucleolítica. Las bacterias se identificaron mediante los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados, las enzimas usadas fueron *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I*. Los genes ribosómicos 16S de siete bacterias que presentaron perfiles de ADN diferentes se amplificaron, secuenciaron y analizaron mediante programas bioinformáticos. Del análisis fenotípico y molecular de las 14 bacterias amilolíticas se obtuvieron dos grupos, uno perteneciente al género *Halomonas* (3) y el otro, al género *Bacillus* (11). Las bacterias amilolíticas caracterizadas podrían ser de potencial uso a nivel industrial.

Palabras clave: Salinas de San Blas, amilasas, genes ribosómicos 16S, ARDRA, *Bacillus*, *Halomonas*.

Abstract

The aim of this study was to characterize halophilic amylolytic bacteria from San Blas Salterns-Junin, located in the Peruvian Andes at approximately 4 100 m of altitude. This study was conducted with 34 bacteria isolated from soil samples which were cultured in salt water medium (SW) 5 % containing 0,5 % yeast extract and 1 % starch. It was found that 41 % were starch-degrading bacteria, which were further characterized with conventional physiological and biochemical tests. Three bacteria were Gram-negative and eleven Gram-positive. Also, 21 % (3/14) was able to grow in a wide range of saltconcentration from 5 to 20 %. We reported that 14 % (2/14) of bacteria had all lipolytic, proteolytic and nucleolytic activity, and 29 % (4/14) had both proteolytic and nucleolytic activity. Bacteria were identified by restriction 16S ribosomal genes profiles, enzymes used were *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* and *Cfo I*. 16S ribosomal genes of seven isolated which showed different DNA profiles were amplified, partial sequenced and analyzed using bioinformatic programs. By both phenotypic and molecular analysis of 14 amylolytic bacteria two groups were obtained, one belonged to the genus *Halomonas* (3) and the other, to the genus *Bacillus* (11). The characterized amylolytic bacteria could have a potential industrial use.

Key words: San Blas Salterns, amylases, 16S ribosomal genes, ARDRA, *Bacillus*, *Halomonas*.

Recibido: mayo 19 de 2014

Aprobado: octubre 24 de 2014

* Químico Farmacéutica. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. p.canales.mormontoy@gmail.com.

** Químico Farmacéutica, Magíster en Biotecnología. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. echavezhdalgo@yahoo.com.

*** Químico Farmacéutica, Magíster en Ciencias, Doctor en Medicina. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1 - Perú. azavaletap@unmsm.edu.pe.



Introducción

Los ambientes hipersalinos poseen por lo general entre 8 y 10 veces mayor concentración salina que la del agua de mar, por ello son considerados extremos, varían en términos de salinidad, composición iónica, temperatura, pH y nutrientes; influenciados por la zona geográfica, el clima, la altitud, entre otros factores. Sin embargo, a pesar de las condiciones adversas son ecosistemas dinámicos y presentan gran diversidad microbiana (Bell 2012). Los microorganismos de estos ambientes producen compuestos tales como metabolitos y enzimas extracelulares con gran potencial industrial (Delgado-García et al., 2012; Enache y Kamekura, 2010). Muchas de estas enzimas pueden ser estables y activas en más de una condición extrema, como elevada salinidad y temperatura, y/o amplio rango de pH (Delgado-García et al., 2012). Actualmente, diversos procesos industriales se llevan a cabo en estas condiciones exigentes como en la hidrólisis del almidón, celulosa, entre otros.

Las amilasas hidrolizan el almidón para la obtención de dextrinas y polímeros pequeños compuestos por unidades de glucosa (Gupta et al., 2003). Estas enzimas poseen aplicaciones en diversas industrias como la alimentaria, textil, papelera, de fabricación de detergentes, entre otras (Aiyer 2005; Pandey et al., 2000). Aunque estas enzimas son producidas por procariotas y eucariotas; la fuente bacteriana es la preferida industrialmente por su crecimiento rápido y medios de cultivo poco exigentes. Así, las bacterias productoras de amilasas más descritas pertenecen al género *Bacillus*, entre éstas: *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Prakash y Jaiswal, 2010). A la vez, se han reportado algunas bacterias amilolíticas halófilas como *Chromohalobacter sp.* (Prakash et al., 2009), *Halobacillus sp.* (Amoozegar et al., 2003), *Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000), *Bacillus dipsosauri* (Deutch 2002) y *Micrococcus sp.* 4 (Khire 1994).

Actualmente, con el creciente desarrollo industrial surge la necesidad de buscar nuevos microorganismos productores de amilasas eficientes con mejores características catalíticas. Al respecto, Babavalian et al. (2013) aislaron bacterias con actividad hidrolítica del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán. Ghozlan et al. (2006) reportan la biodiversidad y capacidad hidrolítica de bacterias halófilas moderadas de diferentes ambientes hipersalinos en Alejandría-Egipto, Cojoc et al. (2009) estudiaron bacterias productoras de enzimas extracelulares aisladas de una mina de sal en Slanic Prahova-Rumania, Sánchez-Porro et al. (2003) aislaron diversas bacterias halófilas moderadas productoras de enzimas hidrolíticas de diferentes ambientes hipersalinos en España. Así también, Prakash et al. (2009) reportaron la producción y purificación de amilasas bacterianas.

A nivel industrial, la degradación del almidón requiere diversas condiciones catalíticas desde muy suaves hasta extremas, por ello la búsqueda de bacterias productoras de amilasas de ambientes hipersalinos permitiría obtener fuentes alternativas de enzimas con nuevas características. En ese sentido, este estudio describe las características fenotípicas y genotípicas de bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas, ubicadas en los Andes peruanos.

Materiales y Métodos

Muestras. El estudio se realizó con 34 bacterias aisladas de muestras de suelos de las Salinas de San Blas ubicadas en el distrito de Ondores, provincia de Junín, departamento de Junín (Perú), aproximadamente a 4100 de altitud entre las coordenadas geográficas 11°06'25" L.S. y 76°10'58" L.O. Para el aislamiento de los microorganismos se empleó el medio líquido agua de sales (SW) 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 % (Dyall-Smith 2006). El medio agua de sales a la concentración final de 5 % (g/L) contiene: NaCl 40,0; MgSO₄.7H₂O 5,83; MgCl₂.6H₂O 5,0; KCl 1,17; NaBr 0,13; CaCl₂ 0,083; NaHCO₃ 0,03, y suplementando con extracto de levadura 0,5 %. Medios sólidos SW fueron preparados adicionando 15 g/L de agar. Después, se realizaron tres pasajes sucesivos alternando medios sólidos y líquidos de SW 5 %. Finalmente, las bacterias se conservaron en agar SW 5 % con glicerol 5 % en refrigeración.

Selección de bacterias amilolíticas. Las bacterias se cultivaron en placas con medio agar almidón suplementado con 5 % de sales, se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad amilolítica se detectó mediante la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias después de la adición de solución de lugol sobre las placas (Amoozegar et al., 2003). Las bacterias amilolíticas fueron seleccionadas para su posterior estudio.

Características fisiológicas. Se realizó la tinción Gram y se determinaron las características morfológicas de las colonias. Además, se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias a concentraciones salinas de 0, 5, 10, 15 y 20 %, p/v; y a pH de 5, 6, 7, 8 y 9. Ambas pruebas se realizaron en medio líquido SW suplementado con 0,5 % de extracto de levadura.

Actividades hidrolíticas extracelulares. Se realizaron diversos ensayos en medios sólidos, todos a la concentración de 5 % de sales, según se describe a continuación.

La actividad proteolítica se determinó en placas de agar SW 5 % suplementado con skim milk 1 % y extracto de levadura 0,2 %. La formación de halos translúcidos alrededor de las colonias después de 48 h de incubación a 37 °C indicó la producción de proteasas (Ardakani et al., 2012).



La actividad lipolítica se determinó en placas de agar SW 5 % suplementado con tributirina 1 %, tritón X-100 0,1 % y extracto de levadura 0,2 %. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h. La formación de halos alrededor de las colonias indicó la producción de lipasas (Sharma et al., 2001).

La actividad celulolítica se evidenció en placas de agar SW 5 % suplementado con carboximetilcelulosa 1 % y extracto de levadura 0,2 %. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Se usó solución roja de congo 1 % como revelador. La formación de halos alrededor de las colonias indicó la presencia de celulosas (Teather y Wood, 1982).

La producción de DNasa se determinó en agar DNA suplementado con 5 % de sales, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se empleó como revelador HCl 0,1N. La formación de halos alrededor de las colonias se reportó como actividad positiva (Onishi et al., 1983).

Amplificación de los genes ribosómicos 16S. Se extrajo el ADN de las bacterias de acuerdo al método de solventes orgánicos según lo descrito por Chávez-Hidalgo (2010). Los genes ribosómicos 16S fueron amplificados usando cebadores universales específicos para el dominio Bacteria 16SBF 5'-AGAGTTGATCATG-GCTCAG-3' y 16SBR 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'. El volumen final de la reacción de amplificación fue de 25 µL, y contenía 50 pM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, KCl 50 µM, Tris/HCl 10 µM, tritón X-100 0,1 % (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, Taq ADN-polimerasa 1,5 U y ADN 50 ng.

Las condiciones de reacción fueron: 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min. Luego, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X. Se empleó como marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Invitrogen).

ARDRA. Los productos amplificados de los genes ribosómicos 16S se cortaron con 5 U de enzima de restricción por µg de producto amplificado. La enzimas fueron: *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I* (Fermentas). Las condiciones de reacción usadas fueron según las especificaciones del fabricante, a excepción del tiempo de incubación que fue de 8 h a 37 °C. Luego de este periodo los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve 3:1 al 3 % con buffer TBE 0,5X, los fragmentos de ADN se visualizaron por coloración con bromuro de etidio en un transiluminador UV a 254 nm. Se utilizó como marcador de peso molecular DNA φX174/*Hae III*. El análisis de los perfiles de restricción se realizó comparando los perfiles de ADN de una cepa con respecto a otra. La similitud de los perfiles fue estimada mediante el coeficiente de concordancia simple y el dendrograma

de similitud obtenido mediante el análisis de agrupamiento de pares por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA).

Secuenciamiento y análisis filogenético. Las bacterias que presentaron perfiles de ADN ribosómico 16S distintos fueron secuenciadas parcialmente. Se solicitó el servicio de secuenciación del Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humboldt" de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante el programa BLAST (Zhang et al., 2000).

El alineamiento múltiple de las secuencias de las bacterias y de las obtenidas en la base de datos se realizó con el programa CLUSTALX versión 2.1 (Jeanmougin et al., 1998), el alineamiento fue editado manualmente con el programa BIOEDIT versión 7.0.5.3. El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA versión 5.0 (Tamura et al., 2011) empleando los métodos neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y minimum-evolution (Rzhetsky y Nei, 1993). El análisis de bootstrap de 1000 replicaciones fue usado para evaluar la estabilidad relativa de las ramas del árbol filogenético (Felsenstein 1985).

Resultados y Discusión

A nivel mundial, existen numerosos ambientes hiper-salinos conteniendo gran diversidad de bacterias con potencial biotecnológico, sin embargo, los estudios realizados son aún escasos.

Selección y caracterización de bacterias amilolíticas. Las bacterias fueron aisladas a partir de muestras de suelos de las Salinas de San Blas ubicadas en los Andes peruanos aproximadamente a 4 100 m de altitud, entre las coordenadas geográficas 11°06'25" LS. y 76°10'58" LO. Las condiciones ambientales en este lugar son agrestes, con temperatura promedio de 6 °C y fuerte radiación solar durante el día (Morales 1998); a pesar de estas condiciones existe diversidad de microorganismos. Así, Maturrano et al. (2006) estudiaron la diversidad microbiológica de las Salinas de Maras (Cusco) ubicadas también en los Andes peruanos. A la vez, Flores et al. (2010) reportaron bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas provenientes de los ambientes salinos de Maras, Pilluana, Chilca y Paracas.

El 41 % (14/34) de las bacterias de las Salinas de San Blas presentó actividad amilolítica. Estas bacterias se denominaron como ESB 30, ESB 31, ESB 32, ESB 34, ESB 37, ESB 42, ESB 51, ESB 53, ESB 61, ESB 66, ESB 68, ESB 71, ESB 73 y ESB 79. De igual forma, Babavalian et al. (2013) describen que el 39 % de bacterias aisladas del lago hipersalino Aran-Bidgol en Irán fueron productoras de amilasas. Además, Cojoc et al. (2009) reportaron que el 32 % de las bacterias aisladas de



una mina salina en Slanic Prahova-Rumania fueron productoras de amilasas. Por otra parte, las 14 bacterias produjeron diversos tamaños de halos de hidrólisis en placas con agar almidón, el 21 % entre dos y tres cm de diámetro, el 36 % entre 1 y 2 cm, y el 43 % menor a 1 cm (tabla 1).

Todas las cepas fueron bacilos, tres Gram-negativos y once Gram-positivos, asimismo la morfología de las colonias fue variada. Trece de las bacterias fueron capaces de crecer en medios a pH entre 5 y 9. Además, tres crecieron en un amplio rango salino entre 5 y 20 %. De acuerdo a la clasificación propuesta por Kushner (1978), el 43 % de las bacterias fueron halófilas moderadas y el 57 % halotolerantes (tabla 1). En general, los bacilos Gram-positivos presentaron capacidad hidrolítica más diversa que los Gram-negativos, además de la actividad amilolítica presentaron capacidad proteolítica, lipolítica y nucleolítica, mientras que los Gram-negativos sólo exhibieron actividad amilolítica y nucleolítica.

Actividad hidrolítica de las bacterias. La capacidad para producir cuatro diferentes enzimas hidrolíticas fue evaluada cualitativamente en las 14 bacterias productoras de amilasas. No se detectó ninguna bacte-

ria capaz de degradar celulosa, posiblemente debido a la baja cantidad de este polímero en el ambiente hipersalino. Dos bacterias presentaron cuatro actividades hidrolíticas combinadas (amilolítica, lipolítica, proteolítica y nucleolítica), cuatro presentaron tres y cinco mostraron dos actividades hidrolíticas (tabla 2). Al respecto, Sánchez-Porro *et al.* (2003) reportaron sólo cuatro bacterias con cinco hidrolasas (amilasa, proteasa, lipasa, DNasa y pululanasa), 36 con tres y 20 con dos de 122 bacterias halófilas moderadas aisladas de ambientes hipersalinos en España. En el estudio de Babavalian *et al.* (2013), de 83 bacterias halófilas moderadas se reportaron bacterias que produjeron desde dos hasta ocho hidrolasas.

Análisis ARDRA. El producto amplificado de los genes ribosómicos 16S midió aproximadamente 1400 pb, después la digestión con las enzimas de restricción produjo fragmentos de diferentes tamaños. Con *Hae III* se obtuvieron fragmentos entre 118 y 603 pb; *BstU I*, de 61 a 1335 pb; *Hinf I*, de 120 a 1353 pb; y *Cfo I*, de 155 a 1306 pb (figura 1). Un total de 5, 4, 6 y 5 perfiles de restricción fueron identificados con *Hae III*, *BstU I*, *Hinf I* y *Cfo I*, respectivamente.

Tabla 1. Características fenotípicas de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín

Bacterias	Características						
	Morfología	Tinción Gram	Color de la colonia	Forma de la colonia	Rango de sales (% p/v)	Rango de pH	Tamaño de halo de hidrólisis (mm)*
ESB 30	bacilo	+	crema claro	redonda	5-15	5-9	26
ESB 31	bacilo	-	crema	redonda	5-20	5-9	9
ESB 32	bacilo	-	amarillo tenue	amorfa	5-20	5-9	18
ESB 34	bacilo	+	crema oscuro	redonda	0-15	5-9	24
ESB 37	bacilo	+	crema	redonda	0-10	5-9	6
ESB 42	bacilo	+	crema	redonda	0-15	5-8	17
ESB 51	bacilo	+	anaranjado	redonda	5-15	5-9	8
ESB 53	bacilo	+	crema amarillo	redonda	0-15	5-9	25
ESB 61	bacilo	+	crema	redonda	0-15	5-9	8
ESB 66	bacilo	+	crema claro	amorfa	0-10	5-9	17
ESB 68	bacilo	+	crema claro	redonda	5-10	5-9	8
ESB 71	bacilo	+	crema amarillo	redonda	0-15	5-9	15
ESB 73	bacilo	+	amarillo tenue	redonda	0-10	5-9	12
ESB 79	bacilo	-	amarillo tenue	amorfa	5-20	5-9	8

* En placas de agar almidón.



Tabla 2. Hidrólisis de sustratos de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín

Cepa bacteriana	Hidrólisis de sustratos			
	Tributirina	Caseína	CMC*	DNA
ESB 30	+	+	-	+
ESB 31	-	-	-	+
ESB 32	-	-	-	-
ESB 34	-	+	-	+
ESB 37	-	+	-	-
ESB 42	-	+	-	+
ESB 51	-	+	-	+
ESB 53	-	+	-	+
ESB 61	-	+	-	-
ESB 66	-	-	-	-
ESB 68	-	+	-	-
ESB 71	+	+	-	+
ESB 73	-	+	-	-
ESB 79	-	-	-	-

* CMC: carboximetilcelulosa.

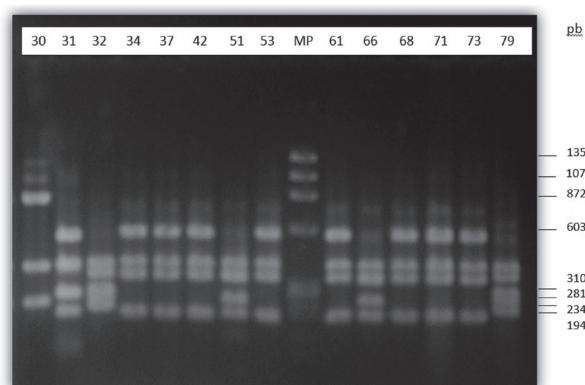


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Se observan los patrones de bandas producto de la digestión de los genes ribosómicos 16S con *Cfo I*. 30, ESB 30; 31, ESB 31; 32, ESB 32; 34, ESB 34; 37, ESB 37; 42, ESB 42; 51, ESB 51; 53, ESB 53; 61, ESB 61; 66, ESB 66; 68, ESB 68; 71, ESB 71; 73, ESB 73; 79, ESB 79, MP, marcador de peso molecular DNA φX174/*Hae III*.

Del análisis de los perfiles de restricción usando el coeficiente de concordancia simple y el UPGMA se obtuvo el dendrograma de similitud. El dendrograma de similitud muestra que las bacterias en su mayoría se asocian con un nivel de similitud de 75 % en cuatro grupos denominados como A, B, C y D. Sólo la cepa ESB30 formó un grupo individual (figura 2).

ARDRA es una técnica para el análisis de la estructura de comunidades microbianas cuando se cumplen determinadas condiciones que eliminan las falsas similitudes, como el uso de varias enzimas de restricción o de genes de rápida evolución. En el dendrograma de similitud obtenido se observan dos brazos principales, luego a partir de los cuales se diferencian los grupos A, B, C y D. Estos brazos principales coinciden con las dos grandes ramas que los géneros *Bacillus* y *Halomonas* forman en el árbol filogenético. Así también, se puede señalar que las cepas ESB 32 y ESB 79 se encuentran estrechamente relacionadas entre ellas en el árbol filogenético, al igual que en el análisis ARDRA. Es así que, la topología del dendrograma obtenido a partir de los perfiles de ADN es similar a la basada en las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S (figuras 2 y 3). Esto muestra que el análisis de los patrones de ADN de genes considerados cronómetros moleculares es consistente con las secuencias nucleotídicas. ARDRA ha mostrado ser útil en la agrupación de aislamientos bacterianos de diversos orígenes para su posterior identificación (Yeon et al., 2005).

Secuenciamiento y análisis filogenético. En base al análisis molecular y a las características fenotípicas, las bacterias fueron identificadas como miembros de los géneros *Halomonas* y *Bacillus* (figura 3).

Las tres bacterias Gram-negativas fueron identificadas como miembros del género *Halomonas*, mientras que

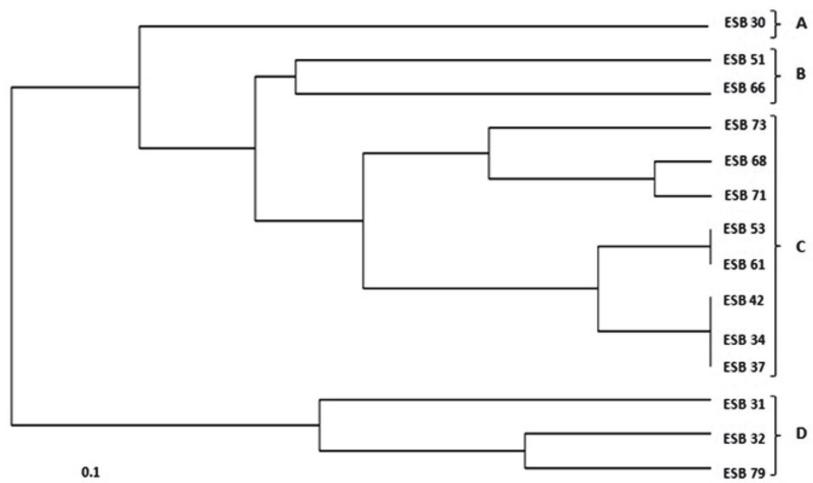


Figura 2. Dendrograma de similitud de las bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas-Junín. Obtenido de la comparación de los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados.

las once bacterias Gram-positivas, como miembros del género *Bacillus*. Sánchez-Porro *et al.* (2003) reportó resultados similares, señalando como géneros Gram-negativos predominantes *Salinibrio* y *Halomonas*, y como Gram-positivos predominantes, *Bacillus* y *Salibacillus*. Resultados diferentes describieron Rohban *et al.* (2009) quienes reportan como género Gram-negativo predominante a *Salicola* y entre los Gram-positivos, los géneros *Virgibacillus* y *Thalassobacillus* de bacterias halófilas aisladas del lago hipersalino Howz Soltan-Irán. Las características propias de cada ambiente hipersalino puede influir en la diversidad microbiana e incluso en las características que los microorganismos pueden desarrollar (Bell 2012); es por ello que al comparar los estudios de ambientes hipersalinos, la diversidad y características de los microorganismos varía.

En estudios similares, se identificaron bacterias halófilas productoras de amilasas, tal como Babavalian *et al.* (2013) quienes identificaron como principales géneros amilolíticos *Halobacillus*, *Thalassobacillus* y *Halomonas*. Ellos también identificaron representantes del género *Bacillus* pero con crecimiento débil en pH neutro y sin crecimiento a valores más bajos de pH, a diferencia de nuestro estudio donde todas las cepas de *Bacillus* crecieron desde pH 5 hasta 8-9. También reportaron la producción de proteasas y lipasas en algunas cepas amilolíticas de *Halomonas*, a diferencia de nuestro estudio donde sólo reportamos DNasea en cepas amilolíticas de *Halomonas*. Así también, Rohban *et al.* (2009) reportaron como productores de amilasas, los géneros *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Piscibacillus* y *Salinicoccus*. A diferencia de nuestro estudio, algunos representantes de *Halomonas* mostraron actividad celulolítica. Es así que las cepas aisladas

de las Salinas de San Blas tienen características propias de acuerdo a las condiciones en dicha salina.

Cabe mencionar que el género *Bacillus* detectado en este estudio es ampliamente reconocido como productor de enzimas para diversos procesos industriales (Prakash y Jaiswal, 2010; Nascimento y Martins, 2004). Muchos microorganismos halófilos presentan actividad hidrolítica combinada, lo cual representa una ventaja para varios procesos industriales, como en el tratamiento de residuos que contienen alta salinidad. Las amilasas y otras enzimas provenientes de microorganismos halófilos se espera que muestren actividades óptimas en condiciones extremas. Así, este estudio permite tener un mayor conocimiento sobre la diversidad y capacidad hidrolítica de bacterias halófilas aisladas de ambientes hipersalinos peruanos. Muchas de sus enzimas podrían ser activas bajo condiciones extremas, lo cual las convertiría en fuentes promisorias para uso industrial, para lo cual se requerirían estudios posteriores.

Conclusiones

De las Salinas de San Blas, Ondores-Junín, se aislaron 14 bacterias con actividad amilolítica, pertenecientes 11 al género *Bacillus* y 3 a *Halomonas*. Estos microorganismos crecen en diversos rangos salinos y dos de ellos son capaces de producir proteasas, lipasas y DNases.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente con los contratos 017-Fincyt-PIBAP-2008, y VRI-UNMSM 2012.

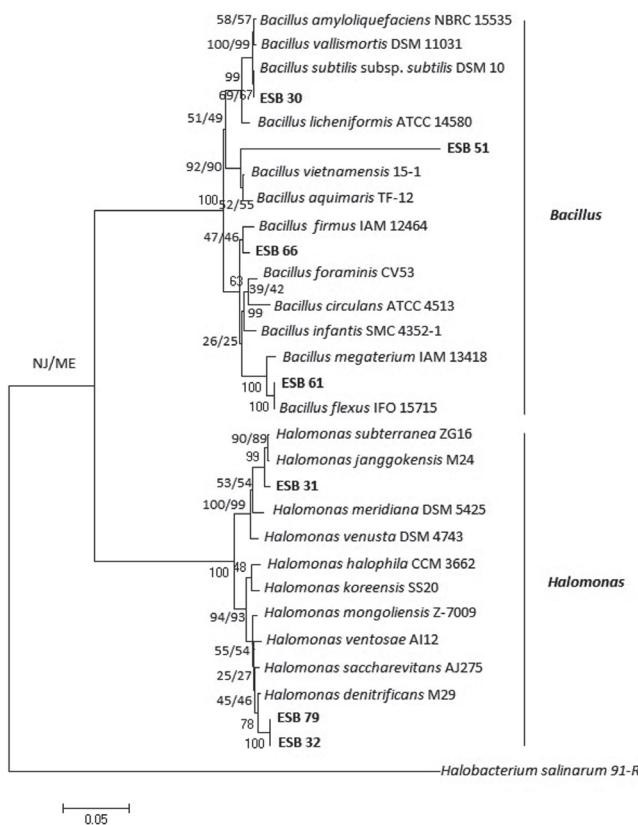


Figura 3. Árbol filogenético mostrando la posición de las bacterias de las Salinas de San Blas-Junín. Basado en la comparación de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S y analizado con Mega 5.0.

Referencias bibliográficas

- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*. 4(13):1525-1529.
- Amoozegar, M.A.; Malekzadeh, F.; Malik, K.A. 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*. 52(3):353-359.
- Ardakani, M.R.; Poshtkouhian, A.; Amoozegar, M.A.; Zolgharnein, H. 2012. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from persian gulf. *Indian Journal of Microbiology*. 52(1):94-98.
- Babavalian, H.; Amoozegar, M.A.; Pourbabaei, A.A.; Moghaddam, M.M.; Shakeri, F. 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology*. 82(4):466-474.
- Bell, E.; editor. 2012. *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. Wallingford: CABI, p 554.
- Chávez-Hidalgo, E.L. 2010. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Cojoc, R.; Merciu, S.; Popescu, G.; Dumitru, L.; Kamekura, M.; Enache, M. 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*. 14 (5):4658-4664.
- Coronado, M.-J.; Vargas, C.; Hofemeister, J.; Ventosa, A.; Nieto, J.J. 2000. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 183(1):67-71.
- Delgado-García, M.; Valdivia-Urdiales, B.; Aguilar-González, C.N.; Contreras-Esquivel, J.C.; Rodríguez-Herrera, R. 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(13): 2575-2580.
- Deutch, C.E. 2002. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in Applied Microbiology*. 35(1):78-84.
- Dyall-Smith, M.; editor. 2006. *The halohandbook. Protocols for halarchaeal genetics*. Melbourne: University of Melbourne. p 144.
- Enache, M.; Kamekura, M. 2010. Hydrolitic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*. 47(1):47-59.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-791.
- Flores, M.L.; Zavaleta, A.I.; Zambrano, Y.; Cervantes, L.; Izaguirre, V. 2010. Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*. 13(1):42-46.
- Ghazlan, H.; Deif, H.; Kandil, R.A.; Sabry, S. 2006. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 52(2):63-72.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38(11):1599-1616.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J.D.; Gouy, M.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(10): 403-405.



- Khire, J.M. 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt-pan. *Letters in Applied Microbiology*. 19(4): 210-212.
- Kushner, D.J.; editor. 1978. *Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria*. In *Microbial Life in Extreme Environments*. London: Academic Press, p 317-368.
- Maturrano, L.; Santos, F.; Rosselló-Mora, R.; Antón, J. 2006. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6):3887-3895.
- Morales, D. 1998. Importancia de las Salinas de San Blas durante el periodo formativo en la Sierra Central del Perú. *Boletín de Arqueología PUCP*. (2): 273-288.
- Nascimento, W.C.A.D.; Martins, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35(1-2):91-96.
- Onishi, H.; Mori, T.; Takeuchi, S.; Tani, K.; Kobayashi, T.; Kamekura, M. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp.: production, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(1):24-30.
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D.; Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31:135-152.
- Prakash, B.; Vidyasagar, M.; Madhukumar, M.S.; Muralikrishna, G.; Sreeramulu, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*. 44(2):210-215.
- Prakash, O.; Jaiswal, N. 2010. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160(8):2401-2414.
- Rohban, R.; Amoozegar, M.A.; Ventosa, A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36(3): 333-340.
- Rzhetsky, A.; Nei, M. 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*. 10(5):1073-1095.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425.
- Sánchez-Porro, C.; Martín, S.; Mellado, E.; Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2):295-300.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19(8):627-662.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10):2731-2739.
- Teather, R.M.; Wood, P.J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(4):777-780.
- Yeon, S-H.; Jeong, W-J.; Park, J-S. 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *The Journal of Microbiology*. 43(1):1-10.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7(1-2):203-214.



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Variación temporal a *Microcyclus ulei* en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones controladas

Temporal variation to *Microcyclus ulei* in rubber tree clones FX 3864 and FX 4098 under controlled conditions

Armando Sterling Cuéllar*, Luz Marina Melgarejo**

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la variación temporal de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de dos clones (FX 3864 y FX 4098) de *Hevea brasiliensis* a *Microcyclus ulei* en condiciones controladas. Las inoculaciones se realizaron en cámara húmeda a 23 °C, una humedad relativa superior al 90% y un fotoperíodo de 12 h. Con un modelo de medidas repetidas en el tiempo y mediante correlaciones se analizaron cuatro variables: severidad de ataque (SA), intensidad de esporulación conidial (IE), tamaño de lesión (TL) y frecuencia de infección (FI). *M. ulei* generó síntomas en los dos clones a los 4 días después de la inoculación. Los signos de la enfermedad (IE= 3) se manifestaron a los 8 días en el clon FX 3864 y a los 12 días en el clon FX 4098. FX 3864 presentó la mayor susceptibilidad a *M. ulei* (mayor severidad y una esporulación alta, IE= 4). En general, se observó una influencia del tiempo en la reacción de cada clon para las variables SA, IE y TL. Altas correlaciones significativas se encontraron entre SA y las variables IE, TL y FI, excepto en el día 12 para IE. Este estudio permite concluir que en condiciones controladas la intensidad y la frecuencia de los síntomas así como el grado de esporulación producidos por *M. ulei* cambian significativamente a través del tiempo y esta variación está influenciada a su vez por el nivel de susceptibilidad a *M. ulei* presentado por cada clon de *H. brasiliensis*.

Palabras clave: *Hevea brasiliensis*, mal suramericano de las hojas, severidad, esporulación.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of temporal variation on the main physiological components associated with the reaction to *Microcyclus ulei* of two rubber tree clones of *Hevea brasiliensis* under controlled conditions. Inoculations were performed in a moist chamber at 23 °C, a relative humidity higher than 90% and a photoperiod of 12 h. The variables severity of attack (SA), conidial sporulation intensity (IE), lesion size (TL) and infection frequency (IF) were analyzed with a repeated over time measurements model and also with correlations. *M. ulei* produced symptoms (SA, TL, FI) in both rubber tree clones 4 days after inoculation. Signs of the disease (IE = 3) appeared in the FX 3864 at day 8th and in the FX 4098 at day 12th. FX 3864 presented higher susceptibility to *M. ulei* (greater severity and high sporulation, with IE = 4). In general, the time influenced the reaction of each clone, especially in the variables SA, IE and TL. High significant correlations were found between SA and the variables IE, TL and FI, except on day 12 for IE. It was concluded that intensity and frequency of symptoms and the degree of sporulation produced by *M. ulei* change significantly over time under controlled conditions and this variation is influenced also by the level of susceptibility to *M. ulei* showed by each clone of *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*, South American leaf blight, severity, sporulation.

Recibido: mayo 5 de 2014

Aprobado: octubre 20 de 2014

* Biólogo, MSc., Candidato a Doctor en Ciencias - Biología, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Investigador Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi Sede Florencia, Florencia – Colombia. asterling@sinchi.org.co; asterling@unal.edu.co (Autor para correspondencia)

** Bióloga, PhD. Profesora titular, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. lmmelgarejom@unal.edu.co



Introducción

El caucho natural [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg.] es una especie de origen suramericano productora de látex destinado principalmente a la industria llantera (Compagnon, 1998). A nivel mundial, el Sudeste Asiático produce el 93% del caucho natural, África el 4% y América Central y del Sur el 3 %. Tailandia, Indonesia y Malasia concentran el 66,5% de la producción, siendo éstos los principales países productores (IRSG, 2013).

En Colombia, a diciembre de 2013 se reportó la existencia de 44.100 ha cultivadas de caucho (producción anual de 3.950 toneladas), constituidas principalmente por clones introducidos de origen asiático, africano y americano (STN, 2013). Caquetá es el departamento con mayor tradición cauchera de Colombia y el tercero en área sembrada con 6.017 ha de caucho, de las cuales 1.581 ha son plantaciones en etapa productiva con una producción de 1.89,4 toneladas de caucho seco por año (Asoheca, 2014).

Dada la importancia del caucho natural y su creciente demanda actual en el mercado nacional, esta situación impone al sector heveícola colombiano el reto no sólo de incrementar las áreas de siembra sino además identificar para las diferentes regiones del país los clones apropiados con mejor desempeño y tolerancia a los principales limitantes del cultivo, especialmente al principal problema fitosanitario, el mal suramericano de las hojas, por sus siglas en inglés SALB (South American Leaf Blight) causada por el hongo ascomiceto *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx (Gasparotto et al., 2012).

Esta enfermedad reviste gran importancia porque produce defoliaciones prematuras repetidas, reduce la actividad fotosintética de la planta, disminuye la producción de látex entre un 20% y 75% (Chee y Holliday, 1986) y puede ocasionar la muerte de la planta (Gasparotto et al., 2012). Actualmente, el uso del mejoramiento genético para la generación de materiales con resistencia horizontal al SALB representa la principal estrategia para el manejo de la enfermedad (Gasparotto et al., 2012).

Sin embargo, en Colombia y en zonas de no escape al SALB como la región amazónica, *M. ulei* constituye la principal amenaza para el establecimiento de nuevas plantaciones de *H. brasiliensis* a escala comercial (Castellanos et al., 2009). En el Departamento del Caquetá (Amazonia colombiana) los cultivares de caucho natural: IAN 873, IAN 710 y FX 3864 han reducido el desempeño en etapa improductiva (Sterling y Correa, 2010) y se ha incrementado la susceptibilidad al SALB (Sterling et al., 2009, 2010a, b). Esta situación pone en riesgo el desarrollo de nuevas plantaciones de caucho en la región amazónica colombiana, debido a la poca variabilidad en su base genética y a la pérdida de resistencia al hongo *M. ulei* (Sterling et al., 2010a, b).

Variación temporal a *Microcyclus ulei*

Lo anterior ha impulsado a nivel regional la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia genética a *M. ulei* dentro las cuales se ha destacado el clon FX 4098 como un material con promisorio para la región amazónica colombiana (Sterling et al., 2010a, 2011, 2012). No obstante, aún se requiere evaluar diversos componentes fisiológicos asociados a la reacción del *Hevea* a *M. ulei* dentro de la interacción hospedero-parásito de acuerdo con el clon y la variabilidad fisiológica del patógeno, antes de ofrecer una recomendación final a nivel del productor.

Los diversos estudios realizados sobre el efecto del SALB en *H. brasiliensis* han dilucidado en condiciones controladas varios de los mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados con la resistencia parcial (García et al., 1999), la variabilidad fisiológica de *M. ulei* (Junqueira et al., 1990, Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a) y la influencia de las condiciones ambientales en la dinámica epidemiológica de la enfermedad (Furtado et al., 2008; Guyot et al., 2010).

Aunque son diversos los estudios que han contribuido con el análisis de los principales componentes de resistencia a *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada, es necesario fundamentar el efecto del progreso de la infección sobre los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción al SALB en clones de caucho con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad. Dicho conocimiento es importante para la detección y la valoración en el tiempo del impacto del estrés ocasionado por el SALB en *H. brasiliensis* y a partir de esto diseñar estrategias de manejo adecuadas que permitan realizar un control integrado de la enfermedad.

Al respecto se presume que el desarrollo del SALB debe estar influenciado no sólo por la interacción hospedero-parásito, sino también por la dinámica temporal de los síntomas y signos producidos por *M. ulei* de una manera diferencial según el nivel de susceptibilidad presentado por el respectivo clon de *H. brasiliensis*.

De acuerdo con lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar la variación temporal de los principales componentes fisiológicos relacionados con la reacción a *M. ulei* de dos clones de caucho (FX 3864 y FX 4098) con distinta susceptibilidad al SALB en condiciones de inoculación controlada en Caquetá (Colombia).

Materiales y métodos

Área de estudio y condiciones de inoculación

El estudio se realizó en el cuarto climatizado del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi en Florencia, Caquetá (Colombia), municipio localizado entre las coordenadas 1° 37' 03" de latitud Norte y 75° 37' 03" de longitud Oeste (IGAC, 2010). Al interior del cuarto



climatizado se adecuaron 10 cubículos (cabinas para inoculación). Cada cubículo con dimensiones de 1,3 m x 1,2 m x 2,5 m, se construyó en plástico negro con armazón en madera y con dos aperturas (un tragaluces y una puerta) para el control de entrada del aire climatizado. La temperatura del aire se controló a 23 °C mediante el uso de dos aires acondicionados de 12000 Btu cada uno tipo mini split con filtro deshumificador. El control de la humedad relativa (> 90%) se manejo mediante un sistema de riego independiente por goteo. Finalmente dentro de cada cubículo se manejo un fotoperíodo de 12 h mediante la adecuación de un temporizador y cuatro lámparas fluorescentes de 40 W (PAR= 11.5 µmol fotones/m².s²) (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010 a, b).

Fuente de inóculo

Se empleó el aislamiento CVI2 de *M. ulei* perteneciente al banco de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Sinchi. Este aislamiento se obtuvo *in vitro* a partir de lesiones conidiales presentes en foliolos infectados en campo (vivero del género *Hevea* del Instituto Sinchi, Itarca, La Montañita, Colombia) y escogido por su virulencia (Sterling et al., 2011). El aislamiento fue conservado en medio de crecimiento (MC) (adaptado de Junqueira et al., 1984) en oscuridad a 24 °C y esporulado en medio M4 (papa dextrosa agar – PDA) (adaptado de Mattos, 1999) con un fotoperíodo de 12 h. El inóculo primario, consistió de conidios crecidos *in vitro* los cuales se depositaron con un pincel pelo de marta (No. 2) en el envés de foliolos en estadio B2 (Halle et al., 1978) de plantas de un clon altamente susceptible (PB 260) (Sterling et al., 2009). Las esporas se recolectaron a partir de foliolos lesionados 8 días después de la inoculación con un pincel pelo de marta estéril y humedecido con Tween 80 al 0,05%. Se preparó en agua destilada estéril una sus-

pensión de inóculo de 2 x 10⁵ conidios/ml (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a, b).

Material vegetal

Se utilizaron los clones FX 4098 y FX 3864 (tabla 1) procedentes del Jardín clonal del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi en Florencia, Caquetá (Colombia). La identidad varietal del clon FX 3864 fue confirmada por Fonseca y Aristizabal (2010) y la del clon FX 4098 por Quintero et al. (2012), mediante el uso de la técnica SSR usando cinco pares de cebadores microsatélites del genoma de *H. brasiliensis*: hmac4, hmac5, hmct1, hmct5 (Saha et al., 2005), y M574 (Lespinasse et al., 2000; Lekawipat et al., 2003).

Por cada clon de *H. brasiliensis* se emplearon plántulas de 4 meses de edad (dos pisos foliares) crecidas en bolsa con suelo de 7 Kg dentro de cubetas plásticas de 20 cm x 30 cm y mantenidas en una casa de malla a un temperatura promedio de 29,7 °C, una humedad relativa media de 80,8% y una radiación PAR promedio de 275 µmol fotones/m².s. El material vegetal fue fertilizado periódicamente cada dos meses de acuerdo con sus requerimientos nutricionales (Viegas et al., 1992) con aplicaciones edáficas de NPK [Triple 15® (5 g/plántula)] y elementos menores [Agriminis® (5 g/plántula)]. Para las inoculaciones se seleccionaron plántulas libres de síntomas por deficiencias nutricionales o por ataque de plagas o patógenos (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a, b).

Inoculaciones controladas y diseño experimental

Las inoculaciones se realizaron en cuarto climatizado a 23 °C y una humedad relativa superior al 90%. Se utilizó una concentración de inóculo de 2 x 10⁵ conidios/ml la cual se asperjó en el envés de 12 foliolos jóvenes (12 días de edad) en estadio B₂ (Hallé et al. (1978) pertenecientes al segundo piso foliar de cada

Tabla 1. Descripción de los clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) evaluados por la reacción a *Microcyclus ulei* en condiciones de inoculación controlada.

Clon	Progenitores	Especie de Hevea	Origen	Tipo de reacción a <i>M. ulei</i>	Descripción general
FX 4098	PB 86 x B 110	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. brasiliensis</i>	Brasil	Resistente	Clon producido por la compañía Ford en Brasil, con características de alta productividad (Mattos et al., 2007), crecimiento vigoroso (Sterling y Correa, 2010; Sterling et al., 2012) con susceptibilidad al secamiento del panel. Resistencia parcial a <i>M. ulei</i> (Le Guen et al., 2008, Sterling et al. 2009, 2010; Rivano et al., 2010).
FX 3864	PB 86 x FB 38	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. brasiliensis</i>	Brasil	Susceptible	Clon secundario desarrollado por la compañía Ford, en el Brasil, resultante del cruzamiento intra específicos de los clones primarios de <i>Hevea brasiliensis</i> . Susceptible a <i>M. ulei</i> (Junqueira et al., 1988; Matos et al., 2003; Sterling et al., 2009)



planta con la ayuda de un aerógrafo acondicionado con un compresor eléctrico calibrado a 4.5 Pa de presión (Sterling et al., 2010a, b). Luego de la inoculación, las plantas permanecieron 24 horas en oscuridad y a partir de ahí hasta el día 20 se sometieron a un fotoperíodo de 12 h (radiación fotosintéticamente activa, PAR: 11.5 $\mu\text{mol fotones/m}^2\text{s}$).

El experimento consistió en un diseño completamente al azar con dos tratamientos (clon resistente inoculado FX 4098 y clon susceptible inoculado - FX 3864) con cinco repeticiones. La unidad experimental correspondió a cada una de las plantas inoculadas. El experimento se realizó por triplicado.

Evaluación de la enfermedad- componentes fisiológicos

A partir del día 1 después de la inoculación y en adelante hasta el día 20 se evaluaron en cuarto climatizado las siguientes variables:

Severidad de ataque (SA), adaptada de la escala de Gasparotto et al. (1989): definida como el porcentaje de área foliar lesionada, valorada de 0 a 4: 0= nulo (0% de área foliar afectada); 1= bajo (0,2 - 5% del área foliar afectada); 2= medio (6 - 15% del área foliar afectada); 3= alto (18 - 30% del área foliar afectada); 4= muy alto (40 - 100% del área foliar afectada).

Intensidad de esporulación conidial (IE) de 1 a 6: 1= lesiones necróticas sin esporas; 2= lesiones cloróticas sin esporas; 3= esporulación muy baja y heterogénea sobre la cara inferior de los foliolos; 4= esporulación alta, heterogénea o parcial sobre la cara inferior de los foliolos; 5= esporulación muy alta y uniforme cubriendo la lesión entera sobre la cara inferior de los foliolos; y 6= esporulación muy alta cubriendo la lesión entera sobre ambas caras de los foliolos (Mattos et al., 2003).

Tamaño de lesión (mm) (TL): el diámetro promedio de la lesión fue calculado a partir de la medición del diámetro de las lesiones observadas en cada folíolo con un pie de rey digital (adaptado de García et al., 1999).

Frecuencia de infección (lesiones/8 cm²) (FI): El número de lesiones observadas sobre un rectángulo de 8 cm² (García et al., 1999).

En ambos clones se determinaron también los períodos de incubación (número de días entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas cloróticos) y de latencia (número de días entre la inoculación y la primera aparición macroscópica de los conidios) (Junqueira et al., 1990).

Análisis estadístico

Se ajustó un modelo lineal general con los factores: clon (FX 3864 y FX 4098), tiempo (4, 8, 12, 16 y 20 días después de la inoculación) y su interacción, así:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

- Y_{ijk} variable respuesta (SA, IE, TL, FI)
 μ media general
 C_i efecto del clon i, con i = 1, 2
 T_j efecto del tiempo j, con j = 1, 2, 3, 4, 5
 $(CT)_{ij}$ Interacción clon x tiempo
 ε_{ijk} error residual de la planta k perteneciente al clon i en el tiempo j

La varianza residual se modeló para contemplar varianzas diferentes (Heterocedasticidad, H) por clon, mientras que la correlación residual para las observaciones sucesivas realizadas sobre una misma planta se contempló mediante los modelos de simetría compuesta (SC), autorregresiva de orden 1 (AR1) y sin estructura (SE). Los criterios de Akaike (AIC), Bayesiano (BIC) y LogLik se utilizaron para la selección de la estructura de varianzas y correlaciones residuales (Di Rienzo et al., 2011). Los menores valores para estos criterios indicaron el mejor modelo. El ajuste se realizó mediante la función lme de la librería nlme (Pinheiro et al., 2013) de R (R Core Team, 2013), bajo la interfaz implementada en InfoStat (Di Rienzo et al., 2013).

El análisis de la interacción clon x tiempo para la comparación de medias se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$). Los coeficientes de correlación (Prueba de Pearson) entre las distintas variables se estimaron para cada tiempo con el fin de determinar la variación en el grado de inter-dependencia de los principales componentes de resistencia al SALB a lo largo del proceso infeccioso en laboratorio. Todas las pruebas estadísticas se corrieron en el programa InfoStat versión 2013 (Di Rienzo et al., 2013).

Resultados y discusión

Selección del modelo estadístico para el análisis de los datos

El análisis de las variables SA, IE, TL y FI se basó en un modelo de análisis de varianza de datos longitudinales (tablas 2, 3 y 4). El mejor modelo fue el de simetría compuesta con varianzas homogéneas (SC) (tabla 2). En general, para las variables evaluadas, los criterios (AIC y BIC) fueron mínimos para este modelo, excepto para la variable TL en la cual el modelo SE presentó el menor valor para el criterio AIC (tabla 2). El modelo SC se utilizó para la inferencia estadística principalmente para analizar la significancia de la interacción Clon x Tiempo (tabla 3 y figuras 1A-D).

El modelo seleccionado en este estudio para analizar la variación temporal del SALB en condiciones de inoculación controlada difiere del utilizado por Rivano et al. (2010) quienes reportaron un modelo autorre-



gresivo de primer orden con varianzas heterogéneas (AR1H) para la evaluación mensual de la susceptibilidad al SALB en condiciones de campo en Ecuador. En ambos estudios, los criterios AIC y BIC fueron los más importantes en la elección del modelo.

Reacción del FX 3864 y FX 4098 a *Microcylus ulei*

M. ulei generó síntomas cloróticos (SA, TL, FI) del SALB en ambos clones de caucho (FX 3864 y FX 4098) (tabla 4), los cuales se observaron a los 4 días después de la inoculación (período de incubación) (figuras 1A-C). Los signos de la enfermedad (IE= 3) se manifestaron a los 8 días en el clon FX 3864 y a los 12 días en el clon FX 4098 (período de latencia) (figura 1D). El clon FX 3864 presentó la mayor susceptibilidad a *M. ulei* con las mayores notas de severidad de la enfermedad (tabla 4) y una esporulación alta, heterogénea sobre la cara inferior de los foliolos (IE= 4) registrada a partir del día 16 después de la inoculación (figura 1D). Luego del día 12 después de la inoculación, en general se observaron a través del tiempo mínimas diferencias en los valores medios de las cuatro variables analizadas (tabla 4 y figuras 1A-D).

El período de incubación observado en este estudio para los clones FX 3864 y FX 4098 fue de 4 días para

ambos clones, muy similar a los reportes de Chee (1976) (5 días), Junqueira et al. (1990) (2,6 a 5 días) y García et al. (1999) (4,5 días). Según Hashim et al. (1978) los foliolos con mayor edad (12 - 20 días) son menos receptivos a la infección por *M. ulei*, por lo que en materiales susceptibles como resistentes, los síntomas se presentan en un mayor tiempo (10 - 25 días después de la inoculación). Lo anterior, podría explicar por qué clones que han demostrado resistencia parcial a *M. ulei* como el FX 4098 (Junqueira et al., 1990, Mattos et al., 2003, Sterling et al., 2010a, b), en este estudio presentó lesiones cloróticas antes de los 5 días, igual a lo observado en el clon más susceptible, el FX 3864.

En relación con el período de latencia, Junqueira et al. (1988) observaron signos de *M. ulei* en el clon FX 3864 con un rango de 6,5 a 11 días después de la inoculación, mientras que en el clon FX 4098 fue de 8 a 10 días. Hashim et al. (1978) observaron signos del patógeno a los 9 días. García et al. (1999), registraron un período de latencia de 7 días en el clon FX 4098. En este estudio el período de latencia para FX 4098 (12 días) fue superior a lo reportado por dichos autores, lo que indica una menor virulencia del aislamiento CVI2 en el clon FX 4098. Sin embargo, según Mattos et al. (2003), la reacción (resistente o susceptible) a *M. ulei*

Tabla 2. Criterios para la elección del modelo de análisis de datos longitudinales para la evaluación en el tiempo (días) del SALB (*Microcylus ulei*) en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones de inoculación controlada.

Variable	Severidad de ataque, SA			Intensidad de esporulación conidial, IE			Tamaño de lesión (mm), TL			Frecuencia de infección (lesiones/8cm ²), FI		
	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik
SC	53,1	73,37	-14,55	40,94	61,21	-8,47	-23,5	-3,23	23,75	135,48	155,75	-55,74
SCH	-	-	-	-	-	-	-24,13	-2,18	25,07	136,71	158,66	-55,35
AR1	65,32	85,59	-20,66	41,07	61,34	-8,54	-18,89	1,38	21,45	175,76	196,03	-75,88
AR1H	-	-	-	-	-	-	-20,73	1,23	23,36	157,93	179,89	-65,97
SE	-	-	-	58,72	94,19	-8,36	-28,56	6,91	35,28	143,28	178,75	-50,64

AIC: Criterio de información de Akaike; BIC: Criterio de información bayesiano; LogLik: Log de Likelihood (Di Rienzo et al., 2011)

SC: Modelo de simetría compuesta con varianzas uniformes; SCH: Modelo de simetría compuesta con varianzas heterogéneas; AR1: Modelo autorregresivo de orden 1 con varianzas uniformes; AR1H: Modelo autorregresivo de orden 1 con varianzas diferentes; SE: Modelo sin estructura. El mejor modelo es el de simetría compuesta con varianzas uniformes (SC).

Tabla 3. Análisis de la varianza basado en el modelo de simetría compuesta con varianzas uniformes (SC).

Efecto	gl	SA	IE	TL	FI
Clon	1	72,25 (<0,0001)	103,14 (<0,0001)	216,62 (<0,0001)	186,12 (<0,0001)
Tiempo	4	53,39 (<0,0001)	89,91 (<0,0001)	87,66 (<0,0001)	42,52 (<0,0001)
Clon x Tiempo	4	2,96 (0,0313)	4,70 (0,0033)	22,47 (<0,0001)	0,78 (0,5432)

SA, severidad de ataque; IE, intensidad de esporulación conidial, TL, tamaño de lesión (mm), FI, frecuencia de infección (lesiones/8 cm²)



Tabla 4. Medias para cuatro componentes fisiológicos asociados a la reacción a *Microcyclus ulei* de dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) evaluados a través del tiempo, en condiciones de inoculación controlada.

Factor	Nivel	Variables de reacción a <i>M. ulei</i>			
		SA	TL	FI	IE
Clon	FX 3864	3,16 ± 0,11 ^{a,b}	1,83 ± 0,03a	16,84 ± 0,54a	3,20 ± 0,05a
	FX 4098	1,80 ± 0,11b	1,13 ± 0,03b	6,40 ± 0,54b	2,44 ± 0,05b
Tiempo (días después de la inoculación)	4	1,50 ± 0,10b	1,02 ± 0,04d	9,70 ± 0,42d	1,80 ± 0,08d
	8	2,60 ± 0,10a	1,38 ± 0,04c	11,30 ± 0,42c	2,50 ± 0,08c
	12	2,70 ± 0,10a	1,62 ± 0,04b	11,90 ± 0,42b	2,80 ± 0,08b
	16	0,80 ± 0,10a	1,63 ± 0,04b	12,40 ± 0,42ab	3,50 ± 0,08a
	20	2,80 ± 0,10a	1,75 ± 0,04a	12,80 ± 0,42a	3,50 ± 0,08a

a Error estándar

b Valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba LSD, $p < 0,05$)

SA, severidad de ataque; IE, intensidad de esporulación conidial, TL, tamaño de lesión (mm), FI, frecuencia de infección (lesiones/8 cm²)

del clon FX 4098 puede variar según la virulencia del aislamiento probado.

Por otro lado, el período de latencia para el clon FX 3864 (8 días) estuvo dentro del rango observado por Hashim et al. (1978) lo que confirma la susceptibilidad de éste clon a *M. ulei*. García et al. (1999), afirman que la esporulación en foliolos jóvenes susceptibles en general, se manifiesta entre los 5 y los 8 días posteriores a la inoculación, similar a lo observado en este estudio para el clon FX 3864 (8 días) (figura 1D).

Según las tabla 3 y 4, se encontraron diferencias significativas entre los dos clones de caucho y entre los días después de la inoculación para las cuatro variables del SALB. La prueba de hipótesis con el modelo SC resultó significativa para la interacción Clon x Tiempo en las variables SA, IE y TL (tabla 3). La significancia observada en este estudio por efecto del genotipo también ha sido reportada en condiciones de inoculación controlada por autores como Junqueira et al. (1990), García et al. (1999), Mattos et al. (2003), Le Guen et al. (2008) y Sterling et al. (2010b, 2011). En relación con el efecto del tiempo, la mayoría de estos estudios han analizado la reacción a *M. ulei* en lecturas iniciales (períodos de incubación y latencia) y finales de la enfermedad (severidad, esporulación conidial, diámetro de lesión, frecuencia de infección, entre otros) entre los 12 y 17 días después de la inoculación.

Análisis de la interacción Clon x Tiempo

El análisis de la interacción Clon x Tiempo para las cuatro variables estudiadas se presenta en las figura 1A-D. En este sentido, se encontró que el valor medio de SA (severidad de ataque) fue de 2,48 el cual osciló entre 1,00 (ataque bajo) para el clon FX 4098 en el día 4 después de la inoculación y 3,60 (ataque alto a muy

alto) en el clon FX 3864 a partir del día 16 después de la inoculación (figura 1A).

A lo largo del tiempo, el valor medio de SA en el clon FX 3864 fue significativamente superior a lo observado en el clon FX 4098 ($p < 0,05$). La SA en el clon más susceptible (FX 3864) se estabilizó a partir del día 12 después de la inoculación, mientras que en el clon FX 4098 ocurrió a partir del día 8 en donde se observó una severidad media constante ($SA = 2,00$) (figura 1A).

Los mayores tamaños de lesión (TL) se presentaron en el clon FX 3864, las cuales oscilaron entre 1,16 mm y 2,24 mm a los 4 y 20 días después de la inoculación, respectivamente (figura 1B). Entre el día 16 y 20 se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de TL en el clon FX 3864 contrario a lo registrado en el clon FX 4098. El mayor tamaño de lesión (1,26 mm) en el clon FX 4098 se observó en el día 20 después de la inoculación.

En relación con la frecuencia de infección (FI), en ambos clones se observó un incremento significativo en el número de lesiones hasta el día 12 (6.6 lesiones/ 8 cm² en FX 4098 y 17.2 lesiones/ 8 cm² en FX 3864), en adelante FI no presentó una variación significativa en el tiempo (figura 1C), dado el desarrollo fenológico de los foliolos (estadio C) que impide que el inóculo presente reinfecte (Lieberei, 2007). Aunque la interacción Clon x Tiempo no resultó significativa para FI (tabla 3), la prueba LSD de Fisher mostró diferencias debido al efecto significativo exhibido por los efectos principales (Clon y Tiempo) (ambos, $p < 0,01$) (tablas 3 y 4). Lo anterior significa que aunque el FI medio observado en cada clon no fue influenciado por el tiempo transcurrido entre la inoculación y el avance de la enfermedad (se observó el mismo patrón de incremento), si se evidenció a lo largo del tiempo una mayor susceptibilidad

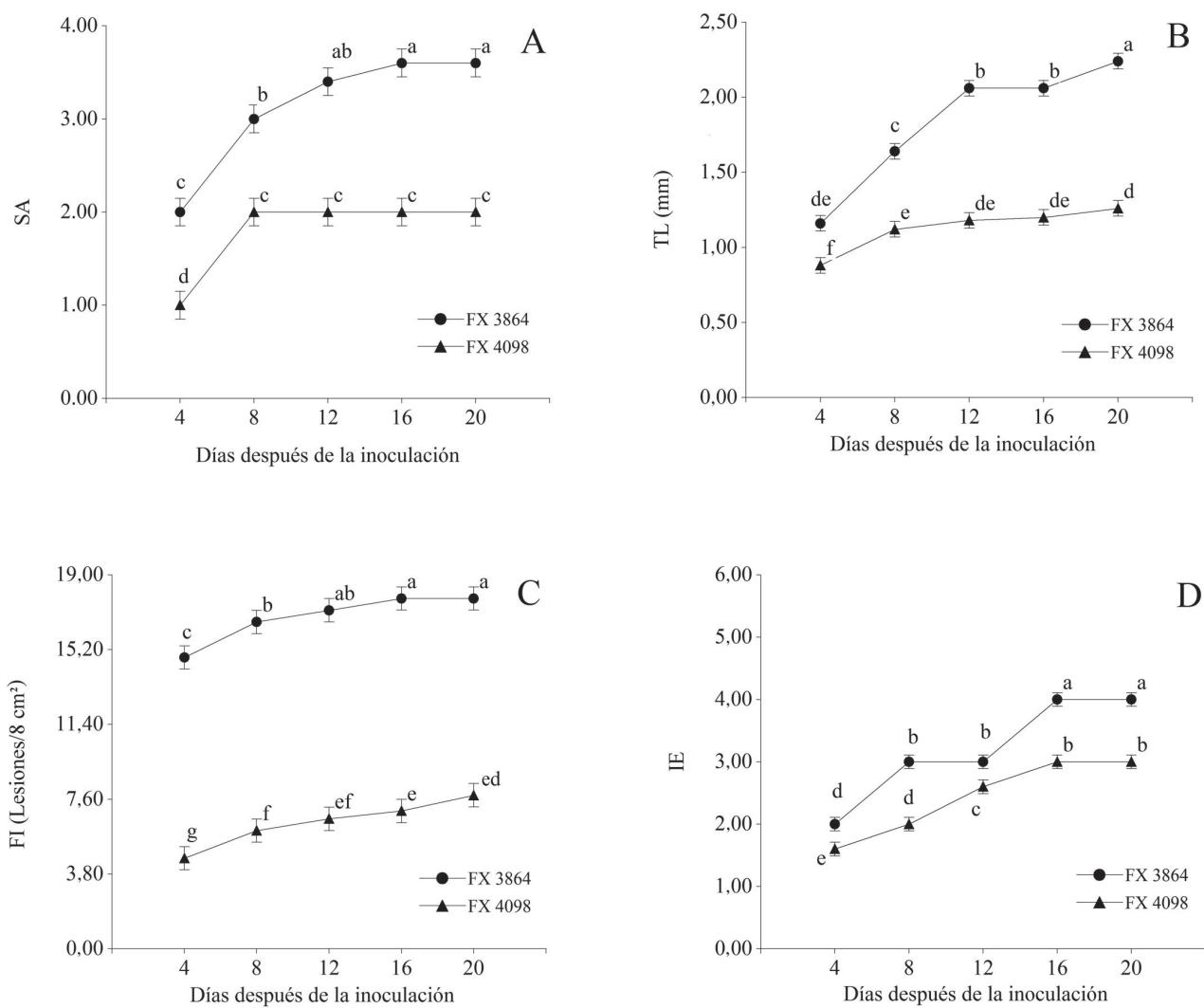


Figura 1. Progreso del SALB (*Microcyclus ulei*) en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) en condiciones de inoculación controlada en Caquetá (Colombia). **A.** Severidad de ataque (SA) de 0 a 4 (0: nulo; 1: leve; 2: medio; 3: alto y 4: muy alto), modificada de la escala de Gasparotto *et al.* (1989). **B.** Tamaño de lesión (mm) (TL) (García *et al.*, 1999). **C.** Frecuencia de infección (Lesiones/8 cm²) (FI) (García *et al.*, 1999). **D.** Intensidad de esporulación conidial (IE) de 1 a 6 (1 y 2: lesiones sin esporas; 3 y 4: lesiones con esporulación débil; 5 y 6: lesiones con esporulación fuerte y muy fuerte, respectivamente), según la escala de Mattos *et al.* (2003). Cada punto representa la media de cinco réplicas. Las barras representan el error estándar. Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba LSD; $p < 0,05$).

en el clon FX 3864 en relación con el clon FX 4098 (figura 1C).

En relación con los signos del SALB, se observó una esporulación conidial débil ($IE > 2$) en el clon FX 4098 en el día 8 y en el clon FX 3864 en el día 12 posteriores a la inoculación. La máxima IE (≥ 4) (esporulación alta) en el clon FX 3864 se presentó a partir del día 16 y hasta el día 20 después de la inoculación (figura 1D). La mayor producción de esporas ($IE = 3$) en el clon FX

4098 se registró en los días 16 y 20 posteriores a la inoculación.

En general, se observó para este estudio que un aumento en TL conllevó a una mayor severidad (SA) y esporulación (IE) de la enfermedad, aunque la frecuencia de infección (FI) no fuese importante en algunos días posteriores a la inoculación. Esta aseveración es similar a lo afirmado por Hashim y Pereira (1989) quienes reportaron mayores severidades del SALB en clones



que habían desarrollado lesiones de mayores tamaños y menos abundantes por unidad de superficie foliar.

Los resultados de ésta investigación para SA y FI en ambos clones coincide con García et al. (1999); se observan mayores notas de éstas variables (mayor susceptibilidad) en el clon FX 3864 y por tanto una mayor resistencia en el clon FX 4098. Sin embargo, las notas medias máximas observadas por García et al. (1999) para ambos clones fueron inferiores (SA= 0,8 y FI= 5 para FX 4098 y SA= 1,3 y FI= 15 para FX 3864) a lo observado en este estudio. La mayor susceptibilidad observada en el clon FX 3864 también ha sido reportada en condiciones de campo por diferentes autores (Mattos et al., 2005; Sterling et al., 2009, 2010c; Rivano et al., 2010; Cardoso et al., 2014).

En este estudio, las variables IE y TL se observaron con medias significativamente diferentes en ambos clones (tabla 2). Sin embargo, García et al. (1999) no evidenciaron diferencias para IE y TL entre los clones FX 3864 y FX 4098. Al respecto, Junqueira et al. (1988, 1990) afirman que la reacción a *M. ulei* del clon FX 4098 difiere de los observado en el clon FX 3864, ya que el menor tamaño de lesiones (0,5 a 2,2 mm) y la menor esporulación se observaron en el clon FX 4098.

Hashim y Pereira (1989), Mattos et al. (2003), Le Guen et al. (2008) y Sterling et al. (2010a, b) reportaron que el clon FX 4098 posee una menor esporulación conidial producida por *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada, lo cual es similar a lo encontrado en el presente estudio (figura 1D). García et al. (1999) reportaron que el clon FX 4098 y FX 3864 presentan para el aislamiento FTP25 de *M. ulei* los componentes más desfavorables para el desarrollo del hongo. Lo anterior coincide para el clon FX 4098 pero difiere para el clon FX 3864 dado que éste material fue el más susceptible en la presente investigación.

En general, en el presente estudio la mayor resistencia al SALB en el clon FX 4098 también ha sido registrada en campo por García et al. (2004), Sterling et al. (2009, 2010c, 2012, 2013). No obstante, Rivano et al. (2010) en condiciones de campo, observaron en el clon FX 4098 una alta severidad de ataque en hojas jóvenes y maduras y una alta esporulación (mayor a 4) durante el período de mayor precipitación.

Variación de las correlaciones entre variables

Se observaron bajas correlaciones, no significativas ($r \leq 0,45$; $gl= 9$; $p > 0,05$), en el día 12 después de la inoculación entre IE y las tres variables restantes (figura 2). Cabe mencionar además que las bajas correlaciones que se analizaron entre IE y las variables SA y FI en el día 12 también se evidenciaron en el día 4 después de la inoculación. La correlación más baja ($r = 0,44$) se presentó entre IE y FI en el día 4 después de la inoculación. Altas correlaciones significativas ($r \geq 0,84$; $gl= 9$; $p < 0,01$) se encontraron entre SA y las variables TL y

FI en todos los puntos del tiempo de progreso de la enfermedad. Lo mismo ocurrió entre TL y FI ($r \geq 0,81$). En general, los coeficientes de correlación se hicieron mayores con el tiempo, es decir, que a lo largo de todo el proceso infeccioso, aumentó la inter-dependencia entre las variables que explican la intensidad de los síntomas y signos del SALB.

El comportamiento atípico evidenciado entre IE y SA especialmente en el día 12 después de la inoculación (figura 2) se puede atribuir al hecho que entre los días 8 y 12, la severidad y la esporulación fueron constantes en los clones FX 4098 y FX 3864, respectivamente (figura 1A) contrario a lo observado en los demás intervalos de tiempo en los que ambas variables se incrementaron significativamente.

Por otro lado, la relación atípica entre la esporulación y las variables TL y FI en el día 12 después de la inoculación, podría explicarse en los valores constantes de IE en el clon FX 3864 entre los días 8 y 12, diferente a lo observado en las variables TL y FI, las cuales se incrementaron significativamente a través del tiempo (figuras 1 B - D).

Las bajas correlaciones observadas en éste estudio en el día 12 entre IE y las variables SA y TL, difieren de Sterling et al. (2010b) quienes encontraron para el mismo período de evaluación una importante correlación entre la esporulación y la severidad del SALB ($r = 0,76$). Sterling et al. (2011) en condiciones de campo también reportaron una alta correlación entre el ataque y la esporulación ($r = 0,87$) de *M. ulei* en genotipos élite regionales de caucho en la Amazonia colombiana. Con excepción de las correlaciones observadas entre IE y SA en los días 4 y 12 (figura 2), en los demás días del progreso del SALB, la severidad de ataque y la esporulación conidial de *M. ulei* se correlacionaron positivamente ($r \geq 0,90$), similar a los reportes de los autores antes mencionados.

Hashim y Almeida (1987), Hashim y Pereira (1989) y García et al. (1999) reportaron la mayor correlación entre el diámetro de lesión y la intensidad de esporulación, resultados que difieren de lo reportado en éste estudio para IE y TL en el día 12 después de la inoculación ($r = 0,47$). Sin embargo, los reportes de estos autores coinciden con el presente estudio en los demás días del progreso del SALB, con coeficientes de correlación altos ($r \geq 0,81$).

En la presente investigación las altas correlaciones observadas a lo largo del tiempo entre TL y FI difieren de García et al. (1999) quienes no encontraron correlación entre el tamaño de lesión y la frecuencia de infección. Sin embargo, las correlaciones entre la severidad del SALB y la producción de esporas, y también entre producción de esporas y el tamaño de lesión, fueron similares a las observadas en éste estudio. Adicionalmente en ésta investigación entre los días 12 y 20 después de la inoculación se evidenciaron correlaciones

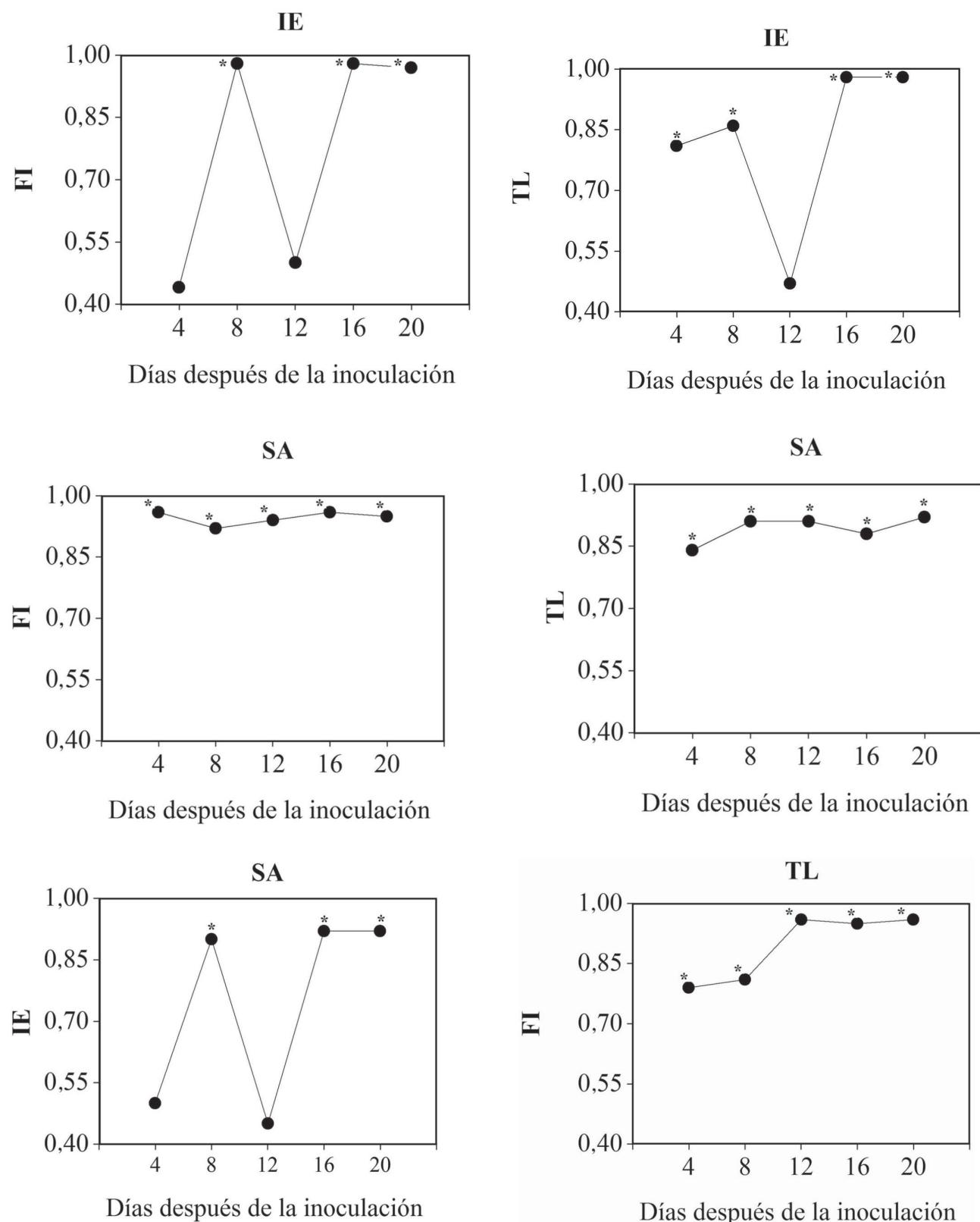


Figura 2. Correlaciones entre las cuatro variables de reacción a *Microcyclus ulei* evaluadas en los clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) FX 3864 y FX 4098 a través del tiempo (días después de la inoculación). Severidad de ataque (SA). Intensidad de esporulación conidial (IE). Tamaño de lesión (mm) (TL). Frecuencia de infección (Lesiones/8 cm²) (FI). Los asteriscos indican correlaciones significativas en un punto del tiempo dado (Prueba Pearson; $p < 0,05$).



altas y uniformes entre TL y FI. Lo anterior indicaría que el desarrollo de la enfermedad a partir del día 12 avanzó con tamaños y frecuencias de lesiones con un patrón de crecimiento uniforme hasta el final del seguimiento.

Conclusiones

El análisis de la variación temporal de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de los clones de *H. brasiliensis* FX 3864 y FX 4098 a *M. ulei*, permite concluir que en condiciones controladas, la intensidad y la frecuencia de los síntomas así como el grado de esporulación producidos por *M. ulei* cambian significativamente a través del tiempo y esta variación está influenciada a su vez por el nivel de susceptibilidad a *M. ulei* presentado por cada clon. Se observa además que la variación temporal de los síntomas y signos del SALB en los clones FX 3864 y FX 4098, afecta significativamente el grado de inter-correlación entre las variables de ataque y esporulación conidial especialmente entre los días 8 y 12 posteriores a la inoculación. Este estudio es el primer reporte en el que se analiza desde un enfoque multi-temporal los cambios de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de los clones FX 3864 y FX 4098 a *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada durante la fase infecciosa de la enfermedad.

Agradecimientos

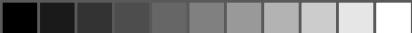
Los autores agradecen al proyecto: Evaluación del asocio agrisilvícola: caucho (*Hevea brasiliensis*) – nuevos clones de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante el uso de indicadores agronómicos, ecofisiológicos, bioquímicos y epidemiológicos en el departamento del Caquetá. Contrato RC No.746 -2011- Fiduciaria Bogotá – Colciencias – Sinchi – UNAL - Asoheca por el soporte económico a la presente investigación.

Referencias bibliográficas

- Asoheca (Asociación de Reforestadores y Cultivadores de Caucho del Caquetá, CO). 2014. Información estadística de caucho en el Departamento del Caquetá (Colombia) a diciembre de 2013. Documento interno de agronegocios. Ed. I. Dussan. p. 2.
- Cardoso, S.E.A.; Freitas, T.A.; Silva, D. da C.; Gouvea, L.R.L.; Gonçalves, P.; Mattos, C.R.R.; García D. 2014. Comparison of growth, yield and related traits of resistant *Hevea* genotypes under high South American leaf blight pressure. Brasil. *Industrial Crops and Products*. 53: 337-349.
- Castellanos, D.O.; Fonseca, R.S.; Barón, N.M. 2009. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de caucho natural y su industria en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural/Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. p. 209.
- Chee, K.H. 1976. Assessing susceptibility of *Hevea* clones to *Microcyclus ulei*. *Ann. Appl. Biol.* 84: 135-145.
- Chee, K.H.; Holliday, P. 1986. South American leaf blight of *Hevea* Rubber. Malaysian Rubber Research and Development Board. *Malaysian Rubber Research and Development Board Monograph*.13: 50.
- Compagnon, P. 1998. El Caucho Natural, Biología - Cultivo - Producción. Consejo Mexicano del Hule - CIRAD. México, D. F. p. 701.
- Di Rienzo, J.A.; Macchiavelli, R.E.; Casanoves, F. 2011. Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat. 1^a ed. Grupo InfoStat. Córdoba, Argentina. p. 248.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Fecha de consulta: 21 de julio de 2013. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Fonseca, P.D.; Aristizabal, G.F.A. 2010. Contribución a la certificación por técnicas moleculares del material comercial de *Hevea brasiliensis* de interés para Colombia. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - IBUN - Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi. Fecha de consulta: 09 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://biblioteca.agronet.gov.co:8080/jspui/handle/123456789/1910>.
- Furtado, E.L.; Menten, J.O.M.; Passos, J.R. 2008. Intensidade do Mal das Folhas em plantas jóvenes e adultas de seis clones de seringueira na região do Vale do Ribeira. *Tropical Plant Pathology, Brasilia*, DF. 2 (33): 130-137.
- García, D.; Troispoux, V.; Grance, N.; Rivano, F.; Auzac, D. 1999. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. *Eur. J. For. Path.* 29: 323-338.
- Gasparotto, L.; Zambolim, L.; Maffia, L.A.; Ribeiro, D.O.; Vale, F.X.; Junqueira, N.T.V. 1989. Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea* spp.) por *Microcyclus ulei*. *Fitopatol. Bras.* 14 (1).
- Gasparotto, L.; Ferreira, F.A.; dos Santo, A. F.; Rezende, P.J.C.; Furtado, E.L. 2012. Capítulo 3: Doenças das folhas. pp. 39-176. En: Gasparotto L.; Pereira R.J.C. (Eds.). Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Brasília, DF. 255 p.
- Guyot, J.; Condina, V.; Doaré, F.; Cilas, C.; Sache, I. 2010. Segmentation applied to weather-disease relationships in South American leaf blight of the rubber tree. *Eur. J. Plant. Pathol.* 126: 349-362.
- Hallé, F.; Oldeman, R.; Tomlinson, P.B. 1978. Tropical trees and forest. Springer-verlag. Berlin, DE. p. 441.
- Hashim, I.; Chee, K.H.; Duncan, E.J. 1978. Reaction of *Hevea* leaves to infection with *Microcyclus ulei*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia*. 26 (2): 67-75.
- Hashim, I.; Almedia, L.C.C. 1987. Identification of races and in vitro Sporulation of *Microcyclus ulei*. *J. Nat. Rubb. Res.* 2 (2): 111-117.
- Hashim, I.; Pereira, J.C. 1989. Lesion Size, latent period and sporulation on leaf Discs as indicators of resistance of *Hevea* to *Microcyclus ulei*. *J. Nat. Rubb. Res.* 4 (11): 56-65.
- IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, CO). 2010. Caquetá, características geográficas. Imprenta Nacional de Colombia. Bogotá. p. 373.
- IRSG (International Rubber Study Group, SI). 2013. Rubber Statistical Bulletin. Noviembre de 2013. Fecha de consulta: 2 de Abril de 2014. Disponible en: <http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>
- Junqueira, N.T.V.; Chaves, G.M.; Zambolim, L.; Romeiro R., da S.; Gasparotto, L. 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres*. 31: 322-331.
- Junqueira, N.T.V.; Lieberei, R.; Kalil Filho, A.N.; Lima, M.I.P.M. 1990. Components of parcial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *M. ulei*. *Fitopatologia Brasileira*.15: 211- 214.
- Le Guen, V.A.; Guyot, J.B.; Mattos, C.C.R.; Seguin, M.A.; García, D. 2008. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop Protection*. 27: 1498-1503.
- Lekawipat, N.; Teerawatasuk, K.; Rodier-Goud, M.; Seguin, M.; Vanavichit, A.; Toojinda, T.; Tragoonrung, S. 2003. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea*



- brasiliensis* Muell. Arg. By using microsatellite markers. *Journal of Rubber Research*. 6 (1): 36-47.
- Lespinasse, D.; Roider-Goud, M.; Grivet, L.; Leconte, A.; Legnate, H.; Seguin, M. 2000. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) bases on RPLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theoretical Applied Genetics*. 100: 127-138.
- Lieberei, R. 2007. South american leaf blight of the rubber tree (*Hevea spp.*): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Invited Review. Annal of Botany*. 100: 1125-1142.
- MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CO) - Agronet (Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario, CO). 2013. Presentación Subsector Heveícola Colombiano.
- Mattos, C.R.R. 1999. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. *Fitopatología Brasileira*. 24: 470.
- Mattos, C.R.R.; García, D.; Pinard, F.; Le Guen, V. 2003. Variabilidade de Isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste de Bahia. *Fitopatología Brasileira*. 28 (5): 502-507.
- Mattos, C.R.R.; García, D.; Le Guen, V. 2005. Seleção de Clones de Seringueira com Alta Produção e Resistentes ao Mal-Das-Folhas. *Ceplac. Comunicação técnico*. 28: 1-9.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Fecha de consulta: 21 de julio de 2013. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Pinheiro, J.; Bates, Douglas; Saikat, D.; Deepayan Sarkar and the R development core team. 2013. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. *R package version*. (3): 1-109.
- Quintero, B.L.; Zapata, O.J.A.; Bolaños, M.D.C.; Sterling, C.A.; Rodríguez, A.O.L. 2012. Caracterización morfológica y molecular de diez clones de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) promisarios para la Amazonía colombiana. pp. 123-147. En: Sterling, C.A., Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Ampliación de la base genética de caucho natural con proyección para la Amazonía colombiana: fase de evaluación en período improductivo a gran escala. Capítulo 4. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 147 p.
- Rivano, F.; Martínez, M.; Cevallos, V.; Cilas, C. 2010. Assessing resistance of rubber tree clones to *Microcyclus ulei* in large-scale clone trials in Ecuador: a less time-consuming field method. *Eur J. Plant Pathol*. 126: 541-552.
- Saha, T.C.; Bindu, R.; Nazeer, M.A. 2005. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding*. 124: 86-92.
- STN (Secretaría Técnica Nacional del Caucho, CO). 2013. Ministerio de Agricultura - Presentación Subsector Heveícola Colombiano a diciembre 2013. En: Congreso Internacional Cauchero 2014. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Sterling, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L.; Correa, J. 2009. Evaluación fitosanitaria y resistencia en campo a *Microcyclus ulei* de *Hevea brasiliensis* en la Amazonía Colombiana. *Revista Colombia Amazónica*. 2: 80-90.
- Sterling, A.; Correa, J. 2010. Desempeño de una colección clonal de caucho en período de inmadurez en la Amazonía colombiana. *Ingenierías & Amazonía*. 3 (1): 16-27.
- Sterling, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L. 2010a. Variabilidad fisiológica de aislamientos de *Microcyclus ulei* de la Amazonía colombiana. *Revista Momentos de Ciencia*. 7 (1): 30-35.
- Sterling, A.; Calderón, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L. 2010b. Caracterización morfológica y patogenicidad de *Microcyclus ulei* en la Amazonía colombiana. *Revista Colombia Amazónica*. 3: 99-116.
- Sterling, A.; Galindo, L.C.; Correa, J. 2010c. Incidencia y severidad de *Microcyclus ulei* en una colección de caucho en la Amazonía colombiana. *Ingenierías y Amazonía*. 3 (2): 93-104.
- Sterling, C.A.; Galindo, L.C.; Rodríguez, O.L.; Martínez, A.K.; Bonilla, R.N.M. 2011. Evaluación de la resistencia a *M. ulei* de los mejores genotipos élitres de *H. brasiliensis* de origen franco bajo condiciones naturales y controladas. pp. 139-171. En: Sterling, C.A., Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Nuevos clones de caucho natural para la Amazonía Colombiana: Énfasis en la resistencia al Mal Suramericano de las Hojas (*Microcyclus ulei*). Capítulo 5. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 195 p.
- Sterling, C.A.; Rodríguez, L.C.H.; Dussán, H.I.; Correa, D.J.; Vargas, L.M.A.; Centeno, C.A.; Sánchez, L.R.; Rodríguez, M.A.F.; Plaza, C.D.; Gaviria, D.C.; Salas, T.Y.M.; Ossa, M.E.O.; Ruiz, T.P.N.; Castillo, O.J.O. 2012. Evaluación fitosanitaria con énfasis en la resistencia a *Microcyclus ulei* de diez clones de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) en Campo Clonal a Gran Escala CCGE. pp. 79-121. En: Sterling, C.A.; Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Ampliación de la base genética de caucho natural con proyección para la Amazonía colombiana: fase de evaluación en período improductivo a gran escala. Capítulo 3. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 147 p.
- Sterling, A.; Rodríguez, C.H.; Vargas, M.A.; Caicedo, D.F.; Dussán, I. 2013. Resistencia a *Microcyclus ulei* de clones promisarios de *Hevea brasiliensis* en sistema agroforestal en la Amazonía colombiana. p 51. En: Mena V.E., Andrade H.J., Mora J.R. (Eds.). Memorias IV Seminario Internacional de Agroforestería 2013. Universidad Tecnológica del Chocó - Red Agroforestal de Universidades de Colombia (RAUC). Quibdó (Chocó), Colombia. 86 p.
- Viéegas, J.M.; Haag, M.; Bueno, N.; Pereira, J.D.A. 1992. Nutrição mineral de seringueira. XII. Absorção de macro e micronutrientes nos primeiros 240 dias. *Scientia Agricola*. 49 (1): 41-52.



Cultivo *in vitro* de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnst var. *fasciculata* (molle)

In vitro culture of *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnst var. *fasciculata* (molle)

Rodrigo Freire **, Nélida J. Carnevale **, Claudia Alzugaray *, Mirian S. Bueno *

Resumen

Schinus fasciculata es un árbol de la ecorregión chaqueña argentina. Es una especie de bajo porte, usada como antiséptico, analgésico, antiinflamatorio y antifúngico. Estudios previos registraron baja germinación y deficiente sanidad. El objetivo fue evaluar la germinación y la respuesta de las plántulas *in vitro* en dos medios de cultivo. Se recolectaron frutos, se desinfectaron por 20 min con HClNa y se sembraron en agar-agua. Las plántulas se repicaron a medio MS en dos diluciones: un cuarto (MS 1/4) y un medio (MS 1/2). Se hicieron ensayos de germinación y vigor (tiempo medio de germinación máxima en días). Se evaluó % de contaminación. A los 20 días del repique se evaluó % de explantos con hojas, número de hojas y altura de plántulas. Paralelamente se hizo un ensayo de germinación y vigor en arena. La contaminación fue de 16 %, la germinación de 84 %, el vigor de 4,9 días. El 94 y el 100 % de los explantos en MS 1/4 y MS 1/2 presentaron hojas. El número promedio de hojas fue de 7,5 y 7,4 y la altura promedio fue de 3,35 cm y 2,98 cm en MS 1/4 y MS 1/2, observándose diferencias significativas en altura. La germinación en arena fue de 46 % y el vigor de 4,6 días. La utilización de la técnica de cultivo *in vitro* en *S. fasciculata* facilita la multiplicación de esta especie de alto valor farmacológico, permitiendo aumentar el porcentaje de frutos germinados y obtener plántulas libres de patógenos todo el año.

Palabras clave: *Schinus fasciculata*, germinación, vigor, cultivo *in vitro*.

Abstract

Schinus fasciculata is a tree of Argentina Chaco eco-region. It is a low-growing species, used as an antiseptic, analgesic, anti-inflammatory and antifungal. Previous studies reported low germination and poor health. The object of this work was to evaluate the germination and *in vitro* response of seedlings in two culture media. Fruits were collected, disinfected for 20 min with HClNa and sowing in agar - water. The seedlings were seeded onto MS medium in two dilutions: fourth (1/4 MS) and half (1/2 MS). Germination and vigor tests (mean time to maximum germination in days) were made. Contamination percentage was evaluated. At 20 days of transplanted were evaluated: % of explants with leaves, leaf number and height of seedlings. Parallel assay germination and vigor in sand was made. Contamination was 16%, germination was 84% and vigor 4.9 days. The 94 % and the 100% of the explants in MS 1/4 and 1/2 MS showed leaves. The average leaf number was 7.5 and 7.4 and the average height was 3.35 cm and 2.98 cm in MS 1/4 and MS 1/2, with a significant difference in height. Germination in sand was 46 % and vigor was of 4.6 days. The technique of *in vitro* culture in *S. fasciculata* facilitates the multiplication of this species of high pharmacological value, allowing to increase the percentage of germination and obtain pathogen-free all year seedlings.

Key words: *Schinus fasciculata*, germination, vigor, *in vitro* culture.

Recibido: abril 15 de 2013

Aprobado: octubre 1 de 2014

* Cátedra de Biología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. CC 14 (S2125ZAA) Zavalla
miriansbueno@gmail.com

** Cátedra de Ecología



Introducción

Schinus fasciculata es un árbol de la Familia Anacardiaceae originario de América del Sur, ampliamente distribuido en Bolivia, Paraguay y Argentina y es típico de la región chaqueña (Burkart y Bacigalupo, 2005). En la provincia de Santa Fe, se lo encuentra en los departamentos General Obligado, Las Colonias, 9 de Julio, San Cristóbal y Vera (Pensiero et al., 2005). *S. fasciculata*, comúnmente llamado "molle", "molle de curtir", "molle pispita" y "moradillo" es polígamico dioico, con hojas dimorfas, flores amarillentas en pseudorracimos y sus frutos (también denominados semillas), son drupas globosas de 4 a 5 mm de diámetro de color morado (Burkart y Bacigalupo, 2005). Es una especie rústica, resistente a fríos y sequías, puede llegar a medir entre 1 y 8 m de altura. Sus usos medicinales son diversos, como antiséptico, analgésico, antiinflamatorio en emplastos en casos de fracturas y hernias. Además presenta particular interés por las propiedades antifúngicas y antimicrobianas de sus extractos acuosos (Steibel et al., 2007; Vivot Luppi et al., 2009). Tiene aplicaciones como especie ornamental, en perfumería a partir de la extracción de aceites esenciales de hojas y frutos, para arbolado o cercado, para consumo de los frutos como pimienta por su sabor dulce y picante. En estudios previos se observó que esta especie presentaba baja germinación, entre 20 y 40 %, debido a la gran cantidad de frutos vanos que presenta (Alzugaray y Carnevale, 2009). Esta característica es compartida por otras especies de la misma familia, por ejemplo en *Schinopsis balansae* Engl., la proporción de frutos con semillas viables depende de las condiciones climáticas durante la polinización y el período del llenado del fruto (Alzugaray et al., 2005; González y Vesprini, 2010). En el pistacho (*Pistacia vera* L.), el llenado de los frutos depende de la conducción vascular hacia los óvulos, lo que resulta en distintas proporciones de frutos llenos según la variedad (Polito, 1999). Para *Schinus terebinthifolius* Raddi, un arbolito típico de Brasil, se demostró que la especie funciona como dioica y que la polinización cruzada fue necesaria para lograr frutos con semillas en una proporción de 45 a 56 % (Lenzi y Orth, 2004). Para rescatar la diversidad genética amenazada y como una importante herramienta de mejoramiento genético, resulta necesario estudiar la capacidad de las especies para propagarse vegetativamente, así como desarrollar técnicas para obtener copias génicas (Aparicio et al., 2009). La micropropagación *in vitro* de plantas, permite la propagación de árboles y proporciona una ventaja económica importante a la industria forestal (Attrre y Fowke, 1993; Gupta et al.; 1980). Entre otras ventajas permite reducir los largos períodos de maduración y la baja viabilidad de las semillas (Trigiano et al., 1992), requiere poco equipamiento y puede también ser utilizada como conservación de germoplasma a bajo costo (Verzino y Joseau, 2005). Estas técnicas se han utilizado con éxito a partir de explantes juveniles como cotiledones

y secciones nódales de plántulas germinadas *in vitro* para especies nativas de la provincia de Buenos Aires, Argentina, con usos diversos, entre ellos el medicinal (Boeri et al., 2000; Sharry et al., 2011).

Con respecto a la micropropagación de especies de esta familia existen antecedentes de cultivo *in vitro* de *Schinus molle* L. a partir de brotes axilares (Ayala Terán, 2011), de *Schinopsis balansae* Engl. a partir de hojas (Sansberro et al., 2003) y de embriones de *Pistacia vera* entre otras especies (Benmahioul et al., 2009). Para *S. fasciculata* (Bueno et al., 2011) establecieron que la utilización de esta técnica incrementó la germinación respecto a métodos tradicionales.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la germinación, el vigor de frutos y el comportamiento *in vitro* de esta especie, en dos medios de cultivo de *Schinus fasciculata*, para la obtención de plantas madre que serán utilizadas posteriormente para micropropagar la especie.

Material y métodos

Durante marzo de 2011 se cosecharon frutos de *S. fasciculata* en la localidad de Vera, Santa Fe (60°18'1.768'' O; 29° 27'5,197'' S) y se dejaron secar a temperatura ambiente en laboratorio. Los frutos coleccionados, luego de la extracción del exo y meso carpo, se desinfectaron durante un minuto en alcohol 96° y 20 min en HClNa al 2% (5,6 g/l de cloro activo), con dos gotas de Tween 20 y se lavaron con agua destilada esterilizada. Se sembraron 98 frutos en agar-agua (AA) y a los 20 días las plántulas obtenidas se repicaron a medio Murashige and Skoog (1962) en dos diluciones: un cuarto (MS 1/4) y un medio (MS 1/2) con 3 % de sacarosa y 0,7 % de agar-agar por litro de medio. Se incubaron a 25°C, con fotoperíodo de 12 hs (dentro del rango de horas de luz en que germina esta especie en el sitio de recolección).

De la siembra en agar-agua se evaluaron: porcentaje de contaminación, porcentaje de germinación fisiológica (protrusión de la raíz primaria), porcentaje de germinación y vigor, expresado como tiempo medio de germinación máxima (TMG) en días. Se entiende por germinación la aparición y el desarrollo de las estructuras esenciales que indican la capacidad de la semilla para producir una plántula normal en condiciones favorables y se expresa como porcentaje de plántulas normales (ISTA, 2003). El TMG se calculó según la metodología de Kotowiski (1926), citada por Silva y Nakagawa (1995):

$$TMG = \sum Ci Ti / \sum Ci$$

Donde:

Ci = número de semillas germinadas por día.

Ti = número de días desde el comienzo del ensayo en que germinan Ci semillas.



Tras 20 días de incubación se evaluó, el porcentaje de explantes que desarrollaron hojas y a los 45 días: el número promedio de hojas por explante y la altura promedio de plántulas. Los resultados se compararon con la Prueba de T al 0,05 % (InfoStat, 2012).

Paralelamente a los ensayos *in vitro* se efectuaron ensayos de germinación y vigor en arena (ISTA, 2003). Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % del valor comercial (5,6 g/l de cloro activo) por 2 min, se lavaron con agua esterilizada y se colocaron a germinar en cajas plásticas transparentes con arena a capacidad de campo. Se realizaron 4 réplicas de 50 semillas cada una y para cada ensayo. Las plántulas se evaluaron cada 7 días durante 2 semanas, según indicaciones del manual de evaluación de plántulas (Association Official Seed Analysts, 1992). Los resultados de la germinación se expresaron como porcentaje de plántulas normales. La prueba de vigor realizada fue el tiempo medio de germinación máxima (TMG), registrándose diariamente durante 15 días la germinación fisiológica. Los ensayos se realizaron en cámaras de germinación con un fotoperiodo de 12 hs y una temperatura de 25°C.

Resultados

El porcentaje de contaminación *in vitro* de semillas sembradas en AA fue de 16%. El porcentaje de germinación fisiológica a los 3 días de la siembra fue de 40% y a los 7 días alcanzó el 84%. El TMG fue de 4,9 días y la germinación final se mantuvo en 84 % a los 11 días del ensayo. En la figura 1 se observa una plántula normal en AA.

En las plántulas cultivadas en ambas diluciones de MS se observó la regeneración de un brote por explante. El 94% de los brotes en MS 1/4 diferenciaron hojas, en el medio con mayor concentración de sales el número de brotes con hojas alcanzó el 100 % (figura 1). El promedio de hojas fue de 7,5 y de 7,4 en MS 1/4 y MS 1/2, sin diferencias significativas. La altura media de los brotes fue 3,35 cm en MS 1/4 y 2,98 cm en MS 1/2, estas

diferencias fueron significativas entre los medios ensayados ($p < 0,05$), tabla 1.

Tabla 1. Regeneración de brotes, diferenciación, número de hojas y altura promedio de los brotes para los medios de cultivo MS 1/4 y MS 1/2

	Medios de cultivo	
	MS 1/4	MS 1/2
Regeneración de brotes	100	100
Diferenciación de hojas (%)	94	100
Número promedio de hojas	7,5	7,4
Altura media de brotes (cm)	3,35	2,98

La germinación de plántulas normales en arena fue de 46% y el TMG fue de 4,6 días.

Las plántulas consideradas normales presentaron uno o dos cotiledones, sin daño o con un daño no mayor de un tercio del cotiledón; además del hipocótilo elongado y raíz primaria (figura 1). Las plántulas anormales fueron aquéllas que sufrieron apenas emergidas podredumbre provocada por patógeno (ISTA, 2003); plántulas sin raíz primaria, y plántulas con daños mayores a un tercio de los cotiledones (AOSA, 1992). Estas representaron un 30% del total de plántulas (figura 2), el resto no germinó.

Discusión

El protocolo de desinfección fue eficiente para este lote de frutos germinados *in vitro* (16%), ya que en trabajos previos, utilizando el mismo protocolo de desinfección, los frutos contaminados alcanzaron el 60% (Musso et al., 2010), estas diferencias pueden deberse a las condiciones ambientales durante la maduración de los mismos. En *S. balansae*, una especie de la familia Anacardiaceae, típica de los bosques en

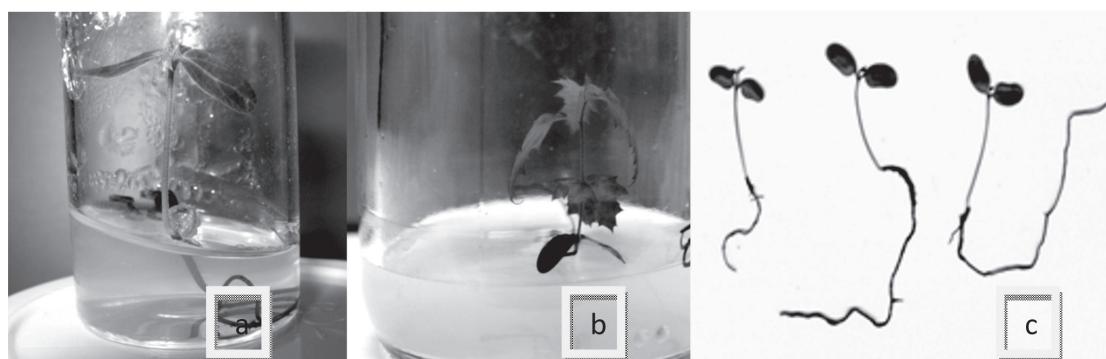


Figura 1. Plántula normal: a-en AA, b- en MS, c- de ensayo de germinación en arena.



Figura 2. Plántula anormal en medio de cultivo.

donde prospera *Schinus fasciculata*, los frutos presentaron mayor contaminación por patógenos fúngicos en años de elevadas precipitaciones entre la floración y la plena madurez. Esto dio como resultado una menor germinación (Alzugaray et al., 2007). Sansberro et al. (2003), trabajando en *Schinopsis balansae*, registraron un porcentaje de explantos contaminados del 30%, siendo el tiempo de exposición en hipoclorito de sodio de 10 min, en lugar de 20 min utilizado en este trabajo. Contaminaciones del 20-30% de los explantos fueron presentados por Rodríguez et al. (2011) en *Gleditsia amorphoides* utilizando 20 min de inmersión en hipoclorito de sodio. Otros autores completan la desinfección con otros desinfectantes como cloruro de mercurio o fungicidas que pueden afectar los cultivos, es el caso de Benmahioul et al. (2009) en *Pistacia vera* y de Rosero (2004) en *Tectona grandis* que agregan Cobox a la desinfección.

Comparando la contaminación durante la germinación *in vitro* y la germinación en arena, se verifica la existencia de mayor contaminación en los ensayos tradicionales, que producen una baja en la producción de plántulas completas (Alzugaray y Carnevale, 2009). Esto puede deberse a que como norma general, en los ensayos tradicionales de germinación, los frutos sembrados no se desinfectan o sólo se desinfectan si existen evidencias de contaminación severa, con el objetivo de que las semillas expresen completamente su potencial (Willan, 1991).

La germinación *in vitro* mostró un elevado porcentaje de plántulas normales emergidas (84%) respecto del ensayo en arena (40%) y de los ensayos informados por otros autores (Alzugaray y Carnevale, 2009), que utilizando métodos tradicionales de producción de plántulas obtuvieron entre un 20-40% de germinación. Las plántulas *in vitro* fueron vigorosas y sanas, ya que a los 7 días la mayor parte de las semillas habían germinado. Estos resultados coinciden con lo observado

por Bueno et al. (2006) para *Maytenus vitis-idaea*, otro arbusto de la región chaqueña, ya que la germinación de las semillas de esta especie en agar-agua aceleró su germinación. Otra especie arbórea de la familia Anacardiaceae, *Pistacia vera L.*, mostró un 100 % de germinación sembrada *in vitro* (García et al., 2010).

Los explantos, se comportaron mejor en medio diluido (MS1/4), estos mismos resultados fueron informados por Sansberro et al. (2003) en *Schinopsis balansae*. Rodríguez et al. (2001), señalan sin embargo, que en *Gleditsia amorphoides*, las concentraciones más diluidas disminuyen la respuesta *in vitro* de la especie. Alzugaray et al. (2013) señalan que las mayores concentraciones de sales mejoran el crecimiento y la proliferación de hojas en *Schinopsis balansae*.

La presencia de un brote por explanto, puede deberse a que no se utilizaron reguladores vegetales en esta etapa, ya que el objetivo era obtener plantas madres. Para promover la formación de brotes, se podrían haber suplementado los medios con ácido indol acético o cinetina (Rodríguez et al., 2011), o aumentar la concentración de sales en los medios base (Alzugaray et al., 2013).

Conclusiones

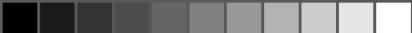
La utilización de la técnica de cultivo *in vitro* en *S. fasciculata* facilita la multiplicación de esta especie de alto valor farmacológico, permitiendo aumentar el porcentaje de frutos germinados y obtener plántulas libres de patógenos durante todo el año.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Referencias bibliográficas

- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J.; Salinas, A. R. y Pioli R. 2005. Observations on quality of *Schinopsis balansae* Engl. seeds. *Seed Technology*. (27) 1: 49-58.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J. 2009. Libro de semillas de especies leñosas autóctonas (Chaco húmedo. Cuña Boscosa santafesina). Ed. Subsecretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Provincia de Santa Fe. Ministerio de Aguas, Servicios Públicos y Medio Ambiente. Prov. Santa Fe. P. 112.
- Alzugaray, C.; Giampaoli, J.; Bueno, M. 2013. Germinación *in vitro* de *Schinopsis balansae* Engl. *Quebracho*. 21 (1,2):39-45.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J.; Salinas, A. R. y Pioli R. 2007. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24 (2): 142-147.
- Aparicio, A.; Pastorino, M.; Martínez-Meier, A. 2009. Propagación vegetativa de ciprés de la cordillera, una especie vulnerable del bosque subtropical de Sudamérica. *Bosque*. 30, 1: 18-26.
- Association Official Seed Analysis. AOSA. 1992. *Seedling Evaluation Handbook*. Contribution. 35: 101 pp.
- Attrre, S.; Fowke, L. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 35:1-35.



- Benmahioul, B.; Kaid-Harche, M.; Dorion, N.; Daguin, F. 2009. *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae*. 122 (2009) 479–483.
- Bueno, M.; Alzugaray, C.; Freire, R.; Badino, D.; Carnevale, N. 2011. Germinación *in vitro* de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. (molle). VIII Simposio Argentina "La Biotecnología entre nosotros". Buenos Aires, REDBIO.
- Boeri, P.; Scelzo, L.; Ruscitti, M.; Abedini, W.; Marinucci, L. 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*. (9) 1: 31-44.
- Bueno, M.; Severín, C.; Carnevale, N. J.; Alzugaray, C.; Giubileo, G. 2006. *In vitro* germination and production of *Maytenus vitis-idaea* plants in two culture media. *Molecular Medicinal Chemistry*. 11: 8-9.
- Burkart, A.; Bacigalupo, N. 2005. Flora de la provincia de Entre Ríos. Parte IV Dicotiledóneas Arquiclamídeas B: Geraniales a Umbelliflorales. Entre Ríos: Ediciones INTA p. 627.
- Musso, E.; Carnevale, N.; Spotto, N.; Alzugaray, C.; Bueno M. 2010. XII Congreso Anual Soc. Biol. Rosario.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J.A.; Arbeloa, A.; Andreu, P. 2010. Micropropagación e injerto *in vitro* de pistacho. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*. 106 (4): 294-302.
- González, A.M.; Vesprini, J.L. 2010. Anatomy and fruit development in *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 67(2): 103-11.
- Gupta, P. K.; Nadgir, A.L.; Mascarenhas, A.F.; Jagannthan, V. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science letters*. 17: 259-268.
- International Seed Testing Association. 2003. Rules. *Seed Science and Technology*. Zurich. Switzerland.
- InfoStat. 2012. InfoStat v 2012. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Lenzi, M. y Orth, A.I. 2004. Caracterizacão funcional do sistema reprodutivo da Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis- SC- Brasil. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP. 26(2): 198-201.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pensiero, J.F.; Gutiérrez, H.F.; Luchetti, A.M.; Exner, E.; Kern, V.; Brinich, E.; Oakley, L.; Prado, D.; Lewis, J.P. 2005. Flora vascular de la provincia de Santa Fe. Claves para el reconocimiento de las familias y géneros. Catálogo sistemático de especies. Ed. Secretaría de Extensión. Universidad Nacional del Litoral. 403 p.
- Polito, V.S. 1999. Seedlessness and Parthenocarpy in *Pistacia vera* L. (Anacardiaceae): Temporal Changes in Patterns of Vascular Transport to Ovules. *Annals of Botany*. 83: 363-368.
- Rodríguez, V. M.; Vila, S. K.; Rey, H.; Mroginski, L.A. 2011. Organogénesis *in vitro* de *Gleditsia amorphoides* (Leguminosae). *Comunicaciones Científicas y Técnicas UNNE*. 4 p
- Rosero, N. C. 2004. "Micropagación Clonal de árboles seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Disponible en: <<http://www.visagesoft.com>> Consultado el: 3 de abril de 2012.
- Sansberro, P.; Rey, H.; Mroginski, L.A.; Luna, C. 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). *Trees*. 17: 542- 546.
- Sharry, S.; Abedini, W.; Basiglio Cordal, M.A.; Briones, V.; Roussy, L.; Stevani, R.; Galarco, S.; Adema, M.. 2011. Food and medicinal value of some forest species from Buenos Aires (Argentina). *Emir. J. Food Agric.* 23 (3): 222-236.
- Silva, J.B.; Nakagawa, J. 1995. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. *Informativo ABRATES*. 5(1).
- Steibel, P.E.; Troini, H.O.; Oriani, D.S.; Ardoino, S.M.; Toribio, M.S.; Boeris, M.A.; Toso, R.E. 2007. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*. 6 (5): 278-279.
- Trigiano, R. N.; Geneve, R. L.; Merkle, S.A. 1992. Tissue and cell culture of woody legumes. *Horticultural Review*. 14: 265-331.
- Verzino, G.E.; Joseau, M.J. 2005. El banco nacional de germinación de *Prosopis*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UN de Córdoba. 235 p.
- Vivot Lupi, E.P.; Sánchez Brizuela, C.I.; Cacik Jeifetz, F.; Sequin Acosta, C.J. 2009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Rev. Cubana de Farmacia*. 43(4):74-84.
- Willan, R.L. 1991. *Guía para la manipulación de semillas forestales*. ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Estudio Montes FAO* 20/2. 502 pp.



ARTÍCULO CORTO

Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56

Effect of growth conditions and culture medium composition on bacteriocin production by *Enterococcus mundtii* Tw56

Marisol Vallejo*, **Pablo Ledesma ****, **Luciano Anselmino *****, **Emilio Marguet******

Resumen

Enterococcus mundtii Tw56 es una cepa productora de bacteriocina que fue aislada del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes sp.*). El objetivo del presente trabajo fue determinar los factores fisicoquímicos y la composición del medio de cultivo para lograr un mayor rendimiento de células viables y producción de bacteriocina. No se observaron cambios en la producción del antimicrobiano cuando la glucosa fue sustituida por fructosa o maltosa en la formulación del medio MRS. Por el contrario, la mayor actividad de las bacteriocinas se obtuvo cuando se utilizó el extracto de carne como fuente única de nitrógeno. Mientras que la máxima biomasa se alcanzó a 35 °C, las temperaturas óptimas para la producción de bacteriocina se observaron a 25 y 30 °C. El pH inicial óptimo para el crecimiento celular y bioactividad fue 6,5, ambos parámetros disminuyeron cuando la experiencia comenzó a pH 6,0 o 5,5. La formación de biomasa y la producción de bacteriocina disminuyeron en presencia de cloruro de sodio. La cepa comenzó a producir bacteriocina en la fase exponencial tardía. La actividad aumentó en función de la masa celular y alcanzó el máximo al final de la fase exponencial (12 h). Una disminución de la actividad antimicrobiana se observó en la fase estacionaria (16 h), posiblemente debido a la degradación por enzimas proteolíticas.

Palabras clave: *Enterococcus mundtii* Tw56, bacteriocina, factores fisicoquímicos, medio de cultivo.

Abstract

Enterococcus mundtii Tw56 is a bacteriocin-producing strain that was isolated from intestinal content of silverside (*Odontesthes sp.*). The aim of the present work was to determine physicochemical factors and culture medium composition for higher yield of viable cells and bacteriocin production. No changes were observed in the antimicrobial production when glucose was replaced by fructose or maltose in the MRS medium formulation. On the other hand, highest bacteriocin activity was obtained when meat extract was used as a sole nitrogen source. While the maximum biomass was achieved at 35 °C, the optimal temperatures for bacteriocin production were observed at 25 and 30 °C. The optimal initial pH for cell growth and bioactivity was 6.5, both parameters dropped when the experience started at pH 6.0 or 5.5. Biomass formation and bacteriocin production decreased in the presence of sodium chloride. The strain started producing the bacteriocin at the late exponential phase. The activity increased as a function of the cell mass and reached the maximum at the end of exponential phase (12 h). A decrease of antimicrobial activity was observed in the stationary phase (16 h), possibly due to degradation by proteolitic enzymes.

Key words: *Enterococcus mundtii* Tw56, bacteriocin, physicochemical factors, culture medium.

Recibido: noviembre 18 de 2013

Aprobado: septiembre 18 de 2014

- * Doctora en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. sotrelew@gmail.com
- ** Licenciado en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. reuteriar@yahoo.com
- *** Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. patxlu@hotmail.com
- **** Doctor en Bioquímica. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. emarguet@yahoo.com.ar



Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo bacteriano utilizado tradicionalmente en fermentaciones industriales de alimentos de origen lácteo, vegetal o cárnico (Cleveland et al., 2001). Estos microorganismos contribuyen al desarrollo de aroma, sabor y textura de los productos fermentados. Sin embargo, su efecto no se limita a brindar una calidad sensorial determinada a los alimentos, sino que las BAL son también responsables de su preservación, evitando el desarrollo de microorganismos contaminantes o patógenos (O'Sullivan et al., 2002). Esta propiedad particular se debe a la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana inespecífica como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo y etanol. En forma adicional, algunas cepas de BAL tienen la propiedad de sintetizar bacteriocinas, péptidos de síntesis ribosomal que actúan en forma específica sobre la membrana de bacterias filogenéticamente relacionadas (Dobson et al., 2012).

Las bacteriocinas producidas por BAL están categorizadas en 3 diferentes grupos: Clase I o lantibióticos, pequeños péptidos modificados luego de la traducción que contienen aminoácidos inusuales como la lantionina; Clase II, subdividida en las subclases IIa, IIb y IIc, constituida por bacteriocinas que no sufren modificaciones luego de su síntesis y Clase III, péptidos termosensibles (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996).

Durante los últimos años se ha desarrollado un especial interés por el estudio de bacteriocinas de la clase IIa para su potencial uso en preservación de alimentos puesto que presentan actividad contra patógenos de origen alimentario como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* (Gillor et al., 2008).

Dentro de las BAL, la familia *Enterococcus* exhibe una alta frecuencia de cepas productoras de bacteriocinas, especialmente de la clase IIa. Su inclusión en procesos fermentativos de alimentos no sólo responde a esta característica fisiológica, sino que además este grupo posee actividades enzimáticas degradativas que conjuntamente a la utilización de citrato, contribuyen al desarrollo de sabores y aromas típicos (Franz et al., 2007).

Su utilización en alimentación humana y/o animal resulta controversial puesto que algunas especies de esta familia se encuentran relacionadas con enfermedades nosocomiales como endocarditis, bacteriemia e infecciones pélvicas, abdominales y del sistema nervioso. Sin embargo, las especies vinculadas a patologías humanas quedan limitadas a *E. faecalis* y *E. faecium* mientras que las restantes resultan agentes etiológicos infrecuentes (Sabia et al., 2008).

La exigencia de alimentos naturales impuesta por los consumidores, ha inducido al estudio de bacteriocinas y de bacterias productoras. La inclusión de antimicro-

bianos naturales o de cepas bacteriocinogénicas se presenta como una alternativa viable para reemplazar a los conservantes químicos (O'Sullivan et al., 2002; Settanni et al., 2008).

La preservación de alimentos, utilizando producción *in situ*, o la bacteriocina purificada o semipurificada, requiere estudiar y definir la relación entre las condiciones fisicoquímicas y el nivel de síntesis con el propósito de optimizar la actividad antimicrobiana. La producción de péptidos específicos está influenciada por el pH, la temperatura, la composición del medio, la densidad celular y la fase de crecimiento (Delgado et al., 2005; Aktypis et al., 2007; Todorov y Dicks, 2009; Kanmani et al., 2011; Metsoviti et al., 2011). Algunos autores describen una asociación directa entre la densidad celular y la producción de una determinada bacteriocina, sin embargo esta relación no siempre se corresponde con el incremento de la síntesis del antimicrobiano (Avonts et al., 2004; Aktypis et al., 2007).

En este estudio evaluamos la influencia de la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH, la concentración de NaCl y la fase de crecimiento sobre la producción de bacteriocina de la cepa *E. mundtii* Tw56. Esta BAL fue aislada del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes sp.*) y seleccionada posteriormente sobre la base de su actividad específica antilisteria (Marguet et al., 2011).

Materiales y métodos

Microorganismo e identificación fenotípica

La cepa *Enterococcus mundtii* Tw56, aislada previamente del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes sp.*), se obtuvo de la colección perteneciente al Laboratorio de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia). La identificación fenotípica, a nivel de género y especie, se llevó a cabo según las recomendaciones de Manero y Blanch (1999). La cepa se reactivó con sucesivos cultivos en caldo y agar De Man, Rogosa y Sharp (MRS, Biokar, Francia) y se conservó en leche descremada suplementada con glicerol al 10 % a -30 °C.

Identificación genotípica

Luego de una incubación a 35 °C durante 12 h en caldo MRS, la cepa se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 5 min. y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica el ARNr 16S, con un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), usando los cebadores universales para procariotas



5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' y 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3', según lo descrito por DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes

La actividad antibacteriana se determinó luego de cultivar la cepa *E. mundtii* Tw56 según los parámetros establecidos en cada experiencia. Luego del período de incubación, el cultivo se centrifugó a 8000 g a 4 °C durante 10 min. En todos los casos el sobrenadante libre de células (SLC) se ajustó a pH 6,8 con NaOH 0,5 M (Anedra, Argentina) y se sometió a un calentamiento de 100 °C durante 5 min. Posteriormente, el SLC se filtró utilizando membranas Sartorius de 0,22 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania) y se almacenó a -30 °C hasta la realización de los ensayos.

La determinación cuantitativa de la actividad de los sobrenadantes se realizó por el método de difusión en placa. Se colocaron 50 µl de diluciones sucesivas del SLC en pocillos (6 mm de diámetro) practicados en placas de agar Tripticasa Soja (Britania, Argentina), sembrados previamente con 50 µl de un cultivo (0,5 de la escala Mc Farland) de *Listeria innocua* ATCC 33090. Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 30 °C durante 24 h. La actividad se definió como la recíproca de la dilución más alta que exhibió inhibición completa de la bacteria blanco en la placa inoculada y se expresó en unidades arbitrarias (AU) por mililitro de SLC. (Floriano et al., 1998).

Evaluación de la población bacteriana

La población bacteriana de los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Jenway 6400. La conversión a biomasa celular, expresada en g/L, se realizó de acuerdo a la correlación entre la DO y el peso celular seco (Delgado et al., 2005).

Fuentes de nitrógeno y carbono

Para determinar la influencia de las fuentes de nitrógeno y carbono sobre la producción de bacteriocinas se utilizó la fórmula del caldo MRS original introduciendo las modificaciones correspondientes. En el caso de las fuentes de nitrógeno se reemplazaron los 10 g/L de pluripeptona y 10 g/L de extracto de carne que componen originalmente la fórmula del medio citado por 20 g/L de las siguientes fuentes proteicas: bactopeptona® (Difco), casaminoácidos® (Difco), extracto de carne (Biokar), peptona (Merck) y triptona® (Merck).

En el caso de las fuentes de carbono, los 20 g/L de glucosa del medio original se reemplazaron por igual concentración de los siguientes azúcares: fructosa (Fluka), lactosa (Fluka), sacarosa (Mallinckrodt) y maltosa (Fluka). Todas las experiencias se realizaron a 25 °C y con un pH inicial de 6,5.

Factores fisicoquímicos

La influencia del pH inicial sobre la actividad de los SLC de ensayó con valores de 6,5; 6,0 y 5,5 a 25 °C. Con el mismo propósito de determinó la actividad en caldo MRS suplementado con NaCl en concentraciones de 5, 10, 20, 40, y 60 g/L a 25 °C.

La influencia de la temperatura sobre la producción de bacteriocinas se determinó en caldo MRS comercial a 20, 25, 30, 35, 40 y 45 °C.

Curva de crecimiento vs actividad

Se determinó la curva de crecimiento y la actividad de la bacteriocina producida en las condiciones óptimas determinadas en los ensayos descritos, durante un período de 24 h. Se tomaron muestras en forma aseptica cada 2 h para determinar su densidad óptica (DO) a 600 nm y su actividad (UA) según lo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado; los promedios, desvíos estándar y análisis de la varianza (ANOVA) se calcularon mediante el uso del programa estadístico HyperStat. El ANOVA se aplicó para establecer diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Resultados y discusión

La identificación bioquímica de *E. mundtii* Tw56 se confirmó por identificación genotípica mediante el secuenciamiento del gen ARNr 16S y posterior comparación con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank. Las 1396 bases secuenciadas exhibieron un 100% de homología con la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa *E. mundtii* ATCC 43186.

El efecto de la temperatura sobre la producción de bacteriocina se estudió en caldo MRS comercial en un rango de 20 °C a 45 °C. Exceptuando el ensayo a 45 °C, temperatura donde no se detectó actividad, en todos los otros casos la producción pudo ser demostrada a partir de la fase logarítmica y llegando al máximo al final de la misma.

La máxima producción se logró a 25 y 30 °C (tabla 1) mientras que la máxima población se alcanzó a los 35 °C, temperatura óptima para el crecimiento de *E. mundtii*. Estos resultados demuestran que no necesariamente existe asociación entre el nivel de actividad



Tabla 1. Crecimiento y actividad de *E. mundtii* Tw56 en función de la temperatura, pH inicial del medio y concentración de NaCl.

Composición del medio	Actividad* (UA/mL)	Masa celular** (g/L)
MRS control (pH inicial 6,8; 30 °C)	20.480	2,35±0,12 ^a
MRS-20 °C	10.240	2,23±0,06 ^a
MRS-25 °C	20.480	2,26±0,15 ^a
MRS-35 °C	5.120	2,37±0,21 ^a
MRS-40 °C	1.280	2,13±0,11 ^a
MRS-45 °C	-	1,91±0,09 ^b
MRS-pH 6,5	20.480	2,28±0,16 ^a
MRS-pH 6,0	10.240	1,99±0,11 ^b
MRS-pH 5,5	10.240	1,91±0,13 ^b
MRS- NaCl 5 g/L	10.240	2,33±0,12 ^a
MRS- NaCl 10 g/L	2.560	2,30±0,14 ^a
MRS- NaCl 20 g/L	1.280	1,88±0,23 ^b
MRS- NaCl 40 g/L	640	1,75±0,18 ^b
MRS- NaCl 60 g/L	160	1,44±0,15 ^b

* Ensayo realizado por triplicado.

** Valor promedio ± desvío estándar. Los superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a los valores del control.

antibiótica y el crecimiento de la cepa (Delgado et al., 2005). Un dato relevante es que a 45 °C no se detectó producción de bacteriocina, sin embargo la cepa logró altos niveles poblacionales ($1,91 \pm 0,09$ g/L), característica de muchas especies de enterococos. Este resultado no está de acuerdo con los exhibidos en trabajos previos que muestran sólo una disminución marcada del nivel de actividad a la temperatura citada. (Zendo et al., 2005; Settanni et al., 2008; Kanmani et al., 2011)

Se realizaron, en forma adicional, ensayos a más bajas temperaturas y se detectó tanto crecimiento como actividad hasta 8 °C (datos no mostrados).

La variación de la actividad con respecto al pH inicial del medio de cultivo se ensayó en caldo MRS a 25 °C ajustando el pH a 6,5; 6,0 y 5,5. Los mejores resultados se lograron cuando la experiencia se realizó a partir de un pH inicial de 6,5; valor aproximado al pH original del medio (6,8). En los 2 restantes casos se obtuvieron valores menores al obtenido a pH 6,5 (tabla 1).

Estos datos coinciden con los publicados por otros autores y en consecuencia se podría afirmar que la mayor producción se logra partiendo de un medio de cultivo con valores de pH aproximados al óptimo para el crecimiento de *E. mundtii* (Kanmani et al., 2001; Todorov y Dicks, 2009). Algunas experiencias realizadas

en fermentadores a pH estable (6,5-7,0) no parecen mostrar resultados promisorios. En la mayoría de los casos el descenso de pH parece estar vinculado a una mayor producción de antimicrobiano (Guerra y Pastrana, 2003; Aktypis et al., 2007).

La bibliografía exhibe resultados contradictorios con respecto al efecto producido por la adición de NaCl a los medios de cultivo sobre la actividad específica. Algunos autores afirman que la presencia de pequeñas concentraciones de Na⁺ aumentaría la actividad en cepas de BAL productoras de bacteriocinas (Neyens et al., 2003; Delgado et al., 2005). Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico esta afirmación no presenta argumentos aceptables; el Na⁺ es un catión que las BAL no utilizan en sus reacciones bioquímicas (Devriese y Pot, 1995). Su presencia en medios de cultivo implica la necesidad de eliminarlo del citosol por diversos mecanismos de transporte que necesitan, en todos los casos, gasto de energía. Los resultados obtenidos en esta experiencia afirmarían esta posición: en todos los casos donde fue adicionado NaCl se produjo una disminución de la producción del antimicrobiano y a concentraciones superiores a 1 %, el descenso fue aún más marcado (tabla 1).

La selección de una adecuada fuente de carbono resulta importante para lograr una rápida duplicación celular y alcanzar una población suficiente que pueda sintetizar altos niveles de bacteriocinas. La mayor actividad se logró cuando se incluyó en la formulación fructosa o maltosa, resultados comparables con la glucosa, azúcar empleado en el medio original. La utilización de lactosa exhibió una alta población final pero con una marcada disminución de la actividad, mientras que la inclusión de sacarosa en el medio de cultivo mostró, no sólo una baja producción de bacteriocinas sino también un bajo nivel poblacional final, fenómeno que indicaría alguna dificultad en el transporte o en el metabolismo de este disacárido (tabla 2). Estos resultados coinciden con los exhibidos en trabajos previos (Settanni et al., 2008; Todorov y Dicks, 2009).

Una de las claves en la optimización de la producción de bacteriocinas constituye la elección de la fuente de nitrógeno. En nuestra experiencia se reemplazaron de la fórmula original del caldo MRS los 20 g/L correspondientes a sus 2 fuentes de N (pluripeptona y extracto de carne) por igual concentración de una única fuente y manteniendo en forma constante la concentración indicada para el extracto de levadura (5g/L).

Los mejores resultados como se puede observar en la tabla 2 se obtuvieron cuando se utilizó extracto de carne como fuente de N (40.960 UA/mL), duplicando la actividad obtenida en el control. El extracto de carne es uno de los derivados proteicos más costosos, sin embargo, analizando los resultados obtenidos constituye, en este caso, una buena elección para la producción de bacteriocinas.



Tabla 2. Crecimiento y actividad de *E. mundtii* Tw56 en función de diferentes nutrientes.

Composición del medio	Actividad* (UA/mL)	Masa celular** (g/L)
MRS control (pH inicial 6,8; 30 °C)	20.480	2,35±0,12 ^a
MRS-bactopeptona	2.560	2,01±0,16 ^a
MRS-casaminoácidos	10.240	1,40±0,08 ^b
MRS-extracto de carne	40.960	2,48±0,07 ^a
MRS-peptona	5.120	1,46±0,41 ^b
MRS-triptona	10.240	2,32±0,18 ^a
MRS-fructosa	20.480	1,85±0,22 ^b
MRS-lactosa	2.560	2,16±0,11 ^a
MRS-sacarosa	5.120	0,51±0,09 ^b
MRS-maltosa	20.480	2,13±0,14 ^a

* Ensayo realizado por triplicado.

** Valor promedio ± desvío estándar. Los superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a los valores del control.

Algunos trabajos vinculados con la producción de péptidos con capacidad antibiótica sugieren elevar la concentración de fuentes de nitrógeno para obtener niveles más altos de actividad (Kanmani *et al.*, 2011). Sin embargo, esto aumenta mucho el costo del medio de cultivo y además las altas concentraciones de derivados proteicos actúan como amortiguadores del pH impidiendo la acidificación del medio. Este efecto, como explicamos anteriormente en el caso de *E. mundtii* Tw56, disminuye la síntesis de bacteriocinas y en consecuencia no resulta recomendable.

En la figura 1 se puede observar la evolución del crecimiento de la población, expresada en DO relativa y la actividad antimicrobiana en función del tiempo. Para esta experiencia se cultivó la cepa en estudio utilizando en la formulación las mejores condiciones para la producción de bacteriocina: fructosa como fuente de carbono, extracto de carne como fuente de nitrógeno, se ajustó el pH a 6,5; no se adicionó NaCl y se incubó a 25 °C. La gráfica nos muestra una fase lag corta seguida por una fase logarítmica que llegó al máximo de población a las 12 h de incubación. La actividad de la bacteriocina se detectó a partir de las 6 h de incubación y llegó a su máximo a las 12 h donde alcanzó las 40.960 UA/mL. Luego de las 16 h se observó una disminución drástica de la actividad, fenómeno que coincide con lo descrito en anteriores trabajos (Todorov y Dicks, 2009; Kanmani *et al.*, 2011). La molécula de bacteriocina es un péptido muy estable en un amplio rango de pH y temperatura, en consecuencia esta disminución de la capacidad antibiótica no debería

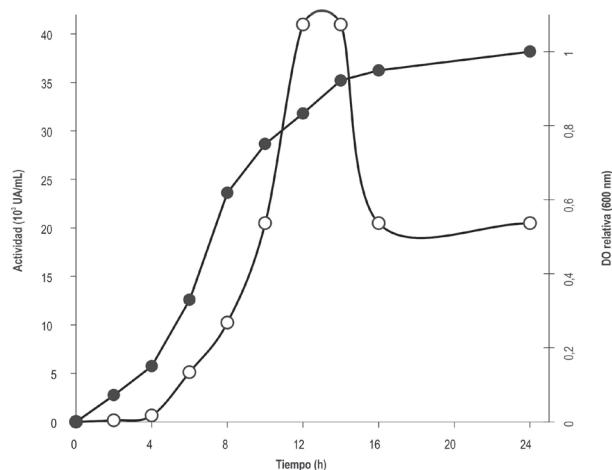


Figura 1: Curva de crecimiento (●) expresada en DO relativa y actividad antimicrobiana (○) de *E. mundtii* Tw56 en función de tiempo.

atribuirse a las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo. Algunos autores indican que la inestabilidad se debe a la actividad enzimática de proteasas intracelulares inespecíficas que actuarían degradando el péptido sin embargo, esta afirmación nunca ha sido demostrada en forma fehaciente (Avonts *et al.*, 2004; Aktypis *et al.*, 2007).

Conclusiones

La cepa *E. mundtii* Tw56, aislada del contenido intestinal de pejerrey mostró una alta actividad específica contra *L. innocua* ATCC 33090. El estudio de las variables fisicoquímicas y componentes del medio de cultivo permitió alcanzar una alta expresión de la bacteriocina, comparable con los resultados publicados por otros autores. En este caso particular, la composición óptima del medio de cultivo se logró incluyendo extracto de carne como única fuente de nitrógeno y fructosa como única fuente de carbono en la fórmula del medio MRS. Sobre la base de esta fórmula, se estableció que las mejores condiciones para la producción de bacteriocina fueron a 25-30 °C, con un pH inicial de 6,5; en ausencia de NaCl y luego de 12 h de incubación. Estudios complementarios permitirán determinar la posibilidad de la potencial utilización de la cepa *E. mundtii* Tw56 como biopreservante en el campo de la industria alimenticia, estableciendo como condición previa, determinar la ausencia de genes vinculados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos para garantizar su inocuidad.

Referencias bibliográficas

- Aktypis, A.; Tychowski, M.; Kalantzopoulos, G.; Aggelis, G. 2007. Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92:207-220.



- Avonts, L.; Van Uytven, E.; De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* 14:947-955.
- Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F.; Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71:1-20.
- Delgado, A.; Brito, D.; Peres, C.; Noé-Arroyo, F.; Garrido-Fernández, A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol.* 22:521-528.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 89: 5685-5689.
- Devriese, L.A.; Pot, B. 1995. The genus *Enterococcus* en The genera of lactic acid bacteria. London, United Kingdom, Wood and Holzapfel ed. p 327-367.
- Dobson, A.; Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.
- Floriano, B.; Ruiz-Barba, J.L.; Jiménez-Díaz, R. 1998. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883-4890.
- Franz, C. M. A. P.; van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H.; Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293-310.
- Gillor, O.; Etzion, A.; Riley, M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 591-606.
- Guerra, N.P.; Pastrana, L. 2003. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 51-55.
- Kanmani, P.; Satishkumar, R.; Yuvaraj, N.; Alagesan Paari, K.; Pattukumar, V.; Venkatesan, A. 2011. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin production by an aquaculture probiotic *Enterococcus faecium* MC13 isolated from fish intestine. *Korean J. Chem. Eng.* 28:860-866.
- Klaenhammer, T.R. 1993 Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Manero, A.; Blanch, A.R. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425-4430.
- Marguet, E.; Vallejo, M.; Sierralta Chichisola, V.; León Quispe, J. 2011. Actividad antagonista de bacterias ácido lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 45: 305-311.
- Metsoviti, M.; Paramithiotis, S.; Drosinos, E.H.; Skandamis, P.N.; Galiotou-Panayotou, M.; Papanikolaou, S. 2011. Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *New Biotech.* 28: 600-609.
- Nes, I.F.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S.; Brurberg, M.B.; Eijsink, V.; Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 113-128.
- Neysens, P.; Messens, W.; De Vuyst, L. 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.* 88:29-39.
- O'Sullivan, L.; Ross, R.P.; Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
- Sabia, C.; Niederhauern, S.; Guerrieri, E.; Messi, P.; Anacarso, I.; Monicardi, G.; Bondi, M. 2008. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J. Appl. Microbiol.* 104: 970-979.
- Settanni, L.; Valmorri, S.; Suzzi, G.; Corsetti, A. 2008. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiol.* 25: 722-728.
- Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. 2009. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe.* 15:65-73.
- Zendo, T.; Eungruttanagorn, N.; Fujioka, S.; Tashiro, Y.; Nomura, K.; Sera, Y.; Kobayashi, G.; Nakayama, J.; Ishizaki, A.; Sonomoto, K.; 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1181-1190.



ARTÍCULO CORTO

Establecimiento *in vitro* de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco)

***In vitro* establishment of two species native to Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) and *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco)**

Hine Gómez, Ana*; Rojas Vargas, Alejandra; Daquinta Gradaille, Marcos *****

Resumen

El objetivo de esta investigación fue lograr el establecimiento *in vitro* de la especie *Terminalia amazonia* y *Vochysia allenii* debido a la dificultad de propagarlas sexual y asexualmente con técnicas convencionales. Se logró establecer segmentos nodales de ambas especies en condiciones *in vitro* empleando el $HgCl_2$ 0,1 % con un tiempo de exposición de 5 minutos. El mejor medio de cultivo para nudos fue el WPM 100 % de sales para *T. amazonia* y para *V. allenii* fue el WPM 50 % de sales. Después de 28 días de cultivo se obtuvo un 42 % de nudos establecidos para *T. amazonia* y 10% para *V. allenii*. En ambas especies se evaluó el efecto sobre la brotación de cinco concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (0,0; 2,22, 4,44, 6,66, 8,88 μM L^{-1}) y cinco de thidiazuron (TDZ) (0,0; 0,22, 0,45, 0,68, 0,90 μM L^{-1}). Se obtuvo en promedio un brote por explante en los cinco tratamientos de BAP y TDZ utilizados.

Palabra clave: cultivo *in vitro*, nudos, 6-bencilaminopurina, thidiazuron.

Abstract

The objective of this research was to achieve the *in vitro* establishment of the species *Terminalia amazonia* and *Vochysia allenii* due to the difficulty propagate sexually and asexually with conventional techniques. It was possible to establish the nodal segments of both species in *in vitro* conditions using 0.1 % $HgCl_2$ with an exposure time of 5 minutes. The best nodal culture medium was 100 % WPM salts in *T. amazonia* and *V. allenii* was WPM 50% salts. After 28 days of culture 42 % of nodal segments to *T. amazonia* and *V. allenii* 10% was obtained. In both species, the effect on sprouting of five concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BAP) (0,0, 2,22, 4,44, 6,66, 8,88 μM L^{-1}) and five thidiazuron (TDZ) (0,0, 0,22, 0,45, 0,68, 0,90 μM L^{-1}) was evaluated. Outbreak was scored on average per explant in the five treatments of BAP and TDZ used.

Key word: *in vitro* culture, nodal segments, 6-benzylaminopurine, thidiazuron.

Recibido: febrero 18 de 2014

Aprobado: octubre 17 de 2014

Introducción

El amarillón, *Terminalia amazonia*, es un árbol grande de 25 a 45 m de altura, ampliamente distribuido en el bosque lluvioso y altamente valorado por su madera de alta calidad, su crecimiento es moderado convirtiéndolo en candidato para plantar desde altitudes bajas hasta medianas. Su madera dura y durable, es

cotizada en los mercados nacionales e internacionales. Por su alta fortaleza y acabado atractivo tiene diversos usos en construcción general (armadura de techos y pisos), mueblería y construcción externa, incluyendo en durmientes para ferrocarriles y puentes. Se recomienda para mangos de herramientas, encofrados, puentes, pilotes, tarimas, pisos industriales, chapa,

* Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA). CP 86-3000. Costa Rica. Tel.: 25624606, ana.hine.gomez@una.cr.

** Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA). CP 86-3000. Costa Rica. Tel.: 25624606, alejandra.rojas.vargas@una.cr.

*** Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km. 9. CP 69450. Cuba. Tel.: 2713313.



parquet, barriles, puertas y tablilla (OFI y CATIE, 2003; Zamora et al., 2003).

Por otra parte, el árbol de botarrama blanco, *Vochysia allenii*, es un árbol de buen tamaño de 30 a 35 m de altura y 98-120 cm de DAP (diámetro a la altura de pecho). Su madera puede usarse en la construcción interna y carpintería general, postes de cercas, formáletas, molduras, cornisas y rodapié, cajas de diversos tamaños, fósforos, palillos y enchapes. Esta madera tiene características excelentes para la producción de pulpa para papel (Quesada et al., 1997; Flores y Obando, 2003).

Como respuesta a la dificultad de propagar sexual y asexualmente con técnicas convencionales el amarillón y la existencia de pocos individuos de botarrama, se plantea la propagación *in vitro* como una alternativa de multiplicación de estos materiales. En general, la técnica busca mejorar los sistemas de producción de las especies, producir material sano y seleccionado durante todo el año, útil para el establecimiento de plantaciones clonales de las especies seleccionadas; sin olvidar que se contribuye a la conservación genética de las mismas (Daquinta et al., 2000; Agramonte et al., 2001; Estopá, 2005).

Por otra parte, existen pocos trabajos de cultivo de tejidos en estas especies. Para el género *Terminalia*, Ramesh et al., (2005) lograron el establecimiento exitoso de segmentos nodales de *Terminalia bellirica*; Pandey et al., (2006) lograron el establecimiento de nudos de *Terminalia arjuna* y Méndez y Abdelnour (2014) lograron el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Para botarrama blanco no existen trabajos de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Por lo anterior, se realizó este trabajo con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de amarillón y botarrama blanco para generar otro método de propagación vegetativa.

Materiales y métodos

Establecimiento in vitro de nudos de T. amazonia y V. allenii provenientes de plantas cultivadas en condiciones de invernadero

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Forestales del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional, (UNA), Costa Rica. El material experimental fue donado por la Fundación para el desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR). Una vez colectadas las plantas, se trasladaron a condiciones de invernadero (temperatura promedio 27 °C, humedad relativa 60 %) para ser decapitadas y podadas mensualmente, eliminándose la yema apical con el fin iniciar el rebrote de las yemas axilares (rejuvenecimiento). Finalmente, las plantas se trataron semanalmente con una mezcla de 2 g/l de Agimicina y 2 g/l Benlate y 50 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) por un periodo de cuatro semanas (figura 1).

El material experimental de ambas especies a introducir en condiciones *in vitro*, consistió de nudos tomados de brotes axilares de plántulas mantenidas en condiciones de invernadero (figura 1). Para la desinfección del material, se colectaron los nudos en el invernadero y se trasladaron al laboratorio en una solución de 0,5 g/l de cisteína. Posteriormente, se mantuvieron durante 1 h bajo el flujo de agua constante, seguido se sumergieron en una solución de agua y jabón líquido Antibacterial Bactex (Punto Rojo S.A) al 1 % por 10 min en agitación y se lavaron con ayuda de un cepillo suave para eliminar los contaminantes adheridos superficialmente, luego se enjuagaron con abundante agua. Posteriormente, se evaluaron tres metodologías de desinfección para la introducción *in vitro* de nudos de ambas especies tabla 1. Los explantes de *T. amazonia* se cultivaron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) y el Lloyd y McCown, (WPM)



Figura 1. Plántulas en condiciones de invernadero: (A) *T. Amazonia*; (B) *V. allenii*.



(1980). Para el caso de *V. allenii* se cultivaron los explantes en WPM 100 % y 50 % de fuerza iónica y el MS 50 % de fuerza iónica. Todos los medios de cultivo se complementaron con 3 % de sacarosa, y se solidificaron con 2,7 g L⁻¹ de PhytigelTM (Sigma, St. Louis, MO, USA); el pH del medio se ajustó a 5,7 antes de la esterilización en autoclave (21 °C, 15 lb. presión, 25 min).

Debido a la oxidación del medio de cultivo que presentaron los nudos de *T. amazonia* al ser desinfectados e introducidos en condiciones *in vitro*, se realizó una prueba con diferentes medios de cultivo y antioxidantes con el fin de eliminar la necrosis de los explantes. Los tratamientos empleados se detallan en el tabla 2. Para este ensayo los explantes fueron desinfectados empleando la metodología C (tabla 1).

Inducción de brotes en segmentos nodales de *T. amazonia* y *Vochysia allenii*

Para los ensayos de multiplicación *in vitro*, se emplearon nudos de *T. amazonia*, inmaduros y etiolados durante 30 días en condiciones de invernadero y nudos de *V. allenii*, inmaduros sin etiolación. Los nudos de ambas especies fueron desinfectados empleando la metodología C, que incluía el uso de 0,1 % de HgCl₂. Como unidad experimental se consideró un nudo de 2 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo WPM 100 % de fuerza iónica para el caso de *T. amazonia* y 50 % de fuerza iónica para *V. allenii*, complementados con 3 % de sacarosa, 1 ml L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPM)TM (Plant Cell Technology, Washington DC, USA), 1 g L⁻¹ de PVPPTM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolizada y solidificados con 2,7 g L⁻¹ de PhytigelTM). El pH de los medios se ajustó a 5,7 antes de la esterilización en autoclave (21 °C, 15 lb. presión, durante 25 min). Se estudiaron cinco concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (Sigma, St. Louis, MO, USA): (0,00; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 μM L⁻¹) y cinco de

tidiazuron (TDZ) (Sigma, St. Louis, MO, USA): (0,00; 0,22; 0,45; 0,68; 0,90 μM L⁻¹).

Procesamiento estadístico de los datos

Cada tratamiento consistió de 20 nudos introducidos en condiciones *in vitro*; como unidad experimental se consideró un nudo de 2 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo. Las variables evaluadas fueron las siguientes: porcentaje de nudos contaminados, porcentaje de explantes necrosados y número promedio de brotes por explante desinfectado. El ensayo se evaluó semanalmente durante un mes. En cada uno de los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con 20 nudos por tratamiento. El procesamiento de la información se realizó empleando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2009).

Resultados y discusión

Establecimiento *in vitro* de nudos de *T. amazonia* y *V. allenii*

En *Terminalia amazonia* para la variable explantes libres de contaminación no se logró determinar diferencia entre los tratamientos de desinfección aplicados. El tratamiento con HgCl₂ 0,1 % con un tiempo de exposición de 5 min resultó ser el mejor, debido a que no se presentaron explantes necrosados (0 %) y el porcentaje de explantes sobrevivientes fue alto (76 %). Por su parte, los tratamientos A y B presentaron 100 % de explantes necrosados y no sobrevivió ningún explante. Sin embargo, el material no presentó valores de contaminación importantes, en el tratamiento A se presentó un 73 % de explantes libres de contaminación y en el tratamiento B un 79 %. Además, se debe mencionar que se observó oxidación de los medios de cultivo en todos los explantes desinfectados tanto con NaClO como con HgCl₂. Por este motivo, se necrosó gran parte del material introducido. Se definió el trata-

Tabla 1. Tratamientos empleados para el establecimiento de una metodología de desinfección para nudos de *T. amazonia* y *V. allenii*.

Pasos de desinfección	Tratamientos		
	A	B	C
1. Sumergir en una mezcla en agitación de Agrimicin® (2 g L ⁻¹) y Benlate® (2 g L ⁻¹) por 30 min	✓	✓	-
2. Sumergir en una solución de cloruro de mercurio al 0,1% por 5 min con bomba de vacío.	-	-	✓
3. Sumergir en una solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO i.a) + 0,1 % de tween 80 por 20 min <i>T. amazonia</i> y 15 min <i>V. allenii</i> .	2,5%	3,5%	-
Tres lavados con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar, durante dos min.	✓	✓	✓

✓: paso de desinfección realizado - : paso de desinfección no realizado



miento C con HgCl_2 0,1 % como el más efectivo en la desinfección de nudos de *T. amazonia*.

Tabla 2. Tipos de medios de cultivo y antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 28 días de cultivo

Tipo de medio de cultivo	Tipo de antioxidante
MS (50% de sales)	100 mg L^{-1} ácido cítrico
MS (50% de sales)	100 mg L^{-1} ácido cítrico + 100 mg L^{-1} ácido ascórbico
MS	1 g L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) TM
WPM (50% de sales)	100 mg L^{-1} ácido ascórbico
WPM (50% de sales)	100 mg L^{-1} ácido cítrico + 100 mg L^{-1} ácido ascórbico
WPM (50% de sales)	1 mg L^{-1} ácido cisteína
WPM	1 g L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) TM
WPM	-

Por otro lado, en el caso de *V. allenii* solo se observó explantes limpios en la desinfección con HgCl_2 (47,5 %), de los cuales solo el 10 % sobrevivieron y no se observó oxidación del medio de cultivo. Sin embargo, en esta especie se observó gran pérdida de material por necrosis de los explantes en todos los tratamientos de desinfección y por la presencia de una bacteria persistente. De acuerdo con Smith (2000) y Alvarado (1998), es frecuente que el material vegetal tenga microorganismos endógenos. En algunos casos estos microorganismos se pueden expresar porque la desinfección es un estrés para el vegetal o quedaron latentes y almacenados en el interior de las células, espacios intercelulares o haces conductores.

Por otra parte, el cloruro de mercurio aunque ha tenido sus detractores, es un desinfestante muy empleado en especies donde los hipocloritos no han tenido éxito. Por ejemplo, Daquinta *et al.*, (2007) lograron el establecimiento de Bambú con HgCl_2 0,2 % con un tiempo de exposición de 10 min. Además, Abdelnour y Muñoz (2005), obtuvieron un 40 % de yemas limpias al desinfectar con HgCl_2 0,5 % durante 10 min, yemas de estacas de (*Tectona grandis*) provenientes de plantas de campo.

Pandey *et al.*, (2006) lograron el establecimiento de nudos de *Terminalia arjuna* provenientes de brotes juveniles de árboles de 35 años de edad, aplicando durante 3 min una solución de 0,05 % de HgCl_2 . Además, Ramesh *et al.*, (2005) lograron el establecimiento exitoso de segmentos nodales de plántulas de 3 meses de

edad de *Terminalia bellirica*, provenientes de semillas germinadas en condiciones de invernadero empleando 0,1 % de HgCl_2 por 5 min. Lo que demuestra que el HgCl_2 es utilizado exitosamente como desinfectante para el establecimiento de explantes de diferentes especies del género *Terminalia*. Sin embargo, Abdelnour y Muñoz (2005), observaron que en yemas de *Tectona grandis* provenientes de estacas de campo, desinfectadas con cloruro de mercurio en concentraciones de 1,5 % y 1,0 % se obtienen porcentajes de contaminación del 3 % y 5 % respectivamente, pero estas son incapaces de brotar. Cuando se utilizó este desinfectante en concentraciones de 0,5 % durante 10 min, se observó un mayor porcentaje de explantes contaminados (58 %), pero el 40 % del total de material sometido a desinfección logró el establecimiento aséptico y la brotación de las yemas. Lo anterior, evidencia que aún cuando en muchas especies el HgCl_2 sea el único agente desinfectante que permite la desinfección de los explantes, el tejido vegetal puede dañarse a su exposición, afectando significativamente los porcentajes de sobrevivencia.

Con respecto al comportamiento de los nudos de ambas especies, establecidos en los medios de cultivo MS y WPM 100 % y 50 % de sales, en el caso de *T. amazonia*, se obtuvo entre el 40 - 42 % de explantes vivos (tabla 3) en ambos medios de cultivo. Sin embargo, los mayores valores se obtienen en el medio de cultivo WPM, siendo el mejor para continuar con la investigación. Al analizar los datos de *V. allenii* se observó mayor porcentaje de sobrevivencia (35 %) en el medio WPM al 50 % de sales inorgánicas (tabla 4). Ambos medios de cultivo se han empleado indistintamente para el establecimiento de diversas especies leñosas, de acuerdo a sus exigencias nutricionales (George *et al.*, 2008).

Los resultados presentados en la tabla 5, muestran que el PVPP fue el antioxidante con mejor efecto contra la oxidación del medio de cultivo y la necrosis de los nudos de *T. amazonia*; resultado que coincide con el de Méndez y Abdelnour (2014) en *T. amazonia*. Además, George *et al.*, (2008) mencionan que el PVPP es una poliamida que absorbe los fenoles a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización.

No se observó oxidación de los explantes durante los primeros 7 días de cultivo tanto en el medio MS (1962) como en el WPM. Por lo que se incluye dentro de los compuestos complementarios del WPM a emplear en la etapa de multiplicación. Azofeifa (2009), define la oxidación u oscurecimiento del tejido *in vitro* como la oxidación de radicales libres de diferentes compuestos celulares, así, como la oxidación de los compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO), para producir quinonas, las cuales son muy reactivas, generando daño e incluso la muerte celular.



Tabla 3. Efecto del tipo de medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 28 días de cultivo.

Tratamientos	Explantes limpios (%)	Explantes necrosados (%)	Sobrevivencia (%)
MS (1962)	45,00 ± 0,00	7,50 ± 3,54	40,00 ± 0,00
WPM	50,00 ± 0,00	7,50 ± 3,54	42,00 ± 3,34

Promedio de dos experimentos, cada experimento consistió de 20 nudos por tratamiento.

Tabla 4. Efecto del tipo de medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de nudos *V. allenii*, luego de 28 días de cultivo.

Tratamientos	Explantes limpios (%)	Explantes necrosados (%)	Sobrevivencia (%)
WPM (100% sales inorgánicas)	45	55	20
WPM (50% sales inorgánicas)	60	25	35
MS (1962) (50% sales inorgánicas)	45	45	20

Tabla 5. Efecto del tipo de medio de cultivo y antioxidante en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 7 días de cultivo.

Tipo de medio de cultivo	Tipo de antioxidante	Explantes oxidados (%)
MS (50% de sales)	100 mg L ⁻¹ ácido cítrico+ 100 mg L ⁻¹ ácido ascórbico	45
MS (50% de sales)	100 mg L ⁻¹ ácido cítrico	30
MS	1 g L ⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVPP) TM	0
WPM (50% de sales)	100 mg L ⁻¹ ácido ascórbico	60
WPM (50% de sales)	1 mg L ⁻¹ ácido cisteína	80
WPM (50% de sales)	100 mg L ⁻¹ ácido cítrico	15
WPM (50% de sales)	100 mg L ⁻¹ ácido cítrico + 100 mg L ⁻¹ ácido ascórbico	45
WPM	1 g L ⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVPP) TM	0
WPM	-	55

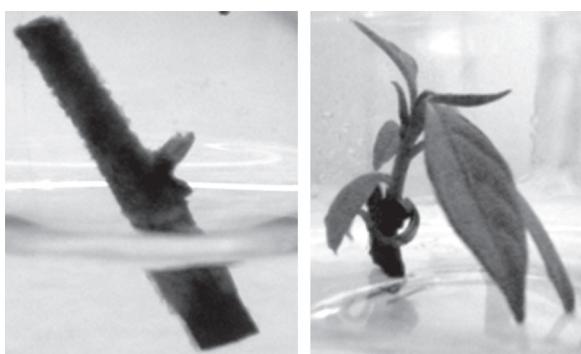


Figura 2. Brote de *T. amazonia* inducido con 4,44 μ M L⁻¹ de 6-BAP (A). Brote de *T. amazonia* desarrollado (B).



Tabla 6. Efecto de diferentes concentraciones de TDZ y 6-BAP sobre la inducción de brotes en nudos de *T. amazonia* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 60 días de cultivo.

	Concentraciones TDZ ($\mu\text{M L}^{-1}$)					Concentraciones 6-BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)				
	0,00	0,22	0,45	0,68	0,90	0,00	2,22	4,44	6,66	8,88
Explantes brotados por tratamiento (%)	25	40	15	15	15	35	35	35	30	20
Promedio de brote/explante brotado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Promedio de dos experimentos, cada experimento consistió de 20 nudos por tratamiento.

Inducción de brotes en segmentos nodales de *T. amazonia* y *V. allenii*

Comportamiento similar en cuanto al número promedio de brotes por explantes, se observó al emplear 6-BAP y TDZ en *T. amazonia* (tabla 6). Obteniéndose un brote por explante en todas las concentraciones evaluadas (figura 3A). Según George *et al.*, (2008), ambas citocininas se han empleado en el establecimiento de diferentes especies leñosas, siendo su respuesta similar a la obtenida en el presente trabajo en *T. amazonia*. En la figura 3B, se presenta la respuesta de un nudo de *T. amazonia*, en presencia de 4,44 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 6-BAP, como se puede notar se alcanza un buen desarrollo tanto del brote como de las hojas en el medio de cultivo WPM. Este resultado concuerda con lo mencionado por Méndez y Abdelnour (2014), donde el 6-BAP actúa como una citocinina que promueve la proliferación de brotes por explante en concentraciones relativamente bajas.

Pandey *et al.*, (2006) y Pijut *et al.*, (2012), lograron propagar *Terminalia arjuna* a partir de segmentos nodales de un árbol maduro. Para lo cual emplearon en medio de cultivo MS a la mitad de sus sales orgánicas y complementado con BAP 4,44 μM y 0,53 μM de ácido naftalenacético (ANA). Por otra parte Ramesh *et al.* (2005) y Pijut *et al.*, (2012), lograron inducir la brotación de *Terminalia bellirica* a partir de explantes nodales cultivados en medio de cultivo MS complementado con 13,3 μM 6-BAP, seguido de subcultivo en un medio que contenía 4,4 de μM 6-BAP. Por su parte, Méndez y Abdelnour (2014) lograron en *T. amazonia* generar brotes con una concentración alta de 6-BAP (30 mg/l) y

Ravi *et al.*, (2014) también lograron inducir brotación de yemas con 1,5 mg/l de 6-BAP.

Por su parte, al utilizar el TDZ en *T. amazonia* se presentó un resultado similar al estudiado por Pandey *et al.*, (2006), los cuales determinaron que el TDZ en algunas especies forestales puede presentar niveles bajos de inducción de yemas.

En la tabla 7 se presenta el efecto de 6-BAP y TDZ sobre la brotación de nudos de *V. allenii*. Se obtuvo en promedio de 1 a 2 brotes por explante, resultado muy similar al presentado en *T. amazonia*.

De acuerdo con la (figura 4 A) las yemas nuevas presentaron un mejor desarrollo en el medio de cultivo complementado con 6-BAP. Este resultado pudo deberse según George (2008), a que el TDZ es un regulador del crecimiento que induce una brotación múltiple y en consecuente los brotes adventicios no pueden elongarse lo suficiente. Por su parte, el 6-BAP sí induce la elongación y desarrollo del brote que prolifera.

Como ya se mencionó, la inducción de yemas presentó un resultado muy similar en ambas especies y evidencia lo mencionado por George *et al.* (2008), en cuanto a que la respuesta de estos reguladores de crecimiento es similar al inducir brotes en especies leñosas. Finalmente, no se reportan trabajos anteriores de micropropagación en *V. allenii*, pero queda claro con este ensayo que la especie responde a los reguladores de crecimiento. Lo anterior, indica que su multiplicación podría darse empleando el cultivo de tejidos como una herramienta para tal fin, pero se debe trabajar otras técnicas hasta obtener un protocolo de multiplicación *in vitro* de la especie.

Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ sobre la inducción de brotes en nudos de *V. allenii* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 28 días de cultivo.

	Concentraciones TDZ ($\mu\text{M L}^{-1}$)				Concentraciones 6-BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)			
	0,00	0,22	0,45	0,68	0,00	2,22	4,44	6,66
Explantes brotados por tratamiento (%)	50	60	35	20	10	10	10	10
Promedio de brote/explante brotado	1	1	2	1	1	1	1	1

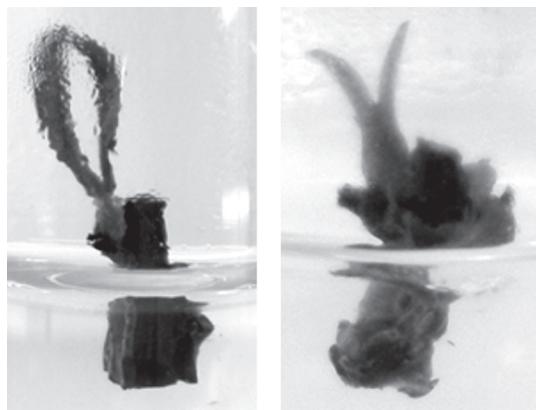


Figura 4. (A) Brote de *V. allenii* inducido con 6-BAP. (B) Brote de *V. allenii* inducido con TDZ.

Conclusiones

En ambas especies se logró el establecimiento *in vitro* utilizando el $HgCl_2$ como agente desinfectante. Se concluye que el WPM 100 % de fuerza iónica es el mejor medio de cultivo para el desarrollo de *T. amazonia*; mientras que para *V. allenii* el mejor medio de cultivo es WPM 50 % de fuerza iónica. Además, se logró la inducción de brotes a partir de segmentos nodales. Sin embargo, los datos obtenidos en ambas especies sugieren que la multiplicación partir de segmentos nodales resulta en baja frecuencia de brotación de los nudos. Lo anterior, las clasifica como especies altamente recalcitrantes o difíciles de establecer en condiciones *in vitro*. Es importante destacar que sí es posible su establecimiento en condiciones *in vitro* y que se deben estudiar otras metodologías de multiplicación que permitan la propagación del material ya establecido.

Referencias bibliográficas

- Abdelnour, A.; Muñoz, A. 2005. Micropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal (Costa Rica). 2(5): 1- 11.
- Agramonte, D.; Delgado, L.; Trocones, A.; Pérez, M.; Ramírez, D.; Gutiérrez, O. 2001. Micropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. *Biología vegetal*. 1(2): 109-114.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas, Cuba. p 81-104.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación en explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*. 20(1): 153-175.
- Daquinta, M.; Gregori, A.; Cid, M.; Lezcano, L.; Sagarría F. 2007. Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biología vegetal*. 7(2): 119-122.
- Daquinta, M.; Ramos, L.; Lezcano, L.; Rodríguez, R.; Escalona, M. 2000. Algunos elementos en la propagación de la teca. *Biología vegetal*. 1: 39-44.
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2009. Infostat versión 2009. Grupo Infostat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Estopá, BM. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa de plantas de vivero. *Viveros Revista Extra*. Pp. 50-56.
- Flores, E.; Obando, G. 2003. Árboles del trópico húmedo: importancia socioeconómica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago. 920 p.
- George EF.; Hall MA.; De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ra Ed. Springer, The Netherlands. 501 p.
- Lloyd, G; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int Plant Prop Soc Proc*. 30: 421- 427.
- Méndez, D.; Abdelnour, A. 2014. Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* (Costa Rica). 11(27): 7-21.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- OFI (Oxford Forestry Institute) y CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2003. *Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas*. UK. 1 disco compacto. 1079p.
- Pandey, S.; Singh, M.; Jaiswal, U.; Jaiswal, V. 2006. Shoot initiation and multiplication from a mature tree of *Terminalia arjuna* Roxb. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 42: 389-393.
- Pijut, PM.; Beasley, RR.; Lawson, SS.; Palla, KJ.; Stevens, ME.; Wang, Y. 2012. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species - A Review (2001-2011). *Propagation of Ornamental Plants*. 12(1): 25-51.
- Quesada, F.; Jiménez, Q.; Zamora, N.A.; Aguilar, R.; González, J. 1997. *Árboles de la Península de Osa*. Heredia, CR, INBio.
- Ramesh, M.; Pavan, U.; Venugopal, K.; Sadanandam, A. 2005. Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. A sericulture and medicinal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 41: 320-323.
- Ravi, M.; Ramanjaneyulu, P; Rao, A. 2014. Micropropagation of *Terminalia arjuna* Roxb. from nursery plant material. *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology*. 01(07): 997-1004.
- Smith, R. 2000. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. 2^{da} Edición. San Diego, USA. Academic Press. p 231.
- Zamora, N.; Jiménez, Q.; Poveda, I.; Aragón, C. *Árboles de Costa Rica*. Heredia, INBIO, Costa Rica. 2003.



Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de neem sobre aislamientos de dermatofitos

Antifungal activity of neem cellular biomass extracts on dermatophytes isolates

Daniel Iván Ospina Salazar*, **Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez****, **Myrtha Arango Arteaga*****,
Fernando Orozco Sánchez****, **Jhon Diego Ríos Salazar*******

Resumen

Las líneas celulares de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) cultivadas en suspensión líquida han demostrado producir metabolitos secundarios bioactivos, particularmente triterpenoides. En consecuencia, se han realizado estudios para el control de microorganismos de importancia médica, como los hongos dermatofitos. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar a través de un método de referencia *in vitro* la actividad antifúngica de diferentes extractos de cultivos celulares de neem sobre varios aislamientos de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*. Se realizó un escalado de cultivos de suspensiones celulares de neem, a partir de los cuales se obtuvo un extracto crudo metanólico. Éste extracto fue fraccionado posteriormente por cromatografía en columna de silice gel. Con los extractos obtenidos se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), siguiendo el método de microdilución en caldo M38-A2, con cinco aislamientos de *T. mentagrophytes*, cinco de *T. rubrum* y tres de *E. floccosum*. Se usó como control positivo el antimicótico Terbinafina. Los resultados mostraron que el extracto crudo de biomasa celular de neem inhibe el crecimiento hasta en 100 % de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum*. Al evaluar las fracciones por separado, se observó que las de menor polaridad exhibieron en general mayor actividad antifúngica (CMI=109 µg/mL) que el extracto crudo *per se* (CMI=2500 µg/mL) y las fracciones más polares (CMI=7000 µg/mL). Lo anterior indica que las células de neem cultivadas en suspensión producen compuestos con actividad antifúngica, siendo más bioactivos los presentes en las fracciones de menor polaridad.

Palabras clave: método de microdilución en caldo, cromatografía, cultivo de células en suspensión, concentración mínima inhibitoria, compuestos bioactivos.

Abstract

Cell lines of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) grown in liquid suspension have shown to produce bioactive secondary metabolites, particularly triterpenoids. In consequence, its use as a control of medical microorganisms (like dermatophytes) is proposed. The main goal of this study was to assess the antifungal activity of methanolic extracts from neem cultured cell suspensions on several isolates of *Trichophyton mentagrophytes* (five isolates), *Trichophyton rubrum* (five isolates) and *Epidermophyton floccosum* (three isolates). Neem cell suspension cultures were scaled up, from which a raw methanolic extract was obtained. This extract was fractionated by silica gel column chromatography. The raw methanolic extract and its fractions were used in order to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) on the dermatophytes isolates by following M38-A2 broth microdilution method. Antimycotic Terbinafine was used as positive control. The results shown that neem raw cellular biomass extract inhibits the growth of *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* and *E. floccosum* in at least 100%. In the evaluations of the separated fractions, it was observed that the low polarity fractions had higher antifungal activity (MIC=109 µg/mL) than the raw extract *per se* (MIC=2500 µg/mL) and the most polar ones (MIC=7000 µg/mL). The

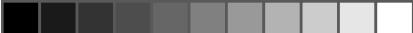
* Estudiante Maestría Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia. diospinas@unal.edu.co

** Profesor asociado, Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.

*** Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**** Profesor asociado, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.

***** Estudiante Maestría Ciencias Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.



latter suggest that neem cells cultured in liquid suspension produces compounds with antifungal activity, being more active those present in the low polarity fractions.

Key words: broth microdilution method, chromatography, suspension cell culture, minimal inhibitory concentration, bioactive compounds.

Recibido: marzo 10 de 2014

Aprobado: octubre 22 de 2014

Introducción

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados que producen infecciones en la piel, el pelo y las uñas tanto del ser humano como de los animales, las cuales reciben el nombre de tiñas (del latín *tinea*). *Trichophyton rubrum* es el agente causal principal de *tinea pedis* (pies), la infección más común por dermatofitos (Fernández-Torres, 2005). *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum* se presentan comúnmente en *tinea unguium* (uñas), la cual afecta a un 15-20 % de individuos entre cuarenta y sesenta años, alcanzando una incidencia de hasta el 48 % entre la población mayor de setenta años (Roseeuw et al. 1999). La prevalencia a nivel mundial de las infecciones causadas por dermatofitos constituyen motivo constante de investigación sobre nuevos métodos de control, de ahí la relevancia actual del uso de los extractos vegetales, entre ellos el de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.).

Los extractos del árbol de neem son de los más poderosos que se pueden encontrar en la farmacopea de la India para combatir varias enfermedades. Esto se ha demostrado a través de estudios con microorganismos patógenos que dan cuenta de su bioactividad. Natarajan et al. (2003) encontraron una CMI de extractos orgánicos de hojas y semillas de neem de 31 µg/mL, sobre los dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum nanum*. También reportan una distorsión en el patrón de crecimiento de estos hongos a una concentración 15 µg/mL. Este mismo autor (Natarajan et al., 2002) menciona que extractos de semillas de neem exhibieron una menor CMI en evaluaciones con *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *M. nanum* y *E. floccosum* que el extracto de hojas. La inhibición en el crecimiento de algunos dermatofitos como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se atribuye a la mayor concentración de triterpenoides en estas partes de la planta.

Algunos autores han observado la existencia de efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos presentes en los extractos de neem. Govindachari et al. (1998) observaron que la mezcla de fracciones obtenidas por HPLC de un extracto metanólico separado del aceite de semillas de *A. indica* resultó efectiva contra *Drechslera oryzae*, *Alternaria tenuis* y *Fusarium oxysporum* (26 % - 72 % de inhibición respecto al control). No obstante, indicaron que los compuestos por separado, como azadiradiona, nimbin y salanina no po-

sean el mismo poder antifúngico. En el mismo sentido se expresan Suresh et al. (1997), quienes a partir de extractos hexánicos y metanólicos de hojas de neem obtuvieron varias fracciones por HPLC, entre otras, los triterpenoides nimonol e isomeldenina, y evaluaron la formación de pústulas de *Puccinia arachidis* en foliolos de maní, *Arachis hypogaea*. Los resultados mostraron que la formación de pústulas era menor en los tratamientos con limonoides mezclados con trazas correspondientes a compuestos análogos. Los anteriores resultados respaldan la idea de que algunos metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de neem poseen mayor actividad antifúngica al actuar de forma combinada que aislada.

La capacidad de algunos compuestos presentes en *A. indica* para inhibir el crecimiento de microorganismos se ha explicado desde el punto de vista bioquímico. Lyer and Williamson (1991) atribuyeron las propiedades antifúngicas de los extractos orgánicos de neem a la inhibición en la actividad proteasa en dermatofitos. Okemo et al. (2001) sostienen que la cinética de acción de ciertos extractos de *A. indica* frente a microorganismos como *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es dependiente de la concentración y el tiempo, y está relacionada con la pared celular. Extractos acuosos de hojas de neem incrementaron la hidrofobicidad superficial de las células de *Candida albicans*, así como la formación de biopelícula en esta levadura (Polaquini et al., 2006).

No obstante lo anterior, falta información acerca de la capacidad de células de *A. indica* cultivadas en suspensión líquida, de producir metabolitos con actividad antifúngica. Debido a que esta técnica de cultivo *in vitro* se ha evaluado para la producción de otros compuestos bioactivos, como la azadiractina, de comprobada acción antialimentaria en insectos lepidópteros (Orozco-Sánchez, 2007), se justifica determinar el potencial de dicha técnica para la producción de metabolitos con otro tipo de atributos biocidas.

En consideración de lo anterior, se plantea evaluar la actividad antifúngica de un extracto metanólico de células de *A. indica* cultivadas en suspensión líquida, así como identificar las fracciones químicas responsables de dicho efecto, empleando el método de referencia *in vitro* M38-A2 para hongos filamentosos y dermatofitos.



Metodología

Material Vegetal

Las suspensiones celulares de *A. indica* se iniciaron por transferencia en forma aséptica de una cantidad estimada de 500 mg de callos friables de 8 semanas de edad a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido consistente en sales básicas Murashige & Skoog (MS, 1962) con orgánicos mínimos (MSMO, Sigma M 6899), sacarosa 3 % (p/v), glicina 2 mg/L, ácido nicotínico 0.5 mg/L, Piridoxina-HCl 0.5 mg/L y tiamina-HCl 0.1 mg/L, y suplementado con ácido indol butírico (IBA) 19,7 μ M (4 mg/L) y 6-benzil amino purina (BAP) 4,44 μ M (1 mg/L), todo diluido en agua destilada. El pH fue ajustado a 5.8 con NaOH 1 M. Se taparon los Erlenmeyer con tapones de algodón y se procedió a esterilizar en autoclave a 121 °C, 20 lb/pulg² durante 20 min. Las suspensiones fueron incubadas en condiciones de oscuridad a 25 °C en un agitador orbital a 120 rpm. El crecimiento de las suspensiones fue medido semanalmente marcando el nivel del sedimento celular. Cada dos semanas, se dejaron en sedimentación las suspensiones para desaguar el medio de cultivo viejo, agregándose inmediatamente un medio líquido fresco y estéril a las células remanentes o sedimentadas. Esta operación se realizó durante tres meses hasta obtener una cantidad considerable de biomasa celular.

Obtención de extractos

La biomasa celular fue filtrada en un montaje con papel de filtro, embudo Büchner, matraz Kitasato y bomba de vacío. Posteriormente, esta biomasa fue liofilizada en un equipo Labconco Freezone 6 (USA) durante 24 horas a -36 °C y 10⁻³ Mbar para extraer toda el agua. Esta biomasa celular se percoló en metanol sucesivamente hasta agotar el material. Los extractos metanólicos resultantes se concentraron al vacío en un rotovapilador R-3000 Büchi a 42 °C hasta obtener una pasta seca (extracto crudo). Una parte de este extracto se rotuló y se guardó hasta los bioensayos de actividad antifúngica. Se realizó un procedimiento de fraccionamiento de la otra parte del extracto crudo, por cromatografía en columna, con base en la información de Jarvis *et al.* (1999). Se inició con 2,3 g de extracto crudo de biomasa celular, el cual se mezcló homogéneamente con 30 g de silice gel de 63 - 200 micrones (Panreac) para conformar la cabeza de la columna. Posteriormente, se agregaron 60 g de silice gel a una columna cromatográfica de 50 cm de altura y 2,5 cm de diámetro y encima se depositó la cabeza mezclada con el extracto. Se realizó un fraccionamiento con mezclas de solventes de diferente polaridad, iniciando con hexano (H), mezcla de hexano - acetato de etilo (Ac), y finalizando con metanol (MeOH) de la siguiente forma:

1: 350 mL H	4: 275 mL H.Ac 3:7
2: 450 mL H:Ac 7:3	5: 550 mL H:Ac 1:9
3: 650 mL H:Ac 6:4	6: 300 mL MeOH

La fracción hexánica fue descartada ya que no produjo ningún rendimiento, mientras que las demás se guardaron para su uso posterior en los bioensayos.

Determinación de la actividad antifúngica

Los aislamientos de dermatofitos fueron gentilmente proveídos por el laboratorio de micología médica de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia, donde fueron aislados e identificados de acuerdo a los criterios de clasificación micológica de Kane *et al.* (1997) y Rebell (1977). Estos aislamientos se cultivaron en Papa-Dextrosa-Agar para promover la formación de conidias:

Trichophyton rubrum: cinco aislamientos

Trichophyton mentagrophytes: cinco aislamientos

Epidermophyton floccosum: tres aislamientos

Los ensayos de actividad antifúngica sobre los aislamientos de dermatofitos se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo M38-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Las colonias de 7 días de crecimiento fueron cubiertas con 3 mL de solución salina estéril al 0,85% p/v y suavemente removidas con un asa estéril para liberar las conidias en la solución. Se realizó conteo en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración final a un rango de 1,0 - 3,0x10³ UFC/mL,

Se prepararon microplacas estériles de 96 pozos de fondo en U con los diferentes extractos de neem, mediante diluciones dobles seriadas, a partir de una solución madre 1x10⁶X de cada extracto en MeOH y dimetil sulfóxido (DMSO) en relación 1:2, llevado a concentración final 1:50 en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con glucosa al 2%, HEPES como amortiguador de pH y sin bicarbonato de sodio. Se empleó el antimicótico comercial Terbinafina como control positivo, y como control de solvente una mezcla de MeOH y DMSO en proporción 1:2. Se dejó un control negativo (sin extracto ni antimicótico) y un control de esterilidad (sin inocular).

Una vez preparadas las placas con el rango de concentraciones a evaluar, se procedió a inocular cada pozo con 100 μ L de la suspensión de conidias ajustada previamente. Las placas fueron cultivadas a 35 °C durante 7 días en oscuridad. Cada bioensayo se hizo por triplicado en un diseño completamente aleatorizado. Los datos se analizaron por medio de la prueba del rango múltiple de Duncan, procesándolos en el programa SAS 9.3.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos fue estimado visualmente comparando la turbidez



del control negativo con el del tratamiento, asignándole un valor en porcentaje, adaptando la metodología de Fernández-Torres (2005). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue establecida como aquella en la que la turbidez fue nula, es decir, pozos translúcidos.

Resultados y discusión

Los resultados mostraron en mayor o menor grado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los trece aislamientos de dermatofitos, dependiendo del tipo de extracto y la concentración. Dentro del rango de concentraciones desplegado entre todos los extractos, la CMI fluctuó entre 109 y 7000 $\mu\text{g/mL}$; el control positivo (Terbinafina) exhibió el mayor poder antifúngico al inhibir totalmente el crecimiento hasta 0.0078 $\mu\text{g/mL}$. No se detectó un efecto inhibitorio en el crecimiento de los dermatofitos debido al control de solvente (MeOH:DMSO 1:2), por lo tanto su contribución a la actividad de los extractos es descartable. Como se muestra en las figuras 1 y 2, la escala de turbiedad en las placas multipozos fue un indicador acertado del crecimiento de los hongos en presencia de los extractos de neem.

Los resultados obtenidos permiten relacionar la actividad antifúngica (a menor CMI mayor actividad antifúngica) con el tipo de extracto. En primer lugar, es importante resaltar que por lo menos dos de las fracciones separadas (2 y 3) del extracto crudo de biomasa celular exhibieron una CMI inferior (109 - 750 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) que el extracto crudo *per se* (2500 $\mu\text{g/mL}$) en varios de los aislamientos de dermatofitos evaluados. Adicionalmente, se observó una tendencia hacia un aumento de la CMI en la mayoría de los aislamientos, al estimar su crecimiento con fracciones de mayor polaridad. Ésta CMI, incluso, podía estar por encima de la del extracto crudo. En algunos casos, no se detectó inhibición del crecimiento.

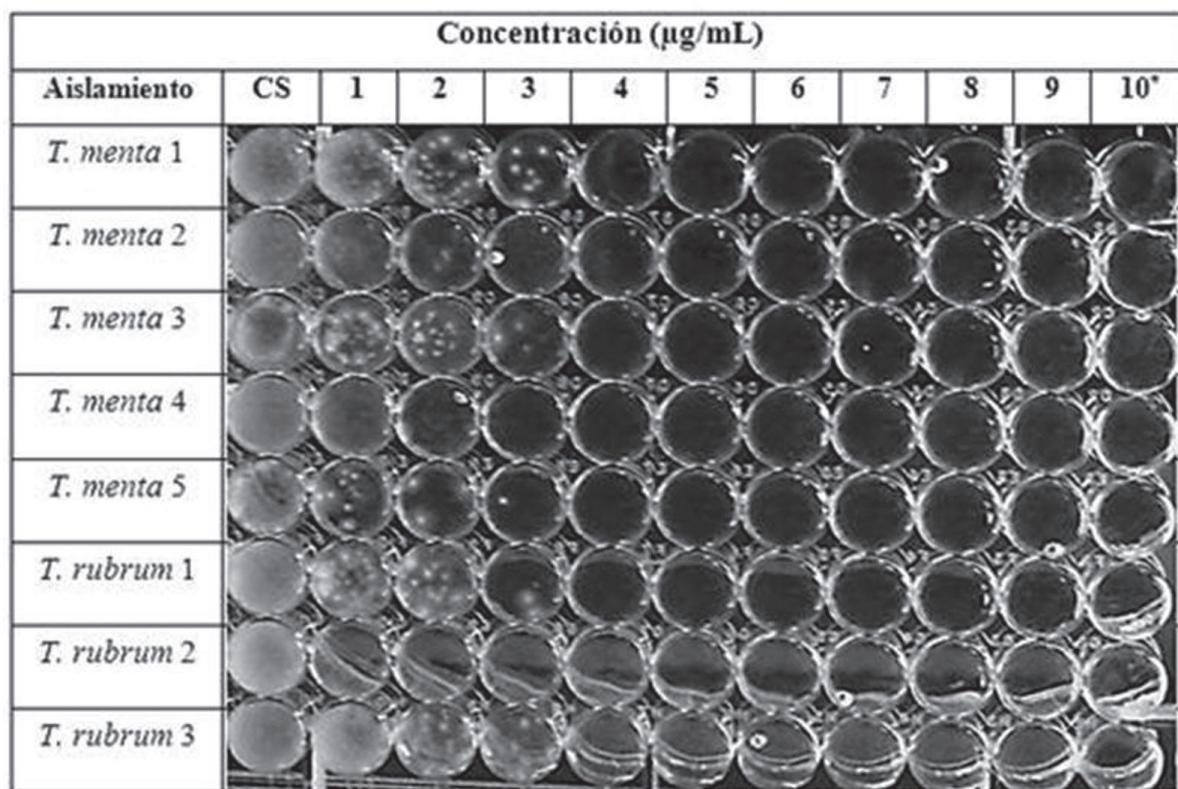
Para ilustrar lo anterior, en la tabla 1 se indican las CMI para cada aislamiento y extracto (mediana de tres repeticiones).

De los datos obtenidos se podría inferir que los compuestos bioactivos son de naturaleza no polar, pues fueron separados en las fracciones con mayor proporción de hexano, como la 2 y 3. Por otra parte, en las fracciones separadas con mayor proporción de acetato de etilo o MeOH, como la 5 y la 6, la menor

Aislamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)										
	CS	3	7	13	27	54	109	218	437	875	1750
<i>T. menta</i> 1											
<i>T. menta</i> 2											
<i>T. menta</i> 3											
<i>T. menta</i> 4											
<i>T. menta</i> 5											
<i>T. rubrum</i> 1											
<i>T. rubrum</i> 2											
<i>T. rubrum</i> 3											

Convenciones: CS. Control Solvente. No se muestran todos los aislamientos ni las repeticiones.

Figura 1. Aspecto del crecimiento fúngico en una placa multipozos (fracción 3).



Convenciones: CS. Control Solvente. No se muestran todos los aislamientos ni las repeticiones. *Concentraciones dobles seriadas desde 0.0039 μg/mL (1) hasta 2 μg/mL (10)

Figura 2. Aspecto del crecimiento fúngico en una placa multipozos (Terbinafina).

Tabla 1. CMI por aislamiento y tipo de extracto

Aislamiento	CMI por extracto y fracción 2 a 6 (μg/mL)							
	Biomasa celular	Terbinafina	2	3	4	5	6	CS
<i>T. menta</i> 1	2500	0.0156	3000	218	2500	1000	3500	ND
<i>T. menta</i> 2	2500	0.0156	750	109	2500	2000	3500	ND
<i>T. menta</i> 3	2500	0.0156	3000	218	2500	2000	7000	ND
<i>T. menta</i> 4	2500	0.0156	3000	218	2500	2000	7000	ND
<i>T. menta</i> 5	2500	0.0078	1500	218	2500	2000	7000	ND
<i>T. rubrum</i> 1	5000	0.0156	6000	218	5000	4000	7000	ND
<i>T. rubrum</i> 2	2500	0.0078	3000	218	2500	4000	3500	ND
<i>T. rubrum</i> 3	2500	0.0156	750	109	2500	2000	3500	ND
<i>T. rubrum</i> 4	2500	0.0078	750	109	2500	4000	7000	ND
<i>T. rubrum</i> 5	5000	0.0156	3000	109	2500	4000	7000	ND
<i>E. flocc</i> 1	5000	0.0313	3000	218	5000	ND	ND	ND
<i>E. flocc</i> 2	5000	0.0156	750	218	5000	4000	ND	ND
<i>E. flocc</i> 3	2500	0.0313	3000	218	5000	ND	ND	ND

Convenciones: ND. No Detectado. CS. Control Solvente.



actividad antifúngica puede atribuirse a una menor concentración de compuestos bioactivos.

En el análisis estadístico posterior se observa una tendencia similar, al mostrar diferencias significativas en el promedio de porcentaje de inhibición entre las fracciones, en un orden de menor a mayor polaridad, como se ilustra en la tabla 2.

Tabla 2. Agrupamiento Duncan y diferencias significativas entre tipos de extractos.

Agrupamiento Duncan		\bar{X} Inhibición	N	Extracto/ fracción
	A	82.319	360	Terbinafina
	B	26.694	360	3
	C	12.319	360	2
D	C	7.528	360	4
D	C	7.167	360	crudo biomasa
D	C	6.931	360	5
D		6.167	360	6

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Los resultados podrían interpretarse como contrarios a lo expuesto por Govindachari *et al.* (1998), quienes reportan que la fracción metanólica obtenida de aceite de *A. indica* exhibió mayor poder antifúngico frente a *Drechslera oryzae*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria tenuis* que la fracción hexánica. Esto se atribuyó a que dicha fracción contenía mayormente cadenas de ácidos grasos, mientras que en la metanólica se identificaron varios triterpenoides como azadiradiona, nimbinina y salanina. En concordancia con lo anterior, este mismo autor (Govindachari *et al.* 2000), señala también que algunos compuestos puros aislados pueden reducir el crecimiento fúngico por sí solos, como la azadiradiona proveniente de aceite de semillas de neem por HPLC preparativo, al evaluarla frente a *Puccinia arachidis*.

Por otra parte, los reportes de Suresh *et al.* (1997) y Mahmoud *et al.* (2011), indican que la mezcla de ciertas fracciones de extractos de neem aisladas por HPLC exhiben una actividad antifúngica incrementada, respecto a compuestos puros aislados (como nimonol e isomeldenina), sugiriendo entonces un efecto sinérgico entre los triterpenoides presentes en los extractos de *A. indica*.

Debe tenerse en cuenta que las fracciones evaluadas en este trabajo no son compuestos puros en sí, sino que siguen siendo mezclas complejas de compuestos de polaridad semejante. Ante las diferentes observaciones de otros investigadores, y los resultados de este trabajo, se puede concluir que los compuestos presentes en los extractos de neem, bien provengan de la

planta *in situ* o de cultivos celulares, poseen actividad antifúngica. Con base en los datos de este estudio, se sugiere que dichos compuestos se encuentran en las fracciones de menor polaridad del extracto crudo de biomasa celular.

No obstante, cabe la explicación, aún sin estudios comparativos, de que puede ocurrir un efecto antagonista por la presencia de gran variedad de compuestos en el extracto crudo de biomasa celular, lo que explicaría por qué es menos bioactivo que las fracciones separadas de sí mismo.

Conclusiones

El extracto metanólico de biomasa celular de *A. indica* puede inhibir el crecimiento de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum*, a concentraciones relativamente altas, como lo mostraron CMI mayores a 2500 µg/mL. Sin embargo, se encontraron fracciones de menor polaridad con mayor actividad antifúngica (CMI=109 µg/mL). Esto indica que en el metabolismo secundario de las células de *A. indica* cultivadas en suspensión líquida, se producen compuestos bioactivos, tal como ocurre en partes de la planta *in situ* como hojas y semillas, mencionado por otros autores. Se sugiere que el efecto de estas fracciones es enmascarado en el extracto crudo posiblemente por antagonismo. Se requieren, por lo tanto, procedimientos cromatográficos adicionales para lograr aislar de forma pura los compuestos presentes en el extracto crudo de biomasa celular.

En consideración de que los cultivos de células de *A. indica* en suspensión pueden ser elicidos para la producción de metabolitos con actividad biológica, como lo señala Orozco-Sánchez (2007), la investigación se debe orientar hacia la obtención de líneas celulares con un metabolismo incrementado en la producción de compuestos de baja polaridad (posiblemente triterpenoides) por su conocida capacidad de inhibir el crecimiento de varios tipos de hongos, incluyendo los dermatofitos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo logístico e investigativo brindado en los Laboratorios de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas, Ciencia de los Alimentos, Productos Naturales y Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, y muy especialmente al personal del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Referencias bibliográficas

- CLSI. 2008. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition*. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.



- Fernández-Torres, B. 2005. *Sensibilidad antifúngica de los dermatófitos*. Reus, España: Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.
- Govindachari, TR.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Banumathy, B.; Masilamani, S. 1998. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. 26(2): 109-116.
- Govindachari, TR.; Suresh, UG.; Gopalakrishnan, G.; Masilamani, S.; Banumathy, B. 2000. Antifungal activity of some triterpenoids. *Fitoterapia*. 71: 317-320.
- Jarvis, AP.; Morgan, ED.; Edwards, DC. 1999. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. *Phytochemical Analysis*. 10: 39-43.
- Kane, J; Summerbell, R; Sigler, L; Krajden, S; Land G. 1997. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails*. Belmont, EEUU: Star Publishing Company.
- Lyer, SR.; Williamson, D. 1991. Efficacy of some plant extracts to inhibit the protease activity of *Trichophyton* species. *Geobios*. 18: 3-6.
- Mahmoud, DA.; Hassanein, NM.; Youssef, KA.; Abou Zeid, MA. 2011. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1007-1016.
- Natarajan, V.; Pushkala, S.; Karupiah, VP.; Prasad, PV. 2002. Anti dermatophytic activity of *Azadirachta indica* (neem) by *in vitro* study. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 45(3): 311-3.
- Natarajan, V.; Venugopal, PV.; Menon, T. 2003. Effect of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 21(2): 98-101.
- Okemo, PO.; Mwatha, WE.; Chabrab, SC.; Fabryc, W. 2001. The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African Journal of Science and Technology (AJST) Science and Engineering Series*. 2(2), 113-118.
- Orozco, F.; Vergara, R.; Capataz-Tafur, J.; Hoyos-Sánchez, R. 2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith en condiciones de laboratorio. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 61: 3703 - 3715.
- Polaquini, SRB.; Svidzinski, TIE.; Kemmelmeier, C.; Gasparetto, A. 2006. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin with *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*. 51(6): 482-490.
- Rebell, G; Taplin, D. 1979. *Dermatophytes, their recognition and identification*. Coral Gables, EEUU: University of Miami Press.
- Roseeuw, D. 1999. Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. *Journal of European Academy Dermatology*. 12: S6-9.
- Suresh, G.; Narasimhan, NS.; Masilamani, S.; Partho, RD.; Gopalakrishnan, G. 1997. Antifungal fractions and compounds from uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. 25(1): 33-39.



ARTÍCULO CORTO

Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos en *Pterogyne nitens* Tull “tipa colorada”

Embriogenic calli induction and somatic proembryo formation in *Pterogyne nitens* Tull

Maritza Vacca Molina*,¹ María Luisa Cristina Bonomo**, Zulma Avilés***, Lucía Díaz****

Resumen

Pterogyne nitens es un árbol que crece en bosques húmedos del Norte de la Argentina. Por su calidad maderera la especie se utiliza en forestación, reforestación o enriquecimiento de bosques nativos. Una alternativa a los métodos convencionales de propagación son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales mediante el uso de la embriogénesis somática.

El objetivo del presente trabajo es inducir la formación de callos embriogénicos y la obtención de proembriones somáticos evaluando la influencia del tipo de explanto, tipo y concentración de reguladores de crecimiento y composición del medio basal. Para la inducción de callos embriogénicos se utilizan explantes extraídos de hojas cotiledonares, foliolos, tallos y raíces de plántulas de dos meses de edad. Se emplean tres medios de cultivo MSC, MS50 y MSMOD. Cada medio de cultivo se suplementa con 2,4-D ó ANA en distintas concentraciones. A los 45 días los explantes provenientes de hojas cotiledonares en los medios de MSC con 2,4-D en concentraciones de 67.87, 107.41, 113.12, 135.74 y 180.99 μ M, se logra en mayor proporción la formación de masas callosas amarillas. Con 107.41 μ M de 2,4-D en el medio MSC se observa la formación de estructuras proembrionarias. Los segmentos radiculares en todos los tratamientos evaluados, no desarrollan callos.

Palabras clave: Tipa colorada, micropropagación, embriogénesis, forestales, leguminosa.

Abstract

Pterogyne nitens is a tree that grows in wet forests of Northern Argentina. Due to its quality timber species are used in afforestation, reforestation or enrichment of native forests. An alternative to conventional methods of propagation is the techniques of plant tissue using somatic embryogenic. The aim of this study is to induce the formation of embryogenic callus and of somatic obtaining proembryos, evaluating the influence of type of explant, type and concentration of growth regulators and composition of the basal medium. For induction of embryogenic callus from explants extracted cotyledonary leaves, leaflets, stems and roots of seedling of two months old are used. Three means of MSC culture, MS50 and MSMOD are also used. Each culture medium is supplemented with 2,4-D at different concentration or ANA. After 45 days the explants from cotyledon leaves in MSC media supplement with 2,4-D at concentrations of 67.87, 107.41, 113.12, 135.74 and 180.99 μ M, promote greater proportion of yellow callus formation masses. With 107.41 μ M 2,4-D proembryos structures formation are observed. The root segments in all treatment tested, do not develop calluses.

Key words: Tipa colorada, micropropagation, embryogenesis, forestry, legume.

Recibido: enero 31 de 2014

Aprobado: octubre 20 de 2014

* Ing. Agr. Ms. Sc. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. maritzavaccamolina@yahoo.com.ar

** Lic. en Cs. Biológicas. Cátedra de Introducción a la Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. mbonomo@unsa.edu.ar

*** Lic. en Cs. Biológicas. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. zulmaviles_3@hotmail.com

**** Ing. Agr. Dr. en Agronomía. Cátedra de Caña de Azúcar. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. luciaptiaz@yahoo.com



Introducción

La "tipa colorada" (*Pterogyne nitens*) pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Caesalpinoideae. El nombre vulgar de la misma varía de acuerdo al país de origen: en Bolivia es conocida como "ajunau", en Paraguay como "yvyraró" y en Brasil se la llama "amendoim". En Argentina entre las denominaciones figuran "viraró", "tipa colorada" y "tipilla" (Dimitri et al., 2000). Su área de distribución geográfica abarca los países de Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina.

Es un árbol que crece en ambientes húmedos y alcanza los 25 m de altura, de tronco recto y cilíndrico con unos 90 cm de diámetro y fuste de 6 a 8 m; tiene corteza tática, con tinte rojizo en las grietas. Su madera posee un veteado parecido al de la caoba y ha sido clasificada como madera dura o semidura. Cuando se la somete a un secado lento, no presenta deformaciones o rajaduras, manchas ni ataque de insectos. Esta especie, de gran calidad maderera, es apta para ser utilizada en planes de forestación, reforestación o enriquecimiento de los bosques naturales del noroeste argentino, que han sufrido intensas explotaciones (Del Castillo et al., 1997; Dimitri et al., 2000). Entre sus usos se mencionan el empleo de la madera para la fabricación de muebles de estilo (Dimitri et al., 2000), herramientas como arados, bateas, mangos de hachas y utensilios de cocina (Moraes et al., 2006). Como producto forestal no maderero se incluye su uso ornamental y como fuente de extracción de tanino, tintas, alimentos y medicinas. Como medicina, se destaca su empleo como expectorante, antigripal y para combatir la presencia de parásitos, el dolor de hígado y estómago. En estudios fitoquímicos, se aislaron cinco alcaloides guanidínicos de las hojas y tallos, los cuales mostraron una importante actividad antitumoral; de los extractos de flores fueron aislados e identificados cuatro flavonoides, con acción antiinflamatoria (Regasini et al., 2008).

Según del Castillo et al. (1997) la explotación de los bosques de la Selva de Yungas (Jujuy, Salta y Tucumán) se inició entre los siglos XVI y XIX intensificándose en años posteriores, lo que produjo el agotamiento del bosque. El remanente de la selva pedemontana mantiene el aspecto de selva, pero su valor forestal actual y potencial es casi nulo. Entre las especies más buscadas en las áreas pedemontanas se encuentra la tipa colorada, considerándose una especie amenazada por pérdida de área (Pece et al., 2010). En Brasil, la madera de *P. nitens* es utilizada en forma indiscriminada para la construcción civil. En consecuencia, por tratarse de un género monoespecífico, esta leguminosa se encuentra seriamente amenazada de extinción (Regasini et al., 2008, Oliveira et al., 2006).

Hasta el presente no se ha reportado para esta especie un programa de selección de individuos élitres y menos aún un esquema de mejoramiento. En la propagación vía sexual, se informan altos porcentajes de

germinación con tratamientos de escarificación (Pece et al., 2010); por la vía vegetativa mediante enraizamiento de esquejos no hay información disponible. Avilés et al. (2009) utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales logra la inducción y desarrollo de yemas axilares, con bajo porcentaje de enraizamiento. La embriogénesis somática (ES) se considera para las especies forestales, como la vía de regeneración más adecuada ya que ofrece la posibilidad de una alta tasa de producción de propágulos, criopreservación de callos embriogénicos, rejuvenelización, producción de semilla sintética y la utilización de cultivos embriogénicos en transformación genética (Peña-Ramírez et al., 2011). Se basa en el principio de la formación de un embrión a partir de células somáticas diferentes a un gameto o al producto de la unión de gametos. En la naturaleza se la conoce como una forma de apomixis, la cual recibe el nombre de embrionía adventicia (Merkle, 1995). Los embriones somáticos bipolares se asemejan a embriones sexuales, se desarrollan de manera similar y atraviesan todos los estadios de la embriogénesis, son genéticamente idénticos al progenitor y germinan dando origen a una plántula completa sobre un sustrato. Es requisito que se genere material fiel al donante sin variabilidad intraclonal y, fundamentalmente para el sector forestal, que sea susceptible de automatización para reducir los costes de producción (Celestino et al., 2005).

La embriogénesis somática ha sido reportada en varias especies, *Pinus pinea* (Carneros et al., 2009); *Quercus rubra* (Vengadesan y Pijut, 2009), *Quercus suber* (Hernández et al., 2011); *Acrocomia aculeata* (Ferreira Moura et al., 2008); *Eucalyptus sp.* (Pinto et al., 2008); *Cupressus sempervirens* L. (Giovanelli y Carlo, 2007); *Melia azedarach* (Sharry et al., 2006); leguminosas (Marinucci et al., 2004); *Araucaria angustifolia* (Santos et al., 2002), *Coffea canephora* (López Gómez et al., 2010), *Hevea brasiliensis* (Lardet et al., 2009), *Vitis sp.* (Gambino et al., 2007; Tsvetkov et al., 2014), *Picea abies* (Businge et al., 2012), *Phoenix dactylifera* (Kurup et al., 2014) etc.; sin embargo, aún no se encontraron estudios que informen su aplicación en *Pterogyne nitens*. Debido a la importancia económica, de conservación y difusión de esta especie, el estudio de la ES constituye un aporte al conocimiento, tendiente a generar protocolos viables de propagación. El objetivo del presente trabajo fue inducir la formación de callos embriogénicos y la obtención de proembriones somáticos en tipa colorada mediante la elección del tipo de explanto, tipo y concentración de reguladores de crecimiento y composición del medio basal.

Materiales y métodos

Material vegetal y desinfección

Para los distintos experimentos se emplearon frutos maduros recolectados de la localidad de Orán (Salta,



Argentina) entre los meses de mayo y junio de los años 2011 y 2012. Las semillas se extrajeron de los frutos, se sometieron a desinfección superficial mediante lavado en una solución de detergente y agua en agitación a una velocidad de 250 rpm durante 30 min, enjuagándose con agua corriente. Posteriormente las semillas estuvieron en inmersión en alcohol etílico al 70 % (v/v), durante 2 min, seguida de una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % (p/v), preparada a partir de un producto comercial conteniendo 55g/L de cloro activo, con el agregado de tres gotas de Tween 20® por litro de solución durante 10 min. Luego se enjuagó cinco veces con agua destilada estéril.

La desinfección se completó en condiciones de asepsia, en cámara de flujo laminar. Las semillas desinfectadas fueron incubadas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) reducido en macro y micronutrientes al 50% de su concentración salina original (MS50), solidificado con 5 g/L de agar (Sigma ®), suplementado con 0.1 g/L de myo-inositol, vitaminas de MS (0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina-HCl, 0.1 mg/L de tiamina-HCl y 2 mg/L de glicina) y 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a 7 antes de la adición del agente solidificante. La corrección del pH se realizó con KOH o con H₃PO₄. El medio se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (PSi) a 121°C, durante 20 min.

Después de establecer las semillas en medio de cultivo, se incubaron durante 60 días bajo iluminación fluorescente a 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 16 horas y a 25 \pm 2°C. A partir de plántulas obtenidas por esta vía, se seccionaron diferentes tipos de explantes: hojas cotiledonares, explantes foliares, segmentos caulinares y radiculares; los cuales se utilizaron en los ensayos realizados en el presente trabajo.

Inducción de callos y proembriones somáticos

Para la inducción de callos se utilizaron tres medios de cultivo basados en la fórmula salina de MS. Se denominó MSC al medio con la fórmula original completa, MS50 al medio en el que se redujo la concentración de todos los macro y micronutrientes a la mitad y MS-MOD al medio modificado en NH₄NO₃ (825 mg/L) y KNO₃ (950 mg/L) con las sales restantes al 100% de su formulación original. Los medios fueron solidificados con 2 g/L de Phytagel (Sigma ®), suplementado con 0.1 g/L de myo-inositol, 0.5 g/L de caseína hidrolizada (Sigma ®) y 30 g/L de sacarosa (Neolab ®). El pH se ajustó a 7 antes de la adición del agente solidificante. El medio se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (PSi) a 121°C, durante 20 min. Cada medio de cultivo se suplementó con 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) en concentraciones de 67.87, 107.41, 113.12, 135.74, 180.99 y 226.24 μM ó ANA (ácido naftalenacético) en concentraciones de 53.70, 80.56, 107.41 y 134.26 μM . Se generaron treinta tratamientos (con reguladores de crecimiento) y tres tratamien-

tos testigos (sin reguladores de crecimiento y para cada composición salina ensayada) (tabla 1). Todos estos tratamientos se aplicaron sobre los distintos tipos de explantes y en las tres bases salinas consideradas.

Tabla 1. Tratamientos y reguladores de crecimiento utilizados en cada composición salina (MS, MS50 y MSMOD) para la inducción de callos embrionarios en *Pterogyne nitens*.

Tratamientos	2,4 D (μM)	ANA (μM)
1	67.87	-
2	107.41	-
3	113.12	-
4	135.74	-
5	180.99	-
6	226.24	-
7	-	53.70
8	-	80.56
9	-	107.41
10	-	134.26
11	-	-

A los 45 días, se evaluó el porcentaje (%) de formación de masas callosas en los distintos tipos de explantes empleados. Los experimentos se condujeron en un diseño completamente aleatorizado (DCA), con treinta repeticiones por tratamiento, con 4 explantes en cada unidad experimental. Los cultivos se incubaron en cámara de cría en oscuridad a 25 \pm 2 °C y se repicaron en los mismos medios cada 20 días. El porcentaje de formación de callos se analizó con el paquete Estadístico InfoStat (Di Rienzo et. al., 2011) empleándose la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$) para comparar los mismos.

Estudios histológicos

El carácter embrionario de los callos fue determinando mediante análisis histológico. Las muestras de tejidos que desarrollaron callos se fijaron en FAA (paraformaldehido al 35%, ácido acético glacial y etanol al 70% (1:1:9)(v/v/v); posteriormente se deshidrataron en una serie de alcoholes (70°, 80°, 90°, 96°, 100° y xilol) y se incluyeron en Paraplast (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Se obtuvieron cortes de 8 μm con un micrótomo de rotación marca Minot. Se realizaron dos tipos de tinciones, una con Safranina - Fast Green y otra con el colorante Violeta de Cresilo. Se realizaron las observaciones con microscopio óptico.

Las muestras tomadas para microscopía electrónica fueron fijadas y deshidratadas, se les realizó secado



por punto crítico CO₂ y fueron metalizadas con oro. Las observaciones y fotografías se realizaron con microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL modelo JSM 5480 LV perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional de Salta (LASEM).

Resultados y discusión

Material vegetal y desinfección

La germinación de semillas de especies forestales en condiciones *in vitro* permite obtener material vegetal con adecuado estado fitosanitario. En el presente trabajo, el porcentaje de germinación alcanzado en condiciones *in vitro* fue del 90 %, similar al obtenido en condiciones de campo. A diferencia del protocolo de germinación propuesto por Peres Biruel *et al.*, (2007), en el presente trabajo, la escarificación química de las semillas no fue necesaria. El medio de cultivo utilizado no afectó la capacidad de germinación de las semillas. El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana. En

este ensayo, la contaminación registrada fue del 1 %, lo que indica que el protocolo de desinfección de semillas para la obtención de plantas asepticas fue adecuado. Oliveira do Nascimento *et al.* (2006) informa en semillas, la presencia de siete géneros de hongos, siendo *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. los que tuvieron mayor porcentaje de ocurrencia, los cuales tienden a perjudicar la calidad de la semilla por pérdida de viabilidad. En el presente ensayo, no se detectó la presencia de hongos patógenos que afecten la germinación.

Inducción de callos y de proembriones somáticos

La composición salina de los medios (MS, MS50 y MSMOD) influye sobre la respuesta de los explantos, detectándose diferencias estadísticas significativas ($H=27,48$ $n=99$ $p<0,0001$). Cuando se utilizó el medio MSC, que contiene el 100 % de sales de Murashige y Skoog, se favoreció la formación de callos. El medio MS provee los seis nutrientes principales (N, P, K, Ca, Mg y S) y constituye uno de los factores claves en la morfogénesis *in vitro*, de manera que una reducción en su concentración puede afectar el desarrollo morfogenético (Ramage y Williams 2002). En *Pinus pinea* la ES es dependiente de la composición nutritiva del

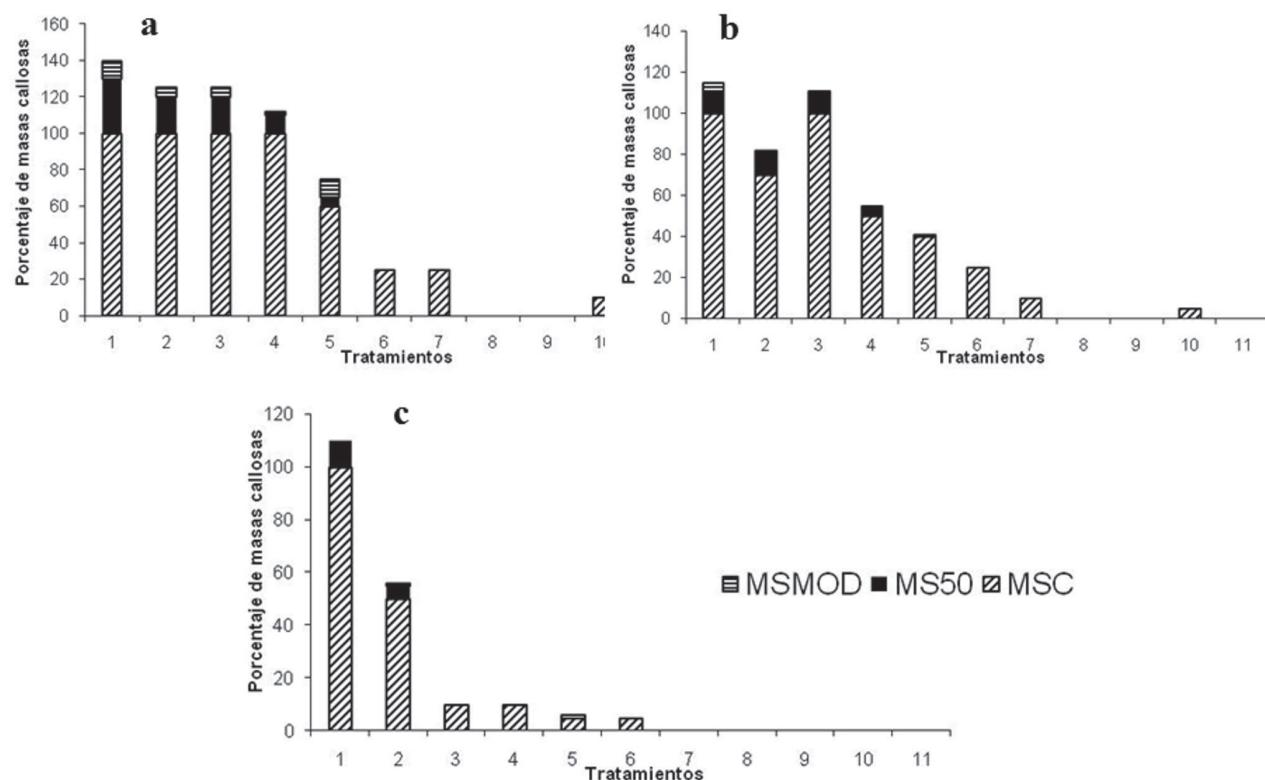


Figura 1. Porcentaje de explantos en que ocurrió la formación de callos por tratamiento, en tres medios de cultivos, a los 45 días en *Pterogyne nitens*: A) hoja cotiledonar B) explantos foliares C) tallos. MSC= medio de MS con la fórmula original completa; MS50= medio al 50% de la concentración salina original y MSMOD= medio modificado solo en NH₄NO₃ y KNO₃



medio (Carneros et al., 2009). En el presente trabajo, la reducción del contenido de nitrógeno en el medio (MS50 y MSMOD) no favoreció la respuesta callogénica de los explantes. Así, la importancia del abastecimiento de nitrógeno durante la embriogénesis puede ser un reflejo de los requerimientos de nitrógeno por la continua síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y sustancias de reserva (Merkle 1995).

Los explantes provenientes de hojas cotiledonares generaron una mayor formación de masas callosas cuando se los cultivó con 2,4-D en concentraciones de 67.87, 107.41, 113.12, 135.74 y 180.99 μ M disminuyendo para la concentración de 226.24 μ M, asimismo se observó formación de callo solo para la menor concentración de ANA (53.70 μ M). Para segmentos foliares y tallo se observó una menor formación de masas callosas con el incremento de la concentración de 2,4-D (figura 1) arrojando diferencias estadísticas significativas ($H=8.79$ $n=99$ $p=0,0041$).

Por el contrario, los segmentos radiculares en todos los tratamientos evaluados, resultaron ineficaces para la generación de callos; la respuesta nula obtenida

con este tipo de explantes se debe a que en estos tejidos las células no fueron capaces de asumir actividad meristemática y por tanto no respondieron a ninguna de las concentraciones de 2,4-D y perecieron. A pesar de que cualquier parte de la planta es factible de emplearse como explante, no todos los tejidos tienen la totipotencia celular para responder a estímulos externos que disparan la competencia para generar callos, en un inicio, y posteriormente, la organogénesis o embriogénesis somática (Hernández Meneses et al., 2013).

Los reguladores de crecimiento y las concentraciones utilizadas, presentaron diferencias estadísticas significativas ($H=140,78$ $n=27$ $p <0,0001$). El 2,4-D promovió en todos los casos, la formación de masas callosas amarillas las cuales comenzaron en las zonas de corte de los segmentos empleados (figura 2). Los cortes histológicos de hojas cotiledonares muestran el inicio de la formación de callos en la región de corte (figura 3A). Los callos formados cubrieron la totalidad de los segmentos cotiledonares (figura 3B) y foliares. Una respuesta similar en cotiledones es reportado por Marinucci et al., 2004, en cinco leguminosas forestales. El

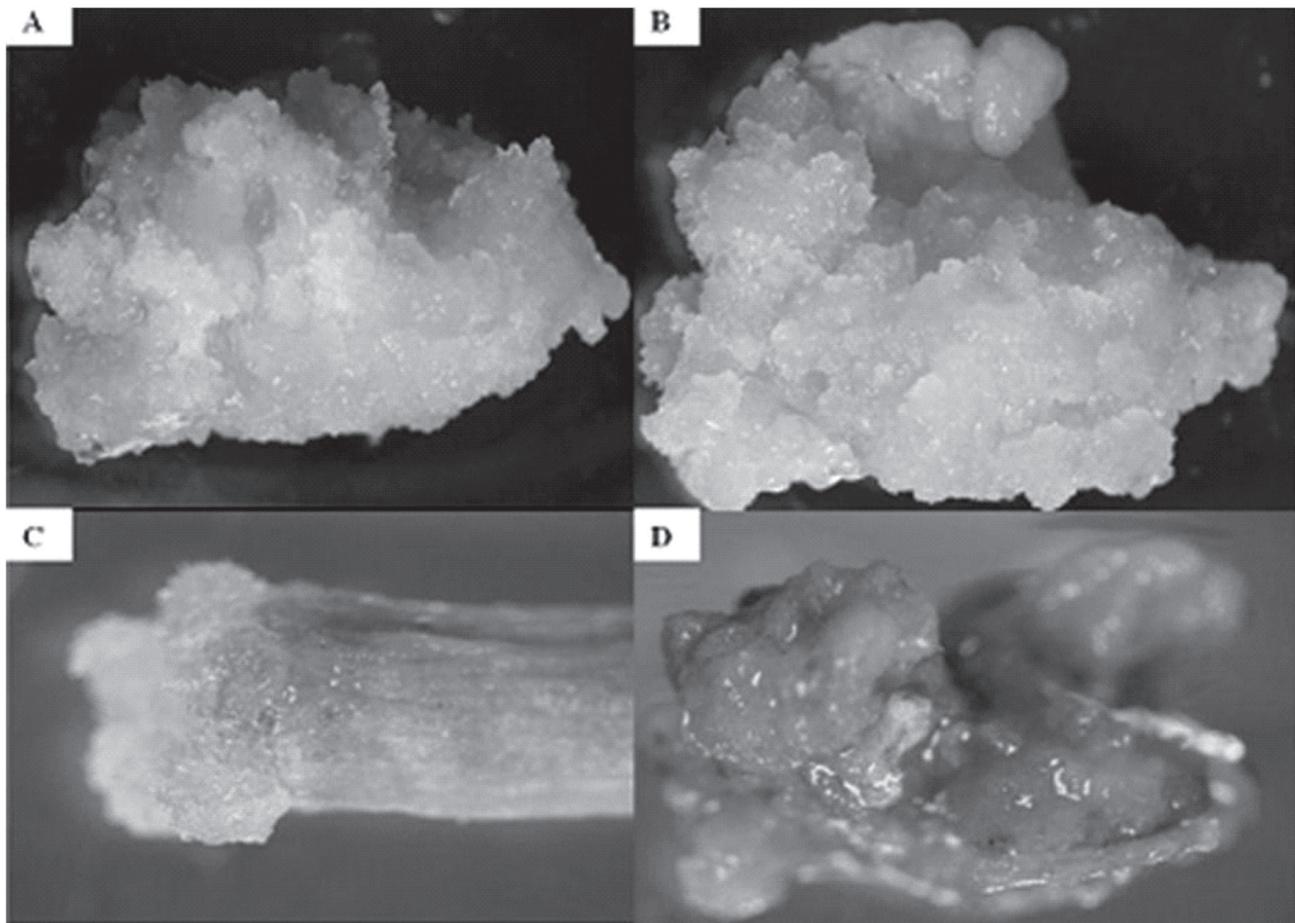


Figura 2. Formación de callos de *Pterogyne nitens* sobre un medio MSC y 2,4-D (135.74 μ M): A) hoja cotiledonar, B) Explantes foliares, C) Tallos, D) Secciones radiculares.

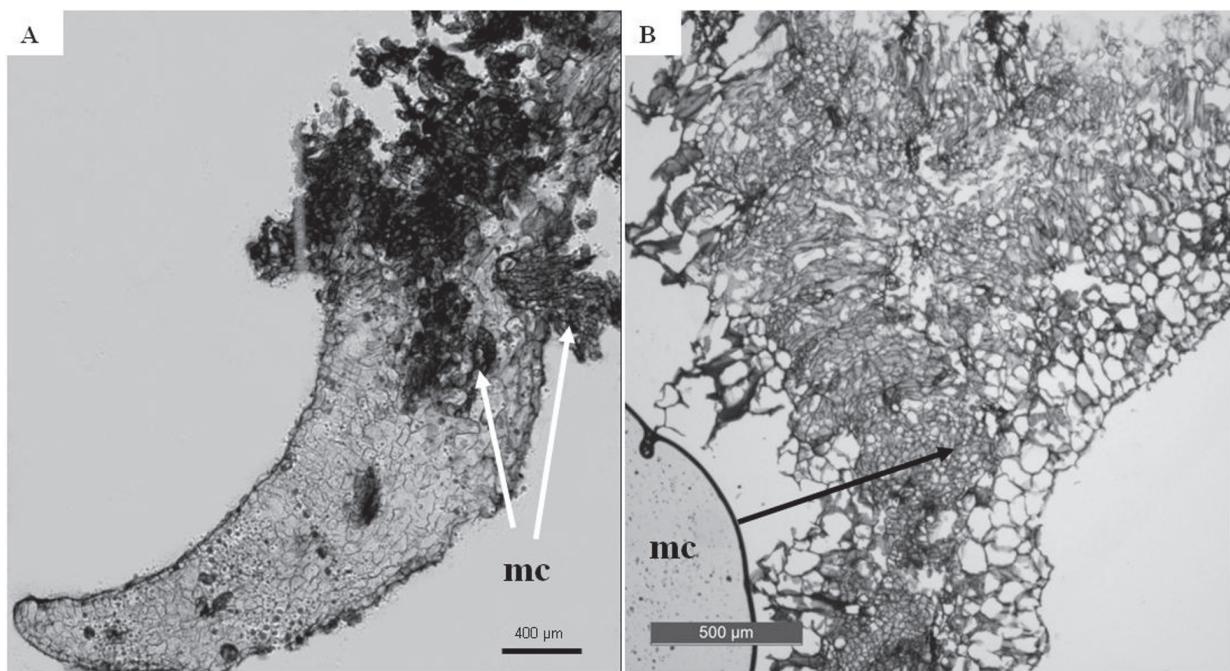


Figura 3. Corte histológico de hoja cotiledonar de *Pterogyne nitens*: A) Inicio de la formación de masas callosas. B) Proliferación celular típica de una masa callosa. Masa callosa (mc).

2,4-D es un regulador de crecimiento sintético, que es utilizado para la inducción de la ES (Gaj 2004). Sobre las células del explantó, funciona como una sustancia inductora de estrés más que una fitohormona y en respuesta al estrés éstas adquieren capacidad embriogénica en diferentes grados, debido a la expresión de genes específicos de la embriogénesis (Kikuchi et al., 2006). El 2,4-D es más efectivo en la inducción de la embriogénesis somática que el AIA endógeno, debido a que la auxina artificial no se puede metabolizar en las células vegetales (Stasolla et al., 2004).

Las hojas cotiledonares y fragmentos de foliolos fueron los explantos que desarrollaron callos de consistencia frágil y coloración amarillenta o lechosa, en los cuales mediante histología se verifica la presencia de células meristemáticas con alto contenido de almidón (figura 4). Una observación similar fue informada por Deo et al. (2009) en *Colocasia esculenta* var. *esculenta*, los cuales encontraron en callos nodulares de color amarillo cremoso dos tipos de células: pequeñas células isodiamétricas con grandes núcleos y citoplasma denso, típicas de células embriogénicas y células parenquimáticas vacuoladas conteniendo pocos plástidos típicos de células no embriogénicas. Según Salinas (1990), los callos embriogénicos tienen una coloración amarillenta o amarillo verdosa, de forma amorfa o nodular y de consistencia frágil y están constituidos por células isodiamétricas con abundantes gránulos de almidón.

El análisis de los callos al MEB muestra la consistencia de los mismos. Los callos friables considerados em-

briogénicos, mostraron una superficie desorganizada pero con cierto grado de compactación entre las células (figura 5 A). La presencia de células isodiamétricas en estos callos, concuerda con las observaciones realizadas por Peña Ramírez et al. (2011), para callo embriogénico en *Cedrela odorata*. Mientras que los callos no embriogénicos se caracterizaron por presentar células alargadas, sin uniones entre ellas, con una desorganización total del tejido (figura 5 B).

Los explantos caulinares desarrollaron callos no embriogénicos translúcidos, que se disgregan fácilmente (figura 2 C, 5 B). Las secciones radiculares generaron escasas masas callosas, las que con el transcurso del tiempo se oxidaron (figura 2 D).

En los tratamientos suplementados con ANA la presencia de callos embriogénico fue escasa a nula. El tipo y la concentración de auxinas es un factor crítico para la inducción y formación de embriones somáticos (Sharry et al., 2006).

En los explantos cotiledonares los tratamientos suplementados con 2,4-D en concentraciones de 107.41, 113.12 y 135.74 μ M se observó el desarrollo de masas proembriogénicas (figura 6) siendo el primero de estos valores, el que reveló la formación de ES (figura 7). El nivel endógeno de hormonas es uno de los factores cruciales que influyen en el potencial embriogénico de los explantos. En *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado que tanto los primordios cotiledonares como los cotiledones tienen altos niveles de auxina endógena los cuales se correlacionan con la alta competencia embriogénica exhibida por estos tejidos (Gaj 2004).

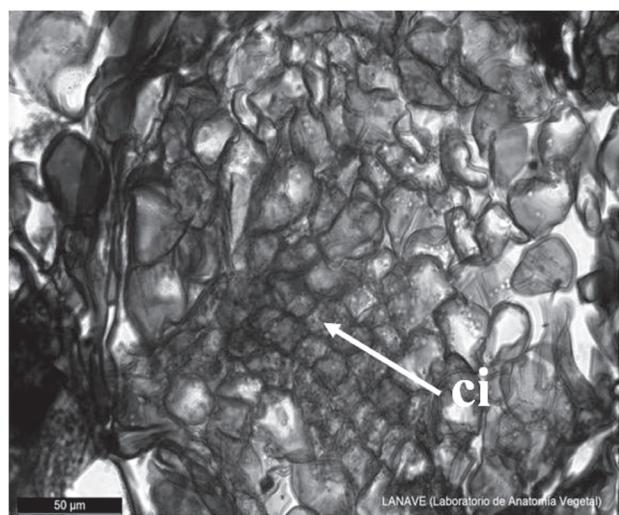


Figura 4. Estructura proembrional de *Pterogyne nitens*: células isodiamétricas (ci) con plastos.

En soja, Bermúdez Carabaloso *et al.* (2012), informan que el incremento en la respuesta embriogénica como resultado de la exposición a 2,4-D exógeno, está asociada con un incremento de los niveles de AIA endógeno, lo cual sugiere que la auxina sintética 2,4-D tiene un efecto indirecto significativo sobre la embriogénesis somática posiblemente debido a disturbios causados sobre el metabolismo de la auxina endógena. En nuestro estudio, la observación de diferentes tipos de callos (embriogénico y no embrionario) puede ser debida a cambios en el medio de cultivo atribuibles a la degradación hormonal, absorción diferencial de los nutrientes del medio y estrés osmótico.

En *Colocasia esculenta* var. *esculenta*, las estructuras embriogénicas generalmente están localizadas en la

periferia de las masas callosas distribuidas en grupos, entremezcladas con grandes células parenquimáticas (Deo *et al.*, 2009). Samaj *et al.* (2003), describe en maíz una estructura globular a la que denomina 'pre-embryogenic units', rodeada por grandes células parenquimáticas las cuales podrían estar actuando como "células nodrizas". Al igual que lo reportado para *Cedrela odorata* L. (Peña Ramírez *et al.*, 2011), las masas celulares presentaron diferentes grados de organización, con múltiples zonas meristemáticas, incluyendo proembriones con presencia de protodermis, y estructuras embrionarias globulares. Se observaron los estadios globulares y acorazonado, sin embargo no se registró sincronía durante el proceso inductivo desarrollado (figura 7).

La incubación de los cultivos en oscuridad es considerada necesaria para la formación de callos embriogénicos que luego dan lugar a embriones somáticos bien formados en *Strelitzia reginae* (Arzate Fernández *et al.*, 2008) y *Cydonia oblonga* (Morini *et al.*, 2000). El efecto del 2,4-D podría estar relacionado con la inducción de la respuesta morfogenética, ya que la degradación de esta auxina es más lenta cuando los explantos se incuban en oscuridad (Arzate Fernández *et al.*, 1998).

En los ensayos no se observó necrosis tisular por producción de compuestos fenólicos, por lo tanto, no fue necesaria la inclusión de carbón activado ni de antioxidantes en los medios de cultivos.

Una variedad de factores modifican las respuestas morfogenéticas observadas en los explantos cultivados *in vitro*. Todos estos factores pueden resumirse en el término "control fisiológico", haciendo referencia a los factores físicos y químicos que se encuentran dentro de las células o en el ambiente que rodea a las células, modificando las respuestas morfogenéticas, dentro de los límites genéticos o restricciones epigenéticas.

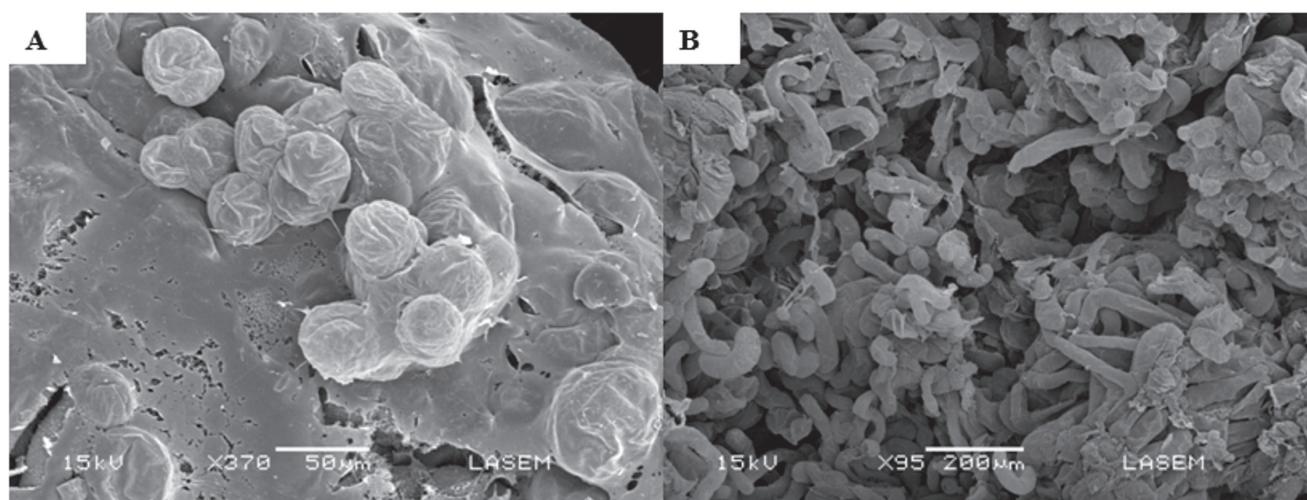


Figura 5. Microfotografía electrónica de barrido de: A) Callo embriogénico, B) Callo no embrionario de *Pterogyne nitens*.

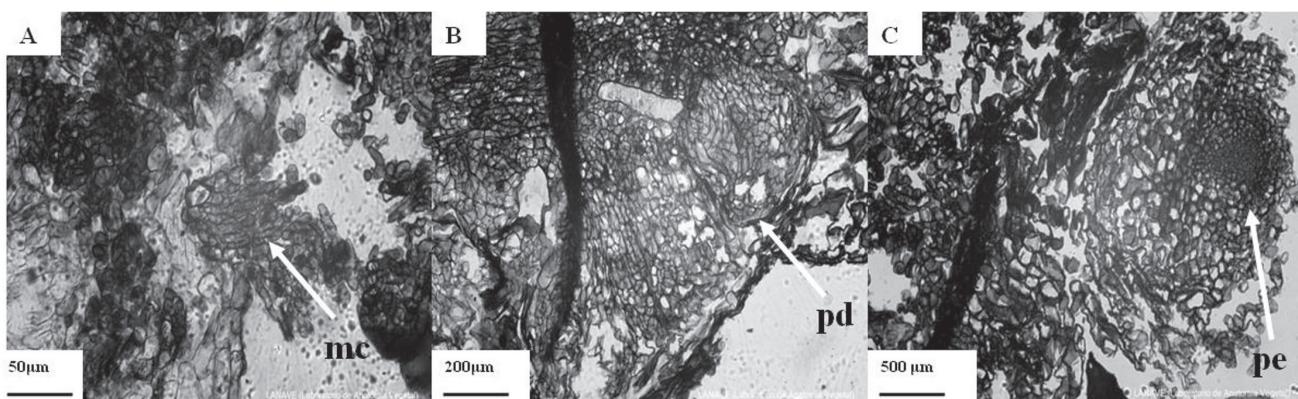


Figura 6. Formación de estructuras proembriogénicas de *Pterogyne nitens*: A) Inicio de masa callosa B) Proembriones dentro del callo C) Protrusión de la estructura proembrional. Masa callosa (mc), protodermis (pd), proembrión (pe).

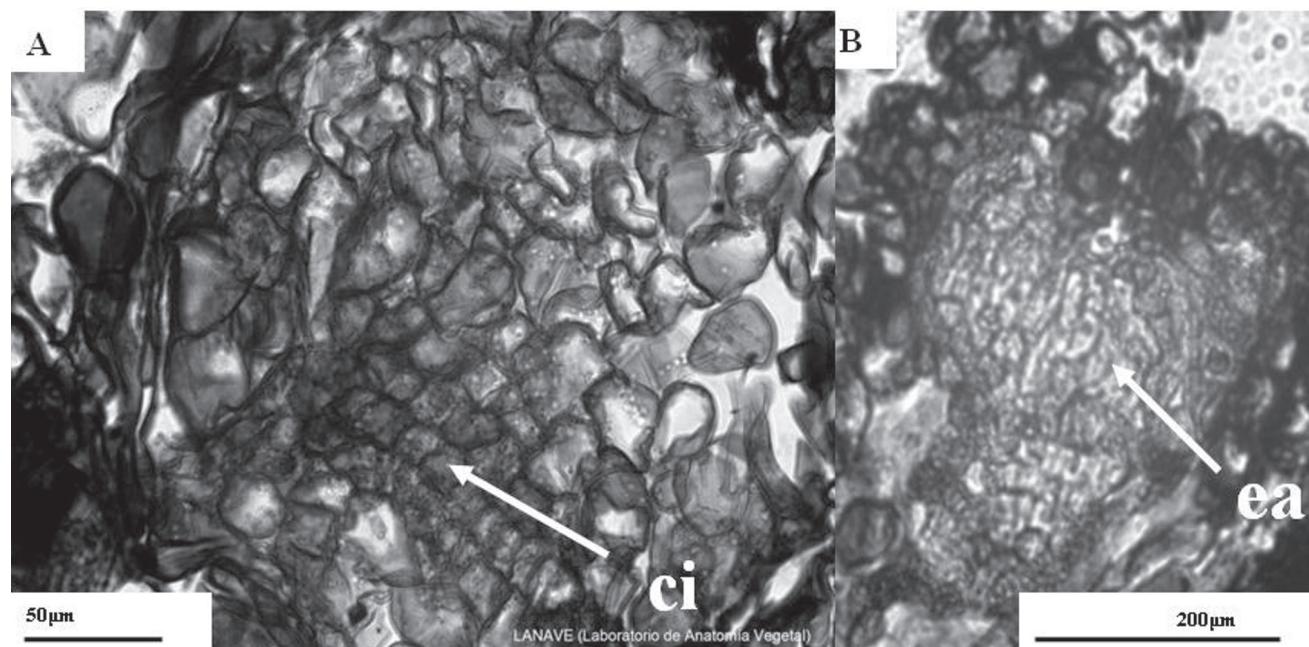


Figura 7. Estadios embrionales de *Pterogyne nitens*: A) Globular B) Acorazonado. Células isodiamétricas (ci), Estadio acorazonado (ea).

Conclusiones

Se logró la formación de proembriones de tipo colorada (*Pterogyne nitens* Tull.) a partir de la inducción de callos embrionados provenientes de explantes de hojas cotiledonares. El medio MSC con 107.41 μM de 2,4-D favorece la inducción de callos embrionados con capacidad de formación de embriones somáticos. Se continúa trabajando para la obtención de embriones totalmente diferenciados.

Agradecimientos

Al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta quien financió este trabajo y a la Lic. Marcela Hernández, Dra. Virginia Martínez, Dra. Olga Martínez y Lic. María Inés Irazusta por la permanente colaboración brindada.

Referencias bibliográficas

- Arzate Fernández, A. M.; Nakazaki, T.; Tanisaka, T. 1998. Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *L. longiflorum* by ovary slice culture. *Plant Breeding*. 117: 479-484.
- Arzate Fernández, A. M.; Piña Escutia, J. L.; Zavaleta, H. A. 2008. Inducción de proembriones somáticos en ave de paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 183-186.
- Avilés, Z.; Vacca Molina, M.; Bonomo de Villa, M.L.C. 2009. Establecimiento *in vitro* de Tipa Colorada (*Pterogyne nitens* Tull.). VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. 20-24 abril de 2009, Rosario, Santa Fe, Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, p 88.
- Bermúdez Carabaloso, I.; Blanco, T.; Pérez Pérez, J.; García, L. R.; Veitia, N.; Collado, R.; Torres, D.; Romero, C. 2012. Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de embriones somáticos en variedades cubanas de soya. *Biotecnología Vegetal*. 12(2) : 93 - 97.
- Businge, E.; Brackmann, K.; Moritz, T.; Egertsdotter, U. 2012. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic



- embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree physiology*. 32 (2): 232-244.
- Carneros, E.; Celestino, C.; Klimaszewska, K.; Park, Y.; Toribio, M.; Bonga, J. M. 2009. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 98: 165-178.
- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López Vela, D.; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología Forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 14 (3): 345-357.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina, p 83.
- Del Castillo, E. M.; Gil, M. N.; Terán, M.; Cravero, S.; Zapater, M. A. 1.997. "Tipa colorada": su autoecología. Resúmenes del primer taller internacional de recursos filogenéticos del Noroeste argentino. Salta. Argentina.
- Deo, P.; Harding, R.; Taylor, M.; Tyagi, A.; Becker, D. 2009. Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99: 61-71.
- Di Renzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2011. Infostat versión 2010. Grupo Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dimitri, M. J.; Leonardi, R. F.; Biloni, J. S. 2000. El nuevo libro del árbol. Especies forestales de la Argentina oriental. Tercera edición. Tomo II. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, p120.
- Ferreira Moura, E.; Contín Ventrella, M.; Yoshimitsu Motoike, S.; de Sá Júnior, A. Q.; Carvalho, M.; Manfio, C. E. 2008. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 95: 175-184.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulator*. 43: 27-47.
- Gambino, G.; Ruffa, P.; Vallania, R.; Gribaldo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 90 (1): 79-83.
- Giovanelli, A.; Carlo, A. 2007. Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Part 1: 93-105, doi: 10.1007/978-1-4020-6352-7_9.
- Hernández, I.; Cuenca, B.; Carneros, E.; Alonso Blázquez, N.; Ruiz, M.; Celestino, C.; Ocaña, L.; Alegre, J.; Toribio, M. 2011. Application of plant regeneration of selected Cork Oak tree by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 5 (1): 19-26.
- Hernández Meneses, E.; López Peralta, M. C. G.; Estrada Luna, A. A. 2013. Calligénesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4 (8): 1175-1186.
- Kikuchi, A.; Sanuky, N.; Higashi, K.; Koshib, T.; Kamada, H. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*. 40: 211-216.
- Kurup, S.; Aly, M.; Lekshmi, G.; Tawfik, N. 2014. Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26 (6), doi-10.
- Lardet, L.; Dessailly, F.; Carron, M. P.; Montoro, P.; Monteuuis, O. 2009. Influences of aging and cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype. *Tree physiology*. 29 (2): 291-298.
- López Gómez, P.; Iracheta Donjuan, L.; Castellano Juárez, M.; Méndez López, I.; Sandoval Esquivel, A.; Aguirre Medina, J.; Ojeda Zacarías, M.; Gutiérrez Díez, A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33 (3): 205-213.
- Marinucci, L.; Ruscitti, M.; Abedini, W. 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 105 (2).
- Merkle, S. A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology A*. 31, p. 6.
- Moraes, M. R.; Ollgaard, B.; Kvist, L. P.; Borchsenius, F.; Balslev, H. 2006. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. 533 pp.
- Morini, S.; D'onofrio, C.; Bellocchi, G.; Fisichella, M. 2000. Effect 2,4D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* culture quince leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 63: 47-55.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Oliveira do Nascimento, W. M.; Cruz, E. D.; Duarte Moraes, M. H.; Machado Menten, J. O. 2006. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae - Caesalpinoideae). *Revista Brasileira de Sementes*. 28 (1): 149-153.
- Pece, M.; Gaillard, C.; Acosta, M.; Bruno, C.; Saavedra, S. 2010. Tratamientos pregerminativos para tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul.). *Forestá Veracruzana*. 12 (1): 17-25.
- Peña Ramírez, Y. J.; García Sheseña, I.; Hernández Espinoza, A.; Domínguez Hernández, A.; Barredo Pool, F. A.; González Rodríguez, J. A.; Robert, M. 2011. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 105: 203-209.
- Peres Biruel, R.; Borba Filho, A. B.; de Araújo, E. C. E.; Fraccaro, F.; de Andrade, S.; Perez, C. J. G. 2007. Efeitos do condicionamento seguido ou não de secagem em sementes de *Pterogyne nitens* Tul. sob estresse. *Ciência Florestal, Santa Maria*. 17 (2): 119-128.
- Pinto, G.; Silva, S.; Park, Y. S.; Neves, L.; Araujo, C.; Santos, C. 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. doi:10.1007/s11240-008-9418-5.
- Ramage, C. M.; Williams, R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 38: 116-124.
- Regasini, L.; Fernandes, D. C.; Castro Gamboa, I.; Siqueira Silva, D. H.; Furlan, M.; da Silva Bolzan, V.; Barreiro, E. J.; Monteiro Cardoso Lopes, E.; Marx Young, M. C.; Brandão Torres, L.; Rebuglio Velloso, J. C.; Mascarenhas de Oliveira, O. M. 2008. Constituentes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Cesalpinoideae). *Química Nova*. 31 (4): 802-806.
- Salinas, R. 1990. Inducción de embriogénesis somática en camote (*Ipomoea batatas* Lam). Universidad Nacional Agraria La Molina. 51 p.
- Samaj, J.; Baluska, F.; Pretova, A.; Volkmann, D. 2003. Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Reports*. 21: 940-945.
- Santos, W. A. L.; Silveira, V.; Steiner, N.; Vidor, M.; Guerra, M. P. 2002. Somatic Embryogenesis in Paraná Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Brazilian archives of Biology and Technology*. 45 (1): 97 - 106.
- Sharry, S.; Cabrera Ponce, J. L.; Herrera Estrella, L.; Rangel Cano, R. M.; Lede, S.; Abedini, W. 2006. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry -tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9 (3): 0-0. Stasolla, C.; Bozhkov, P. V.; Chu, T. M.; van Zyl, L.; Egertsdotter, U.; Suarez, M. F.; Craig, D.; Wolfinger, R.; Von Arnold, S.; Sederoff, R. R. 2004. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiology*. 24 (10): 1073-1085.
- Tsvetkov, I.; Dzhambazova, T.; Kondakova, V.; Batchvarova, R. 2014. *In vitro* long-term storage and regeneration of Bulgarian Grapevine Variety "Velika" via repetitive somatic embryogenesis. *Universal Journal of Plant Science*. 2 (2): 48-51. DOI: 10.13189/ujps.2014.020204
- Vengadesan, G.; Pijut, P. M. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 97: 141-149.



Comité evaluador

La Revista Colombiana de Biotecnología ofrece sus agradecimientos a los siguientes docentes quienes actuaron en el presente número como Comité de Arbitraje:

Alonso Hurtado, Uriel, MSc Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, uahurtadop@unal.edu.co

Aragón Abreu, Carlos Eduardo, MSc, PhD Tissue and Organ Culture Lab, Plant Physiology and Biochemistry, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba, eduardo@bioplantas.cu

Aragón, Oscar, Ing., MSc, PhD, Grupo de Biotecnología y Bioprospección, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, oscarleo1@yahoo.com

Araujo, Karenly, MSc, PhD, Laboratorios de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Venezuela, karenraujo@gmail.com

Barragán-Huerta, Blanca E., MSc., PhD Laboratorio de Residuos Peligrosos, Depto de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Instituto Politécnico Nacional, México, bbarraganh@ipn.mx

Bazaldúa M, Crescencia, PhD, Departamento de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México, cbazaldua@ipn.mx

Bello Toledo, Helia, MSc., PhD Lab Investigación en Agentes Antibacterianos, Depto Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile, hbello@udec.cl

Benavides-Mendoza, Adalberto, MSc., PhD Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro., México, abenmen@gmail.com

Bernal, Mauricio, MSc, cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, jmbernalmo@unal.edu.co

Bortolotti Da Silva, Adriano, MSc., PhD Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Alfenas, Universidade Jose do Rosario Vellano, Brasil, adriano.silva@urenifenas.br

Brasil, José Eduardo, PhD., Universidad Federal de Lavras, Brasil, jeduardo@dag.uflla.br

Britos, Paola V., PhD, Ciencias Informáticas, Centro de Ingeniería del Software e Ingeniería del Conocimiento, Instituto Tecnológico de Buenos Aires, Argentina, paobritos@gmail.com

Buitrago Hurtado, Gustavo, IQ, Msc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, gbuitragoh@unal.edu.co

Cárdenas Henao, Heiber, PhD, Profesor, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Colombia, hecarden@yahoo.es

Castiblanco Rodríguez, Ana Lucía, QT, cMSc Toxicología, Coordinadora Lab. Análisis Instrumental, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, alcastiblanco@unal.edu.co

Ceiro Catasú, Wilson G., Msc., Profesor de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Gramma, Cuba, wceiroc@udg.co.cu

Cerón Rincón, Laura E., MSc., PhD(C) Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, lauraceron16s@gmail.com

Cerruti, Patricia, MSc., PhD, Universidad de Buenos Aires, Argentina, cerruti@di.fcen.uba.ar

Comba González, Natalia Beatriz, MSc, cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, natalia.comba@gmail.com

Corredor, Gloria, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, gacorredorh@unal.edu.co

Cortazar Gómez, Jorge E, MSc., cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, ijcortazar@hotmail.com

Cossío Bayúgar, Raquel, MSc., PhD Investigadora Titular C, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Animal INIFAP, México, cossio.raquel@inifap.gob.mx

Cota, Alma Guadalupe, PhD., Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, México, agcota@guayacan.uson.mx

Cuadrado Cano, Bernarda S., MD., MSc Microbiología, Departamento Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Colombia, bcuadrado@unicartagena.edu.co

Del Rincón Castro, Ma. Cristina, MSc., PhD., Profesora-Investigadora, Depto Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, México, mdelrinc@yahoo.com

Echeverría, María Gabriela, MSc., PhD., Departamento de virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina, gecheverria@fcv.unlp.edu.ar

Escobar, Ricardo, MSc., Director de Investigación, ASD, ASD, Semillas y clones de palma aceitera de alto rendimiento, Costa Rica, r.escobar@asd-cr.com

Esquivel-Cote, Rosalba, Lab. Microbiología Experimental, Depto Biología, Facultad Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, rosesquivel_cote@hotmail.com

Fernández Colón, Elena, MSc., PhD Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, España, bioelen@yahoo.es

Freire Seijo, Marisol, MSc., PhD, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu", Cuba, marisol@ibp.co.cu

Gabriel, Julio, MSc. PhD Mejoramiento Genético de Plantas, Fundación PROINPA, Bolivia, j.gabriel@proinpa.org

Galindo, Lyda Constanza, MSc., Biología, Universidad de la Amazonía, Colombia, lcgalindo1@yahoo.es

García Romero, Alejandro, BSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, lagr84@gmail.com

García Romero, Ibonne Aydee, PhD., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, ibonne@gmail.com

González Sáyer, Sandra Milena, MSc. Microbiología, Lab de marcadores moleculares, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, milenasayer@gmail.com

González V., Iván Andrés, PhD, Profesor, Universidad de San Buenaventura, Colombia, ivanandresgonzalez@gmail.com

González-Maldonado, María Berenice, MSc., Academia de Entomología, CIIID, Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, México, mbgonzalez@ipn.mx

Gutkind, Gabriel O., MSc., PhD Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, ggutkind@ffyb.uba.ar

Hernández Forte, Ionel, MSc., PhD Reserva Científica del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba, ionel@inca.edu.cu

Hernández-Rodríguez, Annia, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba, annia@ibio.uh.cu

Marquina, María Eugenia, MSc., PhD Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno y Cultivos de Tejidos Vegetales in vitro, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Universidad de Los Andes, Venezuela, martu@ula.ve

Miranda-Miranda, Estefan, MSc., PhD Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México, miranda.estefan@inifap.gob.mx

Mojica-Nava, Eduardo, PhD., Associate Professor, Department of Electrical and Electronics Engineering, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, eamojican@unal.edu.co

Pabón, Miguel Angel, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, miguelpabon@gmail.com

Pattanakul, Sitananta, MSc., PhD Department of Plant and Soil Sciences, Kentucky Tobacco Research and Development Center, University of Kentucky, Estados Unidos, spattz@uky.edu

Peralta, Andrea, MSc., PhD Investigadora Asistente CONICET, Instituto de Biotecnología, INTA, Argentina, peralta.andrea@inta.gov.ar

Peraza, Andrés, Ing. Agr., MSc, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, andresp503@gmail.com

Pérez León, Noraída de J, MSc., PhD, Investigador Auxiliar de la Unidad Científico Técnologica de Base "Los Palacios", Cuba, nory@inca.edu.cu

Pérez Mancilla, Ximena C., cPhD, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, xcperezm@unal.edu.co

Pinzón Gutiérrez, Yeimi Alexandra, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, yeialep@gmail.com

Quijada, Elisa, MSc., PhD, Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, elisa@ibp.co.cu

Reguero Reza, María Teresa, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, mtrreguero@unal.edu.co

Rivera Jacinto, Marco Antonio, MSc, PhD Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, mrivera@unc.edu.pe

Rodríguez Monroy, Mario, MSc., PhD., Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, México, mmonroy@ipn.mx

Rodríguez, Yaelin, MSc., PhD Departamento Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba, yaelin@inca.edu.cu

Rosa, Miguel A., Msc., Facultad Regional Villa María, Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química (GISIQ), Universidad Tecnológica Nacional, Argentina, rosa_m@frvm.utn.edu.ar

Rosas García, Ninfa María, MSc., PhD Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México, nrosas@ipn.mx

Sadeghpour, Amir, MSc., PhD Stockbridge School of Agriculture, University of Massachusetts, Estados Unidos, asadehghp@pss.umass.edu

Sáez Delgado, Patricia, MSc., PhD. Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad de Concepción, Chile, patrisaezd@gmail.com

Sandoval, Horacio, MSc., PhD Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, México, hsandov@correo.xox.uam.mx

Santillana Villanueva, Nery, MSc., Laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Perú, nerysantillana@yahoo.es

Sicardi, Margarita, MSc., IFCA-Laboratorio de Microbiología del Suelo, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, sicardi@adinet.com.uy

Sierra Hayer, Juan Fernán, MSc., PhD Protección Vegetal, Departamento Defensa Fitosanitaria- FCA, Universidad Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho" -UNESP, Brasil, juafersih2@gmail.com

Silva Pupo, Juan J., PhD., Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Gramma, Cuba, jsilvap@udg.co.cu

Singh, Sanjay K., MSc., PhD Kentucky Tobacco Research & Development Center, University of Kentucky, Estados Unidos, sanjaysingh@uky.edu

Soler T, Wilmer, MSc, Depto Fisiología y Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Colombia, wilmer.soler@udea.edu.co

Sousa, Oscarina V., MSc., PhD, Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará, Brasil, oscarinassousa@yahoo.com.br

Terry Alfonso, Elein, Investigadora Titular, Dpto. Fitotecnia. INCA, Cuba, terry@inca.edu.cu

Todorov, Svetoslav D., MSc., PhD Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil, slavi310570@abv.bg

Torres, Guillermo G., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, guigotoe@gmail.com

Valencia Chona, Jorge Andrés, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, joavalenciach@unal.edu.co

Valenzuela V., Carolina, PhD., Departamento de Fomento de la Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Chile, cvalenzuelav@u.uchile.cl

Vargas A, Claudia M., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, cmvargas@unal.edu.co

Varón Devia, Edgar Herney, PhD., CORPOICA, , Colombia, evaron@corpoica.org.co

Vasconsuelo, Andrea, PhD., Lab. Química Biológica, Universidad Nacional Del Sur, Argentina, avascon@criba.edu.ar

Veitia Rodríguez, Novisel, MSc., PhD., Instituto Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Cuba, novisel@ibp.co.cu

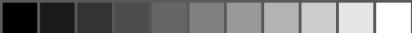
Velázquez Del Valle, Miguel Gerardo, PhD., Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, México, mdevall@ipn.mx

Vilchez Perozo, Jorge Alberto, MSc., PhD Laboratorio de Fisiología Vegetal, Universidad del Zulia, Venezuela, jvilchezp@faz.ulz.edu.ve

Villavicencio G, Edith, PhD., Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, México, villavicencio.edith@inifap.gob.mx

Wiesner, Magdalena, MSc., PhD Grupo de Bioprospección, Subdirección de Innovación, Instituto Nacional de Salud, Colombia, mawire@gmail.com

Yáñez Márquez, Cornelio, PhD., Centro de Investigación en Computación, Laboratorio de Cómputo Inteligente, Instituto Politécnico Nacional, México, cyanez@cic.ipn.mx



Autores – Authors

A

Albany, Nilca, Profesora Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Venezuela, nalbany@fa.luz.edu.ve

Almeyda León, Isidro Humberto, Centro de Investigación Regional Noreste-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México, almeyda.isidro@inifap.gob.mx

Alzugaray, Claudia, Cátedra de Biología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Anselmino, Luciano, Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina, patxlu@hotmail.com

Arango Arteaga, Myrtha, Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Colombia

Argüello Fuentes, Henry, PhD, Profesor Asociado, Universidad Industrial de Santander, Colombia, henarf@uis.edu.co

Arias, Diana, BSc., MSc. Investigador Asociado. Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite – Cenipalma, Colombia, dianaris2002@gmail.com

Avilés, Zulma, Lic. en Cs. Biológicas. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Argentina, zulmaviles_3@hotmail.com

Ball Vargas, María Mercedes, Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela, mball@ula.ve

Barbosa Cepeda, Iván Darío, Biologist, MSc. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, idbarbosac@unal.edu.co

Barrera, Gloria, Ph.D. Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia, gbarrera@corpoica.org.co

B

Barreto-Hernández, Emiliano, MSc.,PhD., Profesor Asociado de Dedicación exclusiva, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia, ebarreto@unal.edu.co

Bonilla Buitrago, Ruth Rebeca, B., PhD. Laboratorio de Microbiología de Suelos, Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpoica, Colombia, rbonilla@corpoica.org.co

Bonilla Buitrago, Ruth Rebeca, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Laboratorio Microbiología de Suelos, Colombia,

Botello Suarez, Wilmar Alirio, Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela, wbotello@unisangil.co

Botero Orozco, Kelly Johana, Biologist, Universidad de Caldas; Investigator, Centro de Bioinformática y Biología Computacional de Colombia, Manizales, Colombia, kelly.botero@cbbc.org.co

Bueno, Mirian S., Cátedra de Biología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, miriansbueno@gmail.com

Butiuk, Ana Paula, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina

C

Canal Morales, Alejandra, Estudiante Maestría en Biología, Universidad de Antioquia, Colombia

Canales, Pamela E., Químico Farmacéutica. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, p.canales.mormontoy@gmail.com

Cardona Bustos, Nadya Lorena, MSc., PhD. Instituto de Biología, Grupo BIOMA, Universidad de Antioquia, Colombia, nadya.cardona@udea.edu.co

Cardozo Ojeda, Erwing Fabián, MSc. Ingeniería de Sistemas e Informática, Universidad Industrial de Santander, Colombia, fabiancardozo@gmail.com

Carnevale, Nélida J., Cátedra de Ecología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Chaparro Giraldo, Alejandro, Agronomical Engineer, MSc., Ph.D. Associated professor, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, achaparro@unal.edu.co

Chávez-Hidalgo, Elizabeth L., Químico Farmacéutica, Magíster en Biotecnología. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, echavezihidalgo@yahoo.com

Cristina Bonomo, María Luisa, Lic. en Cs. Biológicas. Cátedra de Introducción a la Biología. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Argentina, mbonomo@unsa.edu.ar

Cuartas, Paola, Microbiólogo, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia, pcuartas@corpoica.org.co

D

Daquinta Gradaille, Marcos, Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba

Díaz, Lucía, Ing. Agr. Dr. en Agronomía. Cátedra de Caña de Azúcar. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, luciapdiaz@yahoo.com

F

Falquet, Laurent, Swiss Institute of Bioinformatics, University of Fribourg, Switzerland, laurent.falquet@unifribourg.ch

Fernández C., Erika Pamela, Microbióloga Industrial. Instituto de Biología, Instituto de Biología, Grupo BIOMA, Universidad de Antioquia, Colombia, eripafer@gmail.com

Flores, Vanessa, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia

Franco, Marcela, Microbióloga. PhD., Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología, Colombia, franco@javeriana.edu.co

Freire, Rodrigo, Cátedra de Ecología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

García Hoyos, Ana María, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Laboratorio Microbiología de Suelos, Colombia,

Gómez, Juliána, Microbiólogo, Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia, jagomez@corpoica.org.co

González Cortes, Areli, Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, areli_morelos@live.com.mx

González Muñoz, Andrea, Biologist, Universidad de Caldas; Master's Fellow in Science-Biology, Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Genética, Bogotá, Colombia, andrea_gmu@hotmail.com

González, Elsa Beatriz, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia,

Hernández-Fernández, Javier, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Centro de Biosistemas. Grupo de Investigación, Desarrollo en Horticultura Sostenible, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Colombia, javier.hernandez@utadeo.edu.co

Hine Gómez, Ana, Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA), Costa Rica, ana.hine.gomez@una.cr

Hours, Roque Alberto, Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata - CONICET, La Plata, Argentina,



Hoyos Sánchez, Rodrigo Alberto, Profesor asociado, Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia

L

Ledesma, Pablo, Licenciado en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina, reuteriar@yahoo.com

León, Guillermo, PhD. (c), Corpoica, Colombia, gleon@corpoica.org.co

López Gartner, Germán Ariel, Professor and Investigator, Faculty of Exact and Natural Sciences, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, german.lopez@ucaldas.edu.co

Lorena Rojas, Natalia, Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata - CONICET, La Plata, Argentina,

Marguet, Emilio, Doctor en Bioquímica. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina, emarguet@yahoo.com.ar

M

Martos, María Alicia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina, amartos@fceqyn.unam.edu.ar

Melgarejo, Luz Marina, Bióloga, PhD. Profesora titular, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Colombia, lmmelgarejom@unal.edu.co

Mendoza Labrador, Jonathan Alberto, Ingeniero Biotecnológico. Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpoica, Colombia, jonathanmendoza@hotmail.com

Monsalve Fonnegra, Zulma Isabel, PhD en Biotecnología, Investigadora grupo AgroBiotecnología y docente Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia, zulma.monsalve@udea.edu.co

Moreno Conn, Lina M., Microbióloga Agrícola y Veterinaria MSc., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica C.I. La Libertad, Colombia, lmoreno@corpoica.org.co

O

Ojeda, Zaida, Lic., MSc. Docente Asistente. Escuela de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biotecnología Vegetal BIOPLASMA, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja, Colombia, zaida.ojeda@uptc.edu.co

Orozco Sánchez, Fernando, Profesor asociado, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia

Ospina Salazar, Daniel Iván, MSc (c) Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias,

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia, diospinas@unal.edu.co

P

Pacheco, Estíben, BSc., Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Colombia, estiby88@hotmail.com

Parra-Fuentes, M., Facultad de Ciencias e Ingeniería. Centro de Biosistemas. Grupo de Investigación, Desarrollo en Horticultura Sostenible, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Colombia

Pavas, Harold, Biólogo, Universidad de Antioquia, Colombia, bachue@gmail.com

Pérez, Adrián, Ingeniero de Producción Biotecnológica MSc., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica C.I Tibaitatá, Colombia, urleyadrian@gmail.com

R

Ramírez, Margarita, Ingeniero agrónomo PhD., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica C.I Tibaitatá, Colombia, mmramirez@corpoica.org.co

Ramón Mantilla, José, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia, jrmantilla@unal.edu.co

Reguero, Ma. Teresa, MSc., Profesora Asociado de Dedicación exclusiva, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia, mtreguero@unal.edu.co

Reyes-Perdomo, C., Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de Investigación GENBIMOL "Genética, Biología Molecular y Bioinformática", Universidad Jorge Tadeo Lozano, Colombia

Ríos Salazar, Jhon Diego, MSc (c) Ciencias Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia

Rojas Pirela, Maura Lina, Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela, mball@ula.ve

Rojas Vargas, Alejandra, Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Costa Rica, alejandra.rojas.vargas@una.cr

Romero Perdomo, Felipe Andrés, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Laboratorio Microbiología de Suelos, Colombia

Romero, Hernán, BSc., MSc., PhD. Coordinador del Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma, Colombia, hromero@cenipalma.org

Rosas García, Ninfa María, PhD., Profesora Titular B, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México, nrosas@ipn.mx

S

Sánchez López, Diana Beatriz, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Laboratorio Microbiología de Suelos, Colombia, dbsanchez@corpoica.org.co

Sterling Cuéllar, Armando, Biólogo, MSc., Candidato a Doctor en Ciencias - Biología, Investigador Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi Sede Florencia, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Colombia, asterling@sinchi.org.co

T

Torres Tapia, María Alejandra, Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, atorres_tapia@hotmail.com

U

Uribe, Laura Patricia, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia

Urrea Trujillo, Aura Inés, PhD en Biotecnología, Investigadora grupo AgroBiotecnología y docente Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia

V

Vacca Molina, Maritza, Ing. Agr. Ms. Sc. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Argentina, maritzavaccamolina@yahoo.com.ar

Valenzuela de Silva, Emilia María, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Colombia, emvsilva@unal.edu.co

Vallejo, Marisol, Doctora en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina, soltrelew@gmail.com

Vilchez, Jorge, Profesor Titular. Master en Biotecnología Vegetal. Departamento de Botánica, Laboratorio de Fisiología Vegetal "Merylin Marin" Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Venezuela, jvilchezp@fa.luz.edu.ve

Villamizar, Laura, Ph.D. Corpoica, Colombia, lvillamizar@corpoica.org.co

Villavicencio Gutiérrez, Eulalia Edith, Campo Experimental Saltillo, Col. Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México, villavicencio.edith@inifap.gob.mx

Z

Zamora Villa, Víctor Manuel, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, vzamvil@uuaan.mx

Zavaleta, Amparo I., Químico Farmacéutica, Magíster en Ciencias, Doctor en Medicina. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, amparo.zavaleta@yahoo.com



INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La *Revista Colombiana de Biotecnología* publica únicamente artículos originales, principalmente contribuciones provenientes de investigación y desarrollo en las diversas áreas de la biotecnología, así como artículos técnicos que no presentan prueba de hipótesis, como la descripción técnica de métodos. También serán aceptadas notas breves; por ejemplo informes de un trabajo significativo cuyos objetivos sean de corto alcance.

Los autores deberán seguir las instrucciones que se presentan a continuación. Los artículos que no cumplen con éstas se devolverán sin ser evaluados. Los manuscritos deben enviarse por triplicado, en papel blanco de tamaño carta (21,6 x 27,5 cm), a espacio sencillo, con márgenes de 3 cm. Las dos copias deberán omitir la información de los autores. Debe incluirse la versión electrónica del trabajo en disquete o CD. Para agilizar el proceso de evaluación puede enviarse también una copia al correo electrónico que se indica al final. Los artículos deben ser elaborados utilizando Word Windows o aplicaciones compatibles, en letra Times new roman de 12 puntos.

El trabajo debe tener una extensión máxima de 20 páginas, incluidas figuras, tablas y bibliografía. El lenguaje utilizado debe ser claro y preciso. El trabajo debe estar escrito en estilo impersonal.

Los nombres comerciales y marcas deben evitarse en el texto, o referidos entre paréntesis. Los productos comerciales deben ser mencionados por el nombre técnico o el principio activo. Los nombres registrados deben ir acompañados por ®. Se deben utilizar las abreviaturas aceptadas internacionalmente. En caso de ser utilizadas siglas poco comunes, deberán indicarse completas la primera vez que se citan, seguida de la sigla entre paréntesis. Todas las abreviaturas y siglas deben escribirse sin punto. Use el sistema métrico decimal para todas las medidas y abreviaturas para las unidades comunes de medida: kilogramo (kg), gramo (g), miligramo (mg), metro (m), etc. Evite las notas de pie de página, excepto para la información de los autores del artículo. Utilice un solo tamaño de letra.

La estructura del artículo debe tener en cuenta los pasos del método científico, así:

Título. Debe ser corto pero ilustrativo, sin exceder de 15 palabras. Debe incluirse una traducción del título en inglés y un título corto para los encabezados de página.

Autores. En el crédito a los autores se deben incluir los nombres completos. Los autores deben ir en orden de acuerdo con la importancia de contribución a la investigación o en la preparación del artículo y no en orden alfabético ni de rango. En nota a pie de página y con

asteriscos se indicarán respectivamente los títulos académicos, la institución a la cual pertenecen y la dirección postal completa (incluido e-mail).

Resumen. Debe ser conciso y contener información sobre justificación, objetivos, metodología y resultados concretos de la investigación. Debe indicar las principales conclusiones haciendo énfasis en los logros alcanzados. No debe exceder de 250 palabras escritas en un solo párrafo.

Palabras clave. Se debe elaborar una lista de cinco palabras del artículo, como máximo, diferentes de las incluidas en el título, que faciliten el uso de los sistemas modernos de catalogación y búsqueda de la información por computador.

Abstract. Debe ser una traducción técnica del resumen al idioma inglés.

Key words. Debe ser una traducción fiel de las palabras clave al idioma inglés.

Introducción: Debe describir el planteamiento general de un tema, dando la información necesaria en forma precisa y haciendo referencia sólo a la bibliografía directamente relacionada y considerada indispensable para el desarrollo del tema, que permita conocer el estado actual del mismo. Debe indicar con claridad el objetivo de la hipótesis de la investigación y su relación con otros trabajos relevantes. (No revisiones amplias de bibliografía).

Materiales y métodos: Deben describirse las técnicas y los equipos utilizados dentro de una secuencia que muestre de manera concreta y lógica el desarrollo de la investigación, con el fin de que puedan ser reproducibles. Las fuentes y el estado de pureza de los materiales y la descripción detallada de equipos sólo debe incluirse cuando éstos sean muy específicos o novedosos. Los procedimientos descritos por otros autores deben evitarse, pero si han sido modificados, se deben incluir los detalles de la modificación.

Resultados y discusión (la discusión puede ir como capítulo aparte). Los resultados experimentales podrán presentarse en tablas y figuras sólo cuando éstas sean absolutamente necesarias, y deben estar explicadas en forma sucinta pero completa en el texto. En caso de que los resultados estén sustentados por cálculos estadísticos, deberá mencionarse la procedencia de los datos y el método estadístico empleado. Las tablas se deben presentar con título e identificadas con números arábigos continuos. Las figuras, fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben



presentarse con título e identificarse con números arábigos. Se aceptan figuras elaboradas en computador cuando éstas sean impresas con características de alta calidad, preferentemente en impresora láser. Las fotografías se aceptan en blanco y negro. En caso de ser necesario incluir fotografías en color, el autor paga los costos de su impresión. La discusión debe ser breve y limitarse a los aspectos significativos del trabajo.

Conclusiones. Deben basarse en los resultados obtenidos; si es posible, deben ofrecer una solución al problema planteado en la introducción.

Agradecimientos. En caso de ser necesario manifestar agradecimientos a las personas o instituciones que contribuyeron de manera significativa a la realización del trabajo, éstos deberán ser muy cortos y concretos.

Cita bibliográfica. Solamente se aceptan referencias publicadas, citando el apellido del autor seguido del año de publicación entre paréntesis. Ejemplo: Rodríguez (1997). Cuando los autores sean tres o más se debe usar la expresión latina *et al.* Ejemplo: López *et al.* (1996). Si la cita se coloca al final se usa autor y fecha entre paréntesis: (Rodríguez 1997; López *et al.*, 1996).

Bibliografía. Se debe presentar en orden alfabético. Su presentación será de la siguiente manera.

Artículo. Autores, año, título del artículo, revista, volumen, número, páginas. Ejemplo: Pérez R, Lalucat J. 1980. Genes asesinos de vida libre. *Investigación y ciencia*. 44 (4): 38-45.

Libro. Autor, año de publicación, título, lugar de impresión, editorial o entidad responsable de la publicación, páginas. Ejemplo: Gómez, A; Posada, H. 1987. *Descripción de malezas en plantaciones de café*. Chinchíná, Colombia: Cenicafé, p. 481. Las tesis deben referenciarse como libro. Si algún trabajo tiene características propias y no puede cumplir todas las especificaciones señaladas anteriormente, se recomienda que por lo menos tenga en cuenta título, autor, resumen, palabras clave, traducciones del resumen y palabras clave, citas bibliográficas, conclusiones.

Artículos de revisión de tema

Los artículos de revisión solamente se aceptarán para publicación cuando sean solicitados por el Consejo Edito-

rial. No obstante, los autores pueden proponer temáticas indicando el objetivo de la revisión, fuentes y métodos de búsqueda de referencias. El Consejo Editorial evaluará las propuestas y determinará si es posible su desarrollo e inclusión en la revista.

Los artículos de revisión, que de acuerdo con Colciencias, son documentos resultado de una investigación donde se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y las tendencias de desarrollo, deben cumplir con las siguientes características:

Extensión entre 12 y 20 páginas. Componentes: resumen que enfatice en el significado de los hallazgos recientes, introducción, análisis crítico (presentar con subtítulos o secciones), conclusiones y bibliografía que abarque por lo menos 50 referencias, en su mayoría recientes (de los últimos cinco años en el caso de temáticas ampliamente conocidas). Además, se sugiere incluir tablas, esquemas y figuras que dinamicen el texto y faciliten su comprensión. La revisión debe integrar adecuadamente la información recopilada y explicar con detalle las limitaciones e incongruencias de los resultados de los estudios publicados.

La *Revista Colombiana de Biotecnología* es una publicación arbitrada. Los artículos recibidos son enviados (sin nombres de autores) a pares evaluadores anónimos seleccionados por el Consejo Editorial. Sus observaciones son remitidas a los autores para que realicen las modificaciones correspondientes. El Consejo Editorial toma la decisión final sobre la publicación de los artículos.

Dirección

Revista Colombiana de Biotecnología
Consejo Editorial
Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Biotecnología
Teléfonos: (571) 316 5450
316 5000 Ext. 16981 -
Fax: 3165415
A.A. 14490 de Bogotá
e-mail: revbib_bog@unal.edu.co
www.rcb.unal.edu.co



AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

The *Revista Colombiana de Biotecnología* only publishes original articles, mainly contributions from research and development (R&D) in biotechnology's diverse areas, as well as technical articles not necessarily orientated towards proving hypotheses (i.e. technical descriptions of methods). Brief notes will also be accepted, such as reports concerning significant work having short-term objectives.

Authors must follow the following instructions; articles not complying with them will be returned without being evaluated. Manuscripts must be submitted in triplicate, on letter-sized (21.6 x 27.5 cm), white paper; they must be single-spaced, with 3 cm margins. Two copies must omit author details. An electronic copy of the work must also be submitted on diskette or CD. A copy can also be sent to the e-mail address given at the end of these instructions to speed-up the evaluation process. The articles must be processed using Word for Windows or a compatible application, written in Times New Roman, font-size 12.

The work must not exceed a maximum of 20 pages, including Figures, Tables and Bibliography. The language used must be clear and precise and the work must be written in the third person. The past tense must be used for the Introduction, Materials and Methods and Results sections.

Commercial names and brand-names must be avoided in the body of the text (or referred to in parenthesis). Commercial products must be referred to by the technical name or the main ingredient (initial letter capitalised). Only internationally accepted abbreviations must be used. In the case of little-known acronyms being used, they must be written in full the first time that they are used, followed by the acronym in parenthesis. All acronyms and abbreviations must be written without a full-stop following them. The metric decimal system must be used for all measurements and those abbreviations for common units of measurement: kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), meter (m), etc. Avoid footnotes, except for information regarding authors of an article. Use a single letter size.

The article's structure must follow the accepted steps used by Scientific Method, thus:

Title. It must be short but illustrative, without exceeding 15 words. This title must then be translated into Spanish and a short title for the pageheadings must also be included.

Authors. The complete names must be included when crediting the authors of any article. The authors must be listed in agreement with the importance of their contribution to the research or in the preparation of the arti-

cle and not in alphabetical order, nor in terms of rank. Their respective academic distinctions, the institution to which they belong and their complete mailing address (including e-mail) must be marked by an asterisk and given in a footnote.

Abstract in English. This must be concise and contain information concerning the research's justification, objectives, methodology and concrete results. It must indicate the main conclusions, emphasising achievements. It must not exceed 250 words, these to be written in a single paragraph.

Key words in English. There must be a list containing a maximum of five key words from the article (different to those included in the title) facilitating the use of modern computerised cataloguing and information search systems.

Abstract in Spanish. This must be a technical translation of the abstract to the Spanish language.

Key words in Spanish. There must be a faithful translation of the key words to the Spanish language.

Introduction. This must describe the general purpose for writing on the subject, giving the necessary information precisely, referring only directly to that related literature considered indispensable for developing the subject, allowing the present state of the same to become known. It must clearly indicate the objective of the research's hypothesis and its relationship with other relevant work (it must not include extensive reviews of the bibliography).

Materials and Methods. The techniques and the equipment used must be described in a sequence specifically and logically showing the research's development so that they can be reproduced. The materials' sources, their state of purity and the detailed description of equipment must only be included when these are very specific or novel. Procedures described by other authors must be avoided; but, if they have been modified, then the details of such modification must be included.

Results and Discussion (the Discussion can be given as a separate section). Experimental results must only appear in Tables and Figures when these are absolutely necessary; they must be succinctly but completely explained in the text. When results are sustained by statistical calculation, the origin of the data and the statistical method used must be mentioned. The Tables must be given a title and be identified by continuous Arabic numbers. The Figures (photographs, drawings, graphs and maps) must appear with a title and be identified by Arabic numbers. Figures processed by computer (when these are printed with high



quality characteristics, preferably by laser printer) are accepted. Black and white photographs are accepted. If it is necessary to include colour photographs then the author must pay the printing costs. The discussion must be brief and limited to the work's significant aspects.

Conclusions. They must be based on the results obtained. If it is possible, they must offer a solution to the problem outlined in the Introduction.

Acknowledgements. If it is necessary to show gratitude to people or institutions making a significant contribution towards the work, these must be kept short and concrete.

Bibliographical references in the body of the **Text**. Only published references can be accepted, mentioning the author's last name, followed by the year of publication in parenthesis, for example: Rodríguez (1997). When there are three or more authors, the Latin expression *et al.* must be used, for example: López *et al.* (1996). If the reference is made at the end of a phrase, author and date are given in parenthesis, for example: (Rodríguez 1997; López *et al.* 1996).

Bibliography. This must be presented in alphabetical order of first-named authors. Its presentation must be as follows.

For articles. Author(s), year, title of the article, journal, volume, number, page(s), i.e. Pérez, R.; Lalucat, J. 1980. Genes as assassins of free life. 44 (4): 38-45.

Books. Author (s), year of publication, title, place where printed, the publisher or organisation responsible for the publication, pages, i.e. Gómez A.; Posada, H. 1987. Chinchiná, Colombia: Cenicafé.p. 481.

A thesis must be referred to as if it were a book.

If any work has special characteristics and therefore cannot fulfil all those specifications previously indicated, then it is recommended that at least title, author(s), abstract, key words, translations of the abstract and key words, bibliographical appointments and conclusions should be given.

Articles dealing with topic review

Topic review articles will only be accepted for publication when requested by the Editorial Committee. Authors may

however propose topics, indicating the purpose of such reviews and the reference sources and search methods to be used. The Editorial Committee will evaluate any such proposal and determine whether it should be developed and/or included in the journal.

According to Colciencias, review articles are documents resulting from research, analysing, systematising and integrating the results of published and unpublished research in a scientific or technological field so as to take account of advances and trends in R&D. They must fulfil the following characteristics.

Reviews must be between 12 and 20 pages long. Contents: they must have a Summary emphasising the significance of recent findings; an Introduction; a section for Critical Analysis (presented under subtitles or in sections); Conclusions; and a Bibliography, including at least 50 references, the majority being recent (i.e. published within the last five years in the case of wellknown topics). Schemes, Figures and Tables should also be included, dynamising the text and facilitating understanding. A review should integrate the compiled information and give a detailed explanation of the limitations and any incongruence found in published studies' results.

The *Revista Colombiana de Biotecnología* is a peer-reviewed publication. Those articles received are sent (without authors' names) to anonymous peer reviewers selected by the Editorial Committee. Their observations are then sent to authors so that they can make the corresponding modifications. The Editorial Committee takes the final decision whether to publish a particular article.

Address

Revista Colombiana de Biotecnología
Consejo Editorial
Universidad Nacional de Colombia,
Instituto de Biotecnología
Telephones: (571) 316 5450
316 5000 Ext. 16981
Fax: 3165415
A.A. 14490 de Bogotá (P.O. Box)
e-mail: revbib_bog@unal.edu.co
www.rcb.unal.edu.co



REVISTA COLOMBIANA DE
BIOTECNOLOGÍA

TARJETA DE SUSCRIPCIÓN

Susribase
hoy mismo

Nombre: _____ Apellidos: _____

Compañía: _____

Cargo: _____

Dirección:

Ciudad: _____ Estado/Dpto.: _____

País:

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

Suscripciones:

Consignar la suma de \$30.000 equivalente a la suscripción anual (dos números) en la cuenta No. 209-849037-97 de Bancolombia a nombre de Corpodib-Revista Colombiana de Biotecnología.

Enviar al Fax (571) 316 5415 o por correo al Instituto Colombiano de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (AA. 14490 de Bogotá), copia de la consignación y sus datos completos (nombre, entidad, cargo, dirección para el envío, ciudad, país, teléfono, fax, e-mail).

