

BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE *Zea mays* “maíz” PRODUCTORAS DE AUXINAS. AYACUCHO-2019

Saúl A. Chuchón Martínez, Rilder N. Gasteú Quispe¹

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas

Programa de Investigación: Biodiversidad y Gestión Ambiental-Línea de Investigación: Biodiversidad

E-mail: saulchuchonmartinez@gmail.com

RESUMEN

El objetivo general fue evaluar la capacidad de las bacterias endofíticas de *Zea mays* “maíz” en la producción de auxinas. Ayacucho-2019. La población y muestra estuvo constituida por: Población A: plantas de *Zea mays* “maíz”, MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN proporcionadas por el INIA Canaán - Ayacucho, cultivadas, mediante prácticas agrícolas comunes, en terrenos de la ciudad universitaria “Los Módulos”. Muestra A: 5 plántulas, en cada caso, de *Zea mays* de 1, 2 y 3 meses de edad. Población B: bacterias endofíticas de *Zea mays* “maíz”. Muestra B: bacterias endofíticas aisladas a partir de 5 plántulas, en cada caso, de *Zea mays* de 1, 2 y 3 meses de edad. Las muestras de *Zea mays* “maíz”, se colectaron como plántulas (íntegras: raíz, tallo y hojas) seleccionando aquellas plántulas sanas y vigorosas, con hojas que no estén en contacto con el suelo. Fueron colocadas en bolsas de polietileno nuevas, cerradas, rotuladas y transportadas al Laboratorio de Microbiología Ambiental. El mismo día de muestreo (sin exceder las 2 horas entre el muestreo y procesamiento), se procedió a la selección de las raíces, tallos y hojas, (edad media, sanas, sin daños mecánicos, íntegras, etc.), la desinfección de plántulas y aislamiento de bacterias endofíticas fue realizado mediante la técnica por fragmentos (Araujo, W. y col. 2002). Cada cepa fue identificada mediante coloraciones diferenciales y pruebas bioquímicas. La capacidad de producción de auxinas por cepas bacterianas endofíticas se siguió el protocolo establecido por Celis y Gallardo, (2008). Se lograron aislar 61 cepas de bacterias endofíticas de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN; de plántulas de un mes de edad se aislaron 24 cepas: 9 de raíces, 3 de tallos y 12 cepas de hojas; de plántulas de dos meses de edad se aislaron 22 cepas: 8 de raíces, 2 de tallos y 12 de hojas; y, de plántulas de tres meses de edad, se aislaron 15 cepas: 4 de raíces, 3 de tallos y 8 cepas de hojas. De las 61 cepas bacterianas endofíticas de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN; 44 (72.1%) fueron Gram negativas y 17 (27.9%) fueron Gram positivas; de las cuales una cepa (1.6%) fue un coco, 6 cepas (9.8%) cocobacilos y el resto 54 (88.5%) bacilos; todas las cepas mostraron capacidad de ser móviles y ser catalasa positivas. La capacidad de producción de auxinas por parte de cepas bacterianas aisladas de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN, aún no se pudo realizar por el impedimento de ingreso a los laboratorios por la declaratoria de emergencia por la pandemia de COVID-19, actividad que queda pendiente.

Palabras clave: *Zea mays*, endofíticos, auxinas.

BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE *Zea mays* “maíz” PRODUCTORAS DE AUXINAS. AYACUCHO-2019

ABSTRACT

The general objective was to evaluate the capacity of the endophytic bacteria of *Zea mays* "corn" in the production of auxins. Ayacucho-2019. The population and sample consisted of: Population A: *Zea mays* "corn" plants, MAIZE INIA 615 - BLACK CANAAN provided by the INIA Canaan - Ayacucho, cultivated, through common agricultural practices, on land of the university city "Los Modulos". Sample A: 5 seedlings, in each case, of *Zea mays* at 1, 2 and 3 months of age. Population B: *Zea mays* "maize" endophytic bacteria. Sample B: endophytic bacteria isolated from 5 seedlings, in each case, of *Zea mays* at 1, 2 and 3 months of age. The samples of *Zea mays* "maize" were collected as seedlings (whole: root, stem and leaves) selecting those healthy and vigorous seedlings, with leaves that are not in contact with the soil. They were placed in new, closed, labeled polyethylene bags and transported to the Environmental Microbiology Laboratory. On the same sampling day (without exceeding 2 hours between sampling and processing), the roots, stems and leaves were selected (middle age, healthy, without mechanical damage, intact, etc.), the disinfection of seedlings and isolation of endophytic bacteria was performed using the fragment technique (Araujo, W. et al. 2002). Each strain was identified by differential staining and biochemical tests. The production capacity of auxins by endophytic bacterial strains was followed by the protocol established by Celis and Gallardo, (2008). It was possible to isolate 61 strains of endophytic bacteria from seedlings of *Zea mays* "maize" MAIZE INIA 615 - BLACK CANAAN; from one-month-old seedlings 24 strains were isolated: 9 from roots, 3 from stems and 12 strains from leaves; 22 two-year-old seedlings were isolated: 8 from roots, 2 from stems and 12 from leaves; and, from three-month-old seedlings, 15 strains were isolated: 4 from roots, 3 from stems and 8 strains from leaves.

¹colaborador

Of the 61 bacterial endophytic strains of *Zea mays* "maize" seedlings MAIZE INIA 615 - BLACK CANAAN; 44 (72.1%) were Gram negative and 17 (27.9%) were Gram positive; of which one strain (1.6%) was a coconut, 6 strains (9.8%) were cocobacilli and the rest 54 (88.5%) were bacilli; all the strains showed the ability to be mobile and to be catalase positive. The production capacity of auxins by bacterial strains isolated from seedlings of *Zea mays* "maize" MAIZE INIA 615 - BLACK CANAAN, could not yet be realized due to the impediment of entry to the laboratories due to the declaration of emergency due to the COVID pandemic -19, pending activity.

Key words: *Zea mays*, endophytic, auxins.

INTRODUCCIÓN

Con el conocimiento de que el maíz es uno de los cultivos más importantes del mundo el cual es cultivado en el Perú por sus aportes alimenticios y otras bondades, cuya producción se ve influenciada por diversos factores como el clima, altitud, tipo de suelo, uso de fertilizantes y fitohormonas. Por otro lado, los microorganismos endofíticos son aquellos que viven en el interior de plantas habitando, de modo general, sus partes aéreas como tallos y hojas, sin causar, aparentemente, cualquier daño a sus hospederos. Ellos se distinguen de los patogénicos, que causan enfermedades en las plantas, y de los epifitos que viven en la superficie de los vegetales. Las relaciones complejas entre las bacterias endofitas y la planta hospedera, entre otras acciones benéficas, estimulan el crecimiento de plantas a través de la movilización de nutrientes del suelo, produciendo numerosos reguladores del crecimiento vegetal, protección de plantas de fitopatógenos por el control o inhibición de estos. Aunque existen muchas publicaciones referentes a las fitohormonas como metabolitos endógenos de las plantas, la producción microbiana de las mismas y sus efectos posteriores en el crecimiento vegetal han recibido poca atención. Algunos endofitos son capaces de sintetizar sustancias biológicamente activas similares a los metabolitos secundarios producidos por la planta hospedera. Las bacterias endofitas promotoras de crecimiento tienen la capacidad de colonizar el interior de las plantas y establecer un tipo especial de relación en la que ambos organismos pueden obtener beneficios de esta interacción. Dentro de la aparición de nuevas tecnologías para optimizar la implantación de los cultivos se encuentra el uso de los productos biológicos; es decir incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos. Dentro de este grupo se pueden citar a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal conocidos hoy como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism). Estos se definen como microorganismos habitantes de la rizósfera que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Los mecanismos por los cuales los PGPM ejercen efectos positivos sobre las plantas son numerosos.

No existiendo estudios referentes a microorganismos endofíticos del maíz, particularmente aquellos productores de auxinas; en la presente investigación se ha planteado como objetivo general: evaluar la capacidad de las bacterias endofíticas de *Zea mays* "maíz" en la producción de auxinas. Ayacucho-2019; y, como objetivos específicos: aislar bacterias endofíticas de *Zea mays* "maíz", medir la capacidad de producción de auxinas de bacterias endofíticas de *Zea mays* "maíz" e identificar las cepas bacterianas endofíticas de *Zea mays* "maíz" productoras de auxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población - muestra

Población A: plantas de *Zea mays* "maíz", MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN, cultivadas en terrenos de la ciudad universitaria "Los Módulos" de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Frontis de los laboratorios de docencia e investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Muestra A: 5 plántulas de *Zea mays* de un mes de edad, 5 plántulas de *Zea mays* de dos meses de edad y 5 plántulas de *Zea mays* de tres meses de edad; cultivadas en terrenos de la ciudad universitaria "Los Módulos" de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Frontis de los laboratorios de docencia e investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Población B: bacterias endofíticas de *Zea mays* "maíz" cultivadas en terrenos de la ciudad universitaria "Los Módulos" de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Frontis de los laboratorios de docencia e investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Muestra B: bacterias endofíticas aisladas a partir de 5 plántulas de *Zea mays* de un mes de edad, 5 plántulas de *Zea mays* de dos meses de edad y 5 plántulas de *Zea mays* de tres meses de edad; cultivadas en terrenos de la ciudad

universitaria “Los Módulos” de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Frontis de los laboratorios de docencia e investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Siembra de semillas de *Zea mays* “maíz”, MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN:

Antes de proceder a la siembra de semillas certificadas de *Zea mays* “maíz”, se acudió a las oficinas de la estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho del Instituto Nacional de Investigación Agraria perteneciente al Ministerio de Agricultura; para solicitar el suministro de semillas; como resultado de dicha gestión se nos proporcionó 400 gramos de semillas de *Zea mays* “maíz”, MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN.

En terrenos de la ciudad universitaria “Los Módulos” de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Frontis de los laboratorios de docencia e investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas se delimitó un área de aproximadamente 3 x 4 m (12 m²); terreno que fue preparado y abonado con humus y mezclado con tierra negra. A continuación se realizó la siembra de las semillas en surcos, a una profundidad de 10 cm; de los cuales, según lo proyectado, se obtuvieron las muestras de maíz al mes, a los dos meses y tres meses de edad (5 plántulas en cada muestreo).

Recolección de muestras de plántulas de *Zea mays* “maíz”: las muestras de *Zea mays* “maíz”, se colectaron plántulas (íntegras: raíz, tallo y hojas) seleccionando aquellas plántulas sanas y vigorosas, con hojas que no estén en contacto con el suelo; se obtuvieron 5 plántulas de “maíz” de cada edad, uno, dos y tres meses, respectivamente. Una vez extraídas las plántulas, con ayuda de espátulas o piquetas, éstas fueron colocadas dentro de bolsas de polietileno nuevas, cerradas, rotuladas y transportadas inmediatamente al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

Tratamiento de muestras en laboratorio: Una vez en los ambientes de laboratorio, el mismo día de muestreo (sin exceder más de 2 horas entre la hora de muestreo y procesamiento), se procedió a la selección de las raíces, tallos y hojas más adecuadas, (edad media, sanas, sin daños mecánicos, íntegras, etc.), para su desinfección con hipoclorito de sodio (Pereira y col. 1993; Araujo y col, 2001).

Aislamiento de bacterias endofíticas: El aislamiento fue realizado mediante la técnica por fragmentos, tanto de raíces, tallos y hojas (Araujo, W. y col. 2002).

Las cepas de bacterias obtenidas fueron cultivadas en viales para obtener un cepario. Cada cepa fue identificada mediante coloraciones diferenciales y pruebas bioquímicas.

Capacidad de producción de auxinas por cepas bacterianas endofíticas:

Preparación de inóculos microbianos: a partir de cepas de bacterias endofíticas de *Zea mays* “maíz” cultivadas en medio TSA, se prepararon suspensiones de células en solución salina al 0,85% estéril, hasta alcanzar una concentración de 10⁸ células/ml, por comparación con la escala de Mcfarland.

Fermentación discontinua de cepas bacterianas endofíticas para la producción de auxinas: la fermentación fue realizada en matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 90 ml de caldo soya tripticase al cual se le adicionaron 10 ml de inóculo microbiano. Estos matraces fueron incubados a temperatura ambiente, en agitación orbital a 100 rpm, durante 7 días. Cada 24 horas, se tomaron 4 ml de caldo de cultivo, durante 7 días de la fermentación. Las muestras de cultivo fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, se tomaron los sobrenadantes y transferidos a tubos eppendorf, posteriormente se congelaron hasta la evaluación de la presencia de auxinas (Celis y Gallardo, 2008).

Detección de auxinas microbianas: Para la determinación de la concentración (µg/ml) de auxinas (ácido indol acético: AIA), producidos por cada cepa bacteriana, se realizó mediante el uso de reactivo de Salkowsky a base de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 7,9 M y FeCl₃ 40 mM), previa elaboración de una curva patrón de diferentes concentraciones (0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 y 30 µg/ml) de AIA comercial. Las reacciones fueron realizadas a una proporción de 2 ml de reactivo de Salkowsky más 1 ml de muestra (solución de sobrenadante de cultivo microbiano o soluciones patrón), estas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente fueron leídas la absorbancia con un espectrofotómetro a 530 nm. Las mediciones fueron realizadas por triplicado (Celis y Gallardo, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. número de muestreos, edad, número de plántulas muestreadas, órganos de las plántulas procesadas y cantidad de fragmentos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN, procesadas para el aislamiento de bacterias endofíticas. Ayacucho – 2019.

Muestreo	Edad	Nº De Plántulas	Parte De La Plántula	Nº De Fragmentos Cultivados
1	1 mes	5	Raíz	5
			Tallo	5
			Hoja	5
2	2 meses	5	Raíz	5
			Tallo	5
			Hoja	5
3	3 meses	5	Raíz	5
			Tallo	5
			Hoja	5

En la tabla 1 se muestran el número de muestreos, edad, número de plántulas muestreadas, órganos de las plántulas procesadas y cantidad de fragmentos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN, procesadas para el aislamiento de bacterias endofíticas; en el que podemos apreciar que se han realizado tres muestreos, en tres fechas diferentes, teniendo en cuenta la edad de las plántulas (1, 2 y 3 meses); se han obtenido 5 fragmentos de órganos diversos (raíz, tallo y hoja); en cada muestreo fueron sometidos a aislamiento 15 fragmentos de diversos órganos. Este procedimiento se hizo con la intención de aislar la mayor cantidad de cepas bacterianas endofíticas posibles, puesto que existen investigaciones que informan que existen variación de la presencia de microorganismos endofíticos en los diversos órganos de la misma planta y también muestran diferencias dependiendo de la edad de la planta.

La mayoría de las endofitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos del xilema. Algunos de ellas son capaces de colonizar los órganos reproductores de las plantas, por ejemplo, flores, frutos y semillas (STONE et al., 2000). Forman infecciones discretas dentro de los tejidos de plantas sanas para todo o casi todo su ciclo vida. (LIMSUWAN et al., 2009). Los estudios han demostrado que, alrededor de 30,000 especies de plantas están asociada con una o varias poblaciones de especies de bacterias (STROBEL y DAISY 2003; HUANG et al., 2008). En los últimos años, ha despertado interés cada vez mayores aspectos relacionados con la composición, estructura y función de comunidades bacterianas y en particular las unidades fundamentales de las cuales están compuestas (WARD, 2006 citado por Pérez et al., 2013).

Al respecto podemos indicar que las asociaciones entre endofitos no sistémicos y plantas vienen marcadas por la ubicuidad. Hasta la fecha se han descubierto endofitos en todas las especies vegetales que han sido analizadas (Saikkonen et al., 1998; Stone et al., 2004; Arnold, 2007; citados por Sánchez, M. 2009) y en los ecosistemas más variados, desde bosques tropicales, a tundras y desiertos (Fisher et al., 1995; Arnold et al., 2000; Higgins et al., 2006; Murali et al., 2007; Porras-Alfaro et al., 2008; citados por Sánchez, M. 2009). Dicho de otra manera; en la actualidad, descubrir una especie vegetal sin endofitos se consideraría una rareza. La diversidad taxonómica de los endofitos no sistémicos es notable. El número de especies endofíticas asociadas a cada especie vegetal es elevado; en censos de endofitos anteriores al año 2000, como media se identificaron unas 50 especies por cada especie de planta analizada (Stone et al., 2004). Cuando se empezaron a utilizar métodos moleculares para la identificación de especies fúngicas este número aumentó debido a que las especies estériles pudieron ser clasificadas (Arnold et al., 2000; Guo et al., 2000; citados por Sánchez, M. 2009). Este avance ha supuesto que en algunos censos se hayan detectado cientos de especies endofíticas en una sola especie vegetal (Collado et al., 1999; Arnold et al., 2000; citados por Sánchez, M. 2009).

Los endofitos no sistémicos se han encontrado en diversas partes de las plantas, como hojas, tallos, órganos reproductores e incluso semillas. Esto los distinguiría de las micorrizas, las cuales solo infectan la raíz de las plantas. Sin embargo, algunos endofitos pueden también alojarse en tejidos de la raíz, por lo que en ocasiones la distinción in vivo no es firme. En estudios realizados a finales del siglo pasado se vio que es habitual que haya diferencias entre la frecuencia de endofitos aislados de varios órganos de la planta (Fisher y Petrini, 1992; Rodrigues, 1994; Carroll, 1995; citados por Sánchez, M. 2009).

Hasta la actualidad, muy pocos estudios hablan de una especificidad de los endofitos por el tejido. Se han visto casos de especificidad de ciertos endofitos por las raíces de las plantas (Jumpponen y Trappe, 1998; Mandyam y Jumpponen, 2005; Waller et al., 2005; Porras-Alfaro et al., 2008; citados por Sánchez, M. 2009), y por las semillas (Gallery et al., 2007; citado por Sánchez, M. 2009).

Tabla 2. Número de cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de un mes de edad. Ayacucho – 2019.

Órgano Vegetal	Frag-Mento	Nº de Cepas	Código de Cepa	Nº Total de Cepas
Raíz	1	0		9
	2	2	IR2a	
	3	2	IR2b	
			IR3a	
			IR3b	
4	4	IR4a		
		IR4b		
		IR4c		
		IR4d		
Tallo	5	1	IR5	3
	1	1	IT1	
	2	0		
	3	0		
	4	2	IT4a	
Hoja	5	0	IH1a	12
			IH1b	
	1	3	IH1c	
			IH2a	
			IH2b	
	2	2	IH3	
	3	1	IH4a	
			IH4b	
	4	2	IH5a	
			IH5b	
IH5c				
IH5d				
Número total de cepas				24

Tabla 3. número de cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mayz* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de dos meses de edad. Ayacucho – 2019.

Órgano Vegetal	Fragmento	Nº de Cepas	Código de Cepa	Nº Total de Cepas
Raíz	1	1	IIR1	8
	2	2	IIR2a	
	3	2	IIR2b	
			IIR3a	
	4	1	IIR3b	
5	2	IIR4		
Tallo	5	2	IIR5a	2
			IIR5b	
	1	1	IIT1	
	2	0		
	3	1	IIT3	
Hoja	4	0		12
	5	0		
	1	3	IIH1a	
			IIH1b	
			IIH1c	
	2	2	IIH2a	
	3	2	IIH2b	
IIH3a				
4	3	IIH3b		
4	3	IIH4a		
		IIH4b		

	5	2	IIIH4c IIIH5a IIIH5b	
Número total de cepas				22

Tabla 4. número de cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de tres meses de edad. Ayacucho – 2019.

Órgano Vegetal	Fragmento	Nº De Cepas	Código De Cepa	Nº Total De Cepas
Raíz	1	1	IIIR1	4
	2	0		
	3	0		
	4	2	IIIR4a IIIR4b	
	5	1	IIIR5	
Tallo	1	1	IIIT1	3
	2	1	IIIT2	
	3	1	IIIT3	
	4	0		
	5	0		
Hoja	1	2	IIIH1a IIIH1b	8
	2	2	IIIH2a IIIH2b	
	3	1	IIIH3	
	4	2	IIIH4a IIIH4b	
	5	1	IIIH5	
Número total de cepas				15

Tabla 5. número de cepas bacterianas endofíticas aisladas, en tres muestreos, a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN al mes, dos meses y tres meses de edad. Ayacucho – 2019.

Muestreo/Edad	Órgano Vegetal	Nº de Cepas/Órgano Vegetal	Nº Total de Cepas
I 1 mes	Raíz	9	24
	Tallo	3	
	Hoja	12	
II 2 meses	Raíz	8	22
	Tallo	2	
	Hoja	12	
III 3 meses	Raíz	4	15
	Tallo	3	
	Hoja	8	
TOTAL			61

En las tablas 2, 3 y 4 se pueden apreciar el número de cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de uno, dos y tres meses de edad. Ayacucho – 2019; habiéndose aislado 24, 22 y 15 cepas bacterianas, respectivamente; haciendo un total de 61 cepas. Además, la tabla 05 nos muestra que el órgano del cual se obtuvieron el mayor número de aislamientos fue de las hojas con 32 cepas, seguido de la raíz con 21 cepas y finalmente el tallo con 8 cepas. Nuestros resultados son corroborados por otros investigadores que hallaron la misma tendencia; en los estudios con hojas, que son los órganos en los que más se ha estudiado la presencia de endofitos (Arnold, 2007; citado por Sánchez, M. 2009), las tasas de infección son elevadas, ya que entre el 78 y el 100% de las hojas analizadas contienen endofitos (Petrini et al., 1982; Arnold et al., 2000; citados por Sánchez, M. 2009). Al estudiar la distribución de los endofitos en las

hojas, se han obtenido estimaciones que indican que entre el 30 y el 73% de los fragmentos de cada hoja pueden estar colonizados por endofitos (Rodrigues, 1994, Arnold et al., 2000; citados por Sánchez, M. 2009)). Rodrigues y Samuels, 1999; citados por Sánchez, M. 2009, mencionan que en trabajos sobre endofitos de hojas, no se puede afirmar que las especies aisladas muestren especificidad por este tejido, ya que no se han realizado los estudios pertinentes para saber si en otras partes de la planta podrían aislarse las mismas especies como endofitos. Lo que si se ha observado es que dentro de las hojas puede existir especificidad por la zona donde se alojan dichos microorganismos. Por otro lado, Bacon & Hinton, 2007; citados por Notario, M. 2009, mencionan que las bacterias endófitas colonizan activamente tejidos de plantas, establecen asociaciones a largo plazo, en realidad asociaciones naturales de toda la vida y, generalmente no son órgano-específicas. Así, pueden estar asociadas a raíces, hojas y tallos y, unas pocas a inflorescencia y frutos

Los números de endófitas bacterianas contenidas dentro de tejidos de plantas varían, pero son sumamente mayores que las bacterias patogénicas. Se han reportado concentraciones internas hasta de 10^7 UFC/g de peso húmedo del tejido de plantas de varias especies, sin embargo, es normal encontrar concentraciones de 10^2 a 10^6 UFC/g de peso húmedo de tejido de plantas. El número total de bacterias endófitas que colonizan una planta está relacionado con su genotipo, factores bióticos y abióticos y, genotipo bacteriano. Las poblaciones endófitas fluctúan temporalmente, dependiendo en la temperatura de crecimiento y genética del hospedero, o bien sea intra- o interespecífica la presencia de endófitas o especies epífitas competidoras, alteraciones químicas en el hospedante, así como la sequedad, calor y salinidad de los suelos (Sturz, 2000; Bacon & Hinton, 2007; citado por Notario, M. 2009).

Existen reportes que avalan la presencia de varias endófitas en algunos hospederos, los cuales sirven como reservorios para un amplio rango de taxas endófitas. Por ejemplo, el tubérculo de papa, es habitado por: *Acidovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter ureafaciens*, *Bacillus alcohophilus*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *Capnocytophaga* sp., *Comamonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Curtobacterium citreum*, *C. luteum*, *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Flavobacterium* sp., *Kingella kingae*, *Klebsiella* sp., *Leuconostoc* sp., *Methylobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Pantoea* sp., *Photobacterium* sp., *Pseudomonas plymuthica*, *P. tolaasii*, *Psychrobacter* sp., *Serratia liquefaciens*, *S. proteamaculans*, *Shewanella* sp., *Sphingomonas aurantiaca*, *Vibrio* sp., *Xanthomonas* sp. (Hollis, 1951; Sturz, 1995, 1998; Sessitsch, 2004). Sin embargo, no se sabe cuántos de estos organismos están coexistiendo, en realidad, como endófitas fisiológicamente viables dentro del mismo nicho o están como propágulos dominantes (Bacon & Hinton, 2007; citado por Notario, M. 2009).

Tabla 6. resultados de tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas de cepas de bacterias endófitas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de un mes de edad. Ayacucho – 2019.

CEPA	GRAM	MORFOLOGÍA	LACTOSA	ESPORA	MOVILIDAD	CATALASA
IR2a	-	Bacilo	+	-	+	+
IR2b	-	Bacilo	-	-	-	+
IR3a	-	Cocobacilo	-	-	+	+
IR3b	+	Bacilo	-	+	+	+
IR4a	-	Bacilo	+	-	+	+
IR4b	-	Bacilo	-	-	+	+
IR4c	+	Coco	-	-	-	-
IR4d	+	Bacilo	-	+	+	+
IR5	-	Bacilo	-	-	+	+
IT1	-	Cocobacilo	-	-	-	+
IT4a	-	Bacilo	+	-	+	+
IT4b	-	Bacilo	+	-	+	+
IH1a	-	Bacilo	-	-	+	+
IH1b	+	Bacilo	-	+	+	+
IH1c	-	Bacilo	-	-	+	+
IH2a	-	Bacilo	-	-	+	+
IH2b	+	Bacilo	-	+	+	+
IH3	-	Cocobacilo	-	-	+	+
IH4a	-	Bacilo	+	-	+	+
IH4b	+	Bacilo	-	+	+	+
IH5a	-	Bacilo	+	-	+	+
IH5b	-	Bacilo	+	-	+	+
IH5c	-	Bacilo	-	-	+	+
IH5d	-	Bacilo	-	-	+	+

Tabla 7. resultados de tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas de cepas de bacterias endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de dos meses de edad. Ayacucho – 2019.

Cepa	Gram	Morfología	Lactosa	Espora	Movilidad	Catalasa
IIR1	+	Bacilo	-	+	+	+
IIR2a	-	Bacilo	-	-	-	+
IIR2b	-	bacilo	-	-	+	+
IIR3a	+	Bacilo	-	+	+	+
IIR3b	-	Bacilo	+	-	+	+
IIR4	-	Bacilo	-	-	+	+
IIR5a	+	Bacilo	-	+	-	+
IIR5b	+	Bacilo	-	+	+	+
IIT1	-	Bacilo	-	-	+	+
IIT3	-	Bacilo	+	-	+	+
IIH1a	+	Bacilo	-	+	+	+
IIH1b	-	Bacilo	-	-	+	+
IIH1c	-	Bacilo	-	-	+	+
IIH2a	+	Bacilo	-	+	+	+
IIH2b	-	Bacilo	-	-	+	+
IIH3a	-	Bacilo	+	-	+	+
IIH3b	+	Bacilo	-	+	+	+
IIH4a	-	Bacilo	+	-	+	+
IIH4b	-	Bacilo	+	-	+	+
IIH4c	-	Bacilo	-	-	+	+
IIH5a	-	Bacilo	-	-	+	+
IIH5b	-	Cocobacilo	-	-	+	+

Tabla 8. resultados de tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas de cepas de bacterias endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de tres meses de edad. Ayacucho – 2019.

Cepa	Gram	Morfología	Lactosa	Espora	Movilidad	Catalasa
IIIR1	-	Bacilo	+	-	+	+
IIIR4a	+	Bacilo	-	+	+	+
IIIR4b	-	Bacilo	-	-	+	+
IIIR5	+	Bacilo	-	+	+	+
IIIT1	-	Bacilo	-	-	-	+
IIIT2	-	Cocobacilo	+	-	+	+
IIIT3	-	Bacilo	-	-	+	+
IIIH1a	-	Bacilo	-	-	+	+
IIIH1b	+	Bacilo	-	+	+	+
IIIH2a	-	Bacilo	-	+	+	+
IIIH2b	-	Bacilo	-	-	+	+
IIIH3	-	Bacilo	+	-	+	+
IIIH4a	-	Cocobacilo	-	-	+	+
IIIH4b	-	Bacilo	+	-	+	+
IIIH5	+	Bacilo	-	+	+	+

Las tablas 6,7 y 8 Tabla 8 muestran los resultados de tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas de cepas de bacterias endofíticas aisladas a partir de diversos órganos de plántulas de *Zea mays* “maíz” MAÍZ INIA 615 – NEGRO CANAÁN de uno, dos y tres meses de edad. Ayacucho – 2019; habiéndose logrado aislar mayormente bacterias Gram negativas (44 cepas) y solamente 17 cepas Gram positivas; la gran mayoría morfológicamente son bacilos o cocobacilos y solamente una cepa fue catalogada como coco. Todas las cepas mostraron poseer la enzima catalasa, indicativo de que podrían ser aerobios o anaerobios facultativos, todas las cepas mostraron la capacidad de ser móviles, indicativo de que poseen flagelos; respecto a la capacidad de fermentar la lactosa nuestros resultados mostraron gran diversidad y todas las cepas bacilares Gram positivos mostraron la capacidad de formar endosporas. Estos resultados nos conducen a pensar que estaríamos frente a cepas no fermentadoras de lactosa como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*; cepas fermentadoras de lactosa como *Citrobacter*, *Enterobacter* o *Klensilla*; y, cepas bacterianas formadoras de endosporas como *Bacillus* incapaces de fermentar dicho azúcar.

Al respecto se menciona que existe una extensa diversidad de endófitos, pero los que se han estudiado con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia* y *Xantomonas* (Muñoz, J. y Caballero, J. 2003; Cocking, E. C. 2005; Dazzo, F. B. y Yanni, Y. G. 2006; España, M.; Cabrera, E. y López, M. 2006; citados por Dibut, B. y cols. 2009).

Las bacterias endófitas colonizan un gran número de plantas, no obstante, por razón de no provocar síntomas, estos organismos no pueden ser detectados, de no ser por su aislamiento a partir de la superficie esterilizada de plantas colocadas en agar bacteriológico; mismo procedimiento que dificulta generar un estimado válido del número de bacterias endófitas y sus funciones en la planta (Bacon & Hinton, 2007; citado por Notario, M. 2009).

Nuestros resultados son corroborados por los informes de Bacon & Hinton, 2007; citados por Notario, M. 2009, que manifiestan que las asociaciones biológicas de plantas han ocurrido con bacterias Gram positivas y Gram negativas, a pesar de sus principales diferencias en morfología celular y especializaciones bioquímicas, indicando los beneficios derivados de las asociaciones con plantas. Es más, filogenéticamente estas asociaciones han ocurrido en el grupo didermo y derivados y, en el grupo monodermo (referente a uno o dos membranas lipídicas envolviendo la célula, Gram positivo y negativo, respectivamente), siendo el primero, visto actualmente como el grupo más primitivo. No obstante, la mayoría de las especies endófitas se encuentran en el grupo de las bacterias monodermas, sugiriendo que las asociaciones endofíticas podrían ser un rasgo ancestral, en oposición, a lo visto a priori, de que es una característica evolutivamente derivada. Si en verdad la evolución de la bacteria ocurriera en una dirección progresiva en el tiempo, las bacterias endofíticas monodermas podrían no ser tan primitivas como la asociación sugiere, pues desde que los cambios ambientales han ocurrido sobre los periodos evolutivos sólo han permitido que éstas sobrevivan, viviendo en nichos protegidos tales como los espacios intercelulares de plantas. Por otro lado McInroy & Klopper, 1995; citados por Notario, M. 2009, indica que la incidencia de las bacterias endófitas, como vestigios de las formas primitivas, está reforzado por sus números bajos y, dentro de ellas, las cifras más abundantes pertenecen a los grupos de β -proteobacterias y γ -proteobacterias, colocándolos en el margen principal de evolución (Gupta, 2002), por ejemplo especies de *Burkholderia*. Sin embargo, esta conclusión esta basada en el número total de bacterias cultivables. Otro estudio de bacterias no-aisladas de maíz, basado en el análisis del 16S ADN extraído directamente de sus raíces, indicaron que el grupo Proteobacteria es el más grande, con la predominancia de las α -proteobacterias, seguido por las β -proteobacterias y, las γ -proteobacterias como el tercer grupo más abundante (Chelius & Tiplett, 2001; citado por Notario, M. 2009).

Estudios realizados en cultivos de arroz han identificadas una diversidad de poblaciones de especies de bacterias endófitas en rizósfera como en diferentes tejidos vegetales. En la rizosfera de esta especie vegetal principalmente se han reportados al género de bacterias endófitas *Azospirillum* (THAKURIA et al., 2004), *Herbaspirillum* (ELBELTAGY et al., 2001; RADWAN et al., 2004), *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azetobacter* y *Bacillus* (HERNANDEZ et al., 2004). Varios grupos de microorganismos del suelo como *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.*, *Azoarcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Serratia sp.* y *Rhizobium sp.* son consideradas PGPB's (KLOEPPER, 1983).

Debido a la cantidad cada vez mayor de fertilizantes nitrogenados y fosfatados que se utilizan para la producción de cultivos, la gran necesidad de energía para la producción de estos, y el impacto ambiental provocado por el lixiviado, es cada vez más importante tratar de extender el nitrógeno biológico fijados en plantas no leguminosas, así como a la utilización de solubilizantes de fosfato inorgánico de las reservas del suelo por las bacterias que lo vuelven disponible para las plantas en general. También es importante la comprensión de la interacción bacteria-planta en la producción de la auxina IAA y su uso en el aumento de la producción de cultivos, además del conocimiento de la diversidad de bacterias endofíticas para un posible uso de la misma de varias maneras. Debido a su adaptación a las condiciones internas de las plantas. De esta manera, este trabajo tuvo como objetivos estudiar la diversidad de bacterias endofíticas en el cultivo del maíz (*Zea mays*) y seleccionar endofíticas con potencial para la promoción del crecimiento y su actividad en la planta. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad de bacterias endofíticas en el cultivo de maíz (*Zea mays*) y seleccionar su potencial y actividad de crecimiento de la planta en la planta. La diversidad se evaluó en plantas recolectadas en cuatro lugares del estado de São Paulo y la identificación se realizó mediante el método de extracción de ácidos grasos (FAME). Se aisló un gran número de bacterias donde se puede observar la diferencia en la diversidad en relación con los lugares. La mayor diversidad de especies se observó en el lugar de Lins. El grupo Proteobacteria prevaleció en las comunidades bacterianas endofíticas, siendo la subdivisión β y γ y en la Enterobacteriaceae Family la más frecuente y con mayor diversidad. Los géneros más frecuentes fueron *Stenotrophomonas* y *Bacillus*. Las poblaciones endofíticas de maíz presentan características relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas como la producción de IAA, la fijación de nitrógeno y la solubilización del fosfato. Las diferentes condiciones de cultivo y genotipos, así como de la etapa de desarrollo, podrían haber influido en la diversidad fisiológica observada. Las bacterias endófitas pertenecientes a la especie *Klebsiella pneumoniae*, *Microbacterium saperdae*, *Stenotrophomonas maltophilia*,

Enterobacter cloacae, Bacillus megaterium y Pseudomonas mucidolens promovieron el aumento del peso de la raíz y de la parte aérea de las plantas de maíz, presentando un potencial de aplicación (Ceriglioli, M. 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo, W. Oliveira, A. Azevedo, J. Marcon, J. Kuklinsky, J. Texeira, P. 2002. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Departamento de Genética. Universidade de Sao Paulo.
2. Celis, L. Gallardo, I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
3. Ceriglioli, M. 2005. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Repositorio Institucional. UFSCar. URI <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/5427>
4. Dibut, R. Martínez-Viera, Marisel Ortega, Yoania Ríos, Grisel Tejada, Liuba Planas y Janet Rodríguez. 2009. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVA DE LAS RELACIONES ENDÓFITAS PLANTA-BACTERIA. ESTUDIO DE CASO *Gluconacetobacter diazotrophicus*-CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA. *Rev. Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 4, p. 16-23
5. Elbeltagy, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. 2001. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5285- 5293.
6. Hernández, A.; Rives, N.; Heydrich, Y.M. 2004. Caracterización de la comunidad microbiana y endófita asociada al cultivo del arroz variedad J- 104. En: Congreso Científico del INCA (14:2004, nov 9-12, La Habana). Memorias [CD-ROM]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
7. Holguin, G., y Patten, C. L. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. World Scientific.
8. Huang, ZJ.; CAI, XL.; Shao, CL.; She, ZG.; XIA, XK.; CHEN, YG. 2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp ZSU-H76. *Phytochemistry* 69: 1604-8.
9. Kloepper, J. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phitopathology.* 73: 217-219.
10. Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. and Zablutowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-43
11. Limsuwan, S.; TRIP, EN.; Kouwenc, T.; Piersmac, S.; HIRANRAT, A.; MAHABUSARAKAM, W.; ETAL, R. 2009. A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine* 16:645-51.
12. Notario, M. 2009. Aislamiento Y Caracterización De Bacterias Endófitas De Papa Asociadas Con Síntomas De Punta Morada. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Programa de Graduados Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
13. Perez, A., Chamorro, A. 2013. Bacterias endofitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 5(2):439-462,2013.
14. Radwan, T.; Mohamed, Z.K.; REIS, V.M. 004. Efeito da inoculacao de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na producao de compostos indolicos em plantulas de milho e arroz. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasilia 39(10): 987-994.
15. Stone, Jk.; Bsccon, Cw.; White, Jr. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. In: Becon CW, White Jr JF, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; p.3-29.
16. Sánchez-Fernández, R. Sánchez-Ortiz, B. Monserrat Sandoval, Y. Ulloa-Benítez, A. Armendáriz-Guillén, B. García-Méndez, M. y Macías-Rubalcava, L. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas.* versión impresa ISSN 1405-888X. TIP vol.16 no.2 México dic. 2013
17. Strobel, G.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):491-502.
Sturz, A. V. y Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil ecology*, 15(2), 183-190.
18. Thakuria, D.; Talukdar, N. C.; Goswami, C.; Hazarika, S.; Boro, R. C. Y Khan, M. R. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science* 86(7): 978-985.