

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



**AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
ENDÓFITAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO
DE PLANTAS**

Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica

Elaborado por: Univ. Carina Vasquez Espejo
Asesoras: María Teresa Álvarez Aliaga PhD.
Carla Crespo Melgar PhD.

LA PAZ - BOLIVIA
2018

DEDICATORIA

Primero a Dios por cuidarme y guiarme en cada momento de mi vida. A mi familia por su inmensa paciencia, comprensión y apoyo incondicional en cada paso que doy.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por cuidarme en cada momento.

A la Universidad Mayor de San Andrés, que me albergó durante los años de mi formación profesional y permitirme conocer a muchos amigos, compañeros, docentes y personas que influenciaron en cierta medida para llegar hasta este punto de mi vida, haciendo el camino divertido.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por haberme acogido desde mi formación como estudiante, abriéndome la mente hacia nuevas perspectivas y posteriormente permitido realizar esta tesis de investigación.

A mis queridas asesoras, Dra. Carla Crespo Melgar y Dra. María Teresa Álvarez, por darme la confianza para afrontar cada reto, y poder contar con su guía, conocimiento en el desarrollo de la tesis.

Al Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal INIAF-La Paz, por la cooperación y orientación de los Ingenieros, Rogelio Maydana (Responsable departamental) y Cecilia (Responsable de Laboratorio) por permitirme realizar un trabajo interdisciplinario entre nuestras carreras Bioquímica y Agronomía.

Finalmente, a mi familia que siempre ha estado ahí y apoyarme en cada decisión que tomé, por darme los ánimos de seguir adelante durante estos años. Y un agradecimiento especial a mi mamá un ejemplo de mujer, que se esfuerza y da todo para lograr todo lo que se propone sin rendirse.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Planteamiento del Problema	1
1.1.	Justificación	2
1.2.	Objetivos	3
1.2.1.	Objetivo General.	3
1.2.2.	Objetivos Específicos	3
2.	Diseño Teórico	3
2.1.	Marco Referencial.....	3
2.1.1.	Antecedentes generales sobre el problema en estudio	3
2.1.2.	Descripción del Ámbito en Estudio	4
2.2.	Marco Teórico.....	5
2.2.1.	Generalidades.....	5
2.2.2.	Bacterias endofíticas	5
2.2.3.	Definición	5
2.2.4.	Mecanismos de promoción del crecimiento.....	6
2.2.5.	Fijación de nitrógeno	6
2.2.6.	Solubilización de fosfatos	7
2.2.7.	Producción de Ácido Indol Acético	7
2.2.8.	Potencial endófito promotor del crecimiento de cultivos	8
2.3.	Marco Conceptual.....	9
3.	Formulación de la Hipótesis de de Investigación	10
4.	Operacionalización las variables en estudio	10
5.	Diseño Metodológico	11
5.1.	Población en Estudio, Ámbito y Periodo de Investigación	11
5.1.1.	Población en Estudio	11
5.1.2.	Ámbito	11
5.1.3.	Periodo de investigación.....	11
5.2.	Tipo de Investigación	11
5.3.	Materiales, métodos, técnicas y procedimientos	12
5.3.1.	Protocolo de Investigación	12
5.4.	Procesamiento de los Datos	22
5.4.1.	Recolección.....	22

5.4.2.	Elaboración	22
5.4.3.	Análisis	22
6.	Resultados y Discusión	23
6.1.	Población bacteriana endófito cultivable de thola y tarwi	24
6.1.1.	Cuantificación de la población bacteriana endófito total	24
6.1.2.	Cuantificación e incidencia de la población endófito cultivable fijadora de nitrógeno recuperada de thola y tarwi.....	26
6.2.	Aislados endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico.....	27
6.2.1.	Efecto de las condiciones de cultivo para la recuperación de endófitos fijadores de nitrógeno	28
6.3.	Mecanismos endófitos potenciales para la promoción del crecimiento de plantas	29
6.3.1.	Bacterias endófitas solubilizadoras de fosfatos	29
6.3.2.	Bacterias endófitas inductoras de la producción de ácido indol acético (AIA)	34
6.3.3.	Actividad fijadora de nitrógeno de bacterias endófitas seleccionadas.....	36
6.4.	Promoción de la germinación de semillas empleando endófitos.....	38
6.4.1.	Germinación de semillas de tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>) y arroz (<i>Oryza sativa</i>)	40
6.4.2.	Germinación de semillas de cañahua (<i>Chenopodium pallidicaule</i>)	43
6.4.3.	Germinación de semillas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i>).....	45
6.5.	Evaluación fenotípica y genotípica de las cepas K, t2 y t4	48
6.5.1.	Identidad genética de las cepas endófitas K, t2 y t4	50
7.	Conclusiones	54
8.	Perspectivas Futuras.....	55
9.	Referencias Bibliográficas.....	56
	ANEXOS.....	1

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas

Anexo 2. Plantas en estudio

Anexo 3. Reactivo de Murphy (1962) para la cuantificación de fosfatos

Anexo 4. Curva de calibración de Fosfatos – Técnica de azul de molibdeno

Anexo 5. Curva de calibración de Acetileno 10% - Ensayo de reducción de acetileno

Anexo 6. Reactivo de Salkowsky (Modificación Bric et al, 1991) para la cuantificación de Ácido indol acético

Anexo 7. Curva de calibración de Ácido Indol Acético – Ensayo de producción de Ácido indol acético

Anexo 8. Control de esterilidad, de la técnica de esterilización por superficie

Anexo 9. Población endófitas asociada a plantas

Anexo 10. Selección de endófitos por el ensayo semicuantitativo de solubilización de fosfatos

Anexo 11. Análisis estadístico

Anexo 12. Electroferogramas de los productos de amplificación primer forward y reverse, de las cepas K, t2 y t4

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Tratamientos empleados para la germinación de semillas, según el tipo de semilla.....	19
Tabla 2. Técnicas y condiciones de germinación, según el tratamiento y tipo de semilla.....	19
Tabla 3. Población endófitas asociada a diferentes secciones de las plantas de thola (<i>Parastrephia lepidophylla</i>) y tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)	26
Tabla 4. Número de aislados endófitos fijadores de nitrógeno, a partir de homogenados y explantes, en dos condiciones de cultivo.....	29
Tabla 5. Capacidad solubilizadora de fosfatos de aislados endófitos fijadores de nitrógeno.....	31
Tabla 6. Selección preliminar de bacterias endófitas por su efecto promotor de germinación de semillas.....	39
Tabla 7. Promoción del crecimiento en la germinación de semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua.....	46
Tabla 8. Características fenotípicas de las cepas K, t2 y t4.....	50
Tabla 9. Identificación del fragmento 16S ADNr de las cepas K, t2 y t4 mediante el análisis Blast.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Fraccionamiento del tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>): A. ramas; B. frutos; C. tallos; D. raíz.....	14
Figura 2. Aislamiento de endófitos de raíces nodulares del tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>) en JNFB. A: Desarrollo de colonias a partir de la muestra homogenada; B: Desarrollo de colonias alrededor de explantes; C. Colonias aisladas de la cepa J.	28
Figura 3. Solubilización de fosfatos: A. Ensayo cualitativo: Halo de solubilización (cepas aisladas: t2, ñ y L); B. Ensayo semicuantitativo: Diámetro del halo de solubilización de la cepa K; C. Ensayo cuantitativo: Cultivo de la cepa t4 en medio NBRIP.....	31
Figura 4.1. Cinética de solubilización de fosfatos y variación de pH. A. cepa t2 y B. cepa J (Grupo I). C. cepa t4 y D. cepa K (Grupo II). Diferencias significativas respecto al control abiótico ($p < 0,05$).....	33
Figura 4.2. Gráfico de cajas de la cinética de solubilización de las cepas J, K, t2 y t4. Diferencias significativas ($p < 0,02$) respecto al control abiótico...	34
Figura 5. Fig. 5. A. Producción de Ácido Indol Acético (AIA) empleando las cepas t2, t4, J y K (Diferencias significativas respecto al control abiótico, $p < 0,01$), con el siguiente orden CEPA K > CEPA t2 > CEPA J > CEPA t4 > Control. B. Reacción colorimétrica del AIA.....	36
Figura 6. Actividad fijadora de nitrógeno de bacterias endófitas seleccionadas (*: cepas con diferencia significativa respecto a <i>Rhizobium sp.</i> , $p < 0,05$). B. Cultivo de la cepa K en el medio JNFB, control abiótico en el extremo izquierdo.....	38
Figura 7.A. Longitud promedio de la radícula de semillas de tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>), tratados con: T1: H2O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: cepa viable K (3×10^8 UFC/mL); T4: cepa lisada K (3×10^8 UFC/mL), diferencias significativas ($p < 0,005$).....	41
Figura 7. B. Longitud de la radícula de semillas de tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>), T1: H2O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: cepa viable K (3×10^8 UFC/mL); T4: cepa lisada K (3×10^8 UFC/mL).....	41
Figura 8.A. Longitud promedio de la emisión de la radicular de semillas de arroz (<i>Oryza sativa</i>), T1: H2O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa K; T4: endófitos lisados de la cepa K, diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$).....	42

Figura 8.B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de arroz (<i>Oryza sativa</i>), T1: H ₂ O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa K; T4: endófitos lisados de la cepa K.....	43
Figura 9.A. Longitud promedio de la emisión de radicular de semillas de cañahua (<i>Chenopodium pallidicaule</i>), T1: H ₂ O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t4; T4: endófitos lisados de la cepa t4, diferencias altamente significativas (p<0,0001).....	44
Figura 9.B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de cañahua (<i>Chenopodium pallidicaule</i>), T1: H ₂ O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t4; T4: endófitos lisados de la cepa t4.....	44
Figura 10.A. Longitud promedio de la emisión de la radicular de las semillas de cañahua (<i>Chenopodium quinoa</i>), T1: H ₂ O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t2; T4: endófitos lisados de la cepa t4, diferencia significativa (p<0,0001).....	45
Figura 10.B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de cañahua (<i>Chenopodium quinoa</i>), T1: H ₂ O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t2; T4: endófitos lisados de la cepa t4.....	46
Figura 11. Características fenotípicas: A. cepa K; B. cepa t2; C. cepa t4..	50
Figura 12. Análisis filogenético de los fragmentos 16S ADN _r de las secuencias K, t2, t4 y secuencias obtenidas de la base de datos de NCBI, método Neighbor Joining.....	52

TABLA DE ABREVIATURAS

FAO	: Food and Agriculture Organization
N	: Nitrógeno
P	: Fósforo
N ₂ O	: Óxido Nitroso
CO ₂	: Dióxido de Carbono
AIA	: Ácido Índol Acético
NH ₃	: Amoniaco
NMP	: Número Más Probable
NBRIP	: National Botanical Research Institutes Phosphate
ARA	: Análisis de Reducción del Acetileno
INIAF	: Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal
TSB/TSA	: Caldo Soya Tripticasa /Agar Soya Tripticasa
NFB	: Nitrogen Free Broth (JNFB modificación al medio NFB)
NaCl	: Cloruro de Sodio
UFC/mL	: Unidades formadoras de colonias/mililitro
ISTA	: International Seed Testing Association
ADN	: Ácido Desoxiribonucleico
PCR	: Reacción en Cadena Polimerasa
DGGE	: Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
NCBI	: National Center for Biotechnology Information

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS

Debido a los efectos del cambio climático, los microorganismos se han adaptado a nuevas condiciones, existiendo una interacción dinámica *suelo-planta*, que incide en el fitobioma. En esta relación se incluye a las bacterias endófitas, que colonizan el tejido interno de las plantas sin provocar daño, promueven el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas y el uso eficiente de nutrientes disponibles en su entorno, entre otros. En el presente trabajo se aislaron 52 endófitos fijadores de nitrógeno, aislados a partir de thola (*Parastrephia lepidophylla*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*), de los cuales 3 cepas endófitas fueron seleccionadas y caracterizadas debido a que exhibieron los mecanismos directos involucrados en el crecimiento de plantas. Las especies bacterianas identificadas genéticamente como *Serratia liquefaciens* Bol-K, Bol-t2 y Bol-t4 presentaron efecto promotor de la germinación de semillas *in vitro* obteniendo porcentajes de inducción de la germinación de semillas de arroz (*Oryza sativa*), tarwi (*Lupinus mutabilis*), cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) y quinua (*Chenopodium quinoa*) entre el 50 al 100%, respecto a los controles ($p < 0,005$). Estudios *in vivo*, habilitarían el empleo de estas cepas como bioinoculantes en los cultivos de interés de nuestro entorno, contribuyendo a la reducción del uso de fertilizantes químicos y coadyuvando a la agricultura sostenible para la seguridad y soberanía alimentaria de nuestro país.

Palabras clave: *endófitos, tarwi, thola, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, fitohormonas.*

Abstract

Due to the effects of climate change, microorganisms have adapted to new conditions, through a dynamic soil-plant interaction that maintains the phytobiome. This relationship includes endophytic bacteria that colonize the internal plants tissue without causing damage symptoms. In contrast, endophytic bacteria promote the plant growth through different mechanisms that include: production of phytohormones and availability of nutrients in their environment. In this research, 52 nitrogen-fixing endophytes were isolated from thola (*Parastrephia lepidophylla*) and tarwi (*Lupinus mutabilis*). Three endophytic bacteria were selected and characterized due to direct mechanisms involved in the plants growth. The strains were identified genetically as *Serratia liquefaciens* Bol-K, Bol-t2 and Bol-t4. *Serratia*-like species presented a promoting effect for seed germination *in vitro*. Germination induction percentages of rice, (*Oryza sativa*), tarwi (*Lupinus mutabilis*), cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds varied among 50 to 100%, with respect to controls ($p < 0,005$). *In vivo* studies would enable the use of these strains as bio-inoculants for economical interesting crops, contributing to the reduction of chemical fertilizers usage for sustainable agriculture purposes, supporting food security and sovereignty in our country.

Keywords: *endophytes, tarwi, thola, nitrogen fixation, phosphates solubilization, phytohormones.*

1. Planteamiento del Problema

En los últimos años el cambio climático ha afectado a la producción agrícola (Meenaa y otros, 2017), por su dependencia en el clima, el cual presenta un cambio significativo y duradero (Aimee, Maja, Jeremiah, & Newman, 2015), atribuido en gran medida a las actividades humanas, que conducen a un cambio en la atmósfera (Paginasiete, 2015), el aumento de la emisión desproporcionada de los gases del efecto invernadero aportado por la deforestación (G.E.I., 2016), CO₂, metano, óxido nitroso y la variabilidad natural del clima (Aimee, Maja, Jeremiah, & Newman, 2015). Debido a esto existe una incapacidad de afrontar estos eventos extremos, ya sea por la falta de lluvias, sequía, granizo, heladas, el uso ineficiente de la tierra o del cultivo adecuado (Patria, 2015), el aumento de la temperatura puede llegar a ser insostenible para la producción de recursos naturales de origen agrícola por la falta de adaptación de los cultivos al cambio climático (Silveti, Condori, & Mamani, 2011), lo que provocaría la pérdida parcial o total de la producción, mediante la interrupción del ciclo de crecimiento de los cultivos (Aimee, Maja, Jeremiah, & Newman, 2015).

Hay una necesidad creciente de aumentar la producción agrícola, sin embargo las estrategias actuales para el aumento y mejoramiento de la productividad están basados en el empleo de fertilizantes químicos, que conllevan contaminación de los suelos y riesgos para la salud (Shahab, 2009)

Según la FAO, en Bolivia la agricultura familiar actualmente aporta un 70% de arroz, 45% de hortalizas, 70% de maíz, casi un 100% de papa y yuca (Lostiempos, 2014), el resto es abastecido por las importaciones, para así tener seguridad alimentaria. La variabilidad climática no ayuda al cultivo de varios productos, y ante los efectos del cambio climático i) cada vez se está sembrando menos como es el caso del arroz (Icees, 2014), o ii) constantemente se cambia el cultivo para un determinado producto, comprometiendo la soberanía alimentaria.

En la actualidad, no existe producción a gran escala, de fertilizantes biológicos en el país, para el enriquecimiento de las tierras de cultivo. Dada esta necesidad, los agricultores emplean más de un tipo de fertilizantes químicos como los combinados de nitrógeno-potasio-fosforo (NKP 15-15-15), el DAP (18-4-00), todos de procedencia extranjera (FAO, 1999), con elevados costos por lo que el consumo es extremadamente bajo, en la mayor parte del territorio arable no se usa fertilizantes. El requerimiento de fertilizantes está en función al tipo de cultivo y suelo, encabezado por el cultivo de papa seguido por hortalizas, arroz, trigo y maíz (El Día, 2014), cuanto más fértil es el suelo requiere menor cantidad de fertilizantes (Universia, 2006) por ejemplo las gramíneas como maíz, arroz y otros requieren mayor cantidad de N y en menor cantidad P y K, sin embargo, no se debe usar en exceso los fertilizantes químicos, ya que ello provocaría la contaminación de las reservas subterráneas de agua y el empobrecimiento del suelo. El N tiene gran importancia ya que mejora el rendimiento de la producción (Meenaa y

otros, 2017) y es consumido casi en su totalidad en cada cosecha por lo que debe ser repuesto cada vez, lo que implica una inversión económica alta, en cambio P y K son absorbidos en menores cantidades en cada cosecha y estos se van acumulando en los suelos (Universia, 2006). El fósforo P, es el segundo nutriente limitante para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno, este P se encuentra insoluble en los suelos lo que impide su aprovechamiento dado que no es asimilado, sólo ciertos microorganismos tienen la capacidad de convertir el fósforo a una forma orgánica que pueda ser metabolizada como nutriente para las plantas (Martins, 2004).

1.1. Justificación

La seguridad alimentaria, se ve comprometida por el cambio climático, afectando en gran medida a la agricultura y por ende el abastecimiento de los recursos naturales agrícolas, para el consumo y bienestar de la población. Sin embargo, los sistemas agrícolas no deben ser explotados, para el beneficio económico, son parte del medio ambiente y por ello es primordial dar una respuesta ecológica. Esto se puede lograr con el empleo de nuevas tecnologías, los fertilizantes biológicos, gracias a la interacción en el fitobioma, las bacterias endófitas que poseen diversos mecanismos para el uso eficiente de los nutrientes, como la fijación del nitrógeno, que se encuentra en altas concentraciones en la atmósfera, siendo éste el nutriente principal, que es absorbido casi a totalidad en cada cosecha por ello su requerimiento es imprescindible. El fósforo, es el segundo nutriente limitante para el crecimiento de las plantas, que puede ser solubilizado por bacterias endófitas que convierten el fosfato insoluble a formas asimilables por la planta. Así mismo, las bacterias endófitas inducen la producción de fitohormonas que favorecen el desarrollo de las plantas en diferentes etapas de su crecimiento. Las bacterias endófitas, pueden llegar a habitar cualquier tipo de planta, debido a que poseen mecanismos de colonización, por su relación íntima *bacteria-planta*.

Con el presente trabajo se pretende recuperar los saberes y prácticas ancestrales sobre producción agrícola, para fortalecer las actividades agrícolas frente al cambio climático. La cultura heredada sobre el empleo de plantas de thola en suelos empobrecidos, se expresa en sus prácticas cotidianas y repercute en la producción. Así también, el tarwi es una planta de interés, posee alto valor nutricional, por la cantidad de proteínas, vitaminas y minerales, lo que la hace un cultivo importante.

En el presente trabajo se estudiaron plantas de thola y tarwi, para dar una explicación científica de los procesos relacionados a la promoción del crecimiento de plantas, de esta forma revalorizarlas. En ese sentido, se estudiaron endófitos procedentes de thola y tarwi con el propósito de aislar bacterias endófitas con capacidad fijadora de nitrógeno, para seleccionar cepas que presenten mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, como solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas y actividad fijadora de nitrógeno. Además, se evaluó el efecto promotor durante la germinación *in vitro* de semillas de tarwi, quinua cañahua y arroz, con las cepas que presentaron alto

potencial de los mecanismos mencionados. Se establecieron las características fenotípicas y genotípicas, de las cepas seleccionadas para ser potencialmente empleadas como bioinoculantes que contribuyan a la reducción del uso de fertilizantes químicos y coadyuven a la agricultura sostenible para la seguridad y soberanía alimentaria de nuestro país.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General.

Seleccionar, aislar y caracterizar endófitos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos a partir de thola (*Parastrephia lepidophylla*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*) como promotores del crecimiento de plantas.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Aislar bacterias endófitas a partir de thola (*Parastrephia lepidophylla*), tarwi (*Lupinus mutabilis*), en función a su capacidad de fijación de nitrógeno en medios selectivos.
- Evaluar *in vitro* los mecanismos de solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno e inducción de ácido indol acético (mecanismos directos relacionados a la promoción del crecimiento de plantas) de las bacterias endófitas aisladas.
- Determinar *in vitro* el efecto promotor, de las bacterias endófitas seleccionadas, en la germinación de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*), arroz (*Oryza sativa*), cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).
- Establecer las características fenotípicas y genotípicas de endófitos con efecto promotor del crecimiento de plantas.

2. Diseño Teórico

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Antecedentes generales sobre el problema en estudio

A medida que la población mundial aumenta, la agricultura ha tenido grandes tropiezos para lograr abastecer la demanda de productos de calidad con alto valor nutricional (proteínas, vitaminas y minerales), como el tarwi, la tierra es inmóvil, por lo que su calidad se hace progresivamente más pobre, por los cambios en su uso conforme se eleva la población y la demanda económica (Aliaga, Villegas, & Leguía, 2010), al igual que se han visto afectados otros recursos vitales como el aire puro y el agua (Kaimowitz & Angelsen, 1999), todo a consecuencia del cambio climático, a través de cambios extremos del clima, que comprometen la soberanía alimentaria de los países del mundo, la biodiversidad y degradación del suelo (Kaimowitz & Angelsen, 1999). Es así que, la

población de las comunidades de nuestro país, han adoptado una actitud resiliente frente a los efectos del cambio climático, empleando diversos conocimientos ancestrales, que fortalecen sus actividades agrícolas, tal es el caso de los bioindicadores como estación, fauna y flora. La thola es empleada como planta para el enriquecimiento de los suelos, antes de la siembra de papa, por ejemplo. También existe una afectación del medio ambiente por el cambio natural del clima, que incluye variables fisicoquímicas especialmente en los lugares donde se deforesta (Solon, 2015), que generan altas cantidades de los gases del efecto invernadero (Wood & Cowie, 2004).

En Bolivia no se utiliza tradicionalmente muchos fertilizantes químicos, que son los que emiten grandes cantidades de N_2O , aportan 298 veces más al calentamiento global por gramo que el CO_2 en un plazo de 100 años. La fabricación de fertilizantes químicos produce gases del efecto invernadero (GEI), un kilo de fertilizante con nitrógeno, fósforo y potasio produce entre 1 y 2 kilos de CO_2 (Amos, 2014). Cuando el fertilizante es aplicado en el campo, hay bacterias en el suelo que pueden oxidar el nitrógeno del fertilizante para formar óxido nitroso (N_2O), que es un gas que se queda en la atmósfera por un promedio de 121 años que remueve el oxígeno del agua para generar proceso de eutrofización en los ríos y pantanos.

Por otro lado, los fertilizantes químicos destruyen los microorganismos en el suelo que producen la fertilidad, los nutrientes solubles provocan una explosión reproductiva de microorganismos que mueren cuando el fertilizante se agota, sin estos microorganismos, es necesario aplicar más fertilizantes químicos para mantener el mismo rendimiento agrario, entonces el agricultor tiene que usar más fertilizante para mantener su rendimiento (Hallmann-Quadt, Hallmann, Mahaffee, & Kloepper, 1997).

2.1.2. Descripción del Ámbito en Estudio

Las bacterias endófitas han sido encontradas en gran variedad de plantas leguminosas y no leguminosas, colonizándolas y ejerciendo efectos benéficos como la promoción del crecimiento de las plantas (Ryan, Germaine, Franks, Ryan, & Dowling, 2007), fitoestimulación, entre otros. Por lo que son de gran interés en la agricultura coadyuvando a la fertilidad de la tierra promoviendo la disponibilidad de nutrientes por sus mecanismos de solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Glickmann & Dessaux, 1994).

Existe un interés creciente al respecto de las aplicaciones biotecnológicas que tienen estas bacterias endófitas por sus interacciones con la planta (Ryan, Germaine, Franks, Ryan, & Dowling, 2007), para fomentar mejores prácticas de producción de los sistemas agrícolas, especialmente los cultivos que se encuentran en las regiones del Departamento de La Paz.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Generalidades

Las plantas están constantemente involucradas en interacciones con diversos microorganismos de su medio, entre ellas las bacterias (Mitter, y otros, s.f.), en general las plantas pueden albergar entre 50 a 100 especies diferentes con porcentajes variables (Lodewyckx, y otros, 2002).

La habilidad de los endófitos para colonizar las plantas no involucra necesariamente mecanismos activos por lo que las bacterias de la rizósfera pueden ser endófitas en alguna etapa de su ciclo de vida. Los endófitos tienen mecanismos de adaptación específicos para la penetración activa de la raíz (Lodewyckx, y otros, 2002), favoreciendo su movilidad dentro de la planta (Hallmann, 2001) llegando a colonizar tallos y hojas (Lodewyckx, y otros, 2002). Sin embargo pocos endófitos llegan a colonizar la parte aerobia de la planta (Hallmann, 2001).

2.2.2. Bacterias endófitas

Las bacterias pueden colonizar la rizósfera, el filósfera, epifitos y el interior de tejidos de plantas. Los endófitos están protegidos de tensiones del medio ambiente y de la competición microbiana, por el anfitrión, la planta. Los microorganismos endófitos desarrollan parte de su ciclo de vida en el interior de los tejidos de la planta sin causar síntomas de daño en ella, colonizando los alrededores de las células de la epidermis, la exodermis, y las células de la corteza (Prakamhang, Minamisawa, Teamtaisong, Boonkerd, & Teaumroong, 2009). La presencia de bacterias endófitas diazótrofes, fijadoras de nitrógeno, ha sido detectada en raíz, tallo y hoja, de diferentes plantas, por ejemplo se realiza estudios de los genes involucrados en la detección de la actividad fijadora de nitrógeno (Prakamhang, Minamisawa, Teamtaisong, Boonkerd, & Teaumroong, 2009).

La comunidad endofítica, ha sido estudiada a detalle sólo de pocas plantas, la misma contiene una variedad de bacterias no patógenas que pertenecen a diversos grupos filogenéticos. Al parecer predominan microorganismos del grupo de las Proteobacterias, los Gram positivos y negativos, con bajo y alto contenido de GC.

2.2.3. Definición

El término endófito, se refiere a la colonización interior de plantas por microorganismos que normalmente no causan daño al anfitrión, viven dentro de la planta sin causar enfermedad (Castro & Roa, 2006), incluye también a aquellas bacterias que en algún momento de su ciclo de vida fueron endófitas pero colonizan la parte externa de la planta.

2.2.4. Mecanismos de promoción del crecimiento

Las bacterias endófitas son promotoras del crecimiento vegetal, lo cual hace referencia a un grupo de microorganismos que estimulan el desarrollo de las plantas con interés agronómico (Hallmann-Quadt, Hallmann, Mahaffee, & Kloepper, 1997).

Para tal efecto existen diversos mecanismos, los directos (Novak, 1998; Compant, y otros, 2005), que ayudan a la tolerancia contra tensiones como las causadas por la sequía, entre ellas, el ácido abscísico, giberelinas, auxinas, citoquinas, etileno, producción de ácidos orgánicos, **fijación de nitrógeno** (Verma, Ladha, & Tripathi, 2001), **solubilización de fosfatos** (Puente, Li, & Bashan, 2009), el suministro de nutrientes esenciales (Wall, 2001), la movilización de los mismos (Sturz, Christie, Matheson, Arsenault, & Buchanan, 1999) y la **producción de fitohormonas** (Anexo 1). Entre los mecanismos indirectos están la protección a patógenos por antagonismo (Wilhelm, Arthofer, & Schafleitner, 1997; Krechel, Faupel, Hallmann, Ulrich, & Berg, 2002; Pal, Bhatt, & Chauchan, 2000), producción de antibióticos, liberación de enzimas como quitinasa y glucanasas, inducción de resistencia sistémica de la planta a hongos, bacterias, virus patógenos como agentes de bioprotección (Sessitsch & Clément, 2010).

Otros estudios han indicado que las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la alteración de la fisiología vegetal, que incluyen la regulación de la presión osmótica, los cambios en las respuestas de los estomas, el ajuste en el tamaño de la raíz y la morfología, la modificación, la acumulación y el metabolismo del nitrógeno, y el aumento de la absorción de ciertos minerales (Verma, Ladha, & Tripathi, 2001; Ibarra, 2010).

2.2.5. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente con mayor demanda en las plantas, pero de baja disponibilidad lo que puede ser un factor limitante para la producción agrícola (Tenuta, 2004). Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) tienen la capacidad de convertir el nitrógeno de la atmósfera en una forma asimilable para la planta como ión amonio, debido a su maquinaria metabólica basada en la enzima nitrogenasa. El amonio es incorporado al tejido vegetal uniéndose a los esqueletos carbonados para la producción de aminoácidos (Kloepper, Zablotowicz, Tipping, & Lifshitz, 1991; Pérez, Tuberquia, & Amell, 2014), Anexo 1.

Este proceso de fijación está condicionado por la presencia de oxígeno que puede inhibir la funcionalidad de la enzima **nitrogenasa**, por lo que los microorganismos han sido separados en grupos (Tenuta, 2004) de acuerdo a la capacidad de tolerar la presencia de oxígeno en:

- Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno heterotróficas
- Bacterias aeróbicas y microaerofílicas
- Anaerobios facultativos

- Anaerobios obligados

En el caso de la fijación de nitrógeno atmosférico, el gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa que es parte del complejo de la nitrogenasa responsable de todo el proceso, ha sido ampliamente utilizado como marcador funcional para el estudio de estas comunidades, a pesar de que la sola presencia de este gen no es concluyente respecto a su actividad (Kloepper, Zablotowicz, Tipping, & Lifshitz, 1991; Taulé, y otros, 2012).

2.2.6. Solubilización de fosfatos

El fósforo constituye el 0,2% del peso de la planta, como estructuras macromoleculares, por ello es el segundo nutriente limitante para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno (Martins, 2004), el fósforo mejora el desarrollo de las raíces y por ende la producción, falta de este componente la planta podría atrofiarse e inclusive retrasar la maduración del fruto (Raven, Evert, & Eichhorn, 2001). La tierra es muy rica el cuanto a la composición de fosforo una pequeña porción soluble y la mayor parte se encuentra en su forma natural insoluble en rocas y apatitas (Anexo 1).

Para que las plantas la puedan emplear es necesario que sean asimiladas, sólo ciertos microorganismos tienen la capacidad de convertir el P a una forma orgánica que pueda ser metabolizada como nutriente (Martins, 2004). Los mecanismos propuestos para la solubilización de fosfatos incluyen:

- Producción de ácidos orgánicos durante la descomposición del carbono orgánico (Hameeda, Kumar, Rupela, Kumar, & Reddy, 2006).
- Excreción de protones en forma de amonio que es asimilado por los microorganismos (Whitelaw, 2000).
- Formación de complejos entre ácidos orgánicos y aniones con cationes (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}) (Welch, Taunton, & Banfield, 2002).
- Desorción de fósforo en suelos mineralizados (Osorio, 2008).

2.2.7. Producción de Ácido Indol Acético

El Ácido Indol Acético (AIA), es una auxina natural de las plantas. Las auxinas son hormonas vegetales encargadas de regular diferentes procesos fisiológicos. La industria agroquímica realiza una síntesis química para la obtención de estos reguladores vegetales. En la actualidad se busca reemplazar a los productos químicos con otros naturales que no afecten los sistemas agrícolas. La síntesis microbiológica de fitohormonas representan una disminución del impacto medioambiental (Castillo, Altuna, Michelena, Sánchez, & Acosta, 2005). Existen diversas rutas metabólicas implicadas en la síntesis de AIA como: Indol 3- acetamida, Indol 3-piruvato, ruta de la triptamina, oxidación de la cadena de triptófano, Indol-3- acetonitrilo y triptófano independiente, éste último ha sido reportado en bacterias. Las rutas mejor caracterizadas

en bacterias de conversión del triptófano a AIA, es la ruta Indol-3-acetamida y la indol-3-piruvato. Se reportó el potencial promotor en las especies de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*. (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007; Umesh & Ashok, 2011). Anexo 1.

El triptófano se encuentra en forma natural en el tejido vegetal como parte del metabolismo de proteínas, ayuda a la síntesis de AIA, por otra parte éste aminoácido es suplementado en los medios de cultivo como precursor del AIA (Ghosh & Basu, 2006), mediante la ruta metabólica que implica la conversión de triptófano a ácido indol acético, por acción de la enzima transaminasa a cetoácido piridoxal fosfato, el ácido indol pirúvico es descarboxilado a indol acetaldehído, con posterior oxidación a AIA (Perumal & Perumal, 2012).

Las auxinas son reguladores biológicos activos en bajas concentraciones, cambiando la respuesta natural a las hormonas. Regulan los procesos tales como división celular, diferenciación, elongación celular, formación de raíces, florecimiento, germinación de semillas. El AIA puede mediar las respuestas a la gravedad y luz (Lwin, Myint, & Moe, 2012)

2.2.8. Potencial endófito promotor del crecimiento de cultivos

Las bacterias endófitas han demostrado su capacidad promotora del crecimiento y desarrollo de diferentes cultivos de importancia como papa, tomate, arroz (Tenuta, 2004), además de otras cosechas anuales como trigo, haba, lechuga, frijol, maíz, cebada (Mahafee, Hallman, Quadt-Hallman, & Kloepper, 1997) y otras plantas (Duangpaeng, Phetcharat, Chanthapho, Boonkantong, & Okuda, 2011). La caña de azúcar es un cultivo ampliamente estudiado en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno por parte de bacterias diazótrofes que aportan el requerimiento de N a la planta, así se minimizan las cantidades de fertilizantes adicionados (Mitter, y otros, s.f.).

Existen estudios de Duangpaeng, et al. (2012), que se basan en la inoculación de bacterias endófitas *O-3-S-3* (2) y *O-1-S-2*, en semillas antes de su germinación con el objetivo de incrementar la altura de los brotes y la longitud de las raíces de las plántulas. Govindarajan. y otros, (2007) informó de los resultados de la inoculación de *Burkholderia vietnamensis* aislado de tejidos vegetales en Vietnam, *Gluconacetobacter diazotrophicus* aislado de tejido de la raíz de la caña de azúcar en Brasil (Duangpaeng, Phetcharat, Chanthapho, Boonkantong, & Okuda, 2011). *Azospirillum lipoferum* aislado de arroz en Francia y *Herbaspirillum seropedicae* aislado de tejidos de la raíz de arroz en Vietnam. Estos microorganismos pueden incrementar el crecimiento de plántulas de arroz en comparación con controles. Meunchang, y otros. (2004) reportó que *Azospirillum* era capaz de producir además ácido indol acético (AIA).

También se reportó, que plantas de álamo salvaje y sauce inoculadas con endófitos incrementaban su biomasa en comparación a plantas control sin inoculación alguna,

incluso se demostró por la técnica de dilución de isótopo de ^{15}N que aproximadamente el 65 % del N total de los cultivos inoculados fue aportado por la fijación biológica del N y se observó su crecimiento bajo condiciones deficientes de N, Knoth, y otros, (2014).

2.3. Marco Conceptual

Ciclo de crecimiento: Todos los seres vivos, incluyendo las plantas y los animales, desarrollan diferentes ciclos de vida para asegurar la supervivencia de las especies. Las plantas necesitan alimentarse, eliminar los desechos, reproducirse y crear nuevas plantas, medios para crecer individualmente, formas de moverse, respirar, todo esto se realiza en un ciclo de vida de 7 etapas (Fiorentino, y otros, 2017)

Soberanía alimentaria: La Soberanía Alimentaria es el derecho de los pueblos, comunidades y países a definir sus propias políticas agrícolas, pastoriles, laborales, de pesca, alimentarias y agrarias que sean ecológica, social, económica y culturalmente apropiadas a sus circunstancias exclusivas. Esto incluye el derecho real a la alimentación y a la producción de alimentos, lo que significa que todos los pueblos tienen el derecho de tener alimentos y recursos para la producción de alimentos seguros, nutritivos y culturalmente apropiados, así como la capacidad de mantenerse a sí mismos y a sus sociedades (Soberanía alimentaria, 2002).

Eutrofización (Eutroficación): Proceso natural y/o antropogénico que consiste en el enriquecimiento de las aguas con nutrientes, a un ritmo tal que no puede ser compensado por la mineralización total, de manera que la descomposición del exceso de materia orgánica produce una disminución del oxígeno en las aguas profundas (Cricyt).

Bacteria endófitas: Son aquellas bacterias que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta. Etimológicamente endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta (Bacterias endófitas).

Fertilizante: Los fertilizantes o abonos son sustancias de origen animal, mineral, vegetal o sintético, que contienen gran cantidad de nutrientes y se utilizan para enriquecer y mejorar características físicas, químicas y biológicas del suelo o sustrato; así las plantas se desarrollarán mejor. Podemos diferenciar tres tipos de fertilizantes: químicos, orgánicos e inorgánicos (Fertilizante).

Rizósfera: Es una zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas y microorganismos del suelo. Esta región especializada, está caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad (Rizósfera).

Filogenética: La filogenética es la disciplina encargada de clasificar a los seres vivos dando cuenta de su historia evolutiva (Filogenética).

Nitrogenasa: El complejo nitrogenasa está compuesto por dos metaloproteínas, una hierro-proteína y otra hierro-molibdeno proteína, cuya función es fijar el nitrógeno atmosférico N₂ y transformarlo en NH₃ (Nitrogenasa).

3. Formulación de la Hipótesis de Investigación

3.1. Hipótesis alterna

Las cepas endófitas seleccionadas por sus mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, entre ellos solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas, presenten a su vez efecto inductor en la elongación radicular de las semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua, en etapa de germinación, con diferencias significativas respecto a los controles ($p < 0,05$).

3.2. Hipótesis nula

Las cepas endófitas aisladas a partir de las plantas de thola (*Parastrephia lepidophylla*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*), no presenten los mecanismos de promoción del crecimiento de plantas, es decir, capacidad solubilizadora de fosfatos, fijadora de nitrógeno y productora de fitohormonas, por lo cual no ejerzan un efecto inductor en la germinación de las semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua, no existiendo diferencias significativas respecto a los controles ($p > 0,05$).

4. Operacionalización de las variables en estudio

Variable	Dimensión	Indicador	Tipo de Variable
Capacidad fijadora de nitrógeno	Población	NMP	Cuantitativa discreta
Solubilización de fosfatos	Mecanismos directos de promoción del crecimiento	Fosfato soluble	Cuantitativa continua
Actividad fijadora de nitrógeno		Reducción de acetileno	Cuantitativa continua
Producción de AIA		Reacción colorimétrica	Cuantitativa continua
Germinación <i>in vitro</i>	Inoculación de endófitos	Longitud radicular	Cuantitativa continua
Características Morfológicas	Identificación de endófitos	macroscópica, microscópica	Cualitativa discreta
Bioquímicas		Pruebas convencionales	Cualitativa discreta
Moleculares		Gen 16S ADNr	Cuantitativa discreta

5. Diseño Metodológico

5.1. Población en Estudio, Ámbito y Periodo de Investigación

5.1.1. Población en Estudio

5.1.1.1. Plantas de thola (*Parastrephia lepidophylla*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*)

Las bacterias endófitas fueron aisladas a partir del tejido vegetal de estas plantas de nuestra región.

5.1.1.2. Bacterias endófitas

Fueron aisladas en un medio selectivo carente de nitrógeno, seleccionadas por la actividad solubilizadora de fosfatos y producción de ácido indol acético, mecanismos que promueven el crecimiento de plantas.

5.1.1.3. Semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*), arroz (*Oryza sativa*), quinua (*Chenopodium quinoa*) y cañahua (*Chenopodium pallidicaule*)

Se evaluó el efecto promotor de las bacterias endófitas seleccionadas sobre la germinación de las semillas, como primer paso del desarrollo de una planta.

5.1.2. Ámbito

El trabajo pretende aislar, seleccionar y caracterizar bacterias endófitas, *bioinoculantes*, con capacidad promotora del crecimiento de plantas, que puedan ser empleadas como una alternativa para el mejoramiento de la seguridad alimentaria, dando un aporte para el desarrollo de estudios *in vivo*, de los sistemas agrícolas.

5.1.3. Periodo de investigación

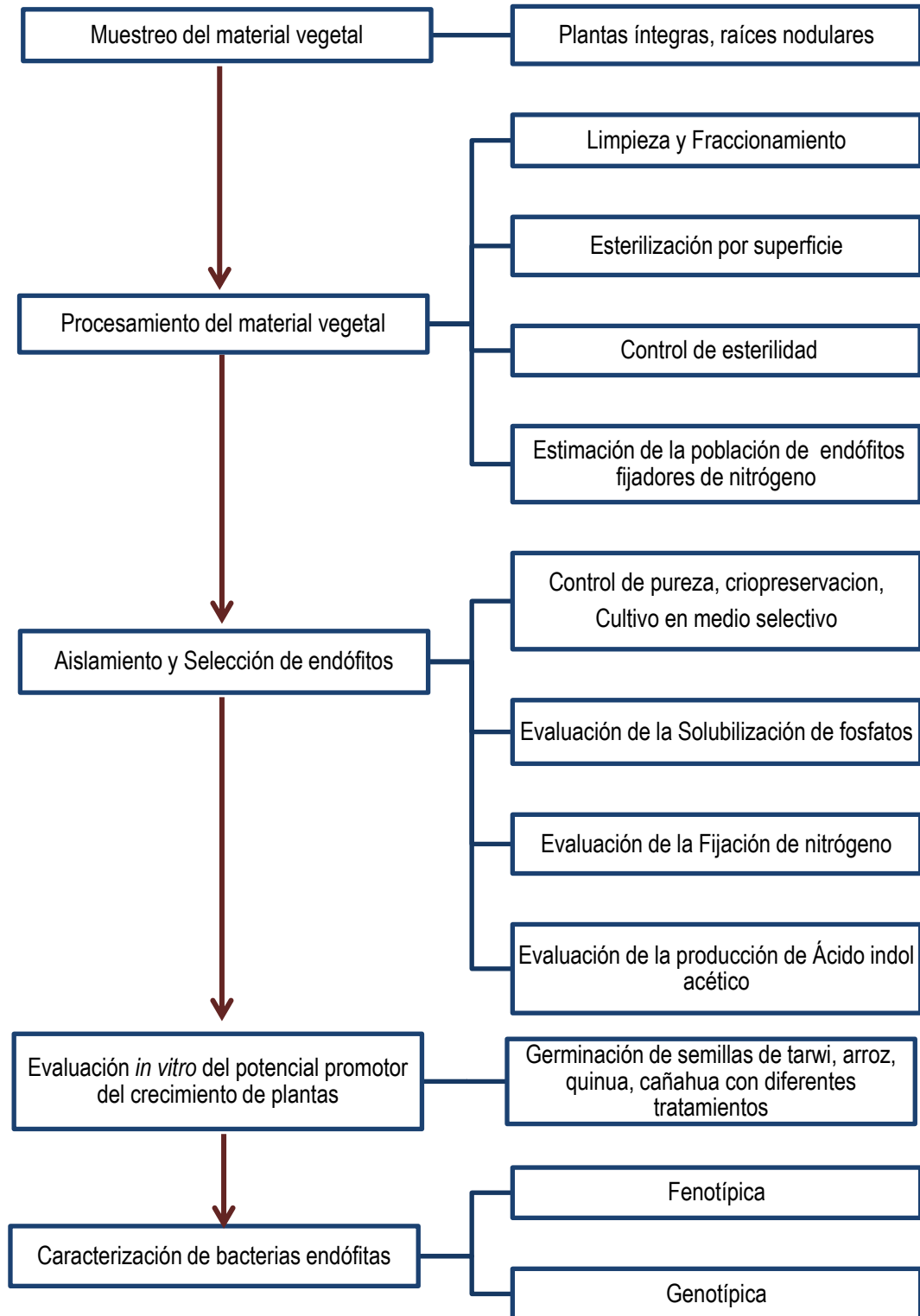
El presente trabajo se desarrolló en el Área de Biotecnología, perteneciente al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA, en el periodo 2016-2017.

5.2. Tipo de Investigación

El tipo de investigación que se desarrolló en el presente trabajo fue *Experimental-aplicada*. Las bacterias endófitas aisladas, fueron seleccionadas *in vitro*, por sus mecanismos promotores del crecimiento de plantas. Posteriormente, los endófitos fueron aplicados en semillas para su evaluación.

5.3. Materiales, métodos, técnicas y procedimientos

5.3.1. Protocolo de Investigación



5.3.1. Material vegetal

5.3.1.1. Muestreo del material vegetal

5.3.1.1.1. Recolección, transporte y almacenamiento

Plantas de tarwi (*Lupinus mutabilis*) de las comunidades Ñacoca, Ñachoca, Zapaña e Iravi Grande, pertenecientes a la Provincia Ingavi del Departamento de La Paz (Altura 3824 msnm, latitud 16°34.00', longitud 68°57.00'), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF). Un primer lote consistió en raíces nodulares de cuatro plantas, con un corte en el cuello de la raíz, se extrajeron los restos de tierra adherida, sin dañar los nódulos. El segundo lote, fue una planta íntegra de suelo arenoso, colectada por el INIAF en condiciones limpias, de la comunidad de Ñacoca (Anexo 2).

Las muestras del primer y segundo lote, fueron transportadas en bolsas plásticas y un saco grande, etiquetadas respectivamente. El material vegetal fue almacenado a 4°C hasta su procesamiento (Herbario Forestal, 1999).

Se colectó una planta íntegra de supothola “thola” (*Parastrephia lepidophylla*) de la comunidad Toloma, perteneciente a la Provincia Aroma del Departamento de La Paz (Altura 3866 msnm, latitud 17°06.861', longitud 67°58.681'). Este arbusto de dos años de crecimiento aproximado, tenía una altura 60 cm. El arbusto entero fue colectado sin dañar las raíces secundarias retirando los restos de tierra, el mismo fue envuelto en papel periódico y manipulado lo menos posible en condiciones limpias (Anexo 2).

El material vegetal fue trasladado en un saco grande identificado, almacenado a 4°C hasta su procesamiento, según lo descrito en la guía para la recolección y preservación de muestras botánicas de campo (Herbario Forestal, 1999).

5.3.1.2. Procesamiento de las muestras vegetales

5.3.1.2.1. Fraccionamiento de plantas íntegras

Las plantas íntegras de tarwi (Lote 2) y thola, fueron fraccionadas en secciones, dividiéndolas en raíces, tallos, ramas, hojas, flores y frutos empleando tijeras de podar (Fig. 1).

5.3.1.2.2. Limpieza y fragmentación del material vegetal

Se realizó un prelavado del material vegetal, raíces nodulares (tarwi) y plantas fraccionadas (sección 5.3.1.2.1) empleando agua de grifo hasta remover todos los restos de tierra (Jalgaonwala & Totaram, 2011). Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril de acuerdo al protocolo descrito por Sakiyama, y otros, (2001). El material vegetal limpio fue fragmentado en segmentos de 1 – 1,5 cm de longitud, en condiciones estériles, empleando tijeras de podar (Gonzalez, 2015).



Figura 1. Fraccionamiento del tarwi (*Lupinus mutabilis*): A. ramas; B. frutos; C. tallos; D. raíz (Fuente: Elaboración propia)

5.3.1.2.3. Esterilización del material vegetal fragmentado

La esterilización por superficie del material vegetal, fue realizado en una Cabina de Seguridad Biológica Clase II (*Nuairé*), mediante la técnica descrita por Pérez, y otros, (2010) para ello, se realizó el lavado de los fragmentos, con agua destilada estéril (2 veces), tampón fosfato (0,05M, pH 7) durante 15 minutos en agitación, inmersión en etanol (75%) durante 1 minuto; hipoclorito de sodio-tween (5%-8%) durante 5 minutos, inmersión en etanol (75%) por 1 minuto, flameado durante 30 segundos, agitación en tampón fosfato (0,05M, pH 7) por 15 minutos y enjuagues con agua destilada estéril (4 veces). Todo el procedimiento fue realizado por triplicado, posteriormente se realizó un control de esterilidad.

5.3.1.2.3.1. Control de esterilidad

El control de esterilidad se basó en la determinación de la ausencia de microorganismos contaminantes, en el cultivo del agua destilada empleado en el último enjuague (sección 5.3.1.2.3). Para ello, se sembró 100 μ L de agua, en agar nutritivo e incubó a 37°C por 7 días en condiciones de aerofilia y microaerofilia (5% de CO₂). El control de esterilidad se basó en la observación del medio de cultivo “sin desarrollo microbiano” (Andreolli, Lampis, Zapparoli, Angelini, & Vallini, 2015).

5.3.2. Estimación de la población bacteriana endófitas asociada a las plantas

La estimación de la población bacteriana endófitas asociada a las plantas en estudio, se realizó mediante la técnica de número más probable (NMP), serie de tres tubos. Para ello, el tejido vegetal estéril, fue homogenizado en un mortero, re-suspendido en solución cloruro de sodio (0,9%) proporción 1:10 (P/V). A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas en un rango de 10⁻¹-10⁻¹², 0,5 mL de las tres últimas

diluciones se inocularon en tubos con 4,5 mL de medio TSB (Caldo Soya Tripticasa). La batería de tubos fue incubada a temperatura ambiente por dos semanas, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (el medio anaerobio se obtuvo cubriendo la superficie del medio con vaselina líquida evitando el contacto con el oxígeno). Para la interpretación de resultados, se tomó como positivo la turbidez causada por el crecimiento microbiano endófito en cada tubo y negativo la ausencia de turbidez, la estimación estadística de la población microbiana, se realizó mediante el programa NMP calculadora Excel (*Versión 5, 2017*) correspondiente a 95% de límite de confianza.

5.3.3. Estimación de la población bacteriana endófito fijadora de nitrógeno

Se empleó la técnica del NMP descrita anteriormente, con las siguientes modificaciones: i) se realizaron diluciones seriadas en un rango de 10^{-1} - 10^{-7} del tejido vegetal homogenizado, ii) se inoculó 0,5 mL de las tres últimas diluciones en tubos con 4,5 mL de medio de cultivo selectivo JNFB (Olivares, 1996) con la siguiente composición (g/L): sacarosa (5,0), K_2HPO_4 (0,6), KH_2PO_4 (1,8), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), NaCl (0,1), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,02), azul de bromo timol 0,5% en KOH 0.2 N (2 mL), solución de vitaminas: 1mL de solución de biotina (0,1g/L), 1mL de solución de piridoxal dihidrocloruro (0,2g/L), solución de micronutrientes (2 mL): solución en g/100mL, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,4), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12), HBO_3 (1,4), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1,0), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (1,5), 4 mL de solución de ácido Fe-etilen diaminotetraacético (1.6%). La carencia de nitrógeno en el medio, fue el primer factor selectivo para el desarrollo de bacterias endófitas con capacidad de fijar nitrógeno, iii) para la interpretación de resultados se tomó como positivo la turbidez causada por el crecimiento microbiano endófito y la capacidad de algunas bacterias de causar el viraje del indicador de pH del medio.

5.3.4. Selección y Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno

5.3.4.1. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno a partir de homogenados

Para el aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno a partir de homogenados vegetales (Sgroy & otros., 2009), el tejido vegetal fraccionado estéril fue homogenizado en un mortero estéril con una solución de NaCl (0.9%) a una proporción de 1:10 (P/V). Posteriormente, se inoculó 100 μ L del homogenado en JNFB agar, composición descrita en la sección 5.3.3 (Olivares, 1996). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis y microaerofilia (5% de CO_2), hasta el desarrollo de colonias.

5.3.4.2. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno a partir de explantes

Para el aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno a partir de explantes vegetales, se sembró el material vegetal fraccionado (explantes de 3-5mm) en JNFB agar

e incubó a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis y microaerofilia (5% de CO₂), hasta el desarrollo de colonias alrededor del explante.

5.3.4.3. Control de cultivos axénicos

Todos los aislados bacterianos endófitos fijadores de nitrógeno, fueron sometidos a un control de pureza, a través de la obtención de cultivos axénicos (Xia, DeBolt, Dreyer, Scott, & Mark, 2015). Por lo que se realizaron, sub-cultivos de colonias con morfología diferente, mediante la siembra por estría agotamiento (Moreno & Albarracín, 2012) en medio TSA, hasta observar el desarrollo de colonias con morfología única.

5.3.4.3.1. Conservación de aislados bacterianos endófitos fijadores de nitrógeno

Las cepas endófitas fijadoras de nitrógeno, fueron conservadas mediante la técnica de criopreservación (-80°C), que emplea glicerol como agente crio protector (25%) (Moreno & Albarracín, 2012). Para ello se realizó un sembrado masivo de cada cepa en TSA, incubado a 28°C por 1 día (fase exponencial), la biomasa bacteriana fue re-suspendida en medio TSB a una concentración correspondiente a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL (Tubo N°5, escala de MacFarland), luego se alicuotaron 750µL de la suspensión, en criotubos con 250µL de glicerol y se mezcló por inversión. Para llegar a la temperatura de conservación de los criotubos se realizó la secuencia: 10°C por 1 hora, 4°C por 1 hora, -20°C una noche y por último a -80°C temperatura final. Para la confirmación de este proceso, se realizó una reactivación de un criotubo de cada cepa, con el fin de asegurar la viabilidad y pureza de los mismos (descrito en la sección 5.3.4.3.).

5.3.5. Estudio de los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas

5.3.5.1 Selección de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfatos

La evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfatos, se llevó a cabo en tres etapas, a través de una evaluación cualitativa, semi-cuantitativa y cuantitativa, para seleccionar las cepas endófitas con mejor potencial, para ello se empleó el medio de cultivo National Botanical Research Institutes Phosphate (NBRIP), cuya composición presenta (g/L): glucosa (10,0), Ca₃(PO₄)₂ (5,0), MgCl₂.6H₂O (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,25), KCl (0,2), (NH₄)₂SO₄ (0,1), (Nautiya, 1999). Para la evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos todas las cepas endófitas fueron sembradas por estría agotamiento en placas con NBRIP agar e incubados a 28°C. La formación de un halo transparente, como indicador de la conversión de fosfato insoluble (Ca₃(PO₄)₂) en formas solubles, alrededor de las colonias fue observado después de 2 días de incubación.

Para la determinación semi-cuantitativa de la solubilización de fosfatos se siguió la metodología descrita por Dinić y otros (2014) con algunas modificaciones: se realizaron 5 horadaciones de 5 mm en placas de NBRIP agar, e inocularon 20 µL de una suspensión de bacterias endófitas (6×10^8 UFC/mL) con actividad positiva a la prueba

cualitativa. Las cajas petri fueron selladas e incubadas a 28 °C por 8 días, realizando revisiones periódicas (2, 4, 6 y 8 días) de la formación de un halo transparente alrededor de la horadación con inóculo, cuyo diámetro es proporcional a la actividad solubilizadora de fosfatos. Se empleó solución NaCl 0,9% (P/V) como control negativo. Esta prueba fue realizada por duplicado, la estimación del Índice de Solubilización (IS) fue realizada empleando la fórmula descrita a continuación con algunas modificaciones (Kibrom, Alemayehu, & Prakasam, 2017).

$$\text{Índice de solubilización (IS)} = \frac{\text{Halo de solubilización (mm)} - \text{Crecimiento en horadación (mm)}}{\text{Crecimiento en horadación (mm)}}$$

Las bacterias endófitas que presentaron mayor diámetro de halo (mayor Índice de solubilización), fueron seleccionadas para la cuantificación de la solubilización de fosfatos, para ello se empleó 50 mL de NBRIP caldo en erlenmeyers (125mL), e inculó al 3% (V/V) con cada cepa endófitas activa (3×10^8 UFC/mL), proveniente de un cultivo en placa. Los cultivos fueron incubados a 28°C, 100 rpm, durante 14 días. Se colectaron alícuotas (2 mL) a los 0, 3, 9 y 14 días, para determinar la concentración de fosfato soluble y la variación de pH. El fosfato soluble debido a la actividad microbiana, fue cuantificado mediante la técnica descrita por Mihalache (2015), las alícuotas colectadas fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. 400 µL del sobrenadante fue diluido con 1280 µL de agua ultra pura en tubos libres de contaminantes (eliminando restos de detergente por sumersión en agua destilada durante 48 horas), a esta mezcla se adicionó 320 µL del reactivo de Murphy (1962) detallado en el Anexo 3. La mezcla fue homogenizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 830 nm de longitud de onda, empleando como blanco agua ultrapura en lugar del sobrenadante, este ensayo fue realizado por duplicado. Los resultados de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración empleando KH_2PO_4 (fosfato soluble) 0,1-1,5 µg/mL, como estándar (Anexo 4).

5.3.5.2. Cuantificación de la actividad fijadora de nitrógeno

La actividad fijadora de nitrógeno de los aislados endófitos seleccionados fue evaluada mediante el Análisis de Reducción de Acetileno (ARA) descrita por Elbeltagy (2011) con algunas modificaciones. Se inóculo 120µL de suspensión endófitas activa (3×10^8 UFC/mL), en viales sellados con anillas de aluminio con 4mL de JNFB, se reemplazó 10% de la atmósfera gaseosa con acetileno (96% pureza), los cultivos fueron incubados a 25 °C (Taulé, y otros, 2012). Posteriormente, se analizó la reducción biológica de acetileno inyectando 100µL de la atmósfera gaseosa a 0, 30, 72 horas, en un Cromatógrafo de Gases, Clarus 500 (*Perkin Elmer*), acoplado con una columna de Porapaq Q a 150°C, e hidrógeno como gas de arrastre (45 PSI). La temperatura del inyector fue de 100°C y se empleó un detector de ionización de llama a 250°C. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración empleando acetileno estándar (Anexo 5) y posterior análisis mediante la ecuación general de los

gases. Adicionalmente, para comparación se empleó *Rhizobium sp.*, como cepa control con capacidad fijadora de nitrógeno reportada (Cortesía del INIAF). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

5.3.5.3. Determinación de la producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Se evaluó la inducción de la producción de la fitohormona de ácido 3-indol acético (AIA), para su cuantificación se inoculó 120 μ L de una suspensión endófitas activa (3×10^8 UFC/mL), en 4 mL de medio JNFB suplementado con triptófano 0,2% (P/V), como precursor de la fitohormona. Los cultivos fueron incubados a 28°C durante 48 horas. Se colectaron alícuotas (1 mL) a las 0, 24 y 48 horas, fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 min y procesadas según el método descrito por Ortuño et al., (2013) y Glickmann & Dessaux (1994): a 100 μ L del sobrenadante se añadió 150 μ L del reactivo de Salkowsky (Anexo 6), y se incubó en oscuridad por 30 minutos (Taulé, y otros, 2012). Se determinó la absorbancia a 530 nm de longitud de onda (EPOCH, Biotek). Los resultados de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración obtenida a partir de diferentes concentraciones de AIA (4 -60 μ g/mL) empleado como estándar (Anexo 7).

5.3.6. Evaluación *in vitro* del efecto inductor de bacterias endófitas sobre la germinación de semillas tarwi (*Lupinus mutabilis*), arroz (*Oryza sativa*), quinua (*Chenopodium quinoa*) y cañahua (*Chenopodium pallidicaule*)

5.3.6.1. Preparación de las semillas

Semillas certificadas de tarwi (*Lupinus mutabilis*), arroz (*Oryza sativa*), quinua (*Chenopodium quinoa*) y cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) (Cortesía de INIAF), fueron tratadas para reducir su carga microbiana a través de la técnica de desinfección por superficie descrita (sección 5.3.1.2.3.). Posteriormente, las semillas fueron escurridas y secadas dentro de una Cámara de Seguridad Biológica, Clase II (*Nuair*) por una hora, manteniendo su condición estéril (Xia, DeBolt, Dreyer, Scott, & Mark, 2015).

5.3.6.2. Preparación de bacterias endófitas

Se realizó un sembrado masivo de las cepas endófitas seleccionadas en medio TSA, incubando a 28°C por 24 horas. Posteriormente, las suspensiones bacterianas fueron lavadas tres veces con NaCl 0.9% (P/V) o PBS, centrifugando a 5000 rpm/5 min. Cada inóculo fue ajustado a una concentración de 3×10^8 UFC/mL (equivalente al tubo N°1 en la escala de McFarland).

5.3.6.3. Tratamiento de semillas con bacterias endófitas

Las semillas semi-secas fueron sumergidas totalmente en soluciones para cada tratamiento **T1** (agua destilada), **T2** (solución salina y/o tampón), **T3** (endófitos viables) y **T4** (endófitos lisados) considerando el tamaño y las características de cada tipo de semilla (descrito en la Tabla 1). El contacto semilla: agua/solución salina/tampón PBS/suspensión bacteriana activa o lisada, se realizó por un lapso de 4 horas en

agitación suave, posteriormente, las semillas fueron escurridas y secadas por 1 hora a temperatura ambiente en una cabina de seguridad biológica. A continuación, las semillas fueron sometidas a dos técnicas de germinación, descritas en la siguiente sección.

Tabla 1. Tratamientos empleados para la germinación de semillas, según el tipo de semilla.

	Semilla certificada INIAF			
	Arroz (20granos)	Quinua (100granos)	Cañahua (100granos)	Tarwi (20granos)
Tratamiento 1				
Agua destilada estéril (mL)	20	4	4	40
Tratamiento 2				
A. Solución salina (mL)	20	4	4	-
B. Tampón PBS (mL)	-	-	-	40
Tratamiento 3				
Aislado endófito viable (UFC/mL)	3x10 ⁸	3x10 ⁸	3x10 ⁸	3x10 ⁸
Tratamiento 4				
Aislado endófito lisado (UFC/mL)	3x10 ⁸	3x10 ⁸	3x10 ⁸	3x10 ⁸

5.3.6.4. Germinación de semillas

Para la germinación de semillas se siguió las normas establecidas por la International Seed Testing Association (ISTA, 2010), de acuerdo al tipo de semilla estudiado, empleando papel como primer sustrato. Para la germinación de semillas de quinua y cañahua se empleó la técnica “sobre papel”, se colocaron las semillas tratadas (procedimiento descrito en la sección previa) sobre dos capas de papel absorbente humedecido con 2mL de cada tratamiento, dentro de una caja Petri de 10cm de diámetro. Por otra parte se empleó la técnica “entre papel”, para las semillas de arroz y tarwi tratadas, que fueron colocadas entre dos capas de papel absorbente humedecido con cada tratamiento (aprox. 15mL), ambas capas se enrollaron e introdujeron en bolsas nylon, todos los tratamientos fueron incubados en una Cámara de Cultivo Vegetal con fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Xia, DeBolt, Dreyer, Scott, & Mark, 2015) de acuerdo a las condiciones y periodo de germinación (ISTA, 2010) como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Técnica y condiciones de germinación, según el tratamiento y tipo de semilla.

Semilla tratada	Técnica	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
Arroz	Entre papel	25	14
Quinua	Sobre papel	25	10
Cañahua	Sobre papel	25	6
Tarwi	Entre papel	20	10

Después del periodo de germinación establecido, se recolectaron datos en función a la longitud de la emisión de la radícula (raíz primaria) de cada semilla. El análisis de resultados fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA), de los tratamientos realizados a las semillas, con un nivel de confianza >99%.

5.3.7. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas endófitas seleccionadas

La caracterización de las cepas endófitas empleadas en ensayos de germinación, se realizó en función a sus propiedades fenotípicas y genotípicas.

5.3.7.1. Caracterización Fenotípica

5.3.7.1.1. Caracterización Morfológica

Las cepas endófitas seleccionadas fueron activadas en medio TSA (descrito en la sección 5.3.4.3.) para su caracterización macroscópica con los siguientes parámetros de crecimiento de colonias: tamaño, color, forma, textura (Molano, 2004). Para la caracterización microscópica, se tomó una porción de las colonias aisladas para verificar su respuesta a la tinción diferencial Gram, mediante la observación en un microscopio óptico (*Olympus*) con una magnificación de 1000X.

5.3.7.1.2. Caracterización Bioquímica

Las cepas endófitas seleccionadas fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas, características para la identificación de su género (Sgroy & otros., 2009), entre ellas se evaluaron: Acidificación del medio y tolerancia a sal, las cepas endófitas fueron sembradas por estría agotamiento en medio JNFB agar (pH 7) con azul de bromotimol como indicador (0,5% en KOH 0.2 N) y suplementado con NaCl (2% P/V), el desarrollo de colonias provocó un viraje del indicador de verde a amarillo por la acidificación del medio, así mismo las bacterias con capacidad de desarrollar en condiciones de salinidad se reportaron como positivas. Actividad catalasa, las cepas endófitas fueron evaluadas en función a la presencia de la enzima catalasa, para ello se tomó un portaobjetos adicionado con una gota de sustrato (peróxido de hidrógeno, 3%), posteriormente se colocó una porción de colonia sobre la gota, la formación de burbujas indicó actividad positiva. Actividad oxidasa, para esta prueba colocó una tira impregnada con NNN'N' tertrametil-p-fenilen diamina dihidroclorada, como sustrato de la enzima citocromo oxidasa (OXOID) sobre cada colonia, el viraje del indicador a azul indicó actividad positiva. Fermentación de lactosa, se sembraron las cepas endófitas por estría agotamiento en agar Mac Conkey para la diferenciación de bacilos gram negativos con capacidad fermentadora de lactosa, el desarrollo de colonias rosadas indicó fermentación de lactosa.

5.3.7.1.3. Determinación del Antibiotipo

Para la determinación del antibiograma, se empleó la técnica de Kirby-Bauer, inoculando las cepas endófitas a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL en placas con agar Mueller Hinton, con discos de Gentamicina (10µg), Ceftriaxona (30µg), Cloxacilina (1µg), Neomicina (30µg), Eritromicina (15µg), Ciprofloxacina (5µg), Polimixina B (300UI), e incubando a 28°C por 24 horas, se registraron resultados de diámetro de halo de inhibición de cada disco.

5.3.7.2. Caracterización genotípica

5.3.7.2.1. Ensayos moleculares

5.3.7.2.1.1. Extracción de ADN

Las cepas K, t2 y t4 fueron sembradas en TSA, e incubadas a 28°C por 24 horas. A partir de estas, se prepararon suspensiones bacterianas c de cada cepa. El ADN fue extraído mediante el kit Wizard de acuerdo a especificaciones del proveedor (*Promega Corporation*). Posteriormente, el rendimiento y calidad del material genético extraído se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, con una corrida a 100 V durante 20 minutos.

5.3.7.2.1.2. Amplificación de fragmento de 16S rDNA

La amplificación del fragmento de la región hipervariable V6-V8 del 16S ADN se desarrolló con los primers 968 GC y 1371 de acuerdo a Valášková & Baldrian, 2009 (primer forward 968-gc 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3' y primer reverse 1378 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'). Se utilizó 20 µL de mix para la amplificación, constituido por 0,03 U/µL de Taq polimerasa, 1x de buffer, 0.8 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, y 5 µg/mL de ADN. Las condiciones de amplificación del ADN por PCR fueron: 94°C por 2 min, 35 ciclos (92°C por 30 s, 55°C por 1 min, 72°C por 45 s + 1 s/ciclo) y 72°C por 5 min. Posteriormente se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5% (Romero, 2018)

5.3.7.2.1.3. Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE)

El análisis de la estructura de poblaciones de las muestras fue determinado mediante la técnica DGGE la misma fue realizada de acuerdo a Donaire y otros, 2017. Para separar los distintos fragmentos amplificados de la región variable V3 del 16S ADN_r, se realizó una electroforesis en gel con gradiente desnaturante utilizando un gradiente de urea-formamida siguiendo las indicaciones descritas por Muyzer, y otros, 1993.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% (v/v) con diferentes gradientes desnaturantes de urea-formamida de 40 a 60%, (100% de desnaturante definido como: 7 M de urea y 40% de formamida desnaturante), acrilamida/bis-acrilamida

(37,5:1) al 8%. En cada pozo del gel se sembraron 10 µl del producto de amplificación y la electroforesis se realizó a 60 V durante 7 horas en buffer TAE (1x) colocado en el tanque de electroforesis a 60 °C (Ascher, y otros, 2004). Posteriormente se realizó el revelado con bromuro de etidio. Posterior a la verificación de la presencia de bandas únicas en el gel de poliacrilamida, se procedió a realizar la PCR de las muestras empleando los mismos primers, con la diferencia que se usó el 968F sin las repeticiones de GC, 968 F 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3' puesto que este clamp se emplea como un ancla para evitar la desnaturalización completa de los fragmentos de amplificación para realizar DGGE e interfiere en la secuenciación. En este sentido, se emplearon las mismas condiciones de ciclado para la amplificación y mismo contenido de mix, descrito previamente.

5.3.7.2.1.4. Secuenciación e Análisis de datos

Los productos de amplificación del fragmento 16S ADN_r con primers forward y reverse de las muestras K, t2 y t4 fueron enviados al laboratorio de Genética (LABOGEN) para su secuenciación. La secuenciación se realizó por el método de Sanger en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Se analizó la similitud de las secuencias obtenidas mediante la búsqueda de base de datos del gen 16S ADN de la muestra K con el programa BLAST, utilizando el portal del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se creó un fichero de texto con las secuencias del gen de 16S ADN_r depositadas en el GenBank. Se utilizó el programa BioEdit v7 (Hall, 2004) para el alineamiento múltiple con método Clustal W, posteriormente se realizó el análisis filogenético por Neighbour Joining (NJ) con el programa MEGA 7 (Tamura, y otros, 2013).

5.4. Procesamiento de los Datos

5.4.1. Recolección

Los datos fueron tabulados en la base de datos de Excel, para su posterior análisis de acuerdo a cada uno de los experimentos que se realizaron.

5.4.2. Elaboración

Se elaboraron tablas y gráficas con los datos recopilados, en el trabajo de investigación con el programa estadístico GraphPad, prisma (versión 6.0), R (versión 3.5.1) y Microsoft office Excel 2010.

5.4.3. Análisis

El análisis estadístico se realizó mediante el uso de diferentes parámetros estadísticos como: promedio, desviación estándar, *t-student* pareado, $p < 0,05$ y análisis de varianza (ANOVA) con diferencias significativas de $p < 0,01$ usando el programa R versión 3.5.1 y GraphPad, prisma versión 6.0. Todos los experimentos se realizaron por duplicado ó triplicado. Se aplicó un nivel de confianza de $>95\%$ en los experimentos realizados.

6. Resultados y Discusión

Existen múltiples causas que afectan la producción y el rendimiento de cultivos agrícolas, entre ellas: la disminución en la productividad del suelo debido a la erosión, pérdida de la materia orgánica, actividad biológica, salinización, etc., además de la acumulación de los contaminantes, como pesticidas, y la resistencia a las plagas que éstos generan (Sinergia, s. f.). Así mismo, existen varios estudios que buscan más de una forma de poder apalear esta situación que empeora continuamente, causada principalmente por los efectos del cambio climático. Las nuevas tecnologías deben estar orientadas a mantener la sostenibilidad del sistema mediante la explotación racional de los recursos naturales y aplicación de medidas adecuadas para preservar el ambiente (Grageda, Días, Peña, & Vera, 2012), entre los requerimientos más importantes se encuentran, el desarrollo de aquellas tecnologías que permitan el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Tradicionalmente, la deficiencia de nutrientes, especialmente el nitrógeno, es complementada a través de la adición de fertilizantes. Sin embargo, su elevado costo limita su uso, sobre todo en los países en desarrollo como Bolivia. Por otro lado, se estima que los cultivos absorben entre un 20 a 40% del fertilizante aplicado, el resto se pierde por diversos mecanismos, generando cuantiosas pérdidas económicas y contaminación ambiental, como la eutrofización de cuerpos de agua, lluvia ácida, destrucción de la capa de ozono estratosférica e incremento del efecto de invernadero (Duxbury, 1994; Grageda, Días, Peña, & Vera, 2012; Fernández M. , 2013) Se ha valorado que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) contribuye con más nitrógeno al crecimiento de las plantas que la cantidad total de fertilizantes nitrogenados aplicados a los cultivos (Grageda, Días, Peña, & Vera, 2012).

La baja rentabilidad de la actividad agrícola impulsa la investigación para desarrollar nuevos insumos, innovaciones tecnológicas como alternativa, de utilizar la actividad microbiológica para favorecer la nutrición de las plantas. Los microorganismos en la naturaleza, se adaptan continuamente debido a que poseen mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones de estrés, y establecer una relación estrecha microorganismo-planta (co-evolución), de ayuda mutua (Kaul, 2014), entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura prevalecen aquellos destinados al mejoramiento productivo de los cultivos, ya que los microorganismos, entre ellos, las bacterias contribuyen a la producción y el aporte de *fitoestimulantes*, favoreciendo la germinación de semillas y el enraizamiento; además poseen acción *biofertilizante*, debido a que incrementan el abastecimiento de los nutrientes participando en los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos, además pueden ser empleadas como agentes de control biológico de patógenos, entre otros (Bowen & Rovira, 1999; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Grageda, Días, Peña, & Vera, 2012).

Las bacterias de vida libre, y las bacterias endófitas asociadas a las raíces u otros órganos vegetales, estimulan el crecimiento de las plantas y son denominadas Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGP, plant growth promoting), las cuales pueden ser empleadas como bio-inoculantes (Pérez, Santana, Alvarado, Díaz, & Gutiérrez, 2010). Las bacterias endófitas, son aquellas asociadas al tejido interno de la planta, éstas pueden colonizar el espacio intra ó extra-celular, sin causar daño o efectos negativos en su hospedero. Los endófitos son activos a exudados quimioatrayentes de la raíz, que inducen además la adherencia, penetración y distribución a los diferentes tejidos dependiendo de la fisiología y compatibilidad con la planta. Los endófitos atraviesan por una selección natural, y sólo los más adaptados sobreviven y habitan los diferentes tejidos, raíz, tallo ramas y hojas de numerosas especies de plantas. En este sentido, uno de los objetivos primordiales de este trabajo fue seleccionar y aislar bacterias endófitas, a partir de plantas de tarwi (*Lupinus mutabilis*) y thola (*Parastrephia lepidophylla*), en función a sus mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas. Adicionalmente, esta investigación plantea evaluar el potencial de las bacterias endófitas seleccionadas e identificadas, por su capacidad de promover la emisión de la radícula primaria en la germinación de semillas de arroz, tarwi, cañahua y quinua, por ser cultivos de interés económico.

6.1. Población bacteriana endófito cultivable de thola y tarwi

La población bacteriana endófito *cultivable* fue evaluada en el presente estudio empleando la técnica de NMP, basada en la extinción de la población usando diluciones seriadas (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014). Los endófitos *no cultivables* no fueron cuantificados en el presente estudio. El cultivo de bacterias endófitas es posible sólo si microorganismos provenientes de la rizósfera son eliminados previamente del tejido vegetal. Para ello, se emplean múltiples desinfectantes de superficie vegetal, siendo el más común hipoclorito de sodio que es de fácil lavado, puede ser empleado a diferentes concentraciones (0,5-6%) y tiempos de exposición (3-90min), y puede estar en combinación con dos o más desinfectantes (sección 5.3.1.2.3). Sin embargo, el hipoclorito de sodio puede inhibir la población endófito, si es empleado a elevadas concentraciones, puede penetrar el tejido interno de las plantas y como consecuencia afecta la recuperación de endófitos (Munif, Hallmann, & Sikora, 2012). El control de esterilidad de las muestras procesadas demostró la limitación en el desarrollo de las bacterias pertenecientes a la rizósfera (sección 5.3.1.2.3.1), a excepción de la raíz nodular 2 de tarwi (Tabla 3), permitiendo verificar la efectividad del método de esterilización (Anexo 8).

6.1.1. Cuantificación de la población bacteriana endófito total

A pesar de que existen diversos estudios que describen la cuantificación de bacterias endófitas cultivables en plantas leguminosas, por ejemplo en soya (*Glycine soja*) con poblaciones entre 2×10^5 a 4×10^6 UFC/g en nódulos, raíces y tallos (Hung, Kumar, &

Govindsamy, 2007), no se ha descrito la cuantificación de la población endófitas asociada al tarwi (*Lupinus mutabilis*). En este sentido, esta investigación reporta una población variable de endófitos aerobios y anaerobios provenientes de tarwi: en nódulos de $3,0 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^9$ UFC/g y en frutos de $3,6 \times 10^6$ a $9,2 \times 10^7$ UFC/g (Tabla 3). No obstante, el estudio de las secciones como el tallo, hoja y flor de tarwi no reportó la presencia de endófitos cultivables. La ausencia de los endófitos, en algunas secciones de tarwi, pudo deberse a la penetración de las soluciones empleadas en la técnica de esterilización por superficie, al tejido interno de estas secciones (Munif, Hallmann, & Sikora, 2012).

Respecto al estudio de los endófitos de thola (*Parastrephia lepidophylla*), no existe ningún reporte de la población asociada a esta planta. Sin embargo, el presente estudio revela que existe una colonización endófitas en todas las secciones estudiadas, encontrando cantidades de endófitos aerobios y anaerobios de $3,0 \times 10^4$ UFC/g en raíces, entre $4,3 \times 10^9$ y $1,1 \times 10^{12}$ UFC/g en tallos y $2,3 \times 10^7$ UFC/g en ramas (Tabla 3). Estos resultados se hallan en concordancia a los obtenidos por Jalgaonwala & Totaram, (2011), que reportan el aislamiento de bacterias endófitas de las diferentes secciones de plantas de cúrcuma (*Curcuma longa*) y eucalipto (*Eucalyptus globules*), con aptitud a tejidos de hojas > tallos > raíz, como se observó en thola, en el presente trabajo.

Adicionalmente, para cuantificar la población endófitas total se evaluó su desarrollo en condiciones aerobias y anaerobias (Anexo 9). La cuantificación de la población endófitas anaerobia es superior en tallos de thola (en el orden de 1000 veces) a la población cuantificada en condiciones aerobias. Sin embargo, estos datos no reportan diferencia significativa entre estas dos condiciones de cultivo ($p > 0,05$).

Dado que el presente estudio constituye la línea base para la evaluación de endófitos como bioinoculantes, no se consideró la población endófitas anaerobia. Sin embargo, las aplicaciones biotecnológicas de los anaerobios son extensas, entre ellas, bioremediación, control de plagas, síntesis de metabolitos, y otros. Sin embargo, el estudio del potencial de las bacterias endófitas anaerobias está en desarrollo, como el caso del anaerobio *Azoarcus sp.* CIB que es capaz de degradar componentes aromáticos (*tecnología de fitoremediación*), además posee mecanismos promotores del crecimiento de plantas (Fernández, y otros, 2014), por lo cual evaluar a esta población de endófitos anaerobios podría otorgar resultados prometedores en futuros estudios.

Tabla 3. Población endófitas asociada a diferentes secciones de las plantas de thola (*Parastrephia lepidophylla*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*)

Planta	Material Vegetal	Control de Esterilidad	Población endófitas total		Población endófitas fijadora de nitrógeno		
			UFC/g muestra		UFC/g muestra	Incidencia (%)	
			Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Aerobios fijadores N ₂ / Aerobios totales	
Tarwi	Nódulos de Raíz	1	+	3,0x10 ³	7,4x10 ⁶	1,1 x10 ³	37
		2	-	-	-	-	-
		3	+	2,4x10 ⁹	1,1 x10 ⁹	1,1 x10 ⁵	<0,1
		4	+	5,2x10 ⁷	1,1 x10 ⁹	3 x10 ⁴	<0,1
	Tallo	+	0	0	0	0	
	Hoja	+	0	0	0	0	
	Flor	+	0	0	0	0	
	Fruto	+	9,2x10 ⁶	3,6x10 ⁶	3,0x10 ²	<0,1	
Thola	Raíz	+	3,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴	2,4 x10 ⁴	97	
	Tallo	+	4,3x10 ⁹	1,1 x10 ¹²	1,1 x10 ⁷	0,3	
	Rama	+	2,3x10 ⁷	2,3x10 ⁷	1,1 x10 ³	<0,1	

+ Confirmación de la esterilidad de la muestra, 0 sin desarrollo, - Muestra descartada por contaminación

6.1.2. Cuantificación e incidencia de la población endófitas cultivables fijadoras de nitrógeno recuperadas de thola y tarwi

La población bacteriana endófitas fijadoras de nitrógeno ha sido foco de numerosos estudios, debido a la importancia de este nutriente esencial (N₂), en el desarrollo de las plantas. Se ha encontrado bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, que colonizan el tejido interno de las plantas, como el arroz (*Rhynchoryza subulata*) reportado por Barraquio W. (1997) encontrando poblaciones de 10³–10⁷ UFC/g en raíces y 10⁴–10⁶ UFC/g en tallos. El presente estudio reporta la cuantificación de la población endófitas fijadora de nitrógeno incidente en la población bacteriana endófitas total. En el caso de nódulos y frutos de tarwi, corresponde a 1 x10⁵ y 3 x10² UFC/g, respectivamente, con un porcentaje de incidencia menor a 0,1 % para ambas secciones de la planta. Sólo en una muestra de raíz nodular de tarwi se encontró 1 x10³ UFC/g de endófitos fijadores de nitrógeno, correspondiente al 37% de incidencia respecto al total (Tabla 3).

Por otra parte, el estudio de la población endófitas fijadora de nitrógeno de thola denota cantidades de endófitos 2,4 x10⁴ UFC/g, 1,1 x10⁷UFC/g y 1,1 x10³ UFC/g en raíces, tallos y ramas, con porcentajes de incidencia de 97, 0,3 y <0,1% respecto a la población total (Tabla 1).

La población endófitas fijadora de nitrógeno de interés en este estudio, estuvo comprendida por bacterias que desarrollan en condiciones aerobias (Anexo 9), debido a su factibilidad de cultivo. En ambas plantas estudiadas (thola y tarwi) hubo mayor incidencia de endófitos fijadores de nitrógeno en raíces, esto podría estar explicado por

la proximidad de la raíz al suelo, lo que hace más factible la colonización de endófitos en esta sección de la planta.

6.2. Aislados endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico

Por muchos años se ha empleado diferentes medios carentes de nitrógeno como estrategia para recuperar bacterias con capacidad de fijar este nutriente de la atmósfera (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014). En ese sentido, se han reportado varios estudios que describen el aislamiento de endófitos fijadores de nitrógeno a partir de plantas de la familia de las leguminosas y otras, basado en el criterio descrito anteriormente. En este estudio, se empleó medio JNFB, carente de nitrógeno, como primer factor de selección de endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico. Se recuperaron aislados endófitos a partir de homogenados y explantes de tejido vegetal de tarwi y thola. En este sentido, se aislaron 52 endófitos bacterianos de las plantas en estudio, 27 procedentes de thola y 25 de tarwi, con una distribución por sección de planta presentada en la Tabla 4, donde se puede observar que un mayor número de aislados endófitos fijadores de nitrógeno fue recuperado a partir de raíces nodulares de tarwi 23 aislados y sólo 2 aislados a partir de fruto. Respecto al aislamiento de endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico, a partir de la thola, se logró recuperar 13 aislados endófitos de la raíz. La apetencia de los endófitos fijadores de nitrógeno, por esta sección de la planta fue demostrada, mediante los porcentajes de incidencia, descrito en la sección 6.1.2. Los endófitos aislados tanto en tallo como en las ramas fueron similares, 7 aislados de cada sección (Tabla 4). La existencia de cierta apetencia, por cada tejido vegetal puede ser explicada por las condiciones del medio: bajas condiciones de estrés, pH y temperatura adecuada (Roesch, Camargo, Bento, & Triplett, 2008). Además, la colonización de endófitos, depende de las características propias de cada planta y su entorno. Otros estudios sugieren que los endófitos tienen una preferencia por el tejido vegetal donde habitan, para multiplicarse, encontrándose principalmente en raíces y minoritariamente habitando tallos u hojas (Montañez, Abreu, Gil, Hardarson, & Sicardi, 2009). En otros estudios (Pérez, Cupull, Alvarado, Díaz, & Torres, 2010), se demostró la colonización y apetencia de endófitos al tejido vegetal, la cual varía de acuerdo a la planta, a partir de maíz se aislaron 178 cepas endófitas en medios selectivos (carentes de nitrógeno) de 19 cultivos de maíz: 83 aislados de tallos, 54 de raíces, 30 de semillas y 20 aislados de hojas, evidenciando la presencia de endófitos en el tallo de todos los cultivos, y en algunos casos se aisló endófitos de semillas, raíces, y hojas, lo relevante del estudio realizado por Jalgaonwala & Totar (2011) fue que, a pesar de haberse estudiado diferentes partes de varias plantas de la misma especie, sólo de una planta de maíz se aislaron endófitos de todas las secciones, misma característica evidenciada en el presente estudio, al existir una colonización endófitas cultivables en todas las secciones estudiadas de thola.

6.2.1. Efecto de las condiciones de cultivo para la recuperación de endófitos fijadores de nitrógeno

En este estudio se realizó el aislamiento de endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico, a partir de homogenados y explantes de tejido vegetal, considerando que para la recuperación de endófitos, es relevante emplear medios de cultivo adecuados, que favorezcan su desarrollo óptimo (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014). La técnica de aislamiento a partir de explantes, se basa en la recuperación de endófitos liberados mediante cortes finos del tejido vegetal, estos cortes favorecen la liberación de los endófitos al medio de cultivo. Es así que en el presente estudio se pudo recuperar un total de 30 aislados a partir de explantes de tarwi y thola (Tabla 4). Se ha demostrado anteriormente, que es posible aislar endófitos fijadores de nitrógeno, a partir de explantes, como fue descrito para explantes de tallos de *Chelidonium majus* L. (Goryluk, Rekosz, & Blaszczyk., 2009), cúrcuma (*Curcuma longa*) y eucalipto (*Eucalyptus globules*), recuperando aislados endófitos a partir de explantes de hojas, tallos y raíz (Jalgaonwala & Totaram, 2011). Asimismo el estudio del aislamiento de endófitos a partir de explantes, ha demostrado que es posible aislar un numero variable de endófitos, a partir de varias plantas de una misma especie hospedera (Procópio, Araújo, Maccheroni, & Azevedo, 2009). Esto puede ser debido a que, la población endófitica cultivable de cada planta es *única*, por ello resulta casi imposible aislar el mismo número de endófitos en dos plantas de igual especie.

La preparación de homogenados de tejido vegetal es empleada ampliamente para el aislamiento de endófitos con diferentes propósitos, entre ellos: promotores del crecimiento de plantas, endófitos halófilos, hiper-acumuladores de níquel, entre otros. Esta técnica de aislamiento está basada en la disrupción del tejido vegetal de interés y posterior liberación de las bacterias endófitas al medio de cultivo (Barzanti, y otros, 2007). En el presente estudio se recuperaron 22 aislados a partir de homogenados de tarwi y thola (Tabla 4), en otros estudios se demostró que es posible aislar endófitos a partir de homogenados de hojas de especies vegetales como *S. brachiata*, *S. indicus*, *C. cretina* y *S. nudiflora* (Arora, Patel, Vanza, & Rao, 2014). A pesar de que es posible aislar endófitos a partir de homogenados vegetales (Fig.2), este procedimiento es grosero, debido a que existe una ruptura y destrucción del tejido vegetal, que puede llegar a dañar a la población endófitica existente (Barzanti, y otros, 2007), como pudo haber sucedido en el presente estudio ya que se recuperó un mayor número de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno a partir de explantes del tejido vegetal de las plantas de thola y tarwi (Fig.2).

Por otro lado, también se evaluaron condiciones de cultivo en aerobiosis y microaerofilia, que favorecen la recuperación de aislados endófitos fijadores de nitrógeno atmosférico de ambas plantas estudiadas. Se recuperó un mayor número de aislados endófitos, en condiciones de aerobiosis 36 aislados, a diferencia de los 16 aislados recuperados bajo condiciones de microaerofilia (Tabla 4). La población

aeróbica, ha sido investigada ampliamente, para el aislamiento de endófitos a partir de raíz, tallo, hojas de diversas plantas (Barzanti, y otros, 2007). Sin embargo, algunas especies bacterianas, como *Azoarcus indigenes*, requieren condiciones de microaerofilia para realizar la fijación de nitrógeno atmosférico (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014), por tal razón esta condición no puede ser obviada para el aislamiento de endófitos con los mismos requerimientos. Por lo planteado anteriormente, los resultados sugieren que es posible aislar endófitos fijadores de nitrógeno a partir de explantes y homogenados de raíces, aislados de tarwi y thola, siendo la condición aerobia la que favoreció recuperar un mayor número de aislados.

Tabla 4. Número de aislados endófitos fijadores de nitrógeno, a partir de homogenados y explantes, en dos condiciones de cultivo

		Homogenados		Explantes		Total
		Aerobiosis	Microaerofilia	Aerobiosis	Microaerofilia	
Tarwi	Raíces	3	3	12	5	23
	Fruto	0	0	2	0	2
Thola	Raíz	8	0	0	5	13
	Tallo	1	0	3	3	7
	Rama	7	0	0	0	7
Total		22		30		52

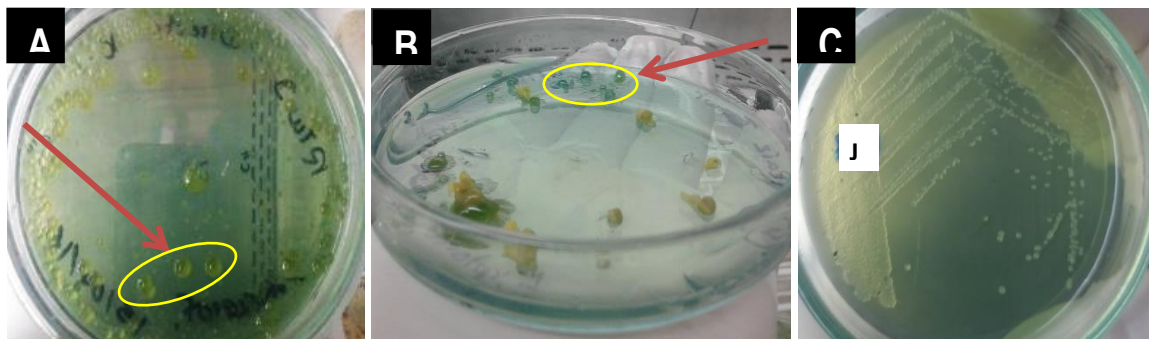


Figura 2. Aislamiento de endófitos de raíces nodulares del tarwi (*Lupinus mutabilis*) en JNFB. A: Desarrollo de colonias a partir de la muestra homogenada; B: Desarrollo de colonias alrededor de explantes; C. Colonias aisladas de la cepa J.

6. 3. Mecanismos endófitos potenciales para la promoción del crecimiento de plantas

6.3.1. Bacterias endófitas solubilizadoras de fosfatos

El fósforo existe en la tierra tanto en su forma orgánica como inorgánica, es un nutriente esencial para el buen desarrollo de las plantas, proporciona la energía necesaria para los procesos metabólicos, además de ser considerado indispensable para la síntesis de ácidos

nucleicos (Muhammad H. H., 2013). La mayor parte del fosfato disponible en los suelos se encuentra en su forma insoluble, lo que hace difícil su uso. El fosfato del suelo se encuentra en su forma inorgánica, y está cargado negativamente, por ello puede reaccionar fácilmente con cationes, formando fosfato férrico, de aluminio y cálcico, transformándose así en formas insolubles, no disponibles para la planta (Oldham, 2011). Aunque el contenido promedio de fósforo en la tierra es cercano a 0,05 % (P/ P), solamente 0,1 % de éste, se encuentra en una forma accesible (Illmer, Barbato, & Schinner, 1995; Panta & Pande, 2016).

Los mecanismos de solubilización de fosfatos permiten poner a disposición este elemento del suelo, para ser empleado por las plantas, estos mecanismos son eficientemente ejecutados por las bacterias, inclusive mejor que los hongos (Dinić, y otros, 2014). Es así que, en el presente estudio, se evaluó la capacidad endófito solubilizadora de fosfatos, como segundo factor de selección de endófitos fijadores de nitrógeno. En este sentido, de un total de 52 aislados a partir de tarwi y thola, evaluados cualitativamente por su capacidad solubilizadora de fosfatos, 24 aislados presentaron esta capacidad (++/+++, Tabla 5) evidenciada mediante la formación de un mayor halo de solubilización de fosfatos alrededor de las colonias (++ entre 4-7mm y +++ entre 7-10mm Fig. 3). Estos resultados señalan que, no todos endófitos fijadores de nitrógeno aislados poseen la capacidad de solubilizar fosfatos, en concordancia a otros estudios realizados, donde a partir de un total de 20 aislados (raíces de palmeras) sólo 4 presentaron un halo de solubilización alrededor de las colonias (Mahmoud, Irin, & Glick, 2015).

La evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfatos mediante el ensayo semicuantitativo, permitió estudiar la potencialidad de los 24 aislados seleccionados por la prueba cualitativa previa. A diferencia del primer ensayo, se empleó la misma densidad celular para todos los aislados bacterianos endófitos (6×10^8 UFC/mL) a ser evaluados. En ese sentido, de los 24 aislados, sólo 4 cepas K, J (provenientes de tarwi) y t2, t4 (provenientes de thola) fueron seleccionados en función a sus diámetros de solubilización variables entre 14-19mm en menor tiempo (Tabla 5, Fig 3, Anexo 10). Otros estudios realizados por Dinić, y otros, (2014) empleando endófitos bacterianos aislados a partir de los nódulos de frijol, demostraron que algunos de estos poseían la capacidad de solubilizar fosfatos en placa, exhibiendo halos de solubilización de entre 3-5,5mm de diámetro. Es interesante hacer notar que, los halos de solubilización de los 4 aislados endófitos seleccionados en este estudio, son superiores a aquellos descritos en otras investigaciones, por lo cual su capacidad solubilizadora y por tanto promotora del crecimiento de plantas podría ser efectiva.

En ese sentido, se evaluó la cinética de solubilización de fosfatos empleando las cuatro cepas seleccionadas (K, J, t-2 y t-4), que expresaron un Índice de solubilización variable entre 1,8 y 2,8 (Tabla 3). Sin embargo, otros estudios realizados reportaron Índices de

solubilización entre 1,2 y 3,2 (Kibrom, Alemayehu, & Prakasam, 2017) lo descrito con *Azotobacter sp.* aislado del suelo, demostró un índice de solubilización del 1,5 (Escobar, Horna, Carreño, & G., 2011). El índice de solubilización puede incrementarse debido al contacto directo y constante con las formas insolubles de fosfato, la cual está directamente relacionada con procesos biológicos, como la producción de ácidos orgánicos, quelación, reacciones de intercambio iónico que hacen disponible a este nutriente (Panta & Pande, 2016).

Tabla 5. Capacidad solubilizadora de fosfatos de aislados endófitos fijadores de nitrógeno

TARWI				THOLA			
Cepa	Cualitativo	Semi-cuantitativo (mm)	Índice de solubilización (IS)	Cepa	Cualitativo	Semi-cuantitativo (mm)	Índice de solubilización (IS)
K	+++	19	2,8	t4	+++	16	2,2
J	++	14	1,8	t2	+++	16	2,2
L-2	++	13	1,6	5(2)b	++	14	1,8
L-1	++	12	1,4	5(1)	++	14	1,8
G-1	++	11	1,2	5(2)a	++	12	1,4
lota	++	10	1,0	O-3	++	10	1,0
G-2							
lambd	++	10	1,0	r	++	10	1,0
a							
l-1	++	10	1,0	E-2	++	9	0,8
lota	++	9	0,8	E-1	++	7	0,4
G-1							
F	++	8	0,6	O-1	++	0	0,0
G-2	++	8	0,6	O-2	++	0	0,0
p	++	7	0,4	N	+	N/S	N/S
l-2	++	0	0,0	u	+	N/S	N/S
q	+	N/S	N/S	gamm	+	N/S	N/S
				a			
rho	+	N/S	N/S	delta	+	N/S	N/S
H	+	N/S	N/S	beta	+	N/S	N/S
s	-	N/S	N/S	j	+	N/S	N/S
lota P	-	N/S	N/S	A	+	N/S	N/S
tiha	-	N/S	N/S	4	+	N/S	N/S
phi	-	N/S	N/S	ñ	+	N/S	N/S
etha	-	N/S	N/S	1	+	N/S	N/S
h2	-	N/S	N/S	2	+	N/S	N/S
k alfa	-	N/S	N/S	n	+	N/S	N/S
epsilo	-	N/S	N/S	M	-	N/S	N/S
n							
o	-	N/S	N/S	3	-	N/S	N/S
				B	-	N/S	N/S
				C	-	N/S	N/S

Evaluación cualitativa del halo de solubilización: +++: mayor (7-10mm), ++: moderado (4-7mm), +: menor (<4mm)-: ausencia

N/S, No seleccionado y por tanto no evaluado.

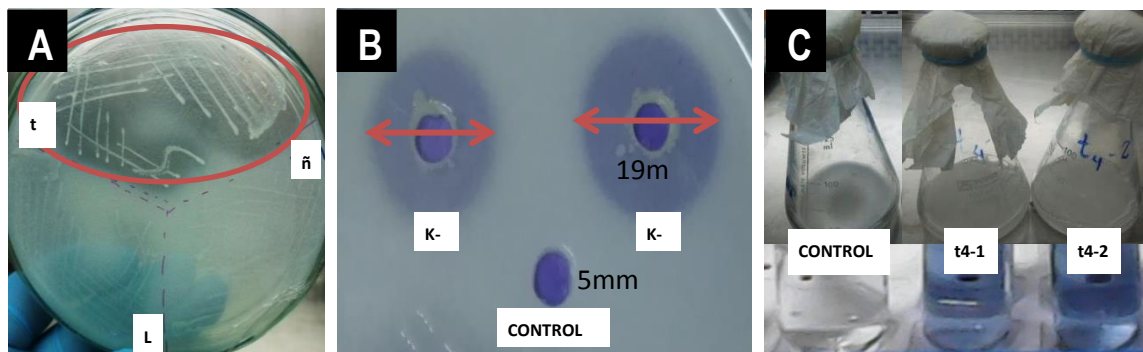


Fig 3. Solubilización de fosfatos: A. Ensayo cualitativo: Halo de solubilización (cepas aisladas: t2, ñ y L); B. Ensayo semicuantitativo: Diámetro del halo de solubilización de la cepa K; C. Ensayo cuantitativo: Cultivo de la cepa t4 en medio NBRIP

La cinética de solubilización de las cepas seleccionadas J, K, t2 y t4 en función al tiempo de cultivo se muestra en la Fig.4. Las cepas t2 y J presentaron una similitud en cuanto a su cinética de solubilización de fosfatos ascendente de 3,8 a 11,5 y 2,6 a 15,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, durante 14 días de incubación (con diferencia significativa respecto al control, $p < 0,05$). Sin embargo, exhibieron una variación de pH diferente, fluctuando entre 6,5 a 4,2 y 6,6 a 5,4 para la cepa t2 y J, respectivamente (Fig. 4 A y B.). Alternativamente, las cepas t4 y K presentaron una cinética de solubilización ascendente en los primeros 3 días de incubación variando de 3,6 a 11,9 y 1,4 a 16,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, manteniéndose casi invariable hasta el día 14 de incubación (con diferencia significativa respecto al control $p < 0,05$). La variación de pH del medio fluctuó entre 6,5 a 4,3 y 6,6 a 3,9 para t4 y K, respectivamente (Fig. 4. C y D). Es así, que en este estudio se evidenció dos tipos de cinética de solubilización de fosfatos, comprendida por: grupo I, cepas t2 y J con un perfil de solubilización ascendente en el tiempo (14 días) y grupo II cepas t4 y K con un perfil de solubilización más rápido (3 días). Las cepas del grupo II, presentaron mayor eficiencia de solubilización de fosfatos (Tabla 5).

Para evaluar la cinética de solubilización de las cepas seleccionadas se recurrió a un ANOVA de medidas repetidas ya que se tomaron muestras en varios días. Los resultados de la prueba de ANOVA de medidas repetidas (sin asumir esfericidad), reportan que existe diferencia significativa en la cinética de solubilización de las cepas a lo largo de los 14 días, respecto al control abiótico ($p < 0,02$), Fig. 4.2, Anexo 11.

Otros estudios realizados empleando aislados endófitos a partir de frijol, reportan que *Pseudomonas sp.* posee capacidad solubilizadora de fosfatos en un rango de 14-182 $\mu\text{g/mL}$ al cabo de 3 días de incubación con valores de pH entre 4,53-5,57 (Dinić, y otros, 2014). Otros autores que estudiaron estos mecanismos con endófitos aislados de palmeras, reportaron valores de solubilización entre 26– 206 $\mu\text{g/mL}$ de fosfato (Mahmoud, Irin, & Glick, 2015). Uno de los mecanismos más importantes de solubilización de fosfatos en plantas asociadas a bacterias, es la producción de ácidos

orgánicos, lo que produce la acidificación del suelo o medio de cultivo. En ese sentido, se encontró una correlación directa entre la acidificación del medio NBRIP y la concentración de fosfato soluble. En estudios previos se reportó un mecanismo similar en bacterias gram negativas siendo la acidificación atribuida principalmente a la producción de ácido glucónico (N Ahmed, 2009). Además, también se ha reportado la presencia de cantidades bajas de ácidos láctico, succínico, acético, propiónico y cítrico. Los ácidos orgánicos pueden quelar el catión unido al fosfato con su grupo hidroxil y carbonil (Oteino, y otros, 2015) de esta forma los fosfatos insolubles se solubilizan. Sin embargo, en el presente estudio no se determinó la presencia de ácidos orgánicos excretados por los endófitos J, K, t2 y t4, que hubiera sido importante para explicar la acidificación del medio durante la solubilización de fosfatos.

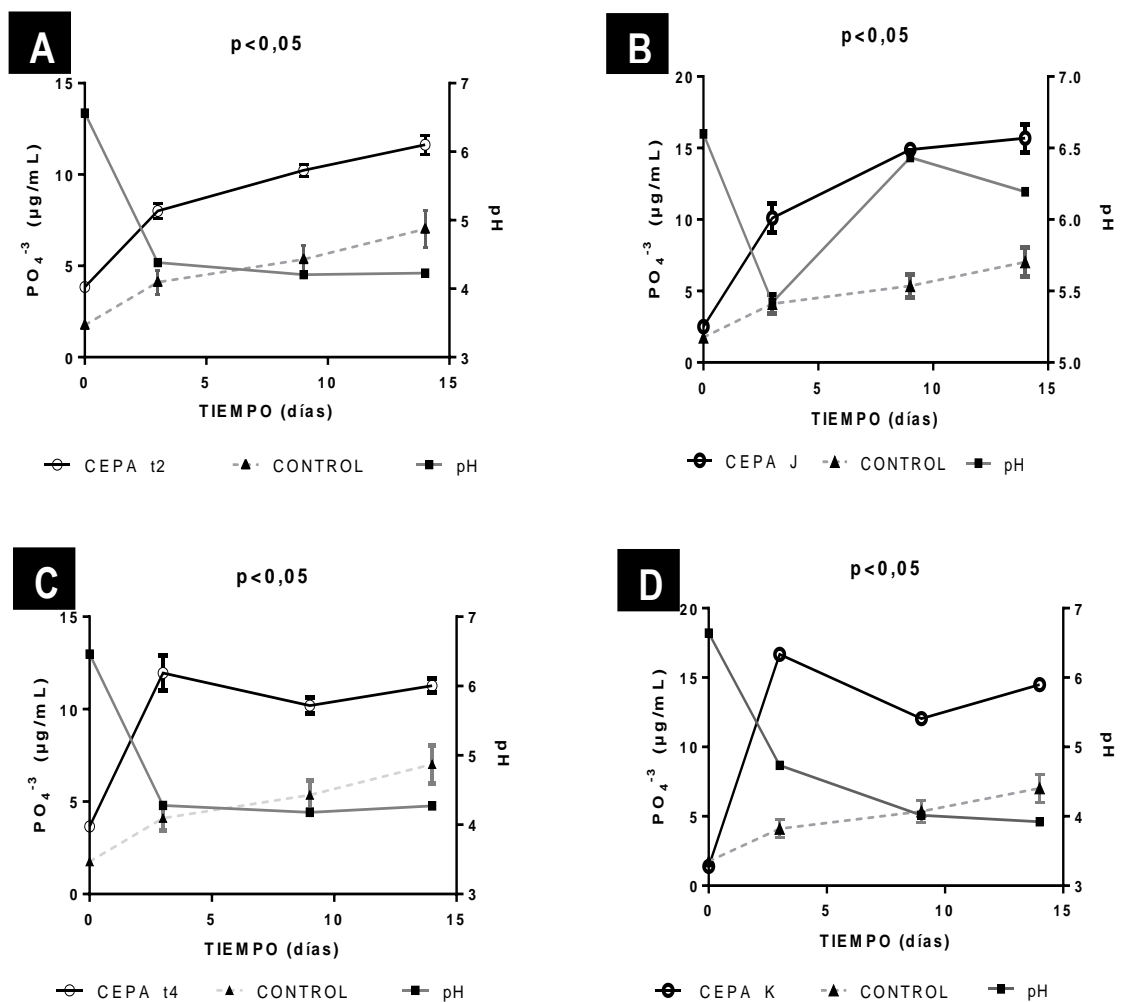


Fig. 4.1. Cinética de solubilización de fosfatos y variación de pH. A. cepa t2 y B. cepa J (Grupo I). C. cepa t4 y D. cepa K (Grupo II). Diferencias significativas respecto al control abiótico ($p < 0,05$).

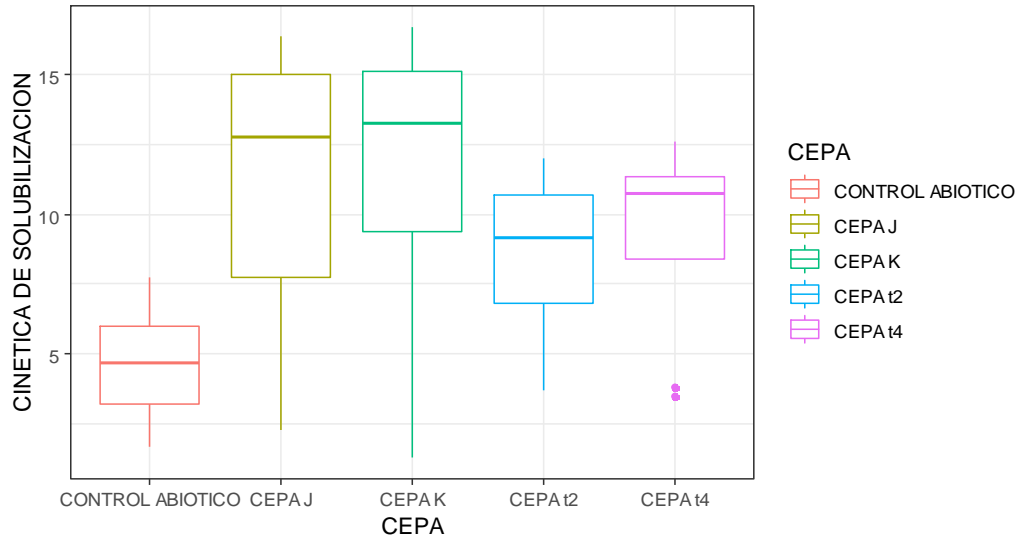


Fig. 4.2. Gráfico de cajas de la cinética de solubilización de las cepas J, K, t2 y t4. Diferencias significativas ($p < 0,02$) respecto al control abiótico

Las cepas J, K, t2 y t4 fueron seleccionadas por presentar los mayores niveles de solubilización de fosfatos, además de poder desarrollarse en el medio JNFB carente de nitrógeno. Por ello, se reportan resultados de experimentos posteriores con estos aislados, que contribuyen al estudio de los mecanismos relacionados con la promoción del crecimiento de plantas de estas cepas.

6.3.2. Bacterias endófitas inductoras de la producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de ácido 3-indol acético (AIA) como inductor del desarrollo de plantas, es una característica propia de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas. La detección de esta fitohormona, se basa en una técnica colorimétrica que emplea el triptófano como precursor de la misma.

Las cepas seleccionadas en este estudio t2, t4, J y K produjeron concentraciones de AIA de 100,4; 6,1; 16,4 y 188,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (con diferencia significativa respecto al control abiótico, $p < 0,05$) (Fig.5). Es importante resaltar que las cepas K y t2 presentaron los valores más altos en la producción de esta fitohormona. El análisis de la producción de AIA, fue realizado por la prueba de Kruskal-Wallis, donde se muestra que si existe diferencia significativa en la producción de ácido indol acético (AIA), inducida por cada cepa ($p < 0,01$). Asimismo, la capacidad de inductora de la producción de AIA disminuye de forma significativa en el siguiente orden CEPA K > CEPA t2 > CEPA J > CEPA t4 > Control, Anexo 11. Estos resultados muestran que la producción de AIA, como mecanismo directo de promoción del crecimiento de plantas, es una característica propia de cada cepa.

Estos datos concuerdan con estudios previos de endófitos aislados del tejido vegetal de la soya (nódulo, raíz y tallo), los cuales presentaron valores de producción de AIA mayores a 7,2 $\mu\text{g/mL}$ (Hung, Kumar, & Govindsamy, 2007; Singh, Sharma, & Kaur, 2013). Otros endófitos aislados de la raíz de maíz reportan niveles superiores a 150 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Pereira & Castro, 2014). No obstante, la mayor producción de AIA ha sido reportada en bacterias de la rizósfera, por ejemplo, en los cultivos de *Pseudomonas sp.*, que producen alrededor de 346 $\mu\text{g/mL}$. Recientemente, Bozo K.Y., (2017), estudió esta característica en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas del suelo adyacente a plantines de thola, donde los valores más altos respecto a la producción de esta fitohormona fluctúan entre 54 y 45 $\mu\text{g/mL}$. En la actualidad, se ha reportado que alrededor del 30% del total de aislados endófitos pueden llegar a producir AIA en concentraciones de 20 a 125 $\mu\text{g/mL}$ (Kumar & otros., 2017). Las cepas endófitas J, K, t2 y t4, seleccionadas en el estudio están dentro de ese porcentaje que poseen la capacidad de producir el AIA. Siendo que el AIA es efectivo en mínimas concentraciones, éste puede actuar sobre el tejido vegetal, regulando ciertas funciones fisiológicas. El AIA se encuentra disponible gracias a ciertas rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis, que incluyen reacciones redox y metabolitos como: indol 3-acetamina, indol-3-piruvato, triptamina, triptófano-oxidasa, indol-3-acetonitrilo (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007; Umesh & Ashok, 2011). Una de las rutas metabólicas empleadas por bacterias, hongos y levaduras, que involucra el aminoácido triptófano como precursor de la fitohormona es la del indol-3-piruvato. El triptófano es convertido en ácido indol pirúvico, mediante una reacción de transaminación que requiere un ceto-ácido y fosfato piridoxal además de la enzima, luego el ácido indol-3-piruvico es descarboxilado a indol acetaldehído por una reacción que requiere fosfato de tiamina, luego una oxidasa u deshidrogenasa oxida el indol acetaldehído a ácido indol acético (Perumal & Perumal, 2012). Cabe resaltar, que el triptófano se encuentra en forma natural dentro de plantas, siendo parte del metabolismo de proteínas (Ghosh & Basu, 2006), por ello la regulación como precursor de la fitohormona resulta fundamental para el desarrollo de las plantas.

El AIA, también puede ser sintetizado de forma natural en las plantas, por rutas metabólicas independientes del triptófano. Es así que la planta puede obtener a esta fitohormona, para la estimulación de su crecimiento. En el presente estudio se evaluó la producción de esta fitohormona, empleando el aminoácido triptófano como precursor. Considerando que, las plantas y bacterias endófitas poseen la maquinaria metabólica capaz de sintetizar el AIA. En ese sentido, la evaluación colorimétrica del AIA, permitió amplificar el metabolismo de biosíntesis presente.

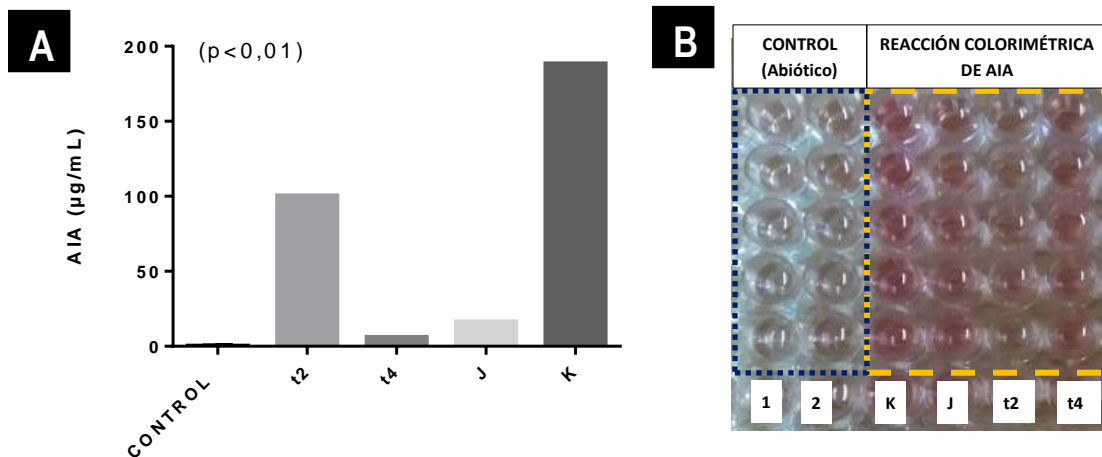


Fig. 5. A. Producción de Ácido Indol Acético (AIA) empleando las cepas t2, t4, J y K (Diferencias significativas respecto al control abiótico, $p < 0,01$), con el siguiente orden CEPA K > CEPA t2 > CEPA J > CEPA t4 > Control. B. Reacción colorimétrica del AIA.

6.3.3. Actividad fijadora de nitrógeno de bacterias endófitas seleccionadas

El complejo enzimático denominado nitrogenasa actúa en la reducción del nitrógeno atmosférico en amoníaco, una forma química asimilable por los organismos, de esta forma puede ser metabolizado para compensar total o parcialmente los requerimientos de este nutriente durante desarrollo de la biomasa vegetal, ésta fuente inorgánica es empleada para la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados esenciales (Pérez, Tuberquia, & Amell, 2014). Cabe resaltar que este mecanismo de asimilación del nitrógeno sólo puede ser realizado por un grupo restringido de organismos, entre ellos plantas, bacterias y arqueas.

El estudio del complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno atmosférico, a través de la evaluación de la reducción de acetileno a etileno, permite usar este ensayo de alta sensibilidad de forma cuantitativa (Castle, 2010). En ese sentido, este ensayo permitió evaluar la actividad fijadora de nitrógeno de las bacterias endófitas seleccionadas en ensayos previos. El ensayo de reducción de acetileno (ARA), está basado en la actividad nitrogenasa, que cataliza la reducción no sólo del nitrógeno atmosférico, sino de muchos sustratos que posean un triple enlace en su estructura, como es el caso del acetileno (Staal, Lintel-Hekkert, Harren, & Stal, 2001). El etileno, producto de ésta reducción fue cuantificado mediante cromatografía de gases empleando un medio con 10% de acetileno, donde los electrones en movimiento son usados para reducir el acetileno, y no así el nitrógeno atmosférico presente (Loiret, Ortega, Kleiner, Ortega-Rode, & Rode, 2004).

En estudios realizados en la población endófitas de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), evaluaron la actividad nitrogenasa de 103 aislados que fueron sometidos al ensayo de reducción de acetileno (ARA), donde sólo 12 presentaron actividad

significativa (+) en este ensayo (Taulé, y otros, 2012). En el presente estudio, las 4 cepas seleccionadas (t2, t4, J y K), fueron evaluadas mediante el ensayo (ARA), las cepas t4 y K reportaron valores de 5,5 y 5,8 nmol Etileno/h, respectivamente, mientras que las cepas t2 y J presentaron actividad fijadora de nitrógeno de 3,5 y 4,5 nmol Etileno/h, respectivamente (Fig. 6). Todas las cepas presentaron diferencia significativa respecto al control abiótico ($p < 0,05$). Adicionalmente, el ensayo ARA, fue realizado empleando una cepa de referencia, *Rhizobium sp.* El género bacteriano *Rhizobium*, es empleado comercialmente, por la actividad fijadora de nitrógeno, característica en este género. En este ensayo la cepa control presentó una actividad de 4,9 nmolEtileno/h. Sin embargo, únicamente las cepas t4 y K, presentaron mayor actividad fijadora de nitrógeno, con diferencia significativa ($p < 0,05$), respecto a la cepa de referencia (*Rhizobium sp.*). Para analizar la actividad fijadora de nitrógeno de las cepas, se recurrió a una prueba de Kruskal-Wallis, los resultados de esta prueba muestran que si existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) Anexo 11. Así también, la actividad fijadora de nitrógeno disminuye de forma significativa en el siguiente orden CEPA K > CEPA t4 > *Rhizobium sp.* > CEPA J > CEPA t2 > Control abiótico.

Otros estudios realizados a partir de bacterias endófitas aisladas de caña de azúcar, reportaron valores entre 1,3 a 3,1 nmolEtileno/h (Loiret, Ortega, Kleiner, Ortega-Rode, & Rode, 2004). Estudios realizados en bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico reportaron valores de 0,00013 a 0,8 nmolEtileno/h (Hernández, Ferrera, & Rodríguez, 2002).

En ese sentido, las cepas endófitas seleccionadas poseen actividad fijadora de nitrógeno significativa, como mecanismo de la promoción del crecimiento de plantas. Sin embargo, el ensayo *in vitro* realizado en condiciones de laboratorio, es muy diferente a las condiciones fisicoquímicas del tejido vegetal (fuente de carbono, temperatura de incubación, tiempo, etc.), que podrían no ser óptimas para la fijación de nitrógeno, y es posible que el medio de cultivo empleado no sea el adecuado para la expresión de la actividad fijadora de nitrógeno (Taulé, y otros, 2012). Montañez (2009) demostró que el medio selectivo (carente de nitrógeno) no es un factor que confirme definitivamente la capacidad fijadora de nitrógeno, ya que, de 178 cepas endófitas evaluadas mediante el ensayo de reducción del acetileno, únicamente 11 cepas presentaron actividad.

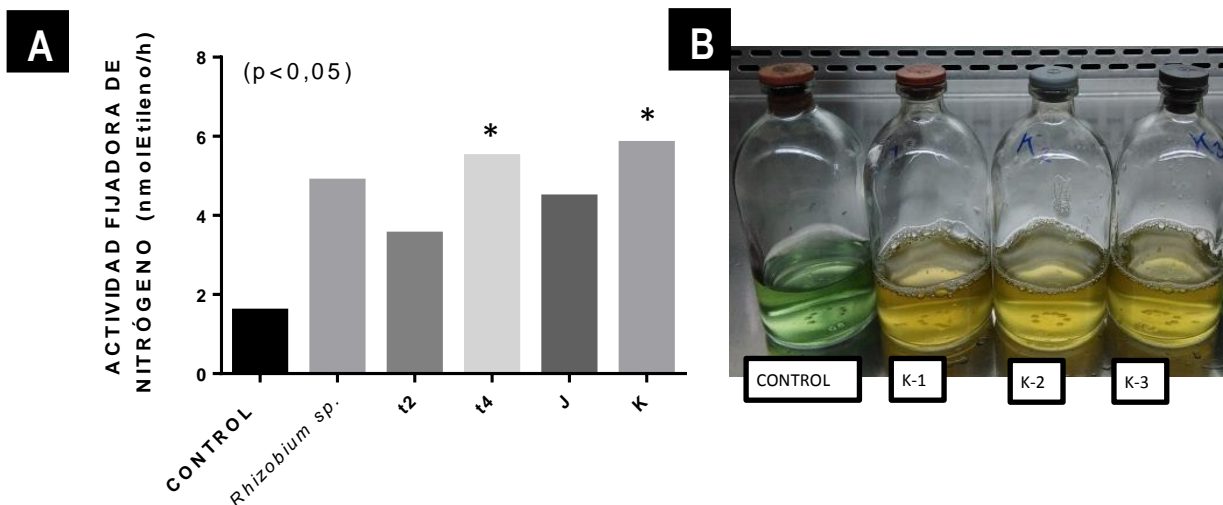


Fig. 6. A. Actividad fijadora de nitrógeno de bacterias endófitas seleccionadas (*: cepas con diferencia significativa respecto a *Rhizobium sp.*, $p < 0,05$). B. Cultivo de la cepa K en el medio JNFB, control abiótico en el extremo izquierdo.

Es así que, en el presente trabajo de un total de 52 cepas endófitas aisladas, en un medio selectivo carente de nitrógeno, las cuatro cepas seleccionadas (J, K, t2 y t4), presentaron actividad fijadora de nitrógeno mediante el ensayo de reducción del acetileno, empleando el medio selectivo (JNFB) en el presente estudio.

Se ha reportado que una misma bacteria endófitas posea varios de los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, las cuatro cepas seleccionadas poseen estos mecanismos en mayor o menor grado, por ello fueron candidatos idóneos para evaluar su efecto en la germinación de semillas de interés en la región.

6.4. Promoción de la germinación de semillas empleando endófitos

Las bacterias endófitas pueden colonizar toda clase de plantas, sin causar daño al tejido vegetal. Es importante resaltar que ésta colonización depende de diversos factores como las condiciones ambientales, especie vegetal (genotipo de la planta), tipo de tejido (etapa de desarrollo) y la interacción con otros microorganismos propios de la planta que también pueden influenciar en la colonización de endófitos (Mocali y otros, 2003; Araujo y otros, 2002; Perez, Rojas, & Fuentes, 2010). Los efectos benéficos de la inoculación de bacterias endófitas en muchas plantas de cultivo, han sido descritos por numerosos autores, como una tecnología nueva e innovadora para mejorar la producción de los cultivos, sin causar daño al medio ambiente.

Algunas bacterias endófitas ejercen los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas como: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, de igual forma pueden inducir antagonismo a agentes patógenos. En ese sentido, en el presente estudio se evaluaron de manera individual, los

mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, descritos en secciones anteriores. La evaluación de las cepas seleccionadas como promotores de la germinación, fue realizada mediante su inoculación directa en semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua, por ser consideradas plantas de interés económico en Bolivia, debido a su alto valor nutricional y su consumo elevado en el país. La actividad promotora de germinación *in vitro* fue evaluada en función a crecimiento radicular de las semillas.

Un aspecto fundamental en la evaluación *in vitro*, fue la selección preliminar de las cepas con mayor efecto inductor en la germinación de cada tipo de semilla. Para ello, las 4 cepas seleccionadas fueron inoculadas en todas las semillas para su evaluación preliminar, reportando diferencias significativas ($p < 0,05$) del tratamiento 3 (suspensión bacteriana de endófitos, descrita en la sección 5.3.6.3) respecto al tratamiento control 1 (agua destilada estéril) como se reporta en la Tabla 6. Las bacterias endófitas poseen cierta especificidad de colonización, determinante para el éxito o fracaso de la promoción del crecimiento de plantas, éste criterio fue demostrado en el presente estudio. Siendo que, la cepa K tuvo efecto promotor de la germinación en semillas de tarwi y arroz, la cepa t4 en semillas de cañahua y la cepa t2 en semillas de quinua. Por otra parte, la inoculación de la cepa J, no reportó diferencia significativa en las semillas evaluadas respecto al control (Tabla 6). Por lo cual, la promoción de la germinación de tarwi, arroz, cañahua y quinua empleando las cepas K, t2 y t4, fue evaluada en experimentos posteriores.

Tabla 6. Selección preliminar de bacterias endófitas por su efecto promotor, en la longitud radicular (cm) en la germinación

Cepa inoculada	Tipo de semilla			
	Tarwi	Arroz	Cañahua	Quinua
Control	7,7	3,6	2,4	0,8
J	10,7	6,1	3,2	1,8
K	13,0*	6,7*	3,3	1,8
t4	10,0	4,3	4,0*	1,7
t2	8,4	4,9	3,6	2,4*

*Diferencia significativa respecto al control, ($p < 0,05$)

Según lo descrito en la Tabla 6, en este trabajo se presenta dos características para evaluar el efecto promotor de germinación: A. actividad promotora de endófitos inoculados sobre la misma planta de la cual fueron aislados: cepa K, tarwi. B. actividad promotora de endófitos inoculados sobre una planta diferente de la que fueron aislados: cepas t4 y t2 aislados de thola, evaluados en cañahua y quinua, respectivamente, y la cepa K evaluada en arroz. La capacidad de promover el desarrollo de las plantas en etapa de germinación, ha sido estudiada ampliamente, endófitos aislados de las plantas

de maíz, melón y tomate inoculados en semillas de tomate (Xia, DeBolt, Dreyer, Scott, & Mark, 2015) y caña de azúcar.

6.4.1. Germinación de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*) y arroz (*Oryza sativa*)

En función a la selección preliminar de bacterias endófitas con potencial promotor de germinación en varias semillas, la cepa bacteriana endófito K, presentó los valores más elevados al evaluar los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas: solubilización de fosfatos, producción de AIA, fijación de nitrógeno; lo que sugiere su alto potencial. En ese sentido, esta cepa fue inoculada en semillas de tarwi y arroz, en las que se reporta su efecto inductor (Tabla 6). Sin embargo, para una evaluación minuciosa del efecto de la inoculación de la cepa K, se emplearon cuatro tratamientos (explicados en la sección 5.3.6.3) que incluyen: *T1*, agua como control negativo para la evaluación, en éste tratamiento se llevó a cabo el proceso de activación y/o interrupción del estado de dormancia de las semillas, para propiciar su germinación. Paralelamente, se evaluó la germinación empleando buffer PBS/solución fisiológica correspondiente a *T2*, que no causa alteración en el proceso típico de activación de la semilla. *T3*, constituido cepa K (3×10^8 UFC/mL) suspendida en soluciones de *T2*, que no afectan su viabilidad. Finalmente, pero no menos importante, *T4*, empleado para evaluar el efecto de inocular cepas endófitas lisadas, las cuales podrían proveer su biomasa en forma de nutrientes para el desarrollo de las plantas durante la germinación, lo que no implica necesariamente la inducción de crecimiento.

Después de la inoculación de endófitos viables de la cepa K en semillas de tarwi (*T3*) y la evaluación de la longitud de su radicular, se verificó la normalidad y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA), esta prueba reportó diferencias significativas ($p < 0,005$) entre tratamientos (respecto a los controles *T1*, *T2* y *T4*), Fig. 7.A. Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la Cepa K tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con agua o células lisadas, Anexo 11. Estas semillas de tarwi germinadas con el inóculo endófito, presentaron una longitud radicular de 15cm, reportando una diferencia de aprox. 5cm en comparación a los controles *T1*, *T2* y *T4* (10cm, aprox.) (Fig. 7. A y B). Por tanto, la cepa K aislada a partir de tarwi, presentó un efecto inductor en la germinación de semillas de la misma planta.

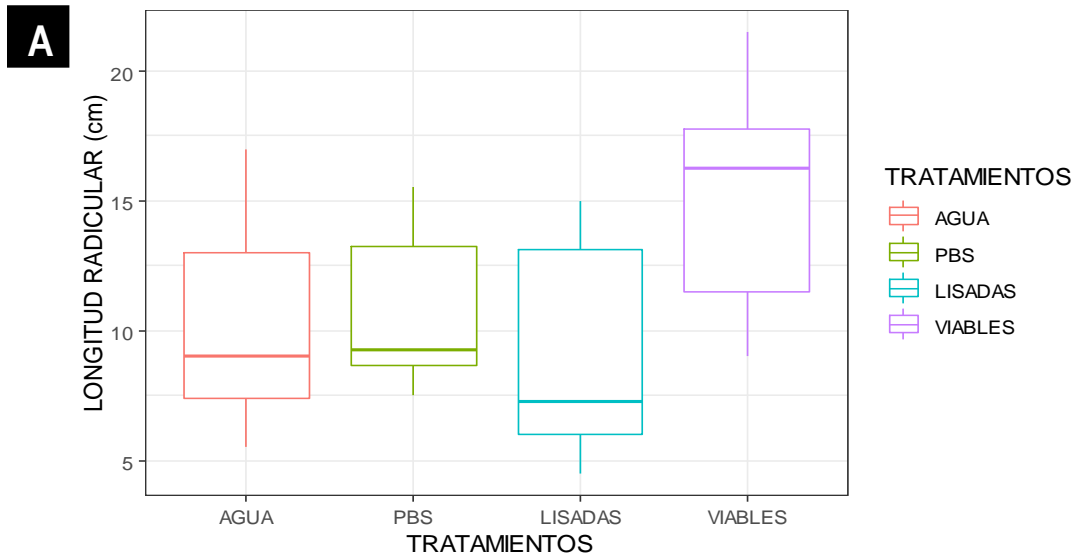


Fig.7. A. Longitud promedio de la radícula de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*), tratados con: *T1*: H₂O, control negativo; *T2*: PBS, control abiótico; *T3*: cepa viable K (3×10^8 UFC/mL); *T4*: cepa lisada K (3×10^8 UFC/mL), diferencias significativas ($p < 0,005$).

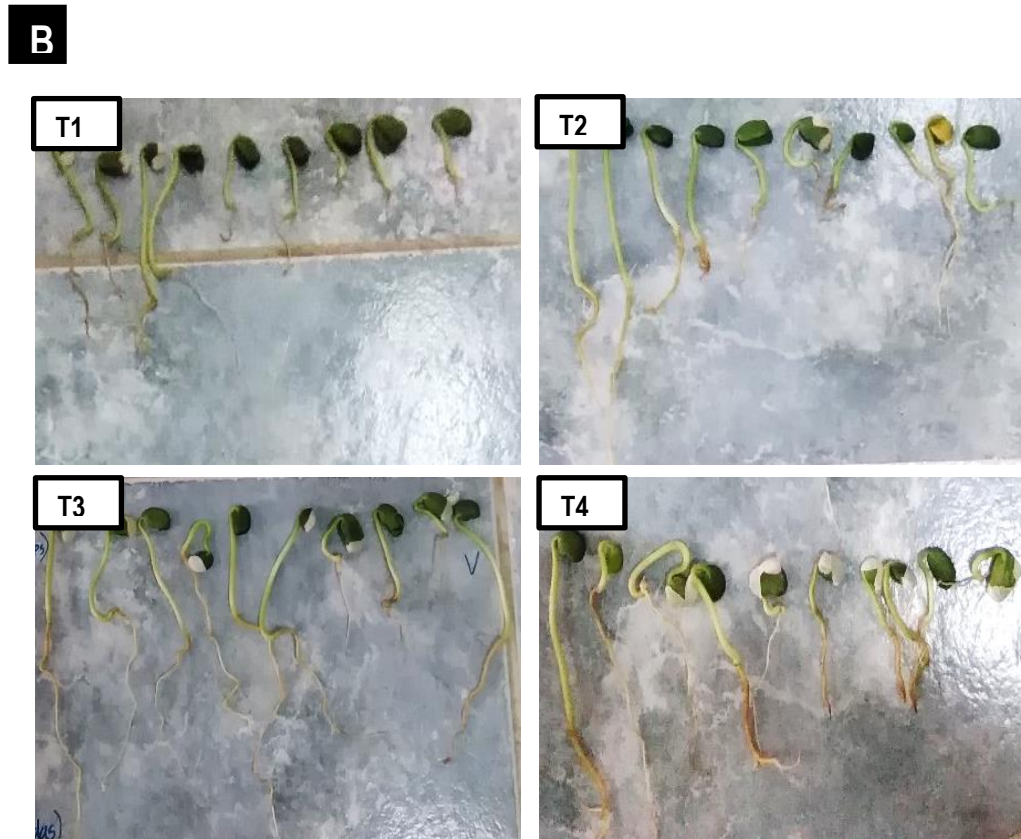


Fig.7. B. Longitud de la radícula de semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis*), *T1*: H₂O, control negativo; *T2*: PBS, control abiótico; *T3*: cepa viable K (3×10^8 UFC/mL); *T4*: cepa lisada K (3×10^8 UFC/mL).

La cepa K también fue inoculada en semillas de arroz (T3), las cuales presentaron una longitud radicular de 6cm en comparación a los controles T1, T2 y T4 (3 a 4cm, aprox.), se verificó la normalidad y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) reportándose diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos (respecto a los controles T1, T2 y T4), Fig. 8.A, B Las pruebas post hoc muestran que las semillas germinadas tratadas con células viables de la Cepa K tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con agua, PBS ó células lisadas, Anexo 11. A pesar de que la cepa K fue aislada a partir de tarwi, presentó un efecto inductor en la germinación de semillas de arroz.

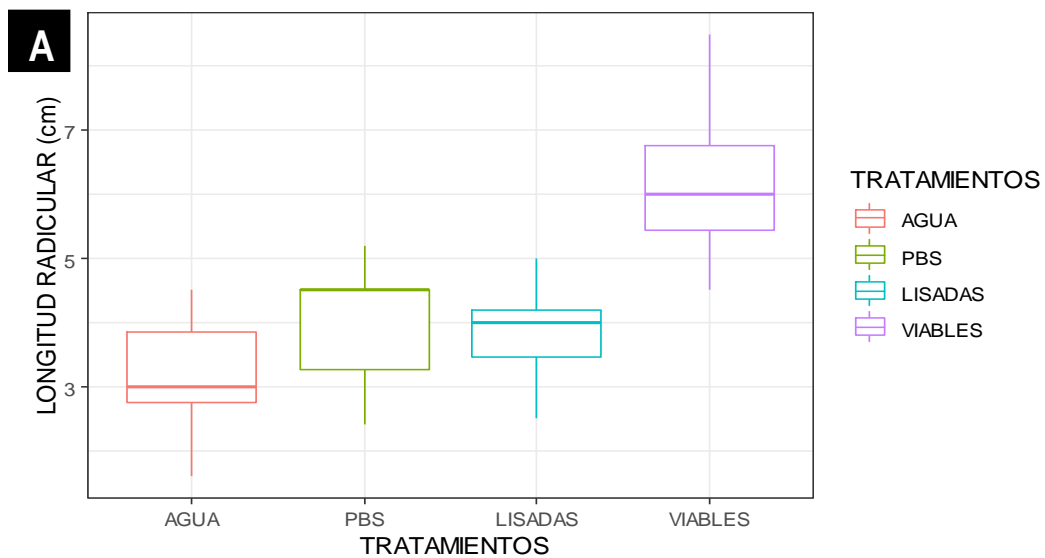


Fig. 8. A. Longitud promedio de la emisión de la radicular de semillas de arroz (*Oryza sativa*), T1: H₂O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa K; T4: endófitos lisados de la cepa K, diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$)

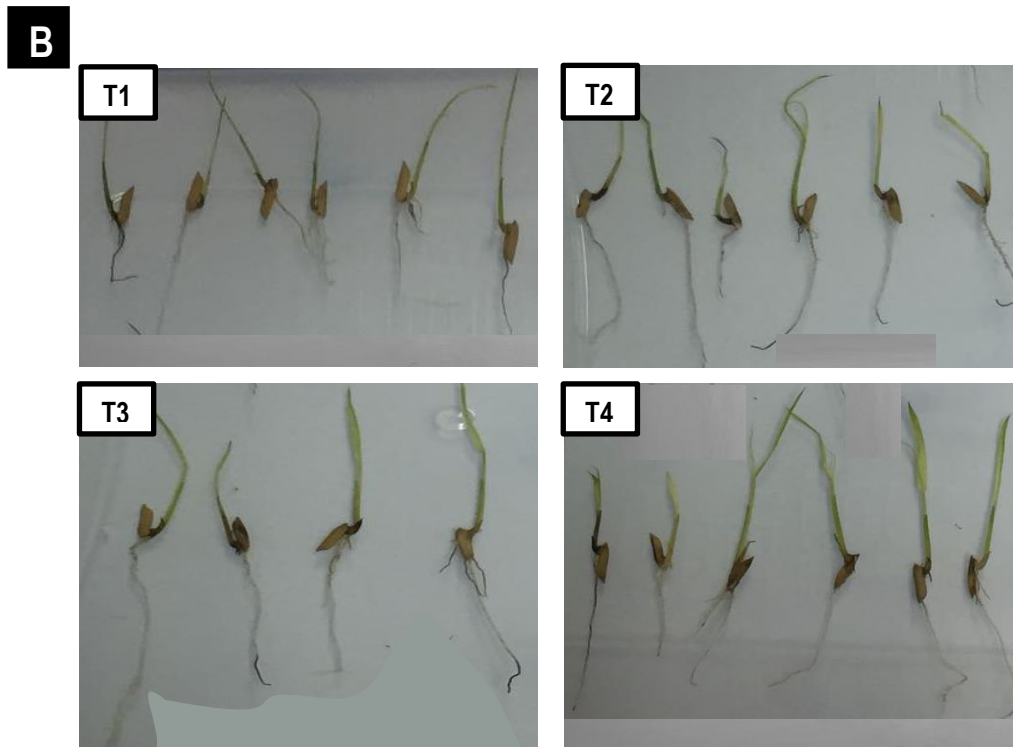


Fig. 8. B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de arroz (*Oryza sativa*), T1: H₂O, control negativo; T2: PBS, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa K; T4: endófitos lisados de la cepa K.

6.4.2. Germinación de semillas de cañahua (*Chenopodium pallidicaule*)

La bacteria endófito codificada como t4, que posee los tres mecanismos de promoción del crecimiento de plantas, fue inoculada sobre semillas de cañahua. Ésta cepa promovió un crecimiento radicular de las semillas de cañahua de aproximadamente 3,5cm, en comparación a los controles T1, T2 y T4 (2cm, aprox.) (Fig. 9). Se verificó la normalidad y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) reportándose diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos (respecto a los controles T1, T2 y T4), Fig. 9. A. Las pruebas post hoc muestran que las semillas germinadas tratadas con células viables de la Cepa t4 tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con agua, NaCl ó células lisadas, Anexo 11. A pesar que la cepa t4 fue aislada a partir de thola, presentó un efecto inductor en semillas de cañahua.

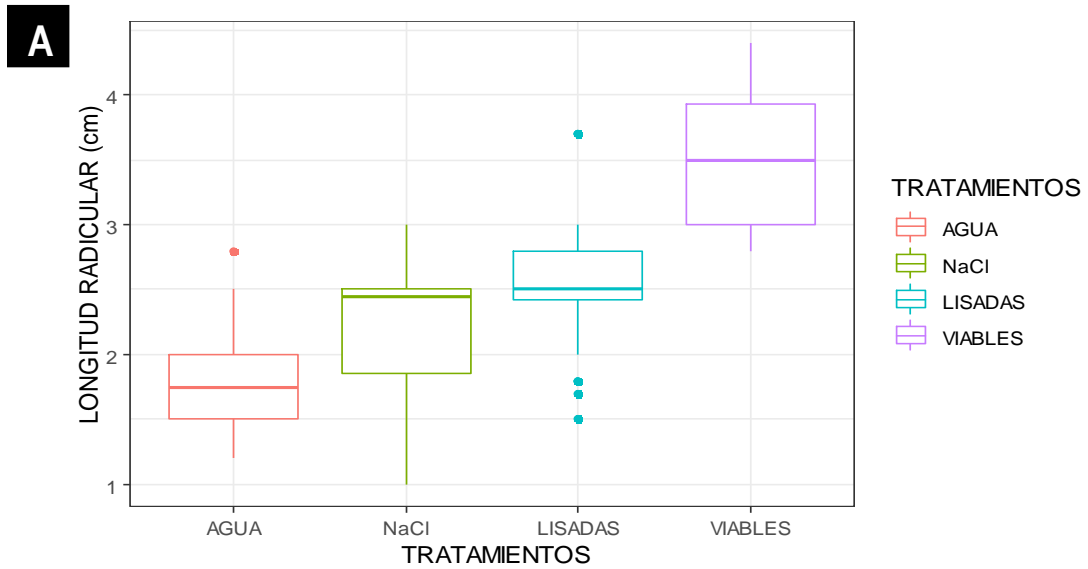


Fig. 9. A. Longitud promedio de la emisión de radicular de semillas de cañahua (*Chenopodium pallidicaule*), T1: H₂O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t4; T4: endófitos lisados de la cepa t4, diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$)

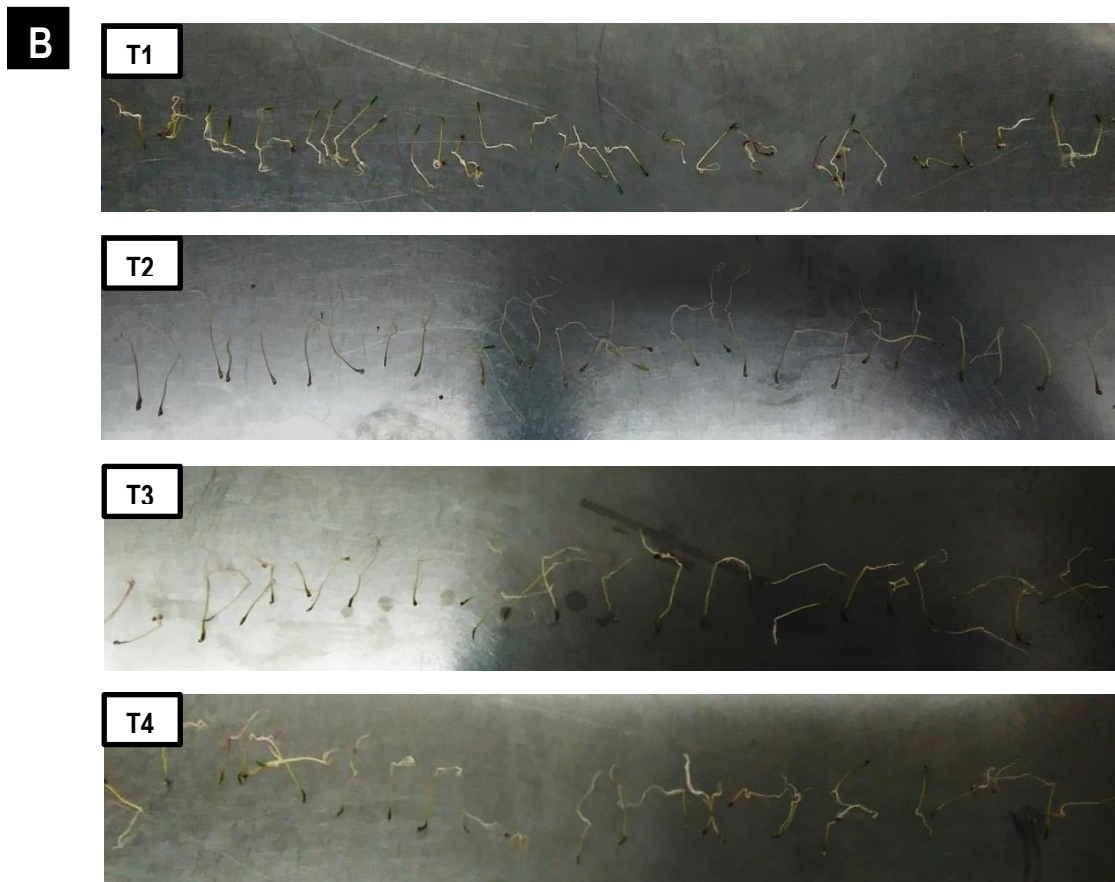


Fig. 9.B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de cañahua (*Chenopodium pallidicaule*), T1: H₂O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t4; T4: endófitos lisados de la cepa t4.

6.4.3. Germinación de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*)

Respecto a la inducción en la germinación de quinua, se empleó la cepa t2, de acuerdo a los datos previos de la Tabla 4. Los antecedentes de la cepa endófito t2, reportan la presencia de los tres mecanismos de promoción del crecimiento de plantas, destacándose dos de ellos con valores altos (solubilización de fosfatos y actividad fijadora de nitrógeno). Ésta cepa promovió un crecimiento radicular de las semillas de quinua de aproximadamente 3cm en comparación a los controles T1, T2 y T4 (1cm, aprox.) (Fig. 10. A). Para el análisis de los datos se realizó una transformación logarítmica de la variable original antes de realizar ANOVA, por la presencia de un sesgo hacia la derecha. La prueba de ANOVA, muestra que sí existe diferencia significativa, de la longitud radicular de los germinados ($p < 0.0001$) respecto a los controles T1 y T2 (agua y solución fisiológica) y T3 (suspensión de bacterias endófitas lisadas). Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la Cepa t2 tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con Agua, solución de NaCl o células lisadas, Anexo 11. Siendo que la cepa t2 fue aislada a partir de thola, presentó un efecto inductor en semillas de una planta diferente.

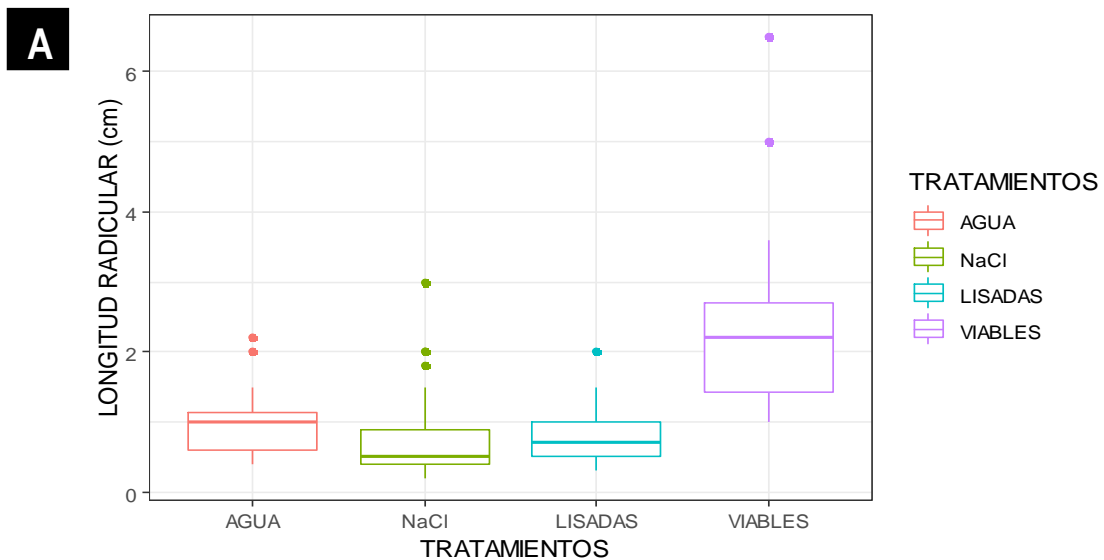


Fig. 10. A. Longitud promedio de la emisión de la radicular de las semillas de cañahua (*Chenopodium quinoa*), T1: H₂O, control negativo; T2: NaCl, control abiótico; T3: endófitos viables de la cepa t2; T4: endófitos lisados de la cepa t4, diferencia significativa ($p < 0,0001$).

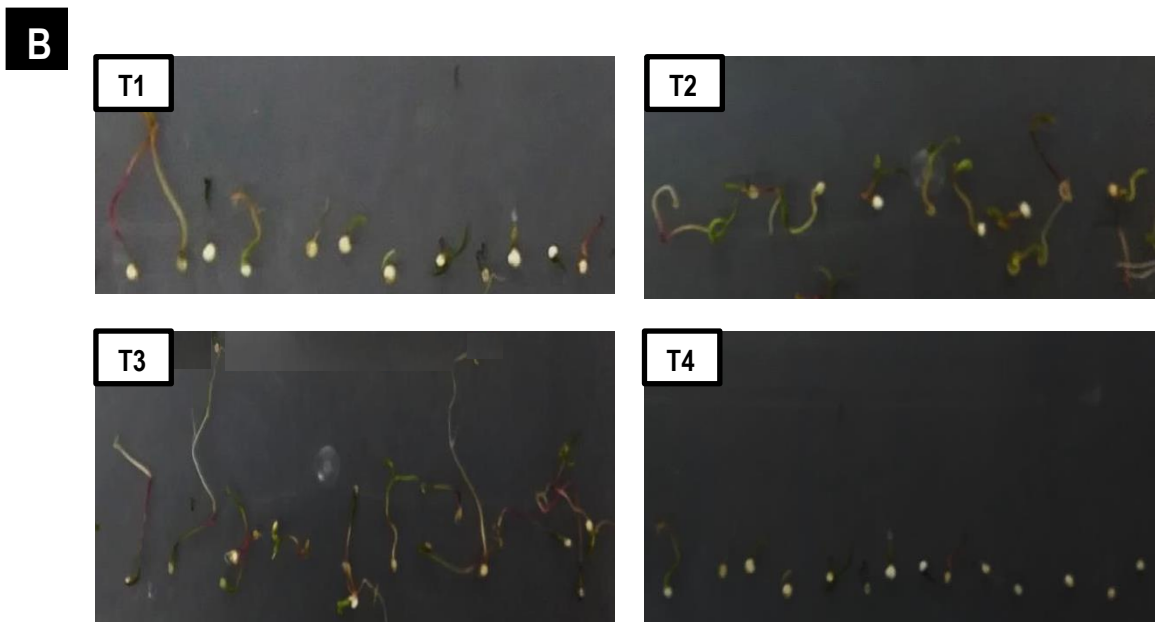


Fig. 10.B. Longitud de la emisión de la radícula de las semillas de cañahua (*Chenopodium quinoa*), *T1*: H₂O, control negativo; *T2*: NaCl, control abiótico; *T3*: endófitos viables de la cepa t2; *T4*: endófitos lisados de la cepa t4.

La inoculación de los endófitos en las plantas tiene por objeto, mejorar la disponibilidad de nutrientes, brindar protección frente a enfermedades, potenciar los procesos microbianos, tiene además un impacto positivo en el suelo por su enriquecimiento (Xia, DeBolt, Dreyer, Scott, & Mark, 2015). No obstante los estudios realizados por Xia, y otros, 2015 con endófitos aislados de maíz, tomate, melón y pimiento, demostraron un incremento del crecimiento de semillas de tomate hasta un 25% respecto a los controles. De la misma manera, en este estudio se determinó el porcentaje de incremento en función a la longitud de radícula de las diferentes semillas, causada por la inoculación de los endófitos (T3) respecto a los controles (T1, T2 y T4) representado en la Tabla 7, donde se reporta un incremento entre el 50-100% de longitud de radícula, para cada semilla en estudio.

Tabla 7. Promoción del crecimiento en la germinación de semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua

Cepa inoculada	Semilla	Promoción del crecimiento (%)
K	Tarwi	50
	Arroz	75
t4	Cañahua	75
t2	Quinua	100

Las 4 cepas seleccionadas, promovieron la inducción de la germinación de semillas, evaluada mediante la emisión radicular, con porcentajes de promoción del crecimiento

de la radícula entre 50 y 100% (Tabla 7). Se ha reportado que las cepas endófitas solubilizadoras de fosfatos, favorecen el crecimiento temprano y estimulan la madurez de las plantas acelerándola (Tucker, 2001), produciendo un incremento en la altura de la planta de maíz y su elongación radicular con valores superiores a 16 y 11%, respectivamente (Muhammad, Hafiz, Muhammad, & Muhammad, 2013). Similares resultados fueron reportados con endófitos solubilizadores de fosfatos (*Pseudomonas* sp.) inoculados en la planta *P. sativum*, ésta planta reportó diferencias significativas en peso fresco y húmedo respecto a controles negativos de *E. coli* JM109 (Oteino, y otros, 2015).

Respecto a la importancia que poseen las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, sobre el desarrollo de plantas, éstas pueden llegar a suplir hasta un 70% de las necesidades de nitrógeno a través de la fijación de nitrógeno atmosférico. En este estudio, las cepas seleccionadas reportaron esta actividad, además de favorecer la germinación de las semillas de tarwi, arroz, quinua y cañahua (Tabla 7). Este mecanismo fundamental para la obtención del nitrógeno como nutriente, es una de las razones de obtener mayor producción en cultivos de interés. En ese sentido, plantas inoculadas con endófitos fijadores de nitrógeno, han reportado un incremento de biomasa en cultivos de maíz, además de un aumento en la asimilación de CO₂, ya que la fijación de nitrógeno implica alto trabajo metabólico (Knoth, Soo-Hyung, Ettl, & Doty, 2013). Para las plantas la producción de la fitohormona ácido indol acético, es muy importante debido a su rol fundamental en la reorganización de la raíz y la adaptación a diferentes condiciones de estrés, salinidad, etc. (Iglesias, Terrile, Bartoli, D'Ippólito, & Casalongue, 2010). Es por ello que las bacterias endófitas que posean esta propiedad son de interés. Otros estudios demostraron el efecto de inocular endófitos productores de AIA sobre cultivos de papa, reportando un incremento significativo en la longitud de brotes de tubérculos de papa, respecto a la inoculación de bacterias productoras de esta fitohormona aisladas de la rizósfera y del tubérculo (Soler, Gilchrist, & Pérez, 2012). Existen diversos estudios realizados en plantas de arroz, cultivo de interés al ser el alimento principal en algunos países del mundo, los cuales resaltan el mejoramiento de la calidad de este alimento con nuevas tecnologías amigables con el medio ambiente, como la aplicación de endófitos. En el presente estudio, se evaluó a la cepa K sobre semillas de arroz, llegando a incrementar su crecimiento en 75% respecto a los controles (Tabla 7). Otros autores reportaron un incremento de la longitud radicular de las semillas de arroz en un 48% inoculando endófitos productores de fitohormonas (Duangpaeng, Phetcharat, Chanthapho, Boonkantong, & Okuda, 2011). También se ha reportado un efecto promotor entre 45 y 100% sobre el arroz, al inocular endófitos procedentes de especies nativas de arroz, que presentaban los mecanismos directos de promoción del crecimiento (solubilización de fosfatos, producción de fitohormona, actividad fijadora de nitrógeno) (Jia, Gururanib, & Chuna, 2014).

En la actualidad se están incrementando los estudios del efecto promotor de las bacterias endófitas en diversas plantas con diversos fines, tal es el caso del estudio realizado en cultivos de gran interés económico como las palmas de aceite (Azria, Ismaila, & Abdullaha, 2018) o el crecimiento de las plantas de reforestación, como los manglares (Assis, y otros, 2018).

Otra propiedad importante observada pero no evaluada en este estudio, fue el efecto protector de las bacterias endófitas viables en las plantas hospederas, cuyas semillas sometidas a la evaluación *in vitro*, no presentaron signos de afectación, a diferencia de las semillas sometidas a tratamientos (T1, T2 y T4), las cuales presentaron cambios habituales en la coloración de la radícula (de blanco a café) producto de la oxidación biológica proveniente de la actividad microbiana. Sería interesante evaluar esta propiedad en futuros estudios, ya que se ha reportado que las bacterias endófitas ejercen mecanismos de protección en las plantas, frente a microorganismos contaminantes. Adicionalmente, en la evaluación realizada con bacterias lisadas (T4), el aporte de nutrientes pudo favorecer el desarrollo de microorganismos contaminantes.

6.5. Evaluación fenotípica y genotípica de las cepas endófitas K, t2 y t4

Para finalizar este estudio, se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas K, t2 y t4 seleccionadas por su potencial promotor en la germinación de semillas (Tabla 7). En el proceso de identificación tradicional de género y en algunos casos de especie, se toma en cuenta las características observables, descritas en la Tabla 8. La morfología macroscópica es similar entre las cepas K y t4 y se diferencian de la cepa t2 en tamaño (3mm) y de la t4 textura (mucoide). La textura mucoide, es una característica típica en algunas bacterias del género *Rhizobium*. *Rhizobium rhizogenes* posee textura cremosa similar a la descrita en cepas K y t2. Las características morfológicas pueden variar inclusive en una misma especie bacteriana, debido la influencia de diferentes factores (medio, condiciones de cultivo, y otros), por ejemplo, del genero *Serratia*, la especie *Serratia marcescens* posee la capacidad de producir una pigmentación rojiza observable en las colonias, causada por la prodigiosina, característica no observada en el cultivo de las cepas en estudio. Respecto a la morfología microscópica, todas las cepas presentan una forma bacilar, con respuesta negativa a tinción de Gram (Tabla 8). Estudios realizados con endófitos demostraron que las bacterias gram negativas presentaron mayor actividad fijadora de nitrógeno atmosférico y solubilizadora de fosfatos respecto a las bacterias gram positivas (Pérez, Tubercuía, & Amell, 2014), ejerciendo mejor los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, resultados coincidentes con la presente investigación.

Por otro lado, respecto a la actividad metabólica fue similar para las cepas K, t2 y t4 (Tabla 8). Se verificó la acidificación del medio, por la producción de ácidos orgánicos, y evidenciada por el viraje del indicador (azul de bromotimol) a amarillo. Ésta característica está asociada a la solubilización de fosfatos, descrita anteriormente.

Respecto a la tolerancia a sal, las cepas estudiadas en el presente trabajo poseen la capacidad de desarrollar en un medio con NaCl (2%), característica habitual de los halófilos discretos y halotolerantes, sin embargo, para su clasificación en un grupo halófilo determinado (discreto, moderado o extremo) es necesaria la evaluación a otras condiciones de salinidad. La salinidad de los suelos limita el desarrollo de la mayoría de las plantas debido a su efecto directo en la presión osmótica, provocando un desequilibrio en la disponibilidad de nutrientes. Otros estudios reportaron el efecto promotor del crecimiento de plantas con la inoculación de bacterias halófilas, ya que pueden tolerar esas condiciones de estrés dadas por el suelo, y ejercer los mecanismos como, producción de AIA entre otros (Sapre, Gontia, & Tiwari, 2018) para favorecer el crecimiento de plantas. Las cepas estudiadas reportaron actividad oxidasa y catalasa positiva, características propias de las bacterias aerobias. Las cepas K, t2 y t4 no fermentaron lactosa, al respecto existen estudios que reportan endófitos con esta característica, por ejemplo especies bacterianas de *Rhizobium* no fermentadoras de lactosa (Granda, Paccha, C., & Torres, 2013).

La determinación del antibiograma, reveló que las tres cepas presentaron una respuesta similar (Tabla 8) con algunas diferencias en cuanto al diámetro de halo, como el caso de la sensibilidad a Ceftriaxona (30µg) con una variación de 12 a 34mm y Ciprofloxacina (5µg) de 30 a 40mm. Sin embargo, el perfil de resistencia de las cepas en estudio, tuvo tres variaciones si se compara al de *Rhizobium rhizogenes*, sensible a los antibióticos Cloxacilina, Neomicina y Polimixina b. En cuanto al perfil de resistencia del género *Serratia* se ha estudiado ampliamente la respuesta a distintos antibióticos como Gentamicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina y Polimixina B. Éste último junto a Colistina y Tetraciclina (Polimixina B, evaluado) permiten diferenciar este género ya que poseen una resistencia natural a estos antibióticos. En ese sentido, las cepas reportaron un perfil similar al del género *Serratia*, cabe resaltar que diferentes géneros bacterianos poseen características bioquímicas similares, por ello las pruebas bioquímicas convencionales proporcionan una idea probable pero no definitiva de su identificación (Boua, G., Garcíac, Sáez-Nietod, & Valdezated, 2011).

Las cepas K, t2 y t4, presentaron características bioquímicas similares entre sí (Tabla 8). Sin embargo, respecto a las características morfológicas macroscópicas se asemejan a *Rhizobium sp.* Por otra parte, las tres cepas K, t2 y t4 presentaron características metabólicas similares a *Rhizobium* y *Serratia sp.* Las cepas en estudio presentan el mismo perfil de resistencia a antimicrobianos, el cual además es similar al de *Serratia sp.* y variable al de *Rhizobium rhizogenes*.

Tabla 8. Características fenotípicas de las cepas K, t2 y t4

Características fenotípicas	K	t2	t4	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	<i>Serratia sp.</i>	
Colonias	Tamaño (mm) Color Textura Forma	4 blanquecino cremosa circular	3 blanquecino cremosa circular	4 blanquecino mucoide circular	3 blanquecino cremosa circular	3 Rojizo cremosa circular
Microorganismos	Morfología T. Gram	Bacilar -	Bacilar -	Bacilar -	Bacilar -	Bacilar -
Variación pH		Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
Tolerancia a sal		+	+	+	+	+
Actividad Oxidasa		+	+	+	+	+
Actividad Catalasa		+	+	+	+	+
Ferm. lactosa		-	-	-	-	-
Gentamicina (10µg)		S (25mm)	S (25mm)	S (25mm)	S	S
Ceftriaxona (30µg)		S (34mm)	S (18mm)	S (14mm)	S	S
Cloxacilina (1µg)		R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)	S	-
Neomicina (30µg)		S (20mm)	S (20mm)	S (22mm)	R	-
Eritromicina (15µg)		R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)	R	-
Ciprofloxacina (5µg)		S (40mm)	S (40mm)	S (35mm)	S	S
Polimixina B (300UI)		R (6mm)	R (6mm)	R (6mm)	S	R

+: positivo; -: negativo; R: resistente; S: sensible

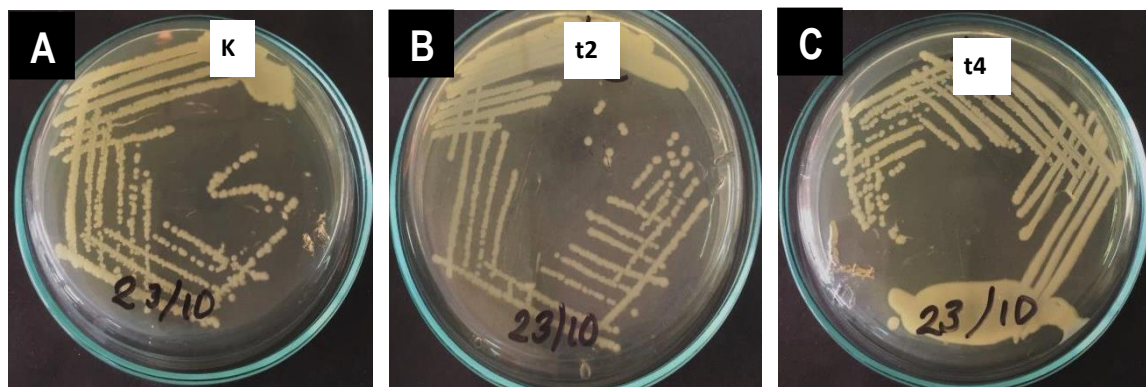


Fig. 11. Características fenotípicas: A. cepa K; B. cepa t2; C. cepa t4.

6.5.1. Identidad genética de las cepas endófitas K, t2 y t4

Para descartar posible contaminación que afecte la identificación molecular de las cepas endófitas K, t2 y t4, se realizó el rastreo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE). El análisis de la estructura de poblaciones reflejó la presencia de bandas únicas en el gel de poliacrilamida. Posteriormente, la

amplificación del fragmento de la región variable V3 del 16S ADNr, de las cepas K, t2 y t4 originó secuencias con calidad de resolución, es decir, señal aceptable a excepción del producto de amplificación con el primer forward de la cepa K, que presentó ruido (Anexo 12).

La identificación de los fragmentos consenso de la región hipervariable V3 del gen16S ADNr fue realizado con 375 pb, mediante el análisis Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), los amplicones de las cepas K, t2 y t4 presentaron entre 98 y 99% homología con *Serratia liquefaciens* cepa CIP 103238 con número de acceso NR_042062.1 (Tabla 9). Esta cepa ha sido empleada como referencia de otros géneros catalogados como *Serratia liquefaciens* like-species (Ashelford, Fry, Bailey, & Day, 2002). Además, el análisis de alineamiento de secuencias amplificadas reveló un E-value menor a 0, es decir altamente aceptable y una cobertura entre 99 y 100%. Considerando que la región variable V3 abarca entre 152 a 198pb (Vargas, 2017). El análisis filogenético de los fragmentos 16S ADNr de las secuencias K, t2, t4 y secuencias obtenidas de la base de datos de NCBI, fue realizado por el método Neighbor Joining empleando la especie *Rhizobium gei* como referencia (outgroup) (Fig. 12).

En el análisis del árbol filogenético, las cepas K y t2 presentaron mayor homología *Serratia liquefaciens* cepa CIP 103238, a comparación con la cepa t4. Cabe destacar que las cepas K y t2 fueron aisladas de diferentes plantas tarwi y thola, respectivamente. A diferencia de la cepa t4 aislada de thola al igual que la cepa t2, lo que se esperaría es un agrupamiento más cercano entre estas t2 y t4 (Fig. 12). Esto puede ser contrastado con las diferencias existentes en cuanto a los mecanismos de promoción del crecimiento evaluados.

Tabla 9. Identificación del fragmento 16S ADNr de las cepas K, t2 y t4 mediante el análisis Blast

Cepa	Cobertura (%)	E-value	Similitud (100%)	Identidad
K	99	6E-116	99%	<i>Serratia liquefaciens</i> CIP 103238 16S ARNr (*NR_042062.1)
t2	100	1E-102	98%	
t4	100	1E-128	99%	

* Número de acceso

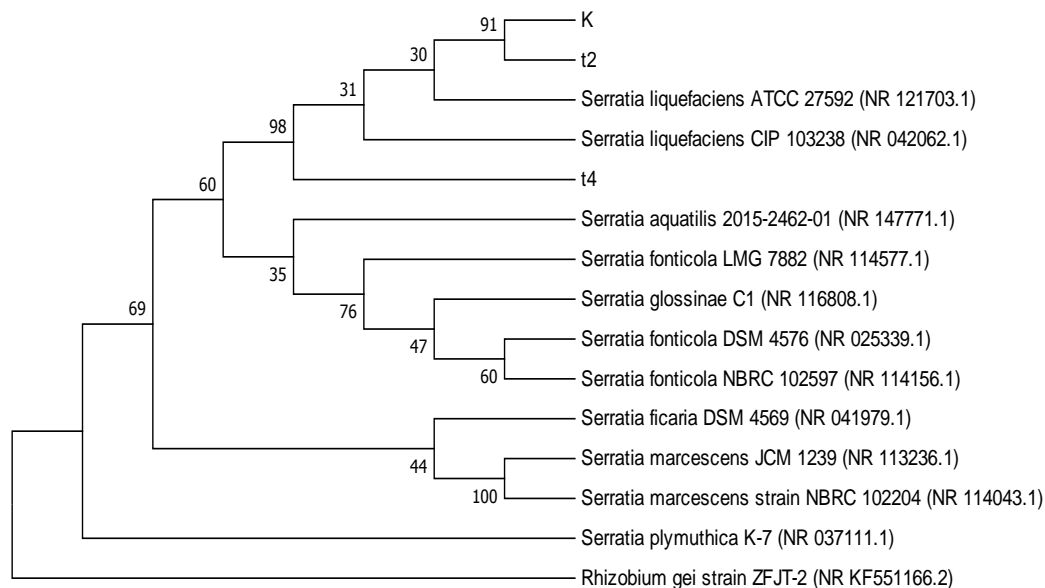


Figura 12. Análisis filogenético de los fragmentos 16S ADNr de las secuencias K, t2, t4 y secuencias obtenidas de la base de datos de NCBI, método Neighbor Joining.

A pesar de las diferentes técnicas de secuenciación, no siempre es posible conocer la filogenia de una especie, esto es afectado más aún cuando, se realiza la amplificación de un fragmento del genoma y no así de todo el genoma, lo que puede llevar a errores en la identificación de especie. Sin embargo, la secuencia del gen 16S ADNr contiene regiones hipervariables, útiles para la identificación de bacterias. La secuenciación del gen 16S ADNr completo, ha permitido una reclasificación bacteriana y la identificación de nuevos géneros y de especies no cultivables (Boua, G., Garcíac, Sáez-Nietod, & Valdezated, 2011). No obstante el análisis filogenético se realizó con 375pb, un mayor tamaño de la secuencia puede proporcionar mayor información, siendo que la secuencia del gen 16S ADNr tiene un tamaño aproximado de 1500pb, estadísticamente válido para la asignación de género y especie. Por ello, se considera que las secuencias de 1300 a 1500pb proporcionan menor al 1% de suposiciones ambiguas en la identificación molecular (Boua, G., Garcíac, Sáez-Nietod, & Valdezated, 2011).

El análisis filogenético de las cepas K, t2 y t4 demostró similitud con *Serratia liquefaciens* CIP 103238 (Tabla 9, Fig 12). El género *Serratia*, ha sido categorizado como microorganismo asociado a plantas y varias especies han sido incluso denominadas como *Serratia liquefaciens*-like species, por lo cual las especies encontradas en el presente estudio podrían estar clasificadas en este grupo hasta confirmar su identidad definitiva ampliando el rango de cobertura del gen o inclusive empleando otros genes diferentes al 16S ADNr, como el gen rpoB. Se ha reportado que especies de este género poseen los mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas, también evaluados en el presente estudio. Gran parte de las especies de éste género han sido aisladas a partir de la rizósfera de las plantas o de su fitobioma

(Ashelford, Fry, Bailey, & Day, 2002). Además, se ha reportado algunas especies *endófitas* pertenecientes a este género, es decir con capacidad de colonización en el tejido vegetal (Zelaya & otros., 2017).

La especie bacteriana *Serratia liquefaciens*, ha sido reportada como una bacteria dominante cultivable, capaz de crecer en diferentes condiciones de estrés, bajos niveles de carbono orgánico y nitrógeno asimilable. Se ha reportado que la cepa *Serratia liquefaciens* ATCC 27592 puede crecer en condiciones que simulan la atmósfera de Marte, con un interés creciente de la base molecular de esta respuesta (Nicholson, y otros, 2013). Por otro lado se estudió a esta especie, por su capacidad de desarrollar en altas concentraciones de metales pesados además de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, producir AIA y formar biopelículas (Zelaya & otros., 2017). Algunas bacterias pertenecientes al género *Serratia* han sido empleadas como una alternativa para fitorremediar suelos contaminados, se aislaron especies de *Serratia* a partir de césped contaminado con petróleo y metales pesados (Yeon & Cho, 2009), para ser empleadas como promotores del crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*).

Li, y otros, (2008), aislaron endófitos a partir de los nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill), pertenecientes al género *Serratia*, que presentaron mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas evaluados *in vitro*, sin embargo, con una inoculación posterior o co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles evaluados. A diferencia de lo reportado por Li, y otros, (2008), en el presente estudio las cepas K, t2 y t4 pertenecientes al género *Serratia* presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando fueron inoculadas en semillas respecto a los controles (bacterias lisadas), tanto en semillas de la misma planta de la que fueron aisladas (tarwi) como en semillas de diferentes especies vegetales (arroz, quinua y cañahua).

Otros estudios relacionados a la inoculación de cepas pertenecientes al género *Serratia*, reportaron su relación con la microbiota del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), al encontrarse cepas con actividad fijadora de nitrógeno y presencia del gen *nif* (Mareque, 2015). Otras cepas de este género demostraron un incremento en la biomasa de plantas de maíz entre 20 y 40% (Hameedaa, Harinib, Rupelab, Wanib, & Gopal, 2008), incremento del desarrollo del garbanzo entre 25 y 30% (Zaheer, y otros, 2016). También, se recuperaron endófitos de la planta medicinal (*Achyranthes aspera*) que reportaron un incremento de la longitud radicular hasta de un 95% (Khaidem, Pandey, & Dutt, 2017). En el presente trabajo se reporta el efecto promotor de las cepas K, t2 y t4, pertenecientes al grupo *Serratia liquefaciens-like species* sobre el desarrollo de las semillas de tarwi, arroz, cañahua y quinua, con porcentajes promoción de la germinación entre el 50 y 100%, demostrando el afecto favorable sobre el desarrollo de las plantas, como una alternativa biotecnológica, para el mejoramiento de la producción agrícola.

7. Conclusiones

Las plantas de thola y tarwi albergan una población bacteriana endófitas cultivable, a partir de éstas plantas se recuperaron 52 aislados de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. La incidencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la población total, fue de 97% en thola y hasta un 37% en tarwi.

En el presente estudio, las cepas endófitas J, K, t2 y t4 fueron seleccionadas por su capacidad de solubilización de fosfatos. Además, evaluaciones *in vitro* de las cepas J, K, t2 y t4 revelaron mecanismos promotores del crecimiento de plantas: producción de AIA y actividad fijadora de nitrógeno.

La evaluación preliminar de la inoculación de las cepas J, K, t2 y t4 sobre diferentes semillas, demostró un efecto inductor de la germinación, la cepa K promovió la germinación de semillas de arroz (75%) y tarwi (50%), las cepas t2 y t4 promovieron la germinación de semillas de quinua (100%) y cañahua (75%), respectivamente, sin embargo, la cepa J no reportó un efecto significativo.

Por último, los resultados de identificación genética de las cepas K, t2 y t4 reportaron una homología cercana al 100% con el género *Serratia liquefaciens*. Sin embargo, a pesar de que las tres cepas poseen los mecanismos directos de promoción poseen un efecto inductor variable en la germinación de acuerdo al tipo de semilla. La cepa *Serratia liquefaciens* K (Bol-K), puede ser empleada para la germinación de semillas de arroz y tarwi, *Serratia liquefaciens* t2 (Bol-t2) en la germinación de quinua y *Serratia liquefaciens* t4 (Bol-t4), favorece la germinación de semillas de cañahua.

8. Perspectivas Futuras

Como parte complementaria de este trabajo, las cepas Bol-K, Bol-t2 y Bol-t4, pueden ser evaluadas como *bioinoculantes* en otros sistemas, por ejemplo, la inducción en el crecimiento de plantines de tarwi, arroz, quinua y cañahua empleando dosis diferenciales, tomando como base el efecto promotor, demostrado en el presente estudio. Además, de ser considerados como *bioinoculantes*, es necesaria la evaluación económica de su producción, bajo una formulación estable de acuerdo a su dosis efectiva, inclusive, una evaluación frente a los fertilizantes químicos.

Por otra parte, sería interesante realizar estudios de los mecanismos involucrados en la colonización de los endófitos en las plantas, para establecer la relación bacteria-hospedero. Además, para corroborar su característica endófito, sería interesante evaluar la presencia de los microorganismos dentro del tejido vegetal, a través de pruebas moleculares como la hibridación fluorescente *in situ*, que revelen la presencia y colonización después de su inoculación.

Es necesario realizar un análisis molecular del genoma completo, con estudios de secuenciación de nueva generación, ya que las tres cepas estudiadas reportaron diferencias en cuanto a la capacidad de realizar los mecanismos de promoción del crecimiento de plantas, los genes involucrados en estos mecanismos son de interés para nuevos estudios, a través de técnicas moleculares, como la clonación. En el transcurso del tiempo las bacterias asociadas a las plantas, los endófitos, se fueron adaptando a las nuevas condiciones ambientales, provocadas por el cambio climático, en sentido, podrían ser de gran interés para el fortalecimiento de los cultivos de nuestra región.

9. Referencias Bibliográficas

- Aimee, C., Maja, S., Jeremiah, H., & Newman, G. (2015). Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: What lies ahead. *ESA CENTENNIAL PAPER*, 1-21.
- Aliaga, J., Villegas, H., & Leguía, D. (2010). Deforestación en Bolivia: Una Aproximación Espacial. *Instituto de Investigaciones Socio Económicas*, 10-17.
- Amos, B. (2014). *La problemática de las emisiones de gases de efecto invernadero en Bolivia*. *Creative Commons-Atribucion 3.0*. Recuperado el 21 de Enero de 2016, de <http://www.reaccionclimatica.org>.
- Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E., & Vallini, G. (2015). Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion. *ResearchGate*.
- Araujo y otros. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol.*, 68(10), 4906-4914.
- Arora, S., Patel, P., Vanza, M., & Rao, G. (2014). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal Gujarat. *African Journal of Microbiology Research*, 1779-1788.
- Ashelford, K., Fry, J., Bailey, M., & Day, J. (2002). Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2281–2289.
- Assis, R., Nóbrega, M., Almeida, J., Teixeira, P., Navee, A., Soares de Melo, I., . . . Quecine, M. (2018). Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 59-66.
- Azria, M., Ismaila, S., & Abdullaha, R. (2018). An endophytic *Bacillus* strain promotes growth of oil palm seedling by fine root biofilm formation. *Elsevier Rhizosphere*, 5, 1–7.
- Bacterias endófitas*. (s.f.). Obtenido de http://www.ecured.cu/Bacteria_end%C3%B3fitas
- Baig, K. A. (2010). Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria . *CheemaSoil & Environ*, 29(1), 82 - 86.

- Baldani, J., Reis, V., Videira, S., Boddey, L., & Divan, V. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Springer- Plant Soil*, 413-431.
- Barzanti, R., Francesca, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., & Mengoni, A. (2007). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from the Nickel Hyperaccumulator Plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology, Springer*, 53, 306-316.
- Boua, G., G., F., Garcíac, C., Sáez-Nietod, J., & Valdezated, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Elsevier, Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 29(8), 601–608.
- Bowen, G., & Rovira, A. (1999). The rizhosphere and its management to improve plant growth. *Adv.Agron.*(66), 1-102.
- Bozo K. Y. (septiembre de 2017). Determinacion del efecto de plantines de kiswara (*Buddleja coriacea*) y thola (*Paastreiphia lepidophyla*) sobre bscterias diazótrofás cultivables provenientes de suelos altioplánios (San José bajo, Municipio Papel pampa, La Paz)). La Paz.
- Butler, J. R. (1994). Introducción y principales conceptos de la economía espacial y escenario económico. En J. R. Butler, *Geografía Económica: Aspectos espaciales y ecológicos de la actividad económica* (págs. 15 – 33). México: Noriega.
- Calentamientoglobal. (12 de Enero de 2016). *¿Qué es el Calentamiento Global?* Obtenido de <http://cambioclimaticoglobal.com/que-es-el-calentamiento-global>
- Cambioclimatico. (20 de Abril de 2015). *La frontera agrícola en Bolivia; transgénicos, deforestación y seguridad alimentaria*. Obtenido de <http://cambioclimatico.org.bo>
- Cambioclimático. (12 de Enero de 2016). *Cambio Climático, Calentamiento Global y Efecto Invernadero*. Obtenido de <http://cambioclimaticoglobal.com/>
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez, J., & Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, 137-142.
- Castle, S. (2010). Acetylene Reduction Assay (ARA):Measuring Nitrogenase Activity. *Aridlands Ecology Lab Protocol*.
- Castro, S., & Roa, C. (2006). *Bacteria endofitas de Cordiaalliodora Okeny Tabebuiarosea Bertold D. C.: Potencial como promotoras de crecimiento*

- vegetal en la propagación de su hospedero*. Obtenido de Carrera de Microbiología agrícola y veterinaria:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis237.pdf>
- Cicloderecimiento. (s.f.). *Ciclo de crecimiento*. Obtenido de
http://www.ehowenespanol.com/ciclo-vida-planta-lista_128070/.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Aitbarka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitisvinifera*L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied Environmental Microbiology* 71, 1685–1693.
- Cricyt. (s.f.). *Eutrofización*. Obtenido de
<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Eutrofizac.html>
- Dinić, Z., Ugrinović, M., Bosnić, B., Mijatović, M., Zdravković, J., Miladinović, M., & Jošić, D. (2014). Solubilization of Inorganic Phosphate by Endophytic *Pseudomonas* sp. from French Bean Nodules. *Ratar. Povrt.*, 51(2), 100-105.
- Duangpaeng, A., Phetcharat, P., Chanthapho, S., Boonkantong, N., & Okuda, N. (2011). The Study and Development of Endophytic Bacteria for Enhancing Organic Rice Growth. *Faculty of Technology, UdonThaniRajabhat University, UdonThani, 41000, Thailand*.
- Duxbury, J. M. (1994). The significance of agricultural sources of greenhouse gases. . *Fert. Res.*(38), 151-163.
- El Día. (7 de Agosto de 2014). *Fertilización de suelos un “AS” bajo la tierra*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de
http://eldia.com.bo/index.php?cat=409&pla=3&id_articulo=151559.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & G., M. (2011). Characterization of native strains of *Azotobacter* spp. and its effect on growth of *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomato” in Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 39 - 49.
- FAO. (1999). *Bolivia hacia una estrategia de fertilizantes*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de Informe Técnico: <http://www.jornadanet.com/n.php?a=68655-1>.
- Fernández, H., Prandoni, N., Fernández, M., Fajardo, S., Morcillo, C., Díaz, E., & Carmona, M. (2014). *Azoarcus* sp. CIB, an Anaerobic Biodegrader of Aromatic Compounds Shows an Endophytic Lifestyle. *PLOS ONE*, 1-11.
- Fernández, M. (2013). *Efectos del cambio climático en la producción y rendimiento por sectores*. Colombia: FONDO FINANCIERO DE PROYECTOS DE DESARROLLO.

Filogenética. (s.f.). Obtenido de <http://definicion.mx/filogenetica/>

Fiorentino, N., Ventorino, V., Rocco, C., Cenvinzo, V., Agrelli, D., Gioia, Di Mola, P., . . . Fagnano, P. (2017). Giant reed growth and effects on soil biological fertility in assisted phytoremediation of an industrial polluted soil. *Science of The Total Environment*, 1375-1383.

G.E.I. (12 de Enero de 2016). *Los Gases de Efecto Invernadero*. Obtenido de <http://cambioclimaticoglobal.com/gasesinv>

Ghosh, S., & Basu, P. (2006). Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Elsevier, Microbiological Research*, 161, 362—366.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1994). A Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 793-796.

Gonzalez, R. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter*, y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo en maíz, variedad INIAP 182, en la estación experimental la Argelia.

Goryluk, A., Rekosz, H., & Blaszczyk. (2009). Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes of *Chelidonium majus* L. *Polish Journal of Microbiology*, 58(4), 355-361.

Grageda, O., Días, A., Peña, J., & Vera, J. (2012). Impact of biofertilizers in agriculture. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.

Granda, K., Paccha, H., C., C., & Torres, R. (2013). Variability of symbiotic diazotrophic isolates at different agroecological conditions of southern Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 2(1), 6-15.

Hallmann. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria. *Biotic Interactions in PlantePathogen Associations*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 87- 119.

Hallmann-Quadt, A., Hallmann, J., Mahaffee, W., & Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*, 895-914.

Hameeda, B., Kumar, Y., Rupela, O., Kumar, G., & Reddy, G. (2006). Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from compost and macrofauna. *Microbiol*, 298–302.

- Hameedaa, B., Harinib, G., Rupelab, O., Wanib, S., & Gopal, R. (2008). Growth promotion of maize by phosphatesolubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 234—242.
- Herbario Forestal, U. (14 de Mayo de 1999). Guía para la recolección y preservación de muestras botánicas en campo. Colombia.
- Hernández, E., Ferrera, R., & Rodríguez, R. (2002). Nitrogen-Fixing Free-Living Bacteria in Bean Rhizosphere Polluted with Kerosene. *Terra*, 81-89.
- Hung, P., Kumar, S., & Govindsamy, V. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biol Fertil Soils*(44), 155–162.
- Ibarra, C. (2010). *Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola*. Obtenido de Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Icees. (8 de Octubre de 2014). *Fertilizantes requeridos en Bolivia*. Obtenido de <http://www.icees.org.bo/2014/10/produccion-de-fertilizantes-npk-en-bolivia/>
- Iglesias, M., Terrile, M., Bartoli, C., D'Ippólito, S., & Casalongue, C. (2010). Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 215.222.
- Illmer, P., Barbato, A., & Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly soluble $AlPO_4$ with P solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 260–270.
- Jalgaonwala & Totaram. (2011). Isolation and Characterization of Endophytic Bacterial Flora from Some Indian Medicinal Plants. *Asian J. Research Chem.*, IV(2), 296-300.
- Jia, S., Gururanib, M., & Chuna, S. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Elsevier. Microbiological Research*, 169, 83– 98.
- Kaimowitz, D. A. (1998). Economic Models of Tropical Deforestation. *Indonesia: Center for International Forestry Research (CIFOR)*.
- Kaimowitz, D., & Angelsen, A. (1999). Economic Models of Tropical Deforestation: A review. Center for Internacional Forestry Research (CIFOR). *Indonesia*.
- Kaul, S. A. (2014). Unlocking the Myriad Benefits of Endophytes: An Overview. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, 41-57.

- Khaidem, A., Pandey, P., & Dutt, G. (2017). Plant Growth-Promoting Endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L., a Medicinal Plant. *HAYATI Journal of Biosciences*, 173-180.
- Kibrom, F., Alemayehu, W., & Prakasam, V. K. (2017). Isolation and Characterization of Efficient Phosphate Solubilizing Bacillus (PSB) from Different Agro-ecological Zones of Trigray Soil, Ethiopia. *CNCS, Mekelle University*, 262-273.
- Kloepper, J., Zablutowicz, R., Tipping, E., & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Cregow, P.B. *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Knoth, J., Soo-Hyung, J., Ettl, G., & Doty, S. (2013). Effects of cross host species inoculation of nitrogenfixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. *GCB Bioenergy*, 5, 408–418.
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., & Berg, G. (2002). Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *CanJ Microbiol*, 772-786.
- Kumar, P., & otros., y. (2017). Inside the Plants: Endophytic Bacteria and their Functional Attributes for Plant Growth Promotion. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6(2), 11-21.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E., Taghavi, S., Mezgeay, M., & Van der Lelie, D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 583-606.
- Loiret, F., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rode, P., & Rode, R. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Dong Journal of Applied Microbiology*, 97, 504–511.
- Lostiempos. (24 de Junio de 2014). *Hay seguridad, pero no soberanía alimentaria*. Obtenido de http://www.lostiempos.com/observador-economico/economia-y-mercados/economia-y-mercados/20140624/hay-seguridad-pero-no-soberan%C3%ADa-alimentaria_263870_577780.html
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth Promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*(63), 541-556.

- Lwin, K., Myint, M., & Moe, W. (2012). Isolation of Plant Hormone (Indole-3-Acetic Acid - IAA) Producing Rhizobacteria and Study on their Effects on Maize Seedling. *ENGINEERING JOURNAL*, 26-27.
- Mahafee, W., Hallman, J., Quadt-Hallman, A., & Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895–914.
- Mahmoud, W., Irin, A., & Glick, B. (2015). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Springer*, 1519-1532.
- Mareque, C. T. (2015). Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Springer, Ann Microbiol*, 65, 1057–1067.
- Martins, N. (2004). Os fosfatos na cana-de-açúca. *Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba*, 87.
- Meena y otros. (2017). Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. (Elsevier, Ed.) *Ecological Engineering*, 107, 8–32.
- Mihalache, G. Z. (2015). PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA ASSOCIATED WITH RUNNER BEAN RHIZOSPHERE. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 67(3), 793-800.
- Mitter, B., Weilharter, A., Brader, G., Nikolic, B., Muhammad, N., Sohail, Y., & Sessitsch, A. (s.f.). Endophyte Research at the AIT.. *AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Bioresources Unit, Seibersdorf, Austria*, A-2444.
- Mocali y otros. (2003). Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res. Microbiol*, 54(2), 105-114.
- Molano, A. (2004). Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) para un sistema de compostaje tipo windrow. *Umbral Científico*, 25-32.
- Montañez, A., Abreu, C., Gil, P., Hardarson, G., & Sicardi, M. (2009). Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Springer - Biol Fertil Soils*, 253–263.
- Morales, R. H. (2015). *Efectividad de los indicadores naturales climáticos y la erosión de los conociminetos en tres comunidades del municipio de Umala provincia Aroma del deparatamento de La Paz*. La Paz.

- Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*, V(5), 79-93.
- Muhammad, H. H. (2013). Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil Environ.*, 32(1), 71-78.
- Muhammad, H., Hafiz, A., Muhammad, J., & Muhammad, A. (2013). Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil Environ.*, 32(1), 71-78.
- Munif, A., Hallmann, J., & Sikora, R. (2012). Isolation of Endophytic Bacteria from Tomato and Their Biocontrol Activities against Fungal Diseases. *Microbiology*, 6(4), 148-156.
- Murphy, J. R. (1962). A MODIFIED SINGLE SOLUTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHOSPHATE IN NATURAL WATERS. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*(27), 31-36.
- N Ahmed, S. S. (2009). Solubilización De Fosfato: Su Mecanismo Genética Y Aplicación. *El Diario de Internet de Microbiología*, 9(1).
- Nautiya, I. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*(170), 265-270.
- Nicholson, W., Leonard, M., Fajardo, P., Panayotova, N., Farmerie, W., Triplett, E., & Schuergerc, A. (2013). Complete Genome Sequence of *Serratia liquefaciens* Strain ATCC 27592 . *Genome Announcements*, 4 e 005.
- Nitrogenasa*. (s.f.). Obtenido de http://bioquimicarps.blogspot.com/2015/02/complejo-nitrogenasa_5.html.
- Novak, S. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can J Microbiol* 44, 528-536.
- Oldham, L. (2011). Phosphorus In Mississippi Soils. 871.
- Olivares, y. o. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils*(21), 197-200.
- Ormachea, G. L. (1988). Avances en el estudio químico del *Lepidophyllum tola*. *Revista Química*, 11-13.

- Ortuño et al. (2013). Selecting strains of *Trichoderma* spp. generating secondary metabolites of interest for use as a growth promoter in plants grown. *Journal of the Selva Andina Biosphere.*, 1(1), 16-32.
- Osorio, N. (2008). Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization.
- Oteino, N., Lally, R., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K., & Dowling, D. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates * |Volume6|Article. *Frontiers in Microbiology*, 6(745), 1 - 9.
- Paginasiete. (27 de julio de 2015). *En 2014 se quemaron casi dos millones de hectáreas de superficie* . Obtenido de <http://www.paginasiete.bo/economia/2015/6/27/2014-quemaron-casi-millones-hectareas-superficie-61365.html>.
- Pal, K., Bhatt, D., & Chauchan, S. (2000). Plant growth promoting fluorescent pseudomonas enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. *National research center for ground*.
- Panta, R., & Pande, P. (2016). Rhizosphere mediated biodegradation of 1,4-dichlorobenzene by plant growth promoting rhizobacteria of *Jatropha curcas*. *Ecological Engineering*, 94, 50–56.
- Patria, L. (21 de Mayo de 2015). *El cambio climático afecta a la producción agropecuaria*. Obtenido de La Patria: <http://lapatriaenlinea.com>
- Pereira, S., & Castro, P. (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Springer*, 14110–14123.
- Perez, A., Rojas, J., & Fuentes, J. (2010). Endophytes Diversity of Bacteria Associated with Roots of *Colosua* (*Bothriochloa pertusa*) Pasture in Three Locations of Sucre Department, Colombia. *Acta biol. Colombiana*, 15(2), 219 - 228.
- Pérez, A., Tuberquia, A., & Amell, D. (2014). Actividad in vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 213-223.
- Pérez, F., Alías, C., Bellogín, R., Cerro, P., Espuny, M., Jiménez, I., . . . Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important

- plants: From microorganism capacities to crop production . *Microbiological Research*, 325-336.
- Pérez, F., Cupull, R., Alvarado, Y., Díaz, B., & Torres, R. (2010). Isolations and morphologic characterization of endophyte bacterias in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Researchgate, Centro agrícola*, 61 -66.
- Pérez, F., Santana, R., Alvarado, Y., Díaz, B., & Gutiérrez, R. (2010). Isolations and morphologic characterization of endophyte bacterias in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Researchgate*, 37(3), 61-66.
- Perumal, V., & Perumal, M. (2012). Evidense for production of Indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) on the growth of *H. annuus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(3), 1-14.
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N., & Teaumroong, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, 141–149.
- Procópio, R., Araújo, W., Maccheroni, J., & Azevedo, J. (2009). Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. *GMR, Genetics Molecular Research*, 8(4), 1408-1422.
- Puente, M., Li, C., & Bashan, Y. (2009). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 402–408.
- Raven, H., Evert, F., & Eichhorn, E. (2001). *Biología vegetal. Guanabara Koogan S.A.*, 698-719.
- Rizósfera*. (s.f.). Obtenido de <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Rizosfera.html>
- Roesch, L., Camargo, F., Bento, F., & Triplett, E. (2008). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil*, 91–104.
- Romero, D. (2018). *IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS* . La Paz.
- Ryan, R., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D., & Dowling, D. (2007). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *BIOMERIT Research Centre*.
- Sakiyama et al. (2001). Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *The Society for Applied Microbiology*(33), 117-121.

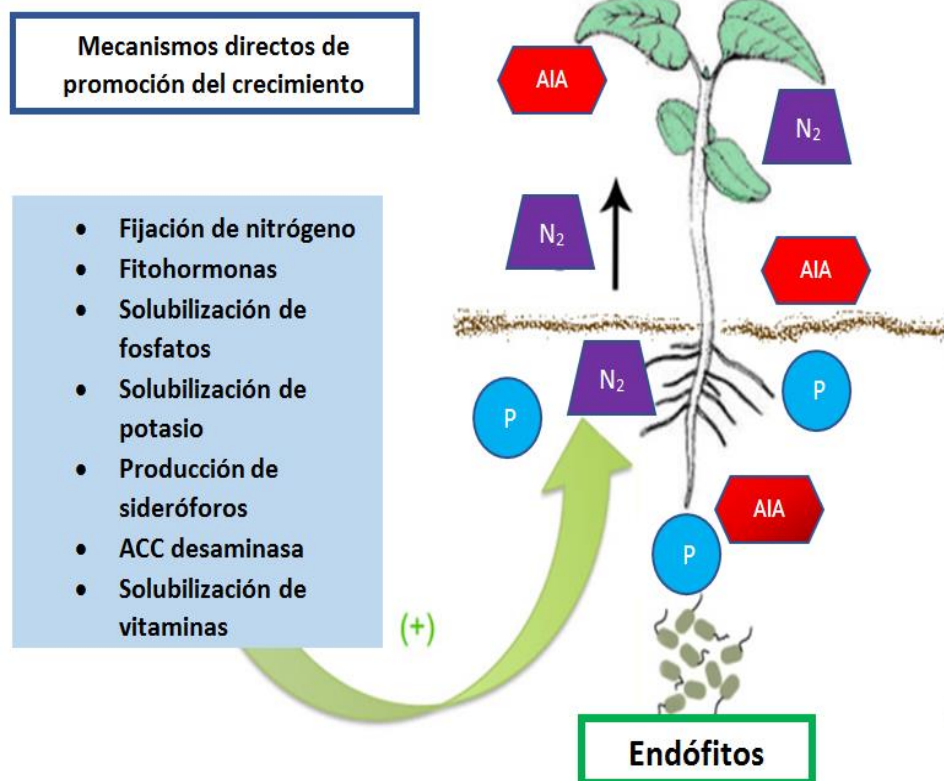
- Sapre, S., Gontia, I., & Tiwari, S. (2018). *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiological Research*, 25–32.
- Sessitsch, A. C., & Clément, C. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology Biochemical* 42, 669–78.
- Sgroy, V., & otros., y. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol-Springer-Verlag.*, 371-381.
- Shahab, S. (2009). Solubilización de los fosfatos: su mecanismo Genética y aplicación. 1.
- Silveti, R., Condori, D., & Mamani, V. (2011). Evaluación de cuatro especies andinas papa, quinua, haba y avena, utilizando fertilizantes orgánicos, orina humana tratada y humus Ecosan comunidad de Villa Andrani, Municipio de El Alto. *Fundación SumajHuasi*.
- Sinergia, L. (s. f.). Impactos ambientales en la Agricultura. *Proyecto, Life Sienrgia*, (págs. 1-11).
- Singh, D., Sharma, A., & Kaur, S. (2013). Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. *Biotech(3)*, 205–212.
- Soberaníaalimentaria. (Junio de 2002). "*Soberanía alimentaria*": un derecho para todos", *Declaración política del Foro de ONG/OSC para la Soberanía Alimentaria*. Obtenido de <http://vsf.org.es/soberania-alimentaria>.
- Soler, J., Gilchrist, E., & Pérez, J. (2012). Evaluation of microorganisms with potential for plant growth promotion and biological control of *Spongospora subterranea*. *Rev. Colombiana Biotecnología*, XIV(1), 157-170.
- Solon, P. (14 de Junio de 2015). *Milagro: de Bolivia en relación al cambio climático*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de <https://pablosolon.wordpress.com/2015/06/14/milagro-de-bolivia-en-relacion-al-cambio-climatico>
- Spaepen, J., Vanderleyden, R., & Remans. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review*, 31, 425-448.

- Staal, M., Lintel-Hekkert, S., Harren, F., & Stal, L. (2001). Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environmental Microbiology*, 3(5), 343-351.
- Sturz, A., Christie, B., Matheson, B., Arsenault, W., & Buchanan, N. (1999). Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol*, 360-369.
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Springer Science, Plant Soil*(356), 35–49.
- Tenuta, M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease control. *Departament of soil science*.
- Torres-Gutiérrez, R. (2008). Phytoestimulatory effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. *Dissertationes de Agricultura*, 21,155.
- Tucker, M. (2001). Essential Plant Nutrients: Their Presence in North Carolina Soils & Role in Plant Nutrition. *Agronomic Division*, 45-61.
- Umesh, P., & Ashok, K. (2011). A simple and rapid plate assay for the screening of indole-3-acetic acid (IAA) producing microorganisms. *IJABPT*, 2, 120-123.
- Universia. (23 de Julio de 2006). *El exceso de fertilizantes está causando graves daños al medioambiente*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de <https://noticias.universia.es/ciencia-nn-tt/2006/07/23/596819/Universia>
- Vargas, F. L. (2017). Size-variable zone in V3 region of 16S rRNA . *RNA BIOLOGY*, 1–8.
- Verma, S., Ladha, J., & Tripathi, A. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol* 91, 127–141.
- Vielma A., M. (1999). Caracterización de cepas autóctonas de Bradyrhizobium sp. aisladas de Lupinus spp. *Fac. Agrom (LUZ)*, 495-508.
- Wall, L. (2001). Wall, Consequences of an overview on PGPR work in Argentina: The field should be wiber. *Programa de investigación en interacciones biológicas. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina*.

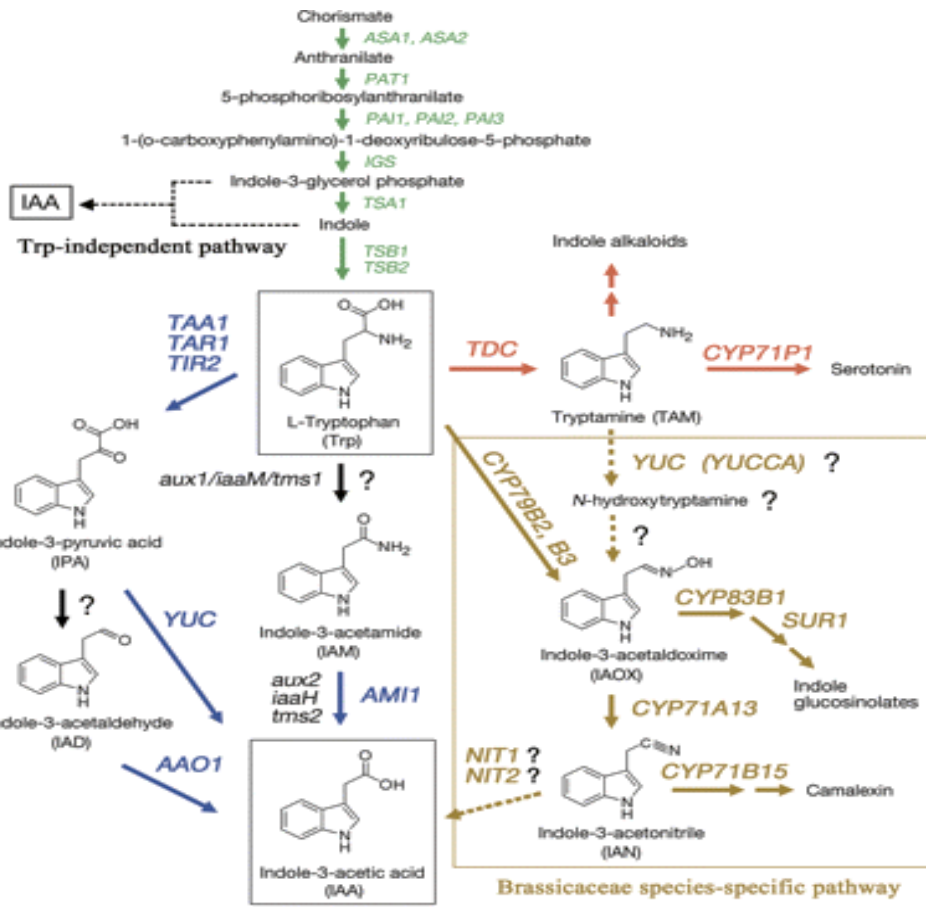
- Welch, S., Taunton, A., & Banfield, J. (2002). Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiol J* 19, 343–367.
- Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69, 99–151.
- Wilhelm, E., Arthofer, W., & Schafleitner, R. (1997). *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectriaparasitica*). *Cassells AC (ed), Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*.
- Wood, S., & Cowie, A. (Julio de 2004). *A Review of Greenhouse Gas Emission Factors for Fertiliser Production. IEA Bioenergy Task 38*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de http://www.ieabioenergytask38.org/publications/GHG_Emission_FertilizerProduction_July2004.pdf.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., & Mark, A. (julio de 2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in Plant Science*, VI, 1-10.
- Yeon, K., & Cho, Y. (2009). Isolation and Characterization of a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1431–1438.
- Zaheer, A., Babur, S., Mclean, J., Sumera, Y., Mahmud, T., Kauser, A., & Sajjad, M. (2016). Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. *Research in Microbiology*.
- Zelaya, L., & otros., y. (2017). Amoniaco-Oligotrophic y Diazotrophic Heavy Metal-Resistant *Serratia licuefaciens* Cepas de plantas pioneras y Mine Tailings. *Ecología microbiana*, 72(2), 324-346.

ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos directos de promoción del crecimiento de plantas



Fuente: García, P., y otros, (2015)



Fuente: Pérez, y otros, (2014)

Anexo 2. Plantas en estudio

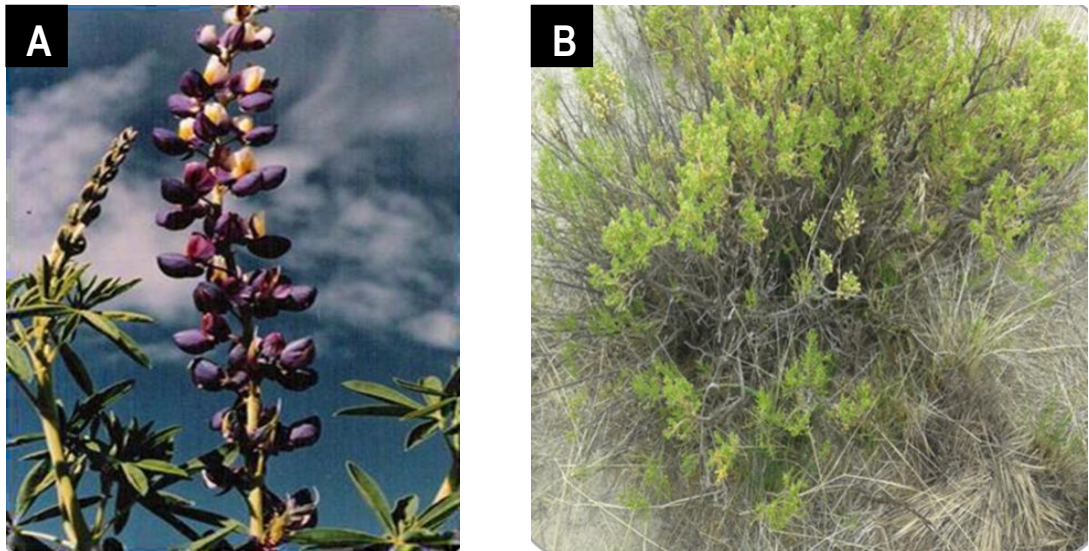
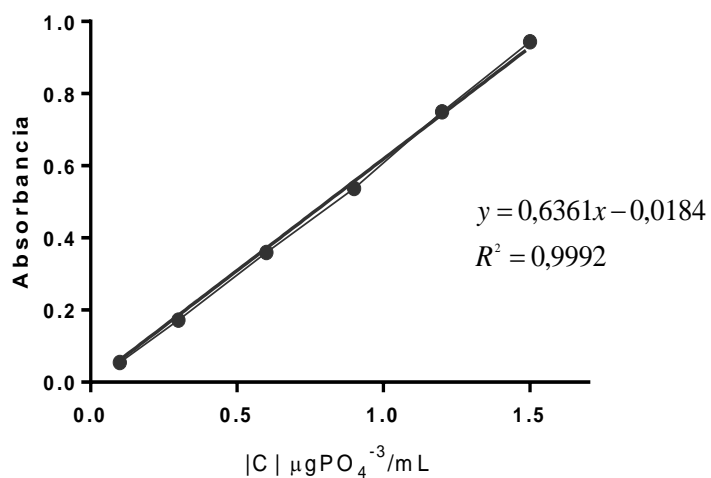


Figura 1. A. Planta de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), B. Planta de thola (*Parastrephia lepidophylla*). (Fuente: Elaboración propia)

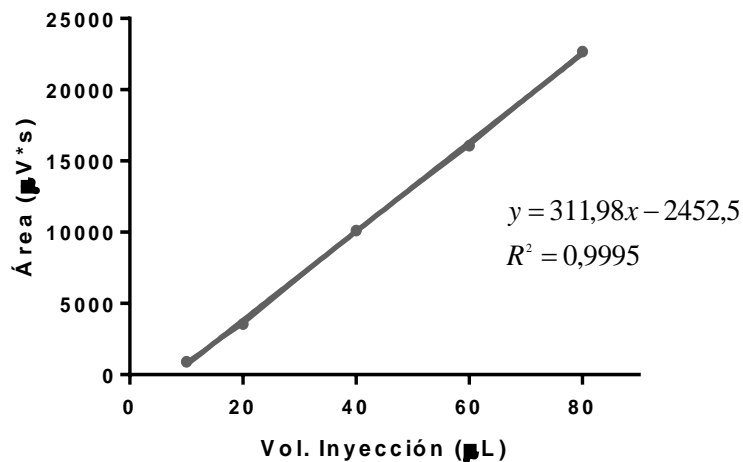
Anexo 3. Reactivo de Murphy (1962) para la cuantificación de fosfatos

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Ácido sulfúrico	5 N
Molibdato de amonio	40 mg/mL
Ácido ascórbico	0,1 M
Tartrato antimonil potasio	2,7 mg/mL

Anexo 4. Curva de calibración de Fosfatos – Técnica de azul de molibdeno



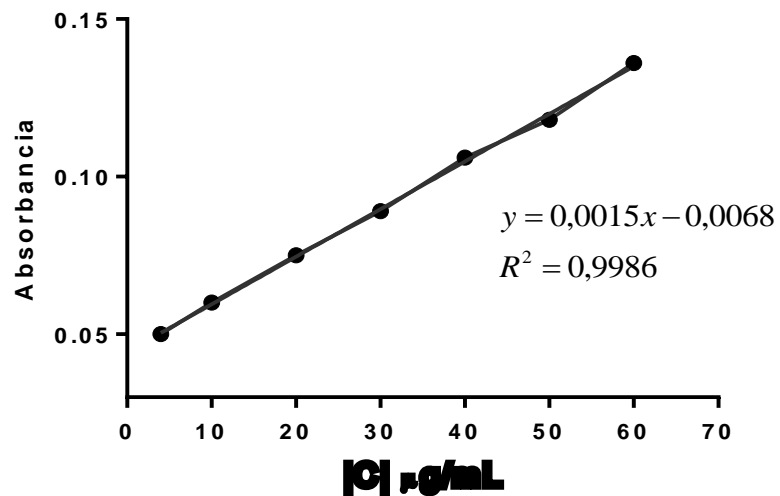
Anexo 5. Curva de calibración de Acetileno 10% - Ensayo de reducción de acetileno (ARA)



Anexo 6. Reactivo de Salkowsky (Modificación Bric et al, 1991) para la cuantificación de Ácido indol acético

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Ácido sulfúrico	18 M
Cloruro férrico	0,5 M
Agua	Destilada

Anexo 7. Curva de calibración de Ácido Indol Acético – Ensayo de producción de Ácido indol acético



Anexo 8. Control de esterilidad, de la técnica de esterilización por superficie

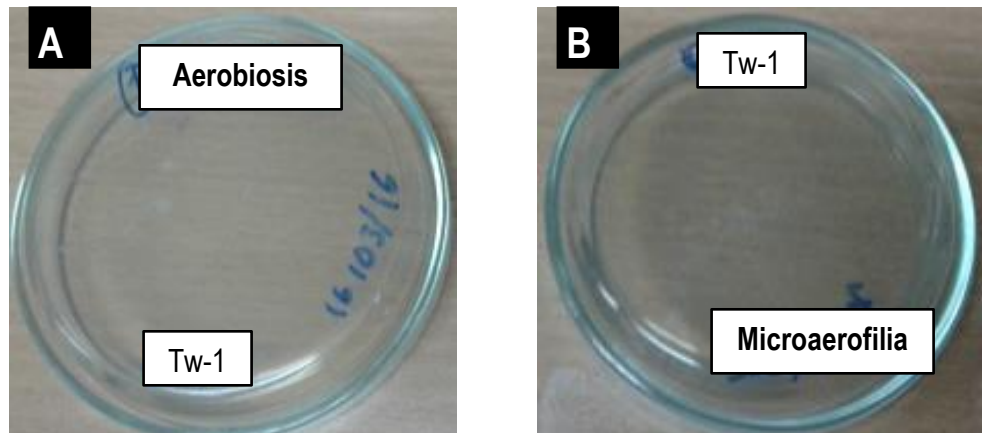


Figura 2. Placas de agar nutritivo, con inóculo de agua del último enjuague de la raíz nodular 1, sin desarrollo al cabo de 7 días. A: aerofilia; B: microaerofilia. (Fuente: Elaboración propia)

Anexo 9. Población endófito asociada a plantas

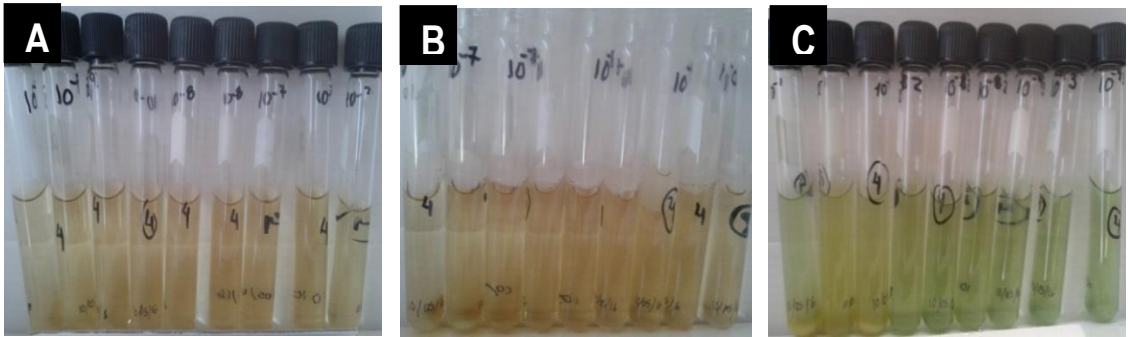


Figura 3. A. Población endófito asociado a la raíz nodular 4. Población total: A. aerobiosis; B. anaerobiosis; Población fijadora de nitrógeno: C. aerobiosis

Anexo 10. Selección de endófitos por el ensayo semicuantitativo de la solubilización de fosfatos

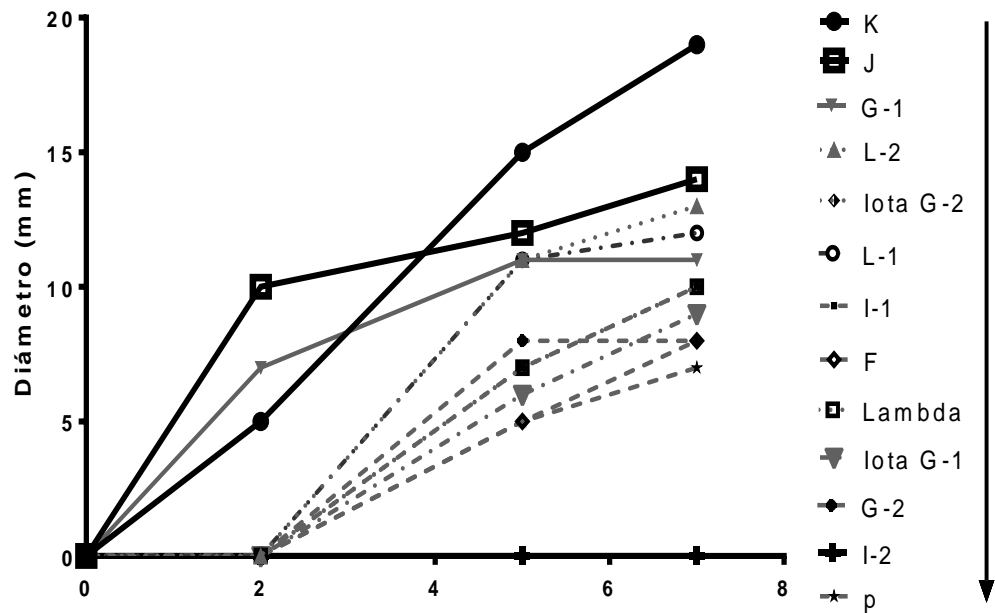


Figura 4. Ensayo semicuantitativo de las cepas provenientes de la planta de tarwi (*Lupinus mutabilis*), la flecha indica de mayor a menor hao de solubilización presentada por cada cepa, en función al tiempo.

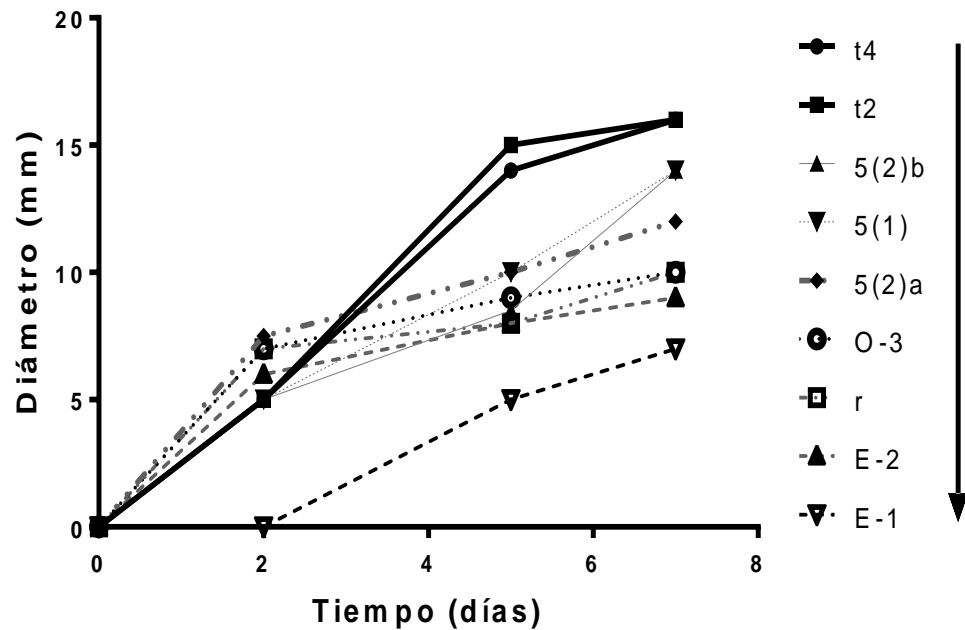


Figura 5. Ensayo semicuantitativo de las cepas provenientes de la planta de thola (*Parastrephia lepidophylla*, la flecha indica de mayor a menor hao de solubilización presentada por cada cepa, en función al tiempo.

Anexo 11. Análisis estadístico

1. Cinética de solubilización

Para evaluar la cinética de solubilización de las cepas seleccionadas se recurrió a una ANOVA de medidas repetidas ya que se tomaron muestras en varios días. Los resultados de la prueba de ANOVA de medidas repetidas (sin asumir esfericidad) muestra que existe diferencia significativa en la cinética de solubilización de las cepas a lo largo de los 14 días ($F_{4,12}=4.52$, $p=0.0186$)

Error: tiempo

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Residuals	3	533.4	177.8	

Error: tiempo:CEPA

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
CEPA	4	222.9	55.74	4.52	0.0186 *
Residuals	12	148.0	12.33		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Sin embargo, las comparaciones post hoc muestran que esa diferencia solo surge debido a que todas las cepas tienen mayor cinética de solubilización que el control abiótico.

Pairwise comparisons using paired t tests
data: datos_tabla_larga\$CINETIC and datos_tabla_larga\$CEPA

	CEPA_ABIO	CEPA_J	CEPA_K	CEPA_T2
CEPA_J	0.0157	-	-	-
CEPA_K	0.0489	0.8077	-	-
CEPA_T2	0.0009	0.2199	0.4944	-
CEPA_T4	0.0065	0.6816	0.4944	0.6816

P value adjustment method: holm

2. Efecto inductor de la producción de AIA

Para analizar el efecto de la cepa en la producción de ácido indol acético (AIA), se recurrió a una prueba de Kruskal-Wallis, debido al bajo número de réplicas por tratamiento y a que la variable no cumplía con los supuestos de la prueba de ANOVA (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas).

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, muestran que si existe diferencia significativa en la producción de ácido indol acético (AIA), inducida por cada cepa ($\chi_4^2 = 13.597$, $p = 0.009$)

AIA

Kruskal-Wallis rank sum test

data: AIA by CEPA

Kruskal-Wallis chi-squared = 13.597, df = 4, p-value = 0.008698

La capacidad de inducir la producción de AIA disminuye de forma significativa en el siguiente orden CEPA K > CEPA t2 > CEPA J > CEPA t4 > ABIOTICO

3. Actividad fijadora de nitrógeno

Para analizar la actividad fijadora de nitrógeno de las cepas, se recurrió a una prueba de Kruskal-Wallis, debido al bajo número de réplicas por tratamiento y a que la variable no cumplía con los supuestos de la prueba de ANOVA (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas)

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, muestran que si existe diferencia significativa en la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por cada cepa ($\chi_4^2 = 16.717$, $p = 0.005$)

Kruskal-Wallis rank sum test

data: FIJN by CEPA

Kruskal-Wallis chi-squared = 16.717, df = 5, p-value = 0.005069

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico disminuye de forma significativa en el siguiente orden CEPA K > CEPA t4 > *Rhizobium sp.* > CEPA J > CEPA t2 > ABIOTICO

4. Efecto inductor de las cepas endófitas K, t4 y t2, sobre la germinación de semillas

Para estudiar el efecto de las cepas en el desarrollo radicular de las plantas se realizó 4 pruebas de ANOVA;

4.1. Efecto de la CEPA K en la longitud radicular de germinados de tarwi (*Lupinus mutabilis*)

La prueba de ANOVA muestra que si existe diferencia significativa de la longitud radicular de los germinados respecto al tratamiento ($F_{3,36}=5.123$, $p=0.0047$)

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
CEPKLUP$TRAT 3 224.6 74.87 5.123 0.0047 **
Residuals 36 526.1 14.62
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se verificaron los supuestos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas

CEPKLUP\$TRAT: AGUA

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.17069, p-value = 0.5613

CEPKLUP\$TRAT: LIS

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.23936, p-value = 0.1072

CEPKLUP\$TRAT: PBS

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.26431, p-value = 0.05613

CEPKLUP\$TRAT: VIAB

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.16314, p-value = 0.6334

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

Df F value Pr(>F)

group 3 0.3846 0.7647

36

Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la CEPA K tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con Agua o células lisadas

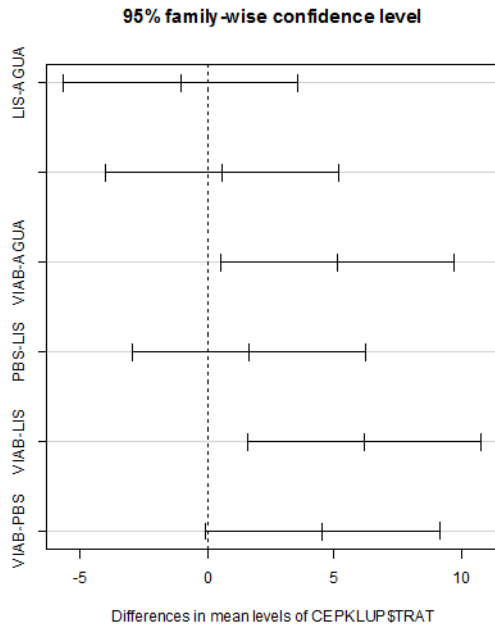
Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = CEPKLUP\$LONGRAD ~ CEPKLUP\$TRAT)

\$`CEPKLUP\$TRAT`

	diff	lwr	upr	p adj
LIS-AGUA	-1.05	-5.65459588	3.554596	0.9269114
PBS-AGUA	0.60	-4.00459588	5.204596	0.9849232
VIAB-AGUA	5.15	0.54540412	9.754596	0.0233567
PBS-LIS	1.65	-2.95459588	6.254596	0.7699120
VIAB-LIS	6.20	1.59540412	10.804596	0.0046852
VIAB-PBS	4.55	-0.05459588	9.154596	0.0537800



4.2. Efecto de la CEPA K en la longitud radicular de germinados de arroz (*Oryza sativa*)

La prueba de ANOVA muestra que si existe diferencia significativa de la longitud radicular de los germinados respecto al tratamiento ($F_{3,40}=20.82$, $p<0.0001$)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
CEPKORY\$TRAT	3	53.91	17.969	20.82	2.75e-08 ***
Residuals	40	34.52	0.863		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se verificaron los supuestos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas

CEPKORY\$TRAT: AGUA
Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
data: x\$LONGRAD
D = 0.13837, p-value = 0.8049

CEPKORY\$TRAT: LISADAS
Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
data: x\$LONGRAD
D = 0.18351, p-value = 0.3779

CEPKORY\$TRAT: PBS
 Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
 data: x\$LONGRAD
 D = 0.26984, p-value = 0.05445

CEPKORY\$TRAT: VIABLES
 Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
 data: x\$LONGRAD
 D = 0.18823, p-value = 0.3387

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

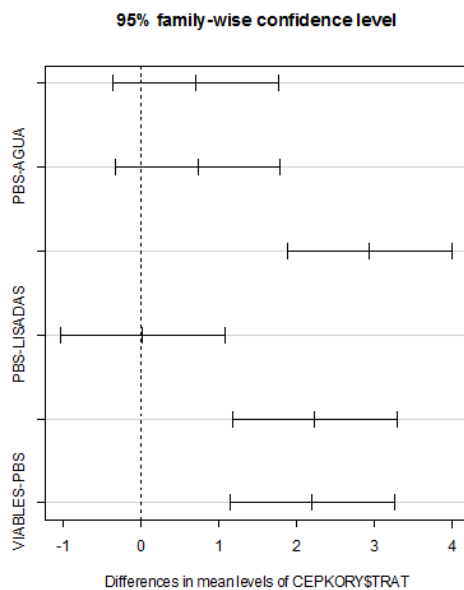
Df F value Pr(>F)
 group 3 0.2617 0.8526
 40

Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la CEPA K tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con Agua, PBS o células lisadas

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = CEPKORY\$LONGRAD ~ CEPKORY\$TRAT)
 \$`CEPKORY\$TRAT`

	diff	lwr	upr	p adj
LISADAS-AGUA	0.70909091	-0.3526981	1.770880	0.2930051
PBS-AGUA	0.73636364	-0.3254254	1.798153	0.2618334
VIABLES-AGUA	2.94545455	1.8836655	4.007244	0.0000000
PBS-LISADAS	0.02727273	-1.0345163	1.089062	0.9998808
VIABLES-LISADAS	2.23636364	1.1745746	3.298153	0.0000087
VIABLES-PBS	2.20909091	1.1473019	3.270880	0.0000108



4.3. Efecto de la CEPA t4 en la longitud radicular de germinados de cañahua (*Chenopodium pallidicaule*)

La prueba de ANOVA muestra que si existe diferencia significativa de la longitud radicular de los germinados respecto al tratamiento ($F_{3,116}=67.06$, $p<0.0001$)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
CEPTCA\$TRAT	3	47.49	15.832	67.06	<2e-16 ***
Residuals	116	27.38	0.236		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se verificaron los supuestos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas

CEPTCA\$TRAT: AGUA

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.12995, p-value = 0.2197

CEPTCA\$TRAT: LISADAS

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.1829, p-value = 0.06179

CEPTCA\$TRAT: NAACL

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.19075, p-value = 0.056873

CEPTCA\$TRAT: VIABLES

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test

data: x\$LONGRAD

D = 0.15924, p-value = 0.0505

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

group	Df	F value	Pr(>F)
3	0.6656	0.5748	
116			

Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la CEPA t4 tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con Agua, solución de NaCl o células lisadas

Tukey multiple comparisons of means

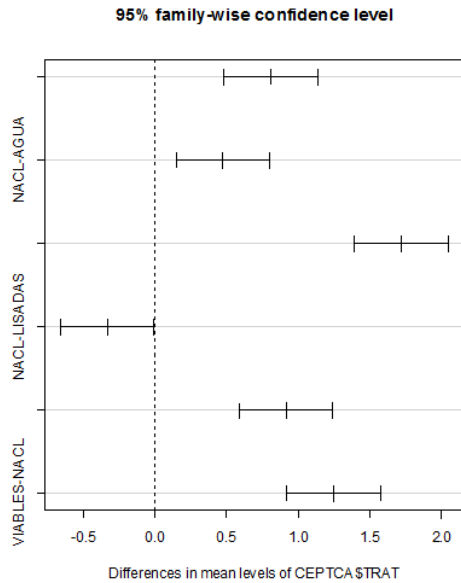
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = CEPTCA\$LONGRAD ~ CEPTCA\$TRAT)

\$`CEPTCA\$TRAT`

	diff	lwr	upr	p adj
LISADAS-AGUA	0.8066667	0.4796582	1.13367516	0.0000000
NAACL-AGUA	0.4733333	0.1463248	0.80034183	0.0014417

VIABLES-AGUA	1.7200000	1.3929915	2.04700849	0.0000000
NACL-LISADAS	-0.3333333	-0.6603418	-0.00632484	0.0439473
VIABLES-LISADAS	0.9133333	0.5863248	1.24034183	0.0000000
VIABLES-NACL	1.2466667	0.9196582	1.57367516	0.0000000



4.4.Efecto de la CEPA t2 en la longitud radicular de germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*)

Debido a que no existía normalidad de residuos y la distribución de la variable estaba sesgada hacia la derecha, se realizó una transformación logarítmica de la variable original antes de realizar la ANOVA

La prueba de ANOVA muestra que si existe diferencia significativa de la longitud radicular de los germinados respecto al tratamiento ($F_{3,76}=18.37$, $p<0.0001$)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
CEPTQUI\$TRAT	3	3.388	1.1294	18.37	4.65e-09 ***
Residuals	76	4.673	0.0615		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se verificaron los supuestos de normalidad de residuos (del logaritmo en base 10 de la longitud radicular) y homogeneidad de varianzas

CEPTQUI\$TRAT: AGUA
Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
data: x\$LONGRAD
D = 0.16769, p-value = 0.1481

CEPTQUI\$TRAT: LISADAS

Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
 data: x\$LONGRAD
 D = 0.10076, p-value = 0.8581

 CEPTQUI\$TRAT: NAACL
 Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
 data: x\$LONGRAD
 D = 0.21724, p-value = 0.01422

 CEPTQUI\$TRAT: VIABLES
 Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
 data: x\$LONGRAD
 D = 0.10557, p-value = 0.8092

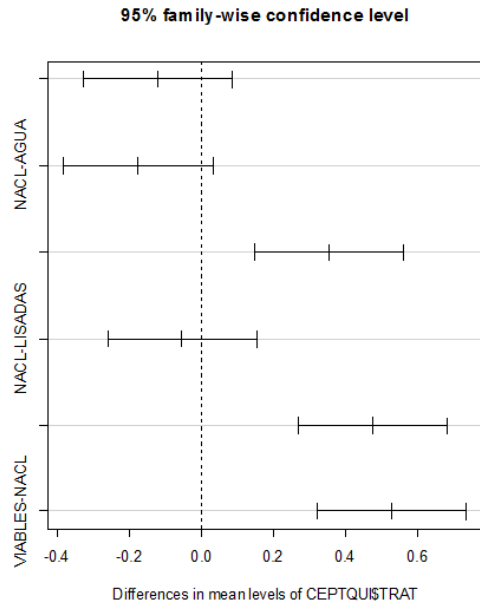
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")
 Df F value Pr(>F)
 group 3 1.1821 0.3222
 76

Las pruebas post hoc muestran que los germinados tratados con células viables de la CEPA t2 tienen una longitud radicular significativamente superior a los tratados con Agua, solución de NaCl o células lisadas

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

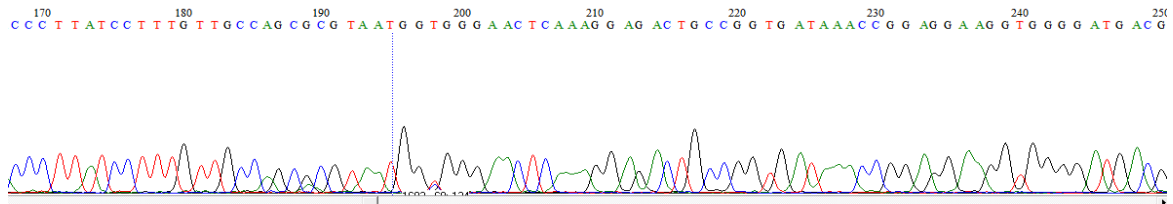
Fit: aov(formula = CEPTQUI\$LONGRAD ~ CEPTQUI\$TRAT)

\$`CEPTQUI\$TRAT`	diff	lwr	upr	p adj
LISADAS-AGUA	-0.12128939	-0.3272685	0.08468972	0.4151094
NAACL-AGUA	-0.17437824	-0.3803574	0.03160087	0.1260617
VIABLES-AGUA	0.35373878	0.1477597	0.55971790	0.0001338
NAACL-LISADAS	-0.05308885	-0.2590680	0.15289026	0.9054926
VIABLES-LISADAS	0.47502817	0.2690491	0.68100729	0.0000003
VIABLES-NAACL	0.52811702	0.3221379	0.73409614	0.0000000

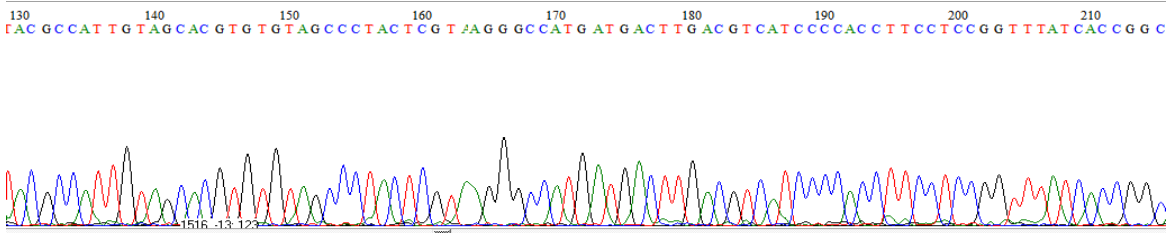


Anexo 12. Electroferogramas de los productos de amplificación primer forward y reverse, de las cepas K, t2 y t4

A



B



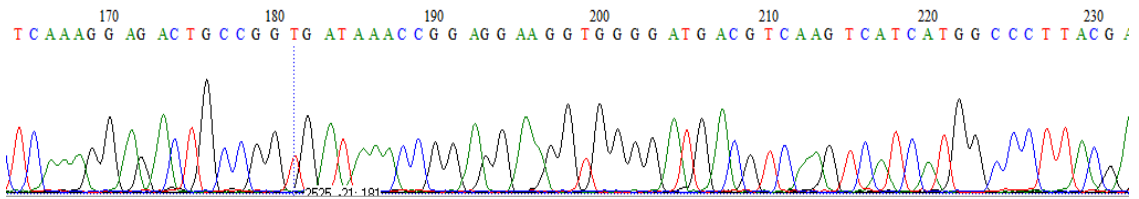
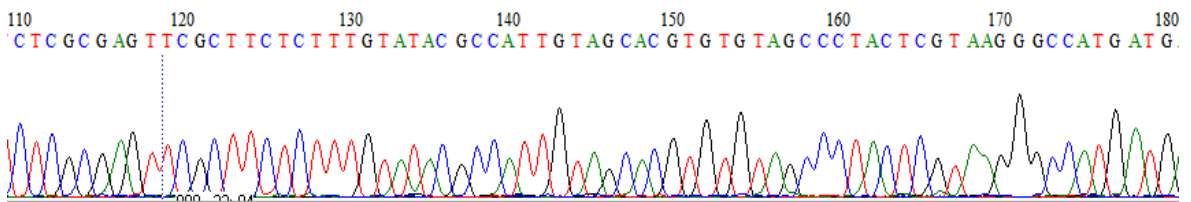
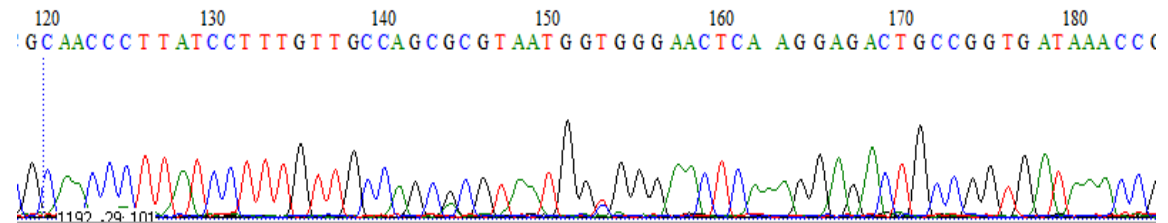
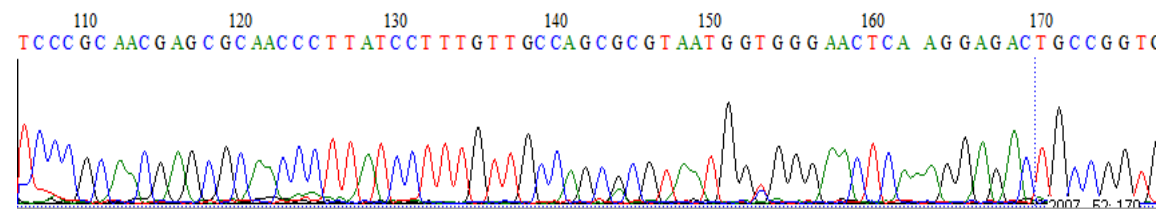
C**D****E****F**

Fig. 6. Secuenciación de los productos de amplificación del primer forward y reverse del fragmento variable V3 del 16S rADN de las muestras: A. secuencia forward cepa K; B. secuencia reverse cepa K; C. forward secuencia t2; D. reverse secuencia t2, E; forward secuencia t4; F. reverse secuencia t4.