



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE MICROORGANISMOS
ENDÓFITOS EN CULTIVOS DE MAÍZ**

Autor: Lorena Sanz López
Tutor/es: José Luis Copa Patiño

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor José Luis Copa Patiño, por darme la oportunidad con la que siempre he soñado, investigar, y por todas las demás oportunidades que me has brindado. He aprendido mucho con este TFG y aún más con tus consejos.

Además, agradecer, a Natalia Gómez Casanova y a Antonio por todo el apoyo dado en estos cinco meses que he pasado en el laboratorio, y, sobre todo, por hacerme sentir como una más.

Igualmente, agradecer a la empresa Ceres Biotics por interesarse en este trabajo, y permitirme expandir mis conocimientos en este campo, al contactarme para realizar las prácticas en su empresa.

Resumen

Los microorganismos endófitos, son aquellos que residen en el interior de las plantas, y tienen múltiples beneficios para el desarrollo y crecimiento de estas. En el presente estudio, se pretende cuantificar la cantidad y diversidad de microorganismos endófitos en el interior de las partes de las plantas (hoja, tallo y raíz) y observar la variación en la cantidad y diversidad de estos con la disponibilidad de agua de las plantas. El estudio se realizó en tres parcelas de maíz (*Zea mays*), situadas a diferentes distancias del río Tajo. Se valoraron las UFC (Unidad formadora de colonias) por gramo de planta, y se estableció el número de morfotipos diferentes basado en las características visuales de las colonias, su tinción de Gram y la forma de los microorganismos. Los resultados obtenidos mediante herramientas estadísticas indicaron que la mayor cantidad y diversidad microbiana se encontró en la parcela cercana al río y en la raíz de las plantas analizadas. El trabajo realizado pretende contribuir al conocimiento sobre los microorganismos endófitos, con el fin de establecer las relaciones que se establecen entre planta-microorganismo y su posible aplicación en la agricultura sostenible.

Palabras clave: Microorganismos endófitos, agricultura sostenible, biocontrol, diversidad microbiana, y PGPM (Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas).

Abstract

Endophytic microorganisms are those that reside within plants and have multiple benefits for their development and growth. In this study, it is intended to quantify the amount and diversity of endophytic microorganisms inside plant parts (leaf, stem and root) and observe the variation in the quantity and diversity of these microorganisms with the availability of water inside plants. The study was carried out on three maize (*Zea mays*) plots, located at different distances from the Tagus River. The CFUs (Colony Forming Unit) per gram of plant were assessed, and the number of different morphotypes was established based on the visual characteristics of the colonies, their Gram stain and the shape of the microorganisms. The results obtained through statistical tools indicated that the greatest amount and diversity of microorganisms was found in the plot near the

river and at the root of the plants analyzed. The work carried out is intended to contribute to knowledge about endophytic microorganisms, in order to establish the relationships that are established between plant-microorganism and its possible application in sustainable agriculture.

Key words: Endophytes microorganisms, sustainable agriculture, biocontrol, microbial diversity and PGPM (Plant growth-promoting microorganisms).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1 Localización del Estudio y recogida de muestras.....	5
3.2 Protocolo de esterilización de las partes de la planta.....	7
3.3 Protocolo de inoculación de los microorganismos endófitos.....	8
3.4 Protocolo de identificación de morfotipos de microorganismos endófitos.....	10
3.5 Análisis estadísticos.....	10
4. RESULTADOS.....	11
4.1 Presencia de microorganismos endófitos.....	11
4.2 Análisis de morfotipos.....	12
5. DISCUSIÓN.....	15
6. CONCLUSIÓN.....	17
7. BIBLIOGRAFÍA.....	18
8. ANEXOS.....	22

1. Introducción

La agricultura es una de las actividades más practicadas en todo el mundo, representando una ocupación del 11% de la superficie terrestre, previéndose que para el año 2050, debido al aumento de la población, habrá un aumento global de la demanda de producción agrícola del 70% y que los recursos naturales para este fin serán escasos (FAO, 2017 y Alston *et al.*, 2010).

En la agricultura actual, predomina un uso masivo de pesticidas y fertilizantes, en su mayoría químicos, para aumentar la producción de las cosechas con el fin de abastecer la gran demanda de producción actual. Según informes de la FAO (Rodríguez-Eugenio, 2018 y Min *et al.*, 2011), el año pasado (2018) se alcanzaron los 200 millones de toneladas de uso de fertilizante (Figura 1).

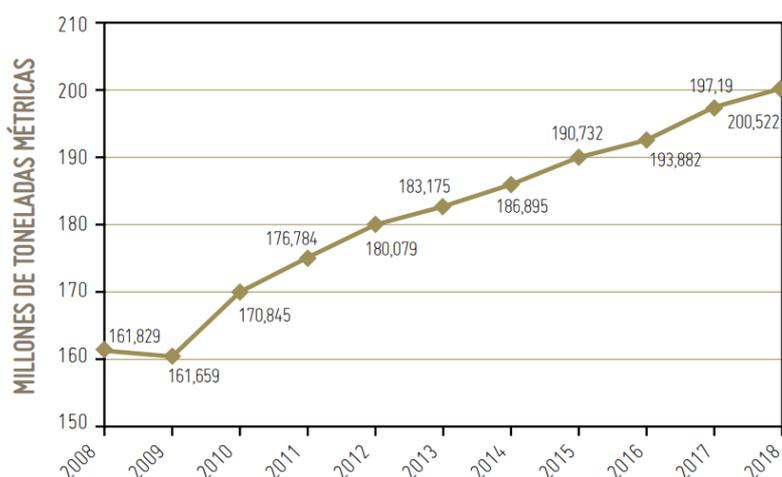


Figura 1. Representación del consumo mundial de fertilizantes químicos en toneladas/año (Rodríguez-Eugenio, 2018).

El aumento de fertilizantes y plaguicidas químicos no es directamente proporcional al aumento de la producción de las cosechas. Este hecho puede ser debido a que su uso genera grandes impactos sobre el medio ambiente que terminan repercutiendo en las mismas (Gray y Smith, 2005 y Rodríguez-Eugenio, 2018).

Estos impactos pueden ir desde la contaminación del aire (FAO, 2011), hasta la destrucción de la capa de ozono, o contribuir al efecto invernadero y al cambio climático al usar, por ejemplo, de forma masiva, fertilizantes a base de nitrógeno

que, en el suelo, y mediante la acción de los microorganismos, genera el gas N₂O (Eichner, 1990).

Por otro lado, los fertilizantes y pesticidas contribuyen a la degradación de los suelos. Esta degradación se produce por la utilización excesiva de fertilizantes compuestos en su mayoría por nitratos o fosfatos, que a su vez contienen metales pesados, como son, el Hg, Pb, Cd y As que derivan en la acumulación y persistencia de estos en los suelos. Esta acumulación provoca la alteración de las comunidades microbianas del suelo que viven en equilibrio con las plantas, varían la salinidad y pH del suelo (Atafar *et al.*, 2010; Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018). Todo ello repercute en una disminución de la producción de las cosechas (FAO, 2011). Finalmente, estos productos pueden ocasionar la eutrofización de las aguas, e inclusive, perjudicar a la salud humana. (Bruinsma, 2003 y FAO, 2011).

Nace de este problema la incipiente necesidad de investigar alternativas para una agricultura sostenible, como son los microorganismos endófitos. Los microorganismos endófitos son aquellos que residen en el interior del tejido de las plantas, ya sea de forma permanente o temporal, y que no causan ningún daño aparente a estas y que pueden realizar una asociación mutualista con las plantas. Se pueden encontrar en el interior de cualquier especie vegetal del planeta (Strobel y Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004 y Pérez y Chamorro, 2013).

Algunos autores, clasifican a los microorganismos endófitos según la dependencia que tengan con la planta y según su permanencia y colonización de esta. Según la dependencia que tengan con la planta, pueden ser facultativos u obligados. Los primeros son aquellos microorganismos que pueden vivir una etapa de su ciclo de vida fuera de la planta. Por el contrario, los segundos, son aquellos cuyo crecimiento y supervivencia depende de la actividad de la planta. (Hardoim *et al.*, 2008). Respecto a su clasificación conforme a su permanencia y colonización de la planta, pueden ser considerados: (a) endófitos pasajeros, son microorganismos que habitan en el suelo y que pueden volverse endófitos por casualidad, al entrar a través de heridas naturales o realizadas por algún nematodo en la raíz, y colonizando solo partes externas de la raíz. (b) Endófitos

oportunistas, mediante sus características colonizan partes específicas de la raíz, como son, el rizoplasma (mediante una respuesta quimiotáctica) o incluso invaden tejidos internos. Por último, (c) Endófitos competentes, son aquellos que se adaptan al entorno de la planta consiguiendo colonizar toda ella, incluyendo el tejido vascular y teniendo la capacidad de modificar el metabolismo de la misma, manteniéndose en equilibrio con ella incluso cuando los microorganismos se encuentran en una alta concentración (Hardoim *et al.*, 2008).

Se han descrito múltiples beneficios que tienen los microorganismos endófitos, no solo para el crecimiento de las plantas y una mayor producción de las cosechas, sino también, para el medio ambiente. Los microorganismos endófitos, son capaces de promover el crecimiento de las plantas (Plant-Growth Promoter Microorganisms; PGPM) y aumentar el rendimiento de las cosechas, principalmente, mediante la movilización de nutrientes. Son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos y producir sideróforos que captan el hierro y lo ponen a disposición de las plantas. Asimismo, pueden modificar partes de la morfología de la planta mediante la secreción de fitohormonas, llegando a ocasionar, un aumento de los pelos radiculares en las raíces, ayudando a las plantas a una mayor captación de nutrientes y agua, o modificando la superficie de la hoja provocando una mayor eficiencia en la tasa fotosintética (Ryan *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2015; Compant *et al.*, 2005; Azad y Kaminskyj, 2016 y Chi *et al.*, 2005). Se ha visto, que la mayoría de los endófitos producen una enzima, la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, capaz de reducir los niveles de etileno que se encuentren dentro de la planta, esto es muy importante, ya que el etileno inhibe el crecimiento y desarrollo de estas (Mei *et al.*, 2010 y Glick *et al.*, 1998).

Los microorganismos endófitos pueden ser usados como agentes de biocontrol o biopesticidas. Estos compiten por el nicho y los nutrientes desplazando a cepas perjudiciales para la planta, activan los mecanismos de resistencia sistémica de las plantas frente a patógenos y algunos nematodos y son capaces de producir metabolitos secundarios (como sideróforos que secuestran el hierro necesario para los microorganismos patógenos) o enzimas líticas. Además, algunos de

ellos producen antibióticos y toxinas capaces de eliminar infecciones de patógenos que puedan sufrir las plantas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018 y Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Un ejemplo de estos metabolitos, son los Ácidos noulispóricos, que ayudan a la eliminación de ciertas larvas (Strobel y Daisy, 2003).

Igualmente, otro gran beneficio que los endófitos les confieren a las plantas es una mayor capacidad frente al estrés ambiental que puedan sufrir en el medio. Tal como, una mayor resistencia frente a sequias, cambios en salinidad o temperaturas (Arachevaleta *et al.*, 1989 y Waller, 2005). La resistencia a sequias viene dada por la capacidad que tienen estos microorganismos de regular la apertura y cierre de los estromas, regulación de la elasticidad de la pared celular, procesos osmóticos y la acumulación de carbohidratos. (Malinowski, 2000 y Ryan *et al.*, 2008).

Por último, promueven la fertilidad del suelo y evitan su contaminación. Los endófitos contribuyen a la eliminación de ciertos contaminantes, repercutiendo en una mejora de la productividad de las cosechas. Igualmente, la fijación del nitrógeno y solubilización de nitratos, así como, la conversión de elementos en formas utilizables por las plantas, aumentan la fertilidad del suelo. (Cordero *et al.*, 2010).

2. Objetivos

A pesar de las investigaciones realizadas con los microorganismos endófitos aún quedan muchas cuestiones sin resolver sobre las interacciones de estos microorganismos con las plantas y sus beneficios (Ordóñez *et al.*, 2012). Igualmente, resulta muy interesante analizar la diversidad presente en las plantas y como dicha diversidad puede ser alterada por las condiciones ambientales que rodean a la planta.

En la bibliografía consultada, se sugiere que habría una mayor cantidad y diversidad de microorganismos endófitos en la raíz (Hallmann *et al.*, 1997), y que, un aumento en la disponibilidad de agua aumentaría el número y diversidad de microorganismos dentro de la planta (Rodríguez *et al.*, 2009).

El trabajo presentado tiene como objetivo general, el comprobar si las observaciones antes mencionadas se manifiestan también en un cultivo de uso agronómico tan importante como es el maíz (*Zea mays*). Para ello se han considerado los siguientes objetivos parciales:

- 1) Analizar si hay diferencias en la cantidad de microorganismos endófitos en las diferentes partes de las plantas de maíz: raíz, tallo y hoja.
- 2) Analizar la diversidad de los microorganismos endófitos en las diferentes partes de la planta mediante el estudio de las características morfológicas y microscópicas de las colonias aisladas de microorganismos.
- 3) Analizar si influye la disponibilidad de agua en el número y diversidad de endófitos presentes en las distintas partes de las plantas de maíz.

3. Materiales y Métodos

3.1. Localización del estudio y recogida de muestras

El estudio se realizó en cultivos de maíz (*Zea mays*). Se seleccionaron tres parcelas de cultivo situadas en la Comunidad Autónoma de Castilla la Mancha, entre las provincias de Guadalajara y Cuenca, concretamente en los términos municipales de Illana y Leganiel (Finca de la Algarga). Las parcelas fueron elegidas según la distancia al río Tajo, siendo la "Parcela A" la más cercana al río (1 metro de distancia), la "Parcela B" situada a una distancia media del río (540 metros de distancia) y la "Parcela C", la más lejana al río (1450 metros de distancia). Estas medidas se tomaron, en el caso de la Parcela A, desde el extremo más cercano de la parcela al río, hasta la margen del propio río, y en el caso de las parcelas B y C desde el extremo de la parcela más alejado del río hasta la margen del río Tajo (imagen 1). Esta elección de las parcelas se efectuó para investigar la relación que pueda establecerse entre los microorganismos endófitos, ya sea mediante la variación en la cantidad de estos o de la diversidad, y la disponibilidad de agua.

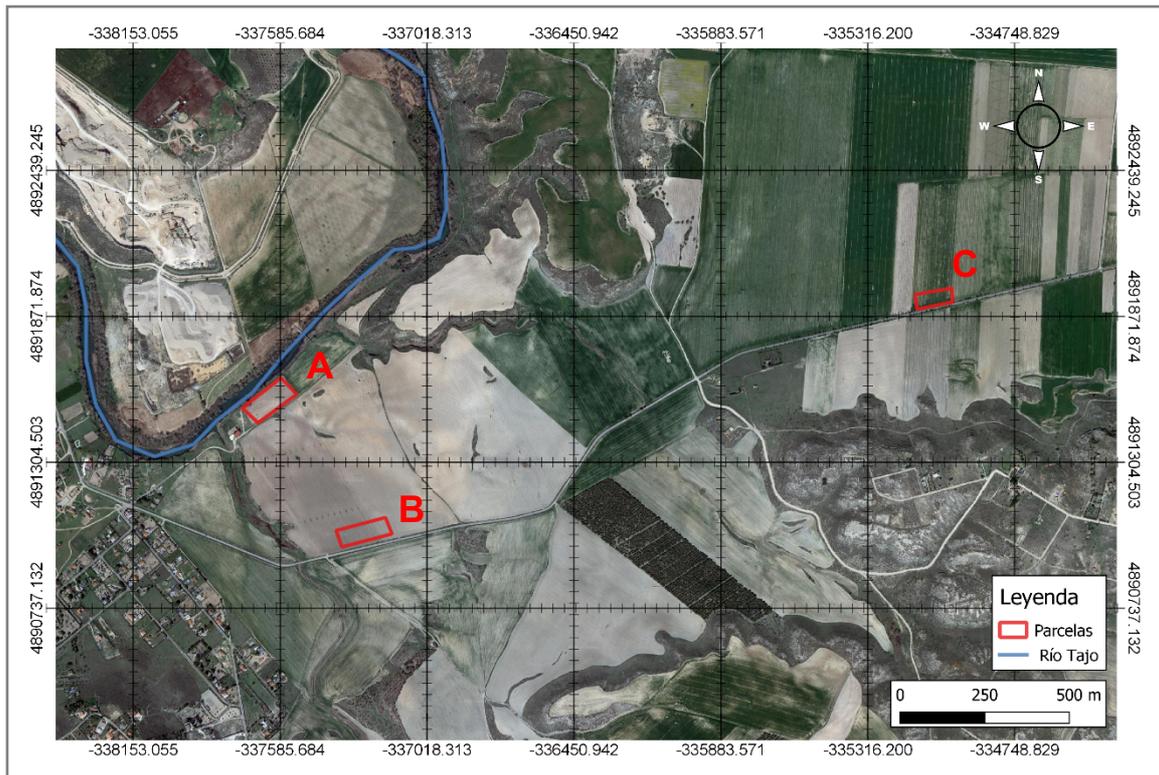


Imagen 1. Mapa de la Algarga indicando las parcelas muestreadas. Realizado con el programa QGIS.

A la hora de recolectar el maíz de las parcelas, se recogieron dos plantas de cada parcela al azar, pero manteniendo una lógica en cuanto a, distancia de una planta a otra, mismo surco de recogida y mismo estado de desarrollo de la planta (se recogieron en su mayor estado de desarrollo, en torno a 2 metros de altura). Asimismo, se tuvo en cuenta que las plantas no mostrarán signos de enfermedad o desperfectos.

De cada planta, se recolectó una muestra de hoja, otra de tallo y otra de raíz. Las muestras de las hojas siempre se obtenían de la parte central de la lámina, las muestras del tallo de la parte alta de la planta y, por último, las de la raíz se escarbó 5 cm de tierra para su obtención. Todas las muestras se recogieron en botes estériles (rotulados con un código para la identificación de las muestras), con guantes estériles, pinzas y tijeras que se esterilizaban con cada uso mediante un algodón con etanol al 96 % (Imagen 2).



Imagen 2. *A, Recolección muestra de hoja. B, Recolección muestra de tallo. C, Recolección muestra de raíz. D, Esterilización de las tijeras. E, Introducción de las muestras en botes estériles. F, Rotulación del código de la muestra.*

3.2. Protocolo de esterilización de las partes de la planta.

A la hora de preparar las muestras para su posterior análisis, una vez transportadas al laboratorio, se procedió a lavarlas con agua del grifo para eliminar el barro e impurezas superficiales.

Una vez limpias las muestras, se tomó la misma cantidad de muestras de tallo, hoja y raíz: 0,8 gramos de cada una.

Se procedió a la esterilización de la superficie de las muestras para evitar la inoculación de microorganismos que no fueran endófitos. Todo el proceso se realizó en una cabina estéril con material previamente esterilizado en autoclave.

El protocolo seguido para esterilizar las muestras fue el descrito por Cordero et al. (2010). Para ello, se cogieron las muestras con pinzas previamente esterilizadas mediante el uso de un mechero bunsen, se sumergieron las muestras en etanol al 70 % durante un minuto, después en hipoclorito sódico 100% durante un minuto y medio y finalmente, en etanol medio minuto para eliminar el hipoclorito sódico. Las muestras fueron limpiadas, con agua destilada esterilizada en un cristizador esterilizado dos veces para retirar los restos de etanol y, por último, fueron lavadas en una placa Petri llena también, de agua destilada estéril. Se cogieron 200 μ l de esta agua con una pipeta y se sembraron

en una placa de PCA (Plate Count Agar; Medio para la enumeración aeróbica en placas por el método de inoculación superficial según las normas ISO 4833, 8552 y 17410. Formula en g/L: peptona de caseína 5; extracto de levadura 2,5; glucosa 1 y agar 15) que previamente habían sido preparadas. Esto se realizó para comprobar que las superficies de las muestras quedaban estériles tras su lavado.

Cada placa de PCA se dividió y rotuló en tres partes donde se colocaron los 200 µl de las muestras de una misma planta, del tallo, la raíz y la hoja (Imagen 3). Y se procedió a su incubación a 37 °C durante 72 horas.

Durante este tiempo las muestras fueron conservadas en placas Petri estériles cerradas con nescofilm, en una cámara fría, evitando así la contaminación y la deshidratación de las muestras. Pasado el tiempo de incubación, se revisaron las placas y se observó si había crecimiento o no.

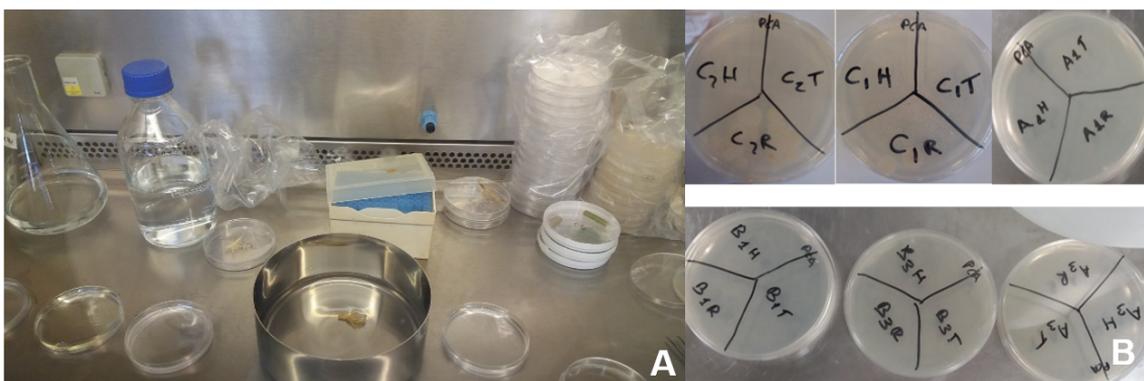


Imagen 3. A, Materiales utilizados para la esterilización. **B**, Placas inoculadas para comprobar la esterilización de las muestras.

3.3. Protocolo de inoculación de los microorganismos endófitos

Una vez esterilizadas las superficies de las muestras, se procedió a la extracción de los microorganismos endófitos y a la inoculación de estos en placas de PCA.

Para ello se extrajeron las muestras de la placa en la que se encontraban guardadas, y una a una, se introdujeron en un mortero estéril, se machacaron y se añadieron 4 ml de agua destilada estéril, se removió hasta obtener una mezcla totalmente homogénea y se guardó 1 ml de la mezcla en un eppendorf estéril.

Este proceso se realizó con cada una de las muestras, manteniéndose en todo momento las condiciones de esterilidad mediante la realización del proceso en una cabina y la esterilización del mortero y la pinza con etanol al 70 % cada vez

que se procesaba una muestra y procediendo después al lavado del mortero con agua destilada estéril para evitar que el etanol matase a los microorganismos de la muestra siguiente.

Para saber si el mortero se esterilizaba correctamente después de cada muestra, se llevaron a cabo dos controles (Imagen 4), basados en la realización del mismo proceso anteriormente mencionado, aunque sustituyendo la muestra de planta por 2 ml agua destilada estéril, y una vez lavado la superficie del mortero, sembrando por el método de extensión esa agua en una placa de PCA e incubándola durante 72 horas a 37 °C.

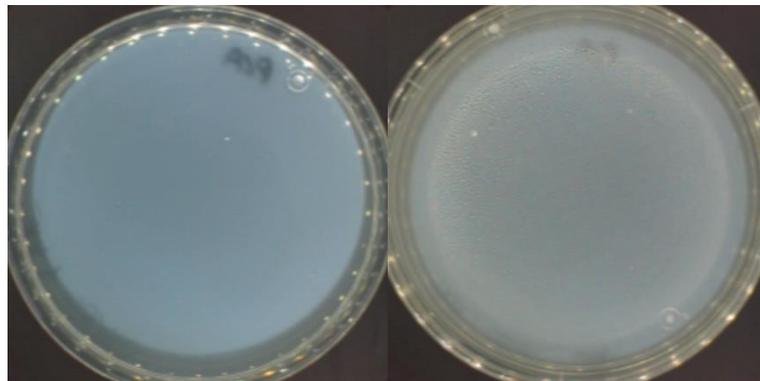


Imagen 4. Controles de esterilización del mortero, no se observó crecimiento de microorganismos.

Una vez obtenidos los eppendorf con las muestras de cada parte de cada planta, se procedió al sembrado de los microorganismos endófitos. Para ello, previamente a su sembrado, se dio un pulso de centrifugación a los eppendorf con el fin de separar los restos más gruesos que habían quedado de las partes de las plantas y obtener una parte líquida más fácilmente manipulable con la pipeta.

A continuación, en una cabina, se realizaron diluciones seriadas y finalmente se inoculó 100 μ l de cada una de las diluciones en placas de PCA por el método de agotamiento. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 72 horas.

Pasadas las 72h se llevó a cabo el recuento de las colonias por cada placa inoculada, mediante recuento manual y mediante el uso de un contador electrónico de colonias (Automatic Colony Counter Scan® 1200; Interscience) con el fin de afianzar los resultados (Anexo, Tabla 1).

3.4. Protocolo de identificación de morfotipos de microorganismos endófitos.

Una vez realizado el recuento de colonias, se observó en cada placa los diferentes morfotipos de colonias que crecían y se separaron en cultivos puros, mediante su resiembra por agotamiento, obteniéndose un total de 45 placas de PCA, manteniéndose la procedencia de estas colonias en cuanto a la planta, parte de ella y la parcela de la que procedían.

La identificación de morfotipos entre las distintas placas se llevó a cabo, por medio de la visualización de las colonias puras en placa y a la lupa, en base a su pigmentación, tamaño, superficie, consistencia y forma. Y, mediante, la visualización de las muestras al microscopio, para la tinción de Gram de las células, su forma y sus agrupaciones. El método de la tinción de Gram es: 1. Fijar la muestra a la llama. 2. Añadir cristal violeta, 2 minutos. 3. Retirar el cristal violeta y añadir lugol, 1 minuto. 4. Retirar el lugol y quitar el exceso con agua. 5. Decolorar con etanol al 96 %. 6. Añadir safranina, 2 minutos. 7. Secar la preparación y observar al microscopio.

A cada muestra se le realizó tres veces la tinción de Gram, para corroborar los resultados obtenidos en la primera tinción.

3.5. Análisis estadísticos.

En primer lugar, se analizó la cantidad de UFC/g por parcela y por partes de la planta. En segundo lugar, se llevó a cabo un estudio de como era la distribución de los morfotipos según las parcelas, partes de la planta, tinción de Gram y forma.

La primera parte de los resultados se sometió a un análisis de varianza ANOVA, tomando como P-valor de significancia 0.05, y cuando no se cumplía la normalidad o homocedasticidad de varianzas, se procedió a realizar un segundo análisis, Kruskal-Wallis para corroborar la significancia obtenida en el test anterior. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa R y Rstudio v.1.3.959 para la visualización de los resultados.

La segunda parte de los resultados se analizó por medio de la realización de gráficos de Mosaico con el programa Rstudio, y mediante un análisis estadístico DCA (Análisis de Correspondencia Desviado) con el programa CANOCO v5.12.

4. Resultados

4.1 Presencia de microorganismos endófitos

UFC/g de planta, encontrados en las parcelas estudiadas.

En el análisis estadístico de las medias de la cantidad de microorganismos endófitos encontrados en las tres parcelas, no se apreció diferencias significativas, oscilando las medias (sobre todo en la parcela alejada del río, C). Observándose, una mayor cantidad de microorganismos endófitos en la parcela A (1×10^4 UFC/g de planta, cercana al río) y una progresiva disminución en las parcelas B (7×10^3 , distancia media al río) y C (2×10^3 UFC/g de planta, parcela lejana al río) (Figura 2).

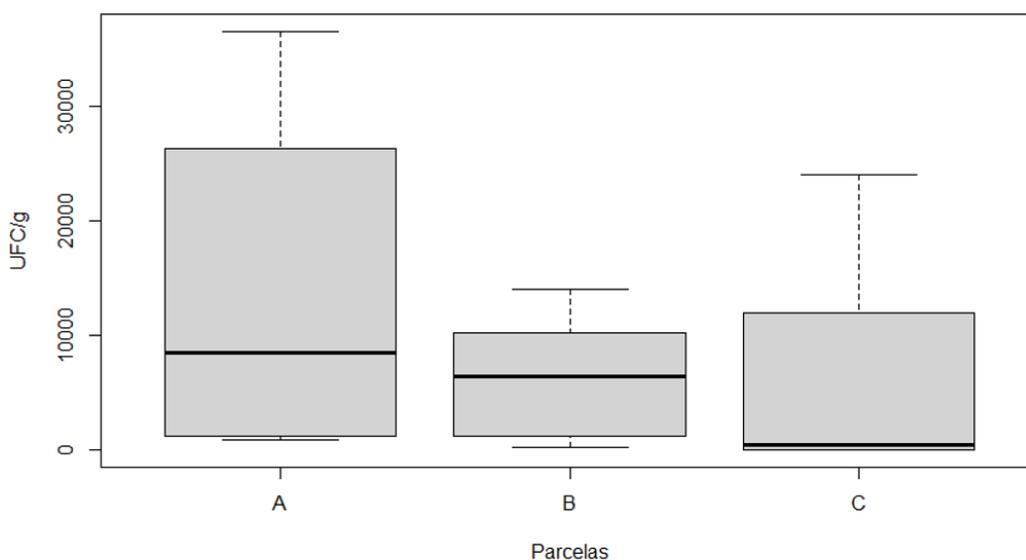


Figura 2. Se muestra un diagrama de cajas con las variables UFC/g de planta por el tipo de parcela analizada y la significación de los datos según ANOVA, obteniéndose un p-valor= 0.417.

UFC/g de planta, encontrados en las partes de las plantas estudiadas

En cuanto al análisis estadístico de la cantidad de microorganismos con respecto a la parte de la planta donde se encontraron, se observaron diferencias significativas, siendo la parte de la raíz donde se aislaron más endófitos $1,2 \times 10^4$

UFC/g de planta, seguido del tallo y las hojas (7×10^2 y 1×10^3 UFC/g de planta, respectivamente)(Figura3).

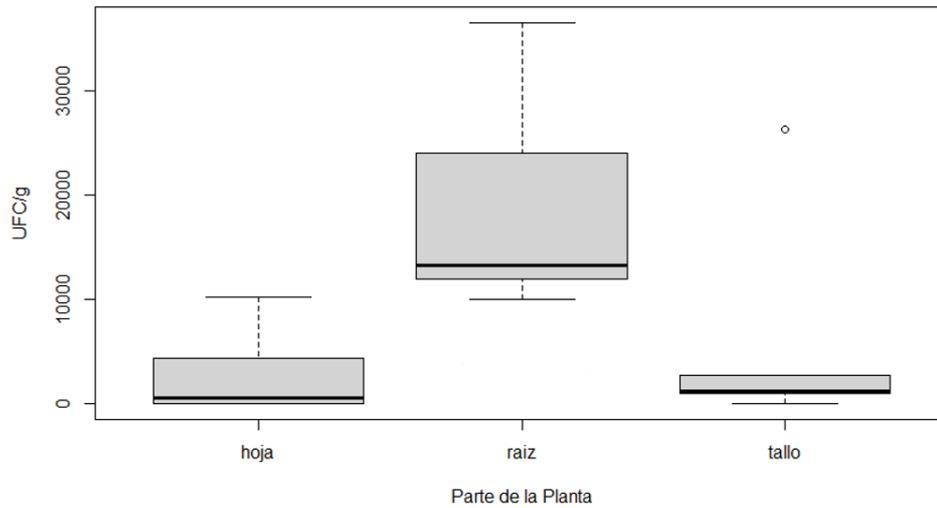


Figura 3. Diagrama de cajas mostrando las variables significativas UFC/g de planta por la parte de la planta analizada, y la significación de los datos según ANOVA con un p -valor=0.0164 y según Kruskal-Wallis con un p -valor=0.014.

4.2 Análisis de Morfotipos

En total, se obtuvieron 21 morfotipos diferentes (ver Anexo, tabla 2). En cuanto a la distribución de morfotipos con respecto a las parcelas analizadas, se observa un mayor número de morfotipos en la parcela cercana al río (14 morfotipos) y un número semejante en las parcelas de una distancia media al río (8 morfotipos) y más alejada al mismo (7 morfotipos), no detectándose morfotipos que sean comunes en las tres parcelas estudiadas (Figura 4).

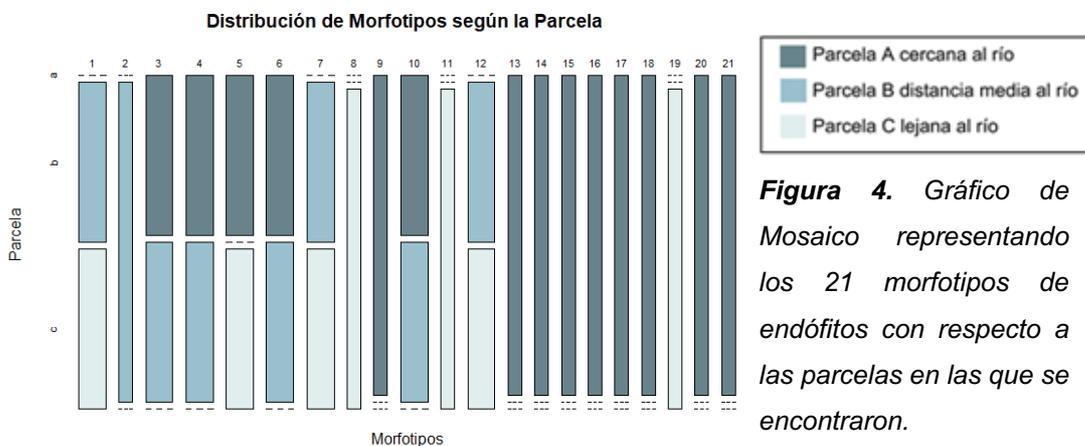


Figura 4. Gráfico de Mosaico representando los 21 morfotipos de endófitos con respecto a las parcelas en las que se encontraron.

Si se analizan los datos teniendo en cuenta solo la parte de la planta en la que se encontraron los morfotipos (Figura 5), se puede apreciar que predomina un mayor número de ellos en la raíz (13 morfotipos), seguido de las hojas (10 morfotipos) y el tallo (6 morfotipos), además, se puede encontrar un morfotipo común a todas las partes de la planta: el morfotipo 3.

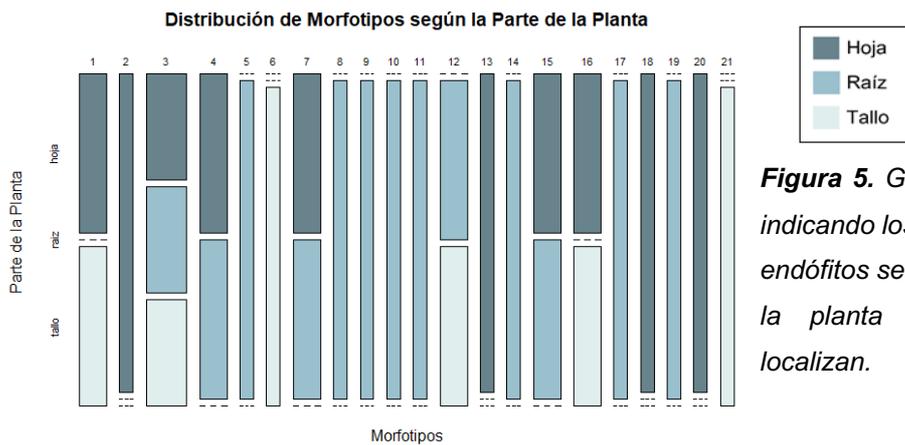


Figura 5. Gráfico de Mosaico indicando los 21 morfotipos de endófitos según en la parte de la planta en la que se localizan.

La distribución de morfotipos según la tinción de Gram se muestra en la Figura 6. La mayoría de los morfotipos son gram positivos (18 morfotipos), y una minoría son gram negativos (3 morfotipos).

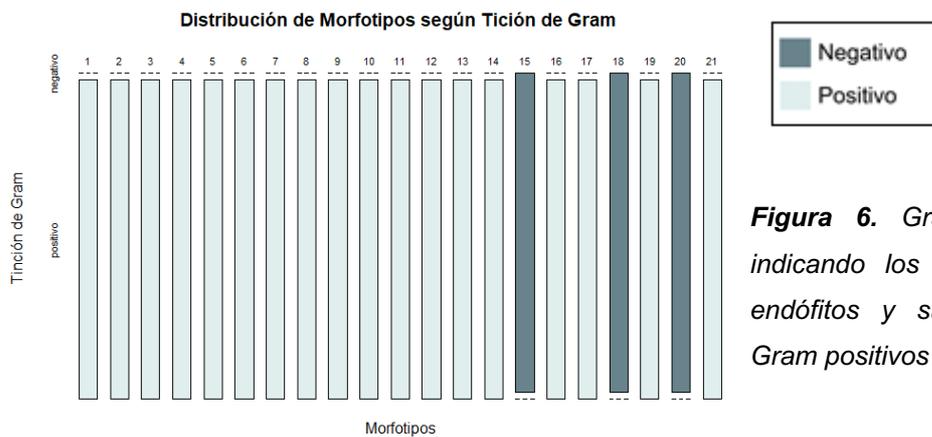


Figura 6. Gráfico de Mosaico indicando los 21 morfotipos de endófitos y su clasificación en Gram positivos o Gram negativos.

Por lo que respecta a la distribución de los morfotipos según la forma de las células, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. Se puede observar que predomina la forma de bacilo (12 morfotipos), seguida de la forma cocoide (7 morfotipos) y solo dos morfotipos presentaron forma pleomórfica.

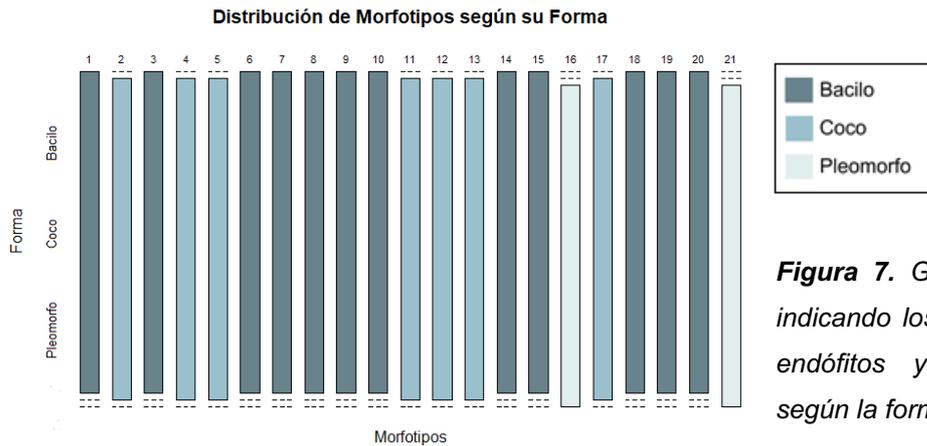


Figura 7. Gráfico de Mosaico indicando los 21 morfotipos de endófitos y su clasificación según la forma celular.

Finalmente, se realizó un análisis multivariante de la distribución de los morfotipos según la parcela en la que se encuentran, la parte de la planta en la que se aislaron, el resultado de la tinción de Gram obtenida y la forma celular de los mismos. El resultado obtenido se muestra en la Figura 8. Para este análisis, tal como se indicó en materiales y métodos, se utilizó el software CANOCO (v5.12).

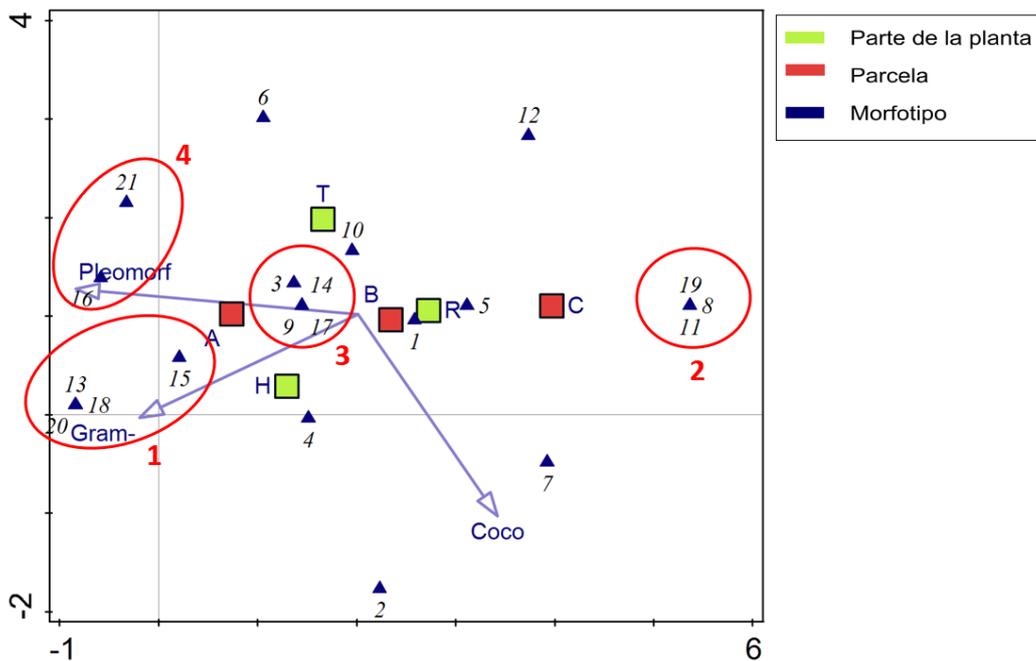


Figura 8. Gráfico del análisis estadístico DCA indicando la distribución de los 21 morfotipos aislados con respecto a las parcelas en las que se encontraron, la parte de la planta, su tinción gram y su forma. Las dos variables representadas, explicarían el 89% de la varianza. Los círculos rojos indican morfotipos que comparten características.

Se puede observar que:

1. Los morfotipos, 13, 15, 18 y 20, se sitúan en la parcela cercana al río (A). De ellos, la mayoría son Gram negativos (15, 18 y 20) y todos ellos aparecen en las hojas de las plantas.
2. Los morfotipos 8, 11 y 19 aparecen en la parcela C y en las raíces.
3. Los morfotipos 3, 9, 14 y 17, se pueden localizar tanto en la parcela más cercana al río (A) como en la parcela con una distancia media al río (B) y pueden encontrarse tanto en los tallos como las hojas.
4. Solo los morfotipos 16 y 21 fueron pleomórficos.

5. Discusión.

En este estudio se ha analizado la cantidad de microorganismos endófitos y morfotipos aislados en tres parcelas diferentes y en tres partes diferentes de las plantas recolectadas, obteniéndose un total de 21 morfotipos. Las variables que se han analizado son las UFC/g de planta, de tres parcelas diferentes, tres partes de la planta diferentes (raíz, tallo y hoja), tinción de Gram de los morfotipos y forma de las células.

Los resultados obtenidos fueron muy diversos, siendo significativos en algunos casos y en otros no. Esto pudo ser debido al bajo número de plantas analizadas, estudiando tres partes de cada planta, de seis plantas diferentes, dando lugar a un total de 18 muestras analizadas.

A pesar de que el análisis estadístico no concluyera diferencias significativas entre la cantidad de microorganismos y su distribución en las parcelas estudiadas, sí que se pudo observar una mayor cuantía de endófitos y diversidad de morfotipos en la parcela más cercana al río (parcela A) y una progresiva disminución de estos según nos alejábamos del río, siendo la parcela C la que menos morfotipos y UFC/g de planta presentó. Según la bibliografía, esto se podría explicar indicando que la mayoría de los nutrientes que necesitan los microorganismos para desarrollarse y generar biomoléculas esenciales para su supervivencia, se encuentran diluidos en el agua, siendo un factor importante la cercanía a una fuente de agua, en nuestro caso la proximidad al río Tajo (Apella

y Araujo, 2005). Además, en el suelo una mayor disponibilidad de agua supone una mayor disponibilidad de nutrientes, reduciendo la competencia de los seres vivos que conforman el suelo, pudiendo promover un aumento de la diversidad microbiana (Cano, 2011 y Timmusk *et al.*, 2005).

La cantidad de microorganismos fue significativa según la parte de la planta analizada, localizándose una mayor cantidad de endófitos en la raíz, seguido de las hojas. Diferentes publicaciones demuestran que existe un gran número de UFC/g de planta, en la raíz, y este hecho viene dado porque la entrada principal de los endófitos se realiza mediante los pelos radiculares y ramificaciones de la raíz, así como de las heridas que se generan de forma natural en las conjunciones epidérmicas por el crecimiento de la planta (Hallmann *et al.*, 1997). Otra entrada de fácil acceso a la planta para los endófitos es en las hojas por la apertura de los estomas, ya que algunos microorganismos cuentan con la capacidad de regular su apertura (Malinowski, 2000 y Ryan *et al.*, 2008). Se debe tener en cuenta que la cantidad de endófitos en las plantas puede estar influida por otros factores como son la especie vegetal, el tipo de tejido, la localización y el posible beneficio de otros microorganismos endófitos que ya estuvieran en el interior de la planta (Cordero, 2010).

Nuestros resultados indican que fue en la raíz donde más morfotipos diferentes se hallaron, esto podría ser lógico ya que fue la parte donde más microorganismos se aislaron. Se ha de tener en cuenta que los microorganismos una vez dentro de la planta, pueden migrar a diferentes partes de esta (Chi *et al.*, 2005), y esto explicaría porque en nuestro estudio se han hallado morfotipos comunes en diferentes partes de las plantas, como es el caso del morfotipo 3 aislado en todas las partes analizadas.

Igualmente, cabe destacar que los morfotipos de la parcela más lejana al río (parcela C) se encontraban mayoritariamente en la raíz (Figura 8), a diferencia de los morfotipos aislados en la parcela cercana al río (parcela A) y la parcela con distancia media al río (parcela B) que se encontraban tanto en la hoja como en el tallo, esto puede producirse porque al haber una menor disposición de agua en la parcela C, y por tanto un mayor estrés hídrico, la planta tiene una necesidad mayor de captación de agua, concentrándose los endófitos en la raíz para facilitar la obtención de este recurso. Por el contrario, cuando la planta no está

sometida a estrés hídrico, y por tanto no hay carencia de nutrientes, los microorganismos pueden distribuirse por otras partes de la planta (Cano, 2011 y Apella y Araujo, 2005).

Los morfotipos aislados fueron en su mayoría gram positivos y bacilos, esto es semejante a lo obtenido por otros estudios realizados por otros autores como Cho *et al.* (2007), donde se aislaron 13 géneros de endófitos en plantas de ginseng, siendo estos en su mayoría gram positivos o el estudio realizado por Liu y Chen (2010) donde el 70% de las bacterias encontradas fueron bacilos. Sin embargo, debe subrayarse que no se pueden considerar estas variables como relevantes, porque diversos estudios notifican que los microorganismos endófitos son muy heterogéneos, encontrándose endófitos de cualquier forma y tipo de gram (Cordero *et al.*, 2010). Además, esta diversidad depende también de la especie de la planta que se analice y de factores ambientales (Gunatilaka, 2006).

Para futuros estudios se aconseja mediante el método PCR (reacción en cadena de la polimerasa) identificar aquellos microorganismos endófitos comunes en parcelas y partes de las plantas (puesto que estos pueden ser considerados endófitos en su totalidad al estar presentes en todas las plantas). Esta identificación, fue nuestra intención desde el inicio del estudio, pero no se pudo realizar por falta de tiempo. Identificar los endófitos sería muy interesante para poder averiguar más sobre los beneficios directos que estas especies proporcionan a la planta, y así, poder usarlos como biofertilizantes y agentes de control. Además, se deberá utilizar un mayor número de muestras, para así tener la oportunidad de obtener diferencias significativas en las variables que se quieran estudiar.

6. Conclusiones.

Del estudio realizado se puede concluir:

1. Existen microorganismos endófitos en todas las plantas analizadas.
2. Existe una diferencia significativa en la distribución de los microorganismos endófitos según la parte de la planta analizada.

3. La presencia de un recurso como el agua aumenta el número de endófitos en las plantas, tal como sucede en los datos obtenidos en la parcela más cercana al río (parcela A).
4. Existe una clara distribución específica de algunos morfotipos según la parcela y parte de la planta, mientras que otros morfotipos no presentan dicha especificidad.

Bibliografía

1. Alston, J. M., Babcock, B. A., y Pardey, P. G. (2010). The shifting patterns of agricultural production and productivity worldwide. *Midwest Agribusiness Trade Research and Information*, pp.7- 15.
2. Apella, C. M., y Araujo, Z. P., (2005). Microbiología del agua. Conceptos básicos. *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*, pp.33-50.
3. Arachevaleta, M., Bacon, C. W., Hoveland, C. S., y Radcliffe, D. E., (1989). Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy journal*, 81(1), pp.83-90.
4. Atafar, Z., Mesdaghinia, A., Nouri, J., Homaei, M., Yunesian, M., Ahmadimoghaddam, M., y Mahvi, A. H., (2010). Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental monitoring and assessment*, 160(1-4), pp.83-89.
5. Azad, K., y Kaminskyj, S., (2016). A fungal endophyte strategy for mitigating the effect of salt and drought stress on plant growth. *Symbiosis*, 68(1-3), pp.73-78.
6. Bruinsma, J., (2003). Agriculture and the environment: changing pressures, solutions and trade-offs, World agriculture: towards 2015/2030: an FAO perspective. *Earthscan*. Chapter 12: Agriculture and the environment: changing pressures, solutions and trade-offs, pp.331-336
7. Cano, M. A., (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), pp.15-31.
8. Chi, F., Shen, S. H., Cheng, H. P., Jing, Y. X., Yanni, Y. G., y Dazzo, F. B., (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves,

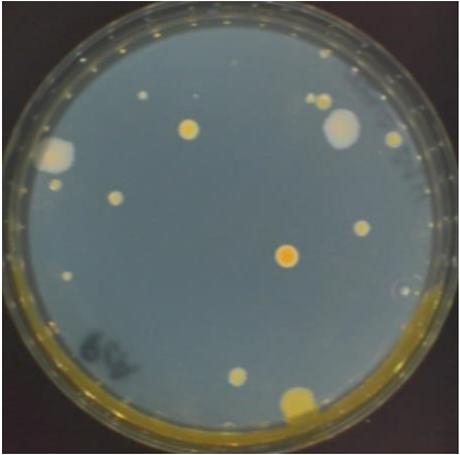
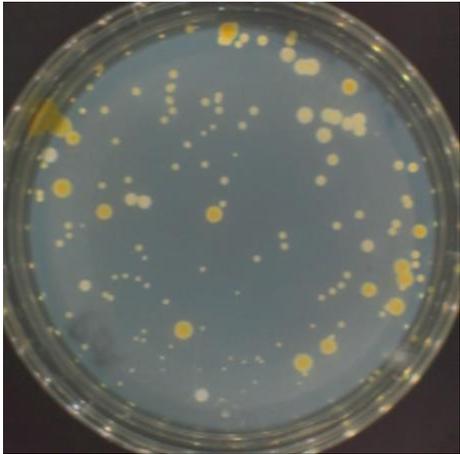
- inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied Environmental Microbiology*, 71(11), pp.7271-7278
9. Cho, K. M., Hong, S. Y., Lee, S. M., Kim, Y. H., Kahng, G. G., Lim, Y. P., Hoon K. y Yun, H. D. (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 54(2), pp.341-351.
 10. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., y Barka, E. A., (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*, 71(9), pp.4951-4959.
 11. Cordero, A. F. P., Sierra, J. N. R., y Cuello, J. R. F., (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta biológica colombiana*, 15(2), pp.219-228.
 12. Eichner, M.J., (1990). Nitrous Oxide Emissions from Fertilized Soils: Summary of Available Data. *Journal of environmental quality*, 19(2), pp.272-280.
 13. FAO, (2017). The future of food and agriculture – Trends and challenges. *Rome*, pp.32- 38
 14. FAO, (2011). The state of the world's land and water resources for food and agricultura. *Managing systems at risk, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan*, London, pp.3-8.
 15. Glick, BR, Penrose, DM y Li, J. (1998). Un modelo para la reducción de las concentraciones de etileno en las plantas por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. *Revista de biología teórica*, 190 (1), pp.63-68.
 16. Gray, E. J., y Smith, D. L., (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), pp.395–412.
 17. Gunatilaka, A. L., (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, 69(3), pp. 509-526

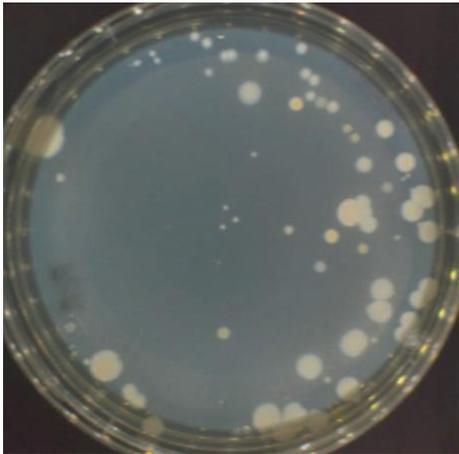
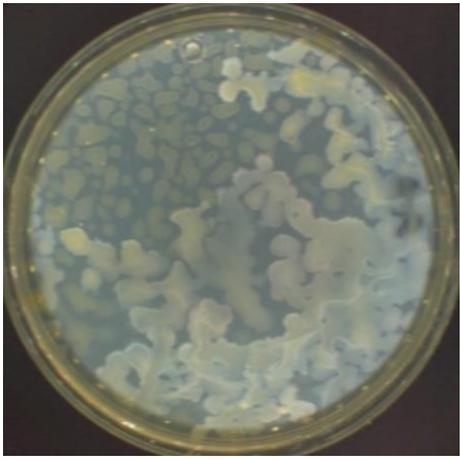
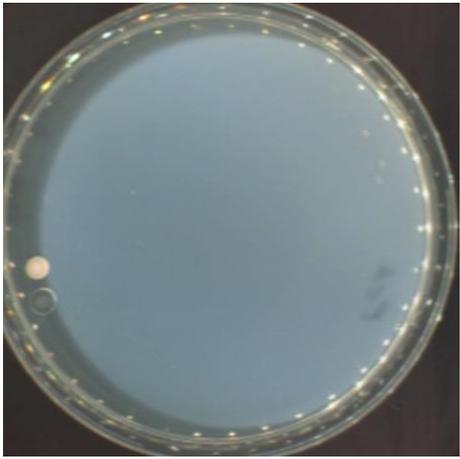
18. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., y Kloepper, J. W., (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), pp.895-914.
19. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., y van Elsas, J. D., (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), pp.463-471.
20. Liu, J., Wang, E. T., y Chen, W. X., (2010). Mixture of endophytic *Agrobacterium* and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes. *Archives of microbiology*, 192(3), pp.229-234.
21. Malinowski, D. P., & Belesky, D. P., (2000). Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40(4), pp.923-940
22. Mei, C., & Flinn, B. S., (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1), pp.81-95.
23. Min, J., Shi, W., Xing, G., Zhang, H., y Zhu, Z., (2011). Effects of a catch crop and reduced nitrogen fertilization on nitrogen leaching in greenhouse vegetable production systems. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 91(1), pp.31-39.
24. Ordóñez, N. F., Otero, J. T., y Díez, M. C., (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), pp.282-290.
25. Pérez C., A. y Chamorro A., L., (2013). Bacterias endofitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario, *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 5(2), pp.439-462
26. Pérez, Y. D. L. F., Díaz de la Osa, A., Restrepo Franco, G. M., Diván Baldani, V. L., y Hernández Rodríguez, A., (2015). Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1), pp.17-26.
27. Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., Y Pennock, D., (2018). Soil pollution: a hidden reality. *FAO*, pp.21-25.

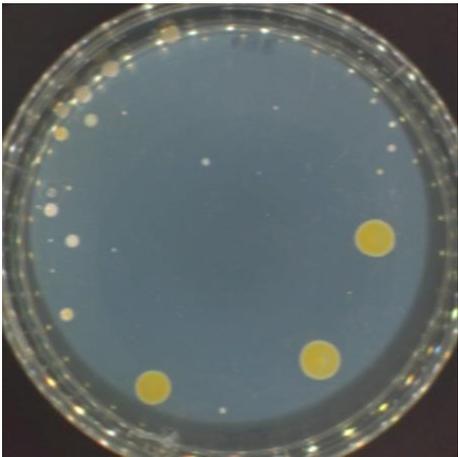
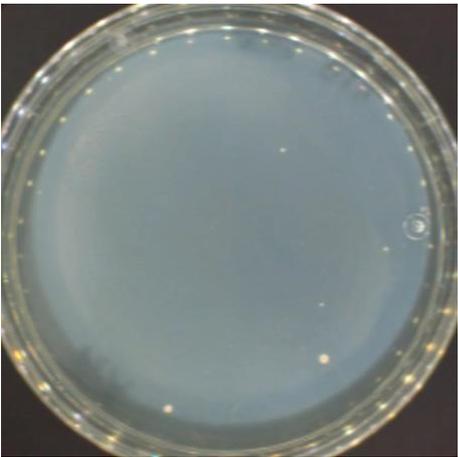
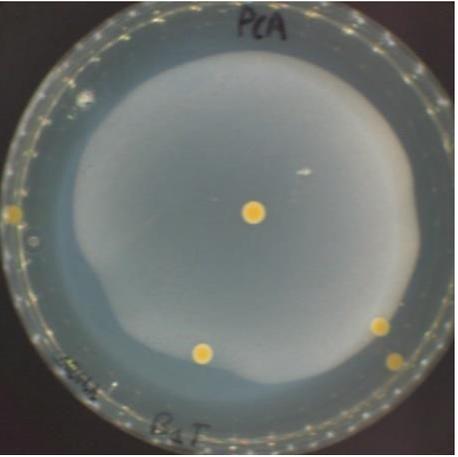
28. Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., y Redman, A. R. A., (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), pp.314-330.
29. Rosenblueth, M., y Martínez-Romero, E., (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), pp.827-837.
30. Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., y Dowling, D. N., (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), pp.1-9.
31. Strobel, G., y Daisy, B., (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), pp.491–502.
32. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., y Harper, J., (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), pp.257-268.
33. Sturz, A. V., Christie, B. R., y Nowak, J., (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, 19(1), pp.1-30.
34. Timmusk, S., Grantcharova, N., y Wagner, E. G. H., (2005). Paenibacillus polymyxa invades plant roots and forms biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71,(11), pp.7292-7300.
35. Villarreal-delgado, M.F., Villa-rodríguez, E.D., Cira-chávez, L.A., estrada-alvarado, M.I., Parra-cota, F.I. y Santos-villalobos, S.D.L., (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), pp.95-130.
36. Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C. y Von Wettstein, d., (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), pp.13386-13391.

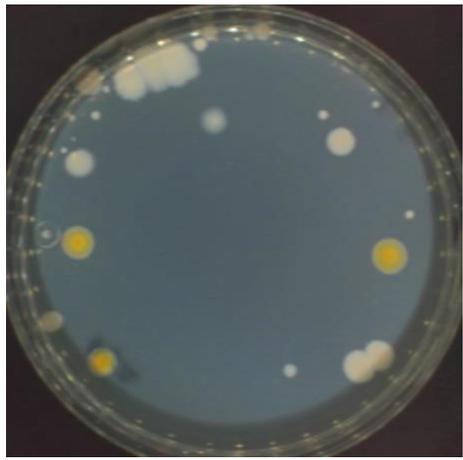
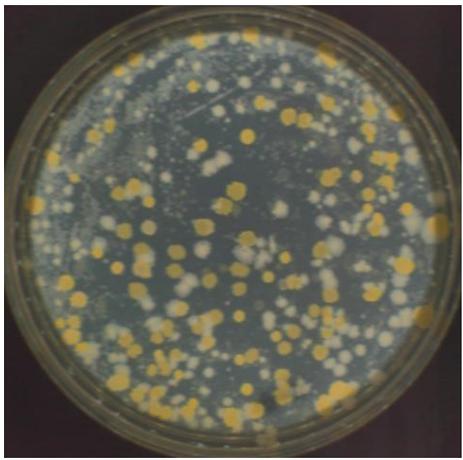
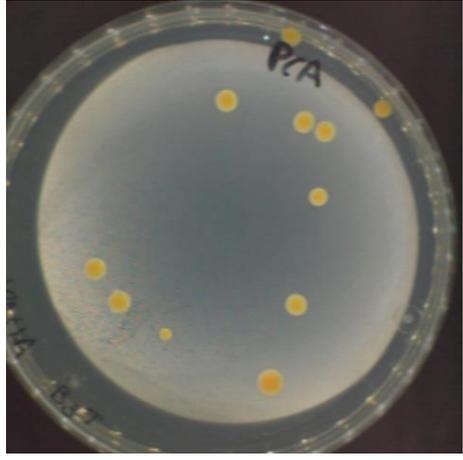
ANEXOS

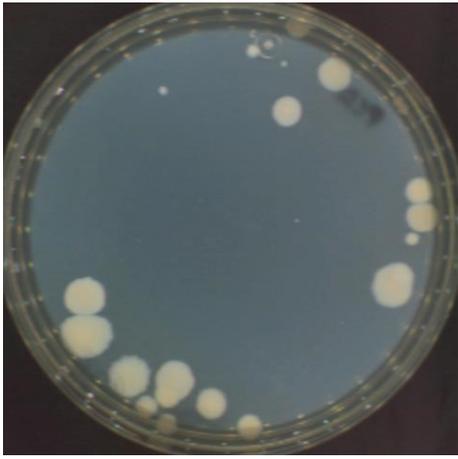
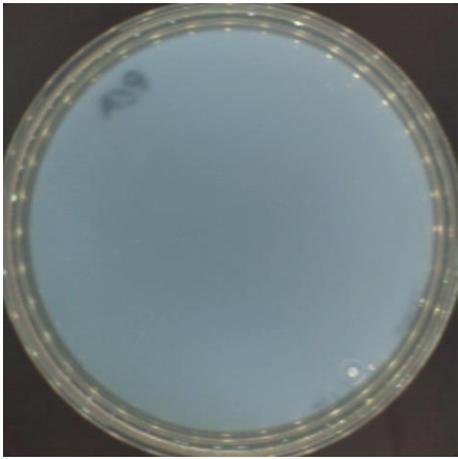
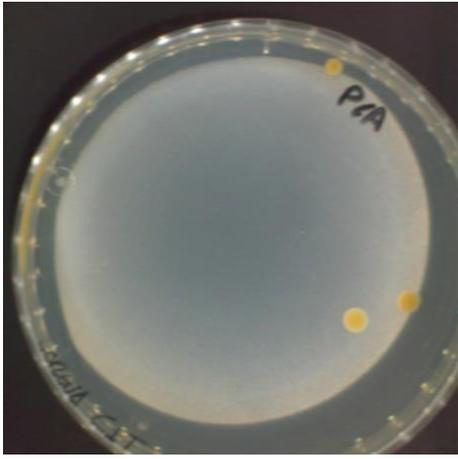
Tabla 1. Representación del recuento de colonias, por muestra en placas de PCA. Código de las muestras: A (Parcela cercana al río), B (Parcela distancia media al río), C (Parcela lejana al río), 1 (Primera planta recogida), 2 (Segunda planta recogida) y H (Hoja), T (Tallo) R (Raíz). El parámetro que se usó en el contador electrónico de colonias fue conteo total de colonias.

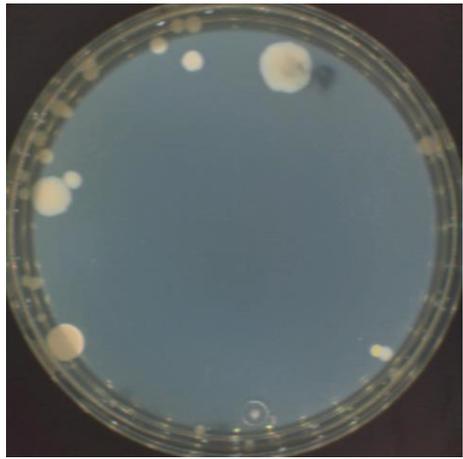
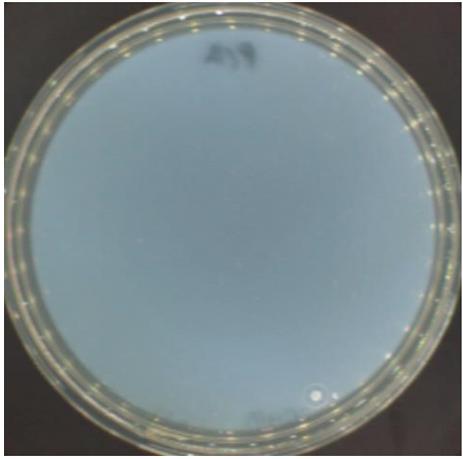
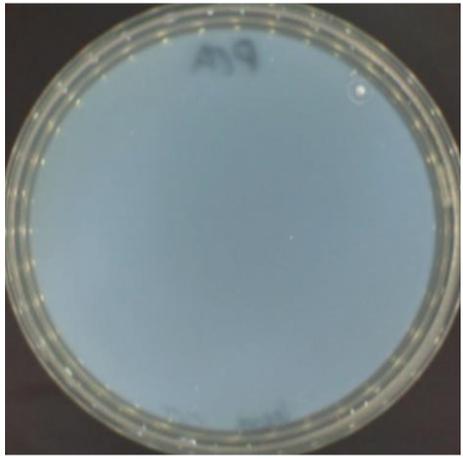
Muestra	Colonias	Tipos de Colonias	Ø CFU media (mm)	Imagen Placa
A1H	17	1.Naranja redonda regular (1col.)	3,25	
		2.Amarilla irregular (10col.)		
		3.Amarilla redonda regular (1col.)		
		4.Blanca grande irregular (3col.)		
		5.Blanca redonda regular pequeña (2col.)		
A1T	105	1.Redonda amarilla (16col.)	1,75	
		2.Blanca grande redonda (15col.)		
		3.Blanca redondeadas pequeñas (71col.)		
		4. Amarilleacea redondeada (3col.)		
A1R	73	1.Naranja en el centro con forma regular (4col.)	2,77	
		2.Marrón con forma irregular(2col.)		

		3. Blanca con forma irregular (2col.)		
		4. Amarillenta con forma redonda (62col.)		
		5. Blanca con relieve liso abultado (3col.)		
A2H	87	1. Blanca, grande con formas irregulares (87col.)	3,62	
A2T	5	1. Blanca con forma redonda y envés marrónáceo (5col.)	3,81	
A2R	25	1. Amarilla, grande y con forma redonda (3col.)	2,45	
		2. Rosa pequeña con forma redonda (2col.)		

		<p>3. Marróncea con forma redonda (2col.)</p> <p>4. Blanca, grande con forma irregular (6col.)</p> <p>5. Blanca, grande con forma circular (1col.)</p> <p>6. Amarilla, pequeña y con forma redondeada (4col.)</p> <p>7. Blanca, pequeña redondeada (7col.)</p>		
B1H	4	<p>1. Amarilla, grande con forma redonda y aureola (2col.)</p> <p>2. Naranja pequeña e irregular (2col.)</p>	1,35	
B1T	5	<p>1. Amarilla redonda grande (5col.)</p>	3,74	
B1R	28	<p>1. Amarilla, grande con forma redonda y aureola blanca (3col.)</p>	2,16	

		2. Blanca, grande con forma irregular (20col.)		
		3. Blanca, pequeña con forma redonda (5col.)		
B2H	204	1. Amarilla, redonda e irregular(77col.)	2,51	
		2. Blanca con forma redonda(58col.)		
		3. Amarillenta, muy pequeña con forma redonda(23col.)		
		4. Blanca, muy pequeña y con forma redonda(46col.)		
B2T	11	1. Naranja, grande y con forma redonda (1col.)	3,4	
		2. Amarilla con forma redonda (10col.)		

B2R	20	Blanca, grande y con forma irregular (20col.)	4,91	
C1H	0	-	-	
C1T	4	1.Amarilla grande redonda (4col.)	4,72	
C1R	24	1.Amarilla, pequeña con forma redondeada (1col.) 2.Blanca redonda y con forma de	3,49	

		ramificación en el interior (2col.)		
		3.Blanca, grande y con forma irregular (21col.)		
C2H	0	-	-	
C2T	0	-	-	
C2R	48	1.Naranja con forma regular (1col.) 2.Blanca, grande y con forma irregular (17col.) 3.Marronacea, pequeña y con	4,5	

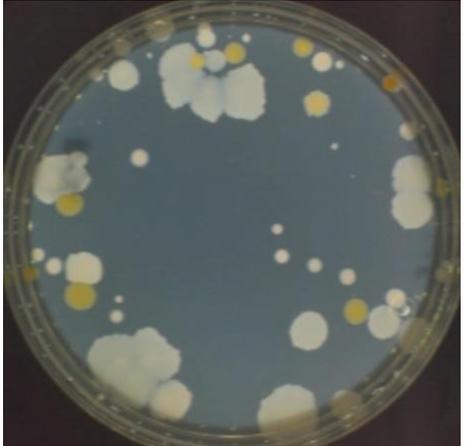
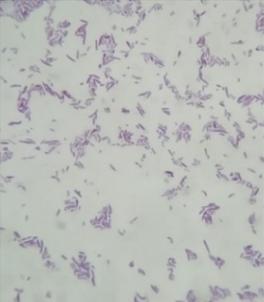
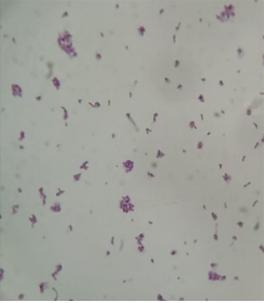
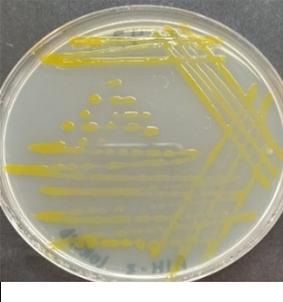
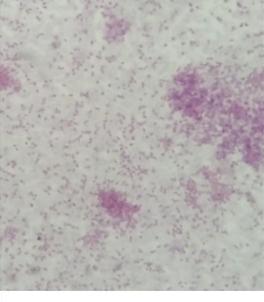
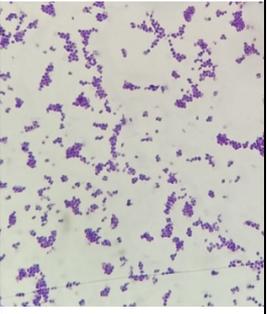
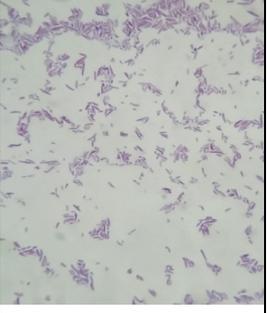
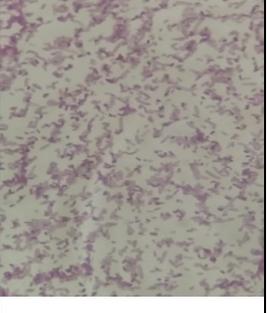
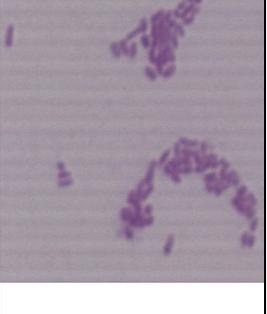
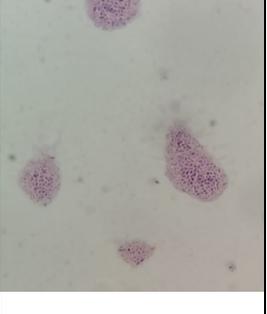
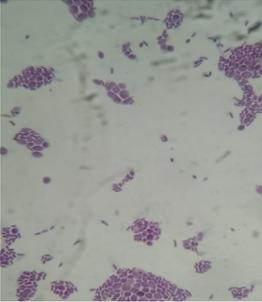
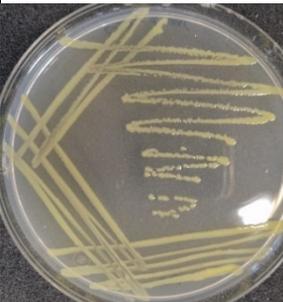
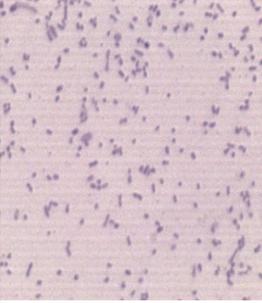
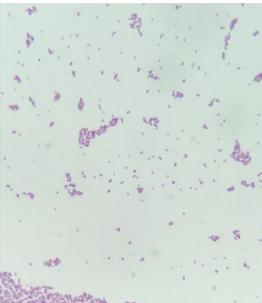
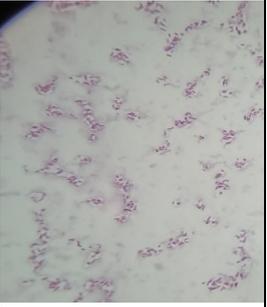
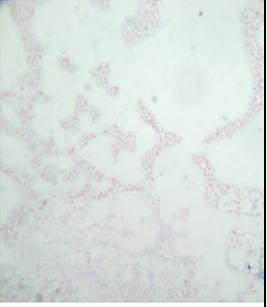
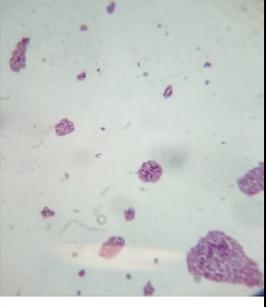
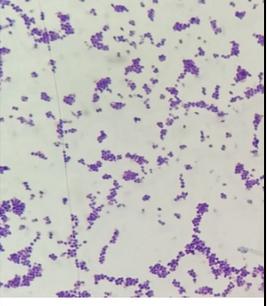
		forma redonda regular (13col.)		
		4.Marrónácea con forma irregular (1col.)		
		5.Amarilla con forma redonda (7col.)		

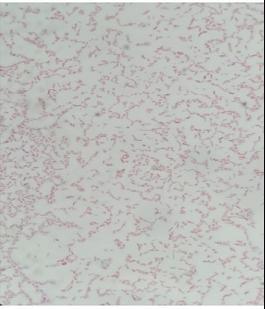
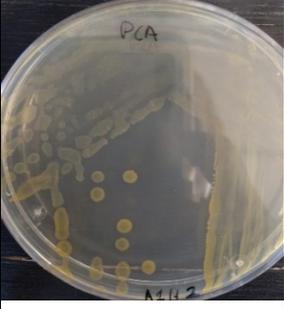
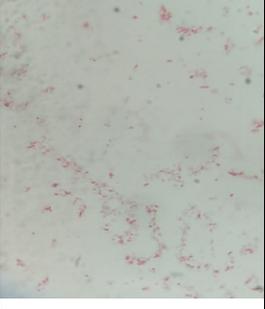
Tabla 2. Representación de los 21 morfotipos aislados, el número de placas en el que se encontraron, forma, agrupación, tinción de Gram, foto de la placa y foto al microscopio óptico (x100).

Morfo-tipo	N.º Placas	Forma	Agrupación	Gram	Imagen placa	Imagen microscopio x100
1	3	Bacilos	Individual/ Cadenas	Positivo		
2	1	Cocos grandes	Diplococos /Tétradas /Racimos	Positivo		
3	5	Bacilos cortos Con acumulaciones	Individual/ Racimo	Positivo		
4	3	Cocos	Individual /Cadena	Positivo		

5	3	Cocos pequeños	Racimos	Positivo		
6	4	Bacilos	Cadena	Positivo		
7	5	Bacilos con acumulaciones	Individual/Cadena	Positivo		
8	2	Bacilo	Individual/Cadena	Positivo		
9	1	Bacilos Pequeños	Racimos	Positivo		

10	4	Bacilo mucosidad hexagonal y acumulaciones	Pleomorfa	Positivo		
11	1	Cocos	Pares/Racimos	Positivo		
12	2	Cocos	Individual/Pares	Positivo		
13	1	Cocos	Individual/Pares	Positivo		

14	3	Bacilos con acumulaciones	-	Positivo		
15	2	Bacilos Pequeños	-	Negativo		
16	2	Pleomorfo	-	Positivo		
17	2	Cocos	Racimo	Positivo		

18	1	Bacilos	Individuales / Cadena largas	Negativo		
19	2	Bacilos	Individual/ Cadenas	Positivo		
20	1	Bacilos Pequeños	Pares/Cadena/Racimo	Negativo		
21	1	Pleomorfo	Racimo	Positivo		