

## IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Pinus engelmannii* COLECTADAS EN EL ESTADO DE DURANGO

---

***María Angélica Martell-Nevárez***

Facultad de Ciencias Forestales y  
Ambientales, UJED

<https://orcid.org/0000-0003-0713-4207>

***Melissa Bocanegra-Salazar***

Facultad de Ciencias Forestales y  
Ambientales, UJED

<https://orcid.org/0000-0002-8543-9551>

***Juan Antonio Rojas-Contreras***

Instituto Tecnológico de Durango

<https://orcid.org/0000-0002-9632-7555>

***Jorge Armando Chávez-Simental***

Instituto de Silvicultura e Industria de la  
Madera, UJED

<https://orcid.org/0000-0003-2666-8829>

***Dyada Blanca León-Flores***

Instituto Tecnológico de Durango

***Eusebio Montiel-Antuna***

Facultad de Ciencias Forestales y  
Ambientales, UJED

<https://orcid.org/0000-0002-7402-3761>

***Georgina Ixtacchuatl Ojeda-Mijares***

Facultad de Ciencias Forestales y  
Ambientales, UJED

<https://orcid.org/0000-0002-0996-4899>

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



**Resumen:** La contaminación microbiológica en semillas de *Pinus engelmannii* es un problema que ocasiona serios problemas en la germinación de las semillas. El objetivo del presente trabajo fue identificar especies bacterianas presentes en semillas de esta especie, mediante el aislamiento de colonias desarrolladas alrededor de una muestra de semilla cultivada en medio agar QL. Se obtuvieron 30 colonias, las cuales fueron aisladas mediante resiembras periódicas, por lo que se pudo caracterizar morfológicamente por sus características macroscópicas y microscópicas, analizadas mediante la técnica de tinción de Gram. Posteriormente, se realizó una identificación molecular, mediante la del ADN genómico y una amplificación del gen 16s ribosomal, utilizando la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); así mismo, se realizó un análisis ARDRA (Análisis Amplificado de Restricción de ADNr), con el que fue posible establecer 11 distintos patrones de corte, de los cuales se pudieron identificar cepas permanentes a la misma especie. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados, sin embargo, sólo fue posible identificar 13 muestras. Los resultados obtenidos de la secuenciación, indicaron la presencia de especies bacterianas como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Serratia*. Teniendo en cuenta el análisis ARDRA y la clasificación morfológica se otorgó identidad a bacterias que no fueron secuenciadas.

**Palabras clave:** Microorganismos, contaminación, semillas, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas cultivadas a nivel mundial son propagadas por semillas, por lo que los problemas fitosanitarios como la presencia de microorganismos patógenos en semillas de pino, traen consigo consecuencias graves como la imposibilidad de germinar adecuadamente; asimismo, es posible que causen la infección de sustratos de germinación, la transmisión del problema a otra región o lote, así como problemas en el aspecto económico y la afectación de la comercialización de pinos en mal estado (Arguedas *et al.*, 1999). Por lo general, los microorganismos infestan la superficie de las semillas, pero cuando se trata de microorganismos longevos, contagian los tejidos internos de ésta causando infecciones vasculares o sistémicas produciendo enfermedades tempranas en las plantas como marchitez, pudriciones, manchas en sus órganos entre otros. Estas enfermedades pueden ser graves si la planta es vulnerable y las condiciones ambientales son favorables para los patógenos. De ahí la importancia de cultivar semillas certificadas ya que brinda la seguridad de obtener una planta de buena calidad, y sin contaminaciones de este tipo (Navarrete *et al.*, 2014).

Durango es un estado de gran importancia en el sector forestal, ya que cuenta con una superficie de aproximadamente 10.5 millones de ha dedicada a esta actividad ocupando el primer lugar a nivel nacional, además de poseer la mayor superficie forestal certificada del país (UNPD, 2015). Debido a esto, los problemas en el desarrollo de una especie maderable como el pino o la pérdida total de plantaciones por contaminación microbiológica de semillas, supone un problema grave para el sector agropecuario, forestal y económico. Por lo tanto, es importante identificar los microorganismos causantes de daños, así como su caracterización. En este proyecto

se plantea la identificación y caracterización de microorganismos presentes en semilla de *Pinus engelmannii*, aplicando técnicas de identificación morfológica, bioquímicas y moleculares, para con base en los resultados obtenidos, proponer una mejora en los tratamientos y técnicas fitosanitarias que se aplican en los huertos semilleros para la producción de una semilla de calidad.

## METODOLOGÍA

Para el aislamiento de microorganismos, se realizó la desinfección de una muestra de semillas de *P. engelmannii*, las semillas se dejaron en agua durante 30 min, posteriormente, se sumergieron en Captan 50 wp durante 30 min con agitación, se lavaron con agua destilada estéril y se sumergieron en etanol al 70% por 5 min y nuevamente se enjuagaron con agua destilada estéril por 3 min. En seguida, se colocaron en hipoclorito de sodio al 15% con dos gotas de tween 20 o jabón antibacterial por 20 min. Finalmente, se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril por 3, 5 y 7 min. En la campana de flujo laminar una vez retirada la testa, se colocó el embrión en agua destilada estéril con unas gotas de Microdyn<sup>®</sup> (plata ionizada) por varios minutos y se cultivaron en medio de agar QL a 37°C hasta obtener muestras de las colonias desarrolladas. Los cultivos axénicos fueron obtenidos mediante resiembras periódicas en agar nutritivo a 37°C. Se describieron las características macro y microscópicas mediante la tinción de Gram. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de cada una de las colonias aisladas mediante el método de Cutting y Van Der Horn (1990). Se procedió a realizar una amplificación del gen 16s ribosomal por la técnica de PCR (Cuadro 1 y 2) realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 0.5x a una corriente eléctrica de 95 V durante 45 min, para visualizar el fragmento de 1.5 kb

correspondientes al tamaño esperado del gen. Una vez visualizado el ADN, se realizó un análisis de fragmentos de restricción (ARDRA) con la enzima *Hinf* I, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5x a una corriente eléctrica de 95 V durante 45 min. Para identificar la identidad de las especies microbianas aisladas, los productos de PCR se purificaron con el kit “Wizard sv gel and PCR clean-up system”. El ADN purificado se mandó secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) y se analizó con el software Bioedit y la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## RESULTADOS

**Aislamiento:** para lograr el aislamiento de las bacterias causantes de la contaminación de la semilla, la placa se dividió en 4 partes iguales, y de cada segmento se tomó una muestra representativa que se sembró por estría cruzada en placas Petri con agar nutritivo. En este primer ensayo se obtuvieron 13 colonias aisladas; durante un segundo muestreo se obtuvieron 16 y por último se realizó un muestreo proveniente de la siembra de la semilla en un tubo con agar QL, obteniendo como resultado un solo aislado. El aislamiento del total de las muestras estudiadas se logró mediante la resiembra periódica de las mismas (un total de 6 veces, para asegurar la obtención de cultivos axénicos), en placas con agar nutritivo e incubación a 37°C durante 24 h.

**Pruebas morfológicas:** con los microorganismos aislados se procedió a la caracterización macroscópica, que se basó en las características morfológicas (forma, bordes, elevación, textura, consistencia,

Reactivo	Cantidad $\mu\text{L}$
Oligo 27f (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG)	1
Oligo 1492r (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT)	1
dNTP's	1
GoTaq Flexi Buffer	5
GoTaq Polimerasa (10% del volumen final de la solución)	0.25
$\text{MgCl}_2$	3
ADN (Templado)	3
Agua libre de nucleases	10.75
Volumen final	25

Cuadro 1. Reactivos necesarios para la PCR

Etapas	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	2:00	 30 ciclos
Tiempo extra	94	0:30	
Alineamiento	55	0:30	
Elongación	72	1:30	
Elongación final	72	3:00	
Enfriamiento	15	$\infty$	

Cuadro 2. Condiciones para la PCR

No. muestra	F	B	E	T	C	CO	P
1	i	o	p	r	me	o	p
2	i	e	p	l	mu	t	p
3	c	e	c	l	mu	t	p
4	c	e	p	l	mu	t	p
5	c	e	p	l	mu	t	p
6	c	e	p	r	me	o	p
7	c	e	p	l	mu	t	p
8	c	o	c	l	mu	t	p
9	i	e	p	l	mu	t	p
10	c	o	p	l	mu	t	p
11	c	e	p	l	mu	t	p
12	c	e	p	l	mu	t	p
13	c	e	p	r	me	o	p
14	c	e	p	l	mu	t	p
15	c	e	e	l	mu	t	a
16	c	e	p	l	mu	t	p
17	c	e	c	l	mu	t	p
18	c	e	p	l	mu	t	p
19	c	e	c	l	mu	t	n
20	c	e	p	r	mu	t	p
21	c	e	p	r	mu	t	p
22	c	o	p	l	mu	t	p
23	c	e	c	l	mu	t	p

24	c	e	e	l	mu	t	a
25	c	e	c	l	mu	t	p
26	c	e	c	l	mu	t	n
27	c	e	c	l	mu	t	n
28	c	e	c	r	mu	t	a
29	c	e	e	l	mu	t	a
30	c	e	c	l	mu	t	p

F=Forma (i=irregular, c=circular); B=Borde (e=entero, o=ondulado); E=Elevación (p=plana, c=convexa, e=elevada); T=Textura (r=rugosa, l=lisa); C=Consistencia (me=membranosa, mu=mucosa); CO=Comportamiento Óptico (o=opaca, t=translúcida); P=Pigmentación (p=perla, a=amarillo, n=naranja).

Cuadro 3. Características morfológicas macroscópicas.

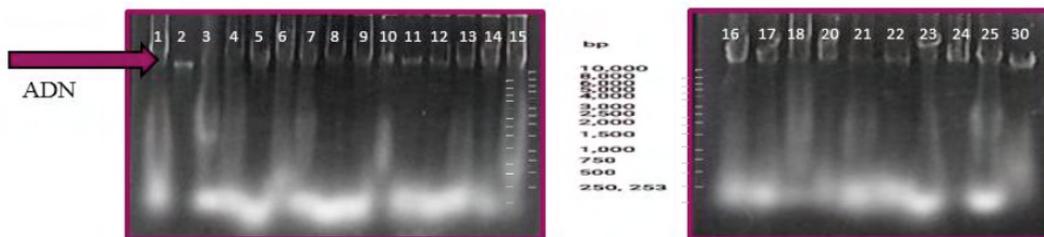


Figura 1. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN genómico de las bacterias aisladas (muestras de ADN genómico. La flecha indica la banda correspondiente al ADN).

Muestra	Concentración ng/μL	Muestra	Concentración ng/μL	Muestra	Concentración ng/μL
1	1780.3	11	720.6	22	966.4
2	954.3	12	986.9	23	896.8
3	3401.2	13	2034.3	24	233.1
4	3362.7	14	2563.9	25	347.9
5	639.3	15	5717.2	30	1852.5
6	2361.9	16	1446.2		
7	1432.8	17	166.9		
8	1264.2	18	253.5		
9	2064.1	20	1323.8		
10	682.8	21	416.5		

Cuadro 4. Concentración de ADN genómico de cada muestra.

comportamiento óptico y pigmentación). La caracterización microscópica se realizó utilizando la tinción diferencial de Gram como se mencionó anteriormente. En estas primeras pruebas se empezaron a notar similitudes entre cepas, especulando que se tratara del mismo microorganismo (Cuadro 3).

Pruebas moleculares: la extracción de ADN genómico se le realizó a 25 de las 30 muestras, ya que cinco no crecieron durante la resiembra a las 24 h de incubación (Figura 1). Debido a la presencia de ARN en la muestra, se decidió agregar 1  $\mu\text{L}$  de RNasa a las muestras y se dejó la reacción enzimática durante 1 h a 37°C.

Las muestras fueron resuspendidas en un volumen total de 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas; a pesar de la dilución, el resultado de la electroforesis mostró una elevada concentración de ADN, por lo que fue necesario realizar una cuantificación de ADN con un nano espectrofotómetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer) (Cuadro 4). Se observó que la mayoría de las muestras tienen concentraciones por arriba de la concentración óptima para la reacción de amplificación por PCR (50-500 ng/ $\mu\text{L}$ ), por lo cual, se ajustó la concentración de estas muestras a 500 ng/ $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas.

Para la amplificación por PCR del gen 16s ribosomal, que sería utilizado para caracterizar molecularmente las bacterias aisladas, se decidió realizar una PCR convencional (Cuadro 2). Sin embargo, no hubo resultados positivos (datos no mostrados), por lo que se decidió realizar un PCR del tipo "nested" (anidado) cuyas características se muestran en el Cuadro 5. Este tipo de PCR permite la amplificación de templados de ADN que muestran ciertas disimilitudes con las secuencias de los cebadores (oligonucleótidos) "universales" utilizados para amplificar el gen (16s ribosomal), ya que en cada ciclo (primeros 10 ciclos del programa del termociclador) se

disminuye la temperatura 0.5°C, haciendo que los cebadores hibriden en secuencias no canónicas. Posteriormente, se siguen 20 ciclos en condiciones normales (Cuadro 2), para enriquecer las copias amplificadas previamente. Gracias a esta modificación se logró la amplificación de la mayoría de las muestras (Figura 2).

Finalmente, a los productos de PCR se les realizó el análisis ARDRA, el cual identificó 11 patrones distintos de cortes de restricción y 4 fragmentos sin cortes, la agrupación permitió definir las muestras que serían secuenciadas, por lo que solamente se secuenciaron 16 muestras; sin embargo, no fue posible identificar tres de ellas o se proporcionó información insuficiente de la secuencia (Cuadro 6).

Los patrones del análisis ARDRA indicaron que la muestra 1,4,6 y 13 pertenecen a *Bacillus pumilus* que es una bacteria de suelo único y natural, coloniza la zona de la raíz de algunas plantas, donde actúa como inhibidor de algunas enfermedades transmitidas por hongos e incluso a los nematodos del suelo (NCBI, 2017), también se ha reportado que el genoma GR8 de *B. pumilus* es un patógeno que causa enfermedades en algunas plantas, por ejemplo en el jengibre; va invadiendo los tejidos parenquimatosos del rizoma de este, y puede crecer en el espacio extracelular y producir enzimas degradadoras de la pared de las células vegetales para destruir las células del jengibre (Yuan y Gao, 2015).

Las cepas 2 y 7 corresponden al género *Pseudomonas sp.*, este género es reconocido por promover efectos benéficos en las plantas, pueden manifestar sus efectos promotores del crecimiento indirectamente, estimulando la acción beneficiosa de otros microorganismos asociados a las raíces, como las micorrizas (Glick, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que, en presencia de otros microorganismos, como *Bacillus thuringiensis*, pierde su efecto

Temperatura por paso (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
95	5:00	
95	0:30	 10 ciclos
65 -0.5 per cycle	0:30	
72	1:00	
95	0:30	 20 ciclos
60	0:30	
72	1:00	
72	7:00	
12	∞	

Cuadro 5. Condiciones para realizar PCR tipo “nested”.

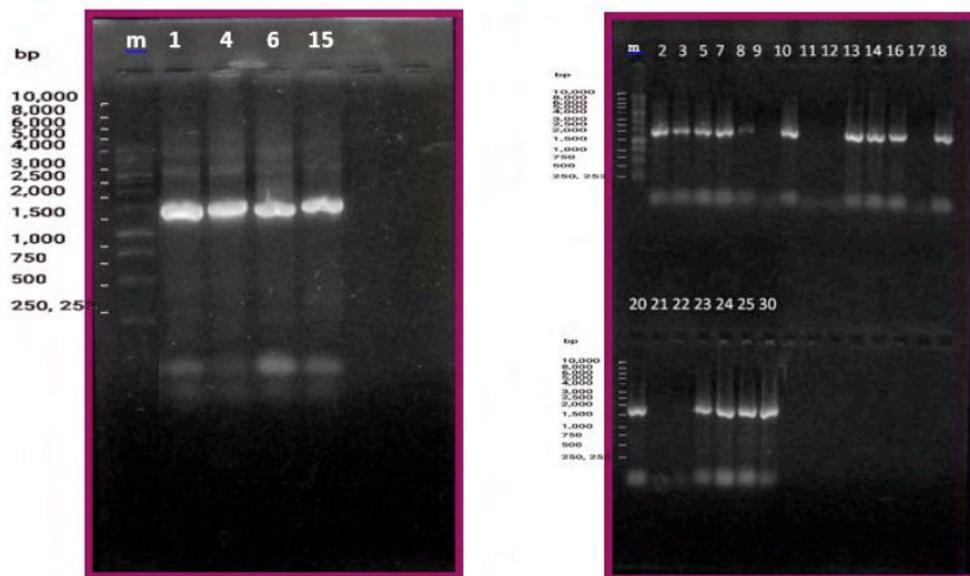


Figura 2. Amplificación del gen 16s ribosomal mediante la técnica de PCR.

Muestra	Microorganismo	% de compatibilidad	Muestra	Microorganismo	% de compatibilidad
1	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	14	<i>Serratia odorifera</i>	88%
2	<i>Pseudomona sp.</i>	99%	15	<i>Micrococus sp.</i>	84%
4	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	16	<i>Serratia odorifera</i>	86%
5	<i>Serratia odorifera</i>	100%	24	<i>Micrococus flavus</i>	89%
6	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	25	<i>Klebsiella sp</i>	98%
7	<i>Pseudomona sp.</i>	100%	26	<i>Bacterium</i>	97%
10	<i>Acinetobacter variabilis</i>	99%	28	No identificado	
13	<i>Bacillus pumilus</i>	87%	29	No identificado	

Cuadro 6. Microorganismos identificados y su porcentaje de compatibilidad con microorganismos de la base de datos de NCBI.

promotor, como lo demostraron Rojas-Solís *et al.* en 2016; en su experimento en semillas de tomate verde evaluaron la capacidad promotora de estos 2 microorganismos, utilizando 5 cepas diferentes de *Bacillus thuringiensis*, la cepa “UM96”, y de *Pseudomonas fluorescens* las cepas “UM16”, “UM240”, “UM256” y “UM270” de forma separada o en combinaciones. Los resultados indicaron que estos grupos no promovieron la germinación de las semillas; sin embargo, cepas de *Pseudomonas*, por separado, incrementaron la longitud del hipocótilo y raíz, así como el peso fresco total de las plántulas, mientras que *B. thuringiensis* únicamente mostró diferencia significativa para longitud de raíz. En conclusión, ciertas combinaciones de estas cepas pueden ejercer un efecto represor en la promoción del crecimiento de plantas, mientras que algunas pueden mantener dicho efecto por separado o en consorcio; sin embargo, es importante considerar que se ha encontrado que no todas las *Pseudomonas* son benéficas, existen ciertas especies de que son patógenas para las plantas, como *P. syringae* la cual provoca problemas en las ramas hojas y frutos.

Las cepas 10,26 y 29 fueron agrupadas de acuerdo a los patrones presentados, la identificación de la cepa 10 indica que estas pertenecen a *Acinetobacter variabilis*, algunos estudios han indicado que esta bacteria es también una importante rizobacteria promotora de crecimiento y, por tanto, podría ser formulada como biofertilizante de amplio espectro por su capacidad probada para solubilizar fosfatos, fijar N<sub>2</sub> y producir ácido indolacético (AIA) (Indiragandhi *et al.*, 2008; Gulati *et al.*, 2009).

Las muestras 5,14,16, 18, 20, 21, 23 fueron agrupadas y corresponden a *Serratia odorifera*, que es una rizobacteria, muchas de estas bacterias son promotoras del crecimiento de las plantas, además de tener la capacidad

de suprimir enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo. Recientemente, se ha demostrado que *Serratia odorifera* emite una cantidad sustancial de compuestos volátiles, que inhiben el crecimiento de muchos hongos. Un experimento realizado en el moho *Hyscomitrella patens*, presenta los efectos de estos compuestos en la planta; se realizó un co-cultivo de esta bacteria y este moho, y concluyeron que se promueve el crecimiento cuando el CO<sub>2</sub> era el volátil dominante, mientras que, en condiciones ambientales de CO<sub>2</sub> se detectaron efectos inhibidores en el crecimiento de este (Kai y Piechulla, 2010).

Por otra parte, la muestra 25 se agrupó junto con las bacterias identificadas como *Serratia odorifera* ya que se observa un patrón bastante similar a ellas en el ARDRA; sin embargo, al introducirla en la base de datos de NCBI su porcentaje de identidad con el género *Klebsiella* fue más elevado, Esta especie es frecuentemente encontrada en aguas, suelos y otros hábitats que tienen contacto con estiércol de animales, ya que son habitantes comunes del tracto digestivo y urinario de diversos mamíferos, incluyendo a los humanos; es un patógeno importante en infecciones nosocomiales, sin embargo, en forma natural está presente en los suelos y puede ser aislada de la superficie de las raíces de algunas plantas, pero en general son diferentes a las asociadas con infecciones en humanos. Chelius y Triplett (2000) aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae*, y observaron que estas pueden colonizar las raíces de plantas de arroz y estimular la formación de pelos absorbentes; mencionan también que esta bacteria es considerada como un microorganismo endofítico capaz de fijar nitrógeno en el interior de la raíz.

Las muestras 3, 8, 11, 12, 17, 19, 22, 27 y 28, no fueron identificadas debido a que no se logró la extracción de ADN y/o la amplificación del gen 16s, por lo que, se recomienda realizar

un estudio más amplio sobre las bacterias que no fue posible identificar, empleando técnicas más especializadas o con una variedad amplia de enzimas de restricción que en conjunto permitan identificarlas.

## CONCLUSIONES

Se logró identificar 14 muestras mediante secuenciación, a pesar de ello se pudo deducir la identidad de muestras no secuenciadas gracias a los patrones analizados por el ARDRA. La mayoría de las bacterias identificadas son colonizadoras de raíces de

las plantas, se ha demostrado las relaciones de estas bacterias con la rizosfera y sus efectos en la comunidad vegetal, algunas de estas son promotoras del crecimiento vegetal y otras inhiben el crecimiento en determinadas circunstancias.

## AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Pública (SEP), por el apoyo otorgado a través del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP).

## REFERENCIAS

- Arguedas, M., Jiménez, M. y Miller, C. (1999). **Microorganismos asociados a semillas de especies forestales en Costa Rica. Avances sobre la producción de semillas forestales en América Latina.** Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. Santo Domingo, República Dominicana. 225-228.
- Chelius, M.K. y Triplett, E.W. (2000). **Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L.** Applied and Environmental Microbiology. 66:783-787.
- Cutting, S. M. y Vander-Horn, P. B. (1990). **Genetic analysis.** In: Harwood C R, Cutting S M, editors. **Molecular biological methods for *Bacillus*.** Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.27-74.
- Glick, B.R. (1995). **The enhancement of plant growth by free-living bacteria.** Canadian Journal of Microbiology 41(2):109-117.
- Gulati, A., Vyas, P., Rahi, P. y Kasana, R. (2009). **Plant growthpromoting and rhizospherecompetent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas.** Current Microbiology. 58(4):371-377.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M. y Sa, T.M. (2008). **Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).** Current Microbiology. 56(4):327-333.
- Kai, M. y Piechulla, B. (2010). **Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens*.** Plant Signaling & Behavior 5(4):444-446.DOI: 10.4161/psb.5.4.11340
- Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M.L., Moya Hernández, S.L. y González Ochoa, M.G. (2014). **Bacterias fitopatógenas en semillas: su detección y regulación.** Revista Mexicana de Fitopatología. 32(2).75-88.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2017). ***Bacillus pumilus*.** Recuperado el 20 nov. 2018.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=bacillus%20pumilus>
- Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C.E. y Santoyo, G. (2016). **Evaluación de *Bacillus* y *Pseudomonas* para colonizar la rizosfera y su efecto en la promoción del crecimiento en tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.).** Revista Chapingo Serie Horticultura 22(1):45-57.
- Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (UNPD). (2015). **Durango: Líder nacional en producción forestal maderable y superficie certificada de proyecto CONAFOR-GEF-PNUD**?. Recuperado el 15 de noviembre de 2017. <http://www.mx.undp.org/content/mexico/es/home/presscenter/pressreleases/2015/06/25/durango-1-der-nacional-en-produccion-forestal-maderable-y-superficie-certificada-de-proyecto-conafor-gef-pnud-.html>
- Yuan, Y. y Gao, M. (2015). **Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy.** Nature: Scientific Reports.5:10259. DOI: 10.1038/srep10259