



PRIMER INFORME DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE *Senecio glaucus* L., EGIPTO

FIRST REPORT OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM *Senecio glaucus* L., EGYPT

Mohammed Sabry Sultan*, Ashraf Elsayed, y Yasser Ahmed El-Amier

Botany Department, Faculty of Science, Mansoura University, Mansoura, 35516, Egypt.

*Autor para correspondencia: mohammedsoltan915@gmail.com

Manuscrito recibido el 15 de febrero de 2022. Aceptado, tras revisión, el 28 de junio de 2022. Publicado el 1 de septiembre de 2023.

Resumen

Los microorganismos están naturalmente asociados con las plantas. El presente experimento se llevó a cabo para aislar bacterias endófitas de las células internas de raíces, tallos, hojas y Tejido capitular de *Senecio glaucus* recolectadas en 2 hábitats diversos (costeros y desérticos) de Egipto. Del aislamiento se obtuvieron un total de 10 bacterias endófitas; la mayor diversidad de endófitos bacterianos se observó en raíces y hojas de muestras del desierto. Los aislamientos se reconocieron con base en la morfología, la bioquímica y los genes de la secuencia del ARNr 16S. Todos estos aislados indican la capacidad de producir enzimas como amilasa, celulasa, lipasa, catalasa y proteasa en sus descripciones bioquímicas; los análisis también mostraron una indicación significativa de su potencial para producir hormonas de crecimiento vegetal; como su capacidad para disolver el fosfato. En el mundo y en Egipto, somos los primeros en reportar endófitos bacterianos aislados de *Senecio glaucus*. Este estudio podría ayudar a determinar el papel de las bacterias endófitas en hábitats severos, así como sus posibles aplicaciones en medicina, biorremediación, agricultura e industria.

Palabras clave: Endófitos bacterianos, Bioquímica, 16S rRNA, *Senecio*, *Asteraceae*.

Abstract

Microorganisms are naturally associated with plants in several ways. The study was conducted to isolate bacteria endophytes from the internal cells of roots, stems, leaves, and capitula of *Senecio glaucus* collected from 2 diverse (coastal and desert) habitats in Egypt. A total of 10 endophytic bacteria were obtained from the isolation; the highest diversity of bacterial endophytes was observed in desert samples roots and leaves. The isolates were recognized based on morphology, biochemical and 16S rRNA sequence genes. All isolates indicated the ability for enzyme production as

amylase, cellulase, lipase, catalase, and protease in their biochemical descriptions; analyses also gave a significant indication of their potential to produce plant growth hormones, as their ability to dissolve Phosphate. In the world and Egypt, we are the first to report bacterial endophytes isolated from *Senecio glaucus*. This study could aid in determining the role of endophytic bacteria in severe habitats, as well as their potential applications in medicine, bioremediation, agriculture, and industry.

Keywords: Bacterial endophytes, Biochemical, 16S rRNA, *Senecio*, *Asteraceae*.

Forma sugerida de citar: Sabry Sultan, M., Elsayed, A. y Ahmed El-Amier, Y. (2023). Primer informe de bacterias endofíticas aisladas de *Senecio glaucus* L., Egipto. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 38(2):82-95. <http://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.06>.

IDs Orcid:

Mohammed Sabry Sultan: <http://orcid.org/0000-0001-7030-7866>

Ashraf Elsayed: <http://orcid.org/0000-0003-2122-767X>

Yasser Ahmed El-Amier: <http://orcid.org/0000-0001-8920-8278>

1 Introducción

La definición de un endófito sigue siendo un tema debatible hoy en día. Se dice que las bacterias que se aíslan de los tejidos internos de la planta y que no causan ningún daño a su huésped se clasifican como endófitas. Otras descripciones indican que la ocupación bacteriana ocurre en los tejidos internos de la planta. El altruismo, el comensalismo, la simbiosis o la pasividad a la patogenicidad se han utilizado para describir esta interacción endófito única del huésped; por lo tanto, en las relaciones específicas involucradas, la colonización interna de las plantas por bacterias constituye un nicho ecológico vasto y, sin embargo, poco investigado (Kobayashi y Palumbo, 2000; Hallmann y col., 1997). La diversidad bacteriana que se ha descrito como endófitos abarca una variedad de importantes bacterias Gram negativas y Gram positivas que contienen géneros de alfa, beta y gamma-proteobacterias, bacteroides, actinobacterias y firmicutes (Bacon e Hinton, 2007; Lodewyckx y col., 2002).

Casi 1250 especies de *Senecio* están ampliamente distribuidas y comprenden unas 6 especies que se encuentran en Egipto, entre ellas *S. glaucus*, *S. flavus*, *S. aegyptius*, *S. Vulgaris*, *S. hoggariensis* y *S. belbeysius*. Este género es importante por sus propiedades farmacológicas, botánicas y toxicológicas (Singh, Satish y Manisha, 2017; Nori-Shargh, Raftari y Deyhimi, 2008). Un estudio sobre el examen fitoquímico de los extractos de *Senecio* reveló propiedades antioxidantes, antimicrobianas, citotóxicas (Tundis y col., 2009), antiinflamatorias, insecticidas y antivirales (Sultan, Elsayed y El-Amir, 2022; El-Amier, Abdelghany y Abed Zaid, 2014; Joshi, Sah y Mishra, 2013; Kahrman y col., 2011).

Las especies de *Senecio* que habitan en las llanuras arenosas y en las cuevas del desierto se utilizan como sedante del sistema nervioso central, diurético y emético en Egipto (Eissa y col., 2014). *Senecio glaucus* L. (Morrar) es una hierba anual que crece en Egipto y tiene dos subespecies *S. glaucus* subsp. *coronopifloius* (Maire) C. Alexander. Subsp. *coronopifloius* y *S. glaucus* L. subsp. *glaucus* que crecen en áreas desérticas, suelos salinos, arenas costeras y bordes de cultivo y en Egipto el más común es subsp. *glaucus* Boullos2002. Los endófitos pueden beneficiar a las plantas indirectamente al mejorar las infecciones del herbívoro o la resistencia al estrés, o

por otros procesos que aún no se conocen (Schulz y Boyle, 2005). En varios estudios se ha encontrado que los endófitos pueden proteger a sus huéspedes de la sequía (Clay y Schardl, 2002).

Según Waller y col. (2005), las plantas infectadas con endófitos mostraron tolerancia a la sal y a la temperatura. Los endófitos actúan como desencadenantes biológicos para estimular la respuesta al estrés de forma más rápida que las plantas no simbióticas, promoviendo el crecimiento de las plantas y protegiéndolas para reducir enfermedades de insectos y plagas, según Redman y col. (2002).

Las bacterias endófitas pueden solubilizar el fosfato y proporcionar nitrógeno asimilable a las plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Además, las interacciones entre plantas y bacterias endófitas pueden ayudar en los procesos de restauración de ecosistemas, protegiendo a las plantas del estrés biótico y abiótico y promoviendo la producción de metabolitos secundarios importantes (Mowafy y col., 2021; Cheng y col., 2019; Müller y col., 2015; Alavi y col., 2013).

El trasfondo genético de las especies de hospederos vegetales, la idoneidad, los nutrientes y los nichos ecológicos (Jia y col., 2016), las circunstancias ambientales, los genotipos de los hospederos, las especies bacterianas (Chebotar y col., 2015), y la etapa de desarrollo del hospedero y la densidad del inóculo (Dudeja y Giri, 2014), tienen un impacto significativo en la población de bacterias endófitas.

Se descubrieron algunas bacterias resistentes al frío en las raíces y las hojas de *Senecio vulgaris* y se definieron como unidades taxonómicas operativas bacterianas básicas y se informó de que tenían un fuerte efecto antibacteriano aparente y la capacidad de sobrevivir en ambientes extremadamente bajos, secos y contaminados con rayos UV (Gaspard y Rice, 1989; Koo y col., 2016; Vishnivetskaya, Kathariou y Tiedje, 2009).

Los endófitos son ventajosos para *S. vulgaris* (Cheng y col., 2019; Singh y col., 2016), y su aplicación al arroz resultó en una reducción de la acumulación de arsénico y la generación de IAA, lo que ayuda en la promoción del crecimiento; la resistencia a metales pesados, particularmente la tolerancia al cadmio; la capacidad de fijación de nitrógeno

(Purchase, Miles y Young, 1997); y la promoción del crecimiento de plantas de maíz y lechuga (Gamel y col., 2017; Chabot, Antoun y Cescas, 1996).

Debido a su larga historia de uso en la medicina tradicional y la selección en una variedad de hábitats climáticos, edáficos y bióticos en lugares geográficamente diferentes, *S. glaucus* presenta una gran diversidad. Se informó de que existen entre 10^2 y 10^4 poblaciones de bacterias endofíticas por gramo de tejido vegetal (Kobayashi y Palumbo, 2000). Este estudio tiene como objetivo evaluar la variedad de comunidades de endofitos bacterianos aislados de *S. glaucus* en dos hábitats diferentes en Egipto: Ciudad Gamasa (costa mediterránea) y Wadi Araba (desierto oriental).

2 Materiales y Métodos

2.1 Recolección del material vegetal

Se tomaron al azar plantas enteras sanas de *S. glaucus* en las fases de floración de dos localidades separadas: Wadi Araba (Desierto Oriental, $29^{\circ}4'23.72''N$ $32^{\circ}25'38.49''E$) y Ciudad Gamesa (costa mediterránea, $31^{\circ}26'58.78''N$ $31^{\circ}28'36.14''E$) para el aislamiento de endofitos bacterianos. Las muestras se envasaron en bolsas de plástico limpias y se transportaron al Laboratorio de Microbiología para su posterior análisis, como se muestra en la Figura 1.

2.2 Aislamiento y purificación de los endofitos

El aislamiento y purificación de los endofitos se realizó de acuerdo con el procedimiento de Bacon e Hinton (2002) utilizando medio de agar LB (1,25 g de extracto de levadura; 2,5 g de peptona; 2,5 g de cloruro de sodio; 3,75 g de agar y 250 ml de agua destilada). Las muestras de plantas se lavaron primero bajo el agua del grifo y luego se separaron en 4 partes, que incluyen raíz, tallo, hoja y cápsula, y luego se esterilizaron en la superficie (Geris dos Santos y col., 2003).

La esterilización superficial se logró enjuagando las partes de la planta con etanol (C_2H_5OH) al 70 % durante 30 segundos, luego hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5 % durante 2-3 minutos y finalmente agua destilada estéril ($Dil.H_2O$) durante 10 minutos (2-3 veces). Después de esto, se secaron los pliegues del material vegetal usando papeles filtrantes estériles.

Con un bisturí esterilizado en llama se retiraron los extremos cortados de los segmentos esterilizados en la superficie y se colocaron en medios de agar LB apropiados, con la superficie cortada tocando el agar. Las máximas colonias posibles de endofitos bacterianos se determinaron mediante la incubación de placas a $35^{\circ}C$ durante 48 horas.



Figura 1. a) Vistas generales de *S. glaucus*, y b) Vistas en primer plano de *S. glaucus* en el área de estudio.

2.3 Caracterización de bacterias endófitas

2.3.1 Caracterización morfológica

Aneja y col. (2006) y Cappuccino y Sherman (1992) utilizaron el procedimiento de tinción de gram estándar para determinar la forma celular, el color de la colonia y la textura y para definir los aislamientos y establecer la morfología de las células bacterianas.

2.3.2 Caracterización bioquímica

Las cepas bacterianas endófitas seleccionadas se caracterizaron bioquímicamente mediante métodos estándar como la prueba de amilasa, la prueba de catalasa, la prueba de lipasa, la prueba de celulasa, la prueba de proteasa, la prueba de nitrato reductasa y la prueba de indol; y se caracterizaron mediante métodos estándar como la prueba de solubilización de fosfato, la prueba de producción de indol, la prueba de producción de ácidos de giberelina y la prueba de producción de sulfuro de hidrógeno (Cappuccino y Sherman, 1992).

2.3.3 Secuenciación del gen 16S rRNA

Las bacterias aisladas se identificaron molecularmente utilizando la metodología MicroSeq® 500 16SrRNA Bacterial Identification Kits. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en los termocicladores 9700 con un volumen total de 20 l (producto de PCR purificado de 7 l y módulo de secuenciación de 13 l) ajustando el termociclador a

96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 4 segundos (25 ciclos). El kit de centrifugado Dye Ex™ 2.0 se utilizó para eliminar el exceso de terminadores de colorantes y cebadores de la reacción de secuenciación del ciclo (Qiagen PN 63204). Para el análisis de las secuencias se utilizó el software Finch TV (versión 1.4.0) y MEGA-X (versión 10.2.5), y el software Seaview para la creación de árboles filogenéticos utilizando las secuencias de los tipos de cepas publicadas más recientemente. Las secuencias de los aislamientos obtenidas en esta investigación fueron sometidas a la base de datos GeneBank del NCBI.

2.4 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por triplicado, calculándose la desviación media estándar (DMS).

3 Resultados

En este estudio se aislaron 10 bacterias endófitas de diferentes partes de la planta de *Senecio glaucus* recolectadas en 2 sitios diferentes (4 aislamientos de la planta costera mediterránea y 6 aislamientos de la planta del desierto) en medio L.B agar bajo condiciones asépticas y de acuerdo con la diferencia morfológicas mostrada en las figuras 2 y 3, y con los códigos (SGC-R, SGC-S, SGC-L, SGC-C) para las muestras costeras y (SGD-R, SGD-S, SGD-L, SGD-C) para las muestras del desierto.

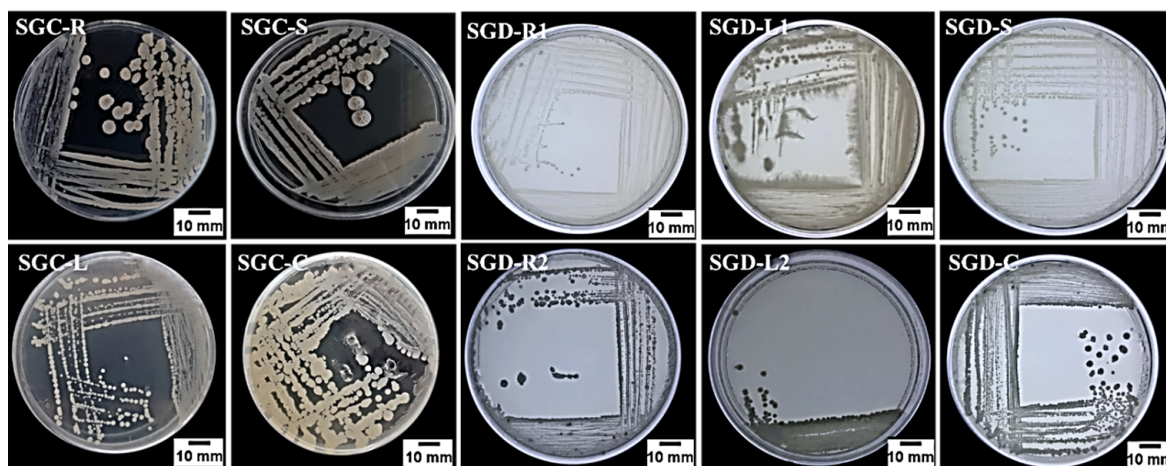


Figura 2. Endófitos bacterianos aislados de *S. glaucus* SGC-R: *Senecio glaucus* costera, SGC-S: -tallo, SGC-L: -Hoja y SGC-C: -Capitula; SGD-R: *S. glaucus* del desierto, SGD-S: -tallo, SGD-L: -Hoja y SGD-C: - Tejido capitular.

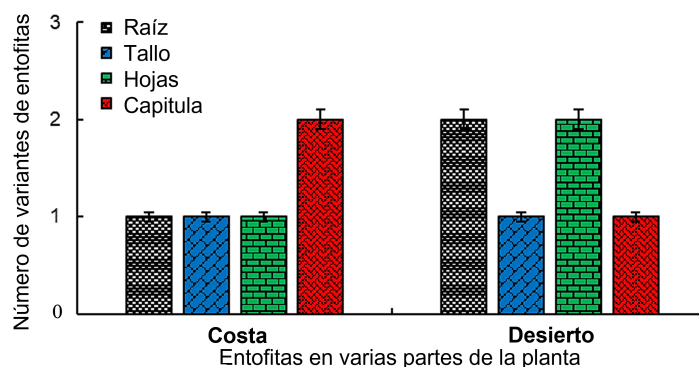


Figura 3. Número de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de la planta medicinal *S. glaucus* recolectadas en hábitats costeros y desérticos.

Los aislamientos bacterianos se caracterizaron morfológicamente de acuerdo con la forma de la colonia, margen, elevación, textura y pigmentación como se muestra en la Tabla 1, y se analizaron microscópicamente de acuerdo con la forma de la célula, donde cabe mencionar que todos los aislamientos tuvieron una forma de varilla y coloración de Gram. La muestra costera mostró 3 cepas Gram positivas y 1 cepa Gram negativas; por otra parte, la muestra del desierto mostró 3 cepas Gram positivas y 3 cepas Gram negativas (Tabla 2).

Tabla 1. Características morfológicas de colonias de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de la planta medicinal *S. glaucus* recolectadas en hábitats costeros y desérticos en Egipto.

Aislados	Origen del tejido	Caracterización de las colonias					
		Tamaño (mm)	Forma de la colonia	Margen	Elevación	Textura	Pigmentación
Muestra costera							
SGC-R	Raíz	3,5	Irregular	Enrollado	Umbonato	Seco/Áspero	Blanquecino
SGC-S	Tallo	3,7	Irregular	Enrollado	Umbonato	Seco/Áspero	Blanquecino
SGC-L	Hoja	1,5	Irregular	Lobato	Elevado	Seco/Áspero	Blanquecino
SGC-C	Tejido capitular	2,5	Irregular	Enrollado	Umbonato	Seco/Áspero	Blanquecino
Muestra del desierto							
SGD-R1	Raíz	1,2	Circular	Entero	Elevado	Cre moso	Blanco amarillento
SGD-R2		1,4	Irregular	Lobato	Elevado	Seco/Áspero	Blanquecino
SGD	Tallo	1,9	Circular	Entero	Elevado	Cre moso	Blanco amarillento
SGD-L1	Hoja	1,3	Irregular	Filamentoso	Plano	Cre ma Brillante	Amarillo Pálido
SGD-L2		2,1	Circular	Entero	Convexo	Seco/Áspero	Tiza blanca
SGD-C	Tejido capitular	2,5	Irregular	Enrollado	Umbonato	Seco/Áspero	Blanquecino

SGC-R: Raíz costera de *Senecio glaucus*, SGC-S: Tallo costero de *S. glaucus*, SGC-L: Hoja costera de *S. glaucus*, y SGC-C: Capitula costera de *S. glaucus*; SGD-R: Raíz desértica de *S. glaucus*, SGD-S: Tallo desértico de *S. glaucus*, SGD-L: Hoja desértica de *S. glaucus* y SGD-C: Tejido capitular desértico de *S. glaucus*.

Tabla 2. Características morfológicas de células de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de la planta medicinal *S. glaucus* recolectadas en hábitats costeros y desérticos en Egipto.

Aislados	Origen del tejido	Características celulares			
		Tinción de Gram	Forma de la célula	Tamaño (μm)	Motilidad
Muestra costera					
SGC-R	Raíz	Gram positivo	Varilla	2,5	Móvil
SGC-S	Tallo	Gram positivo	Varilla	2,5	Móvil
SGC-L	Hoja	Gram negativo	Varilla	1,2	Móvil
SGC-C	Tejido capitular	Gram positivo	Varilla	2,7	Móvil
Muestra del desierto					
SGD-R1	Raíz	Gram negativo	Varilla	1,6	Móvil
SGD-R2		Gram negativo	Varilla	1,3	Móvil
SGD	Tallo	Gram negativo	Varilla	1,7	Móvil
SGD-L1	Hoja	Gram positivo	Varilla	1,9	Móvil
SGD-L2		Gram positivo	Varilla	2,3	Móvil
SGD-C	Tejido capitular	Gram positivo	Varilla	1,8	Móvil

SGC-R: Raíz costera de *Senecio glaucus*, SGC-S: Tallo costero de *S. glaucus*, SGC-L: Hoja costera de *S. glaucus*, y SGC-C: Capítula costera de *S. glaucus*; SGD-R: Raíz desértica de *S. glaucus*, SGD-S: Tallo desértico de *S. glaucus*, SGD-L: Hoja desértica de *S. glaucus* y SGD-C: Tejido capitular desértico de *S. glaucus*.

Los aislamientos purificados se caracterizaron bioquímicamente de acuerdo con la actividad enzimática y las propiedades funcionales. Los aislados mostraron una capacidad variada para producir una variedad de enzimas (Tablas 3 y 4).

Tanto los aislamientos bacterianos costeros como los desérticos fueron capaces de producir indol en concentraciones variables que oscilaban entre altas y bajas en comparación con la muestra control.

Los aislados SGC-L y SGC-C presentaron resultados muy débiles, mientras que los aislados SGD-L2 y SGD-C no mostraron resultados positivos co-

mo se muestra en la Tabla 4.

Basándose en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, las cepas aisladas se identificaron como *Bacillus velezensis* cepa CBMB205 (NR_116240.1), *Bacillus velezensis* cepa CBMB205 (NR_116240.1), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa WS3-1 (MT579842.1), cepa ATCC3 048 (NR_118556.1), *Enterobacter bugandensis* cepa 247BMC (NR_148649.1), *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* cepa 10-17 (NR_126208.1), *Sphingobacterium faecium* cepa DSM11690 (NR_025537.1), y *Kitaspora aburaviensis* cepa NBRC12830 (NR_112295.1); todas las cepas se correlacionaron en la distancia genética como se muestra en la Tabla 5 y Figura 4.

Tabla 3. Análisis cualitativo de la caracterización bioquímica de las bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de la planta medicinal *S. glaucus* recolectadas de diferentes hábitats en Egipto.

Aislados	Órgano tisular	Caracterización Bioquímica					
		Catalasa	Amilasa	Celulasa	Proteasa	Lipasa	H ₂ S
Costero							
SGC-R	Raíz	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
SGC-S	Tallo	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
SGC-L	Hoja	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
SGC-C	Tejido capitular	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
Desierto							
SGD-R1	Raíz	+ve	+ve	+ve	-ve	+ve	-ve
SGD-R2		+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
SGD	Tallo	+ve	+ve	+ve	-ve	+ve	-ve
SGD-L1	Hoja	+ve	+ve	+ve	-ve	+ve	-ve
SGD-L2		+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve
SGD-C	Tejido capitular	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve

+ve: reacción positiva; -ve: reacción negativa.

Tabla 4. Análisis cualitativo de parámetros promotores del crecimiento vegetal (PGP) de endófitos bacterianos aislados de la planta medicinal *S. glaucus*.

Aislados	Órgano tisular	Fomento del crecimiento vegetal			
		Solubilización de fosfato	Nitrato reductasa	IAA	GA3
Costero					
SGC-R	Raíz	+ve	+ve	+ve	+ve
SGC-S	Tallo	+ve	+ve	+ve	+ve
SGC-L	Hoja	+ve	+ve	+ve	+ve
SGC-C	Tejido capitular	+ve	+ve	+ve	+ve
Desierto					
SGD-R1	Raíz	+ve	+ve	+ve	+ve
SGD-R2		+ve	+ve	-ve	+ve
SGD	Tallo	+ve	+ve	+ve	+ve
SGD-L1	Hoja	+ve	+ve	+ve	+ve
SGD-L2		+ve	+ve	+ve	+ve
SGD-C	Tejido capitular	+ve	+ve	-ve	+ve

+ve: reacción positiva; -ve: reacción negativa.

4 Discusión

Desde hace mucho tiempo se sabe que hay endófitos bacterianos en la mayoría de los tejidos sanos de las plantas (McInroy y Kloeppe, 1995; Sturz, 1995; Frommel, Nowak y Lazarovits, 1993). Se han

encontrado bacterias endófitas en todas las especies de plantas estudiadas, según Partida-Martínez y Heil (2011), así como en este estudio. Se ha encontrado que varias especies de plantas tienen diversas comunidades bacterianas endófitas que mostraron una importante diversidad fenotípica y ge-

notípica (Santoyo y col., 2016; Miliute y col., 2015). El estudio de la diversidad poblacional de endófitos bacterianos aislados de la muestra desértica de *S. glaucus* mostró mayor diversidad de especies que la muestra costera (Figura 3). La especie hospedera de la planta, la especificidad del hospedero y los tipos de tejido pueden afectar fuertemente el tipo

de comunidad endófito (Ding y Melcher, 2016). Las variaciones cualitativas y cuantitativas entre especies vegetales en la colonización microbiana se deben principalmente a la compatibilidad genotípica hospedero-endófito y a las condiciones ecológicas (tropical versus templado) (Rajan, 2012).

Tabla 5. Secuencia de referencia del gen ARNr 16S de las cepas en la base de datos GenBank.

Serie	Órgano tisular	Cepa similar	Similitud %	Secuencia NCBI
Muestra costera				
SGC-R	Raíz	<i>Bacillus velezensis</i> cepa CBMB205 (NR_116240.1)	96,08 %	MZ520618,1
SGC-S	Tallo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa WS3-1 (MT579842.1)	99,80 %	OK148122,1
SGC-L	Hoja	<i>Klebsiella aerogenes</i> , cepa ATCC13048 (NR_118556.1)	94,31 %	MZ520791,1
SGC-C	Tejido capitular	<i>Bacillus velezensis</i> cepa CBMB205 (NR_116240.1)	99,80 %	MZ520618,1
Muestra del desierto				
SGD-R1	Raíz	<i>Enterobacter bugandensis</i> cepa 247BMC (NR_148649.1)	99,91 %	OK147922,1
SGD-R2		<i>Klebsiella aerogenes</i> , cepa ATCC13048 (NR_118556.1)	94,31 %	OK057209.1
SGD	Tallo	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> cepa 10-17 (NR_126208.1)	94,03 %	OK044126,1
SGD-L1	Hoja	<i>Sphingobacterium faecium</i> cepa DSM11690 (NR_025537.1)	87,64 %	OK156473,1
SGD-L2		<i>Kitasatospora aburaviensis</i> cepa NBRC12830 (NR_112295.1)	100 %	MZ477009.1
SGD-C	Tejido capitular	<i>Bacillus velezensis</i> cepa CBMB205 (NR_116240.1)	98,06 %	OK147924,1

Las cepas se aislaron de las raíces, tallos, hojas y tejidos capitulares de *S. glaucus*. La mayor población de endófitos se obtuvo de los tejidos internos de las raíces y hojas de la planta (Figura 3). La morfología de las colonias indicó la variación de los endófitos. Los aislamientos evaluados fueron elegidos por su variación morfológica y dominancia (Tabla 1). Una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas están involucradas en las bacterias endófitas (Lodewyckx y col., 2002). Curiosamente, los Gram positivos fueron la población más distribuida en la muestra costera que los Gram negativos aislados de *S. glaucus*. Por otra parte, la población Gram negativa fue igual a la de los aislados Gram positivos de la muestra del desierto

(Tabla 2), como se informó en varias plantas; se identificó una presencia igual de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Zinniel y col., 2002). Existe un predominio de bacterias gramnegativas en los tejidos de diversas plantas (Elbeltagy y col., 2000; Stoltzfus y col., 1997). Estas especies bacterianas podrían haber coevolucionado con la planta para adaptarse a un hábitat árido específico que es pobre en nutrientes. Como respuesta a las condiciones ambientales como pH, temperatura y salinidad, las bacterias Grampositivas de las cepas aisladas forman esporas, lo que puede proporcionar una ventaja de supervivencia.

Toda la morfología de las células aisladas mostró ser bacilos/varilla (Tabla 2). Según Jacobs, Bugbee y Gabrielson (1985), *Erwinia* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* sp. fueron los géneros bacterianos aislados más comunes de bacterias endofíticas en varias plantas como tomate, algodón, soja, arroz y maíz (Chaturvedi, Singh y Gupta, 2016; Hallmann y col., 1997).

Anteriormente se han aislado bacterias endofíticas de tejidos de especies de *Senecio*. Cheng y col. (2019) y Singh y col. (2016) aislaron los endofitos *Brevundimonas diminuta* y *Rhizobium leguminosarum* de *S. vulgaris*; *Sphingomonas aerolata*, *Sphingomonas faeni*, *Exiguobacterium sibiricum* y *Oxalobacteraceae* (OTU3) y se caracterizaron en hojas y raíces de *S. vulgaris* (Gaspard y Rice, 1989; Koo y col., 2016;

Vishnivetskaya, Kathariou y Tiedje, 2009).

En este estudio, los aislamientos obtenidos se caracterizaron bioquímicamente de acuerdo con la actividad enzimática y las propiedades funcionales (Tabla 3). Los aislados mostraron una variada capacidad para producir una variedad de enzimas tales como enzimas catalasas, enzimas amilolíticas, celolíticas, proteolíticas y lipolíticas. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sobre la secreción de estas enzimas por los endofitos (Elbeltagy y col., 2000; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Las bacterias endofíticas pueden actuar como factores de virulencia para bacterias fitopatógenas debido a las celulasas y las enzimas hidrolíticas pueden desempeñar un papel en los mecanismos que entran y persisten en la planta huésped, como se informó para *Enterobacter asburiae* JM22 *Quadt-Hallmann*1997 y *Azoarcus* sp. (Hurek y col., 1994).

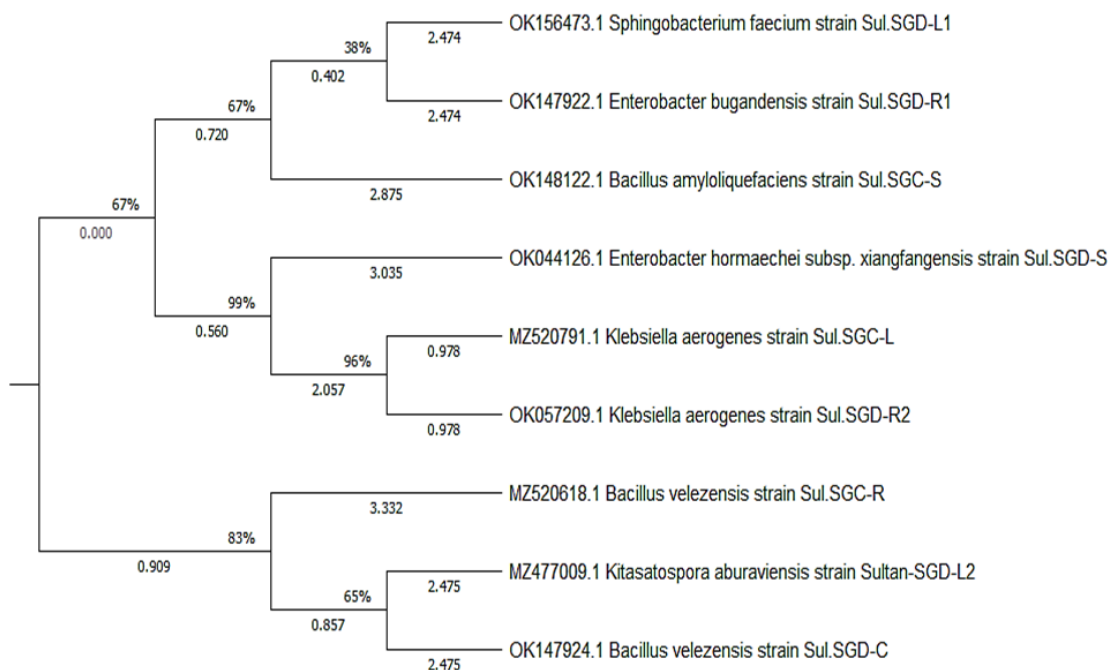


Figura 4. El árbol filogenético se creó de las secuencias del gen 16S rRNA de las 10 cepas bacterianas endofíticas.

Las bacterias endofíticas aisladas del *S. glaucus* costero indicaron la mayor producción de las enzimas estudiadas en comparación a los aislados del desierto, a pesar de la alta diversidad en la muestra de *S. glaucus* del desierto (Figuras 4 y 5). Todos los

aislamientos secretaron amilasas, celulasas, proteasa y lipasa, excepto *Enterobacter hormaechei* subsp. *Xiangfangensis* y *Sphingobacterium faecium* que no pudieron producir enzimas proteasas (Tabla 3). La actividad celulósica de estos endofitos puede ser

una ventaja para la entrada intercelular y la propagación de los endófitos en la planta huésped, ya que la pared celular de la planta huésped contiene celulosa (Hallmann y col., 1997). Las hidrolasas, enzimas extracelulares producidas por bacterias endófitas ayudan en el establecimiento de resistencia sistémica para la invasión de patógenos en plantas (Singh y col., 2017; Elbeltagy y col., 2000).

Además, todos los aislamientos se caracterizaron bioquímicamente de acuerdo con sus propiedades funcionales (Tabla 4). Los aislados mostraron una variada capacidad para producir una variación de fitohormonas que pueden ayudar a las plantas y pueden ser utilizadas como PGPB ácido indolacético, y ácidos giberélicos, ya que también indicaron su capacidad para solubilizar fosfato y nitrato reductasa. Por otro lado, todos los aislamientos presentaron un resultado negativo para la producción de sulfuro de hidrógeno, así mismo, las cepas SGD-R2 y SGD-C aisladas de la muestra desértica fueron negativas para IAA.

Se aislaron 10 cepas con diversas morfologías de colonias y se analizaron sus secuencias del gen 16S rRNA para establecer relaciones taxonómicas (Tabla 5 y Figura 6). No se encontraron bacterias *B. japonicum* en los aislamientos de *S. glaucus* esterilizados en superficie, y la mayoría de ellos fueron morfológicamente únicos. De acuerdo con el análisis filogenético, se demostró que los aislados pertenecían a cuatro filos extremadamente diferentes ya conocidos por estar asociados a plantas: bacterioidetes, proteobacterias, actinobacterias y firmicutes (Reinhold-Hurek y col., 2015). Basándose en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, las cepas aisladas se identificaron como *Bacillus velezensis* cepa CBMB205 y *Bacillus amyloliquefaciens* cepa WS3-1 (Clase: Bacilli), *Enterobacter bugandensis* cepa 247BMC y *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* cepa 10-17 (Clase: Gamma Proteobacteria), *Sphingobacterium faecium* cepa DSM 11690 (Clase: Flavobacteria), *Klebsiella aerogenes* cepa ATCC 13048 (Clase: Gamma Proteobacteria) y *Kitasatospora aburaviensis* cepa NBRC 12830 (*Streptomyces aburaviensis*) (Clase: Actinomycetos). El análisis de la secuencia reveló que los aislados pueden contener especies bacterianas previamente desconocidas: las cepas de dos filotipos mostraron una identidad inferior al 98,7% en los genes de ARNr 16S previamente notificados de especies conocidas. Es probable que

representen al menos especies únicas, dado que este valor ha sido propuesto recientemente como un “patrón de oro” para distinguir las especies (Stackebrandt, 2006). Todas las cepas se correlacionaron con una distancia genética. El dendrograma filogenético ilustró que la correlación entre seis aislamientos se realizó mediante el programa MEGA-X como se muestra en la Figura 4.

5 Conclusiones

En conclusión, este estudio confirmó la diversidad y ocurrencia de endófitos bacterianos en diferentes partes de *Senecio glaucus* (Morrar) recolectados en diferentes hábitats en Egipto. Estas bacterias podrían ser candidatos prometedores para futuras aplicaciones. El aislamiento de las cepas de *Bacillus* abre posibilidades biotecnológicas para la producción de *S. glaucus* y la aplicación prospectiva de especies presuntamente únicas. A través de las descripciones bioquímicas de estos aislamientos se muestra su capacidad para producir algunas enzimas descomponedoras como celulasa, amilasa, proteasa, catalasa y lipasa. Por otro lado, los análisis descriptivos mostraron una fuerte indicación de su capacidad para producir algunas hormonas de crecimiento de las plantas que pueden aumentar el crecimiento y proteger a las plantas, como su capacidad para producir reductasas de nitrato, solubilización de fosfato, indol y giberelinas. El hecho de que estas plantas fueran colonizadas con éxito por cada microbio sugiere que podrían ser utilizadas en muchas aplicaciones, como biofertilizantes, biorremediación y control biológico.

Referencias

- Alavi, P. y col. (2013). «Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T». En: *Frontiers in Plant Science* 4, 141. Online: <https://bit.ly/3lobBfA>.
- Aneja, M. y col. (2006). «Microbial colonization of beech and spruce litter—influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community». En: *Microbial Ecology* 52, 127-135. Online: <https://bit.ly/3YqGLBz>.

- Bacon, C. y D. Hinton (2002). «Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species». En: *Biological Control* 23.3, 274-284. Online: <https://bit.ly/3YLUaEh>.
- (2007). «Plant-associated bacteria». En: Springer Dordrecht. Cap. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility, 155-194. Online: <https://bit.ly/414QjUo>.
- Cappuccino, J. y N. Sherman (1992). *Microbiology: A Laboratory Manual*. 3.^a ed. Benjamin/Cummings Pub, págs. 125-179.
- Chabot, R., H. Antoun y M. Cescas (1996). «Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*». En: *Plant and Soil* 184, 311-321. Online: <https://bit.ly/3UwY9DK>.
- Chaturvedi, H., V. Singh y G. Gupta (2016). «Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors». En: *J Plant Pathol Microbiol* 7.9, 1-6. Online: <https://bit.ly/3UwYrdO>.
- Chebatar, V. y col. (2015). «Endophytic Bacteria in Microbial Drugs that Improve Plant Development (Review)». En: *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* 51.3, 283-289. Online: <https://bit.ly/3YOCojC>.
- Cheng, D. y col. (2019). «Diversity analysis of the rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Senecio vulgaris* L.(Asteraceae) in an invasive range». En: *PeerJ* 6, e6162. Online: <https://bit.ly/3YtFaLy>.
- Clay, K. y C. Schardl (2002). «Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses». En: *The American Naturalist* 160.S4, S99-S127. Online: <https://bit.ly/3I0qbl0>.
- Ding, T. y U. Melcher (2016). «Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants». En: *PloS One* 11.3, e0150895. Online: <https://bit.ly/3K56zyR>.
- Dudeja, S. S. y R. Giri (2014). «Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes». En: *African Journal of Microbiology Research* 8.15, 1562-1572. Online: <https://bit.ly/3IkTZDY>.
- Eissa, T. y col. (2014). «Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt». En: *Journal of Ethnopharmacology* 151.1, 317-332. Online: <https://bit.ly/3jRLWM7>.
- El-Amier, Y., A. Abdelghany y A. Abed Zaid (2014). «Green synthesis and antimicrobial activity of *Senecio glaucus*-Mediated silver nanoparticles». En: *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5.5, 631-642. Online: <https://bit.ly/41oQHwM>.
- Elbeltagy, A. y col. (2000). «Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties». En: *Soil Science and Plant Nutrition* 46.3, 617-629. Online: <https://bit.ly/3K4ua2D>.
- Frommel, M., J. Nowak y G. Lazarovits (1993). «Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere». En: *Plant and Soil* 150, 51-60. Online: <https://bit.ly/3Xs4yzZ>.
- Gamel, R. y col. (2017). «Priming tomato cultivars in β -sitosterol or gibberellic acid improves tolerance for temperature stress.» En: *International Journal of Botany* 13.1, 1-14. Online: <https://bit.ly/3YtKbUo>.
- Gaspard, P. y S. Rice (1989). «Semiclassical quantization of the scattering from a classically chaotic repeller». En: *The Journal of Chemical Physics* 90.4, 2242-2254. Online: <https://bit.ly/3lzH5zG>.
- Geris dos Santos, R. y col. (2003). «Endophytic fungi from *Melia azedarach*». En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 767-770. Online: <https://bit.ly/3Yzmvhy>.
- Hallmann, J. y col. (1997). «Bacterial endophytes in agricultural crops». En: *Canadian Journal of Microbiology* 43.10, 895-914. Online: <https://bit.ly/3K4cPXV>.
- Hurek, T. y col. (1994). «Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses». En: *Journal of Bacteriology* 176.7, 1913-1923. Online: <https://bit.ly/3YkiYU1>.
- Jacobs, M., W. Bugbee y D. Gabrielson (1985). «Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots». En: *Canadian Journal of Botany* 63.7, 1262-1265. Online: <https://bit.ly/3K1lp9B>.
- Jia, M. y col. (2016). «A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review». En: *Frontiers in Microbiology* 7, 906. Online: <https://bit.ly/3jRQYbt>.
- Joshi, N., G. Sah y D. Mishra (2013). «GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Senecio pedunculatus*». En: *IOSR Journal of Ap-*

- plied Chemistry* 6.3, 49-51. Online:https://bit.ly/3od3wf5.
- Kahrman, N. y col. (2011). «Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the flower, leaf, and stem of *Senecio pandurifolius*». En: *Records of Natural Products* 5.2, 82-91. Online:https://bit.ly/3K5rq5h.
- Kobayashi, D. y J. Palumbo (2000). «Microbial Endophytes». En: 1.^a ed. CRC Press. Cap. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, 213-250. Online:https://bit.ly/3GGav6G.
- Koo, H. y col. (2016). «Draft genome sequence of *Janthinobacterium* sp. Ant5-2-1, isolated from proglacial lake Podprudnoye in the Schirmacher Oasis of East Antarctica». En: *Genome Announcements* 4.1, e01600-15. Online:https://bit.ly/3RXVhhL.
- Lodewyckx, C. y col. (2002). «Endophytic bacteria and their potential applications». En: *Critical Reviews in Plant Sciences* 21.6, 583-606. Online:https://bit.ly/3K4h4mj.
- McInroy, J. y J. Klopper (1995). «Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn». En: *Plant and Soil* 173, 337-342. Online:https://bit.ly/3lyTCDt.
- Miliute, I. y col. (2015). «Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review». En: *Zemdirbyste-Agriculture* 102.4, 465-478. Online:https://bit.ly/4157PIa.
- Mowafy, A. y col. (2021). «Endophytic *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* enhance the growth and yield of maize». En: *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science* 71.4, 237-246. Online:https://bit.ly/3xjzZBT.
- Müller, H. y col. (2015). «Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees». En: *Frontiers in Microbiology* 6, 138. Online:https://bit.ly/3XmQPug.
- Nori-Shargh, D., S. Raftari y F. Deyhimi (2008). «Analysis of the essential oil of *Senecio vernalis* Waldst. & Kit. from Iran». En: *Flavour and Fragrance Journal* 23.5, 357-359. Online:https://bit.ly/3HYHHGI.
- Partida-Martínez, L. y M. Heil (2011). «The microbe-free plant: fact or artifact?» En: *Frontiers in Plant Science* 2, 100. Online:https://bit.ly/40Qt54H.
- Purchase, D., R. Miles y T. Young (1997). «Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*». En: *FEMS Microbiology Ecology* 22.1, 85-93. Online:https://bit.ly/3RUKolQ.
- Rajan, A. (2012). «Microbial Endophytes of crop plants and their role in plant growth promotion». Tesis doct. University of Agricultural Sciences, Bangalore. Online:https://bit.ly/3MB2cwU.
- Redman, R. y col. (2002). «Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis». En: *Science* 298.5598, 1581-1581. Online:https://bit.ly/3Yr6bz3.
- Reinhold-Hurek, B. y T. Hurek (1998). «Life in grasses: diazotrophic endophytes». En: *Trends in Microbiology* 6.4, 139-144. Online:https://bit.ly/40NdJot.
- Reinhold-Hurek, B. y col. (2015). «Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity». En: *Annual Review of Phytopathology* 53, 403-424. Online:https://bit.ly/3IBKMHh.
- Rosenblueth, M. y E. Martínez-Romero (2006). «Bacterial endophytes and their interactions with hosts». En: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19.8, 827-837. Online:https://bit.ly/40PZFDM.
- Santoyo, G. y col. (2016). «Plant growth-promoting bacterial endophytes». En: *Microbiological Research* 183, 92-99. Online:https://bit.ly/40Rkj6s.
- Schulz, B. y C. Boyle (2005). «The endophytic continuum». En: *Mycological Research* 109.6, 661-686. Online:https://bit.ly/3K1F899.
- Singh, D., C. Satish y D. Manisha (2017). «Chemical and potential biological perspectives of genus *Senecio* [Asteraceae]». En: *Eur J Pharm Med Res* 4.11, 200-222. Online:https://bit.ly/3K92uK6.
- Singh, M. y col. (2017). «Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds». En: *3 Biotech* 7.315, 1-14. Online:https://bit.ly/3xlzGXm.
- Singh, N. y col. (2016). «*Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L.» En: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 125, 25-34. Online:https://bit.ly/3RY6dfx.
- Stackebrandt, E. (2006). «Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards». En: *Microbiol. Today* 33, 152-155. Online:https://bit.ly/3YyEioT.
- Stoltzfus, J. y col. (1997). «Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen». En: *Plant and soil* 194, 25-36. Online:https://bit.ly/3IvoNIZ.

- Sturz, AV (1995). «The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization». En: *Plant and Soil* 175, 257-263. Online: <https://bit.ly/3YuRBql>.
- Sultan, M., A. Elsayed e Y. El-Amir (2022). «In vitro effect of plant parts extract of *Senecio glaucus* L. On pathogenic bacteria». En: *Biointerface Res. Appl. Chem* 12.3, 3800-3810. Online: <https://bit.ly/3xhZgMM>.
- Tundis, R. y col. (2009). «In vitro cytotoxic effects of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) on human cancer cell lines». En: *Natural Product Research* 23.18, 1707-1718. Online: <https://bit.ly/3E3zzDv>.
- Vishnivetskaya, T., S. Kathariou y J. Tiedje (2009). «The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography». En: *Extremophiles* 13, 541-555. Online: <https://bit.ly/3I1q1Kg>.
- Waller, F. y col. (2005). «The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.38, 13386-13391. Online: <https://bit.ly/3YJbny8>.
- Zinniel, D. y col. (2002). «Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants». En: *Applied and Environmental Microbiology* 68.5, 2198-2208. Online: <https://bit.ly/3xh95L0>.