



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Diversidad y caracterización de bacterias endófitas de raíz
de zarzamora (*Rubus fruticosus*)

TESIS

que presenta

Ingeniero en Biotecnología **Miguel Contreras Pérez**

Como requisito para obtener el grado de

Maestro en ciencias en Biología Experimental

Asesor:

Doctor en Ciencias **Gustavo Santoyo Pizano**

Co-asesor:

Doctor en Ciencias **Rodolfo Farías Rodríguez**

Morelia, Michoacán Febrero 2015

Índice

I. Resumen.....	i
II. Abstract.....	ii
1. Introducción.....	1
1.1 La rizósfera.....	1
1.2 Interacciones planta-microorganismo.....	2
1.3 Bacterias endófitas.....	4
1.4 Compuestos producidos por bacterias endófitas.....	7
1.5 Identificación de bacterias endófitas.....	9
1.6 Análisis filogenético y de diversidad de especies.....	11
2. Antecedentes.....	15
2.1 La zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	20
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1 General.....	25
5.2 Particulares.....	25
6. Estrategia experimental general.....	26
7. Materiales y métodos.....	27
7.1 Recolección de plantas de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	27
7.2 Corte y desinfección superficial.....	27
7.3 Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y obtención de aislados (Banco de endófitas).....	28

7.4	Extracción de ADN genómico y amplificación del gen 16S rDNA.....	29
7.5	Secuenciación y análisis filogenético.....	31
7.6	Análisis de la producción de índoles.....	32
7.7	Análisis de la producción de proteasas.....	32
7.8	Análisis de la producción de sideróforos.....	33
7.9	Análisis del antagonismo contra <i>Botrytis cinerea</i>	33
8.	Resultados.....	34
8.1	Secuenciación del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos endófitos.....	34
8.2	Análisis tipo BLAST de las secuencias 16S ribosomales.....	35
8.3	Análisis filogenético de bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	36
8.4	Análisis del posible papel ecológico de las especies encontradas.....	42
8.5	Índices de diversidad de las bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	44
8.6	Búsqueda de actividades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal.....	45
8.6.1	Producción de índoles.....	45
8.6.2	Producción de proteasas.....	47
8.6.3	Producción de sideróforos.....	49
8.6.4	Antagonismo contra <i>Botrytis cinerea</i>	51
9.	Discusión.....	53
10.	Resumen de resultados.....	59
11.	Conclusión.....	60

12.	Perspectivas.....	61
13.	Bibliografía.....	62
14.	Coautorías.....	67

Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar la diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*) mediante el análisis del gen ribosomal 16S, así como detectar actividades promotoras del crecimiento vegetal y antagonicas contra *B. cinerea*. Para ello, se realizó el aislamiento de las bacterias endófitas cultivables de la raíz de zarzamora, colectadas en el municipio de Los Reyes Michoacán. Se seleccionaron 116 aislados, de los cuales se realizó la extracción del DNA genómico y posteriormente la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S de 102 aislados, con un tamaño promedio de 1,200 pb. De acuerdo a las búsquedas de homología tipo Blast y posterior análisis filogenético, se identificaron 40 especies distribuidas en 5 clases, Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gamaproteobacterias, Bacilli y Actinobacterias. Interesantemente, 14 especies no encontramos un reporte previo como bacterias endófitas, por ejemplo *Herbaspirillum huttiense*, *Dyella japónica*, entre otras. Los índices de Shannon (3.34) y Simpson (0.95) sugieren una alta diversidad en nuestra comunidad. Finalmente, se encontró que 41 cepas producen índoles totales, 23 contienen actividad proteasa, 27 producen sideróforos y 4 presentaron antagonismo en contra de *Botrytis cinerea*, un hongo fitopatógeno de los cultivos de zarzamora entre otros.

Palabras clave: Bacterias endófitas, 16S, análisis filogenético, diversidad

Abstract

The aim of this study was to identify the diversity of endophytic bacteria associated with roots of *Rubus fruticosus* by analysis of 16S ribosomal gene, as well as detecting plant growth-promoting and antagonistic activities against *B. cinerea*. We isolated endophytic bacteria from *Rubus fruticosus* roots, collected in the municipality of Los Reyes Michoacan. We isolated 116 bacterial endophytes, obtaining their genomic DNA to subsequently amplify by PCR their 16S ribosomal gene from 102 isolates, getting an average size of 1,200 bp. According to the Blast homology searches and subsequent phylogenetic analysis, 40 species were identified, distributed in 5 classes, Alfabroteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli and Actinobacteria. Interestingly, 14 species did not have, to our best knowledge, a previous report as endophytic bacteria, such *Herbaspirillum huttiense*, *Dyella japonica*, among others. Shannon (3.34) and Simpson (0.95) indexes suggest a high diversity in the bacterial endophytic community. Finally, 41 strains were found to produce total indoles, 23 contained protease activity, 27 produced siderophores and 4 showed antagonism against *Botrytis cinerea*, a phytopathogenic fungus of *R. fruticosus* plants.

Key words: Endophytic bacteria, 16S, phylogenetic analysis, diversity

1. Introducción

1.1 La rizósfera

La rizósfera se define como la porción de suelo que se encuentra influenciado por los exudados de la raíz de las plantas. El término rizósfera fue introducido originalmente por Lorenz y Hiltner hace más de cien años (1904). Es aquí en este microambiente donde interaccionan los microorganismos del suelo con las plantas, ya que esta es la zona donde son liberados los exudados radiculares, los cuales son utilizados por los microorganismos como nutrientes que les permiten proliferar (Hirsch *et al.* 2012; Hiltner L. 1904; Smalla *et al.*,2006; Hartmann *et al.* 2008).

Pero no sólo los microorganismos se ven beneficiados por los exudados que excretan las raíces de las plantas, sino que las plantas también reciben de forma recíproca ciertos beneficios, tales como inducción de sus sistemas de toma de nutrientes, inducción de su sistema de defensa contra fitopatógenos, estimulación del crecimiento a través de la síntesis de fitohormonas, protección contra fitopatógenos, entre otros que se mencionarán más adelante. Por otra parte algunos microorganismos patógenos también podrían proliferar y causar enfermedades vegetales, mientras que algunos otros no exhiben ningún tipo de efecto en la planta. Como se puede ver, en la rizósfera es donde se pueden llevar a cabo múltiples interacciones planta-microorganismo.

1.2 Interacciones planta-microorganismo

Como mencionamos anteriormente, las plantas establecen múltiples interacciones con diferentes con una gran diversidad de microorganismos durante las diferentes etapas de su desarrollo. A pesar de la gran importancia que las comunidades microbianas rizosféricas tienen para las plantas, dichas poblaciones son difíciles de estudiar por ser extremadamente complejas. De hecho, se sabe que existen más de 300,000 especies vegetales en el mundo, las cuales pueden interactuar con las comunidades de microbianas de su rizósfera, lo que supone también que podrían existir el mismo número de interacciones específicas. Algo importante de destacar es que la gran mayoría de estas comunidades microbianas permanecen sin ser caracterizadas. De hecho, se creó que solo el 7% de las comunidades se han identificado; sin embargo, se puede predecir que muchos de estos microorganismos sin identificar interactúan con las plantas de forma benéfica o negativa, lo que hace necesario su estudio y mejor conocimiento.

Las investigaciones dirigidas a estas comunidades complejas han sido obstaculizadas por el hecho de que el 99% de estos microorganismos no son cultivables. Por lo tanto, este gran porcentaje por descubrir sugiere un gran interés ecológico, así como un gran potencial para diversas aplicaciones en la industria agrícola, la medicina, entre otras (Mora C. 2011).

Las interacciones planta-microorganismo pueden categorizar en benéficas, neutras o perjudiciales (Figura 1) (Welbaum *et al.* 2004; Raaijmakers *et al.* 2008). Aunque el efecto de la mayoría de los microorganismos parece ser neutral o tener una mínima

influencia sobre la planta, puede ser que estos microorganismos usen los exudados radiculares (aminoácidos, fotosintátos, etcétera) como fuente de energía, y de esta forma jugar un papel clave en el uso de los nutrientes que deriva en la modificación del entorno de la planta. Como comentamos anteriormente, los microorganismos benéficos promueven el crecimiento vegetal y/o suprimen enfermedades a través de una gran variedad de mecanismos, entre los que destacan el mejoramiento de la adquisición de nutrientes, producción de reguladores del crecimiento y la síntesis de compuestos inhibidores de patógenos como pueden ser, de importancia económica, los microorganismos fitopatógenos hongos, oomicetes, bacterias y virus que pueden causar enfermedades en las plantas. El resultado de todas estas interacciones se ve además influenciado por el estrés abiótico, factores como la sequía, temperatura, salinidad, acides del suelo y anegamiento (Berg G. 2009).

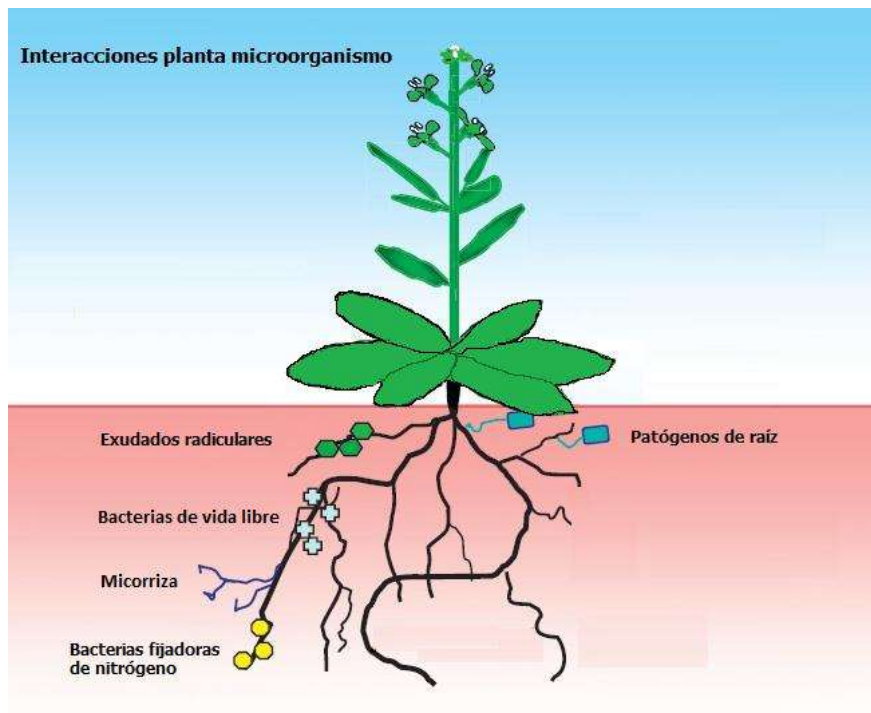


Figura 1. Interacciones planta-microorganismo

1.3 Bacterias endófitas

De la totalidad de microorganismos que interactúan con la planta en la rizósfera, es de interés las bacterias que tienen la capacidad de colonizar los tejidos internos de las plantas que son conocidas como bacterias endófitas (Figura 2).

Las bacterias endófitas se pueden definir como aquellas que logran permanecer dentro de los tejidos vegetales sin causar daño aparente (Kado *et al.* 1992). Y se puede decir que si es complejo estudiar las bacterias que habitan la rizósfera, las cuales son más accesibles y posiblemente con mejores capacidades de vivir de forma libre, se ha sugerido que las bacterias endófitas son aún más difíciles de cultivar, y por lo tanto, de estudiar en laboratorio, ya que se han estudiado desde hace décadas, sin embargo, aún falta mucho por dilucidar. Existe mucha información sobre bacterias endófitas, pero no se saben los mecanismos específicos mediante los cuales llevan a cabo sus funciones al interior de los tejidos, ya que al ser una zona donde no existe tanta competencia como en la rizósfera no se sabe con exactitud cómo es que se lleven a cabo las interacciones en estos microambientes. Así mismo, existen bacterias que pueden ser endófitas obligadas, mientras que otras pueden o no serlo, teniendo la capacidad de ser saprófitas. En la Figura 2 se pueden observar diferentes tipos de bacterias endófitas y como es que estas pueden encontrarse en diferentes microambientes y que dependiendo de sus capacidades de colonización se pueden encontrar mayor cantidad de representantes de una especie que de otra. Como se puede observar en la Figura 2, las bacterias representadas de color amarillo que son capaces de colonizar suelo no rizosférico, la rizósfera, ingresar a los tejidos internos para colonizar córtex y

posteriormente xilema. Mientras que existen algunas que (representantes en color azul y rojo) se pueden encontrar asociadas o no en la rizósfera, teniendo posibilidades de habitar diversas rizósferas de plantas.

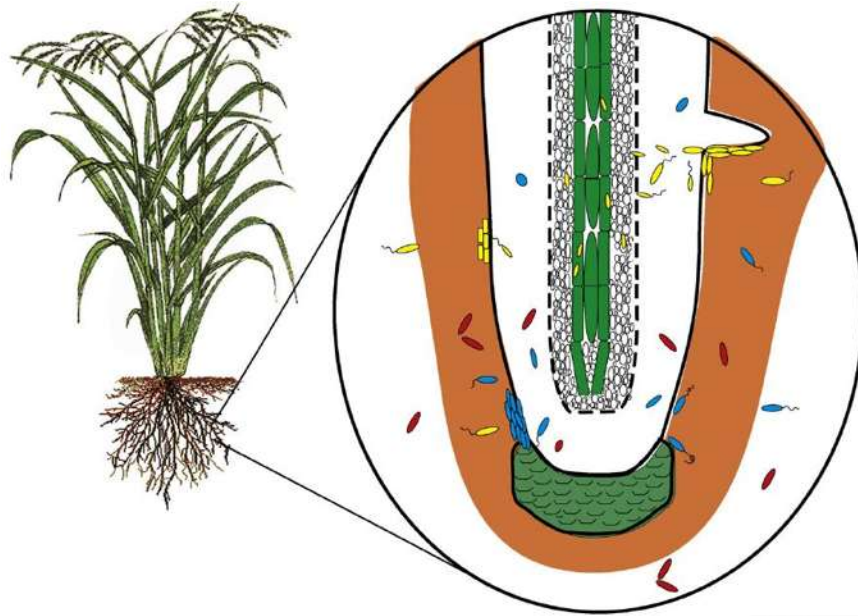


Figura 2. Bacterias endófitas colonizando la raíz de arroz.

Las bacterias endófitas (“endo” dentro y “fito” planta), como se mencionó, tienen la capacidad de habitar los tejidos internos de la planta durante al menos algún periodo de su ciclo de vida y son aisladas de tejidos desinfectados superficialmente (Perotti R. 1926; Hallman *et al.* 1997; Wilson D. 1995). De acuerdo a su estilo de vida pueden ser clasificadas como endófitas “facultativas” u “obligadas”, siendo las endófitas obligadas las que dependen estrictamente de su huésped para sobrevivir y crecer, su transmisión a otras plantas se da principalmente por vectores (Araujo

W. L. 2002); las bacterias endófitas facultativas presentan un ciclo de vida bifásico, alternando entre las plantas y el ambiente (principalmente suelo), de hecho, se cree que la diversidad de bacterias endófitas puede ser explicada debido a la habilidad que presentan diversas bacterias endófitas de colonizar los tejidos internos de las plantas y permanecer ahí (Perotti R. 1926; Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

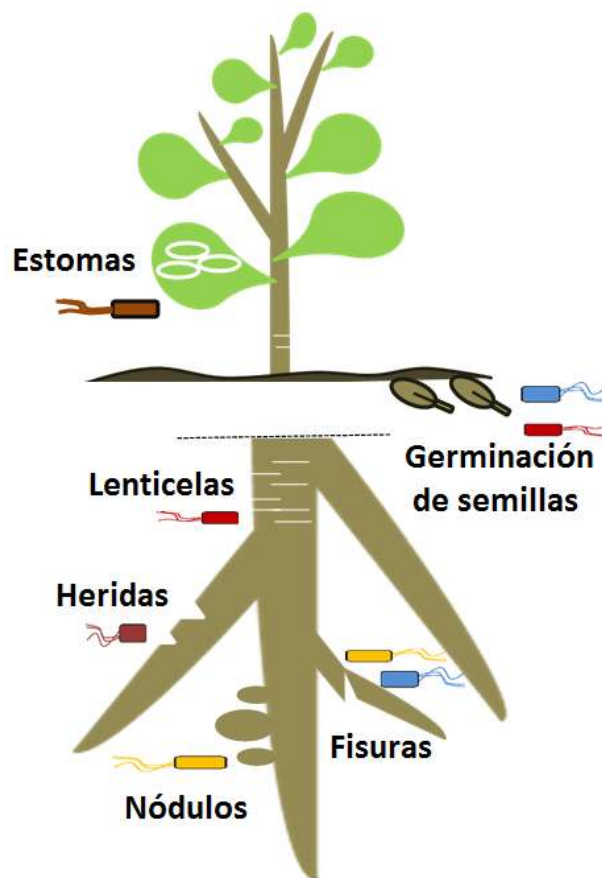


Figura 3. Zonas de colonización de bacterias endófitas

Las bacterias endófitas tienen la habilidad de colonizar los tejidos internos de las plantas (Hardoim *et al.* 2008; Reinhold-Hurek & Hurek 2008) y establecer relaciones especiales donde ambos salen beneficiados de esta interacción (Hallman J. 1997; Reiter & Sessitch 2006), estos endófitos por lo general provienen del suelo rizosférico y colonizan las raíces por las grietas formadas en las zonas de emergencia de raíces laterales y posteriormente dispersándose en los espacios intercelulares en la raíz (Chi F. 2005). Existen además otras zonas por la que pueden colonizar los tejidos de las plantas como pueden ser heridas causadas por otros microorganismos, lenticelas y estomas (Figura 3) (McCully M. E. 2001), se creó que la principal zona por la que ingresan los endófitos o “hot spots” son las fisuras en la raíz (Sorensen & Sessitch 2006) por lo que se dice que las endófitas que infectan a las plantas desde el suelo, deben ser competentes colonizadoras de la raíz. También se han aislado endófitos de semillas, siendo otra manera en que se pueden propagar y también puede ser debido a esto que se creó que todos los cultivos tienen al menos una especie endófitas asociada (Posada & Vega 2005).

1.4 Compuestos producidos por bacterias endófitas.

Las bacterias tienen la capacidad de producir compuestos que les confieren la habilidad de influir en el desarrollo y supervivencia de otros organismos. Existen reportes donde se sabe que las bacterias son una rica fuente de productos biológicamente activos, más de 20,000 (Demain & Sanchez 2009), y las bacterias endófitas no deben ser la excepción ya que debido a la gran variedad de nichos y

ambientes que pueden habitar, deben producir un gran número de compuestos aún sin explotar. El analizar las capacidades que tiene cada cepa de producir estos compuestos nos sirve para ir armando el posible rol ecológico que puedan presentar las bacterias endófitas (Figura 4). Algunos de los compuestos que más comúnmente se analizan son la producción de reguladores de crecimiento vegetal como las auxinas, citicininas y giberelinas; 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa para reducir los niveles de etileno inducido por estrés. Algunas especies bacterianas pueden llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno; solubilización de fosfatos; además las bacterias endófitas también protegen a la planta de patógenos mediante la inducción de la resistencia sistémica, producción de compuestos antagónicos y la competir por nutrientes que les permite ocupar nichos y ser mejores colonizadoras (Reinhold-Hurek & Hurek 2011; Weyens *et al.* 2009; Kobayashi & Palumbo 2000).

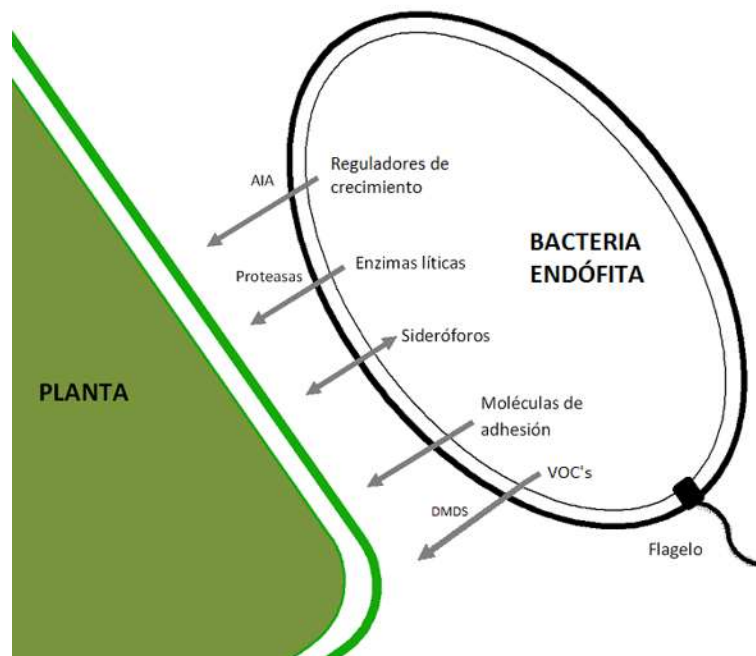


Figura 4. Compuestos bacterianos que influyen en el desarrollo vegetal.

1.5 Identificación de bacterias endófitas

Anteriormente era ampliamente asumido que los tejidos internos de las plantas sanas (principalmente la estela) se creía que eran estériles y que las bacterias que se aislaban del interior de los tejidos eran contaminación misma de la manipulación de los tejidos. Sin embargo, esta percepción se modificó con el desarrollo de las técnicas de microscopía con lo que se ha demostrado ampliamente la presencia de las bacterias endófitas distribuidas en la estela de plantas sanas, habitando tanto los espacios intercelulares (Figura 5) como los intracelulares (Figura 6) (Compant *et al.* 2010), se han reportado mecanismos activos y pasivos con los que las bacterias endófitas pueden realizar su translocación en los tejidos internos de las plantas pasando del rizoplasma al córtex para posteriormente colonizar los tejidos vasculares (xilema y floema) y tratar de alcanzar los tejidos aéreos (Gregory P. J. 2006); para garantizar que se trabaja con “verdaderos endófitos” se dice que se requiere de observarlos en los tejidos ya sea por hibridación o por algún marcador fluorescente, ya que si bien, se encuentra ampliamente recomendada y usada la desinfección superficial de los tejidos mediante lavados seriados de alcohol e hipoclorito de sodio (Sturz *et al.* 2000; Miche & Balandreau 2001; McInroy & Kloepper 1995) y teniendo un control negativo sembrando el último lavado de los tejidos para poder asegurar que no existen bacterias en el exterior de los mismos, se ha manejado además que la colonización de los tejidos internos se ve afectada por los lipopolisacáridos, flagelo y motilidad por tirones (Duijff *et al.* 1997; Dörr *et al.* 1998; Böhm *et al.* 2007) que pueden presentar o no las bacterias endófitas, por lo

que tiene sentido esperar variaciones en la densidad poblacional de bacterias que se encuentren de un cultivo a otro e incluso de una planta a otra de un mismo cultivo.

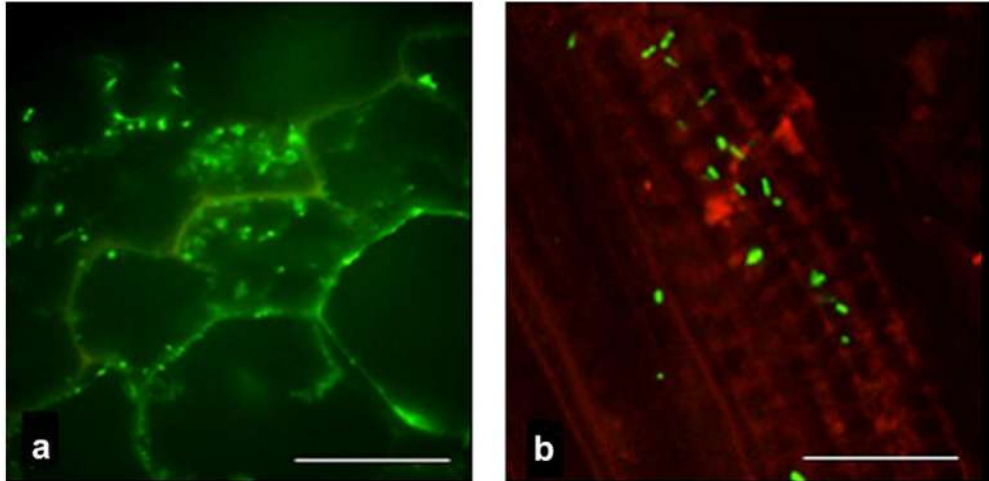


Figura 5. Colonización de la endoriza por *Burkholderia phytofirmans* Sin mediante hibridación *in situ* en el córtex (a) o una etiqueta *gfp* en el xilema

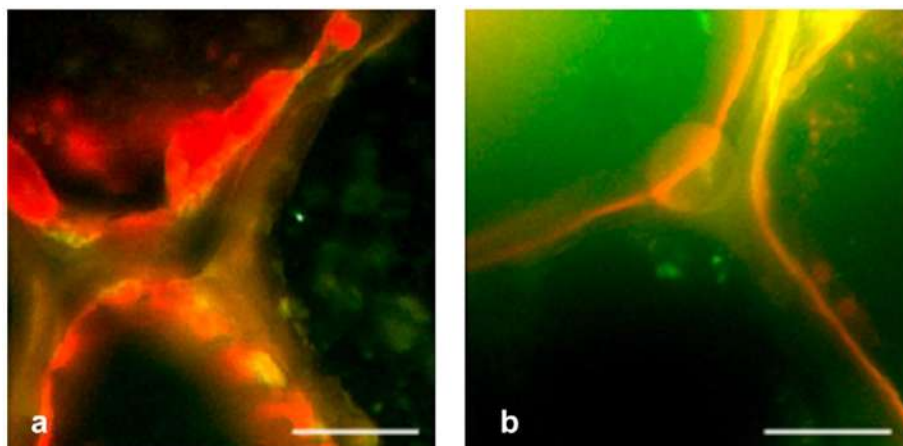


Figura 6. Hibridación *in situ* de bacterias endófitas intracelulares en frutos de uva

Es importante mencionar que las plantas pueden ser colonizadas por varios endófitos al mismo tiempo y no solo por una sola especie (Suryanarayanan & Thennarasan 2004; Khan & Doty 2009; Taghavi *et al.* 2009), por lo tanto las densidades poblacionales pueden variar dependiendo de las especies bacterianas y del genotipo de la planta huésped, su etapa de desarrollo así como las condiciones medioambientales (Pillay & Nowak 1997; Tan *et al.* 2003). La colonización de espacios intercelulares no es algo que no suceda, ya que estos son ambientes ricos en minerales, tales como potasio, calcio, azufre, fósforo, cloro así como diversos azúcares (Madore & Webb 1981), aminoácidos y ácidos orgánicos (Canny & McCully 1988; Canny & Huang 1993). Las bacterias endófitas pueden modificar el pH modificando la actividad enzimática y la asimilación de azúcar de las células huésped al igual que las concentraciones de azúcar inorgánica para los microorganismos colonizadores (Bacon & Hinton 2007), por lo tanto, este ambiente es apropiado para el desarrollo de las bacterias endófitas y para permitir el intercambio de compuestos entre las bacterias endófitas y la planta.

1.6 Análisis filogenético y de diversidad de especies

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre las relaciones evolutivas del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” (Darwing C. 1859) entre especies ancestrales y descendientes.

Para la construcción de árboles filogenéticos se deben seguir ciertos pasos principales (Weisburg *et al.* 1991):

Elección de los marcadores moleculares. Se pueden utilizar secuencias de nucleótidos o proteínas, aunque es recomendable el usar secuencias de nucleótidos, que evolucionan más rápidamente que las proteínas, lo que es útil cuando se estudian organismos estrechamente relacionados.

Construir alineamientos de las secuencias. Este es posiblemente el paso más crítico ya que el resultado de los alineamientos será la base de los arboles filogenéticos.

Elección de un modelo de evolución. Sirve para determinar la divergencia entre 2 secuencias, los más comunes son los modelos Jukes-Cantor (asume que todos los nucleótidos se substituyen con igual probabilidad) y el modelo Kimura (es más realista ya que considera diferentes tasas de mutación para las transiciones y las transversiones lo cual provee mejores estimaciones de la distancia evolutiva).

Determinación de un método de construcción de árboles. Existen diversos métodos para la construcción de los árboles filogenéticos como lo son los métodos basados en distancias (se pueden subdividir en métodos basados en agrupamientos (calculan el árbol usando una matriz de distancias e iniciando por los pares de secuencias más similares); el método de pares no ponderados utilizando media aritmética UPGMA y Neighbor-Joining son ejemplos de este algoritmo) y métodos basados en optimalidad (comparan muchas topologías alternativas de árboles y seleccionan el que tenga el mejor ajuste entre las distancias estimadas en el árbol y las distancias evolutivas reales; Fitch-Margoliash y Evolución Mínima son

ejemplos de estos algoritmos)) y métodos basados en caracteres (están basados directamente en el análisis de los caracteres que forman las secuencias y no de las distancias entre los pares de estas), estos métodos cuentan los eventos de mutación acumulados en las secuencias y pueden por lo tanto eliminar la pérdida de información que se da cuando los caracteres son transformados a distancias y de esta manera se puede estudiar la dinámica evolutiva de cada una de ellos e inferir secuencias de ancestros; los métodos más comunes son el método de Máxima Parsimonia (selecciona el árbol que tiene el mínimo número de cambios evolutivos, “en igualdad de condiciones la solución más sencilla es probablemente la correcta”) y el método de Máxima Verosimilitud (emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, es un método exhaustivo que busca todas las posibles topologías y considera cada posición en un alineamiento, no solo sitios informativos).

Para analizar qué tan diversa es la comunidad de bacterias endófitas es conveniente utilizar índices de diversidad establecidos para este fin, se usan ampliamente índices de diversidad ecológica como lo son el índice de diversidad de Shannon y el índice de diversidad de Simpson (Zar J. H. 1996), si bien ambos índices de nos indican diversidad, su ponderación es diferente ya que el índice de Shannon pondera principalmente la riqueza de especies (cuantas especies diferentes se encuentran en la comunidad) y su rango es de 0 – 5, siendo cero una comunidad poco diversa y cinco una comunidad muy diversa, considerando tres el valor umbral entre una comunidad con una diversidad alta; el índice de Simpson pondera principalmente la dominancia de especies (cuantos representantes se encuentran

de cada especie en la comunidad) cuyo valor oscila de 0-1 (cero a uno), cuyas formulas se puede observar a continuación.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde:

- S – número de especies
- p_i – proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos

Fórmula 1. Índice de diversidad de Shannon

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde:

- S es el número de especies
- N es el total de organismos presentes
- n es el número de ejemplares por especie

Fórmula 2. Índice de diversidad de Simpson

2. Antecedentes

Existen algunos trabajos donde se ha analizado la diversidad de bacterias endófitas asociadas a diferentes cultivos, principalmente de interés agrícola, esto con la finalidad de analizar las comunidades de bacterias endófitas asociadas a diferentes cultivos y obtener un mejor conocimiento sobre su interacción con la planta y su posible efecto benéfico que estén llevando a cabo (Tabla 1).

Cultivo	Bacterias endófitas	Referencia
Arroz	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Serratia marcescens</i>	Chantreuli <i>et al.</i> 2000
Maíz	<i>Burkholderia sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i>	Rosenblueth <i>et al.</i> 2006 Araújo <i>et al.</i> 2001
Papa	<i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Azevedo <i>et al.</i> 2008 Strutz 1995
Cítricos	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>	Araújo <i>et al.</i> 2001
Caña	<i>Gluconobacter diazotrophicus</i> <i>Herbaspirillum sp.</i>	Jiménez-Salgado <i>et al.</i> 1997
Tomate	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Stenotrophomonas sp.</i> <i>Microbacterium sp.</i> <i>Agrobacterium sp.</i>	Hernandez-Pacheco. Datos sin publicar

Tabla 1. Bacterias endófitas asociadas a diversos cultivos

Si bien existen ya varios trabajos analizando las bacterias endófitas asociadas a diversos cultivos, sigue siendo relevante el continuar con estos tipos de estudios ya que el número y tipo de microorganismos es muy variable como se puede ver en los trabajos realizados por Germaine *et al.* 2004, en donde se obtuvieron niveles de 10^2 - 10^4 CFU/g de tejido de plantas de Álamo, mientras que Gyaneshwar *et al.* 2001 aislaron de 10^2 - 10^3 CFU/g de tejido de raíz de arroz. En este mismo sentido Araujo *et al.* 2002 obtuvieron niveles de 10^3 - 10^4 CFU/g de tejido de raíz cítricos, mientras que Mendes *et al.* 2007 reportan aislamientos de bacterias endófitas de 10^2 - 10^6 CFU/g de tejido de caña, en los cuales se contaron las unidades formadoras de colonia (CFU) por gramo de tejido, algunos de los cuales solo consideraron una especie endófitas, limitando el alcance de su estudio.

Para tratar de entender la ecología de las bacterias endófitas se han hecho diversos estudios con diferentes objetivos. De forma general se puede analizar la diversidad de bacterias endófitas mediante el uso de índices de diversidad que sirven para darnos una idea de la composición de la comunidad y poder compararla con otras comunidades, ya que si no se tuvieran valores específicos sería algo ambiguo realizar comparaciones. El uso de los índices de diversidad para comunidades endófitas se pueden observar en Marasco *et al.* 2012, donde se analizan cuatro microambientes, la endosfera (E), rizósfera (R), Suelo cercano a la raíz (S) y suelo no cultivado (B); se compara la diversidad mediante el uso de los índices de Shannon y de Simpson como se ve en la tabla 2, donde observamos que los cuatro microambientes tienen una comunidad bacteriana muy similar.

Índices de diversidad	E	R	S	B
Shannon	1.586	1.799	1.930	1.429
Simpson	0.738	0.748	0.760	0.628

Tabla 2. Índices de diversidad de los distintos microambientes de Chile Morrón

Existen también estudios como los realizados por Pérez *et al.* 2010, en los que se comparan específicamente comunidades de bacterias endófitas asociadas a un mismo tipo de cultivo, solamente variando el sitio de muestreo, en este caso solo se analizó el índice de Shannon, como se puede ver en la tabla 3, el sitio de muestreo tiene una gran inferencia en la diversidad de la comunidad ya que se observan índices desde 0.3 hasta 2.5, bastante variables.

Sitio de muestreo	Índice de Diversidad
1	0.3
2	1.6
3	1.0
4	1.1
5	1.0
6	0.9
7	1.0
8	2.5
9	1.3
10	0.8
11	1.4
12	1.3
13	0.4
14	0.6

Tabla 3. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces de pasto

Pasando a estudios más específicos de las comunidades de bacterias endófitas, están aquellos que realizan análisis filogenéticos mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S, en los cuales se puede observar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de bacterias endófitas en la comunidad. Estudios de este tipo son los realizados por Denise *et al.* 2002, Lei *et al.* 2008, Hoang *et al.* 2010, Jia-Hong *et al.* 2013, en los que se logra ver las relaciones filogenéticas de la comunidad con lo que se refuerza la identificación de las bacterias endófitas realizada con otras metodologías.

Una vez que se logra la plena identificación de los aislados a nivel de especie, se realizan estudios para su clasificación en distintos grupos que puedan servir como un buen antecedente para realizar estudios con grupos específicos de microorganismos. Por ejemplo, se ha observado que bacterias endófitas del género *Pseudomonas* o *Bacillus*, muestran por lo general un gran potencial para mejorar el crecimiento vegetal, ya sea de forma directa o indirecta (Santoyo *et al.* 2012, Glick R. 2015), aunque hay que mencionar que la gran mayoría de los trabajos se basan en bacterias rizosféricas (Hernández-León *et al.* 2015, Martínez-Absalón *et al.* 2014, Martínez-Absalón *et al.* 2012, Hernández-Salmerón *et al.* 2014, Velázquez-Sepúlveda *et al.* 2010). Por lo tanto, conocer la diversidad bacteriana endófitas de las plantas puede ser un buen inicio para conocer el potencial metabólico e inferir funciones ecológicas de la comunidad de endófitos. Posteriormente, muchos de los trabajos se enfocan en poder analizar las capacidades benéficas, tales como promoción del crecimiento, antagonismo contra hongos y bacterias fitopatógenos, resistencia a estrés, fitoremediación por mencionar algunos, como lo son los

estudios realizados por Hoffman *et al.* 2013, Hoang *et al.* 2010, Sessitch *et al.* 2013, Marasco *et al.* 2012, Jia-Hong *et al.* 2013, Polpass *et al.* 2014, Shimaila *et al.* 2012 por mencionar algunos. En estos estudios se realizaron análisis para detectar los mejores aislados de las bacterias endófitas de producir compuestos como sideróforos, ácido indolacético, enzimas líticas, ACC desaminasa para reducir los niveles de etileno en planta, entre otros como se ve en la tabla 4 extraída de Polpass *et al.* 2014, los cuales pueden conferirle un posible rol en la promoción del crecimiento vegetal, ya que se desconoce aún si estos mecanismos se desarrollan igual en el interior de los tejidos que en los experimentos *in vitro* donde las condiciones son controladas.

Strain designation	Phosphate Solubilization	IAA Production	NH ₃ Production	Nitrogen Fixation	Acetoin production	Protease activity	Cellulase activity	Amylase activity
<i>Kocuria</i> sp.JSA01	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Vibrio</i> sp. JSA02	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Bacillus</i> sp. JSA03	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Photobacterium</i> sp.JSA04	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Vibrio</i> sp.JSA05	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Vibrio</i> sp.JSA06	-	†	†	†	†	-	†	†
<i>Aerococcus</i> sp.JSA07	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. JSA08	-	-	†	†	-	†	†	†
<i>Saccharomonospora</i> sp.JSA09	+	ND	-	+	-	+	+	+

Tabla 4. Ejemplos de bacterias endófitas que influyen en el desarrollo vegetal

2.1 La zarzamora (*Rubus fruticosus*).

En este trabajo se estudió la especie vegetal *Rubus fruticosus* variedad Tupy (zarzamora), la cual es cultivada en el estado de Michoacán principalmente en el municipio de Los Reyes, ya que su clima cálido-subhúmedo es el ideal para este tipo de cultivos, razón por la que en el municipio se produce más del 80% de la producción anual total (véase tabla 5).

Producción anual de zarzamora (Toneladas/año)							
Estado	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Michoacán	33,974	40,841	42,369	116,649	112,310	58,279	129,404
Jalisco	239	624	142	364	1,604	1,568	4,358
Colima	2	3	593	825	1,449	1,326	1,493

Tabla 5. Producción anual de zarzamora (65)

Las zarzamoras son arbustos de la familia de las rosáceas que presentan tallos leñosos angulares provistos de espinas, tiernos en la juventud. Presentan un follaje de hojas compuestas de 5 folíolos ovados con bordes dentados, haz brillante y sécil, envés con pilosidad blanquecina y frutos variantes de color dependiendo su estado de maduración (Figura 7).



Figura 7. Zarzamora (*Rubus fruticosus*) variedad Tupy

Existen numerosas especies y variedades de zarzamora que crecen en su mayoría silvestres, lo que dificulta su diferenciación, aunado a esto la facilidad con la que hibridan, entre las especies más representativas están la zarzamora común (*Rubus fruticosus*), zarza de los rastrojos (*Rubus caesius*), zarzamora enana (*Rubus chamaemorus*) y moras Logan (*Rubus loganobaccus*) por mencionar algunas pocas, existen variedades que se diferencian por su contenido de azúcares, como lo son la variedad Tupy, Brazos y Cherokee siendo la variedad Tupy la más dulce y la variedad Cherokee la más ácida (SAGARPA 2013).

En el Municipio de los Reyes Michoacán, se inició la explotación comercial de zarzamora a partir de 1995, estableciendo principalmente la variedad Brazos. Actualmente una gran parte de los productores realizan la reconversión productiva y sustituyen a la variedad Brazos por la variedad Tupy, se consideran 4,500 hectáreas plantadas en esta región, las cuales en su gran mayoría son para producir fruto calidad exportación con valores nutrimentales óptimos como se pueden ver en la tabla 6.

Valor nutrimental por cada 100 g de zarzamora fresca	
Agua	85.64 g
Proteínas	0.72 g
Fibra	5.6 g
Calcio	32 mg
Potasio	196 mg
Hierro	0.57 mg
Vitamina C	21 mg
Vitamina E	0.71 mg
Vitamina A	165 UI
Vitamina B1 (Tiamina)	0.030 mg
Vitamina B2 (Rivoflavina)	0.40 mg
Acido fólico	34 mg

Tabla 6. Valor nutrimental zarzamora

3. Justificación

Es importante realizar estudios que contribuyan al conocimiento de la ecología de los microorganismos endófitos, una parte fundamental es la de observar la diversidad de especies y sus relaciones filogenéticas, así como la potencial capacidad de sintetizar compuestos que puedan tener efecto en el desarrollo vegetal, permitiendo analizar el posible papel de las bacterias endófitas en su ambiente.

4. Hipótesis

En los tejidos de la raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*) existe una alta diversidad de bacterias endófitas que sintetizan compuestos que potencialmente les confiere la capacidad de influir en el desarrollo vegetal.

5. Objetivos

5.1 General

Analizar las poblaciones bacterianas endófitas de la raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*) a través del análisis del gen ribosomal 16S así como su potencial influencia en el desarrollo vegetal.

5.2 Particulares

1. Generar un banco de bacterias endófitas de raíces de zarzamora (*Rubus fruticosus*).
2. Identificar y establecer las relaciones filogenéticas entre las bacterias endófitas.
3. Caracterizar las bacterias endófitas en relación a la síntesis de compuestos relevantes en la interacción planta-bacteria.

6. Estrategia experimental general

La estrategia experimental general consistió en realizar el muestreo de plantas de zarzamora en tres zonas diferentes de un cultivo de zarzamora establecido para obtener los aislados endófitos, previa esterilización superficial de la raíz. Se extrae el DNA genómico para amplificar el gen ribosomal 16S con oligos universales para bacterias, secuenciarlo y realizar análisis de diversidad y filogenética. Una vez identificada la especie de los aislados endófitos se analiza su capacidad de producir compuestos que posiblemente les confiera la capacidad de influir en el desarrollo vegetal (Figura 8).

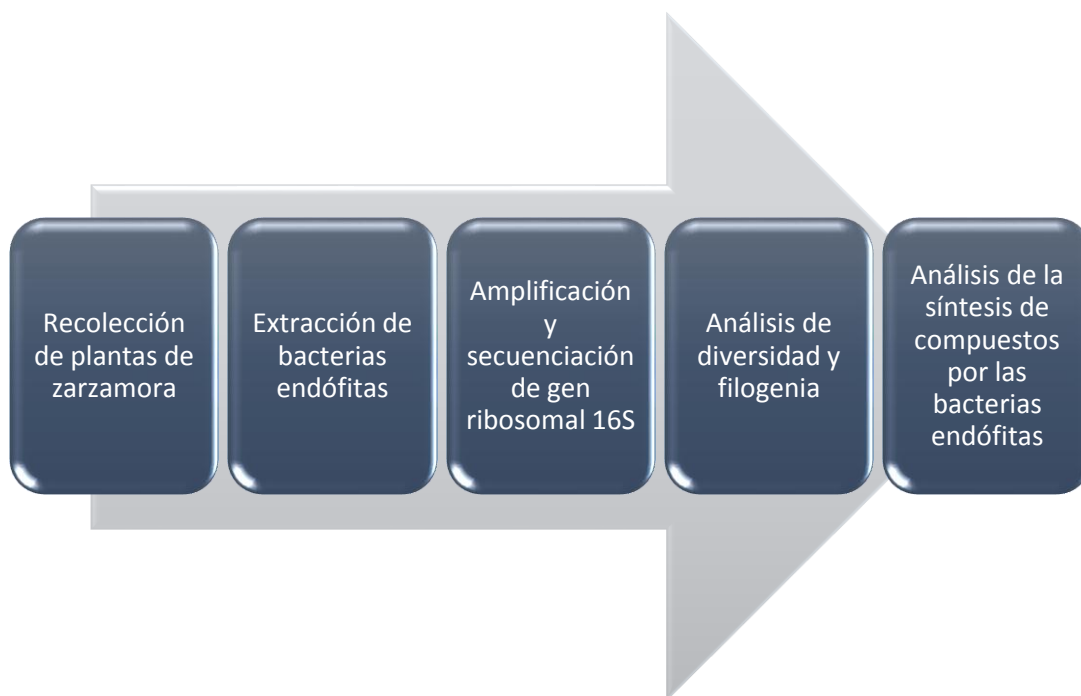


Figura 8. Estrategia experimental general

7. Materiales y métodos

7.1 Recolección de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus*)

Se recolectaron 12 plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus*) de la variedad Tupy en el Municipio de Los Reyes Michoacán, en un plantío a la entrada de la localidad (Figura 9). Las plantas que se recolectaron no presentaron síntomas visibles de alguna enfermedad, tenían aproximadamente 2 meses de edad, pero que aún no se encontraban en etapa de floración.



Figura 9. Rancho Las Palmas en Los Reyes Michoacán

Posterior a la recolección de las plantas estas fueron llevadas al laboratorio para realizar los cortes, desinfección, macerado y aislamiento de bacterias endófitas.

7.2 Corte y desinfección superficial

Una vez en el laboratorio se tomaron 3 plantas de cada sitio de muestreo, una vez seleccionadas se procedió a realizar los cortes de la raíz tomando una porción de raíz de la parte inferior, otro de la parte media y una última porción de la parte superior de la raíz para tomar en total 1 g de tejido y poder proceder con la desinfección.

Para desinfectar los tejidos superficialmente y asegurar así la eliminación de las bacterias de la rizósfera se realizaron lavados con cloro y alcohol como a continuación se describe:

- Se colocan los cortes de raíz en una solución de alcohol al 70%, se agitan durante 30 segundos para eliminar la tierra de las raíces.
- Se pasan los tejidos a una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, se agita durante 5 minutos.
- Posteriormente se enjuagan con etanol al 70% por 30 segundos.
- Finalmente se lavan con agua estéril, repitiendo este lavado 5 veces.

Como control se plaquean 100 μ L del último lavado, incubando por 72 horas, en los cuales no hubo ningún crecimiento de colonias, con lo que se garantiza la eliminación de las bacterias superficiales.

7.3 Cuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y obtención de aislados (Banco de bacterias endófitas)

Para obtener las unidades formadoras de colonias (UFC) se tomaron los cortes de las raíces desinfectados y se maceraron en morteros estériles, posterior a su trituración se tomaron 100 μ L para plaquearlos en cajas de agar nutritivo, las cuales se incubaron por 72 horas a 30 °C, realizando conteos periódicos de las UFC, se seleccionaron los aislados para purificarlos en base a la morfología colonial (véase tabla 7) tratando de obtener la mayor diversidad posible.

CRITERIO DE SELECCIÓN DE AISLADOS
Color de la colonia
Tamaño de la colonia
Consistencia de la colonia
Altura de la colonia
Forma de la colonia

Tabla 7. Criterio de selección de aislados

Una vez que se seleccionaron los aislados estos serán identificados con un código alfanumérico único para cada uno de los mismos, el código consta de dos partes fundamentales: COPE + Número consecutivo.

Una vez que los aislados son identificados se resguardaran en glicerol para evitar la pérdida de los mismos y así tener el banco de bacterias endófitas de raíz de zarzamora.

7.4 Extracción de ADN genómico y amplificación del gen ribosomal 16S

El protocolo para la extracción de ADN genómico que se siguió es una modificación del protocolo de Mahuku 2004, el cuál consta de los siguientes pasos:

- Tomar una azada del aislado, suspender y disolver en un tubo eppendorf que contenga 300 μ L de buffer TES.
- Vortex de 1 minuto para homogenizar las células.
- Adicionar 200 μ L de buffer TES conteniendo proteinasa k (concentración final 50 μ g/mL, esto se logra agregando 1,3 μ L de proteinasa k con una concentración de 20 μ g/mL) y agitar suavemente.
- Incubar en baño maría a 65 °C durante 30 minutos, dando un vortex fuerte de 2 – 3 segundos cada 5 minutos.
- Adicionar 0,5 volumen de acetato de amonio 7,5 M (250 μ L) y se agita suavemente.
- Incubar las muestras en hielo por 10 minutos.
- Centrifugar a 6000 rpm / 30 minutos.
- Si no se forman 2 fases visibles, adicionar 750 μ L de cloroformo isoamílico y centrifugar a 6000 rpm / 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 1 volumen de isopropanol frío.
- Incubar a - 20°C / 1 hora.
- Centrifugar a 6000 rpm / 20 minutos.

- Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 μ L de etanol al 70% frío.
- Centrifugar a 6000 rpm / 6 minutos.
- Decantar el sobrenadante y secar en incubadora a 37°C con los tubos abiertos.
- Adicionar 50 μ L de buffer TE mezclando con la micropipeta y se da un vortex posterior para resuspender el DNA.
- Transferir la solución a un tubo nuevo.
- Adicionar 1 μ L de RNasa dejando incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se corre el gel de agarosa al 1% para comprobar que la extracción se realizó de forma adecuada.
- El ADN se resguarda de -20 a -70 °C.

Una vez obtenido el DNA genómico, mediante el uso de la técnica molecular de PCR se amplificó el gen ribosomal 16S con la siguiente reacción de PCR:

- 6.5 μ L de agua libre de DNasa
- 10 μ L de Master mix
- 1.25 μ L de cada oligo (véase tabla 8)
- 1 μ L DNA genómico (1:10)

PCR			
OLIGO	SECUENCIA	Tm	AMPLIFICA
FD1	5' - CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3'	37 °C	16S
RD1	5' - CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3'	37 °C	16S

Tabla 8. Oligos FD1 – RD1 para amplificación de gen ribosomal 16S

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

- Temperatura inicial 105 °C
- 1 ciclo:
 - 95°C / 4 minutos
- 30 ciclos:
 - 95°C / 1 minuto
 - 55°C / 1 minuto
 - 72°C / 2 minutos
- Extensión final 72°C / 10 min

Una vez amplificado el gen ribosomal 16S se corre un gel al 1% de agarosa para confirmar la presencia del producto, si no se obtiene un amplificado único, se corta la banda correspondiente a las 1500 pb la cual se recupera mediante el uso de un kit comercial y se confirma la purificación del mismo corriendo otro gel de agarosa al 1% y se debe apreciar una única banda del peso esperado.

7.5 Secuenciación y análisis filogenético

Una vez que se obtuvieron los productos purificados del gen ribosomal 16S, estos fueron llevados para su secuenciación a Langebio en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, con lo que se obtuvieron las secuencias de nuestros aislados. Posteriormente se analizaron las secuencias ribosomales (>1200pb) para identificar el género y la especie a la que corresponden.

Para realizar los análisis filogenéticos lo primero que se realizó fue las búsquedas BLAST para obtener las homologías de nuestras secuencias con las bases de datos, para poder construir los alineamientos, elegir un modelo de evolución y un método de construcción de árboles filogenéticos y así tener el análisis filogenético.

Una vez obtenidas las filogenias se analizó la información de las posibles relaciones evolutivas, que tan similares pueden ser unas cepas de otras a nivel de 16S así como ayudar a esclarecer posibles inconsistencias en cuanto a la especie de los aislados.

7.6 Análisis de la producción de índoles

Para la determinación de los índoles producidos por los endófitos se utilizó un método colorimétrico basado en el uso del reactivo de Salkowsky, el cuál consta de los siguientes pasos:

- Las cepas se sembraron en un caldo nutritivo adicionado con 1% de triptófano.
- Se incuban a 30 °C con agitación constante hasta que alcanzaron una D.O. de 1.
- Se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 minutos.
- En una celda de cuarzo se colocaron 250 µL de sobrenadante y 500 µL del reactivo de Salkowsky que se incuban por 30 minutos protegidos de la luz.
- Se realiza la lectura a 540 nm, tomando como blanco caldo nutritivo adicionado con triptófano sin inocular adicionado del reactivo se Salkowsky.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia se convierten a µg/mL usando una curva de calibración estándar.

7.7 Análisis de la producción de proteasas

Para la determinación de la producción de proteasas, a partir de las cepas puras, estas se sembraron en medio Skim Milk usando palillos estériles, posteriormente se incubaron a 30°C midiendo la formación de un halo transparente en el medio que

es de color blanco. La presencia y diámetro de este halo indica la producción de proteasas.

7.8 Análisis de la producción de sideróforos

Para la determinación de la producción de sideróforos, partiendo de las cepas puras, se sembraron en medio CAS usando un palillo estéril, posteriormente se incubaron a 30°C midiendo el cambio de color del medio de azul a amarillo, lo cual indica la producción de sideróforos.

7.9 Análisis del antagonismo contra *Botrytis cinerea*

Para analizar la capacidad que tienen las cepas endófitas de antagonizar al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, primero se colocó al centro de una caja de agar nutritivo agar dextrosa papa 50-50 una porción de micelio del hongo, éstas cajas se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente en obscuridad, una vez que se observó el crecimiento micelial al paso de las 24 horas se inocularon cuatro cepas en la periferia de la caja a la misma distancia del hongo formando un cuadrante, posteriormente se incubaron hasta que una caja control sembrada solo con el hongo cubra la totalidad de la caja. En ese momento se observó si hubo inhibición del crecimiento micelial, lo cual es indicativo de la capacidad que tienen las cepas de antagonizar al hongo *Botrytis cinerea*.

8. Resultados

8.1 Secuenciación del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos endófitos

En la búsqueda de analizar la diversidad de bacterias endófitas que se encuentran en las raíces de zarzamora se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) logrando un conteo de 6×10^2 UFC/g de raíz como promedio de 3 extracciones realizadas al total de raíces de 9 plantas; del total de UFC's se obtuvieron 116 aislados puros de los cuales se realizó la extracción del ADN, en la figura 10 se puede observar una imagen representativa.

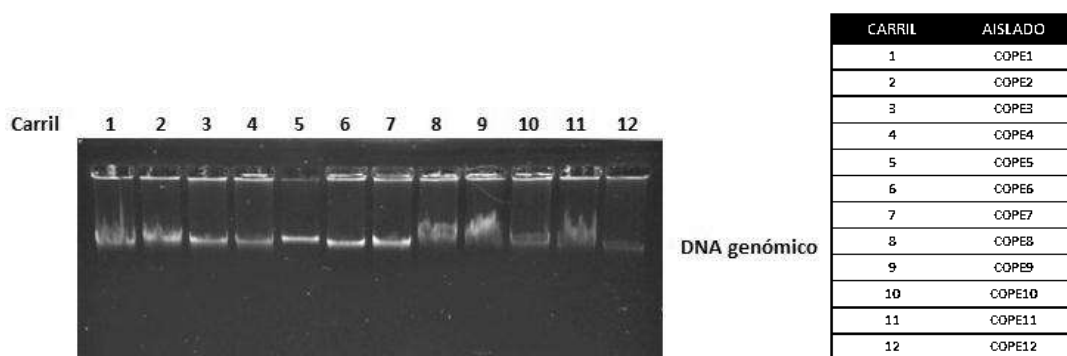


Figura 10. Extracción de DNA genómico de bacterias endófitas

Posteriormente se amplificó y purificó el gen ribosomal 16S, logrando obtener 102 productos de PCR purificados de las 116 muestras iniciales de DNA genómico, la figura 11 es representativa del resultado obtenido.

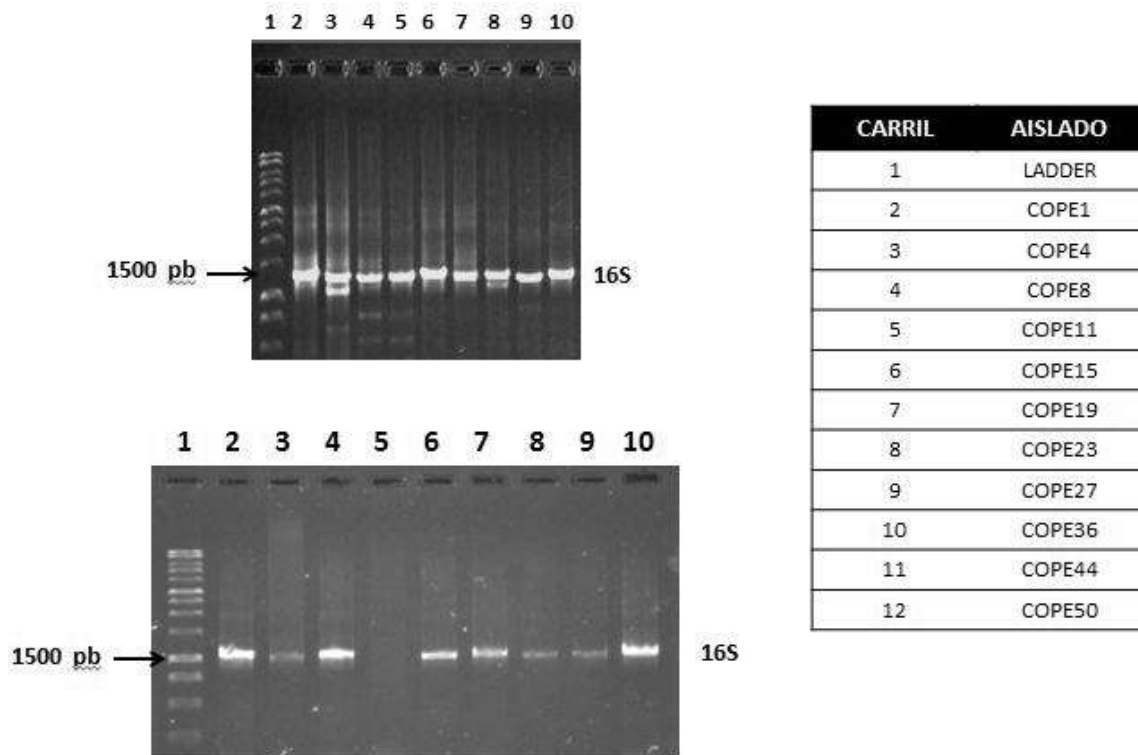


Figura 11. Amplificación y purificación de gen ribosomal 16S

8.2 Análisis tipo BLAST de las secuencias 16S ribosomales

Los productos purificados se secuenciaron en Langebio en Irapuato, de donde se nos proporcionaron las respectivas secuencias como se muestra en la figura 12 representativa de nuestras cepas.

```
>34. -COPE17_B05_2014-02-14.ab1
GTGGTCTTCTTAGCTAGACATGCAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGGCGGACGGGTGAGTAATG
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGG
GGACCTTCGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
TCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAG
TTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAACACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACAGTGGCGAATGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGCAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAGCGATGTCACACTAGCCACTGGGGAGCC
TTGAGCTCTTAGTGGCTCACCTCACGCCTTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAGAAACTCATATGATG
TGACTCGCGGGCTGCACACGCGGGTGGATCATGCTGTTCTATATCAAAGCAACTACGAGAACCTTACGACGGACTTGATC
ATCCAAATGAACTTTGCAGATATGTATTCGCTGCCGTTCCGCGGAGCATTGAGACAGGCGCTGCATGTCTGTTCTGCAGA
CTCGTGTCTGACAAATGTTGTGTTAAGTCCCCGTATCAGCCACCCATAGTGCTAAGCTACAGCACGATCATGGTGGCC
ACTTAGGGAGACTGCAAGGAGACATATCGCAGTAGGGCAGGATGACGTCAGTCACTGACCCGGTAACTGCTGGCCGT
ACCAACGGTGCTGAAGTGGTGCATACATGCGTAGCCAGTCCGGAGGGTGGACCTTATGTTTCGCACATATCTCACTCCTAA
TTCGATAC
```

Figura 12. Secuencia representativa del gen ribosomal 16S del aislado COPE17

Con dichas secuencias se realizaron búsquedas tipo BLAST en las bases de datos, obteniendo homologías arriba del 90% con diversos géneros (véase la tabla 9 representativa), cabe mencionar que se realizó una búsqueda para cada secuencia, lo que equivale a 102 búsquedas BLAST en las bases de datos, desafortunadamente con esta herramienta solo se pudo lograr diferenciar los aislados satisfactoriamente a nivel de género, por lo que se vio la necesidad de utilizar otra herramienta más fina para lograr diferenciar los aislados que no se pudieron diferenciar hasta especie.

No. AISLADO	ESPECIE	HOMOLOGÍA
COPE17	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
COPE22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%
	<i>Bacillus subtilis</i>	
COPE64	<i>Streptomyces minoensis</i>	98%
	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	
COPE77	<i>Burkholderia caledonica</i>	99%
	<i>Burkholderia sediminicola</i>	
COPE114	<i>Bacillus altitudinis</i>	98%
	<i>Bacillus pumilus</i>	

Tabla 9. Homologías con búsquedas BLAST

8.3 Análisis filogenético bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*)

La construcción de los árboles filogenéticos se realizó mediante el uso del programa MEGA 5.0, se usó el método de Máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000, se realizaron varios árboles filogenéticos con los que se pretende mostrar las relaciones que guardan los aislados, así como lograr identificar las especies en las muestras que no se logró con las búsquedas BLAST.

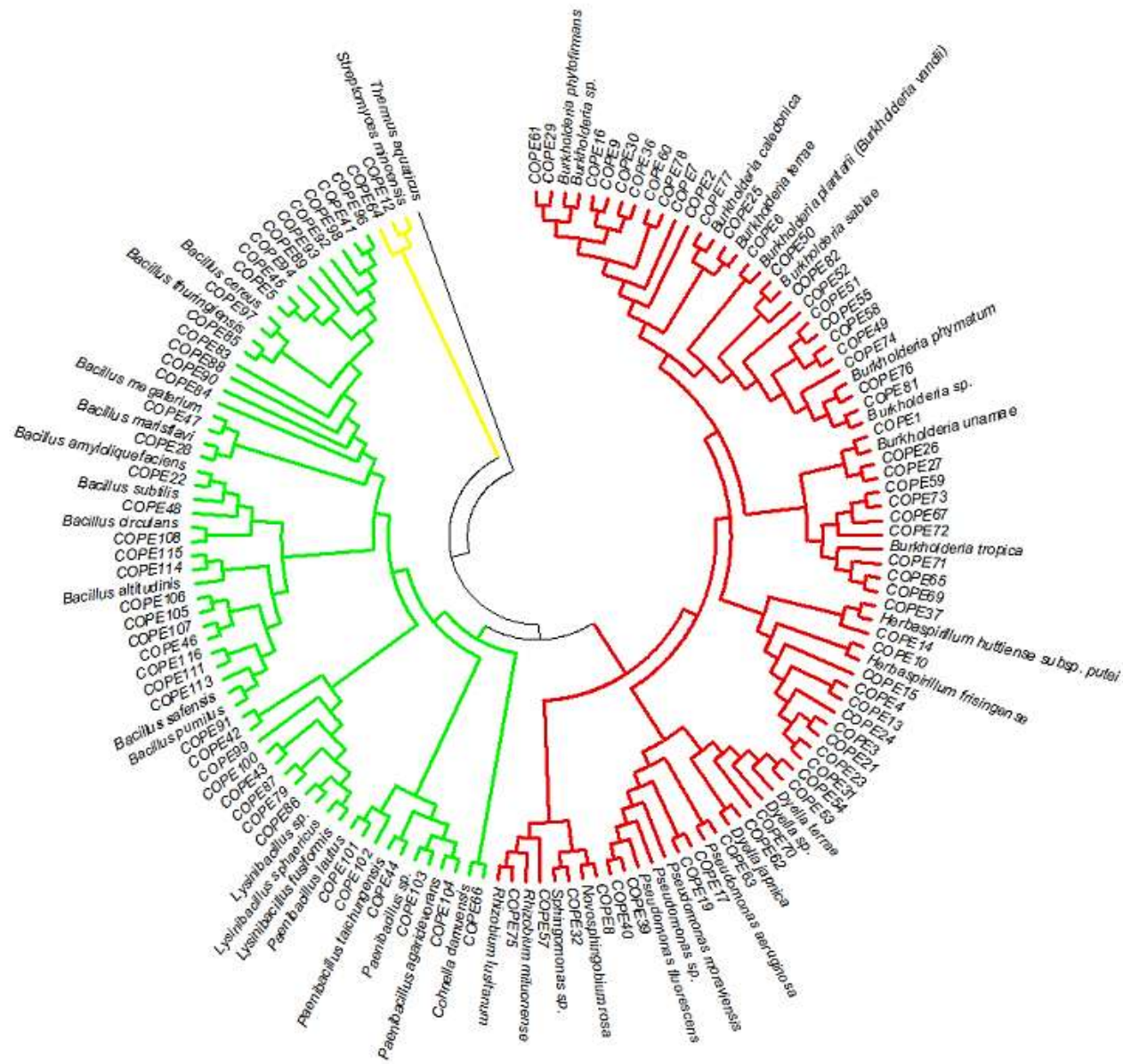


Figura 13. Árbol filogenético de las bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora

En el árbol filogenético (Figura 13) se puede observar como la comunidad se distribuye en 3 ramas, dos ramas principales y una tercera de menos tamaño. Las ramas principales corresponden a proteobacterias (rama de color rojo) y firmicutes (rama de color verde), la tercera rama con un menor tamaño pertenece a actinobacterias (rama de color amarillo). Podemos observar como la comunidad se distribuye en pequeños subgrupos en las ramas principales, para observar mejor estas divisiones se realizaron arboles filogenéticos de cada una de las divisiones en que se agrupo la comunidad (Figura 14, 15, 16).

Del árbol principal podemos observar a que especie corresponde cada uno de los aislados, razón por la que se manejarán como cepas de ahora en adelante, las secuencias se enviaron a la base de datos del NCBI las cuales se pueden consultar con el números de acceso KP634900-KP635001. Se empleó como grupo externo a *B. cereus*.

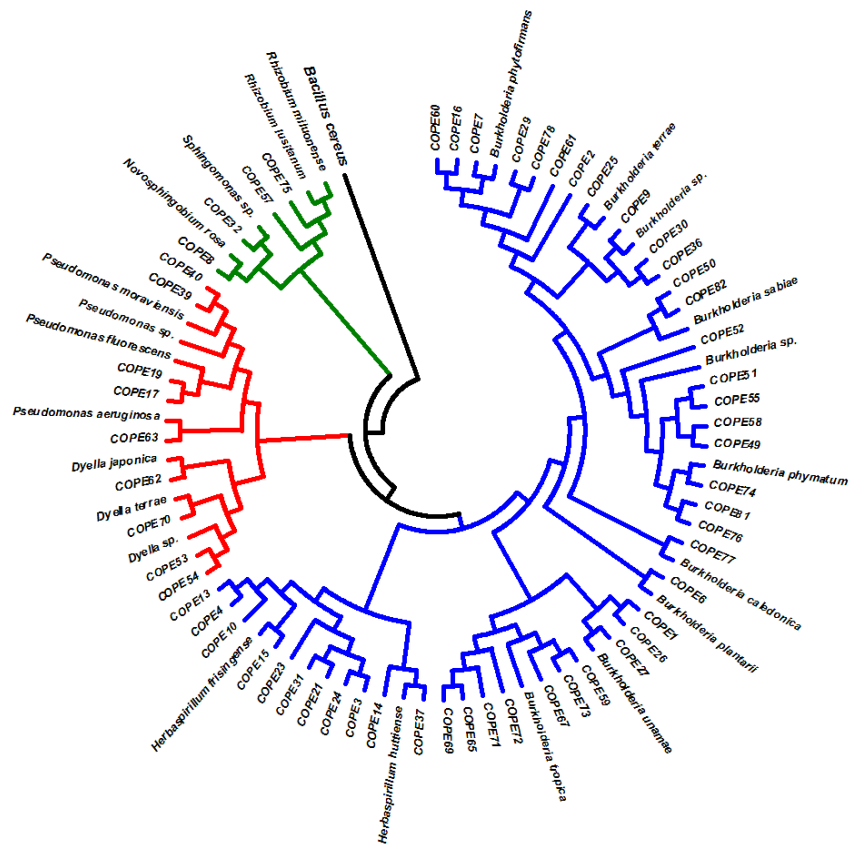


Figura 14. Árbol Filogenético División Proteobacteria

Posteriormente se procedió al análisis de los arboles filogenéticos de cada una de las divisiones del árbol principal, primero se revisó la división proteobacteria, cuyo árbol se puede observar en la figura 14, donde se pueden observar tres divisiones claras del árbol, las cuales corresponden a Alfaproteobacteria (rama verde), Betaproteobacteria (rama azul) y Gamaproteobacteria (rama roja), podemos observar como existe un mayor número de representantes de las betaproteobacterias, seguidas de las gamaproteobacterias y por ultimo las alfaproteobacterias. Podemos ver también que si existen especies dominantes por el número de cepas de cada una de ellas, observando una tendencia a dominar del genero *Burkholderia*. En total se obtuvieron 58 cepas correspondientes a 21 especies.

En la tabla 10 podemos observar un listado de las proteobacterias, especies encontradas y cuales cepas corresponden a cada especie.

Proteobacterias

ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Novosphingobium rosa</i>	COPE8	<i>Burkholderia caledonica</i>	COPE77
<i>Sphingomonas spp.</i>	COPE32	<i>Burkholderia spp.</i>	COPE9, 30, 36, 52
<i>Rhizobium miluonense</i>	COPE57	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	COPE14, 37
<i>Rhizobium lusitanum</i>	COPE75	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE3, 4, 10, 13, 15, 21, 23, 24, 31
<i>Burkholderia unamae</i>	COPE1, 26, 27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	COPE17, 19
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	COPE2, 7, 16, 29, 60, 61,78	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	COPE39, 40
<i>Burkholderia plantarii</i>	COPE6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	COPE63
<i>Burkholderia terrae</i>	COPE25	<i>Dyella japonica</i>	COPE62
<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE49, 51, 55, 58, 74, 76, 81	<i>Dyella terrae</i>	COPE70
<i>Burkholderia sabiae</i>	COPE50, 82	<i>Dyella spp.</i>	COPE53, 54
<i>Burkholderia tropica</i>	COPE59, 65, 67, 69, 71, 72, 73	-----	-----
Total		21 Especies	58 Cepas

Tabla 10. Proteobacteria

Firmicutes

ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Bacillus cereus</i>	COPE5, 41, 45, 83, 85, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98	<i>Bacillus megaterium</i>	COPE47
<i>Bacillus thuringiensis</i>	COPE84	<i>Paenibacillus agaridevorans</i>	COPE104
<i>Bacillus marisflavi</i>	COPE28	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	COPE44
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	COPE22	<i>Paenibacillus spp.</i>	COPE103
<i>Bacillus subtilis</i>	COPE48	<i>Paenibacillus lautus</i>	COPE101, 102
<i>Bacillus altitudinis</i>	COPE114, 115	<i>Conhella damuensis</i>	COPE66
<i>Bacillus pumilus</i>	COPE46, 105, 106, 107	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	COPE79
<i>Bacillus safensis</i>	COPE111, 113, 116	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	COPE87
<i>Bacillus circulans</i>	COPE108	<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE42, 43, 86, 91, 99, 100
Total		18 Especies	43 Cepas

Tabla 11. Firmicutes

La última sección del árbol principal por analizar, es la correspondiente a la división Actinobacteria, la cual es la rama menos diversa ya que solo se logró encontrar a 2 representantes de esta división, las cuales se agruparon con *Streptomyces minoensis* como se puede observar en la figura 16 así como en la tabla 12.



Figura 16. Árbol filogenético División Actinobacteria

Actinobacterias

ESPECIE	CEPA
<i>Streptomyces minoensis</i>	COPE12, 64
Total	1 Especie 2 Cepas

Tabla 12. Actinobacterias

8.4 Análisis del posible papel ecológico de las especies encontradas

Una vez que se tuvieron identificadas las cepas, se procedió a realizar búsqueda de información de las mismas, con la finalidad de ver si existían reportes previos como bacterias endófitas y si tienen alguna función y/o producción de compuestos que puedan conferirles algún efecto en el desarrollo vegetal como se muestra en la tabla 13, donde se pueden ver algunas de las bacterias endófitas aisladas de la raíz de zarzamora, en que cultivos ya se han encontrado como endófitas y que actividades se les han asignado como un a posibilidad de su posible papel ecológico.

ESPECIE	CEPA	ENDOFITO	CULTIVO	ACTIVIDAD
<i>Burkholderia unamae</i>	COPE1	Sí	Maíz/Caña de azúcar	Fijación de nitrógeno
<i>Burkholderia caledonica</i>	COPE2	Sí	Rubiaceae (Familia del café)	S/D
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE3	Sí	Gramineas (Cebada)	Producción de AIA, N-acilhomoserin lactona, ACC-deaminasa
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	COPE39	Sí	Banana	Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de sideróforos
<i>Pseudomonas spp.</i>	COPE40	Sí	<i>Trifolium pratense</i> (Trébol)	Degradación de fenantreno
<i>Bacillus cereus</i>	COPE41	Sí	Aguacate	Antagonismo
<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE42	Sí	<i>Avicennia marina</i> (Manglar)	Producción de adenosin deaminasa

Tabla 13. Bacterias endófitas y sus actividades

La mayoría de nuestras cepas ya se encontraban reportadas como endófitas de alguna planta y muchas de ellas con alguna actividad que pudiera tener efecto en el crecimiento vegetal, sin embargo, se encontraron 14 cepas que hasta nuestro

mayor entendimiento no tienen reporte previo como bacterias endófitas, por lo que es importante mencionarlas (véase tabla 14) como la primera vez que son aisladas como bacterias endófitas.

ESPECIE	AMBIENTE
<i>Novosphingobium rosa</i>	Rizósfera
<i>Herbaspirillum huttiense subsp. putei</i>	Agua
<i>Burkholderia terrae</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	Rizósfera
<i>Paenibacillus lautus</i>	Agua
<i>Dyella terrae</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Dyella japonica</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Cohnella damuensis</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Bacillus marisflavi</i>	Agua
<i>Bacillus circulans</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Bacillus safensis</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Streptomyces minoensis</i>	Suelo / Rizósfera
<i>Rhizobium miluonense*</i>	Trébol
<i>Rhizobium lusitanum*</i>	Frijol
Total	14 Especies

Tabla 14. Especies no reportadas como endófitas

8.5 Índices de diversidad de las bacterias endófitas asociadas a raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*)

Una vez identificadas las cepas y para poder decir que tan diversa es la comunidad de bacterias endófitas asociadas a la raíz de zarzamora, se usaron dos índices de diversidad, el índice de Shannon y el índice de Simpson cuyos resultados se muestran en la tabla 15.

DIVERSIDAD	
INDICE	VALOR
Shannon	3.34
Simpson	0.95

Tabla 15. Índices de diversidad

Estos resultados nos indican que nuestra comunidad es altamente diversa pero con una marcada dominancia de algunas especies.

8.6 Búsqueda de actividades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal.

8.6.1 Producción de índoles

Se analizó la capacidad que tienen las cepas endófitas de raíz de zarzamora para producir índoles en comparación con una cepa que ya se encuentra reportada por su capacidad de promover el crecimiento vegetal y de producir AIA, los resultados se presentan por división en las tablas 16 y 17 que se muestran a continuación:

FIRMICUTES			ACTINOBACTERIAS		
ESPECIE	CEPA	µg/mL	ESPECIE	CEPA	µg/mL
<i>Bacillus cereus</i>	COPE93	0.04			
<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE99	0.21			
<i>Paenibacillus spp.</i>	COPE103	0.40			
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	COPE44	0.55	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UM270	5.8
<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE100	0.61	<i>Streptomyces minoensis</i>	COPE12	7.34
<i>Bacillus cereus</i>	COPE89	0.85			
<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE91	0.89			
<i>Bacillus altitudinis</i>	COPE115	1.45			
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	COPE79	2.41			
<i>Bacillus cereus</i>	COPE83	2.46			
<i>Bacillus cereus</i>	COPE45	2.61			
<i>Lysinibacillus spp.</i>	COPE42	3.57			
<i>Bacillus cereus</i>	COPE94	3.95			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	COPE22	5.41			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UM270	5.8			
<i>Cohnella damuensis</i>	COPE66	6.35			
Total	15 Cepas		Total	1 Cepa	

Los valores representan el promedio de tres repeticiones (n=3)

Tabla 16. Índoles producidos por Firmicutes y Actinobacterias

PROTEOBACTERIAS					
ESPECIE	CEPA	µg/mL	ESPECIE	CEPA	µg/mL
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE10	0.10	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE13	4.30
<i>Burkholderia tropica</i>	COPE71	0.55	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE15	5.18
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	COPE61	0.66	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	COPE17	5.35
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	COPE60	0.87	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UM270	5.8
<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE81	0.87	<i>Burkholderia tropica</i>	COPE73	6.48
<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE49	1.13	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE23	6.93
<i>Rhizobium miluonense</i>	COPE57	1.43	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE21	7.92
<i>Burkholderia sabiae</i>	COPE82	1.98	<i>Burkholderia spp.</i>	COPE9	8.26
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE3	2.24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	COPE63	8.62
<i>Burkholderia unamae</i>	COPE1	2.29	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	COPE14	8.84
<i>Dyella japonica</i>	COPE62	2.46	<i>Burkholderia caledonica</i>	COPE2	12.24
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE31	3.20	<i>Herbaspirillum spp.</i>	COPE36	22.39
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	COPE40	4.11	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	COPE37	24.77
Total			25 Cepas (16 < 9)		

Los valores representan el promedio de tres repeticiones (n=3)

Tabla 17. Indoles producidos por Proteobacteria

De las 102 cepas analizadas 41 cepas presentaron la capacidad de producir índoles, siendo las proteobacterias las que presentan mejor capacidad de producirlo ya que además de ser un mayor número de cepas que lo producen, también son las que producen mayor cantidad de índoles, incluso por encima de la cepa control. En la figura 17 se muestra una imagen representativa de las celdas con la reacción colorimétrica para medir la producción de los índoles.



Figura 17. Celdas con reacción de Salkowski

8.6.2 Producción de proteasas

Se analizó la capacidad que tienen las cepas endófitas de raíz de zarzamora para producir proteasas, los resultados se presentan por división en la tabla 18 que se muestra a continuación:

FIRMICUTES		PROTEOBACTERIAS	
ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Bacillus cereus</i>	COPE5	<i>Herbaspirillum frisinge</i>	COPE15
<i>Bacillus cereus</i>	COPE41	<i>Burkholderia terricola</i>	COPE49
<i>Bacillus cereus</i>	COPE45	<i>Burkholderia sabiae</i>	COPE50
<i>Bacillus megaterium</i>	COPE47	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE55
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	COPE48	<i>Rhizobium miluonense</i>	COPE57
<i>Bacillus cereus</i>	COPE83	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE58
<i>Bacillus cereus</i>	COPE88	<i>Dyella japonica</i>	COPE62
<i>Bacillus thuringiensis</i>	COPE89	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE81
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	COPE91		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	COPE92		
<i>Bacillus cereus</i>	COPE93		
<i>Bacillus cereus</i>	COPE94		
<i>Bacillus cereus</i>	COPE96		
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	COPE100		
<i>Bacillus pumilus</i>	COPE105		
Total	15 Cepas	Total	8 Cepas

n= 4

Tabla 18. Cepas productoras de proteasas

De las 102 cepas analizadas 23 presentaron la capacidad de producir proteasas, siendo las Firmicutes las que presentan más ampliamente distribuido entre sus representantes la capacidad de producirlas ya que son un mayor número de cepas que las producen comparado con la división Proteobacteria que también produce proteasas. En la figura 18 se muestra una imagen representativa del ensayo para analizar la producción de proteasas.



Figura 18. Control negativo (Izquierda) y degradación por proteasas cepa COPE100

8.6.3 Producción de sideróforos

Se analizó la capacidad que tienen las cepas endófitas de raíz de zarzamora para producir sideróforos, los resultados se presentan por división en la tabla 19 que se muestra a continuación:

FIRMICUTES		PROTEOBACTERIAS	
ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Bacillus pumilus</i>	COPE46	<i>Burkholderia caledonica</i>	COPE2
<i>Bacillus pumilus</i>	COPE115	<i>Burkholderia caledonica</i>	COPE29
<i>Bacillus pumilus</i>	COPE116	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE51
<i>Bacillus megaterium</i>	COPE47	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE52
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	COPE48	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE58
<i>Bacillus cereus</i>	COPE96	<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE82
<i>Bacillus cereus</i>	COPE97	<i>Burkholderia terricola</i>	COPE49
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	COPE91	<i>Burkholderia terricola</i>	COPE74
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	COPE99	<i>Burkholderia tropica</i>	COPE59
<i>Paenibacillus lautus</i>	COPE101	<i>Burkholderia tropica</i>	COPE69
<i>Cohnella damuensis</i>	COPE66	<i>Burkholderia tropica</i>	COPE71
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	COPE70
		<i>Herbaspirillum frisingense</i>	COPE23
		<i>Herbaspirillum huttiense</i>	COPE37
		<i>Dyella japonica</i>	COPE62
		<i>Dyella terrae</i>	COPE63
Total	11 Cepas	Total	16 Cepas

n= 3

Tabla 19. Cepas productoras de sideróforos

De las 102 cepas analizadas 27 presentaron la capacidad de producir sideróforos, siendo las Proteobacteria las que presentan más ampliamente distribuido entre sus representantes la capacidad de producirlos ya que son un mayor número de cepas que los producen comparado con la división Firmicutes que también produce sideróforos. En la figura 19 se muestra una imagen representativa del ensayo para analizar la producción de sideróforos.

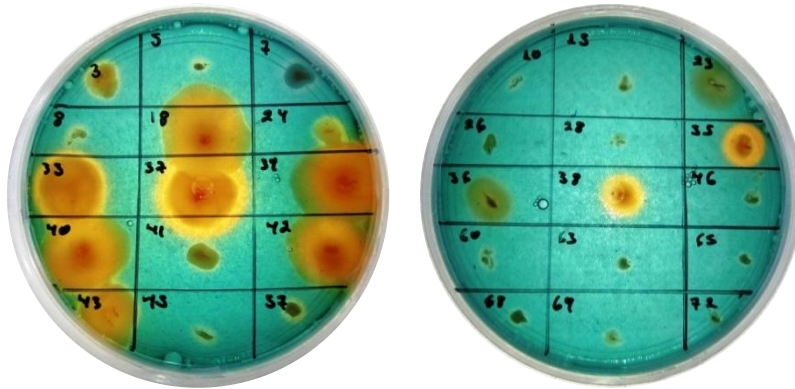


Figura 19. Ensayo para la determinación de la producción de sideróforos

8.6.4 Antagonismo contra *Botrytis cinerea*

Se analizó la capacidad que tienen las cepas endófitas de raíz de zarzamora para antagonizar a *Botrytis cinerea*, los resultados se presentan en la tabla 20 que se muestra a continuación:

ESPECIE	CEPA
<i>Burkholderia phymatum</i>	COPE58
<i>Dyella japonica</i>	COPE62
<i>Bacillus cereus</i>	COPE83
<i>Bacillus cereus</i>	COPE97
Total	4 Cepas

n= 3

Tabla 20. Cepas antagonistas de *Botrytis cinerea*

De las 102 cepas analizadas 4 presentaron la capacidad de antagonizar a *Botrytis cinerea*, si bien son muy pocas las bacterias endófitas las que presentaron esta capacidad, el hecho de que algunas puedan antagonizar hongos fitopatógenas ya es algo alentador para continuar con los ensayos, las bacterias endófitas de la división Firmicutes son las que presentan una mayor distribución de esta capacidad de antagonismo contra *Botrytis cinerea*. En la figura 20 se muestra una imagen del ensayo de antagonismo contra *Botrytis cinerea*.

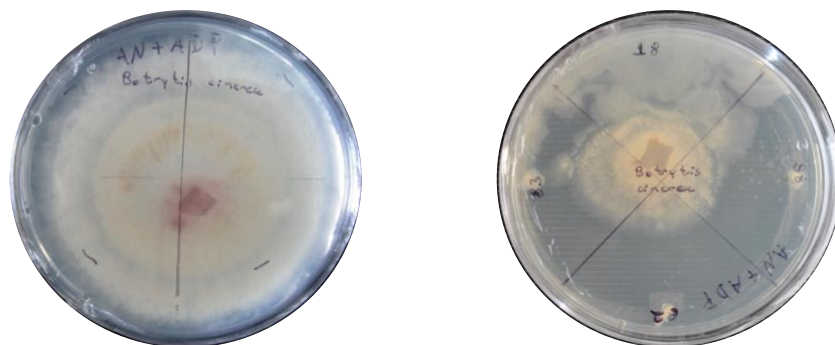


Figura 20. Control negativo (Izquierda) y cepas que inhiben el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*

9. Discusión

Las interacciones planta microorganismo se llevan a cabo principalmente en la zona conocida como la rizósfera (Mora *et al.* 2011), debido a los exudados radiculares que proporcionan una gran cantidad de nutrientes necesarios para los microorganismos que ahí habitan (Schenk *et al.* 2012), existiendo interacciones benéficas, neutras y perjudiciales (Hirsch & Mauchline 2012).

De todas las interacciones que se dan entre la planta y los microorganismos son de nuestro interés aquellas que se lleven a cabo con las bacterias endófitas, es decir, aquellas bacterias que pueden penetrar y sobrevivir dentro de los tejidos vegetales sin causar daño. Se dice que las bacterias endófitas están un paso adelante de aquellas que habitan la rizósfera, ya que pueden interactuar de forma más estrecha y directa con la planta (dentro de sus tejidos), teniendo una mayor influencia en su desarrollo (Glick B. R. 2015).

Desde hace décadas se han estudiado las bacterias endófitas (Perotti R. 1926), clasificándolas principalmente en endófitas obligadas (Araujo *et al.* 2002) y endófitas facultativas (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006). En este trabajo, nos enfocamos en aquellas bacterias endófitas facultativas que pueden sobrevivir fuera de la planta y que permiten tener los cultivos puros. Cabe destacar que las bacterias endófitas obligadas representan la minoría de la comunidad endófitas de una planta (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

Se han aislado bacterias endófitas de diversos cultivos como lo es el arroz (Chantreuli *et al.* 2000), maíz (Araujo *et al.* 2001), papa (Azevedo *et al.* 2008), cítricos (Araujo *et al.* 2001), caña (Jiménez-Salgado 1997) y tomate (Márquez-Santacruz *et al.* 2010) por mencionar algunos, sin embargo, no existe ningún reporte previo de trabajos realizados con bacterias endófitas asociadas a la raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*) por lo que es interesante realizar un estudio al respecto ya que aunque se han estudiado diversos cultivos y las bacterias endófitas que se han encontrado son muy variables tanto en tipo como en número, por lo que

es relevante el continuar con estos estudios para ampliar los conocimientos que se tienen de las comunidades endófitas.

Una de las técnicas que es ampliamente usada para la identificación de la biodiversidad endófitas, es la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S, esto debido a que es un gen conservado y existen amplias bases de datos con información de este gen con las que se pueden realizar comparaciones que nos ayuden a la identificación de las especies. En nuestro caso nosotros decidimos usar esta técnica para analizar la biodiversidad cultivable de bacterias endófitas en plantas de zarzamora. En nuestro trabajo generamos un banco de 116 cepas de bacterias endófitas de zarzamora, de las cuales se aisló y secuenció la gran mayoría el gen ribosomal 16S (102 aislados). Estudios similares han sido realizados por Zinniel *et al.* 2002. Dichos autores analizaron 31 plantas diferentes y se obtuvieron 119 aislados, de los cuales realizaron la identificación solamente de 6 aislados que correspondieron a *Microbacterium testaceum* (3), *Microbacterium sp.* (1), *Clavibacter michiganensis* (1) y *Curtobacterium sp.* (1), a los que posteriormente se les asignaron propiedades de biocontrol (Zinniel *et al.* 2002).

En nuestro trabajo logramos identificar bacterias endófitas de cinco Clases diferentes, incluyendo Actinobacterias, Bacilli, Alfarproteobacterias, Betaproteobacterias y Gamaproteobacterias. Así mismo, identificamos los siguientes OTUs: *Novosphingobium rosa*, *Sphingomonas spp.*, *Rhizobium miluonense*, *Rhizobium lusitanum*, *Burkholderia unamae*, *Burkholderia phytifirmans*, *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia terrae*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia sabiae*, *Burkholderia tropica*, *Burkholderia caledonica*, *Burkholderia spp.*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum frisingense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Dyella japonica*, *Dyella terrae*, *Dyella spp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus agaridevorans*, *Paenibacillus taichungensis*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus spp.*, *Conhella damuensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*,

Lysinibacillus spp., *Streptomyces minoensis*. Estudios de diversidad han sido realizados en diversas especies vegetales. Por ejemplo, Sun *et al.* 2008, aislaron bacterias endófitas asociadas a la raíz de arroz, en las que mediante el análisis del gen ribosomal 16S se obtuvieron 52 OTUs (Operational Taxonomic Units) correspondientes a Alfa, Beta, Gama, delta y Épsilon Proteobacteria, Acidobacterias y Arqueas, siendo las Betaproteobacterias el grupo más dominante. En este estudio se llevó a cabo la identificación de la comunidad endófitas, comparado con nuestro trabajo, donde obtuvimos un total de 116 aislados y de los cuales se logró la amplificación del gen ribosomal 16S de 102 aislados de los cuales se procedió a realizar su identificación primero mediante búsquedas en las bases de datos tipo BLAST y complementándolos posteriormente con la realización de análisis filogenéticos. Lo anterior se pudo agrupar a los diferentes aislados en un total de 40 especies diferentes, mostrando un estudio mucho más robusto de la comunidad de bacterias endófitas ya que estas 40 especies se agruparon en Alfa, Beta y Gama Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacterias, lo que si bien muestra una distribución de las divisiones ya encontradas como presentes en las comunidades de bacterias endófitas, se observa una diversidad poco observada. Esto sugiere la importancia de realizar estudios complementarios para la identificación de las especies, ya que con las búsquedas tipo BLAST se puede llegar a la identificación hasta género, mientras que los análisis filogenéticos complementan la información para asignarlas a especies, además de poder ver las relaciones filogenéticas de los aislados endófitos.

Para analizar la diversidad de bacterias endófitas se ha hecho uso de índices de diversidad ecológicos como lo es el índice de Shannon y el índice de Simpson, ejemplos de esto son los valores obtenidos para las bacterias endófitas de raíz de pimiento en donde se obtuvo un valor de 1.586 para el índice de Shannon y 0.738 para el índice de Simpson (Marisco *et al.* 2012) Así como los valores obtenidos para bacterias endófitas asociadas a raíz de pasto en donde se obtuvieron valores que variaron de 0.3 – 2.5 para el índice de Shannon (Pérez *et al.* 2010). Se puede observar que si bien las diversidades cambian en base al cultivo analizado, nuestros valores obtenidos para las bacterias endófitas asociadas a raíces de zarzamora de

3.34 para el índice de Shannon y 0.95 para el índice de Simpson, nos indican que la comunidad de bacterias endófitas asociadas a raíces de zarzamora es una comunidad altamente diversa, con la dominancia de algunas especies. Sin embargo, es más diversa que otros cultivos reportados, siendo interesante resaltar que los valores obtenidos son incluso mayores que valores observados en comunidades de bacterias distintas a las endófitas, como lo pueden ser algunas comunidades de bacterias rizosféricas.

En este mismo sentido, es de resaltar que la comunidad es altamente diversa aun cuando las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas no fueron tan altas como en otros estudios, ya que se obtuvieron 6×10^2 UFC/g raíz comparado con otros estudios en los que se obtuvieron valores en el orden de $10^2 - 10^4$ CFU/g de tejido de plantas de Álamo (Germaine 2004), otro en donde se obtuvieron niveles de $10^2 - 10^3$ CFU/g de tejido de raíz de arroz (Gyaneshwar 2001), otro en donde se obtuvieron niveles de $10^3 - 10^4$ CFU/g de tejido de raíz cítricos (Araujo 2002) y uno más en donde se obtuvieron niveles de $10^2 - 10^6$ CFU/g de tejido de caña (Mendes 2007), lo que nos dice que las UFC no están directamente relacionadas con el número de especies presentes en la comunidad.

Una vez identificadas las bacterias endófitas presentes en las raíces de zarzamora, se realizaron búsquedas en la literatura sobre los posibles papeles que estén llevando a cabo estos géneros en interacción con la planta. Principalmente con la intención de conocer qué especies de aislados habían sido ya reportados como endófitos asociadas a otras plantas. Nuestros resultados mostraron que 14 especies de aislados bacterianos endófitos de zarzamora, hasta donde sabemos, no tienen reporte previo como bacterias endófitas, lo cual es muy interesante ya que aunado a que la comunidad es diversa se tienen nuevas especies endófitas, lo que nos habla nuevamente de su gran diversidad. Estas especies son *Novosphingobium rosa* (aislada solamente de la rizósfera), *Herbaspirillum huttiense subsp. putei* (aislada solamente de agua), *Burkholderia terrae* (aislada solamente de rizósfera), *Paenibacillus taichungensis* (aislada solamente de la rizósfera), *Paenibacillus lautus* (aislada solamente de agua), *Dyella terrae* (aislada solamente de la rizósfera),

Dyella japonica (aislada solamente de la rizósfera), *Cohnella damuensis* (aislada solamente de la rizósfera), *Bacillus marisflavi* (aislada solamente de agua), *Bacillus circulans* (aislada solamente de la rizósfera), *Bacillus safensis* (aislada solamente de la rizósfera), *Streptomyces minoensis* (aislada solamente de la rizósfera), *Rhizobium miluonense* (nodulando su huésped trébol) y *Rhizobium lusitanum* (nodulando su huésped frijol). Como se puede observar, estas bacterias endófitas sin previo reporte se distribuyen en Proteobacteria (7 representantes), Firmicutes (6 representantes) y Actinobacterias (1 representante); como se puede ver, se encuentran distribuidas en todas las divisiones en que se encontraron bacterias endófitas, con lo que se refuerza la idea de que no importa que ya se hayan encontrado bacterias en las diferentes divisiones, siempre se puede ir ampliando el listado de bacterias endófitas para posteriormente analizar que capacidades puedan presentar.

Posterior a la identificación de los aislados y al análisis de la diversidad de especies que se encuentran asociadas a la raíz de zarzamora, es conveniente analizar la posible función que se encuentren realizando estas bacterias en su ambiente, por lo que, como un primer acercamiento, analizamos las capacidades que tienen de producir *in vitro* diferentes compuestos que les puedan conferir efecto en el desarrollo vegetal.

En este estudio se decidió realizar la búsqueda de posibles actividades de antagonismo o biocontrol, así como de mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal. Por lo que se decidió analizar la producción de sideróforos, producción de índoles, producción de proteasas, actividad de antagonismo en contra de un hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, si bien no se usaron pruebas muy finas para este fin, se usaron aquellas que nos dan un acercamiento y nos dan datos de produce no produce, para en estudios posterior llevar a cabo estudios más específicos que nos permitan cuantificar estas actividades. Se encontró que 41 de las 102 cepas analizadas producen Índoles, 23 de las 102 cepas analizadas producen proteasas, 27 de las 102 cepas producen sideróforos y 4 de las 102 cepas presentan antagonismo contra *Botrytis cinerea*. Esto nos da un acercamiento en el

que se pueden ir separando las cepas acorde a sus actividades, resaltando algunas cepas que presentan más de una actividad como lo es *Dyella japonica* (Indoles, Proteasas, Sideróforos, Antagonismo), *Burkholderia phymatum* (Proteasas, Sideróforos, Antagonismo), *Bacillus cereus* (Indoles, Proteasas, Antagonismo), *Burkholderia caledonica* (Indoles, Sideróforos), *Herbaspirillum frisingense* (Indoles, Sideróforos), *Herbaspirillum huttiense* (Indoles, Sideróforos), *Dyella terrae* (Indoles, Sideróforos), *Cohnella damuensis* (Indoles, Sideróforos). Estudios similares han sido reportados por Jia-Hong *et al.* 2013, en el que analizan la capacidad que tiene la bacteria endófito *Bacillus pumilus* JK-SX001 en contra de 3 hongos fitopatógenos (*Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospora*, *Fusicoccum aesculi*) culpables de la enfermedad de cáncer del Álamo, esta bacteria fue extraída de álamo y vieron que tiene capacidades de inhibir el crecimiento de estos hongos tanto un vitro como en pruebas de invernadero con lo que se dice que las bacterias endófitas son buenas para controlar enfermedades, en este estudio se concluye que la inhibición se da por las enzimas líticas producidas por JK-SX001; otro estudio más amplio es el realizado por Polpass *et al.* 2014, en el que se analizan las capacidades que tienen 9 bacterias endófitas asociadas a pasto de solubilizar fosfato (3 aislados), producción de AIA (4 aislados), producción de acetoína (1 aislado) y fijación de nitrógeno (9 aislados), estos aislados pertenecen a Gamaproteobacterias, Firmicutes y Actinobacterias, las cuales presentan múltiples actividades de promoción de crecimiento vegetal y se sugiere que las actividades que realizan estas bacterias endófitas debe ser muy similar a las que realizan en la rizósfera.

Finalmente, se puede concluir que la biodiversidad de bacterias endófitas de zarzamora es alta comparado con otras comunidades endófitas de plantas. Adicionalmente, fue interesante encontrar especies que no tienen reporte previo como endófitas, lo que demuestra que nuestro trabajo aporta un nuevo conocimiento sobre el estilo de vida de diversas bacterias no conocidas como endófitas de plantas. Lo anterior nos indica que falta mucho por conocer y analizar nuevas especies, así como los posibles papeles ecológicos que llevan a cabo en los tejidos internos de la planta, develando nuevas interacciones planta-bacteria y un estilo de vida endófito.

10. Resumen de resultados

- Se generó un banco de 116 cepas de bacterias endófitas de zarzamora
- Se secuenció el gen ribosomal 16S de 102 aislados.
- Se realizaron filogenias correspondientes a cinco diferentes clases encontradas.
- Se identificaron 20 cepas correspondientes a 14 especies que no han sido reportadas como bacterias endófitas
- Las bacterias endófitas de raíces de zarzamora presentan una alta diversidad de acuerdo al índice de Shannon.
- Las bacterias endófitas de raíz de zarzamora producen compuestos relevantes en el desarrollo vegetal (biocontrol y promoción del crecimiento): 41 cepas produjeron indoles, 23 cepas produjeron proteasas, 27 cepas produjeron sideróforos y 4 cepas presentaron antagonismo contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

11. Conclusión

En los tejidos de la raíz de zarzamora (*Rubus fruticosus*) existe una alta diversidad de bacterias endófitas, algunas de las cuales no tienen reporte previo como endófitas y otras producen compuestos relevantes en la interacción planta microorganismo.

12. Perspectivas

- Realizar pruebas de antagonismo con diferentes hongos fitopatógenos.
- Analizar los perfiles de compuestos volátiles.
- Realizar pruebas de biocontrol (Interacción planta-microorganismo).
- Comparar la diversidad de bacterias endófitas de raíz con las de tallo y hoja.
- Realizar estudios de dinámica de poblaciones (diferentes tiempos y lugares).

13. Bibliografía

- Araujo W. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylela fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4906-4914
- Berg G. (2009). Plant-microbe interaction promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agricultura. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 11-18
- Chi F. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growthphysiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7271-7278
- Hallmann J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914
- Hardoim Pablo R., van Overbeek Leo S., van Elsas Jan Dirk (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463-471
- Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312: 7-14
- Hiltner L. (1904). Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft* 98: 59-78
- Hirsch P. & Mauchline T. (2012). Who's who in the plant root microbiome? *Nat. Biotechnol.* 30: 961-962
- McCully M. E. (2001). Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 983-990

Mora C. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 9, e1001127

Peer M. Schenk, Lilia C. Carvalhais, Kemal Kazan (2012). Unraveling plant-microbe interactions: Can multi-species transcriptomics help?. *Trends in Biotechnology*

Perotti R. (1926). On the limits of biological inquiry on soil science. *Proc. Int. Soc. Soil Sci.* 2: 146-161

Raaijmakers J. M., Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborn pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil* 321: 341-361

Reiter B. & Sessitsch A. (2006). Bacterial endophytes of the wild flower *Crocus albiflorus* analysed by characterization of isolated and by a cultivation-independent approach. *Can. J. Microbiol* 52:140-149

Rosenblueth M. and Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interaction with host. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 827-837

Smalla K., Sessitsch A., Hartmann A. (2006). The Rhizosphere: "soil compartment influenced by the root". *FEMS Microbiology Ecology* 56: pp. 165

Sorensen J. & Sessitch A. (2006). Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. *In Modern Soil Microbiology CRC Press:* 211-236

Welbaum G., Sturz A. V., Dong Z., Nowak J. (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 175-193

Wilson D. (1995). Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276

SAGARPA 2013

SIAP-SIACON 2012

Rashid S., Charles T.C, Glick B:R, 2012. Isolation and characterization of new plantagrowth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology* 61, 217-224.

Polpass A:J: Ilangovan S.S, Klanju Krishan K.S. , Solomon R.D.J., 2014. Molecular phylogeny and plant growth promoting traits of endophytic bacteria isolated from roots of seagrass *Cymodocea serrulata*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 43(4), 571-579.

Sessitch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wezel W.W., Fallman K., Puschenreiter M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 60, 182-194.

Hoffman M.T. Guantilaka M.K., Wijeratne k., Guantilaka L. Arnold A.E., 2013. Endophytic Bacteria Enhances Production of Indole-3-Acetic acid by a Foliar Fungal endophyte. *PLOS ONE* 8(9).

Ren j.h., Wang Y:f , Ye J.R., Yan A.Q. Wu X.Q., 2013. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. *Biological Control* 67, 421- 430.

Long H.H., Sonntag D.G., Schmidt D. D., Baldwin I.T., 2010. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. *New Phytologist* 185,554-567.

San L. Qiu F. Zhang X. Dai X., Dong X., Sang W., 2008. endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S DNA Sequence Analysis. *Microb ecol.* 44, 415- 424.

Rinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuezmarski D., Higley P., Ishimara C.A., Arana Kumari A., Barletta R.G., Vidaver A.K., 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68,2198-2208.

Perez C.A., Rosas S.J., Fuentes C.J. 201. Diversity of bacteria total and endophytes associated with roots of *Bathriochloa perstusa* (L) A.camus.

Marasco. R., Rolli E., Ettoumi B., Vigani g., Mapelli F., et al. (2012) A Drought Resistance-Promoting Microbiome is Selected by Root system under. Desert Farming *Phos ONE* 7(10).

Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A., Wellington, L. Arango, Roijmakers, J., 2007. Diversity of Cultivated endophytic Bacteria from *Sagartene*: Genetic and Biochemical Characterization of *Bacteroides cepacia* Complex Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 7259-7267.

Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., JR., Van Elsa, J.D., van Vuurde, J. W.L. Azevedo, J.L., 2002. Diversity on endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Appl Environ Microbiol.*, 68, 4906-4914.

Gyaneshawar, P. James, E. K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold- Harek, B., Ladha, J.K., 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183, 2634-2645.

Germaine, K., Keogh, E. Bomemans, B. Et al, 2004. Colonisation of poplar trees by GFP expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 109-118.

Weyens, N., Vander liehe., Do., Taghavi., S., Vangrensveld, J., 2009. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Carr. Opin. Biotechnol.*, 20, 248-254.

Reinhold-Hurek., B., Hurek., T., 2011. living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in Plant biology* 14, 435-443.

Zar., J.H 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall.

Weisbatg., W.G., Barns, S.M., Pelletier, D. A., Lane, D.J. , 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study *J.Bacteriol.* 173, 697-703.

Darwing, C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural selection or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London.

Bacon, C.W., Hinton , D.M., 2007. Bacterial endophytes}: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: *Plant-associated bacteria*: In. Gnanamanic-Kam, S.S., Ed. Springer, 155-194.

Canny, M.J., Mc Cully, M.E., 1993. What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscope. *Physiol Plant* 87, 561-568.

Canny, M.J., Mc Cully, M.E., 1988. The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. *Aust J. Plant. Physiol.* 15, 557-566.

Madore, M.; webb, J.A., 1981. Lead fice space analysis and vein bading in carcarbita pepo. *Can J.Bot.* 59, 2550-2557.

Demain, A.L., Sanchez , S., 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* 62, 5 -16.

Gregary, P.J., 2006. *Plant roots: Growth, Activity and Interaction with soils*. Blackwell Publishing, Oxford. 318.

Tan, Z., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2003. Effect on N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 5, 1009-1015.

Pillay, V.K., and Nowak, J., 1997. Inoculum density, temperature and genotype affects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can J. Microbiol.* 44, 354-361.

Kobayashi, D.Y., and Palumbo, J. Effects on plants and weeds in agriculture Microbial endophytes, 199-233.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S. *et al.*, 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 748-757.

Khan, Z., Doty, S.L., 2009 Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant Soil* 322, 197-207.

Suryanarayanan, T.S., The nnaresan, S., 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria nabra* leaves. *Fungal Divers* 15, 197-204.

Posada, F. Vega, F.E., 2005. Establishment of the fungal endopathogen *Beanveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Micologia* 97, 1195-1200.

Sarette, M.A., Starz, A. V. Lada, R.R., Nowak, J., 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. *Van-satiuus*): their localization population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 253, 381-390.

McInroy, J.A., Kloepper, J.W. 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Can J. Microbiol.* 41, 895-901.

Miche, L. Blandrean, J., (2001) Effects of nice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ Microbiol.* 67, 3096-3052.

Starz, A.V. Chritic, B.R. And Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev Plant Sci.* 19:1-30.

Bohm, M., Hurek, T. Reinhold-Hurek, B., 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azorhizobium ciceri* strain Bh72. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 526-533.

Dörr, J., Hurek, T. Reinhold-Hurek, B., 1998. Type IV pili and in vivo plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular microbiology* 30, 7-17.


14. Coautorías

Durante mi formación académica participe en la coautoría de un artículo de difusión en la revista Biológicas y en un artículo indexado en la revista Biological control, los cuales se muestran a continuación.

Biológicas Diciembre 2013, 15(2): 36-41



Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*

Daniel Rojas-Solís, Miguel Contreras-Pérez y Gustavo Santoyo 

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México. 58030



Biological Control

Volume 81, February 2015, Pages 83–92



Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains

Rocío Hernández-León, Daniel Rojas-Solís, Miguel Contreras-Pérez, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Lourdes I. Macías-Rodríguez, Homero Reyes-de la Cruz, Eduardo Valencia-Cantero, Gustavo Santoyo 