



COMUNICACIÓN BREVE

Identificación de bacterias endófitas formadoras de endosporas asociadas a *Theobroma cacao* L. en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador

Identification of endophytes endospore-forming bacteria associated to *Theobroma cacao* L. in Quininde, Esmeraldas, Ecuador

María Aracely Vera-Loor^{1*} , Alexander Bernal-Cabrera² , Danilo Vera-Coello¹ ,
Michel Leiva Mora³ , Lisbeth Morales Díaz de Villegas⁴ 

¹ Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, km 5 vía Quevedo, El Empalme, Cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador, CP 120224

² Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

³ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cantón Cevallos vía a Quero, sector el Tambo-la Universidad, 1801334, Cevallos, Tungurahua, Ecuador

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 26/10/2020
Aceptado: 12/12/2020

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no existir conflictos de intereses.

CORRESPONDENCIA

María Aracely Vera-Loor
mariverloor2007@gmail.com



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo, identificar morfológica, fisiológica y molecularmente bacterias endófitas formadoras de endosporas asociadas a *Theobroma cacao* (cultivar Criollo tipo Nacional) en el cantón Quinindé, provincia Esmeraldas, Ecuador. La caracterización de las bacterias desde el punto de vista cultural, morfológico y fisiológico se realizó de acuerdo a metodologías recogidas en la literatura científica. La confirmación de la identidad de las bacterias se realizó a partir de la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Todas las cepas mostraron características culturales, morfológicas y fisiológicas semejantes al género *Bacillus*. La secuenciación confirmó los criterios anteriores y las principales especies identificadas fueron *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus cereus* con un 99 % de similitud; mientras otras cepas no produjeron una secuencia consenso óptima, quedando como *Bacillus* sp.

Palabras clave: *Bacillus* spp., cacao, caracterización

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize morphologically, physiologically and molecularly endophytic endospore-forming bacteria associated to *Theobroma cacao* (cv. Criollo type National) in Quinde canton, Esmeraldas province, Ecuador. The bacteria were characterized from the cultural, morphological and physiological point of view according to methodologies collected in the scientific literature. The confirmation of the identity of the bacteria was made from the sequencing of the gene encoding 16S rRNA. As results, all the strains showed cultural, morphological and physiological characteristics similar to the *Bacillus* genus. The sequencing confirmed the previous criteria and the main species identified were *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus cereus* with 99 % similarity; while other strains did not produce an optimal consensus sequence, remaining as *Bacillus* sp.

Keywords: *Bacillus* spp., cocoa, characterization

En los últimos años se ha informado acerca del gran potencial de microorganismos endófitos asociados a las plantas de cacao (organismos que colonizan los tejidos: hojas, frutos, tallos y raíces de plantas, sin causar enfermedad) como candidatos para el biocontrol de enfermedades (Eun y Mee, 2016; Villarreal-Delgado *et al.*, 2017).

T. cacao es el hábitat de una comunidad microbiana diversa que todavía está parcialmente caracterizada, razón que justificó la identificación de los potenciales agentes de control biológico en este trabajo estuviera centrado sobre las bacterias endófitas formadoras de endosporas, ya que estas estructuras de resistencia son el principal ingrediente activo de los formulados comerciales, y les confiere como propiedad una mayor viabilidad en el tiempo (Ek-Ramos *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue identificar morfológica, fisiológica y molecularmente cepas de bacterias endófitas asociadas a *T. cacao* en Quindé, Esmeraldas, Ecuador.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Ecuador.

Se emplearon 8 aislados de bacterias endófitas pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del propio Centro. La descripción de los caracteres morfológicos (forma,

agrupación y respuesta a la tinción) en tinciones simples y de Gram, se realizaron mediante observaciones al microscopio óptico Karl Zeiss (aumento 1000 x) de los aislados que resultaron ser bacilos Gram positivos se les realizó la prueba de la enzima catalasa en portaobjetos lisos con Peróxido de hidrógeno al 3 %. Para la identificación molecular, se realizó la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de las cepas de bacterias endófitas sembradas a 28 ± 1 °C por 24 h en medio de cultivo TSA. El proceso de extracción se hizo acorde a las normas de manufactura de PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) con un volumen de elución de ADN final a 100 µL por muestra. El ADN total se amplificó para la región 16S rRNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando los cebadores universales: 27F (5' - AGAGTTTGATCMTGG CTCAG - 3') (Hogg y Lehane, 1999) y 1492R (5' - GGTACCTTGTTACGACTT - 3') (Turner *et al.*, 1999), a una concentración de 25 pmol.

Las condiciones de la PCR fueron: 35 ciclos, con desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de los ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, temperaturas de anillamiento a 50 °C, por 30 s, con extensión a 72 °C por 2 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 10 min. El volumen de reacción de la PCR fue de 25 µL: 2,5 µL de 10x Pfx tampón de amplificación, 17,4 µL de agua desionizada, destilada estéril, 0,8 µL de dNTPs (10nM), 0,5µL de mM MgSO₄ de

cada cebador 0,8 μ L, 0,8 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 μ L de Platinum Pfx® de Invitrogen y 2 μ L de ADN.

Los productos de la PCR se comprobaron por electroforesis con geles de agarosa al 1 % más 1x GelRed® Safe Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA), las condiciones de corrida fueron; 128 V, 3000 mA por 20 min. Se utilizó 2 μ L de marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen), en el gel se cargó 2 μ L del producto de PCR más 3 μ L de bromo fenol azul. El tampón de corrida fue SB 1X. Los productos de PCR fueron purificados con el protocolo para PureLink™ PCR Purification Kit, obteniendo un volumen final de 60 μ L. Los productos positivos fueron enviados a secuenciar en Macrogen (Seoul-Korea).

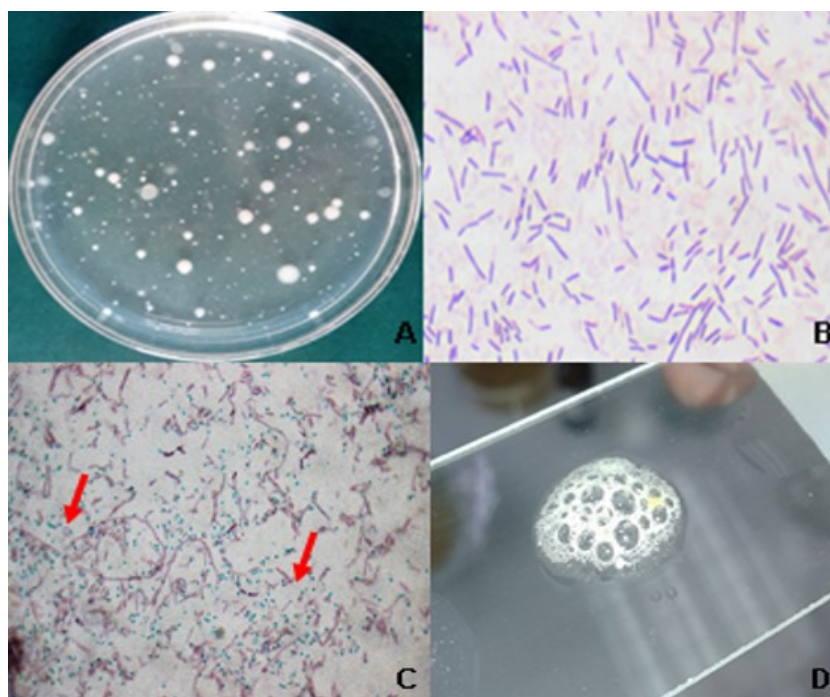
Los cromatogramas de las secuencias obtenidas se verificaron Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA). Las secuencias correctas fueron comparadas en la base de datos (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se observó que las colonias de bacterias aisladas en TSA a las 72 h, tenían características

culturales y morfológicas macroscópicas semejantes a las del género *Bacillus* tales como tamaño de mediano-grande, borde irregular, elevación planoconvexa y color blanquecino (Figura A). Después de realizar la tinción de Gram, se constató a nivel microscópico, que todos los aislados resultaron ser bacilos Gram positivos (Figura B), formadores de endosporas (Figura C) y catalasas positivas (Figura D).

En el estudio de Melnick *et al.* (2011), para la caracterización fenotípica de *Bacillus* en TSA tomó en cuenta el tamaño, forma, elevación margen y color, obteniendo como resultado colonias medianas a grandes, de borde irregular, elevación planoconvexa y color blanco/crema, corroborando estas características para el género *Bacillus* como las de la presente investigación.

La secuenciación del gen que codifica para el ADNr 16S mostró que la cepa 9-2, 24, 29-2, 45-1, 51-2 y 53-4 presentaron un grado de similitud del 99 % y se correspondieron con las especies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* y *B. cereus*, respectivamente; mientras que, las cepas 33 y 72 no produjeron una



A) Morfología macroscópica; B) Células bacilares Gram positivas;
C) endosporas (flechas rojas); D) prueba de la enzima catalasa (positiva)

Figura. Características culturales, morfológicas y fisiológicas de *Bacillus* sp. (aislado 33), con aumento de 1000 X

secuencia consenso óptima, quedando como *Bacillus* sp. con un 98 % de similitud (Tabla).

La identificación basada en criterios morfológicos, coincidió con los criterios moleculares correspondientes a la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.

Los resultados de la presente investigación caracterizaron cepas endófitas de *Bacillus* spp. asociados a *T. cacao*. Las bacterias *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* y *B. cereus* pueden ser empleadas como agentes de control biológico de una de las principales enfermedades fúngicas que limitan la producción cacaotera en Ecuador.

CONTRIBUCIÓN DE CADA AUTOR

María Aracely Vera-Loor: responsable de la gestión, coordinación, planificación, ejecución de las actividades de investigación y escritura del manuscrito publicado.

Alexander Bernal-Cabrera: desarrolló y diseñó las metodologías seguidas en la ejecución de la investigación, contribuyó en la creación y presentación del trabajo publicado.

Danilo Vera-Coello: contribuyó a la organización, análisis y síntesis de la información obtenida.

Michel Leiva Mora: formuló los objetivos generales de la investigación, gestionó,

coordinó, planificó y ejecutó actividades de la investigación.

Lisbeth Morales Díaz de Villegas: contribuyó en el diseño, montaje y evaluación de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- EK-RAMOS, M.J., GOMEZ-FLORES, R., OROZCO-FLORES, A. A., et al. 2019. Bioactive Products from plant-endophytic Gram-Positive Bacteria. *Front. Microbiol.*, 10:463. doi: [10.3389/fmicb.2019.00463](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463).
- EUN, C. and MEE, J. 2016. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnol Rep.*; DOI: [10.1007/s11816-016-0423-6](https://doi.org/10.1007/s11816-016-0423-6).
- MELNICK, R. L., SUAREZ, C., BAILEY, B. A., BACKMAN, P. A. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57: 236-245.
- TURNER, S., PRYER, K. M., MIAO, V. P. W and PALMER, J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46(4): 327-338.

Tabla. Especies identificadas en cepas bacterianas endófitas obtenidos de mazorcas de *Theobroma cacao* L. colectadas en la provincia de Esmeraldas, Ecuador

Código de cepa #	Fasta más cercana	No. Accesoión	Homología % de identidad
9-2	<i>Bacillus subtilis</i>	KP165035.1	99
24	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MF000350.1	99
29-2	<i>Bacillus mycoides</i>	KY352815	99
33	<i>Bacillus</i> sp.	KT583479.1	98
45-1	<i>Bacillus cereus</i>	EU266622.1	99
51-1	<i>Bacillus cereus</i>	KX694390.1	99
53-4	<i>Bacillus cereus</i>	KX694390.1	99
72	<i>Bacillus</i> sp.	KR528492.1	98

HOGG, J. C and LEHANE, M. J. 1999. Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9): 4227-4229.

VILLARREAL-DELGADO, M. F., VILLARRODRÍGUEZ, E. D., CIRA-CHÁVEZ, L. A., *et al.* 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1): 95-130.



Artículo de libre acceso bajo los términos de una *Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional*. Se permite, sin restricciones, el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.