

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS DE PLANTAS DE
Saccharum sp, (CAÑA DE AZÚCAR) DE RIBERÃO
PRETO – BRASIL**

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. Hebert Hernan Soto Gonzales

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS
DIAZOTRÓFICAS DE PLANTAS DE *Saccharum sp.* (CAÑA DE AZÚCAR)
DE RIBERÃO PRETO - BRASIL**

TESIS PRESENTADO POR:

Br. HEBERT HERNAN SOTO GONZALES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACION 12 DE DICIEMBRE DEL 2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:


Ing° M.Sc. EDWIN FEDERICO ORNA RIVAS

PRIMER MIEMBRO:

D.Sc. DINA PARI QUISPE

SEGUNDO MIEMBRO:


M.Sc. MARIA ELENA SUAÑA QUISPE

DIRECTOR / ASESOR:


Dr.Cs. ALVARO GABINO SARMIENTO MENA

AREA
LÍNEA
TEMA

: Ciencias Biomédicas
: Diagnostico y epidemiología
: Biotecnología microbiana

DEDICATORIA

Con todo cariño para mi hijo *Marcelo do Couto Soto*, por todo el apoyo y paciencia durante la realización de esta tesis.

Igualmente con cariño para mis queridos hermanos: *Zeydita y Joselito* por todo su apoyo, lucha, garra y perseverancia.

Hebert H. Soto G.

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento y gratitud:

- Al director de tesis Dr. Álvaro Gabino Sarmiento Mena por su apoyo constante y valiosa participación en el presente trabajo.
- A los miembros del jurado: M.Sc. Edwin Federico Orna Rivas., D.Sc. Dina Pari Quispe., y M.Sc. María Elena Suaña Quispe. Por su valioso aporte en el presente trabajo.
- Al docente Dr. Dante Choquehuanca Panclas, por sus enseñanzas y orientaciones en mi formación profesional y además por su desinteresado y valiosa colaboración.
- A mi colega y gran amigo Dr. Luis Paucar Flores por su ayuda y apoyo constante.
- Al genetista Dr. Roberto Gallegos, por su apoyo y participación en este trabajo.
- A la Sra Bety y Sra. Irma (Secretarias de la Facultad de Ciencias Biológicas), por la atención y orientación para los trámites administrativos.
- A todos mis colegas y amigos de los laboratorios de Microbiología y Biología molecular de la Universidad de San Pablo – USP / EMBRAPA Brasil, en especial para, el Dr. Carlos Menks (Laboratorio de Estudios de Reparación del ADN – ICB - USP) y al Dr. Jorger González (Laboratorio de Microbiología - EMBRAPA) por el uso y utilización de los equipos de investigación para la realización de este proyecto.
- Al Dr Marcos Vital, por su gran apoyo durante mi pasantía de pesquisa en el Programa de Post Grado de la Universidad Federal de Roraima – UFRR/Brasil.
- A todos los profesores y técnicos de la Facultad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – UNAP – Puno.

Hebert H. Soto G.

ÍNDICE

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. REFERENCIAS	67
ANEXO	78

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

LB : Luria-Bertani

CN : Caldo Nutriente

FBN : Fijación Biológica de Nitrógeno

N : Nitrógeno

Mo : Molibdeno

Mg : Miligramos

g : Gramos

Nif : Genes de fijación de Nitrógeno

Pi : Fósforo Inorgánico

PGMP: Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas

ADN : Acido Desoxirribonucleico

ADNr : Acido Desoxirribonucleico Ribosómico

ARN : Ácido Ribonucleico

PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa

ARNr : Acido Desoxirribonucleico Ribosomal

BrEt : Bromuro de Et*9idio

NH₃ : Amoníaco

ml : Mililitros

USP : Universidad de São Paulo

EMBRAPA : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

RESUMEN

Las bacterias endofíticas son conocidas como PGPE (*Plant growth-promoting endophytic bacteria*) presentan un alto potencial biotecnológico para aumentar los índices de productividad agrícola, estos microorganismos tienen la capacidad de interactuar con las plantas en donde contribuyen con la fijación biológica de nitrógeno, capacidad de solubilizar fosfatos, producción de anti fúngicos, entre otros beneficios para las plantas. En este estudio se aisló 85 bacterias endofíticas, se identificó 11 géneros bacterianos: *Burkholderia*, *Gamma*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Xanthomonas*. El 29,31% de los aislados bacterianos presentaron la capacidad de solubilizar el fosfato y la actividad antagonista (anti fúngicos) siendo solamente observados 10 cepas bacterianas endofíticas. La identificación molecular fue realizada utilizando *primers* específicos seguido de la amplificación del ADN ribosómico y la secuenciación parcial del gen 16S rADN.

Palabras Clave: Bacteria, endofitos, fosfatos, nitrógeno y gen 16S rADN.

I. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno a excepción del agua es considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de plantas en su estado natural. En la atmosfera, el nitrógeno se encuentra en grandes cantidades, como elemento químicamente es bien estable, mas no es asimilable por la gran mayoría de seres vivos, necesitando su transformación para otra forma combinada que posibilite su asimilación.

La población humana actualmente es mantenida por alimentos producidos utilizando fertilizantes nitrogenados inorgánicos obtenidos mediante el proceso industrial de *Haber-Bosch*, mediante este proceso químico es producido el amonio y la urea, el cual es necesario 1,3 toneladas de combustible fósil para producir una tonelada de nitrógeno inorgánico. Este proceso es responsable por el excesivo consumo de combustible fósil, además de los altos costos y la generación de la contaminación ambiental: como la contaminación de los recursos hídricos, suelo y de los alimentos por NO_3^- y NO_2^- , la toxicidad para las plantas por la presencia de altos niveles de NO_2^- en los suelos y la emisión de CO_2 contribuyen para acelerar el efecto invernadero del planeta y el cambio climático.

La finalidad de este estudio es dar a conocer avances y contribuciones importantes sobre las perspectivas actuales de los efectos beneficiosos de los microorganismos endofíticos fijadores de nitrógeno aislados de *Saccharum* sp (caña de azúcar) y su contribución para el medio ambiente y la agricultura. Estos resultados obtenidos brindaran información como alternativa biotecnológica, sostenible, inocua, económica y beneficiosa para el medio ambiente y potenciar una agricultura sostenible sin contaminar y remplazando el uso indiscriminado de fertilizantes químicos.

Para el desarrollo del trabajo de investigación se propuso los siguientes objetivos.

- Aislamiento e identificación de bacterias endofíticas diazotróficas de *Saccharum* sp (caña de azúcar).
- Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico y la producción de metabolitos anti fúngicos en los aislados bacterianos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Caña de Azúcar

La caña de azúcar es una gramínea tropical el tallo se acumula un jugo compuesto de sacarosa que al ser extraído y cristalizado se forma el azúcar (James, 2004), la sacarosa es sintetizada por la caña de azúcar con la energía recibida del sol durante el proceso de la fotosíntesis, esta planta constituye uno de los cultivos de mayor importancia desde el punto de vista de la producción azucarera (Castillo y Silva 2004).

Nombre Científico: *Saccharum officinarum* L. Nombre común: caña de azúcar, conocida con otros nombres como caña de castilla, caña dulce, cañaduz, caña melar, cañamiel y Sa-kar.

2.2. Taxonomía de la caña de azúcar

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar es la siguiente: (Cheavegatti-Gianotto, *et al.*, 2011).

Reino: Vegetal

Tipo: Fanerógamas

Subtipo: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Glumales

Familia: Gramíneas

Tribu: Andropogoneas

Género: *Saccharum*

Especie: *officinarum* L.

2.3. Origen de la caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta nativa de las regiones subtropicales y tropicales del sudeste asiático, África, China y Sudamérica (Abbott, 1953; Parreño, 2012). La especie botánica de *S. officinarum* L. corresponde a las cañas cultivadas por el hombre, se considera que esta especie fue domesticada a partir de *S. robustum* (Parreño, 2012). Los cromosomas es variable en cada especie caña en lo que se refiere al número, existe una variación genética amplia entre los progenies y variedades de plantas de caña de azúcar (James, 2004; Boddey *et al.*, 2003).

2.4. Botánica de la caña de azúcar

2.4.1. Sistema radical

El sistema radical de la planta lo constituye la parte subterránea del eje de la planta; es el órgano sostén mecánico y el medio donde se realiza la absorción de nutrientes y agua del suelo (Parreño, 2012). Raíces primordiales: son las raíces de la estaca original de siembra; delgadas, ramificadas y dura hasta los tres meses de edad (Parreño, 2012).

2.4.2. El tallo

El tallo es el órgano más importante de la caña de azúcar, puesto que allí se almacenan todos los azúcares; La longitud de los tallos, en gran parte depende de las condiciones ambientales de la zona y del manejo agronómico que se le dé a la variedad. Los tipos pueden ser primarios, secundarios o terciarios (James, 2004).

2.4.3. El nudo

El nudo es la región más dura del tallo que separa dos entrenudos en las plantas de caña de azúcar. El nudo, se encuentra compuesto por el anillo de crecimiento, la banda de raíces, la yema y el anillo ceroso (James, 2004).

2.4.5. Hoja

La hoja en la caña de azúcar tiene origen a partir de los nudos y se distribuye a lo largo del tallo (Parreño, 2012), cada hoja está formada por la lámina foliar y por la vaina, la unión entre estas dos partes es conocida con el nombre de *lígula*, en cuyo extremo existe una aurícula con pubescencia variable (James, 2004).

2.4.6. La flor

La flor es de tipo de inflorescencia, clase panícula sedosa, las espiguillas dispuestas contienen una flor hermafrodita conteniendo anteras y un solo ovario con dos estigmas que están rodeadas de pubescencias que le dan una inflorescencia de un aspecto sedoso (James, 2004).

2.5. Microorganismos endofíticos en caña de azúcar

Los microorganismos endofíticos en las plantas pueden ser clasificados como seres que viven por lo menos durante un periodo de su ciclo vital en el interior de una planta y no causan ningún daño a su hospedero (Hallmann *et al.*, 1997). Por lo tanto, ellos se diferencian de los microorganismos fitopatógenos, que son perjudiciales a las plantas, causándoles enfermedades (Hallmann *et al.*, 1997), son distintos de los microorganismos epifíticos, que viven en la superficie de las plantas (órganos vegetales) (Baron y Zambryski, 1995).

2.6. Bacterias endofíticas

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes dentro de tejidos de la planta, favorecen el crecimiento, desarrollo y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Hallmann *et al.* 1997), ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente aunque no necesariamente con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbiote (Hallmann *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2003).

La promoción del crecimiento vegetal en las plantas inoculadas con bacterias endofíticas ocurre por diversos factores; uno de ellos es la síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citosinas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001), esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrimentos, permitiendo de esa manera que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Vicentini, 2006).

2.7. Potencialidades Biotecnológicas de las Bacterias Endofíticas

2.7.1. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es sintetizado por procesos industriales (Fernandez-Pascual, *et al.*, 2002) que contribuyen con 70 millones de nitrógeno fijado por estos procesos artificiales, también es obtenido por procesos físicos naturales tales como el relámpago y la combustión volcánica (Magnani *et al.*, 2010), cuya contribución total de nitrógeno fijado es del 10% (Kim y Rees, 1994), pero la mayor contribución se encuentra en la fijación biológica del nitrógeno, con 175 millones de toneladas del total de nitrógeno fijado anualmente (Magnani *et al.*, 2010).

La ventaja de la FBN comparado con la producción de fertilizantes inorgánicos, se convierte en un parámetro claro en cuestión, debido a que en la producción industrial hay un consumo del 1% de la energía total del mundo para la producción de fertilizantes químicos (Estupiñan y Quesada 2010).

2.7.2. Genes de la fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (BNF) es un proceso complejo que requiere la expresión de un conjunto de genes llamados genes *nif* (fijación de nitrógeno), que codifican proteínas implicadas directamente en la (BNF) (Teixeira, 1997), el estudio de la genética de *Klebsiella pneumoniae* llevó al descubrimiento de 20 genes responsables de la (BNF), en este organismo los genes *nif* se organizan en 7-9 "operones" (Frazzon, 1996), ocupando 24 kb entre los genes *shiA* y *hisD* (Arnold *et al.*, 1988), de estos 20 genes *nif* identificados en esta bacteria *K. pneumoniae*, 14 genes fueron encontrados en la mayoría de las bacterias diazotroficas (Teixeira, 1997).

Según Poly *et al.*, (2001), la estructura del gen *nifH* refleja la adaptación a los cambios en diferentes condiciones ambientales, tales como la temperatura y la composición del suelo (Teixeira, 1997), la organización de los genes *nif* no es universal, estudios de caracterización de las bacterias en diazotroficas de vida libre o en asociación indican en una compleja estructura de la organización de estos genes (Brill, 1980).

2.8. Disolución de fosfato inorgánico

El fósforo es considerado uno de los elementos y nutrientes más limitantes en el crecimiento de las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999). Las principales funciones en los seres vivos se encuentran en el almacenamiento, captación y transferencia de energía (Chen *et al.*, 2006). También forma parte de macromoléculas como ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática (Rodríguez y Fraga, 1999), en la agricultura los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación permaneciendo de forma inasequible para la planta (Rengel y Marschner 2005).

Diversos microorganismos colonizadores de la raíz de las plantas tienen la capacidad de disolver el fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999), estos actúan como promotores del crecimiento vegetal en las plantas (Idriss *et al.* 2002), las formas inorgánicas de fósforo son solubilizadas por los microorganismos que excretan ácidos orgánicos, los cuales disuelven minerales ricos en fósforo o quela cationes unidos al fósforo liberando a este a la solución (He *et al.* 2002). Las bacterias y hongos tienen un papel central en el ciclo natural del fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999), diversos tipos de suelos son deficientes en fósforo ya que en la forma soluble el fósforo no está disponible para las plantas (Gyaneshwar *et al.*, 2002a; Barrot y Nahas, 2000).

Las mayores reservas de P inorgánico están en las piedras fosfatadas y otros depósitos minerales, sin embargo, una considerable porción de P está acumulada en los suelos agrícolas, como resultado de las aplicaciones regulares de fertilizantes químicos (Nautiyal, 1999).

El segundo mayor componente de P en el suelo es de origen orgánico, con aportes de 30% a 50% en la composición del total del fósforo en el suelo (Gyaneshwar *et al.*, 2002), el fósforo debe ser hidrolizado para la forma orgánica y de esa manera ser disponible para la planta, este proceso es realizado por la enzima fosfatasa alcalina (FA) presente en microorganismos (Gyaneshwar *et al.*, 2002), varios estudios se han realizado para evaluar los microorganismos con la capacidad de solubilizar el fosfato inorgánico, a pesar de existir muchas bacterias solubilizadoras de fosfato en el suelo, frecuentemente su número no es suficiente para un aumento sustancial en el crecimiento vegetal (Rodríguez y Fraga, 1999).

2.9. Metabolitos anti fúngicos producidos por endófitos

Los anti fúngicos son metabolitos secundarios que se acumulan en el medio de cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial en los microorganismos (Leifert *et al.*, 1995), estos metabolitos no son vitales para el crecimiento y la reproducción, son capaces de dar una ventaja evolutiva (Potera, 1994). Así, en términos competitivos, los microorganismos productores de antibióticos son favorecidos en relación para los no productores (Quan *et al.*, 2006).

Estos tipos de sustancias eliminan o inhiben el crecimiento de otras especies microbianas, incluso en pequeñas cantidades, los antibióticos tienen la función de control biológico de patógenos de plantas (Potera, 1994; Leifert *et al.*, 1995). Por lo tanto, los antibióticos son utilizados con fines terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Una cepa del complejo *Burkholderia cepacia* produce un metabolito anti fúngico altamente activo contra un amplio espectro para hongos (Quan *et al.*, 2006), este metabolito ha traído un gran interés como bio-pesticida para el control biológico de hongos y otras plagas que afectan a plantas y cultivos de interés comercial (El-Banna *et al.*, 1998).

2.10. Promotores del crecimiento vegetal

Las nuevas tecnologías para optimizar los cultivos agrícolas, se encuentra el uso de los productos biológicos y biotecnológicos; es decir, incorporar al sistema productivo, organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos (Idriss *et al.*, 2002), dentro de este grupo se pueden citar a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal conocidos hoy como PGPM (*Plant Growth-Promoting Microorganism*) (McInroy y Kloepper, 1995), existen microorganismos habitantes tanto de la rizósfera y endofíticos que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Los mecanismos por los cuales los PGPM ejercen efectos benéficos sobre las plantas son numerosos (Idriss *et al.*, 2002), entre ellos se pueden mencionar la fijación de N₂, la solubilización de fósforo (P), la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácidos oxálicos, fumárico y cítrico) y fosfatasa facilitando la solubilidad del P y otros nutrientes y además, la promoción del crecimiento de las plantas puede asociarse a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos patógenos (Kloepper *et al.*, 1991).

2.11. Interacción planta-microorganismo

Las interacciones entre las plantas y microorganismos, causaron grandes efectos en el desarrollo de las civilizaciones desde que la humanidad comenzó a depender de los cultivos agrícolas para la alimentación y subsistencia. Diversos microorganismos interactúan con los tejidos y células de las plantas, con diferentes grados de dependencia pudiendo desarrollar interacciones benéficas (simbióticas o no) (Kloepper *et al.*, 1991; Smith, 1992) o también patogénicas (Vitousek *et al.*, 2013; Smith, 1992).

Entre las interacciones planta-microorganismos benéficas que fueron estudiados en detalle, están las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* establecen simbiosis con las plantas de la familia leguminosa formando nódulos en las raíces (Vitousek *et al.*, 2013; Smith, 1992), en estas relaciones se sabe que los microorganismos producen nutrientes nitrogenados a las plantas, y la planta a su vez, contribuye con los nutrientes energéticos generados por el proceso fisiológicos y fotosintéticos (Corrales, *et al.*, 2016).

Otras especies de bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno también fueron encontradas dentro de tejidos de plantas gramíneas y caña de azúcar, en donde pueden obtener un porcentaje para sus requerimientos de nitrógeno a partir de di-nitrógeno fijado por la bacteria fijadora de nitrógeno (Boddey, 1997).

2.12. Taxonomía bacteriana

La taxonomía bacteriana es utilizada como sinónimo de la sistemática moderna, es tradicionalmente dividida en tres partes de acuerdo con Gevers *et al.*, (2006):

- Clasificación: la clasificación de los organismos en grupos taxonómicos basados en la similitud entre ellos.
- Nomenclatura: es el etiquetado de las unidades y se define en la clasificación.
- Identificación de organismos desconocidos: las determinaciones de los organismos que pertenecen a las unidades genómicas y ecológicas pre-existentes.

La *especie* es la unidad básica de la taxonomía bacteriana, que se define como un grupo de cepas, incluida la cepa tipo, que comparten el 70% o más de hibridación ADN-

ADN (Wayne *et al.*, 1987). Una especie es una categoría que circunscribe a un grupo de individuos (cepas / aislados) genómicamente coherentes, demostrando un alto grado de similitud, en muchos aspectos independientes, probados comparativamente bajo condiciones estándares (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista de la evolución molecular, algunos genes de bacterias tienen una tasa constante de mutación, la selección darwiniana y la historia evolutiva de los genes de 16S rADN se aproxima a la historia evolutiva del genoma total, por lo tanto, es aceptable reconstruir las relaciones evolutivas entre las bacterias de la divergencia de las secuencias de los genes 16S rADN (Van Berkun *et al.*, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2002; Mallet y Willmott 2003).

2.13. Métodos fenotípicos y genotípicos aplicados en taxonomía microbiana

Los métodos no direccionados a la utilización de moléculas de ADN o ARN son llamados métodos fenotípicos, incluso los que utilizan marcadores para quimio-taxonómicos. Los métodos fenotípicos clásicos para tipagen bacteriano incluye el análisis de las características morfológicas (forma de la célula o de la colonia), estructurales (para Tinción de Gram), bioquímicos y fisiológicos (crecimiento en diferentes fuentes de carbono, diferentes temperaturas, valores de pH, concentración de sal, clima, etc.) (Wolters y Erdmann, 1989). Estas características, en su conjunto, se pueden utilizar para reconocer algunos taxones. La taxonomía clásica de identificación bacteriana es útil, pero aún es muy limitada (Woese, 1987).

Los métodos modernos de taxonomía genotípica, direccionados para las moléculas de ADN o ARN, son una consecuencia del progreso tecnológico experimentado por la biología molecular en las últimas décadas y actualmente dominan los estudios taxonómicos modernos (Vandamme *et al.*, 1996).

2.14. Estudios de homología del ARN ribosomal

El gen 16S rADN es considerado el mejor gen para el estudio de relaciones filogenéticas, ya que están presentes en todas las bacterias, archaeas y seres eucariotas: son funcionalmente constantes y en la mayoría de estos rADN, su secuencia es altamente conservada (Woese, 1987; Stackenbrandt y Goebel, 1994), son las principales características de cronometro molecular. Hasta hace pocos años no era posible determinar

las secuencias completas de rADN. Así que, por más de una década los rADN se caracterizaron en términos de catálogos de oligonucleótidos (Wolters y Erdmann, 1989), los oligonucleótidos cortos, de aproximadamente 20 bases fueron producidos por la digestión de rADN 16S con ribonucleasa T1 (que corta específicamente residuos Guanina) (Woese, 1987).

2.15. ARNs ribosomales

Los ácidos ribonucleicos ribosómicos (rARN) son biopolímeros considerados como los más adecuados para estudios de la diversidad (Qu *et al.*, 1983; Lane *et al.*, 1985). Sus genes son universalmente distribuidos, tienen un alto grado de conservación. Su variabilidad puede presentarse en mayor o menor extensión, en diferentes regiones de la molécula (Lane *et al.*, 1985).

MARCO CONCEPTUAL

- **Ácido desoxirribonucleico:** Es un tipo de ácido nucleico, contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria (Sambrook y Russel, 2001).
- **Ácido ribonucleico:** Es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (Sambrook y Russel, 2001).
- **Bromuro de etidio: (BrEt)** Es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y Russel, 2001).
- **Caracterización molecular de una especie:** Es el estudio específico de cualquier característica molecular que permita la diferenciación entre especies, mediante el uso de marcadores moleculares, los cuales pueden ser a nivel del ADN, ARN o proteico (Reinhold-Hurek *et al.*, 1998a.).
- **Fijación de nitrógeno:** Este proceso bioquímico se da por bacterias de diversos géneros las cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico para reducir el N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa (Teixeira, 1997).
- **Nitrógeno:** El nitrógeno es un elemento químico, de número atómico 7, símbolo N y que en condiciones normales forma un gas di atómico (nitrógeno diatómico o molecular) que constituye del orden del 78% del aire atmosférico (Qu *et al.*, 1983; Lane *et al.*, 1985).
- **Reacción en cadena de la polimerasa:** conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular (Sambrook y Russel, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito de estudio

Esta investigación se realizó en el Estado de São Paulo - Brasil, en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo y la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (Embrapa). Las muestras (plantas adultas de caña de azúcar) fueron recolectadas de la hacienda Santa Rita, ubicadas en la jurisdicción Riberão Preto – Estado de São Paulo, se encuentra localizado entre las coordenadas de $- 18^{\circ} 52' 17,49''$ de latitud sur y $- 75^{\circ} 45' 36,05''$ longitud oeste (Figura 1).

El muestreo estuvo constituido de 18 plantas adultas de caña de azúcar, se analizaron microbiológicamente en forma separada los 3 órganos vegetales (tallo, raíz y hoja). Las muestras (plantas adultas) fueron colectadas por la mañana y trasladadas el mismo día al laboratorio, para así poderlas procesar por la tarde, se tomaron muestras previamente desinfectadas externamente de raíz, tallo y hoja de plantas adultas. Los muestreos fueron realizados en los meses de setiembre, octubre y noviembre durante la estación de la primavera del 2016. Meses en donde las plantaciones de caña están en estadio fenológico adulto y es realizada las cosechas correspondientes para la obtención de alcohol, azúcar y demás derivados.

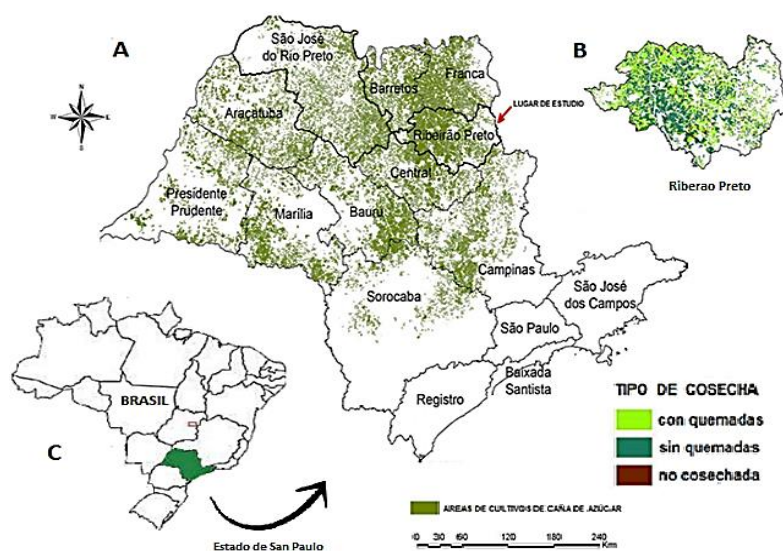


Figura 1. Mapa de ubicación de las colectas del material biológico (plantas adultas de caña de azúcar) obtenidas de la hacienda Santa Rita - Riberão Preto – Estado de São Paulo. **A.** mapa del Estado Federal de San Paulo – Brasil, **B.** Comarca de Riberão Preto y en **C.** mapa de Brasil con la respectiva ubicación del Estado Federal de San Paulo (verde). São Paulo – Brasil. 06/05/2016. Fuente: Theodor (2014).

3.2. Tipo y nivel de investigación

El tipo de investigación realizado en el presente trabajo fue experimental, en donde fue aislado, identificados endófitos bacterianos e investigado sus aplicaciones biotecnológicas aplicados a la agricultura.

3.3. Población y muestra

La población de caña de azúcar en este estudio estuvo constituido de una sola variedad de caña de azúcar (variedad SP909050), siendo utilizados plantas adultas sin presencia de síntomas de alguna enfermedad, se planifico realizar un muestreo no probabilístico al azar, por conveniencia, en que el número de muestras sea representativo de la población. El número total de plantas evaluadas fue de 18 individuos, de cada planta fue analizado los órganos vegetativos de (raíz, tallo y hoja), se realizaron los muestreos en los meses de setiembre, octubre y noviembre del 2016.

Tabla 1. Distribución del número de muestras a evaluar en la investigación.

Meses de Muestreo (2016)	Número de muestras de caña de azúcar - variedad – SP909050.			Total de plantas adultas
	Muestras de raíz*	Muestras de tallo*	Muestras de hoja*	
Setiembre	2	2	2	6
Octubre	2	2	2	6
Noviembre	2	2	2	6
Total	6	6	6	18 plantas

* Muestras originarias por planta adulta de caña de azúcar.

3.5. Metodología

- Aislamiento e identificación bacterias endofíticas diazotróficas de *Saccharum* sp (caña de azúcar).

3.5.1 Aislamiento de bacterias endofíticas diazotróficas de *Saccharum* sp

3.5.1.1. Desinfección externa de la planta

Las muestras vegetales de (plantas adultas y sanas) fueron colectadas en bolsas de plástico, se recolecto plantas adultas de caña de azúcar. Todos ellos fueron colocados en una caja de tipo *tecnopor* acompañado con bolsas de conteniendo cubitos de hielo para mantenerlas en temperatura fresca (4°C) aproximadamente, hasta que las muestras fueron procesadas en el laboratorio, siendo primeramente lavadas con agua destilada estéril y seguidamente separadas en hojas, tallos y las raíces.

Estas muestras vegetales en el laboratorio fueron sometidas a un proceso de esterilización externa para poder obtener solamente las bacterias de tipo endofíticas dentro de la caña de azúcar, siguiendo la metodología de Araújo, *et al.*, 2001. En la tabla 1. Es detallado la distribución del número de muestras a evaluar en la investigación.

Sigue a continuación a continuación los principales pasos para aislar endófitos bacterianos:

3.5.1.2 Desinfección del tallo

La desinfección fue realizada en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol 70% y luz ultravioleta. El tallo (15 cm longitud) fue lavado con agua destilada estéril para eliminar los residuos externos (polvo, restos vegetales y tierra), seguidamente fue inmerso en hipoclorito 10 % por 2 minutos, luego colocado en alcohol al 70% por dos minutos agitándose vigorosamente y finalmente enjuagado con agua auto clavada estéril, en donde el interior fue retirado con ayuda de un bisturí esterilizado (se pesaron 3 gramos), la región interna central del tallo no tuvo contacto directo con el ambiente externo, no estando contaminada con bacterias de vida libre de la parte externa (Araújo, *et al.*, 2001).

3.5.1.2. Desinfección de la raíz

Fue realizada la desinfección externa de las raíces, primeramente fue pesado 3 gramos de este órgano y lavada con agua destilada estéril y colocado a inmersión en un frasco con alcohol al 70%, seguidamente fue sumergida en solución salina estéril de NaCl 0,75% por 2 minutos, luego lavada por cinco minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10 % con agitación y dos lavados sucesivos en solución NaCl 0,75% estéril por 2 minutos con agitación; luego una inmersión en alcohol puro y expuesto al fuego por 6 segundos, después colocados en NaCl 75% estéril y finalmente enjuagado con agua estéril auto clavada.

3.5.1.3. Desinfección de la hoja

Las hojas fueron pesadas 3 gramos y lavadas con agua destilada estéril y colocados en un frasco conteniendo alcohol al 70%, la desinfección prosiguió con dos lavados sucesivos en solución estéril de NaCl 0,75% por 2 minutos; un lavado por cinco minutos en solución de hipoclorito de sodio a 3% con agitación y dos lavados sucesivos en solución NaCl 0,75% estéril por 2 minutos con agitación; una inmersión en alcohol puro y expuesto al fuego por 5 segundos y colocados en NaCl 75% estéril y finalmente enjuagado con agua estéril auto clavada como último lavado.

El último enjuague del material vegetal (raíz, tallo y hoja) fue inoculado e incubados a 30° C por 48 horas, en placas Petri con agar nutriente. La finalidad fue de validar el método de aislamiento de endófitos bacterianos de tejidos internos en caña de azúcar.

3.5.5. Procedimiento de aislamiento de bacterias endofíticas y cuantificación

El proceso de aislamiento y cuantificación de las bacterias endofíticas consistió de las siguientes etapas.

Inicialmente, el material vegetal previamente desinfectado (raíz, tallo y hoja) por separado (3 gramos), este fue macerado en un mortero de porcelana (estéril) con 5 ml de agua destilada estéril. De cada muestra pesada fue obtenido un caldo o sea un (macerado) que fue utilizado para la inoculación en un volumen de (100 µL), fue aplicado en triplicado, en tubos con medio cultivo - Caldo Nutriente (CN).

Los cultivos fueron incubados a 30°C por 48 horas. Una vez incubados por 48 horas los cultivos bacterianos, fueron realizadas diluciones seriadas en los tubos con los caldos LB hasta una concentración de 10^{-8} , con la finalidad de obtener colonias separadas, a partir del tubo incubado por 48 horas se obtuvo 1 ml y distribuido en diluciones y aplicado en placas Petri con agar nutritivo, incubado a 30°C por 48 horas.

Para la cuantificación de bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno, se colocó en un tubo 1mL de las diluciones de 10^{-2} hasta 10^{-6} en tubos que contenían medio de cultivo líquido mineral sin nitrógeno. Fueron utilizados 3 tubos por dilución, incubados a 30°C por 7 días, luego se realizó la lectura de los tubos (+) de cada una de las diluciones observando el cambio de color y la turbidez, la cuantificación bacteriana fue expresado en valores de Número Más Probable por gramo de sustrato (NMP/g), estos experimentos fueron realizados en tres repeticiones, metodología realizada según Gasser *et al.*, 2011.

3.5.6. Características de las colonias

Las bacterias viables con crecimiento en las placas Petri fueron analizados por su morfología. Los criterios utilizados para distinguir las colonias fueron: tamaño, forma, color, textura. Para mejor distinción, las colonias fueron observadas en forma directa y visualizados con auxilio de una lupa y un contador de colonias bacterianas.

3.5.7. Coloración Gram

Cada colonia aislada fue sometida a la coloración Gram. Donde fue observado la retención o no del colorante Gram (G +/G -), la morfología celular de la forma, tamaño de la célula y presencia o no de esporas.

Las colonias bacterianas aisladas fueron cultivadas y preservadas en tubos con agar inclinado y también almacenadas en glicerol 30% en un ultra freezer a - 80 °C.

Tabla 2: Componentes para realizar la coloración Gram.

Reactivo	Componentes	Cantidad
	Iodo en cristales	0,4 g
Solución de Lugol	IK	0,7 g
	H ₂ O destilada	100 mL
Violeta de Genciana	Violeta de Genciana	0,5 g
	H ₂ O destilada	50 mL
Safranina	Safranina	0,4 g
	H ₂ O destilada	50 mL
Alcohol – Acetona	Alcohol	80 mL
	Acetona	2 mL

Fuente: (Estrada-de-los-Santos, *et al.*, 2001).

3.5.8. Selección de bacterias para identificación

El criterio considerado de selección de las colonias bacterianas aisladas para la identificación fue basado en características morfológicas y fisiológicas, siendo:

- (a) de las colonias: color, forma, textura, tamaño.
- (b) de las células: forma, disposición, las esporas.
- (c) estructurales: la conservación o no de la tinción de Gram.

Una importante característica fisiológica fue la fijación de nitrógeno por el método de cromatografía a gas.

3.6. Prueba de Reducción de Acetileno (ARA)

La prueba de reducción de acetileno (ARA) fue realizada según la metodología de (Turner y Gibson, 1980), con las bacterias aisladas para verificar la fijación de nitrógeno atmosférico *in vitro*, para lo cual, fueron cultivadas en medio bacteriológico libre de N₂, utilizando el medio de cultivo NFB agar sólido y semisólido (Estrada-de-los-Santos, *et al.*, 2001).

3.6.1. Medio de cultivo NFB

Tabla 3: Elaboración del medio de cultivo NFB.

Componentes	Cantidad
Acido málico	5 g
Azul de bromotimol 0,5% en 0,2 N de KOH 2mL	2 mL
CaCl. 2H ₂ O	0,02 g
FeEDTA	0,61 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
KOH	4,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Solución de Micronutrientes	2 mL
Solución de Vitaminas	1 mL

Fuente: (Estrada-de-los-Santos, *et al.*, 2001).

Completar para 1000 mL con H₂O destilada, ajustar el pH 5.8, para preparar el medio sólido NFB, colocar la cantidad de 9 g/L de agar bacteriano.

3.6.2. Solución de micronutrientes para el medio de cultivo NFB

Tabla 4: Elaboración de la solución de micronutrientes para el medio de cultivo NFB.

Componentes	Cantidad
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g

Fuente: (Estrada-de-los-Santos, *et al.*, 2001).

- Completar el volumen para 200 mL con agua destilada.

3.6.3. Solución de Vitaminas para el medio de cultivo NFB.

Tabla 5: Elaboración de la solución de vitaminas para el medio de cultivo NFB.

Componentes	Cantidad
Biotina	10 mg
Pyroridoxol	20 mg
H ₂ O	100 mL

Fuente: (Estrada-de-los-Santos, *et al.*, 2001). - Para elaborar la solución, disolver en baño maría 40°C.

Las colonias bacterianas fueron inoculadas en placas con medio NFB e incubadas, con ayuda de la aza se inocularon de 3 a 4 colonias bacterianas en 3 frascos (tipo penicilina de 20 ml capacidad) con medio de cultivo semi-sólido NFB.

Una vez inoculado, cada frasco fue lacrado con la tapa de jebe y sellado con tapa de aluminio. Seguidamente a la fase aérea del frasco se adiciono 10% de gas acetileno con una jeringa y luego incubado sin agitación a 30°C por 72 horas.

La producción de etileno fue probada y analizada cualitativamente, inyectando 0,1 ml de la fase aérea del gas producido en cromatografía a gas, marca Shimadzu GC-14A, con columna Porapak-N 80/100 – INOX a 70 °C, inyector a 180 °C y detector de ionización a 230 °C. Las bacterias fijadoras de N₂ (nitrógeno) o denominados ARA-positivas seleccionadas, fueron sembradas en medio sólido de igual composición al del medio semi-sólido, para reconfirmar sin son fijadoras de nitrógeno.

3.7. Identificación molecular

Para la identificación molecular de las bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno seleccionadas, fueron utilizados métodos de biología molecular, utilizando técnicas de extracción de ADN, Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación parcial del gene 16S y complementados con métodos de filogenia molecular.

3.7.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de bacterias fue realizada utilizando el kit comercial de extracción “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega - USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN fue cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando el kit para la cuantificación de ADN Phage λ (Promega - USA).

3.7.2. Amplificación del gen 16S rADN

La amplificación del gen 16S rADN fue realizado mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa) con primers universales 27F y 1525r según (Stackebrandt *et al*, 1994). La composición de la mezcla para la reacción es la siguiente (Tabla 6).

Tabla 6: Composición de la mezcla para la amplificación del gen 16S rADN.

Reacción (para una muestra)	Cantidad
Iniciador “forward” 27f (Invitrogen, USA)	0,6 μ M
Iniciador “reverse” 1525r (Invitrogen, USA)	0,6 μ M
Tampón Tris-HCl pH 8,4 (Promega, USA)	20 mM
MgCl ₂ (Promega, USA)	50 mM
Mix dNTPs (Promega, USA)	1,5 mM
Go-Taq DNA polimerase (Promega, USA)	2,0 U
ADN molde (bacteriano)	5 – 15 ng
H ₂ O ultra pura grado molecular, free ADNsas, c.s.p	50 μ L

Fuente: Según el fabricante – Promega – USA.

El volumen de la reacción de amplificación fue completado a 50 μ L (Tabla 6) en todas las reacciones fue incluido un tubo control (tubo sin ADN, y agua ultra pura).

La reacción de amplificación de ADN fue realizada en un termociclador de la marca (Eppendorf, Master Cycler 5330 - Germany) previamente programado con una desnaturalización inicial del ADN a 94°C por 2 min, luego 30 ciclos repetidos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anelamiento a 55 °C durante 1 minuto y una extensión de los primers a 72°C durante 3 minutos, seguido de una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Después de la amplificación, 5 μ L de la reacción de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1,0%) en tampón TAE 1x y visualizados con bromuro

de etidio (0,5 mg/ml). Fue utilizado un marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Gibco BRL, 10511-012).

3.7.3. Reacción de secuenciación del gen 16S rADN

El procedimiento de secuenciación de ADN consiste en la incorporación de dideoxinucleotídeos marcados con fluoróforos (Sanger *et al.*, 1977). En esta reacción se utilizó aproximadamente 150 ng de ADN purificado, 4 µL de agua ultra pura (Milli-Q) estéril, 6 µL de tampón de Save Money, 3.2 pmols de primer 782r o 27F (Tabla N° 7) y 2 µL de Big Dye Terminator (Applied Biosystems - USA).

El volumen final de la reacción fue de 20 µL. La reacción se realizó en un termociclador "PTC-100 MJ Research TM. Inc.", utilizando un programa de 40 termo ciclos de (10 segundos a 96 °C, 20 minutos a 52 °C y 4 minutos a 60°C).

Tabla 7: Iniciadores utilizados para estudio de identificación molecular bacteriana.

Nombre Iniciador	Secuencia de ADN (5' → 3')	Finalidad	Fuente
1525r	AAG-GAG-GTG-WTC-	Amplificación del gen 16S rADN.	Stackebrand <i>et al.</i> , 1994.
“reverse”	CAR-CC		
782r “reverse”	ACC-AGG-GTA-TCT-ATT-CCT	Secuenciamiento del gen 16S rADN.	Chun, 1995.
27f “forward”	AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTA-AG		

- Degeneraciones nucleótidos: **H = A, C, W = A, T, y R = A, G.**

3.8. Programas computacionales *freeware* para biología molecular y evolución molecular

Los análisis de filogenia bacteriana de los endófitos microbianos aislados se realizó utilizando el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA. v.5 – 2017). La alineación de las secuencias se realizó mediante el uso del programa ClustalW, 2017 (www.ebi.ac.uk/Clustalw). A partir de los alineamientos de las secuencias de ADN, fueron construidos árboles filogenéticos utilizando el método *Neighbour-Joining* con las distancias genéticas calculadas por el método evolutivo de *Jukes y Cantor*.

Siendo los siguientes:

- Program Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA. V.4–2017. (<http://www.megasoftware.net/>).
 - Programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/Clustalw).
- BLASTs – GenBank (NCBI) National Center for Biotechnology Information.

3.9. Perfil Bioquímico de Cepas a través del Sistema API-20E

Después de la identificación molecular, los resultados fueron complementados con las características fenotípicas de identificación de los aislados bacterianos, utilizando el kit comercial API-20E y (BioMérieux – Francia - <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>) según instrucciones del fabricante, este kit comercial consta de tiras de plástico con veinte micro tubos o pocillos que permite la evaluación de veinte características fenotípicas y bioquímicas, para el grupo de las entero bacterias.

- Para la evaluación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico y la producción de metabolitos anti fúngicos en los aislados bacterianos.

3.10. Determinación cualitativa de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico

Para la detección y selección de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico, fueron realizados de acuerdo al método de Verma *et al.*, (2001).

Las bacterias aisladas de las raíces, tallos y hojas de caña de azúcar fueron inoculadas en medio de cultivo Verma con fosfato insoluble.

Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y la presencia de un halo alrededor de la colonia el cual indica la solubilización del fosfato inorgánico por la actividad enzimática, las bacterias endofíticas diazotroficas fueron evaluadas cualitativamente; para eso, todas las bacterias fueron incubadas en medios de cultivo específicos, y los que dieron resultados positivos fueron analizados por la medición del diámetro del halo y la colonia bacteriana con una regla y siendo determinado el índice enzimático (IE), donde se midió y dividió el diámetro del halo versus diámetro de la colonia (Nahas, 2002).

Mayores valores de IE indican una mayor productividad enzimática. Todos los ensayos fueron realizados en tres repeticiones.

Tabla 8: Elaboración del medio de cultivo Verma con fosfato inorgánico.

Componentes	Cantidad
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
FePO ₄ .2H ₂ O	1,0 g
Ca ₃ (PO) ₂	1,0 g

Fuente: Verma *et al.*, (2001).

Completar para 1000 mL con H₂O destilada, ajustar el pH 7.0 para preparar el medio sólido Verma – Fosfato Inorgánico, colocar la cantidad de 10 g/L de agar bacteriano y autoclavar.

3.11. Producción de anti fúngicos contra cepas fito patógenas

Para la detección y selección de bacterias con actividad anti fúngica, la metodología fue realizado de acuerdo a Potera, (1994). Siguiendo la metodología, las bacterias endofíticas aisladas y hongos fito patógenos fueron incubados a 30°C en medio de cultivo agar batata, por 15 días en tres copias cada ensayo (Leifert *et al.*, 1995).

Seguidamente fue evaluada la actividad de inhibición del crecimiento de los hongos, por los endófitos, en este experimento fueron utilizados 03 hongos patógenos de plantas, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*, los

experimentos fueron realizados en triplicado, las cepas fueron donadas por el Laboratorio de Micología – Universidad de San Paulo – Brasil.

Tabla 9: Elaboración del medio de cultivo Agar batata.

Componentes	Cantidad
Peptona triptona	3,0 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,3 g
Glucosa	0,5 g
Extracto de batata	10,0 g

Fuente: Potera, (1994).

Completar para 1000 mL con H₂O destilada, ajustar el pH 7.0 para preparar el medio Agar batata, colocar la cantidad de 10 g/L de agar bacteriano y auto clavar.

3.12. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de la cuantificación endófitos bacterianos fijadores de nitrógeno presentes en tejidos de los órganos vegetales de la caña de azúcar (raíz, tallo y hojas) fueron analizados utilizando pruebas estadísticas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Para determinación de la diferencia estadística significativa entre la planta y las comunidades de bacterias endofíticas diazotroficas, también se realizaron las pruebas estadística de varianza y la prueba de Tukey con niveles de confianza de 95%, fue procesado con el software GraphPad Prism, 2017.

Para el análisis filogenético de los endófitos diazotrofos aislados identificados por técnicas moleculares, fueron comparados y sometidos a la reconstrucción filogenética de sus ancestros más próximos utilizando el marcador genético 16S rARN, el cual fueron contruidos arboles filogénicos utilizando algoritmos como el *coeficiente de Jaccard* (Sj) y método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Average*) con número de réplicas de 1000 bootstrap, utilizando el programa de filogenia y evolución molecular MEGA v5 -2017 (Kumar *et al.*, 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de bacterias endofíticas de hojas, tallos y raíces de caña de azúcar

En este estudio para garantizar exclusividad y selectividad respecto al aislamiento de bacterias endofíticas del material vegetal trabajado, la metodología utilizada de aislamiento de bacterias endofíticas tuvo buenas repercusiones con relación a la trazabilidad en los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta como referencia el trabajo realizado por Araújo *et al.*, (2001), el tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% resulto de gran eficiencia con respecto a la eliminación de todos los microorganismos epifíticos (externos) de la región superficial de hojas, tallos y raíces de las plantas a estudiar.

En la Figura 2, podemos observar la validación de la eficacia de método de desinfección externa, donde fue cultivada las aguas del enjuague final de los órganos (raíz, tallo y hoja), el cual indica ausencia de crecimiento microbiano.

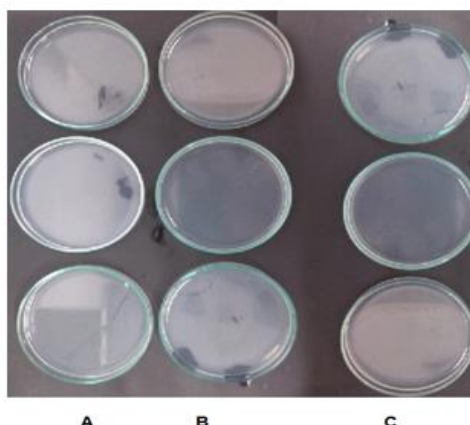


Figura 2. Inoculación del lavado y enjuague del material aplicado en placas Petri con agar nutriente (AN), en este caso según la metodología fue utilizado agua estéril autoclavado. La finalidad fue de validar el método de aislamiento de endófitos bacterianos de tejidos internos en caña de azúcar. En la columna **A**, placas con AN, con agua de raíces, en **B** con agua proveniente del tallo y **C**, placas con agua de enjuague proveniente de la hoja, incubados a 30 °C por 48 horas. Luego de 48 horas se puede constatar ausencia de bacterias, los cuales permite validar el método. Sao Paulo – Brasil. 15/12/2016.

Sánchez *et al.*, (2007) manifiesta que para obtener un buen número de microorganismos endofíticos por técnicas microbiológicas, es importante desarrollar un buen método de desinfección externa de la planta, para lograr así una buena capacidad recuperadora de hospederos, en la (Figura. 3) se observa la diversidad de endófitos bacterianos obtenidas según la morfología de las colonias, color, forma y tamaño de las colonias.

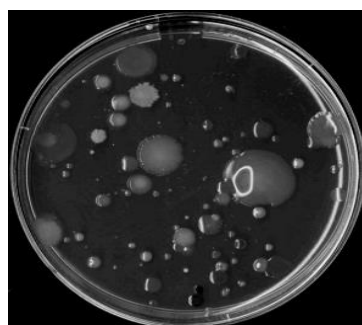


Figura 3. Resultados de la diversidad morfológica de colonias bacterianas endofíticas aisladas a partir de la raíz de caña de azúcar, colonias dispersas, cultivadas en agar nutriente, incubadas a 30°C por 48 horas. São Paulo – Brasil. 06/11/2016.

Utilizando la metodología descrita por Araujo *et al.*, (2001), se consiguió el aislamiento de bacterias endofíticas de plantas adultas de *S. officinarum* L. “caña de azúcar”. En este estudio, fueron aisladas 85 bacterias del tipo endofítico, estos microorganismos solamente habitan el interior de las plantas de caña y sin causar aparente daño, estos fueron agrupados en 11 generos taxonomicos, perteneciente al dominio: bacteria, estas cepas bacterianas fueron aisladas del tallo, raiz y la hoja siendo clasificadas y seleccionadas por observación macroscopica y microscopica relacionados con su morfologia y características fisiologicas (Tabla 10).

En los trabajos de Wissuwa *et al.*, 2007, similar número de generos taxonomicos de endófitos bacterianos fue aislado de cultivos de arroz, en ese trabajo fueron 10 generos, diferente a los estudios de Olivares *et al.*, 1996, en donde aislo un solo genero bacteriano endofítico provenientes de tejidos de caña de azúcar.

Tabla 10: Caracterización macroscópica (colonias) y microscópica (células) de bacterias endofíticas obtenidas a partir raíz, tallo y hoja de caña de azúcar.

Características morfológicas de los aislados bacterianos (colonias y células bacterianas)		Diámetro colonia (mm)	Tinción de Gram (+ 0 -)	Tipo órgano vegetal
IB:01	Blancas, redondas y lisas	0,5-1,0	-	raíz
IB:02	Cremas, amorfas y rugosas	1,0-2,0	-	raíz
IB:03	Blancas, con forma de flor y rugosas	0,5-4,0	-	raíz
IB:04	Blancas, redondas y lisas	1,0-3,0	-	raíz
IB:05	Anaranjadas, redondas y lisas	1,0-3,0	-	raíz
IB:06	Blancas, redondas y lisas	0,5-1,0	-	raíz
IB:07	Blancas, redondas y lisas	1,0-3,0	-	raíz
IB:08	Cremas, amorfas y rugosas	1,0-2,0	-	raíz
IB:09	Rojas, redondas y lisas	2,0-3,0	-	raíz
IB:10	Blancas, lisas y redondas	0,5-2,0	-	raíz
IB:11	Traslucidas, lisas y redondas	0,5-1,0	-	raíz
IB:12	Blancas, lisas y redondas	0,5-2,0	-	raíz
IB:13	Amarillo –verdosas, lisas y redondas	0,5-1,0	-	raíz
IB:14	Amarillo, formas de redonda	1,0-4,0	-	raíz
IB:15	Blanco - amarillo, redondas y lisas	0,5-2,0	-	raíz
IB:16	Blanco, redondas y lisas	0,5-2,0	-	tallo
IB:17	Blanco, redondas y lisas	0,5-1,0	-	tallo
IB:18	Amarillo, redondas y lisas	0,5-2,0	-	tallo
IB:19	Blancas, redondas y lisas	1,0-2,0	-	tallo
IB:20	Blancas, con forma de flor y rugosas	0,5-2,0	-	tallo
IB:21	Blancas, acerradas y rugosas	1,5-7,0	+	tallo
IB:22	Blanquecinas, redondas y lisas	0,5-2,0	-	tallo
IB:23	Blancas con forma de flor y rugosas	0,5-4,0	-	hoja
IB:24	Amarillas, redondas y lisas	0,5-1,0	-	hoja
IB:25	Amarillas, redonda y rugosas	1,0-4,0	-	hoja

Se tomó los siguientes criterios para la selección de bacterias y su respectiva identificación:

- Selección de las diferentes morfologías de las colonias y células bacterianas.

En la tinsión de GRAM, se pudo observar que la mayoría de los aislados bacterianos fueron Gram negativos tanto de la hoja, tallo y raíces. Únicamente fue encontrado el endofito IB 21, siendo como bacteria del grupo de las GRAM positivas, esté endofito fue aislado del tallo en plantas de caña de azúcar (Tabla 10).

4.2. Identificación de bacterias endofíticas

Aplicando los métodos de identificación molecular en el presente trabajo se encontró la presencia de 11 géneros bacterianos, tales como *Burkholderia*, *Gamma*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Xanthomonas* en plantas de caña de azúcar, semejante a los trabajos de Mendes *et al.* (2007) evaluando la diversidad de la comunidad endofítica de caña de azúcar, observó la presencia de *Burkholderia* sp., *Pantoea*., *Pseudomonas* sp y *Microbacterium* sp.: Magnani *et al.* (2010) aisló 4 géneros bacterianos de plantas de caña de azúcar: *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Las especies bacterianas, *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Herbaspirillum* sp., *Azospirillum* sp y *Gluconacetobacter* son relatados en la literatura científica como dizotróficos de plantas no leguminosas, como en el caso de la caña de azúcar (Franche *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010; Saharam y Nehra, 2011).

Las técnicas moleculares permitieron identificar 15 cepas bacterianas de diversos géneros proveniente de la raíz (IB:01 *Burkholderia* sp, IB:02 *Gamma proteobacterium*, IB:03 *Enterobacter* sp, IB:04 *Klebsiella* sp, IB:05 *Klebsiella* sp, IB:06 *Pseudomonas montei*, IB:07 *Klebsiella* sp, IB:08 *Gamma proteobacterium*, IB:09 *Chryseobacterium* sp, IB:10 *Enterobacter asburiae*, IB:11 *Pantoea agglomerans*, IB:12 *Enterobacter asburiae* IB:13 *Agrobacterium* sp, IB:14 *Enterobacter* sp y IB:15 *Pseudomonas* sp), 7 cepas del tallo (IB:16 *Pseudomonas* sp, IB:17 *Rhizobium* sp, IB:18 *Pseudomonas*, IB:19 *Burkholderia caribensis*, IB:20 *Enterobacter* sp, IB:21 *Bacillus* sp, IB:22 *Enterobacter asburiae*) y 3 cepas de la hoja (IB:23 *Enterobacter* sp, IB:24 *Xanthomonas* sp, IB:25 *Enterobacter cloacae*) (Tabla 11).

La asociación entre bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno y plantas involucra diversos mecanismos singulares, todavía poco comprendidos y desconocidos. Solamente algunos géneros bacterianos endofíticos fueron aislados y estudiados: *Herbaspirillum* sp (Oliveira *et al.*, 2003), *Erwinia* sp (Muangthong *et al.*, 2015), *Burkholderia* sp (Reis *et al.*, 2004), *Klebsiella* sp (Muangthong *et al.*, 2015), *Pantoea agglomerans* (Loiret *et al.*, 2004), *Bacillus polimixa* (Muangthong *et al.*, 2015) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Perin *et al.*, 2004).

Para la identificación se utilizó el marcador molecular del gen ribosómico 16S rARN que es considerado una técnica molecular estándar para identificación bacteriana.

Las herramientas de biología molecular han permitido conocer el acceso de estudios de la variabilidad genética microbiana, dependiente e independiente del cultivo en laboratorio, de forma a contribuir para el estudio de las interacciones de microorganismos y plantas.

Varios análisis moleculares que estudian la diversidad genética de las bacterias utilizan el gen 16S rARN, pues es importante para estudios de taxonomía molecular y para filogenia de la bacterias, las secuencias genéticas de este gen corresponden a una región bien conservada en el ribosoma bacteriano (Wartiainen *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008) estudiaron la diversidad genética de bacterias endofíticas en plantas de caña de azúcar mediante la técnica ARDRA, 16S rARN, donde fue observada una elevada diversidad genética de 98 variedades bacterianas.

Tabla 11: Resultados de la identificación molecular versus bioquímica de bacterias endofíticas con valores en porcentaje de similitudes de secuencias de ADN depositadas y comparadas en el Banco de Genes disponible en el GenBank - NCBI.

Identificación molecular (gen 16S rARN)	Órgano vegetal	% Similitud de secuencias – Gen Bank	Identificación Bioquímica – kit API-20E
IB:01 <i>Burkholderia</i> sp	raíz	96	NI
IB:02 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	97	NI
IB:03 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	97	+
IB:04 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	98	+
IB:05 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	98	+
IB:06 <i>Pseudomonas montei</i>	raíz	97	NI
IB:07 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	99	+
IB:08 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	96	NI
IB:09 <i>Chryseobacterium</i> sp	raíz	97	NI
IB:10 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	98	+
IB:11 <i>Pantoea agglomerans</i>	raíz	98	+
IB:12 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	96	+
IB:13 <i>Agrobacterium</i> sp	raíz	98	NI
IB:14 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	98	+
IB:15 <i>Pseudomonas</i> sp	raíz	98	+
IB:16 <i>Pseudomonas</i> sp	tallo	98	+
IB:17 <i>Rhizobium</i> sp	tallo	97	NI
IB:18 <i>Pseudomonas</i>	tallo	96	+
IB:19 <i>Burkholderia caribensis</i>	tallo	99	NI
IB:20 <i>Enterobacter</i> sp	tallo	97	+
IB:21 <i>Bacillus</i> sp	tallo	98	NI
IB:22 <i>Enterobacter asburiae</i>	tallo	98	+
IB:23 <i>Enterobacter</i> sp	hoja	98	NI
IB:24 <i>Xanthomonas</i> sp	hoja	98	NI
IB:25 <i>Enterobacter cloacae</i>	hoja	97	+
- <i>Escherichia coli</i>	control		+

NI = perfil no identificable

Las identificaciones moleculares de los aislados endofíticos fueron complementadas con identificaciones bioquímicas mediante la utilización de pruebas bioquímicas utilizando un kit comercial (Tabla 11), sin embargo no fue útil este método de identificación bioquímica, ya que en algunos aislados bacterianos no fue posible identificar, diversos autores indican que las pruebas bioquímicas son diseñadas solo para uso clínico en identificación de bacterias patógenas de importancia médica.

Las cepas identificadas por métodos moleculares, las secuencias de ADN fueron analizadas para filogenia bacteriana, para lo cual se analizaron las secuencias obtenidas

versus secuencias disponibles en el banco de genes GenBank y generados arboles filogeneticos.

Diversos autores recomiendan realizar en taxonomía de microorganismos realizar la identificación polifásica, que integran criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación de ADN (Stackebrandt *et al.*, 2002). Para el método molecular de identificación bacteriana, todos los aislados fueron analizados mediante la secuenciación parcial del gen ribosómico 16S rARN que consistió de tres etapas:

a) Amplificación del gen a partir de una muestra de ADN genómico de un aislado bacteriano estudiado, fueron amplificados todos los ADN de los aislados bacterianos siendo en total: 25 aislados (Figuras 4 y 5).

b) Determinación de la secuencia de nucleótidos de la ampliación gen ribosómico 16S rARN bacteriano: Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas, agrupadas y comparadas con bancos de genes.

c) Análisis de la secuencia del gen ribosómico 16S rARN bacteriano aislado.

Como punto de inicio en la identificación molecular se realizó con éxito la extracción de ADN genómico total de los aislados bacterianos, el cual genero un material genético de muy buena calidad. La cuantificación del ADN fue realizado utilizando el Quany One Nanodrop – Biorad. (Figura 4), en donde las concentraciones fueron entre 50-230 ng.

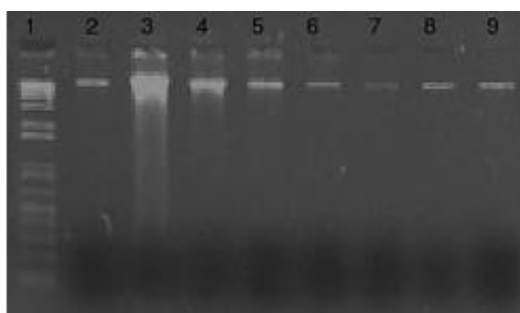


Figura 4. Perfil electroforético de la extracción de ADNs de aislados bacterianos, aplicados en un gel de agarosa 1.5% coloreado en bromuro de etidio (0,5 mg/ul), muestras: (1) Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder Gibco Molecular, del (2-9) son muestras de ADN de endófitos bacterianos. Sao Paulo – Brasil. 06/12/2016.

4.3. Amplificación del gen bacteriano 16S rARN.

El gen ribosómico 16S rARN de 25 bacterias endofíticas fue amplificado por la técnica molecular de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa). Se amplificaron fragmentos de ADN con tamaños de aproximadamente 1500 pb como se aprecia en la Figura 7, amplificado con el par de primers específicos 27F y 1525R (Stackebrandt *et al.*, 1994) (Figura 5).

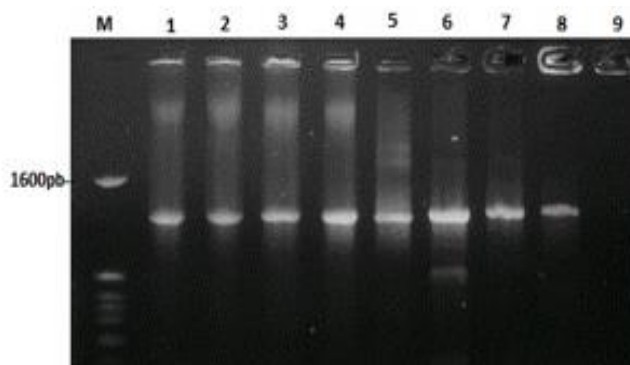


Figura 5. Amplificación del gen ribosómico 16S rARN con los primers 27F y 1525R a partir del ADN genómico total de endofitos microbianos (Stackebrandt *et al.*, 1994). Sao Paulo – Brasil. 06/12/2016.

4.4. Determinación de la secuencia de nucleótidos de la ampliación

Las secuencias obtenidas del gen 16S rARN fueron editadas y comparadas con el programa Blast (NCBI-Blast, 2017) y la Base de Datos Ribosómicas del Proyecto II (*Ribosómica*, 2017) con la finalidad de determinar la relación de identidad con secuencias ya depositadas.

Como resultado de la distribución de las secuencias de los aislados endofíticos fueron obtenidos once géneros bacterianos distribuidos en ocho grupos taxonómicos, según el orden taxonómico (Tabla 12).

Los ocho grupos taxonómicos estuvieron constituidos de los órdenes: I.- Gamaproteobacteriales, II.- Enterobacteriales, III.- Xanthomonales, IV.- Pseudomonales, V.- Rhizobiales, VI.- Burkholderiales, VII.- Bacillales y como VIII.- orden de los Flavobacteriales.

Tabla 12: Distribución taxonómica de las bacterias endofíticas aisladas de la planta *S officinarum* (caña de azúcar).

Dominio: Bacteria	
División: Proteobacteria	
Sub división: Gama-proteobacteria	
Grupo: I	
1) IB:08	<i>Gamma proteobacterium</i> 2) IB:02 <i>Gamma proteobacterium</i>
Grupo: II	Orden: Enterobacterales
Género: <i>Enterobacter</i>	
1) IB:03 <i>Enterobacter</i> sp 2) IB:10 <i>Enterobacter asburiae</i> 3) IB:14 <i>Enterobacter hormaechei</i> 4) IB:20 <i>Enterobacter</i> sp 5) IB:23 <i>Enterobacter asburiae</i> 6) IB:25 <i>Enterobacter cloacae</i> 7) IB:11 <i>Enterobacter</i> sp 8) IB:22 <i>Enterobacter asburiae</i> .	
Género: <i>Klebsiella</i>	
1) IB:04 <i>Klebsiella</i> sp	2) IB:05 <i>Klebsiella</i> sp 3) IB:07 <i>Klebsiella</i> sp
Género: <i>Pantoea</i>	
1) IB:11 <i>Pantoea agglomerans</i>	
Grupo: III	Orden: Xanthomonadales
Género: <i>Xanthomonas</i>	
1) IB:24 <i>Xanthomonas</i> sp	
Grupo: IV	Orden: Pseudomonales
Género: <i>Pseudomonas</i>	
1) IB:06 <i>Pseudomonas monteilii</i> 2) IB:15 <i>Pseudomonas</i> sp 3) IB:16 <i>Pseudomonas</i> sp 4) IB:18 <i>Pseudomonas</i> sp	
Sub división: Alfa-proteobacteria	
Grupo: V	Orden: Rhizobiales
Género: <i>Rhizobium</i>	
1) IB:17 <i>Rhizobium</i> sp	
Género: <i>Agrobacterium</i>	
1) IB:13 <i>Agrobacterium</i> sp	
Sub división: Beta-proteobacteria	
Grupo: VI	Orden: Burkholderiales
Familia: Burkholderiaceae	
Género: <i>Burkholderia</i>	
1) IB:01 <i>Burkholderia</i> sp	2) IB:19 <i>Burkholderia caribensis</i>
División: Firmicutes	
Clase: Bacilli	
Grupo: VII	Orden: Bacillales
Familia: Bacillaceae	
Género: <i>Bacillus</i>	
1) IB:21 <i>Bacillus</i> sp	
División: Bacteroidetes	
Grupo: VIII	Orden: Flavobacteriales
Familia: Flavobacteriaceae	
Género: <i>Chryseobacterium</i>	
1) IB:09 <i>Chryseobacterium</i> sp	

Secuencias de ADN bacteriano correspondiente al gen ribosómico 16S rARN, fueron amplificadas mediante la técnica de PCR y secuenciados por el método de Sanger *et al.*, 1977.

Las secuencias de ADN fueron procesadas y analizadas para la filogénea bacteriana, para lo cual se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias obtenidas versus secuencias disponibles en el banco de genes GenBank.

Los aislados bacterianos endófitos de los grupos de los órdenes I, II y III (Tabla 12) se agruparon en la sub-división de Gamma-Proteobacteria, perteneciendo a la división Proteobacterias.

En el **Grupo I** fueron identificados dos aislados bacterianos endófitos pertenecientes al género *Gamma*.

El **Grupo II** estuvo compuesto del orden Enterobacterales con enterobacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae que incluye tres géneros (*Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pantoea*) en este estudio fue obtenido en total 12 endófitos pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pantoea*.

El **Grupo III** estuvo integrado por el orden Xanthomonales con la familia Xanthomonaceae y con un aislado bacteriano del género *Xanthomonas*.

El **Grupo IV** estuvo conformado por el orden Pseudomonales compuesto de una única familia Pseudomonaceae que comprendió el género *Pseudomonas* con cuatro cepas correspondiente a este género.

Los géneros bacterianos de los **grupos V y VI** pertenecieron a la sub-división de Alfa-Proteobacterias, también perteneciente a la división Proteobacterias.

El **grupo V**, con el orden Rhizobiales, familia Rhizobiaceae estuvo representada por dos géneros: *Rhizobium*, que consto de una cepa y del género *Agrobacterium* igualmente con una cepa identificada.

Los grupos VI, VII y VIII correspondieron a la sub-división Beta-Proteobacterias (Tabla 10). El Grupo VI incluye el orden taxonómico Burkholderiales, con la familia Burkholderiaceae con dos cepas del género *Burkholderia*.

El **Grupo VII**, estuvo relacionado a la División Firmicutes que son aislados endofíticos que no pertenecen a la división Proteobacteria. Este es el caso del grupo VII con el orden Bacillales, con la familia Bacillaceae y con un aislado del género *Bacillus*.

Finalmente el grupo VIII estuvo compuesto por una cepa perteneciente a la división Bacteroidetes y agrupada en el orden Flavobacteriales, familia Flavobacteriaceae, del género *Chryseobacterium*.

En total se identificaron 11 géneros: *Gama-proteobacteria*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Chryseobacterium* (Figura 6).

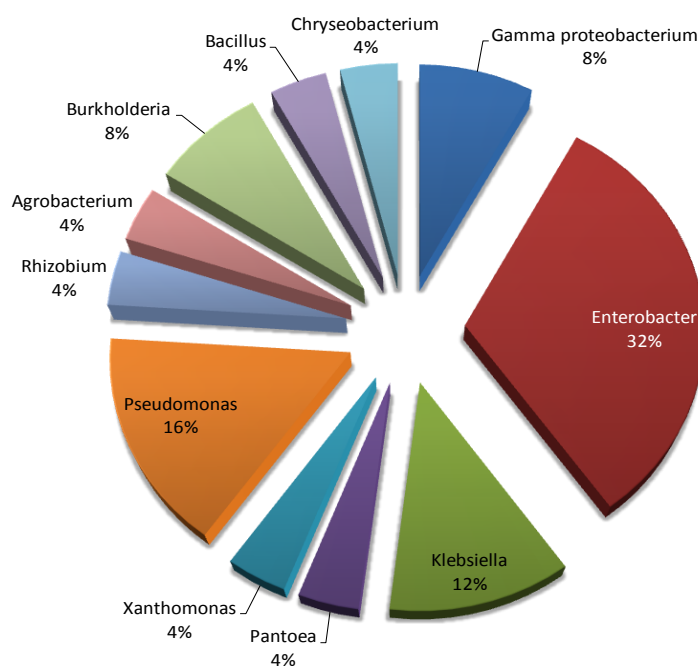


Figura 6. Resultados del porcentaje de aislados endofíticos perteneciente a cada género bacteriano obtenido durante este trabajo. São Paulo – Brasil. 02/03/2017.

Teniendo en cuenta los tres órganos vegetales, el mayor número de aislamientos bacterianos de endófitos se obtuvo en las raíces con (15 cepas), seguido por el tallo (7 cepas) y el hoja (3 aislados), en relación al número de géneros taxonómicos quien predominó en los tres órganos diferentes fue el género bacteriano *Enterobacter* con 37% seguido de *Pseudomonas* con 16% y 12% con bacterias de género *Klebsiella*. Los géneros

Gamma proteobacterium, *Burkholderia*, *Pseudomonas* fueron aislados sólo en tallo y raíz.

4.5. Análisis de secuencias de ADN y perfil bioquímico – API 20E

La determinación del perfil bioquímico de las cepas se realizó como prueba complementaria y confirmativa después de analizar las secuencias obtenidas del gen 16S rARN cuyos resultados mostraron que en algunos casos, parte de las secuencias fueron similares a las del gen 16S rARN depositados en el Gen Bank (NCBI). Por lo tanto, se decidió utilizar el sistema de identificación bioquímica API 20E (Figuras 7 y 8).

La mayoría de las cepas de la familia Enterobacteriaceae fue identificada como perteneciente al género *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pantoea*. Otros géneros fueron identificados como *Pseudomonas*. Los resultados del perfil bioquímico de entero bacterias endofíticas identificadas por el sistema API 20E (Tabla 11).

Existieron limitaciones en cuanto a la identificación bioquímica con el Sistema API-20E, por lo que fue difícil de identificar algunas cepas, siendo considerado como perfil bioquímico no identificable o interpretable como se aprecia en la Tabla 13. Un problema importante de los sistemas de prueba fenotípicos es que las bases de datos de estos kit bioquímico comerciales son limitadas.

El análisis de secuencias del 16S rADN demostró ser una herramienta de diagnóstico útil, con características de desempeño más altas que los métodos fenotípicos clásicos en este caso el uso de kit bioquímico comercial API 20E.

La secuenciación molecular del gen 16S rADN nos permitió una identificación más precisa de los aislados bacterianos seleccionados que los métodos fenotípicos desenmascarando de esta manera como muestras falsos positivos. El procedimiento de secuenciación de regiones variables del 16S ADNr utilizado en este estudio fue fácil de implementar y no implicó un costo significativamente mayor que la caracterización bioquímica.

Por lo tanto, recomendamos pruebas suplementarias utilizando secuenciación u otro método genético si se indica una identificación más precisa en bacteriología de microorganismos endófitos provenientes de plantas. En la metodología de identificación bioquímica con el Kit API-20E, Se utilizó como control positivo *Escherichia coli* (Figura 7 y 8).

Tabla 13: Perfil identificación bioquímico utilizando el kit comercial API-20E.

Endófitos bacterianos									
Perfil bioquímico	IB:01	IB:02	IB:03	IB:04	IB:05	IB:06	IB:07	IB:08	IB:10
ONPG	-	-	+	+	+	-	+	-	+
ADH	-	-	+	-	-	+	-	-	+
LDC	-	-	-	+	+	-	+	-	-
ODC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H ₂ S	+	+	-	-	-	-	-	+	-
URE	+	+	-	+	+	-	+	+	-
TDA	-	-	-	+	+	-	+	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	-	+	-	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	+	+	+	-	+	-	+
MAN	-	-	+	+	+	-	+	-	+
INO	-	-	-	+	-	-	+	-	-
SOR	-	-	+	+	+	-	+	-	+
RHA	-	-	+	+	+	-	+	-	+
SAC	-	-	+	+	+	-	+	-	+
MEL	-	-	-	+	+	-	+	-	-
AMY	-	-	+	+	+	-	+	-	+
ARA	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Identificación	Perfil no interpretable	Perfil no interpretable	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	Perfil no interpretable	<i>Klebsiella sp</i>	Perfil no interpretable	<i>Enterobacter sp</i>

El símbolo (+) indica que es una reacción positiva y el símbolo (-) indica que es una reacción negativa.

ONPG: 2-nitro-fenil-βD galactopiranosida (actividad de la β- galactosidasa).

ADH: L-arginina (actividad de la Arginina-dihidrolasa).

LDC: L-lisina (actividad de la lisina Decarboxilasa).

ODC: L-ornitina (actividad de la Ornitina Decarboxilasa).

CIT: Citrato trisódico (utilización de CITrato).

H₂S: Tiosulfato sódico (producción de H₂S).

URE: Urea (UREasa).

TDA: L-triptófano (actividad de Triptófano DesAminasa).

IND: L-triptófano (producción de INDole).

VP: Piruvato sódico - producción de acetofina.



Figura 7. Control positivo – *Escherichia coli* (ATCC 25922) – identificado con kit API – 20E. Sao Paulo – Brasil. 06 / 10 / 2016.



Figura 8. Identificación bioquímica de bacterias endofíticas analizadas con el kit comercial API 20E, perfil no identificable. Brasil 06 / 10 / 2016.

4.6. Filogenia molecular

La taxonomía bacteriana moderna permitió la construcción de una clasificación jerárquica en los niveles taxonómicos más superiores, principalmente sobre la base de los resultados obtenidos por el análisis filogenético usando secuencias de 16S rADN. Descripciones de nuevas especies son determinadas principalmente basado en los resultados de hibridación ADN-ADN, que presenta una evaluación cuantitativa de las relaciones inter e *intra*-especies. Esta serie de técnicas es denominada de Taxonomía polifásica (Vandamme *et al.*, 1996).

En este enfoque el árbol filogenéticos del gen 16S rADN es la base para la construcción y clasificación de las bacterias y la validación multidimensional es realizada estimando distintas características fenotípicas y moleculares de los organismos en cuestión. Esta metodología es considerada estándar en la sistemática bacteriana moderna (Garrity *et al.*, 2004; Stackenbrandt *et al.*, 2002).

En el presente trabajo de investigación el análisis filogenético molecular permitió facilitar la identificación de los endófitos bacterianos aislados en un 99% de probabilidad y determinar su relación con sus ancestros bacterianos o de algunas otras especies de géneros filogenéticamente y evolutivamente más próximos.

Estos análisis se hicieron a partir del secuenciación del gen 16S rARN obtenido de cepas bacterianas endofíticas aisladas de *S. officinarum* L. El análisis fue realizado mediante el programa BLASTn que mostró distintos grupos taxonómicos bacterianos. Los aislamientos fueron agrupados en 8 grupos taxonómicamente diferentes (Tabla 10).

Los alineamientos de las moléculas de ADN se realizaron entre secuencias obtenidas y comparadas con secuencias de ADN disponibles y publicados en el Banco de Secuencias (GenBank - NCBI). Estos alineamientos se realizaron para tener una mejor visualización del nivel de parentesco ancestral entre las cepas bacterianas aisladas de *S. officinarum* L.

Todos los alineamientos fueron realizados utilizando programas de bioinformática aplicados a biología y filogenia molecular como el Software (MEGA v4. 2017 y CLUSTAW) disponibles gratuitamente en internet, estos programas utilizan métodos complejos de algoritmos y formulas aplicados en filogenia y evolución molecular, los cuales produjeron alineamientos de alto grado de similitud entre las secuencias de ADN

analizadas. La Tabla 9 muestra los porcentajes de similitud de secuencias obtenidas en comparación con las secuencias de la base de datos disponible en el GenBank.

El primer árbol filogenético (Figura 9) la reconstrucción filogenética fue elaborado con las secuencias de ADN de los aislados identificados y pertenecientes a la sub división Gama-proteo bacteria (Tabla 10). Este análisis confirmó los resultados de homología de secuencias obtenidas y comparadas con secuencias disponibles y publicadas en el NCBI, se muestra el árbol con las secuencias de los aislados identificados y agrupados dentro del clado pertenecientes al grupo *Gama-proteo bacteria* como ancestros bacterianos más próximos.

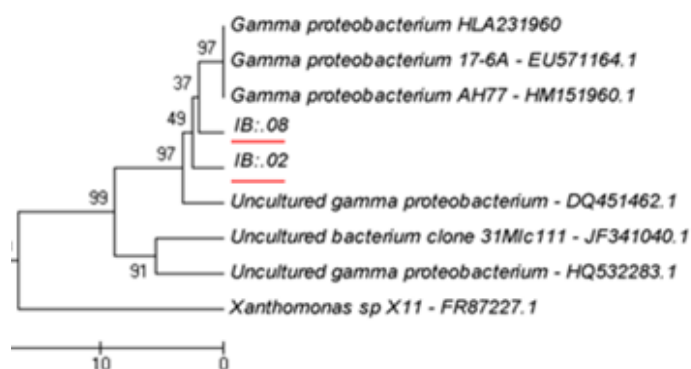


Figura 9: Árbol Filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen 16S rARN de (cepas IB:.08 y IB:.02 pertenecientes al género *Gamma proteobacterium*) comparadas con secuencias disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour-Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

El segundo árbol filogenético (Figura 10) se construyó con las secuencias de ADN del grupo del genero *Enterobacter* (Tabla 10). Los aislados fueron identificados como *Enterobacter* sp, *Enterobacter asburiae* y *Enterobacter hormaechei* (Tabla 9).

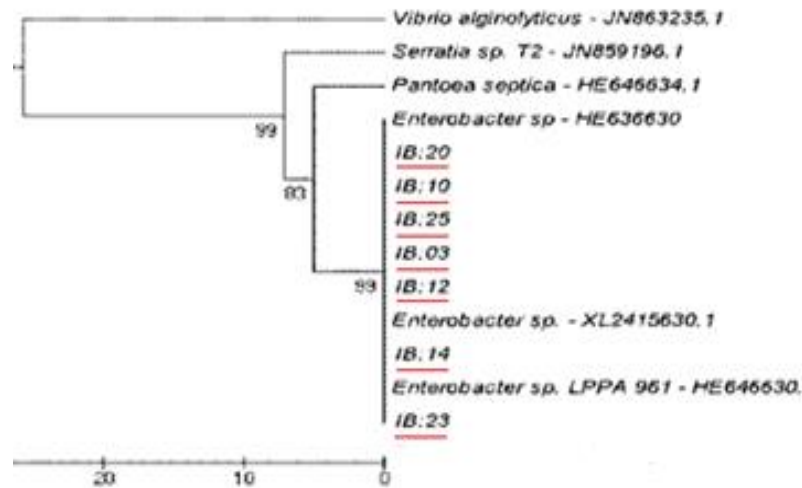


Figura 10: Árbol Filogenético construido a partir de secuencias del gen 16S rARN de (cepas IB:.10, IB:.10, IB:.25, IB:.03, IB:.12, IB:.14 y IB:.23 pertenecientes al género *Enterobacter*) comparadas con secuencias disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour-Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

El tercer árbol (Figura 11) fue producido con el género *Klebsiella* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Los Aislamientos del género *Klebsiella* fueron agrupados próximos a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*. El aislado IB-11 correspondió al género *Pantoea* (Figura 12) correspondiente al cuarto árbol filogenético.

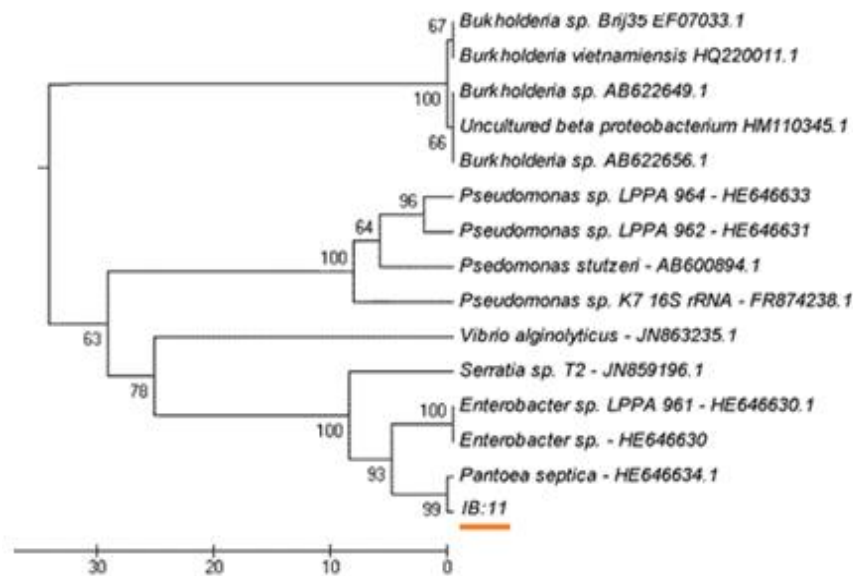


Figura 11: Árbol Filogenético construido a partir de la secuencia del gen 16S rARN de la (cepa IB:11 perteneciente al género *Pantoea*) comparada con secuencias

disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour–Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

Los aislados del género *Pseudomonas* (Tabla 9) se agruparon como *Pseudomonas* sp y *P. stutzeri* (Figura 12).

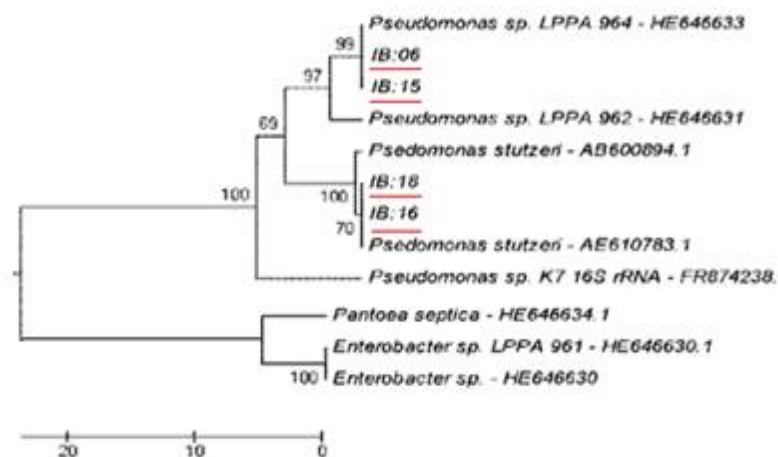


Figura 12: Árbol Filogenético construido a partir de secuencias del gen 16S rARN de las (cepas IB:06, IB:15, IB:18 y IB:16 pertenecientes al género *Pseudomonas*) comparadas con secuencias disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour–Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

El sexto árbol (Figura 13) fue producido con secuencias de los aislados identificados *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Tabla 9). El aislado IB-17 perteneciente al género *Rhizobium* fue agrupado a la especie *Rhizobium tropici* (Figura 13). Ya el aislado IB:13 del género *Agrobacterium* se agrupó con especies próximas del género *Rhizobium* siendo que en la actualidad son especies taxonómicamente bien próximas evolutivamente en plantas como hospederos.

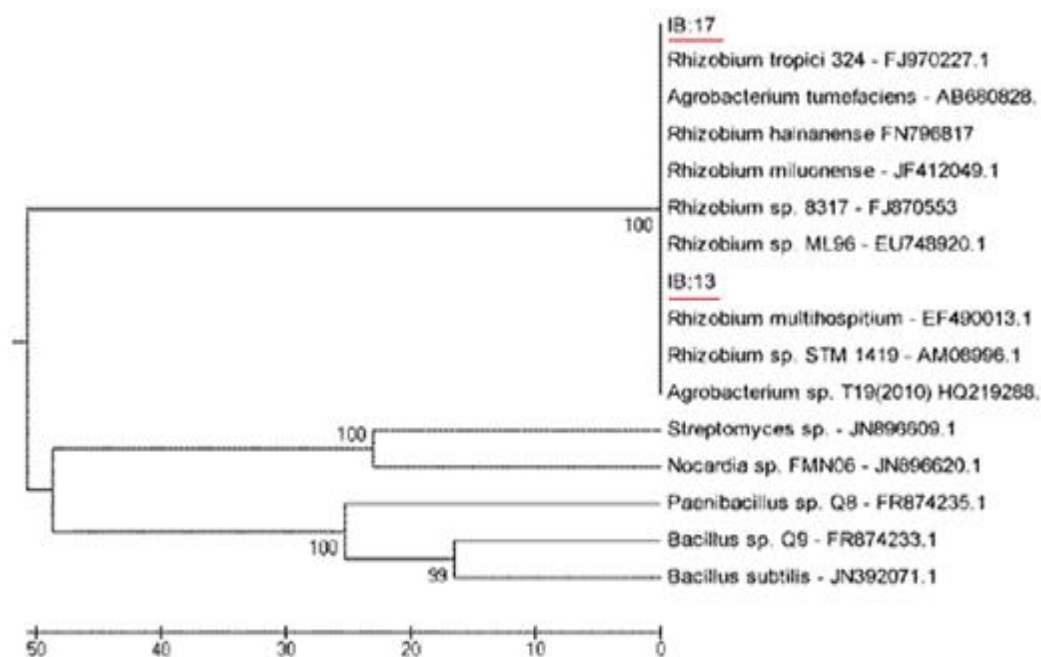


Figura 13: Árbol Filogenético construido a partir de secuencias del gen 16S rARN de las (cepas IB:13 y IB:17 pertenecientes a los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*) comparadas con secuencias disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour-Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

Los aislados IB:01 y IB:19 pertenecientes al género *Burkholderia* se aproximaron filogénicamente al género *Burkholderia* sp, son mostrados en el séptimo árbol filogenético (Figura 14).

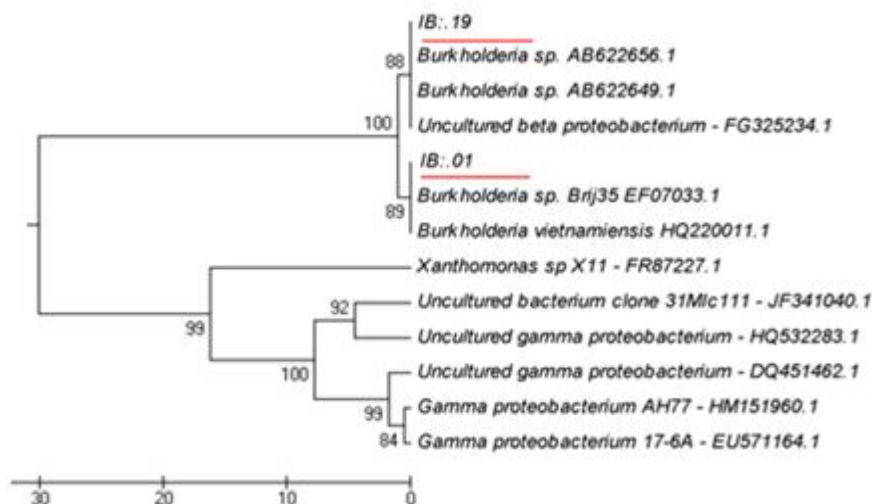


Figura 14: Árbol Filogenético construido a partir de secuencias del gen 16S rARN de (cepas IB:19 y IB:01 pertenecientes al género *Burkholderia*) comparadas con secuencias disponibles en GenBank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour-Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

El octavo y noveno árbol se estableció con los aislados de los géneros *Bacillus* y *Chryseobacterium* respectivamente (Figura 15 y 16). La cepa aislada del género *Bacillus* fue filogenéticamente próxima a la cepa del género *Bacillus* sp (Figura 15) y la cepa aislada identificada como *Chryseobacterium* fue filogenéticamente igual a la cepa del género *Chryseobacterium* sp.

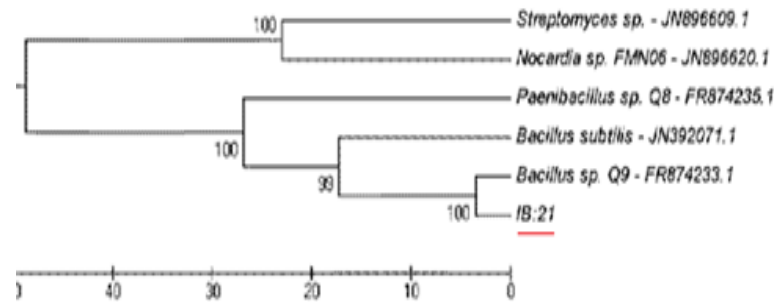


Figura 15: Árbol Filogenético construido a partir de la secuencia del gen 16S rARN de (cepa IB:09 perteneciente al género *Bacillus*) comparada con secuencias disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour–Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

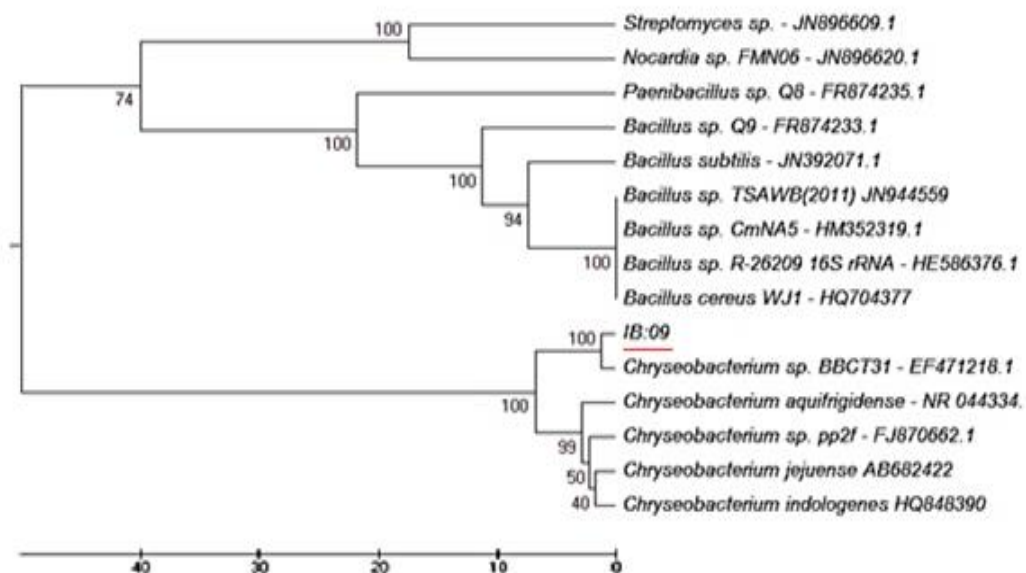


Figura 16: Árbol Filogenético construido a partir de la secuencia del gen 16S rARN (cepa IB:09) perteneciente al género *Chryseobacterium* comparada con secuencia disponibles en Gen Bank (NCBI) utilizando el método estadístico *Neighbour–Joining*. Escala de 0.05 sustituciones de nucleótidos. Valores de *Bootstrap* expresos como porcentajes de 1000 réplicas a partir de 100 %. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

4.7. Determinación cualitativa de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico

En este experimento la solubilización de fosfato inorgánico fue determinado por métodos cualitativos, en placas Petri se observó la presencia de un halo circular transparente entorno de la colonia bacteriana, fue utilizado el medio de cultivo Verma con fosfato inorgánico en placas Petri, los aislados endofíticos que solubilizaron el fosfato inorgánico fueron los géneros bacterianos correspondientes a *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus* y *Xanthomonas* (Tabla 14).

El 29,31% de los aislados bacterianos presentaron la capacidad de solubilizar el fosfato. Diversos estudios proponen en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos por diferentes especies microbianas (Khan *et al.* 2010).

Según diversos estudios, manifiestan que las bacterias con capacidad de solubilización de fosfatos destacan los géneros: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Rhodobacter* (Patiño 2010). En la Figura 17 y 18, se observa alrededor del crecimiento microbiano de los aislados una zona clara, que evidencia la solubilización de fosfatos.

Este cambio de coloración ocurrió alrededor del crecimiento de las cepas de las bacterias endofíticas, lo que se encuentra relacionado con el mecanismo molecular y enzimático a través del cual se lleva a cabo la solubilización de fosfatos, (Cuadro 14 y grafico 17). Los mecanismos bioquímicos de la solubilización de fosfatos en las bacterias serian a través de la excreción de ácidos orgánicos al medio externo (Rodríguez y Fraga, 1999).

La ocurrencia de un intercambio catiónico, permite que el fosfato insoluble se convierta a formas solubles, a partir de cual ya estaría biodisponible para las plantas. Los principales ácidos orgánicos excretados son el ácido succínico, ácido propiónico, ácido cítrico y el ácido láctico producidos por las bacterias solubilizadoras de fosfatos.

La mayoría de los aislados bacterianos en este estudio solubilizaron el fosfato inorgánico, como los obtenidos por Massenssini (2007), en sus aislados de cultivos de eucalipto. Solamente *Burkholderia*, *Xanthomonas* y *Bacillus* presentaron mejor solubilización del fosfato inorgánico (Cuadro 12).

En la figura 17, se observa la solubilización de algunos de los aislados seleccionados, las bacterias padrón fueron las que presentaron los mejores valores de solubilización, entre estos puede observar que *Bacillus cepacia* utilizado como control positivo que presento una mejor solubilización del fosfato inorgánico.

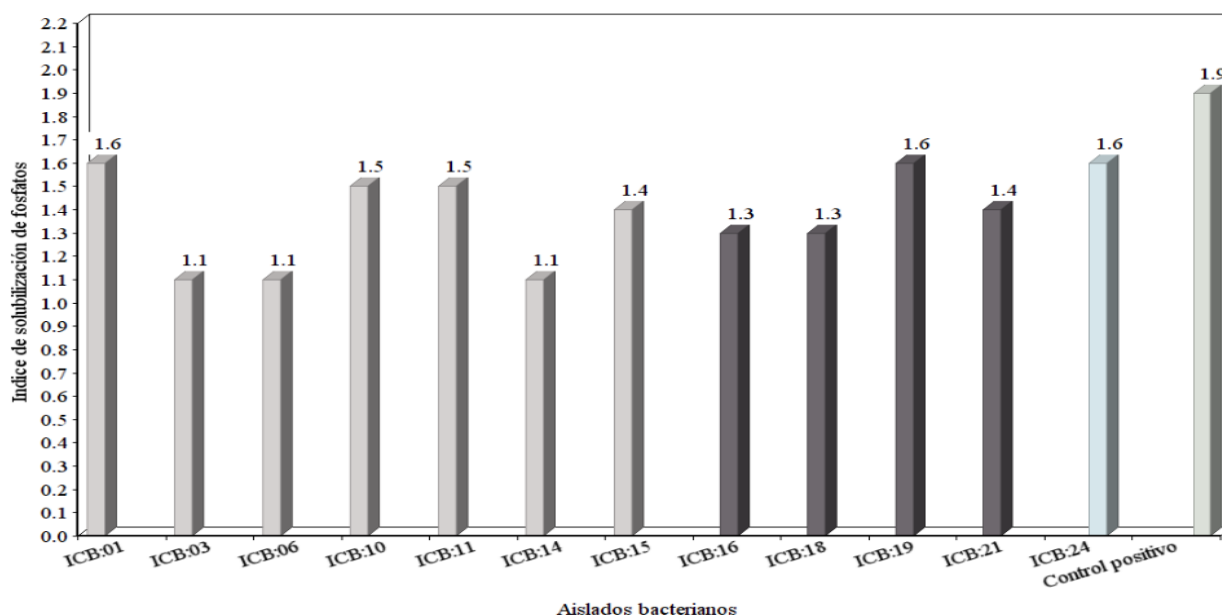


Figura 17: Evaluación de la eficiencia de la solubilización de fosfato inorgánico por los endófitos bacterianos, determinados mediante el índice de solubilización de fosfatos. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

La Tabla 14 muestra las características fisiológicas de los aislados endofíticos con probable aplicación biotecnológica, dentro de las 25 cepas probadas, 13 cepas (80,6%) mostraron ser capaces de solubilizar fosfato inorgánico (formación de un halo circular alrededor de la colonia bacteriana, (Figura 18).

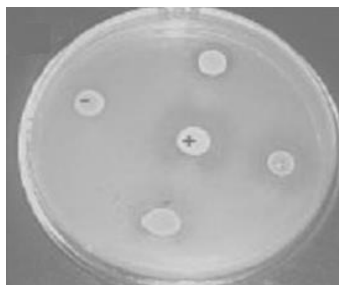


Figura 18: Resultados de la formación de halos producidos por bacterias que indica actividad positiva para producción extracelular de solubilización de fosfato inorgánico, El signo (+) es una cepa control positivo *Bacillus cepacia*. São Paulo – Brasil. 02/04/2017.

Las bacterias aisladas provenientes de la raíz fueron las que presentaron mayor capacidad de solubilización de fosfato (87,5%), seguido por las bacterias aisladas a partir del tallo (9,3%), y finalmente en menor porcentaje las bacterias provenientes del hoja (3,2%).

Al analizar los porcentajes de cepas con esta capacidad se observa que es mayor en cepas provenientes de la raíz (87,5%), probablemente debido a que estos microorganismos se encuentran en un ambiente donde la mayor cantidad de fosfatos se presentan en formas insolubles (Nausch, 2004), por lo que tendrían que haber evolucionado hacia la utilización de esta fuente de nutrientes en las condiciones en que normalmente se encuentran en el sistema suelo/raíz.

En el caso del género *Bacillus* sp, estos son microorganismos endófitos facultativos por lo que el hallazgo de microorganismos endófitos solubilizadores de fosfato, el cual es descrito en la literatura, en este caso permite predecir que pudieron estar en contacto con fuentes de fosfato insoluble del suelo en algún momento de su ciclo de vida.

Tabla 14: Resultados de la solubilización de fósforo inorgánico de bacterias endofíticas aisladas, el índice de solubilización (diámetro del halo solubilizado/diámetro de la colonia bacteriana, según Berraqueiro *et al.*, 1976).

Aislados bacterianos	Evaluación de la eficiencia solubilización de fosfato inorgánico (mm)			
	15 días			
	órgano	Φ colonia	Φ halo	IS – 15 días
IB:01 <i>Burkholderia</i> sp	raíz	1,3	1,9	1,6
IB:02 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	1,0	sh	-
IB:03 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	0,8	1,4	1,1
IB:04 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	0,9	sh	-
IB:05 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	0,9	sh	-
IB:06 <i>Pseudomonas montei</i>	raíz	1,3	1,0	1,1
IB:07 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	0,8	sh	-
IB:08 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	1,0	sh	-
IB:09 <i>Chryseobacterium</i> sp	raíz	1,4	sh	-
IB:10 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	1,0	1,5	1,5
IB:11 <i>Pantoea agglomerans</i>	raíz	1,0	1,3	1,5
IB:12 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	1,4	sh	-
IB:13 <i>Agrobacterium</i> sp	raíz	0,7	sh	-
IB:14 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	1,0	1,3	1,1
IB:15 <i>Pseudomonas</i> sp	raíz	1,3	1,6	1,4
IB:16 <i>Pseudomonas</i> sp	tallo	1,2	1,5	1,3
IB:17 <i>Rhizobium</i> sp	tallo	0,8	sh	-
IB:18 <i>Pseudomonas</i> sp	tallo	1,2	1,5	1,3
IB:19 <i>Burkholderia caribensis</i>	tallo	1,5	1,8	1,6
IB:20 <i>Enterobacter</i> sp	tallo	1,0	sh	-
IB:21 <i>Bacillus</i> sp	tallo	1,3	1,5	1,4
IB:22 <i>Enterobacter asburiae</i>	tallo	1,0	sh	-
IB:23 <i>Enterobacter</i> sp	hoja	1,0	sh	-
IB:24 <i>Xanthomonas</i> sp	hoja	1,4	1,8	1,6
IB:25 <i>Enterobacter cloacae</i>	hoja	1,3	sh	-
Control positivo <i>Bacillus cepacia</i> *		1.4	2.4	1.9

Φ colonia: diámetro de la colonia bacteriana en milímetro.

Φ halo: diámetro del halo bacteriano en milímetro.

IS: índice de solubilización de fosfatos ($IS = \Phi \text{ colonia} / \Phi \text{ halo}$).

sh: sin presencia de halo. * Control positivo – cepa *Bacillus* sp (colección del laboratorio).

4.8. Determinación de la fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) fue determinado *in vitro* a través de la prueba de reducción de acetileno para el etileno, esta técnica es considerado como un método indirecto para la detección de la fijación de nitrógeno, es una técnica económica, sensible y rápida, los aislados bacterianos fueron inoculados en medio semi-solido NFB y los datos fueron reportados mediante la generación de cromatogramas. En la (Figura 19) es mostrado el experimento, todas las cepas fueron capaces de fijar nitrógeno a excepción de las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* que fueron incapaces de fijar nitrógeno.

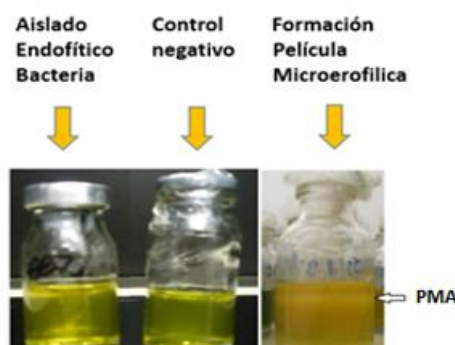


Figura. 19. Determinación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) mediante la prueba de reducción de acetileno – ARA. Crecimiento de un aislado endófito em médio de cultivo semi-solido NFB: control negativo, sin bacteria inoculada. – Formación de película micro aerofilica (FPM). São Paulo – Brasil. 02/02/2017.

La carga bacteriana de los endófitos fijadores de nitrógeno cuantificada en los órganos vegetales estudiados, fueron obtenidos en promedio valores de $195,33 \times 10^2$ NMP/g en el órgano del tallo, en la raíz fue el valor de $231,66 \times 10^2$ NMP/g y en la hoja de $233,66 \times 10^2$ NMP/g respectivamente (Tabla 15).

Referente a los coeficientes de la variación fueron mayores en la raíz (46.5%) y en el tallo (35.5%), ya en el órgano de la hoja por ser un micro hábitat con pocos nutrientes para las bacterias endofíticas, Ya los valores en los recuentos de las bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno fue de 0%, estos resultados son presentados en la (Tabla 15).

Tabla 15. Estudios de la cuantificación de la carga bacteriana endofítica fijadora de nitrógeno en los órganos vegetales de la raíz, tallo y hoja de plantas adultas de caña de azúcar.

Tipo de órgano vegetal	Carga bacteriana endofítica fijadora de nitrógeno en (NMP/g) promedio de tres repeticiones durante la colecta.			\bar{x} (%)	D.E	C.V (%)
	Setiembre	Octubre	Noviembre			
Raíz	$>229 \times 10^2$	235×10^2	231×10^2	$231,66 \times 10^2$	72,05	46,5
Tallo	$>236 \times 10^2$	220×10^2	130×10^2	$195,33 \times 10^2$	73,08	35,5
Hoja	$>234 \times 10^2$	236×10^2	231×10^2	$233,66 \times 10^2$	0,00	0,00

R = repetición, \bar{x} = promedio, D.E = desviación estándar, C.V = coeficiente de variación

Fue encontrado valores altos para la carga bacteriana diazotrofica en la raíz debido a que este órgano tiene contacto con el suelo y contiene exudados conteniendo carbohidratos que son utilizado por la bacterias epifíticas y endofíticas como nutrientes. La carga bacteriana del tallo fue encontrado en segunda posición, donde el tallo de la caña de azúcar contiene abundantes carbohidratos.

Referente a la carga bacteriana endofítica por época, en la raíz se observó que durante los tres meses de setiembre, octubre y noviembre se mantuvo estable dicha carga bacteriana (Tabla 18 – ver anexo).

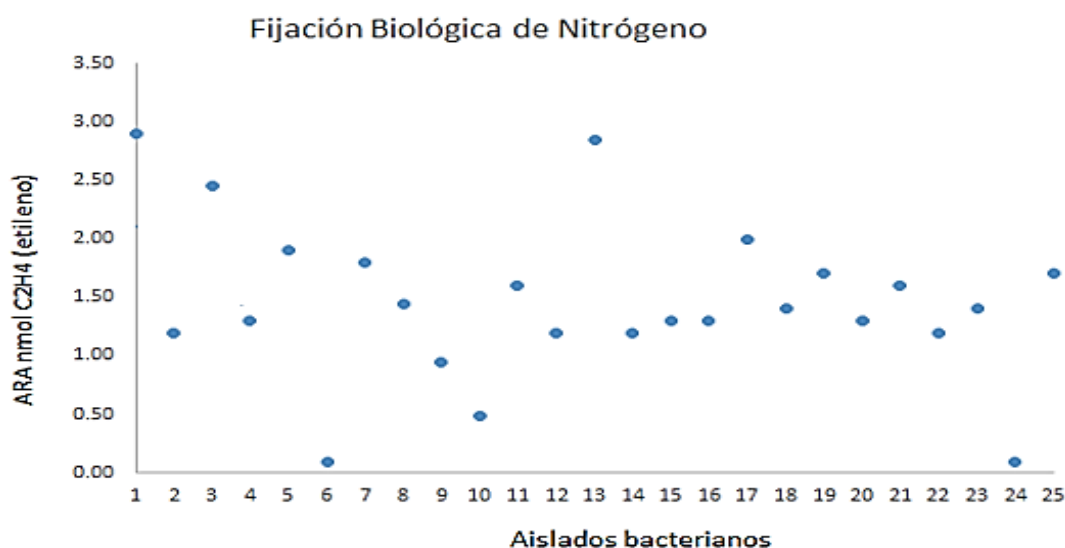
En relación al tallo fue observado un decrecimiento siendo alto en el mes de setiembre y disminuyendo en los meses de octubre y noviembre. Fue demostrado en este experimento que la carga bacteriana de bacterias fijadoras de nitrógeno endofíticas varía de acuerdo al tipo de órgano vegetal, siendo así que en la raíz se obtuvo una alta concentración y siendo este un micro hábitat ideal para las comunidades bacterianas de endófitos bacterianos.

El análisis de varianza (ANDEVA) fue realizado para determinar la significancia de la carga bacteriana, en los tres tipos de órganos vegetales de caña de azúcar (raíz, tallo y hoja) evaluados demostraron que no presentan diferencia estadística significativa ($F = 1.51$; $GL = 2$; $P = 0,2834$).

Herbaspirillum es un género de bacteria fijadora de nitrógeno, estas son capaces de colonizar los tejidos de diversas plantas de interés económico, incluido el arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) (Baldani *et al.*, 1996) y caña de

azúcar (James, 2000). Este organismo fue aislado desde el interior de las raíces, tallos y hojas (Olivares *et al.*, 1996).

Las especies que demostraron una mayor capacidad de fijación de nitrógeno fueron *Burkholderia* sp y *Agrobacterium* sp, para los cuales se obtuvieron valores máximos de 2.90 y 2.85 nmoles de etileno consumidos por hora al cabo de 72 horas de incubación (Tabla 16) y (Figura 20).



1. IB.01 <i>Burkholderia</i> sp	2. IB.02 <i>Gamma proteobacterium</i>	3. IB.03 <i>Enterobacter</i> sp	4. IB.04 <i>Klebsiella</i> sp
5. IB.05 <i>Klebsiella</i> sp	6. IB.06 <i>Pseudomonas mouteii</i>	7. IB.07 <i>Klebsiella</i> sp	8. IB.08 <i>Gamma proteobacterium</i>
9. IB.09 <i>Cryseobacterium</i> sp	10. IB.10 <i>Enterobacter asburiae</i>	11. IB.11 <i>Pantoea agglomer</i>	12. IB.12 <i>Enterobacter asburiae</i>
13. IB.13 <i>Agrobacterium</i> sp	14. IB.14 <i>Enterobacter</i> sp	15. IB.15 <i>Pseudomonas</i> sp	16. IB.16 <i>Pseudomonas</i> sp
17. IB.17 <i>Rhizobium</i> sp	18. IB.18 <i>Pseudomonas</i> sp	19. IB. <i>Burkholderia cariben</i>	20. IB. <i>Enterobacter</i> sp
21. IB.21 <i>Bacillus</i> sp	22. IB.22 <i>Enterobacter asburiae</i>	23. IB. <i>Enterobacter</i> sp	24. IB. <i>Xanthomonas</i> sp
25. IB.25 <i>Enterobacter cloacae</i>			

Figura 20. Endófitos bacterianos y la fijación biológica de nitrógeno, cuantificado por métodos de cromatografía gaseosa – nanomoles de etileno (C₂ H₄). São Paulo – Brasil. 02/06/2017.

Al igual que en el presente trabajo, otros autores han establecido que *Rhizobium* sp, *Burkholderia* sp, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp y *Pseudomonas* sp como endófitos que coloniza raíces y partes aéreas. Se sabe que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la producción de la fito hormona, ácido Indol Acético (AIA) y la fijación biológica de nitrógeno (Molina, *et al* 2006).

Tabla 16: Resultados de la fijación biológica de nitrógeno de bacterias endofíticas aisladas, incubados por 72 horas a 30°C

Aislados bacterianos	Fijación Biológica de Nitrógeno Método de reducción de acetileno en cromatografía gaseosa - ARA		
	Medio de cultivo semi-sólido NFB		
	órgano	ARA	ARA nmol C ₂ H ₄ (etileno)
IB:01 <i>Burkholderia</i> sp	raíz	+	2.90
IB:02 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	+	1.20
IB:03 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	+	2.45
IB:04 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	+	1.30
IB:05 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	+	1.90
IB:06 <i>Pseudomonas montei</i>	raíz	-	0.00
IB:07 <i>Klebsiella</i> sp	raíz	+	1.80
IB:08 <i>Gamma proteobacterium</i>	raíz	+	1.45
IB:09 <i>Chryseobacterium</i> sp	raíz	+	0.94
IB:10 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	+	0.49
IB:11 <i>Pantoea agglomerans</i>	raíz	+	1.60
IB:12 <i>Enterobacter asburiae</i>	raíz	+	1.20
IB:13 <i>Agrobacterium</i> sp	raíz	+	2.85
IB:14 <i>Enterobacter</i> sp	raíz	+	1.20
IB:15 <i>Pseudomonas</i> sp	raíz	+	1.30
IB:16 <i>Pseudomonas</i> sp	tallo	+	1.30
IB:17 <i>Rhizobium</i> sp	tallo	+	2.00
IB:18 <i>Pseudomonas</i> sp	tallo	+	1.40
IB:19 <i>Burkholderia caribensis</i>	tallo	+	1.70
IB:20 <i>Enterobacter</i> sp	tallo	+	1.30
IB:21 <i>Bacillus</i> sp	tallo	+	1.60
IB:22 <i>Enterobacter asburiae</i>	tallo	+	1.20
IB:23 <i>Enterobacter</i> sp	hoja	+	1.40
IB:24 <i>Xanthomonas</i> sp	hoja	-	0.00
IB:25 <i>Enterobacter cloacae</i>	hoja	+	1.70
Control - <i>Escherichia coli</i>*		-	0.00

+ : Significa, aislados endófitos fijadores de N₂.

* Cepa control (colección del laboratorio).

Las colonias bacterianas fueron inoculadas en placas de Petri con medio NFB e incubadas, con ayuda de la aza se inocularon de 3 a 4 colonias bacterianas en 3 frascos (tipo penicilina de 20 ml capacidad) con medio de cultivo semi-sólido NFB. Una vez inoculado, cada frasco fue lacrado con la tapa de jebe y sellado con tapa de aluminio. Seguidamente a la fase aérea del frasco se adiciono 10% de gas acetileno y luego incubado sin agitación a 30°C por 72 horas. La producción de etileno fue probada cualitativamente, inyectando 0,1 ml de la fase aérea del gas producido en un cromatógrafo a gas *Shimadzu*

GC-14A, con columna Porapak-N 80/100–INOX a 70 °C, inyector 180 °C y detector a 230 °C.

4.9. Determinación de la actividad antagónica (anti fúngicos)

De las raíces, tallos y hojas de caña de azúcar, solamente fueron observados 10 cepas bacterianas endofíticas con capacidad de inhibición del crecimiento micelial contra hongos patógenos de plantas, siendo las cepas de IB.01 *Burkholderia* sp con 75 % de inhibición contra el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, IB.02 *Gama proteobacterium* con 65 % de inhibición contra *Rhizoctonia solani*, IB.03 *Enterobacter* sp con 55 % de inhibición contra *S. sclerotiorum*, *Chryseobacterium* sp con 45 % de inhibición contra el hongo *Verticillium dahliae*, el endófito IB.10 *Pantoea agglomerans* tuvo la capacidad de inhibición para dos hongos *S. sclerotiorum* y *V. dahliae* con porcentajes de 60 y 30 respectivamente.

Igualmente IB.15 *Pseudomonas* sp inhibió dos hongos *R. solani* y *V. dahliae* con porcentajes de 45% y 55% ya el endófito IB.16 *Pseudomonas* solo inhibió un solo hongo *V. dahliae* al igual que IB.18 *Pseudomonas* sp tuvo una inhibición de 45% contra *V. dahliae*, y IB.19 *Burkholderia caribensis* inhibió el crecimiento contra el hongo *R. solani* en un 75%.

La prueba de actividad antifúngica de bacterias aisladas contra 3 especies de hongos fitopatógenos: *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *V. dahliae* los resultados son reportados en la (Tabla 17). Las pruebas de enfrentamiento dual (endófito Vs hongo patógeno) se encontró una reducida inhibición micelial en el crecimiento del hongo fitopatógeno al aproximarse al endófito bacteriano (Figura 21).

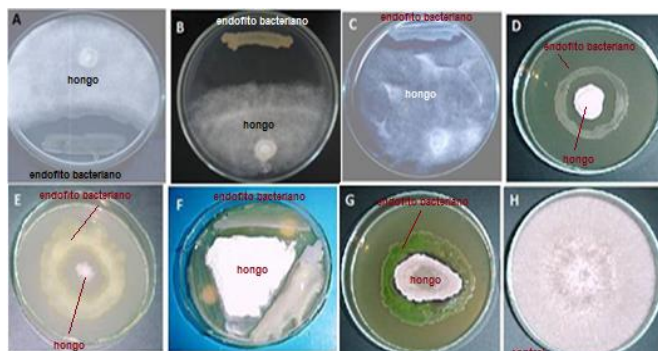


Figura 21: Resultados cualitativos de la inhibición micelial de endófitos bacterianos contra hongos fitopatógenos: **A)** *Burkholderia* sp **versus** *Sclerotinia sclerotiorum*, **B)** *Pseudomonas monteilii* **versus** *Sclerotinia sclerotiorum*, **C)** *Pantoea agglomerans* **versus** *Sclerotinia sclerotiorum*, **D)** *Pantoea agglomerans* **versus** *Verticillium dahliae*, **E)** *Pseudomonas* sp **versus** *Rhizotonia solani*, **F)** *Bacillus* sp **versus** *Verticillium dahliae*, **G)** *Burkholderia caribensis* **versus** *Rhizotonia solani* y **H)** control negativo *Escherichia coli* **versus** *Rhizotonia solani*. São Paulo – Brasil. 02/02/2017.

En esta investigación pocos aislados bacterianos fueron capaces de producir enzimas inhibidores del crecimiento contra los hongos fitopatógenos, los endófitos que inhibieron el crecimiento micelial fueron del grupo de microorganismos que pertenecen a los géneros *Burkholderia* sp, *Gamma proteobacterium*, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas monteilii*, *Cryseobacterium* sp, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp y *Burkholderia caribensis*, (Tabla 17).

Tabla 17: Resultados de la actividad antagónica cualitativo (anti fúngicos) de bacterias endofíticas aisladas de caña de azúcar contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*.

N.-	Aislados bacteriano	Órgano	% de inhibición del crecimiento micelial / hongos fitopatógenos		
			<i>Rhizotonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Verticillum dahliae</i>
IB:01	<i>Burkholderia</i> sp	raiz	-	+ (75 %)	-
IB:02	<i>Gamma proteobacterium</i>	raiz	+ (65 %)	-	-
IB:03	<i>Enterobacter</i> sp	raiz	-	+ (55 %)	-
IB:04	<i>Klebsiella</i> sp	raiz	-	-	-
IB:05	<i>Klebsiella</i> sp	raiz	-	-	-
IB:06	<i>Pseudomonas monteilii</i>	raiz	-	+ (60 %)	-
IB:07	<i>Klebsiella</i> sp	raiz	-	-	-
IB:08	<i>Gamma proteobacterium</i>	raiz	-	-	-
IB:09	<i>Chryseobacterium</i> sp	raiz	-	-	+ (45 %)
IB:10	<i>Enterobacter asburiae</i>	raiz	-	-	-
IB:11	<i>Pantoea agglomerans</i>	raiz	-	+ (60 %)	+ (30 %)
IB:12	<i>Enterobacter asburiae</i>	raiz	-	-	-
IB:13	<i>Agrobacterium</i> sp	raiz	-	-	-
IB:14	<i>Enterobacter hormaechei</i>	raiz	-	-	-
IB:15	<i>Pseudomonas</i> sp	raiz	+ (45 %)	-	+ (55 %)
IB:16	<i>Pseudomonas</i> sp	tallo	-	-	+ (50 %)
IB:17	<i>Rhizobium</i> sp	tallo	-	-	-
IB:18	<i>Pseudomonas</i> sp	tallo	-	-	+ (45 %)
IB:19	<i>Burkholderia caribensis</i>	tallo	+ (75 %)	-	-
IB:20	<i>Enterobacter</i> sp	tallo	-	-	-
IB:21	<i>Bacillus</i> sp	tallo	-	-	-
IB:22	<i>Enterobacter asburiae</i>	tallo	-	-	-
IB:23	<i>Enterobacter</i> sp	hoja	-	-	-
IB:24	<i>Xanthomonas</i> sp	hoja	-	-	-
IB:25	<i>Enterobacter cloacae</i>	hoja	-	-	-
	Control neg. <i>Escherichia coli</i> *		-	-	-

Cepa control (colección del laboratorio). (+) Son cepas que tienen la capacidad de inhibición micelial. (-) son cepas sin capacidad de inhibición micelial.

En cuanto al origen del órgano vegetal aislado respecto al endófito con capacidad de inhibición micelial y anti fúngica fueron provenientes mayormente de la raíz, seguido del tallo y ningún endófito de la hoja.

Según la literatura científica existe una cepa del complejo *Burkholderia cepacia* que produce un metabolito antifúngico altamente activo contra un amplio espectro para hongos (Quan *et al.*, 2006). Este metabolito ha traído un gran interés biotecnológico como

un producto bio-pesticida para el control biológico de hongos y otras plagas que afectan a plantas y cultivos de interés comercial.

De esta manera, el presente trabajo de investigación pretende contribuir con el conocimiento científico por medio del estudio de bacterias endofíticas de caña de azúcar y sus posibles aplicaciones biotecnológicas, como la fijación biológica de nitrógeno (FBN), solubilización de fosforo y producción de anti fúngicos, corroborando con diferentes trabajos de investigación de plantas y sus estudios referente a diferentes nichos ecológicos como la rizosfera (Franche, 2009) y endofíticas (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Baldani y Baldani, 2005), en especial en plantas de caña de azúcar (Mendes *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2011).

La diversidad de los microorganismos endofíticos que colonizan las plantas influyen en la variación de las respuestas benéficas del proceso simbiótico y no simbiótico entre bacteria/planta (Wissuma *et al.*, 2008). Fueron realizados diversos estudios en plantas de caña de azúcar para demostrar los beneficios de las bacterias Boddey *et al.*, (2003), Castro-Gonzales *et al.*, (2011), Taulé *et al.*, (2011) y Urquiaga *et al.*, (2012).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo las condiciones en que se condujo el estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El gene ribosómico 16S rARN es un buen marcador molecular el cual permitió la identificación taxonómica de los endófitos bacterianos.
2. Los endófitos bacterianos aislados de los tejidos internos de caña de azúcar fueron mayoritariamente provenientes de las raíces.
3. La solubilización de fosfato inorgánico fue mayormente en endófitos provenientes de las raíces.
4. Los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* fueron los que presentaron mejores resultados referentes a la fijación de nitrógeno y producción de antibiosis contra hongos patógenos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar, estudios complementarios al presente, que se encuentren inmersos en la ciencia de la biotecnología, con áreas afines, como la proteómica, transcriptómica y metabolómica para entender con mayor detalle las interacciones de los microorganismos con las plantas.
- Aplicar tecnologías modernas de identificación bacteriana como el secuenciamiento completo de genomas mediante la secuenciación de nueva generación.
- Fomentar el desarrollo de tecnologías para la agricultura ecológica u orgánica en el Altiplano Puneño, para generar un adecuado manejo ecológico de los cultivos andinos y de esa manera evitar el uso de agro tóxicos.
- Desarrollar nuevas tecnologías de producción de biofertilizantes para la agricultura.

VII. REFERENCIAS

- Abbott, E.V. 1953. Sugarcane and Its Diseases. *Yearbook of Agriculture*, p. 526-535.
- Araújo W., Maccheroni W., Jr. Aguilar-Vildoso C. y Barroso. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal Microbiology*. 47: 1-8.
- Arnold W., Rump A., Klipp W., Priefer, B y Pühler A. 1988. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*. v. 203:715-738.
- Baldani J. y Baldani V. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77:549-579.
- Baldani J., Pot B., Kirchhof G., Falsen E., Baldani V., Olivares F., Hoste B., Kersters K., Hartmann A., y Döbereiner J., 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plants pathogen, as *Herbaspirillum* comb. Nov.; and classification of group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46:802-810.
- Baron C. y Zambryski P. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics*, v. 29:107-129.
- Barrot G. y Nahas E. 2000. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35:2043-2050.
- Bishop E., Jarlenski D. y Hetherington R. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, v. 150:1244-1251.
- Boddey M., Moraes Sá C., Alves B. y Urquiaga S. 1997. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. *Soil Biology Biochemicals*. Vol. 29, No. 516:787-799.
- Brill W.J. 1980. Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation, *Microbiological Reviews*, Vol 44, No. 3:449-467.

Burns R.C y Hardy R. 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and higher Plants (*Molecular Biology, Biochemistry, and Biophysics*, Vol. 21). X, 189 S., 27 Abb., 21 Tab. Berlin-Heidelberg-New York 1975. Springer-Verlag. DM 59,80.

Burris, R. 1974. Biological Nitrogen Fixation, *Plant Physiological*. 54, 443-449.

Castro-González R., Martínez-Aguilar L., Ramírez-Trujillo A., Santos P.E. y Caballero-Mellado J. 2011. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant Soil*. 345:155-169.

Castillo E. y Silva R. 2004. Elimination of five viruses from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109:439-445.

Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W. y Beauchamp C.J. 1998. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62:2767-2772.

Cheneby D., Philippot L., Hartmann A., Henault C., y Germon J.C. 2000. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 34:121-128.

Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T y Lai C.C. 2006. Young Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33-41.

Cheavegatti-Gianotto A., Couto de Abreu H., Arruda P., Bessalho Filho C y Ulian E. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*. 4:62-89

Chun J. y Goodfellow M.A. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45:240-245.

Corrales R., Caycedo L., Gómez M., Ramos R. y Rodríguez T. 2016. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Revista Nova*. 15 (27):45-65.

- Cullimore J., y Bennett, M. 1992. Nitrogen assimilation in the legume root nodule: Current status of the molecular biology of the plant enzymes. *Canadian Journal Microbiology*. 38:461-466.
- Davis R., Lehman L., Petrovich R., Shah V., Roberts G. y Ludden P. 1996. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, v. 178:1445-1450.
- Dimijian, G.G. 2000. Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. Proceedings (Baylor University. Medical Center), 13 (3), 217–226.
- Estrada-de los Santos P., Bustillos-Cristales R. y Caballero-Mellado J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied Environmental Microbiology*. 67:2790–2798.
- Estupiñan R. y Quesada B. 2010. El proceso *Haber-Bosch* en la sociedad agroindustrial: peligros y alternativas. pag. 1 – 96.
- El-Banna N. y Winkelmann G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal Applied Microbiology* 85:69–78.
- Fernandez-Pascual M., Nuria M. y De Felipe M. 2002. Fijación Biológica de Nitrógeno: factores limitantes. *Revista Ciencia y Medio Ambiente*. p. 195-202.
- Franché C. Lindström K. y Elmerich, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. 321:35-59.
- Frazzon, J. 1996. Regulação e expressão dos genes *nifUSV* de *Azospirillum brasilense* Sp7. Porto Alegre: UFRGS. Tese de Doutorado, pag 83.
- Garrity G., Bell J. y Lilburn T. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Release 5.0 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ª. Ed. New York: Springer pag. 1 – 399.
- Gasser I., Cardinale M., Müller H., Heller S., Eberl L., Lindenkamp N., Kaddor C. y Steinbüchel A. 2011. Berg, G. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant Soil*. 347:125-136.

Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P., Willems A., Vancanneyt M., Swings J. y De Vos P. 2006. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 361:1911–1916.

Gyaneshwar P., James E.K., Reddy P. y Ladha, J. 2002a. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*, v. 154:131.

Gyaneshwar P., James E.K., Mathan N., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B., y Ladha J. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 183:2634-2645.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. y Kloepper J. 1997. Bacterial endophytes in agriculture crops. *Canadian Journal of Microbiology* v. 43:895-914.

Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., y Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60:579-598.

He Z., Bian W. y Zhu J. 2002. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Comm. Soil Science. Plant Anal.* 33:647-663.

Hurek T., Reinhold-Hurek B., y Van Montagu M. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, v. 176:1913-1923.

Idriss, E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T. y Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148:2097-2109.

Jacobson M., Marty R., Jaecobson V., Cash M., Weiss N., Laird W. y Dean. 1989. Biochemical and genetic analysis of the nit1JSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Gen Genetic*. 219:49-57.

James E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v. 65:197-209.

James E.K. y Olivares F.L. 1997. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17:77-119.

James G. 2004. Sugarcane, Second Edition by Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company Edited - ISBN 0-632-05476-X. pag. 224.

Joerger R. y Bishop P. 1988. Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. p. 1-14

Katiyar V. y Goel R. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological Research*, v. 158:163-168.

Kim J. y Rees D.C. 1994. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*, New York, v. 33:389-397.

Kloepper J.W., Mahaffee W., Mcinroy J.A., y Backman P.A. 1991. Comparative analysis of methods for recovering plant growth-promoting rhizobacteria from cotton roots, *Canadian Journal of Microbiology*, v. 37:953-957.

Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. y Zablutowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*. 7:39-43.

Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D. y Kozyroska N. 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissue. *Plant and Soil*, v. 215:1-6.

Kuklinsky-Sobral J., Araújo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.A., y Azevedo J. L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 6:1244-1251.

Kumar S, Tamura K. y Jakobsen I.B, 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*;17:1244-5.

Kumar V., y Narula N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiological Research*, v. 156:87-93.

Kuss A.V., Kuss V.V., Lovato T. y Flôres L.M. 2007. Nitrogen fixation and in vitro production of indol acetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira Journal*, 42: 1459-1465.

Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., y Pace N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82:6955-6959.

Leifert C., Li H., Chidburee S., Hampson S., Workman S., Sigee D., Epton H. y Harbour A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. *Annual Review of Microbiology*. 78:97-108.

Li J.H., Wang E.T., Chen W.F., y Chen W. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:238-246.

Loiret, F. 2004. Putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97:504-11.

Magnani G.S., Didonet C.M., Cruz L.M., Picheth C.F., Pedrosa F.O., y Souza E.M. 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research*. 9:250-258.

Mallet J., y Willmott, K. 2003. "Taxonomy: Renaissance or Tower of Babel?" Trends Ecology Evolution. 18 (2): pp. 57-59.

Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araujo W.L., y Raaijmakers J.M. 2007. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:7259-7267.

Molina L., y Medina M. 2006. El efecto de la interacción *Frankia* - micorrizas - micronutrientes en el establecimiento de árboles Aliso (*Alnus acuminata*) en sistemas silvopastoriles, Revista Colombiana Ciencia Pecuaria v. 19:1:39 – 41.

Muangthong A., Youpensuk S y Rerkasem B. 2015. Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*, 26(1) 41-51.

- Nahas E. 2002. Microorganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Revista Brasileira de Solos e Irrigação*. v. 61, n. 3:267-275.
- Nausch M y Nausch G. 2004. Bacterial utilization of phosphorus pools after nitrogen and carbon amendment and its relation to alkaline phosphatase activity. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 37: 237–245.
- Nautiyal C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170:65-270.
- Nejad P. y Johnson P.A. 2000. Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and Wilt Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. *Revista Biological Control*, v 18:208–215.
- Odufa V.S.A. 1978. Root exudation in cowpea and sorghum and the effect on spore germination and growth of some soil fusaria. *New Phytology*. 80: 607-612.
- Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., y Döbereiner J. 1996. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves predominantly of Graminea, *Biology and Fertility of Soils*, v. 21:197-200.
- Oliveira A.L.M., Urquiaga S., y Baldani J.I. 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal. Local: *Embrapa Agrobiologia*. Documentos, 161. p.40.
- Oliveira A.L.M., de Canuto E.L., Urquiaga S., Reis V.M. y Baldani J.I. (2006) Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil* 284:23–32.
- Parreño H. 2012. Establecimiento in vitro de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) - variedad CP 72-2086. P- Tesis. pag. 1 – 22.
- Patiño C.O. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis Doctorado en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 133 p.

Peoples M.B., y Craswell E.T. 1992. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, v. 141:13-39.

Perin L., Baldani J.I., y Reis V. 2004. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de caña-de-açúcar cultivadas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39:763-770.

Poly F., Monrozier L.J., y Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Microbiological Research*, v. 152:95–103.

Potera, C. 1994. From bacteria: a new weapon against fungal infection. *Science*, v. 265, p. 605.

Qu L., Michot B., y Bachellerie J. P. 1983. Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid “heterologous” sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5’ terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. *Nucleic Acids Research*, v. 11:5903-5919.

Quan C.S., Zheng W., Liu Q., Ohta Y., y Fan S.D. 2006. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72:1276-1284.

Reinhold-Hurek., y Hurek. 1998a. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17:29-54.

Reis V.M., Estrada-De Los Santos. y Caballero-Mellado. J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54:2155- 2162.

Rengel Z. y Marschner P. 2005. Nutrient availability in the rizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.

Rivas R.A 2002. New species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68:5217–5222.

Robson R.L., Woodley P.R., Pau R.N. y Eady R.R. 1986. Second gene (nifH) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, *The EMBO Journal*, v. 5, p. 1159-1163.

McInroy, J. A. y Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 173,337-342.

Mendes R., Pizzirani-Kleiner A., Araujo W. y Raaijmakers J. 2007. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7259–7267.

Rodríguez H. y Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.

Sánchez S., Bills G.F. y Zabalgoceazcoa I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27: 171-195.

Sambrook J., y Russel D.W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3 rd ed., New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pag. 352.

Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M. y Smith M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174DNA. *Nature* 265:687-695.

Sawada H., Kwykendall L.D., y Young J.M. 2003. Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 49:155-179.

Sylvester-Bradley R., Asakawa N., Oliveira L.A y Pereira R.M. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica* 12(1): 15-22.

Smith R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application, *Canadian Journal of Microbiology*, v. 38:485-492.

Stackebrandt E., y Goebel B.M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44:846-849.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A. y Nesme W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52:1043– 1047.

Sylvester-Bradley R., Askawa N., Latorraca S., Magalhães F., Oliveira L. y Pereira R. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*. 12: 12-22.

Taulé C., Hackembruch F., Reis V., Sicardi M., y Battistoni F. 2011. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*. 347:1-400.

Teixeira, K. R. 1997. Bases moleculares e genética da fixação biológica de nitrogênio. *Embrapa-CNPAB. Documentos*, v. 32, p.26.

Theodor Rudorff and Mauricio Alves Moreira. 2014. Satélite de olho na produção de cana-de-açúcar. Canal Ciência, p.1. <http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0260-Sensoriamento-remoto-da-producao-de-cana-de-acucar.html>, en 09/10/2017.

Turner G.I. y Gibson A.H. 1980. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, *Fergersen* v 25:111-138.

Urquiaga R.P.X., y Boddey R.M. 2011. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*. 346-400.

Van Berkum P. y Fuhrmann J.F 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:2165-2172.

Vandamme P., Pot B., Gills M., Devos P., Kersters K., y Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, v. 60:407-437.

Verma S.C., Ladha J.K., y Tripathi K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice, *Journal of Biotechnology*, v. 91:127-141.

Vicentini Kuss Annelise, 2006. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Tesis de la Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul - Brasil, p. 65.

Vitousek P.M., Duncan N.L., Menge S. y Cory C. 2013. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Journal of Philosophical Transactions of The Royal Society*. p. 1-9.

Wartiainen I., Eriksson T., Zheng W. y Rasmussen, U. 2008. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*. 39:65-75.

Wayne L.G., y Trüper H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 37:463-464.

Wissuma M., Ismail A.M. y Graham R.D. 2008. Rice grain zinc concentrations as affected by genotype native soil –zinc availability, and zinc fertilization, *Plant and Soil*. 306:37-48.

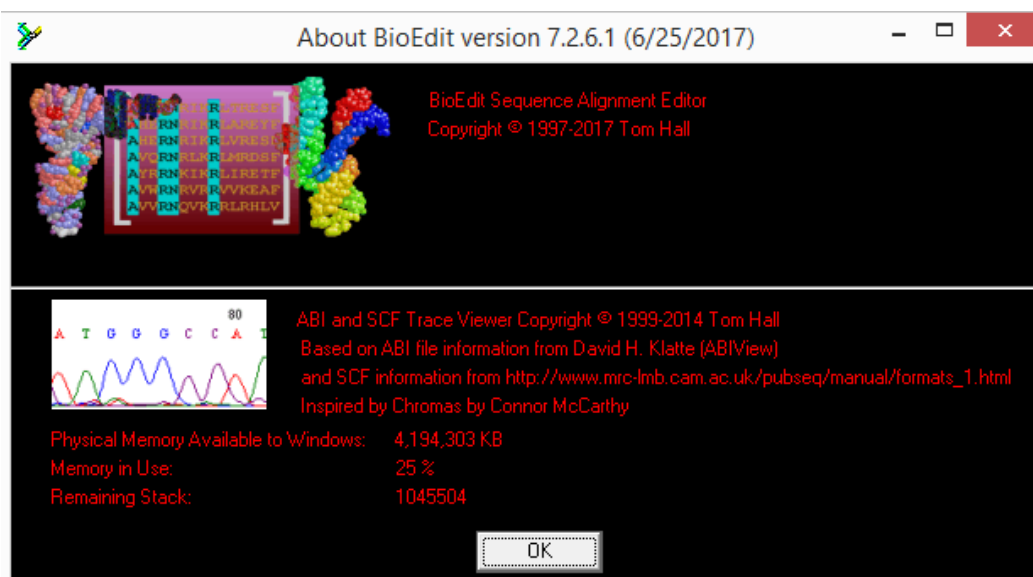
Woese C. R. 1987. Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, v. 2:221-271.

Wolters J. y Edmann V. 1989. The structure and evolution of archaebacterial ribosomal RNAs. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 35:43-51.

Young C. 1990. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soils, *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 36:225-231.

ANEXO

a)



b)

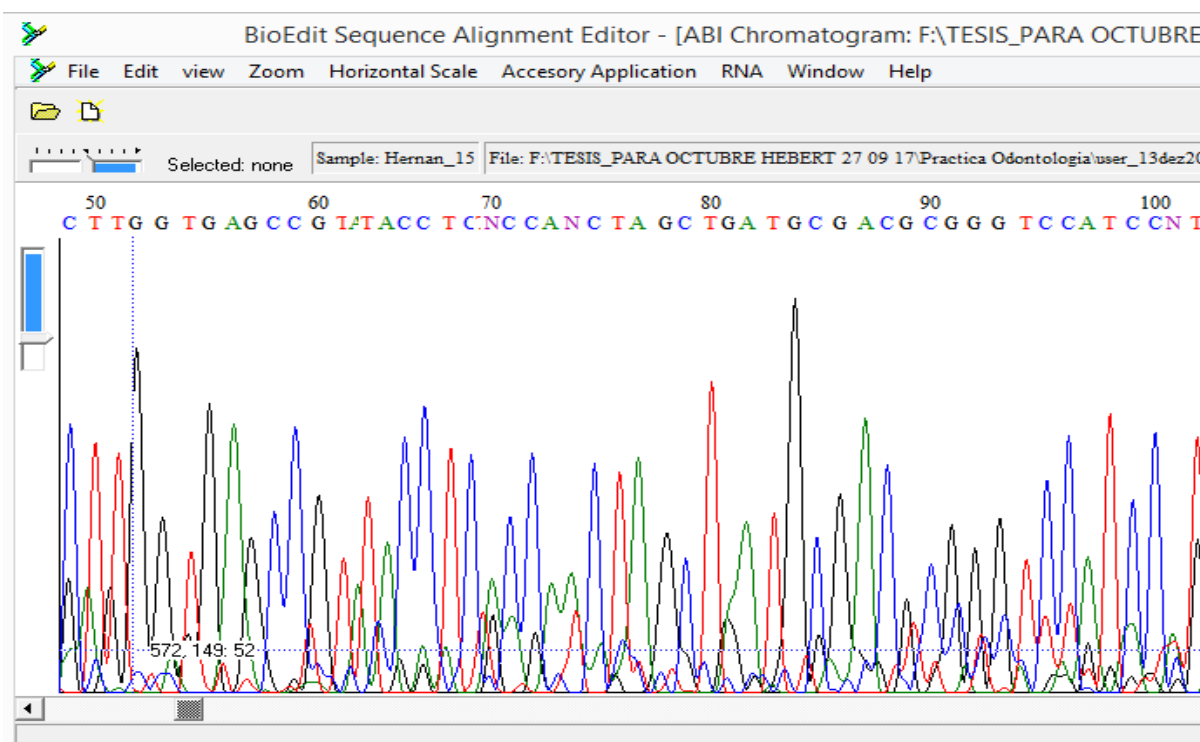
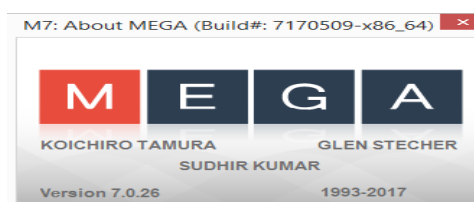
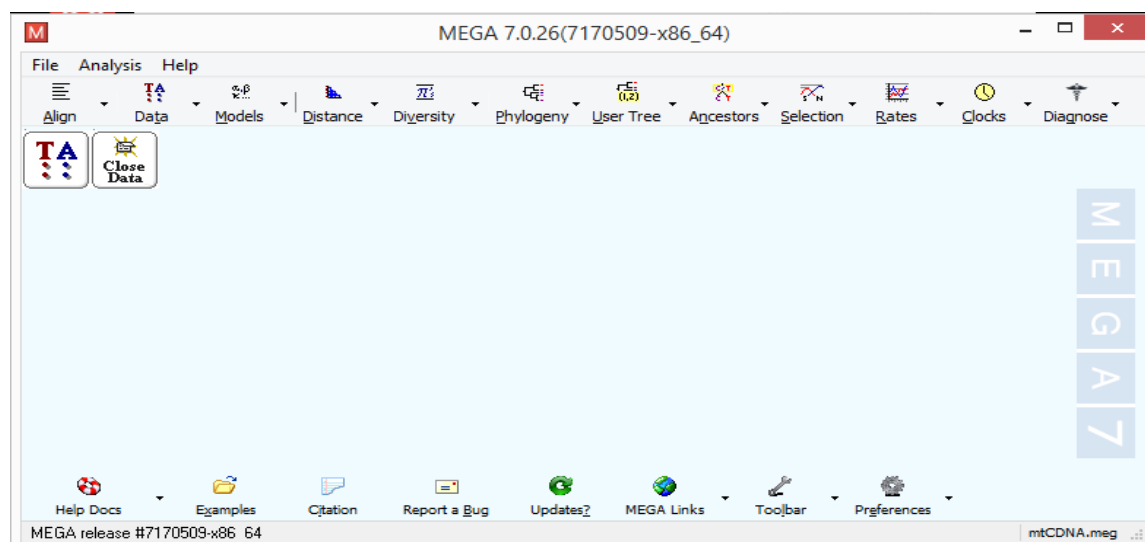


Figura 22. a). Software gratuito utilizado para el análisis de las secuencias de ADN – BioEdit 2017. **b)** Cromatogramas del respectivo secuenciamiento de ADN. São Paulo – Brasil. 02/03/2017.



a)



b)

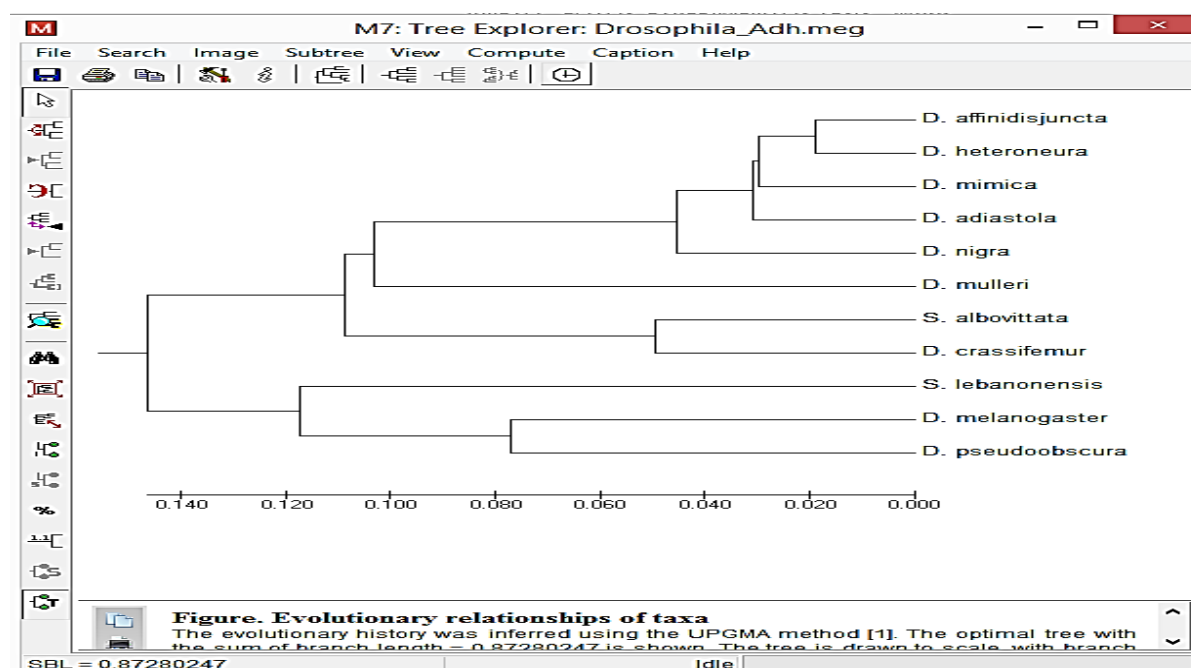
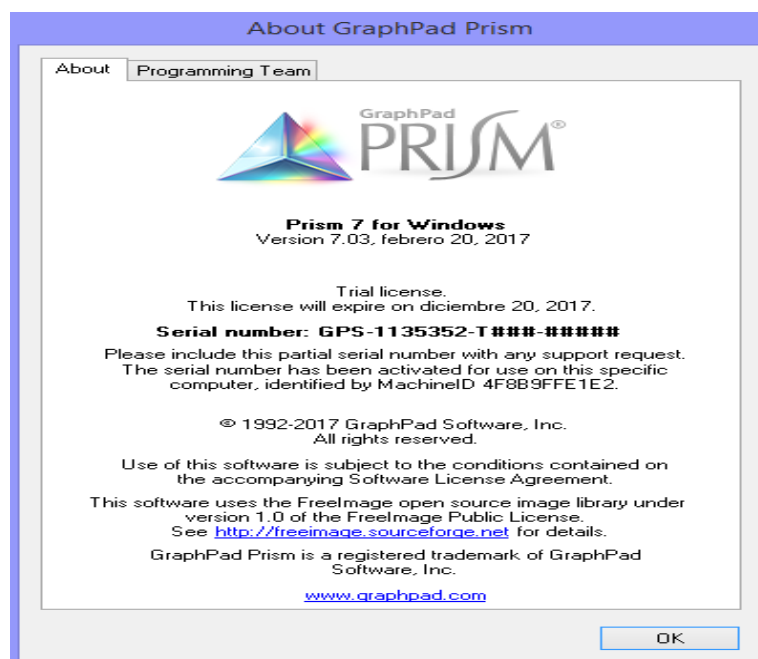


Figura 23. a) Software gratuito utilizado para el análisis filogenético de los endófitos microbianos MEGA 2017. V. 7.0. b) Generación de un árbol filogenético con método UPGMA con dicho programa. São Paulo – Brasil. 02/03/2017.

a)



b)

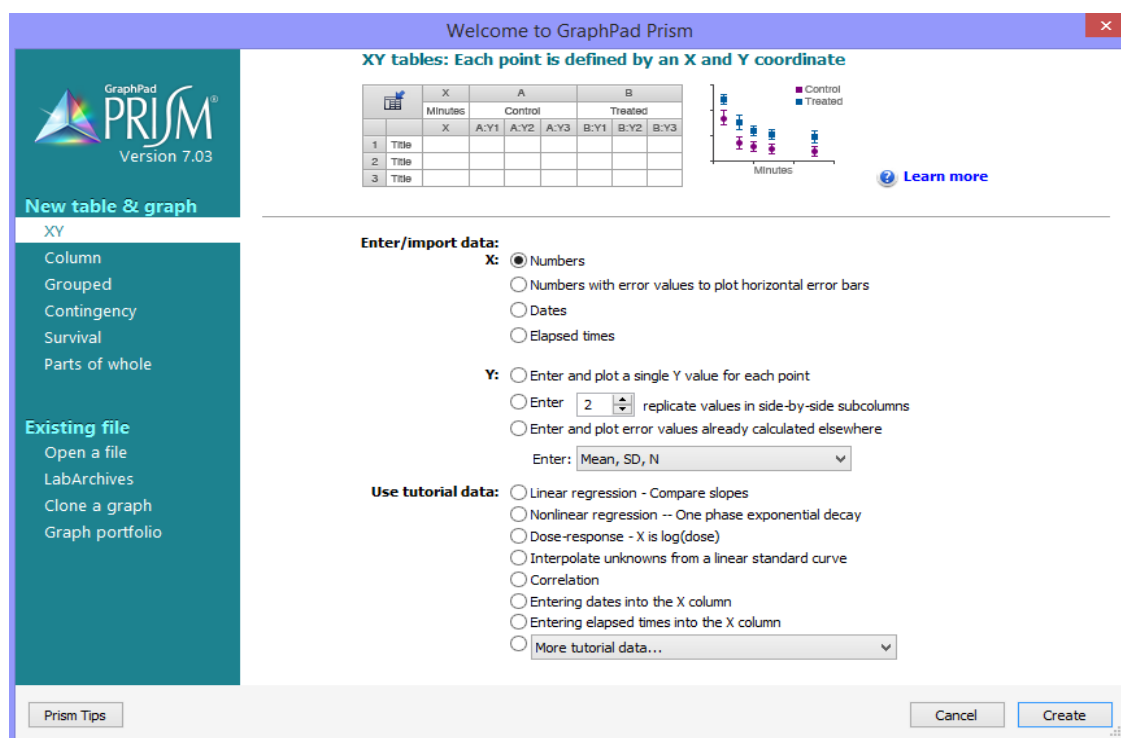


Figura 24. a) Software gratuito (con licencia determinada por 90 días) utilizado para el análisis estadístico – GraphPad Prism v. 7.03. 2017. b) Aplicación del paquete estadístico. São Paulo – Brasil. 02/06/2017.

Tabla 18. Cuantificación de endófitos bacterianos diazotrofos provenientes de tres órganos vegetales (raíz, tallo y hoja) de caña de azúcar, utilizando el método del *Número Más Probable* (MMP).

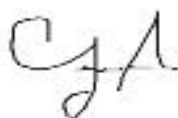
	Número Mas Probable (NMP) de endófitos								
	Raíz			Tallo			Hoja		
Set	15,5x10 ²	14,0x10 ²	12,0x10 ²	11,5x10 ²	10,0x10 ²	11,5x10 ²	5,0x10 ³	6,5x10 ²	7,5x10 ²
	12,0x10 ³	15,0x10 ²	11,2x10 ³	10,2x10 ²	11,0x10 ²	12,2x10 ²	9,5x10 ³	8,5x10 ³	8,5x10 ²
	14,5x10 ²	11,5x10 ²	10,5x10 ³	13,5x10 ³	11,2x10 ⁴	10,2x10 ⁴	7,6x10 ³	8,7x10 ³	7,5x10 ³
	11,0x10 ²	11,5x10 ³	11,2x10 ³	11,2x10 ²	11,0x10 ³	10,5x10 ³	9,1x10 ²	8,5x10 ²	4,5x10 ²
	14,5x10 ³	15,0x10 ³	15,5x10 ²	10,5x10 ⁵	13,3x10 ²	11,2x10 ²	8,7x10 ²	7,0x10 ²	6,0x10 ³
	11,0x10 ²	12,5x10 ²	12,0x10 ²	10,2x10 ³	10,0x10 ²	10,2x10 ²	8,5x10 ³	7,5x10 ³	7,5x10 ³
Oct	13,5x10 ³	13,0x10 ²	11,5x10 ²	11,2x10 ²	11,2x10 ³	9,05x10 ²	6,2x10 ²	6,0x10 ³	6,5x10 ²
	12,5x10 ⁵	12,5x10 ²	14,0x10 ³	12,3x10 ²	13,2x10 ²	10,0x10 ³	6,0x10 ³	7,0x10 ²	7,0x10 ³
	13,5x10 ²	14,5x10 ²	13,5x10 ⁵	16,2x10 ³	12,0x10 ³	11,5x10 ²	7,1x10 ²	6,5x10 ²	6,2x10 ²
	13,0x10 ³	11,5x10 ³	15,0x10 ²	11,2x10 ²	12,2x10 ²	10,0x10 ²	7,6x10 ²	7,3x10 ²	5,8x10 ³
	12,2x10 ²	16,0x10 ²	11,0x10 ²	11,2x10 ³	11,0x10 ³	11,5x10 ³	6,2x10 ³	6,7x10 ³	5,0x10 ²
	14,0x10 ²	12,0x10 ²	13,5x10 ³	13,0x10 ³	15,0x10 ²	11,0x10 ²	3,7x10 ³	6,8x10 ²	6,0x10 ³
Nov	11,0x10 ²	10,5x10 ²	11,0x10 ²	15,0x10 ²	13,2x10 ²	12,0x10 ³	3,0x10 ³	4,5x10 ²	7,5x10 ²
	13,2x10 ³	11,0x10 ²	12,1x10 ³	12,3x10 ²	12,5x10 ²	10,0x10 ³	6,2x10 ²	4,5x10 ²	7,0x10 ²
	12,7x10 ²	12,5x10 ²	11,0x10 ²	17,2x10 ²	12,7x10 ²	13,0x10 ²	3,4x10 ²	8,7x10 ³	7,5x10 ³
	12,0x10 ³	11,0x10 ³	11,2x10 ²	12,0x10 ²	12,2x10 ²	11,0x10 ²	5,2x10 ²	4,5x10 ³	4,0x10 ²
	12,5x10 ³	14,0x10 ²	12,0x10 ²	14,2x10 ²	12,0x10 ²	10,5x10 ²	2,6x10 ²	5,0x10 ²	5,0x10 ²
	13,4x10 ²	12,5x10 ²	11,7x10 ²	11,2x10 ²	11,0x10 ³	10,5x10 ²	6,4x10 ⁴	2,5x10 ²	4,5x10 ²



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Sr. **Hebert Hernan Soto Gonzales**, realizou o desenvolvimento de sua tese de pre-graduação. Intitulado "*Caracterização molecular de bactérias endofíticas diazotróficas de plantas de Saccharum sp, (caña de açúcar) de Riberão Preto - Brasil*". Feito nos laboratórios do Departamento de Microbiologia da USP e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

São Paulo, 21 dezembro de 2017.



Dr. Jorge González Aguilera
Pesquisador - USP / Embrapa

Universidade de São Paulo. São Paulo - Av. Prof. Lineu Prestes, nº 2435 - CEP 05408-900 - Telefone. +55 11 3091 8362 - Butantã - SP.
<http://lattes.cnpq.br/8562342815666974>