

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS PRESENTES EN LA ESPECIE *Witheringia
coccoloboides* (SOLANACEAE) DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE PEREIRA

DIANA CAROLINA LONDOÑO MUÑOZ
LUIS FELIPE QUINTERO JIMÉNEZ

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGIA QUÍMICA
PEREIRA
2015

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS PRESENTES EN LA ESPECIE *Witheringia
coccoloboides* (SOLANACEAE) DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE PEREIRA

DIANA CAROLINA LONDOÑO MUÑOZ
LUIS FELIPE QUINTERO JIMÉNEZ

Trabajo de grado para optar al título de Tecnólogo en Química

DIRECTOR

OSCAR MARINO MOSQUERA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2015

NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS PRESENTES EN LA ESPECIE *Witheringia
coccoloboides* (SOLANACEAE) DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

Presentado por:

**DIANA CAROLINA LONDOÑO MUÑOZ
LUIS FELIPE QUINTERO JIMÉNEZ**

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

OSCAR MARINO MOSQUERA MARTINEZ

Jurado:

Firma

Jurado:

Firma

“Dicen que la historia se escribe de atrás hacia adelante y hay que jalar una hebra de la red del tejido de la vida para comenzar a contar cualquier historia y de esta forma las cosas se van desenredando y, se va contando toda nuestra historia.”

Margaret Atwood

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que con su ayuda contribuyeron a la realización de este proyecto:

A Dios por haberme permitido llegar a esta importante etapa de mi vida.

A mis padres por darme la estabilidad emocional, y económica para poder alcanzar este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes; por enseñarme que todo esfuerzo es al final recompensa. Seréis siempre inspiración para alcanzar mis metas.

Al resto de mi familia, a mi hermano por su apoyo, y por alegrarme en momentos de dificultad, a mis tías y prima por su ayuda y comprensión; y por hacerme llegar de todas maneras su afecto.

A mi director Oscar Marino Mosquera por su confianza, dedicación, esfuerzo y acertada dirección en la realización de este proyecto, al personal del laboratorio de Biotecnología-Productos Naturales por su colaboración y a Dorian Ruiz.

Al profesor Jaime Niño Osorio, por haber confiado en nosotros desde un principio y habernos guiado en momentos de dificultad; también a nuestra evaluadora Liliana Bueno por sus comentarios y consejos, que desde un comienzo permitieron encaminar este trabajo.

A mis compañeros que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, especialmente a Lina María Garzón; mi mejor amiga, por su gran apoyo durante estos años.

Por último, quiero agradecer especialmente a mi compañero Luis Felipe Quintero Jiménez, por su paciencia y apoyo, su trabajo y entrega en la realización de este proyecto y a su amistad incondicional.

A todos ustedes les manifiesto mi eterno agradecimiento.

Diana Carolina Londoño Muñoz

AGRADECIMIENTOS

“¿Por qué sonreímos? ¿Por qué lloramos? ¿Por qué nos sentimos solos? ¿Por qué amamos?”

Pocas son las palabras que existen para expresar lo que siento, es como si llevases siglos de experiencia en la espalda, generaciones, y todo el tiempo lo hubieras pasado preparándote para que este preciso instante tenga lugar... y tú estás dándote cuenta justo en éste instante, estás llegando al lugar que te corresponde.

Quiero agradecer a Dios; porque creo que existe un ser creador de todas las cosas, por regalarme tantos instantes maravillosos en mi vida. Me he acostumbrado a lo que soy y a la manera en que funciona mi vida. Nunca me he sentido listo ni preparado para marcharme; pero estoy feliz por culminar una etapa en mi vida, y sé que mañana al abrir mis ojos, empezaré a caminar un nuevo trayecto e iré afrontando la vida real. Pero quisiera cerrar mis ojos y quedarme con todas mis fuerzas, y sentir que todo es como ayer: estudio, exámenes, fiestas, amigos, familia...

A mi madre Marleny Quintero Jiménez, por ser la voz que guía mi camino, porque en ocasiones sentía que me iba acercando a un pozo de arena y me daba sed; pero escuchaba una voz que me susurraba: “el sacrificio es demasiado grande pero la recompensa lo es también”; la quiero y adoro con todo mi ser, ya que es la luz en un mundo de oscuridad, ella es mi luz.

Al resto de mi familia por alentarme a seguir adelante. Pero, quiero agradecer en especial a mi tía Margarita Quintero Jiménez; ha sido un gran pilar en mi vida, ha sido como una segunda madre. Gracias por escucharme y entenderme en los días que tuve de oscuridad, ya que sin ella, no hubiese podido hacer realidad este logro.

A mi director Oscar Marino Mosquera por darme la oportunidad de trabajar a su lado; por toda la dedicación, esfuerzo y esmero que deposito en nosotros, al personal del laboratorio Biotecnología-Productos Naturales por su colaboración, en especial a Erika Jiménez, ya que fue una gran amiga y guía, y a Dorian Ruiz. Al profesor Jaime Niño Osorio, gracias por darme la oportunidad de recorrer a su lado una parte del camino de la vida, por todas las lecciones y enseñanzas; por depositar en mí su confianza cuando muchas personas no lo hicieron. Por ser una voz de aliento; por la dedicación y horas de estudio que tuvo para revisar este proyecto. Espero algún día llegar a ser tan grande como él. A nuestra evaluadora Liliana Bueno, por la paciencia y tiempo que nos brindó.

Por último, quiero agradecer a mis compañeros, por horas y horas de estudio y dedicación en el transcurso de nuestra carrera; pero en especial, quiero agradecer a Diana Carolina Londoño Muñoz, por todo su apoyo, paciencia, trabajo y entrega en la realización de este proyecto.

Luis Felipe Quintero Jiménez

TABLA DE CONTENIDO

pág.

Lista de tablas.....	10
Lista de figuras.....	11
Lista de anexos.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Introducción.....	15
1. Planteamiento del Problema.....	17
2. Justificación.....	18
3. Marco Teórico.....	19
3.1 Familia Solanaceae.....	19
3.2 <i>Whiteringia coccoloboides</i>	19
3.3 Microorganismos endofíticos.....	20
3.3.1 Hongos.....	21
3.3.2 Hongo Endofítico (HE).....	22
3.3.3 Bacteria.....	22
3.3.4 Bacteria endofítica.....	22
3.4 Técnicas de conservación.....	22
3.4.1 Métodos de elección.....	23
3.4.2 Métodos alternativos.....	23
3.4.3 Métodos restringidos.....	24
3.5 Método del Papel Filtro.....	24
3.6 Crioconservación.....	24
3.7 Espectroscopia Infrarroja (IR).....	24

4. Objetivos.....	26
4.1 General.....	26
4.2 Específicos.....	26
5. Materiales y Métodos.....	27
5.1 Información General.....	27
5.1.1 Ubicación.....	27
5.2 Recolección del material vegetal.....	28
5.3 Tratamiento de las muestras.....	28
5.4 Aislamiento de los microorganismos.....	30
5.4.1 Hongos.....	30
5.4.2 Bacterias.....	30
5.5 Caracterización macro y microscópica de los microorganismos.....	31
5.5.1 Caracterización macroscópica de los hongos.....	31
5.5.2 Caracterización microscópica de los hongos.....	31
5.5.3 Caracterización macroscópica de las bacterias.....	32
5.5.4 Caracterización microscópica de las bacterias.....	32
5.6 Análisis Espectroscópico (IR).....	32
5.7 Conservación de los microorganismos.....	33
5.7.1 Método del Papel Filtro.....	33
5.8 Análisis Estadístico.....	34
6. Resultados y Discusión.....	35
6.1 Hongos.....	36
6.1.1 Caracterización morfológica (análisis macro y microscópico).....	40
6.1.2 Análisis Estadístico.....	60
6.1.2.1 Análisis de la Normalidad (Shapiro-Wilk).....	60

6.1.2.2 Análisis de la Varianza (ANOVA).....	60
6.1.2.3 Análisis Multivariado.....	60
6.2 Bacterias.....	65
6.2.1 Análisis macroscópico.....	67
6.2.2 Análisis microscópico.....	69
6.2.3 Análisis Estadístico.....	72
6.2.3.1 Análisis de la Normalidad y Análisis no paramétrico (Shapiro-Wilks).....	72
6.2.3.2 Análisis multivariado (conglomerados).....	73
7. Conclusiones.....	78
8. Recomendaciones.....	79
9. Bibliografía.....	80
10. Anexos.....	83

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Actividades realizadas durante el desarrollo del proyecto.....	36
Tabla 2. Código de siembra.....	37
Tabla 3. Hongos obtenidos de la primera siembra del material vegetal.....	37
Tabla 4. Código Puro designado a los hongos aislados.....	38
Tabla 5. Código Puro designado a los hongos aislados (reajuste).....	39
Tabla 6. Análisis macroscópico.....	41
Tabla 7. Análisis microscópico.....	50
Tabla 8. Similitud o cercanía entre los hongos aislados y los de referencia.....	64
Tabla 9. Bacterias obtenidas de la primera siembra del material vegetal.....	65
Tabla 10. Código puro de cada bacteria.....	66
Tabla 11. Análisis macroscópico.....	67
Tabla 12. Análisis microscópico.	69
Tabla 13. Análisis microscópico referencias.....	71
Tabla 14. Pruebas bioquímicas.	72

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Especie <i>Witheringia coccoloboides</i> (Del Autor).....	20
Figura 2. Porcentajes de artículos publicados en diferentes áreas del conocimiento sobre hongos endofíticos.....	21
Figura 3. Zona de muestreo, Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira...	27
Figura 4. Zona de muestreo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Del autor).....	28
Figura 5. Recolección del material vegetal en el Jardín Botánico UTP (Del Autor).....	28
Figura 6. Desinfección de hojas y tallos de la planta <i>Witheringia coccoloboides</i> (Del Autor).....	29
Figura 7. Siembra del material vegetal (Del Autor).....	30
Figura 8. Reacciones bioquímicas a partir de la tinción de Gram.	32
Figura 9. Proceso práctico del proyecto (Del autor).....	35
Figura 10. Dendograma obtenido para la Matriz General.	61
Figura 11. Dendograma obtenido para la Matriz 2.....	62
Figura 12. Dendograma obtenido para la Matriz 3.....	62
Figura 13. Dendograma obtenido para la Matriz 4.	63
Figura 14. Dendograma obtenido para la Matriz Total.....	73
Figura 15. Dendograma obtenido para la Matriz 2.....	73
Figura 16. Dendograma obtenido para la Matriz 3.....	74
Figura 17. Dendograma obtenido para la Matriz 4.....	74

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo 1. Contaminación de la siembra del último lavado.....	81
Anexo 2. Siembra del último lavado sin contaminación.....	81
Anexo 3. Tinción de hongos con Azul de Lactofenol.....	82
Anexo 4. Análisis espectroscópico (espectroscopia infrarroja).....	84
Anexo 5. Conservación de hongos endofíticos puros.....	85
Anexo 6. Análisis de la Normalidad.....	85
Anexo 7. Análisis de la Varianza.....	85
Anexo 8. Test de Duncan.....	86
Anexo 9. Hongos de referencia.....	87
Anexo 10. Prueba de Shapiro –Wilks.....	87
Anexo 11. Siembra del último lavado.....	88
Anexo 12. Bacterias de referencia.....	89

RESUMEN

Los microorganismos endofíticos están implicados en la protección natural de la planta contra enfermedades bacterianas, fúngicas y virales y pueden representar una fuente importante de agentes de control biológico. Estos microorganismos producen gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana e insecticida que mejoran la competitividad de la planta y la salud de las personas. Se ha obtenido a partir de microorganismos endofíticos compuestos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos resistentes a los antibióticos actualmente en uso, por lo cual es un gran aporte para llevar a cabo procesos industriales. Los microorganismos endofitos, particularmente los hongos, han recibido una creciente atención en los años recientes. Este grupo de microorganismos vive asintóticamente dentro de tejidos vegetales sanos y han mostrado poseer un gran potencial económico en áreas como la agronomía y la medicina. También se han usado como grupo modelo para estudiar aspectos teóricos de la ecología de comunidades y de la interacción planta-microorganismo. Los objetivos de este trabajo fueron la caracterización morfológica, análisis espectroscópico (IR) y la conservación de los microorganismos presentes en la especie *Witheringia coccoloboides* (Solanaceae). Para llevar a cabo este proyecto, fueron tomadas del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP) muestras del material vegetal de *Witheringia coccoloboides* y posteriormente se procedió con la desinfección y siembra del mismo. Se realizó el aislamiento de las cepas obtenidas en el proceso de siembra, consecutivamente las cepas puras fueron analizadas a través de técnicas clásicas como: análisis macroscópico (con ayuda de claves dicotómicas) y microscópico (por medio de tinciones) y técnicas modernas como espectroscopia infrarroja (por medio del equipo Agilent 630 ATR-FTIR método Pathlength_ATR, el cual proporcionó resultados confiables de los grupos funcionales más representativos de cada uno de los microorganismos), por último, se llevó a cabo la conservación de los microorganismos obtenidos con las técnicas de Papel Filtro y Criopreservación, logrando cumplir de esta manera el objetivo planteado. Los tratamientos utilizados para la desinfección del material vegetal se compararon mediante un análisis estadístico de normalidad (Shapiro-Wilks), dando como resultado una tendencia normal para los hongos, razón por la cual se realizó posteriormente análisis de la varianza (ANOVA y post-ANOVA Test de Duncan) y en el caso de las bacterias los datos no presentaron tendencia normal, por lo cual se realizó análisis de la varianza no paramétrica (Kruskal Wallis), de los cuales se puede concluir que todos los tratamientos fueron eficientes. El aislamiento y purificación de los microorganismos endofíticos dio como resultado la obtención de 28 hongos y 11 bacterias; luego de su caracterización macro y microscópica se encontró gran variedad entre los microorganismos (color, tamaño, forma, textura, reproducción, septos, tipo de esporas, tinción de Gram). Con los resultados del análisis espectroscópico (IR) se realizó un análisis multivariado (conglomerados), con el cual se observa una mejor clasificación de los microorganismos, ya que se encuentra una similitud respecto a los de referencia.

ABSTRACT

The endophytic microorganisms are involved in the natural protection of the plant against bacterial, fungal and viral diseases and may represent an important source of biological control agents. These microorganisms produce large amount of active antimicrobial and insecticidal compounds that improve the competition of the plant and the health of persons. It has obtained from endophytic microorganisms compound capable of inhibiting the growth of microorganisms resistant to antibiotics currently in use, so it is a great contribution to carry out industrial processes. Endophytic microorganisms, particularly fungi, have received increasing attention in recent years. This group of microorganisms lives asymptotically in healthy plant tissue and they have been shown to possess great economic potential in areas such as agriculture and medicine. They have also used as group model to study theoretical aspects of the ecology of communities and the plant–microbe interactions. The objectives of this work were morphological characterization and spectroscopic analysis (IR) and the preservation of microorganisms present in the species *Witheringia coccoloboides* (Solanaceae). To carry out this project, were taken from the Botanical Garden of the University Technological of Pereira (JBUTP) samples of the plant material *Witheringia coccoloboides* and then proceeded with the disinfection and culture of the same. From the isolation process of culture growing, the obtained strains were consecutively analyzed using classical techniques as: macroscopic analysis (using dichotomous keys) and microscopic (by means of staining) and modern techniques as infrared spectroscopy (via the Agilent 630 ATR - FTIR method Pathlength ATR team, which provided reliable results from the functional groups representative of each of the micro-organisms) Finally, took place the preservation of obtained microorganisms through the techniques of paper filter and cryopreservation, managing to meet in this way the stated objective. The treatments used for the disinfection of plant material were compared using a statistical analysis of normality (Shapiro-Wilks), resulting in a normal trend for fungi, reason by which was then analysis of variance (ANOVA and post-ANOVA Test of Duncan) and in the case of bacteria data did not show normal trend, which analysis of the nonparametric variance (Kruskal Wallis) of which it can be concluded that all treatments were efficient. The isolation and purification of endophytic microorganisms resulted in 28 fungi and 11 bacteria strain; After his characterization of macro and microscopic found great variety among the microorganisms (color, size, shape, texture, reproduction, SEPTA, type of spores, Gram stain). With the results of spectroscopic analysis (IR) was performed a multivariate analysis (conglomerates), which looks a better classification of microorganisms, is a similarity to the reference.

INTRODUCCIÓN

En Colombia se registran numerosas especies de la familia Solanaceae, debido a que crecen en altitudes comprendidas entre el nivel del mar hasta los 3000 m de altura. Desde el punto de vista farmacéutico, la riqueza en alcaloides y otras sustancias, y por su importancia alimenticia, esta familia es una de las más importantes económicamente de la flora colombiana (Carretero, 2004).

La palabra endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta; De Barry fue el primero en utilizar este término, en el año 1866, al referirse a hongos viviendo dentro de los tejidos de una planta (Petrini, 1986). Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

Durante los últimos 30 años, el término endófito ha aparecido cada vez con más frecuencia en la literatura científica (Petrini, 1986). Su significado contemporáneo es diferente del original. Actualmente se usa este término para referirse a microorganismos capaces de infectar plantas aparentemente sanas sin causar síntomas (Large, 1986). Es decir, en el más amplio de los sentidos, los microorganismos endofíticos son aquellos que colonizan tejidos vivos de plantas sin ocasionar ningún efecto negativo, inmediato o visible (Hirsch, 1992).

Los microorganismos endófitos además de inhibir patógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfatos y contribuyen a asimilar el nitrógeno por las plantas. Algunos endófitos se encuentran desde la semilla, pero otros tienen mecanismos para colonizar las plantas (Sessitsch, 2002). Inicialmente, las bacterias endofíticas fueron consideradas como patógenos latentes o como contaminantes de una desinfección incompleta de la superficie, pero desde entonces varios reportes han demostrado que las bacterias endofíticas son capaces de promover el crecimiento y la salud de la planta (Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Barka, 2005).

Dentro de los microorganismos endófitos un grupo importante son las bacterias endofíticas, estas bacterias son universales en las plantas y a su vez cada planta puede tener uno o más especies. Por eso es de esperarse una gran diversidad de bacterias endofíticas. Recientemente se han realizado estudios moleculares sobre diversidad de bacterias endofíticas y han revelado que existe una gran riqueza de géneros y especies (Rosenblueth, 2004). El número de bacterias endofíticas varía principalmente, dependiendo de la planta que colonizan y la región de donde fueron obtenidas (Gyaneshwar, 2001).

Las bacterias endofíticas se han aislado de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, que van desde especies de árboles leñosos, tales como roble o peral, hasta cultivos de plantas herbáceas

como la remolacha y el maíz. Los estudios clásicos de la diversidad de bacterias endofíticas se han enfocado en la caracterización de los microorganismos aislados obtenidos de los tejidos internos tras una desinfección de la superficie de las plantas con hipoclorito de sodio o algún agente similar (Miche, 2008).

El aislamiento de bacterias endofíticas se puede caracterizar por la comparación de un análisis parcial y una caracterización fisiológica con respecto a la utilización de sustratos, producción de antibióticos, sensibilidad a los metales y resistencia a patógenos. Una vez que se han aislado los microorganismos de interés, estos deben de ser caracterizados mediante ensayos de taxonomía polifásica y además es conveniente conservarlas para estudios futuros. La conservación es un paso muy importante, debido a que los microorganismos representan un potencial biotecnológico enorme, por lo cual deben de ser conservados de manera correcta para resguardar dicho potencial (Miche, 2008).

La conservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación. El conocimiento de las peculiaridades de las disímiles técnicas de conservación existentes para su correcta aplicación, así como el seguimiento continuo de las propiedades de las cepas, propician su empleo como inóculo confiable en la industria, la docencia y la investigación (García, 2000). Hoy en día, los microorganismos endofíticos han sido reconocidos como fuentes relativamente inexploradas y potenciales de metabolitos secundarios bioactivos para su explotación en medicina, agricultura y en la industria, por lo cual, es de suma importancia la caracterización morfológica, análisis espectroscópico y conservación de dichas cepas. Dada la demanda comercial actual y la producción de hongos y bacterias por cultivos en tierra y madera muerta, la identificación de los mismos por los métodos tradicionales resulta en algunos casos muy dispendioso, razón por la cual la biotecnología y las técnicas instrumentales (como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, FT-IR) son fundamentales para el desarrollo de técnicas rentables y de fácil manejo que permitan caracterizar, clasificar y reproducir fácilmente los microorganismos, reduciendo tiempo y costos, además, impulsando de esta manera el interés comercial y académico de los mismos (Santos, 2001).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante más de 20 años, los microorganismos endofíticos han sido explorados como "biofábricas" de sustancias bioactivas. Nuevos antibióticos, antimicóticos, inmunosupresores y compuestos anticancerígenos son sólo algunos ejemplos de lo que se ha encontrado tras el aislamiento y cultivo de microorganismos endofíticos individuales seguido de la purificación y caracterización de algunos de sus productos naturales. Las perspectivas de encontrar nuevos medicamentos que pueden ser candidatos eficaces para el tratamiento de enfermedades en los seres humanos, plantas y animales, son enormes. Entre los extractos y sustancias puras obtenidas a partir de caldos de cultivo o de la biomasa fúngica, algunos han ejercido la actividad antimicrobiana de moderada a fuerte cuando se prueban en las cepas microbianas resistentes a los antibióticos actualmente en uso.

Por todo lo anterior se hace importante aislar, purificar y conservar nuevos microorganismos sin alterar su metabolismo (metabolitos), por lo cual se ha considerado pertinente desarrollar proyectos investigativos que contemplen la identificación morfológica (macro y microscópicamente), análisis espectroscópico y conservación, donde se espera que la cepa se mantenga sin ningún tipo de alteración y así poder ser usada en estudios e investigaciones posteriores sobre este tipo de microorganismos y demostrar con fines prácticos la importancia y las múltiples aplicaciones potenciales de sus metabolitos.

2. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos endofíticos están implicados en la protección natural de la planta contra enfermedades bacterianas, fúngicas y virales y pueden representar una fuente importante de agentes de control biológico. Producen gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana e insecticida que mejoran la competitividad de la planta y la salud de las personas; esto se hace importante, debido a que existen microorganismos patógenos que afectan la sanidad de los seres vivos, los cuales también son una amenaza importante y crónica a la producción de alimentos, la estabilidad de los ecosistemas y la salud de los seres humanos en todo el mundo.

El presente trabajo está basado en el aislamiento, caracterización macroscópica, microscópica, análisis espectroscópico (IR) y conservación de los microorganismos endofíticos (ME); con el fin de contribuir al conocimiento de la biodiversidad del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira y crear un cepario con los microorganismos endofíticos conservados, utilizando como material de trabajo la especie *Witheringia coccoloboides* (material vegetal) de la familia Solanaceae, de la cual no hay antecedentes de que en la parte interna de la planta (hojas y tallos) existen dichos microorganismos. Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables. La conservación de microorganismos (endofíticos o no) adquiere cada vez mayor importancia como mecanismos o vías para la conservación de la biodiversidad y representan un importante elemento estratégico y económico para el desarrollo de las investigaciones científicas, con particularidad en las ramas biotecnológicas y biomédicas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Familia Solanaceae

Las solanáceas (Solanaceae) son una familia de plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas (Magnoliopsida). Comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies, con una gran diversidad de hábitat, morfología y ecología. La familia es cosmopolita, distribuyéndose por todo el globo con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se halla en América del Sur, en donde se han registrado 56 géneros, de los cuales 25 son endémicos de esa región, y América Central (Cabañas, 2005).

En esta familia se incluyen especies alimenticias tan importantes como la papa o patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los ajíes o pimientos (Capsicum). Muchas plantas ornamentales muy populares pertenecen a las solanáceas, como Petunia, Schizanthus, Salpiglossis y Datura. Ciertas especies son mundialmente conocidas por sus usos medicinales, sus efectos psicotrópicos o por ser ponzoñosas. Tabaco (*Nicotiana tabacum*), originaria de América, se cultiva en todo el mundo para producir tabaco. A pesar de que las solanáceas se hallan en todos los continentes, la mayor riqueza de especies se halla en América Central y América del Sur. Otros dos centros de diversidad incluyen Australia y África. Las solanáceas pueden ocupar una gran variedad de ecosistemas, desde los desiertos hasta los bosques tropicales y, frecuentemente se las halla también en la vegetación secundaria que coloniza áreas disturbadas (Cabañas, 2005).

Varias especies arbóreas o arbustivas de solanáceas se cultivan como ornamentales. Algunos ejemplos son Brugmansia y candida ("trompeta del ángel"), cultivada por sus grandes flores péndulas con forma de trompeta, *Brunfelsia latifolia*, cuyas flores muy fragantes cambian de color desde el violeta al blanco en un período de 3 días. Muchas otras especies, en particular las que producen alcaloides, se utilizan en farmacología y medicina (Nicotiana, Hyoscyamus, y Datura) (Cabañas, 2005).

3.2 *Witheringia coccoloboides*

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Witheringia*

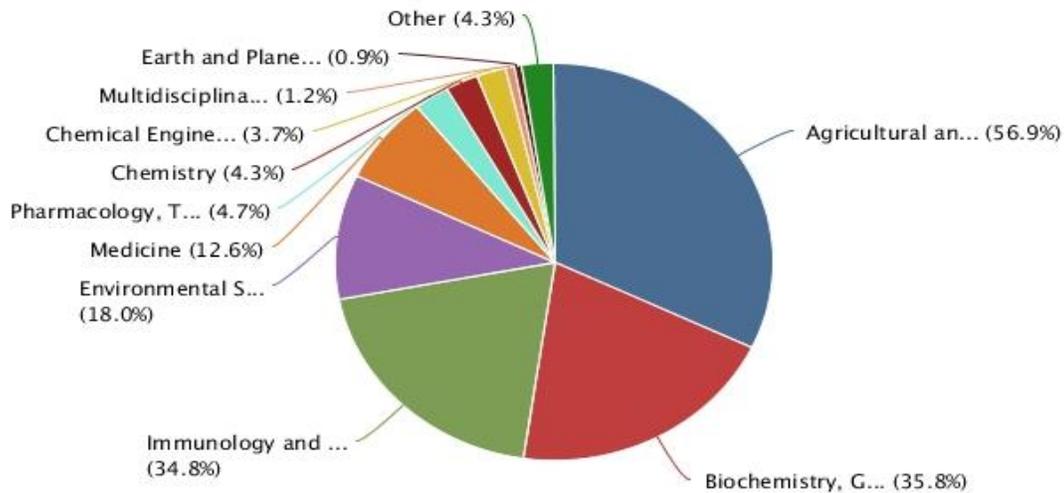


Figura 1. Especie *Witheringia coccoloboides* (Del Autor).

3.3 Microorganismos endofíticos

El término *microorganismo endófito* se refiere a bacterias y hongos que colonizan los tejidos internos (raíz, hojas y tallos) de las plantas sin causarles enfermedades aparentes, además de beneficiarlas al reforzar su tolerancia a condiciones adversas para su desarrollo (Mártinez 2010).

Utilizando Scopus (base de datos), se puede observar que el área de conocimiento en la cual se han publicado más artículos es en la Agricultura y Ciencias Biológicas con un porcentaje de 56.9%, y en segundo lugar Bioquímica, Genética y Biología Molecular con un porcentaje de 35.8%; entre otras áreas de estudios (Observar Figura 1) (Bibliotecas, 2015).



Copyright © 2015 Elsevier B.V. All rights reserved. Scopus® is a registered trademark of Elsevier B.V.

Figura 2. Porcentajes de artículos publicados en diferentes áreas del conocimiento sobre microorganismos endofíticos (Bibliotecas, 2015).

3.3.1 Hongos

Los hongos son organismos eucariontes aclorófilos con pared celular que se alimentan por absorción de moléculas orgánicas (Arauz, 1998).

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, formando largos filamentos denominados hifas que con frecuencia se ramifican; estos hongos, denominados mohos, al crecer forman matas de filamentos entrelazados (Prats, 2006).

3.3.2 Hongo endofítico (HE)

Está ampliamente documentado que existen relaciones simbióticas entre hongos endofíticos (HE) y una amplia variedad de plantas. La colonización de HE puede generar beneficios para la planta hospedera, incluyendo la actividad antagonista y la inducción de resistencia contra patógenos, así como la promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizósfera hacia la planta (Harman, 2004).

3.3.3 Bacteria

Las bacterias son organismos unicelulares relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se llaman *procariotas* (Granados, 1997).

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas Gram positivas, sólo poseen peptidoglicano; el otro, las denominadas Gram negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en lipopolisacáridos (Prats, 2006).

3.3.4 Bacteria endofítica (BE)

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en el tejido interno de material vegetal, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Weller, 1997). Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente, aunque no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbionte (Kloepper, 1999).

3.4 Técnicas de conservación de microorganismos

Existen diferentes métodos para la conservación de microorganismos. Entre los más conocidos está la congelación de muestras de cultivos a la que se le adiciona un agente estabilizante como glicerol y se mantienen a -80°C . La liofilización y la conservación en medios sólidos herméticos son métodos muy aplicados para conservar bacterias; sin embargo, presentan más problemas en el caso de eucariontes ya que muchos de ellos no se recuperan después del tratamiento (Brock, 1997).

Los cultivos herméticos se llevan a cabo en tubos con medio sólido y sembrado por punción cerrándolos herméticamente para evitar desecación, este sistema es útil para procariontes y eucariontes. El método más usado para corto plazo es el mantenimiento en medios generales conservados en refrigeración a 4°C siendo necesario realizar pases cada 6 meses o según sea la cepa (Brock, 1997).

Para evitar la degeneración y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación en las características deseables de una cepa se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como se enumeran a continuación: carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, acumulación de secreciones tóxicas propias del metabolismo del hongo, alteración del pH en el medio (acidez o alcalinidad), disminución en la concentración de oxígeno y la consecuente acumulación de CO₂. La elección de los métodos tiene en cuenta varios factores, según sea el objetivo de la colección, así pues una pequeña colección docente difiere de aquellas que son depositarias nacionales. Si por el contrario el objetivo es clasificar taxonómicamente los cultivos se precisan métodos que garanticen la estabilidad morfológica de los microorganismos. Así mismo una colección de interés para la industria debe hacer énfasis en los métodos que mantengan la estabilidad genética (Angel, 2006).

Métodos de elección

En estos métodos se detiene el crecimiento microbiano sin que se mueran los microorganismos, garantizando la estabilidad genética al evitar la aparición de nuevas generaciones. En este grupo se encuentran la congelación y la liofilización. En los métodos de conservación de microorganismos se buscan principalmente la pureza de la cepa, la sobrevivencia del 70-80% y la estabilidad genética (García, 2000).

Métodos alternativos

Son métodos usados cuando la cepa microbiana no soporta los tratamientos de la conservación o la falta de equipos para llevarlos a cabo, es recomendable no usar un solo método alternativo sino realizar varios de estos métodos. Entre estos métodos se encuentran la conservación por transferencia periódica y la conservación en agua destilada (García, 2000).

Métodos restringidos

En este grupo se encuentran métodos no usados habitualmente, pero a los que se recurren para conservar microorganismos determinados que no soportan la liofilización o la congelación. Algunos métodos se basan en la parálisis del crecimiento por medio de la eliminación del agua disponible para las células como por ejemplo, desecación en papel filtro, desecación en suelo, arena, desecación en bolas de alginato (García, 2000).

3.5 Método del Papel Filtro

Se utilizan unos discos de papel filtro bastante absorbente, con poros de 2 μm (Whatmann n° 3) que se colocan en un sobre de papel aluminio y dentro de cajas de Petri correctamente esterilizadas y con agar o caldo (Ramos, Ramadan, Lopez, Bulacio, & Mellado, 2006). Después se sumergen los discos en el agar o suspensión por un lapso de 2 min, en cámara de flujo laminar y se secan en estufa a 30°C durante 5 min y finalmente son guardados a temperatura ambiente (García, 2000).

3.6 Crioconservación

Es necesario mantener continuamente en replicación la copia activa de la colección del microorganismo en un refrigerador por ello puede perder el aislamiento, entre otros atributos, la viabilidad, la pureza, la virulencia o puede ocurrir que desarrolle una variabilidad no deseada. Los microorganismos aislados, que son purificados y crecen antes de entrar en la fase de congelación en un medio de cultivo, durante un tiempo determinado y a una temperatura óptima, se colocan en viales tomando discos centrales con un sacabocados esterilizado en cámara de flujo laminar, con adición previa de DMSO al 15 % (González, 2013).

3.7 Espectroscopia Infrarroja (IR)

Es una técnica confiable, rápida y amigable con el medio ambiente, debido a que el uso de reactivos es mínimo (*solvent less*). El fundamento de la técnica es un espectro infrarrojo (IR) que constituye un patrón altamente específico semejante a una “*huella digital*”, que representa la composición química global del analito y que, por lo tanto, permite su caracterización estructural. El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de una célula es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de los enlaces químicos de las moléculas que la constituyen, principalmente macromoléculas como nucleótidos, DNA, RNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Kikot, 2012).

Debido a la complejidad inherente a la interpretación de los espectros, se han desarrollado sistemas de reconocimiento basados en técnicas de análisis estadístico multivariado que permiten la caracterización e identificación microbiana así como la cuantificación de componentes celulares. El FT-IR combinada con técnicas de análisis multivariante ha sido propuesto en los últimos años como un método fisicoquímico alternativo para la identificación y caracterización molecular de células. Mediante esta metodología es posible analizar directamente espectros de células enteras, sin ningún tipo de tratamiento ni uso de reactivos especiales, tiene bajos costos operativos y lo que es más importante, permite obtener resultados en tiempos reducidos. La aplicación de metodologías basadas en FT-IR ha sido capaz de identificar células a nivel de género, especie y aún, de cepa (Kikot, 2012).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la biodiversidad del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, explorando los microorganismos endófitos presentes en *Witheringia coccoloboides* (Solanaceae).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener microorganismos (hongos y bacterias) endofíticos presentes en la planta *Witheringia coccoloboides* en medios de cultivos específicos.
- Clasificar por medio de reacciones bioquímicas, análisis morfológico y espectroscopía infrarroja (IR) los microorganismos endofíticos aislados.
- Conservar los microorganismos endofíticos aislados por medio de técnicas de conservación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación

5.1.1 Información General

El proceso investigativo se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira, el proceso de recolección vegetal se llevó a cabo en el Jardín Botánico (Figura 3), posteriormente la parte experimental del proyecto se realizó en el área de microbiología del laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales de la Escuela de Química. Se recolectaron muestras del material vegetal (*Witheringia coccoloboides*) encontradas en las coordenadas: Longitud (74:41,28845), Latitud (4:47,49913) y Altitud (1489), que fueron tomadas de manera aleatoria en el terreno en que crece dicha planta.

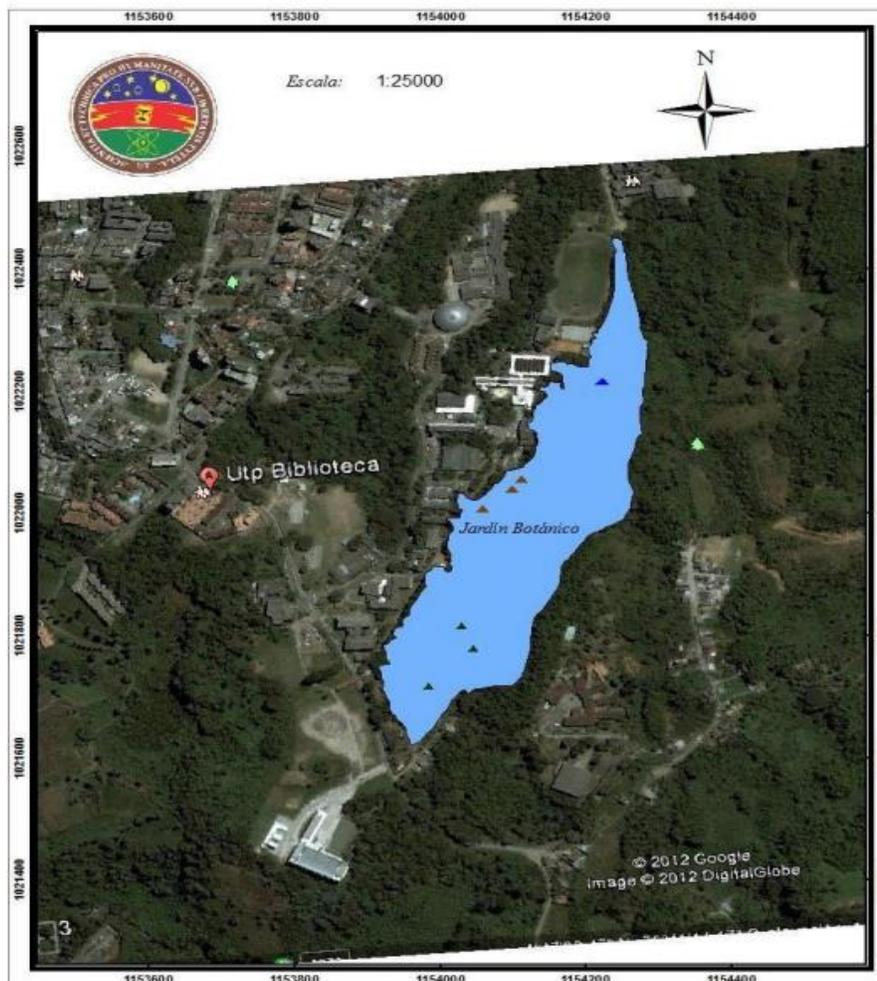


Figura 3. Zona de muestreo, Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

5.2 Recolección del material vegetal

Se tomaron muestras de hojas y tallos (Figura 4 y 5) de *Witheringia coccoloboides* (Solanaceae), recolectadas en el Jardín Botánico de la UTP. La planta seleccionada, se envolvió en papel periódico y se llevó al laboratorio para procesarla en un período no superior a 24 h a partir del muestreo (Azevedo, 2000).



Figura 4. Zona de muestreo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Del autor).



Figura 5. Recolección del material vegetal en el Jardín Botánico UTP (Del Autor).

5.3 Tratamiento de las muestras

Las hojas y tallos, inicialmente se lavaron tres veces con agua corriente del grifo para eliminar los residuos de suelo en la superficie; para la desinfección se realizó una inmersión en Etanol al 70% durante 1 min, Hipoclorito de Sodio al 3% durante 30, 90 y 180 segundos, posteriormente se enjuagaron 5 veces en agua destilada estéril (Figura 6). Para el secado de las hojas y tallos se dejaron pasar unos minutos bajo la cabina de bioseguridad a temperatura ambiente, cada hoja se dividió en cuatro partes y mediante técnicas asépticas se cortaron en secciones pequeñas, con el uso de un bisturí esterilizado con alcohol y flameado en el mechero (Azevedo, 2000).

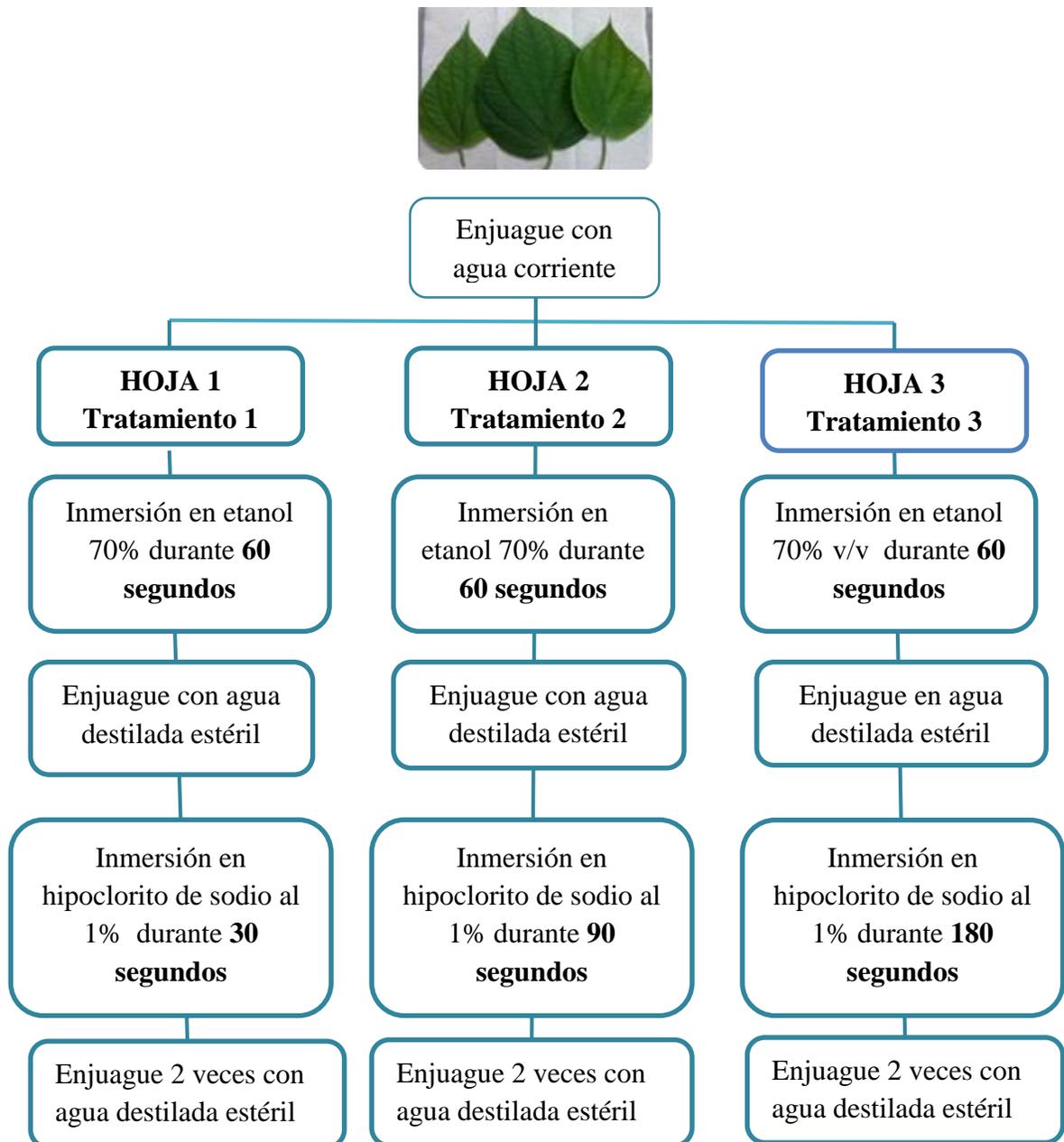


Figura 6. Desinfección de hojas y tallos de la planta *Witheringia coccoloboides* (Del Autor).

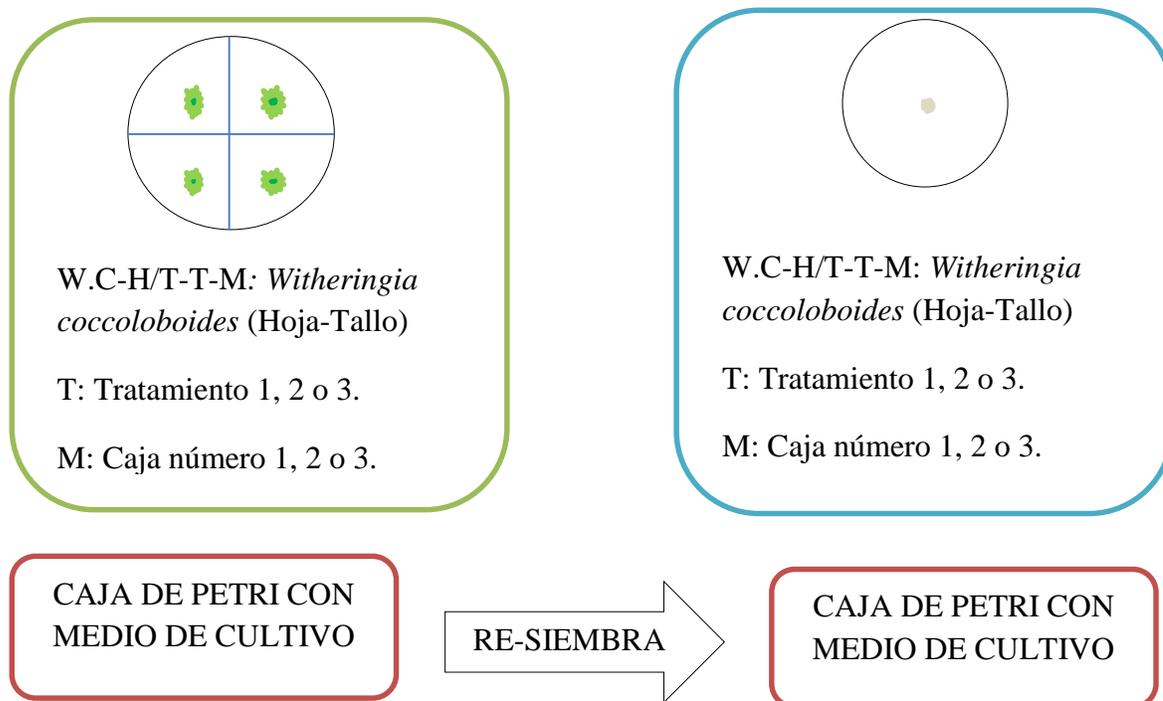


Figura 7. Siembra del material vegetal (Del Autor).

5.4 Aislamiento de los microorganismos

Se aseguró la separación de hongos y bacterias para trabajar con cada tipo de microorganismo, donde se van realizando repiques de los mismos (Figura 7), hasta obtener cepas puras para su posterior análisis.

5.4.1 Hongos

Después de la esterilización, las secciones correspondientes a cada parte de la planta, se inocularon en cajas Petri que contenía Agar Papa Dextrosa (PDA), el cual es utilizado como medio de cultivo para hongos, con adición previa de amoxicilina a 300 ppm para inhibir el crecimiento bacteriano. Las cajas se rotularon de acuerdo al código establecido (planta-individuo-hoja/tallo-muestra), se dejaron en el laboratorio a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) expuestas a períodos naturales de luz y oscuridad (Azevedo, 2000).

5.4.2 Bacterias

Cada una de las secciones de la planta (hojas y tallos) se dividió en cuatro partes y mediante técnicas asepticas se cortaron en secciones pequeñas y posteriormente se sembraron en cajas de

Petri preparadas, las cuales contenían agar bacteriológico utilizado como medio de cultivo para bacterias, con adición previa de Nistatina al 1% el cual inhibe el crecimiento de hongos (contaminación). Las cajas se incubaron a 28°C durante 48 a 72 h y las colonias individuales se aislaron y se purificaron al ser transferidas (repiques) a cajas de Petri con nuevo agar bacteriológico suplementado (Carretero, 2004).

5.5 Caracterización macro y microscópica de los microorganismos endofíticos aislados

Teniendo en cuenta las descripciones bibliográficas sobre las características morfológicas macro y microscópicas de los microorganismos, se procedió a la observación de cada cepa microbiana, determinando así la estabilidad morfológica de cada una. La caracterización de microorganismos es de gran importancia, ya que es un soporte para conocer más a profundidad las características de los microorganismos a estudiar.

5.5.1 Caracterización macroscópica de los hongos

Los hongos aislados se agruparon siguiendo algunas características macroscópicas (color, tamaño, aspecto, textura) (García, 1992).

La identificación macroscópica de los hongos conlleva a un mundo demasiado complejo, debido a que no hay la suficiente información para hacer búsquedas confiables pero maravilloso e importante a la vez, es por esto, que se continuó con la identificación microscópica y espectroscópica, buscando de este modo tener más información de los diferentes tipos de hongos aislados, y así obtener resultados más confiables.

5.5.2 Caracterización microscópica de los hongos

Para la identificación morfológica de los aislamientos se empleó la metodología de tinciones descrita en Rojas, (2011) (Rojas, 2011).

Preparación en cinta engomada o impronta: Se colocó una gota del colorante Azul de Lactofenol sobre la superficie de un portaobjeto. Utilizando cinta transparente, se presionó suavemente la parte adhesiva sobre la superficie de la colonia, procurando adherir una porción de micelio aéreo a esta. Se pegó un extremo de la cinta sobre la superficie del portaobjetos, y cuidadosamente se terminó de fijar la cinta adhesiva al otro lado del portaobjetos, fijando la muestra sobre la gota de colorante. Durante el procedimiento debe evitarse la acumulación de burbujas de aire, para evitar la aparición de estructuras que dificulten la observación. La observación en el microscopio solo se realizó hasta 40x (Rojas, 2011).

5.5.3 Caracterización macroscópica de las bacterias

Se realizó el repique de las bacterias obtenidas en el medio de cultivo Agar bacteriológico. Luego se repicaron e incubaron en medio de cultivo Agar Sabouraud a temperatura ambiente y 37°C; posteriormente se repicaron nuevamente en medio de cultivo Mueller-Hinton (en el cual se observó un mejor crecimiento de las bacterias) a temperatura ambiente. Las bacterias aisladas y purificadas se agruparon siguiendo algunas características macroscópicas (forma, borde, pigmentación, superficie, consistencia, color, entre otras) (Lima, 2005).

5.5.4 Caracterización microscópica de las bacterias

La caracterización microscópica de las bacterias endofíticas se realizó utilizando la tinción diferenciadora de Gram, además de algunas reacciones bioquímicas como la actividad de la catalasa, la oxidasa, la coagulosa y la lactosa (Figura 8) (Lima, 2005).

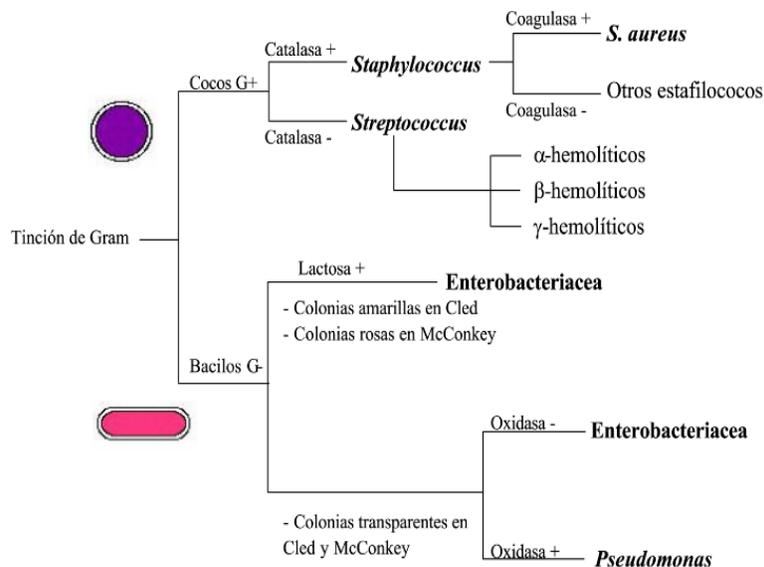


Figura 8. Reacciones bioquímicas a partir de la tinción de Gram (Lima, 2005).

5.6 Análisis Espectroscópico (IR)

Para llevar a cabo el proceso de identificación por medio de técnicas espectroscópicas, en este caso utilizando espectroscopia infrarroja, fueron seleccionadas los repiques que no mostraban contaminación, garantizando así un mayor porcentaje de confiabilidad en los resultados obtenidos por el equipo ATR-FTIR, después de esto, se hizo una siembra en caldo BHI (Infusión cerebro

corazón), para el crecimiento de los hongos endofíticos en forma de pellets, esto debido a que las esporas son difíciles de manejar y pueden contaminar el ambiente o presentarse una contaminación cruzada entre los hongos. Para las bacterias se realizó la siembra en medio de cultivo Agar Mueller-Hinton. Los pellets de los hongos y las colonias bacterianas, fueron leídos en el equipo infrarrojo de la escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira. Estos resultados se analizaron teniendo en cuenta los grupos funcionales más representativos a través de análisis multivariado de conglomerados y de su relación con los hongos y bacterias de referencia usando el software InfoStat (Fischer, 2005).

5.7 Conservación de los microorganismos

5.7.1 Método del Papel Filtro

La conservación de los microorganismos mediante este método se llevó a cabo siguiendo los pasos que se enumeran a continuación:

1. Se prepararon cajas de Petri con medio de cultivo Agar PDA (para hongos) y tubos con medio de cultivo Caldo Mueller-Hilton (para bacterias).
2. Se esterilizó el papel filtro del tamaño interno de la caja Petri.
3. Se colocó el papel filtro en las cajas Petri (para hongos).
4. Se sembró sobre el papel filtro (del paso 3) un (conidio, hifa u otro tejido) del hongo.
5. Se sembró en los tubos (del paso 1) colonias de la bacteria.
6. Se incubó de manera tradicional hasta crecimiento total del microorganismo en la caja o tubo.
7. Se dividió en secciones pequeñas preferencialmente en tiras el papel filtro con el microorganismo.
8. Finalmente se guardó las tiras del papel filtro en tubos eppendorf estéril a 4° o -20° C.

Nota: A través de este método es posible conservar hasta por un año o más sin perder viabilidad del microorganismo (García, 2000).

5.8 Análisis Estadístico

Los tratamientos empleados para la desinfección del material vegetal se compararon por medio de un análisis estadístico de normalidad (Shapiro-Wilks); del cual posteriormente con el resultado de este, se determinó si se realizaba análisis de la varianza (ANOVA) o de la varianza no paramétrica (Kruskal Wallis). A los hongos y bacterias obtenidos en las cajas de los tres tratamientos se les realizó análisis espectroscópico (IR) donde se obtuvo la segunda derivada, con la cual se construyó una serie de tablas (matrices) en Excel. Las tablas fueron exportadas al software estadístico Infostat; el cual me encuentra la similitud o cercanía de los microorganismos (de acuerdo a sus metabolitos primarios), para realizar su posterior análisis, con el cual se obtuvo un Dendograma (análisis multivariado) para cada matriz, tanto para hongos como bacterias (Gómez & Gutierrez, 2014).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo práctico del proyecto comenzó con el estudio del terreno y selección (donde se encontraba una mayor concentración del material vegetal) de los puntos de muestreo en el Jardín Botánico (ecosistema Guadual) de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP), el cual se encuentra ubicado en el sur oriente del área urbana del municipio de Pereira con coordenadas geográficas 4°47'28,2"N-75°41'24"-5W y sus características son: Altitud 1442 m.s.n.m, temperatura media 20 °C y precipitación media anual 2553 mm.

El proceso realizado de forma general para la caracterización morfológica, análisis espectroscópico (IR) y conservación, se ilustra en la figura 9.

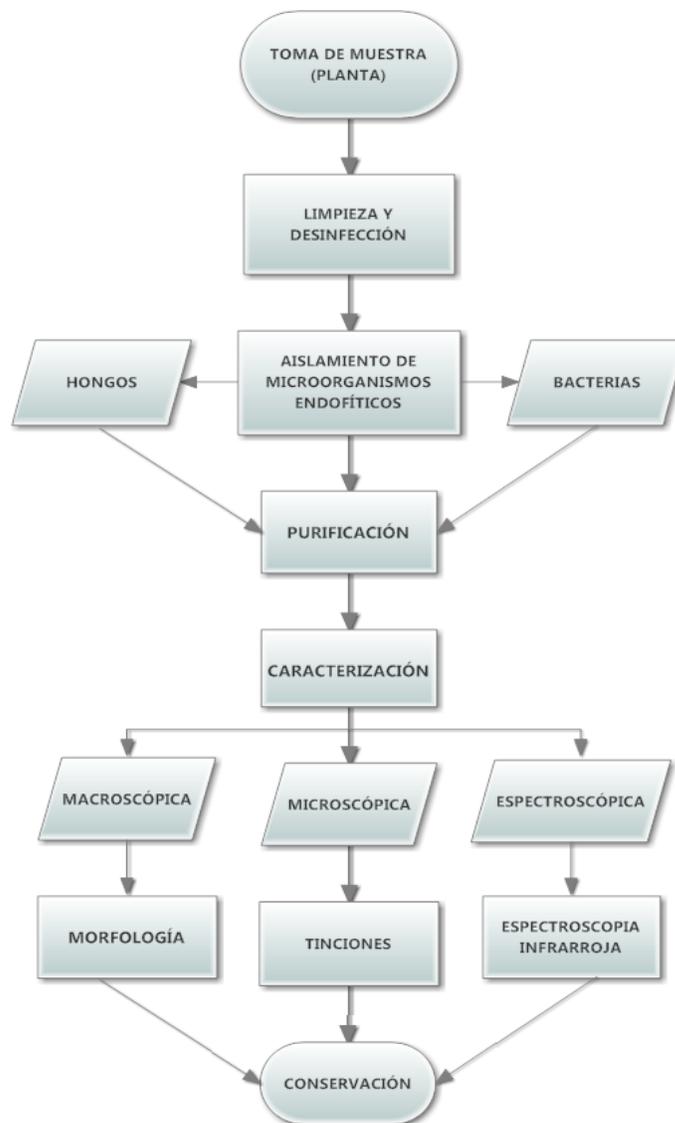


Figura 9. Proceso práctico del proyecto (Del autor).

6.1 Hongos

La recolección del material vegetal se realizó el día 16 de septiembre en horas de la tarde en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, fueron recogidos tallos y hojas en las coordenadas indicadas, estas fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología y Productos naturales en bolsas plásticas selladas y rotuladas el mismo día. Se realizó la siembra y a los ocho días de revisar las cajas, se encontró que la siembra de los últimos lavados estaba contaminada (Anexo 1), por lo cual, todas las cajas fueron descartados y se procedió a realizar de nuevo la recolecta del material vegetal. A continuación se presenta una tabla, en la cual se hace un breve resumen de las actividades realizadas durante el desarrollo del proyecto (ver tabla 1).

Tabla 1. Actividades realizadas durante el desarrollo del proyecto.

ACTIVIDADES	PROCEDIMIENTO
1. Recolección de material vegetal del Jardín Botánico UTP.	El 25 de septiembre durante la mañana fueron recolectadas del Jardín Botánico de La Universidad Tecnológica de Pereira hojas y tallos de 3 plantas de la especie <i>Witheringia coccoloboides</i> , encontrada en las coordenadas Longitud (74:41,28845), Latitud (4:47,49913) y Altitud (1489)
2. Siembra del material vegetal y aislamiento de microorganismos endofíticos.	Se realizaron 3 tratamientos de desinfección según la Figura 5 a las hojas y tallos, y todos resultaron ser efectivos. Se sembró el tejido vegetal en Agar PDA (Papa Dextrosa) y se realizó la separación de los hongos por medio de re-siembras en Agar PDA. Se obtuvieron hongos endofíticos puros (ver Tabla 4).
3. Caracterización morfológica de las cepas microbianas aisladas y análisis espectroscópico (IR).	Los hongos aislados se agruparon siguiendo algunas características macroscópicas (color, tamaño, aspecto, textura). Preparación en cinta engomada o impronta (análisis microscópico): Se colocó una gota del colorante Azul de Lactofenol sobre la superficie de un portaobjeto. Utilizando cinta transparente, se presionó suavemente la parte adhesiva sobre la superficie de la colonia, procurando adherir una porción de micelio aéreo a esta. Se pegó a un extremo de la cinta sobre la superficie del portaobjetos, a un lado de la gota del colorante y con cuidado se pegó la cinta con la muestra sobre la gota del colorante para que el micelio aéreo se impregnara con éste. Durante el procedimiento debe evitarse la acumulación de burbujas de aire, para evitar la aparición de estructuras que dificulten la observación. Se llevó el microscopio hasta objetivo 40x Los resultados se pueden observar en la Tabla 5 y Tabla 6.

4. Conservación de las cepas microbianas.	Según la metodología planteada en el proyecto (método por papel filtro).
---	--

Después de realizar el debido tratamiento al materia vegetal de estudio, a las cajas se les designó un código (ver Tabla 2) para identificar la especie, el tejido y el tratamiento del que provienen (material vegetal), las cajas de Agar PDA se enumeraron de 1 a 3, esto es debido a que se realizó por triplicado. El código del agua del enjuague (agua estéril) es el mismo que el de la caja de Agar PDA y se nombró como agua de último lavado, para observar si había crecimiento de alguna contaminación. Se fue realizando repiques de los hongos que se iban obteniendo, para asegurar un mayor aislamiento y purificación de los mismos.

Tabla 2. Código de siembra.

Especie	Tejido	Tratamiento de Desinfección	Código de Siembra
<i>Witheringia coccoloboides</i>	Hoja	Tra 1	W.C-H-Tra 1
		Tra 2	W.C-H-Tra 2
		Tra 3	W.C-H-Tra 3
	Tallo	Tra 1	W.C-T-Tra 1
		Tra 2	W.C-T-Tra 2
		Tra 3	W.C-T-Tra 3

En las cajas del último enjuague no crecieron hongos ni bacterias, por lo cual se deduce que todos los hongos aislados del tejido de las hojas y tallos son endófitos y que todos los tratamientos de desinfección fueron efectivos (ver Tabla 3).

Tabla 3. Hongos obtenidos de la primera siembra del material vegetal (H: Hojas y T: Tallos).

TRATAMIENTO	CAJA	HONGOS (H)	HONGOS (T)
1	1	3	0
	2	1	2
	3	2	2
2	1	1	3
	2	2	1
	3	3	3
3	1	6	1
	2	0	1
	3	6	3
TOTAL HONGOS ENDOFÍTICOS AISLADOS		24	16

Los hongos obtenidos en la primera siembra se reseñan en la tabla 3, la cual relaciona la cantidad de hongos endofíticos aislados por caja en cada tratamiento, donde se observa que tanto en hojas como tallos hay crecimiento de hongos endofíticos, pero en el caso de las hojas hay un mayor crecimiento. En las hojas se observa un mayor crecimiento en el tratamiento 3 y para tallos hay un mayor crecimiento en el tratamiento 2. Para conocer las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se compararon por medio de un análisis de normalidad (Shapiro-Wilk).

Al obtener los hongos puros, el código de siembra es cambiado por números (hojas) y letras (tallos), como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Código Puro designado a los hongos aislados.

CÓDIGO PURO	NOMBRE
1	W.C-H-Tra 1-Caja 2
2	W.C-H-Tra 1-Caja 3
3	W.C-H-Tra 1-Caja 3
4	W.C-H-Tra 3-Caja 3
5	W.C-H-Tra 3-Caja 3
6	W.C-H-Tra 3-Caja 3
7	W.C-H-Tra 3-Caja 1
8	W.C-H-Tra 2-Caja 3
9	W.C-H-Tra 2-Caja 2
10	W.C-H-Tra 3-Caja 1
11	W.C-H-Tra 2-Caja 1
12	W.C-H-Tra 2-Caja 3
13	W.C-H-Tra 3-Caja 3
14	W.C-H-Tra 3-Caja 1
15	W.C-H-Tra 3-Caja 1
16	W.C-H-Tra 2-Caja 3
17	W.C-H-Tra 3-Caja 1
18	W.C-H-Tra 3-Caja 3
19	W.C-H-Tra 3-Caja 3
20	W.C-H-Tra 2-Caja 2
21	W.C-H-Tra 2-Caja 2
22	W.C-H-Tra 1-Caja 1
23	W.C-H-Tra 3-Caja 1
24	W.C-H-Tra 1-Caja 1
25	W.C-H-Tra 1-Caja 1
A	W.C-T-Tra 1-Caja 3

B	W.C-T-Tra 1-Caja 2
C	W.C-T-Tra 1-Caja 2
D	W.C-T-Tra 1-Caja 3
E	W.C-T-Tra 2-Caja 3
F	W.C-T-Tra 2-Caja 2
G	W.C-T-Tra 2-Caja 3
H	W.C-T-Tra 2-Caja 3
I	W.C-T-Tra 2-Caja 1
J	W.C-T-Tra 2-Caja 1
K	W.C-T-Tra 3-Caja 3
L	W.C-T-Tra 3-Caja 2
M	W.C-T-Tra 2-Caja 1
N	W.C-T-Tra 3-Caja 3
O	W.C-T-Tra 3-Caja 1
P	W.C-T-Tra 3-Caja 3
P'	W.C-T-Tra 3-Caja 3

En la Tabla 4, aparecen todos los hongos endofíticos aislados obtenidos, pero en el transcurso del proyecto se fueron perdiendo hongos endofíticos (contaminaciones, estrés del hongo por demasiados repiques), por lo cual se opta por reajustar la Tabla 4.

Reajuste a la Tabla 4, para nombrar (código puro) los hongos endofíticos puros aislados que se obtuvieron finalmente, donde las letras son cambiadas por números (ver Tabla 5) para una mayor facilidad de entendimiento en el trabajo.

Tabla 5. Código Puro designado a los hongos aislados (reajuste).

CÓDIGO PURO	NOMBRE
1	W.C-H-Tra 1-Caja 2
2	W.C-H-Tra 1-Caja 3
3	W.C-H-Tra 3-Caja 3
4	W.C-H-Tra 3-Caja 3
5	W.C-H-Tra 3-Caja 1
6	W.C-H-Tra 2-Caja 3
7	W.C-H-Tra 2-Caja 2
8	W.C-H-Tra 3-Caja 1
9	W.C-H-Tra 2-Caja 1
10	W.C-H-Tra 2-Caja 3
11	W.C-H-Tra 3-Caja 3

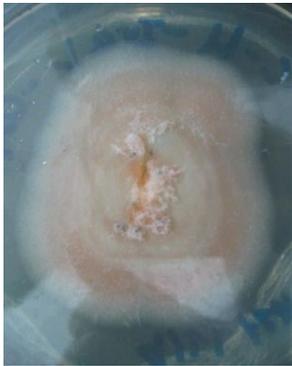
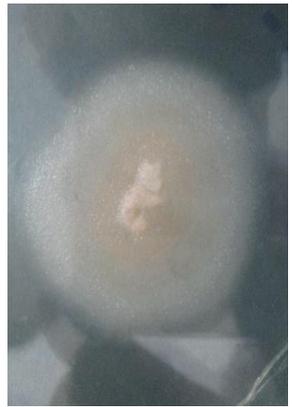
12	W.C-H-Tra 3-Caja 1
13	W.C-H-Tra 3-Caja 1
14	W.C-H-Tra 3-Caja 1
15	W.C-H-Tra 2-Caja 3
16	W.C-H-Tra 3-Caja 1
17	W.C-H-Tra 3-Caja 3
18	W.C-H-Tra 3-Caja 3
19	W.C-H-Tra 2-Caja 2
20	W.C-H-Tra 2-Caja 2
21	W.C-T-Tra 1-Caja 2
22	W.C-T-Tra 1-Caja 2
23	W.C-T-Tra 2-Caja 2
24	W.C-T-Tra 2-Caja 3
25	W.C-T-Tra 2-Caja 3
26	W.C-T-Tra 3-Caja 2
27	W.C-T-Tra 3-Caja 3
28	W.C-T-Tra 3-Caja 1
29	<i>Fusarium solani</i>
30	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
31	<i>Fusarium oxysporum</i>
32	<i>Aspergillus niger</i>
33	<i>Colletotrichum</i>

Los hongos que van del 29 al 33, son los hongos que se utilizaron como referencia para realizar el análisis multivariado (conglomerados).

6.1.1 Caracterización morfológica (análisis macro y microscópico)

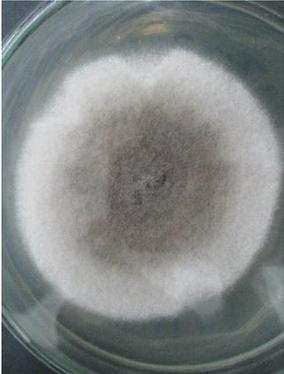
El análisis macroscópico y microscópico fue la base para la identificación de los hongos, en el cual a través de una observación profunda de las partes principales, tinciones y con fotos se fue construyendo una tabla, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 y Tabla 7.

Tabla 6. Análisis macroscópico.

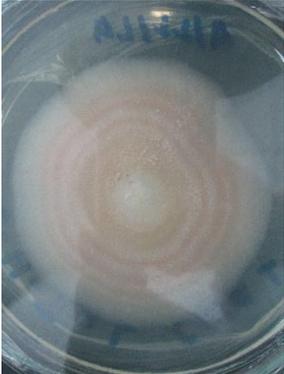
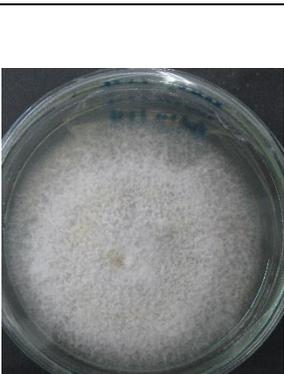
CÓDIGO PURO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS		IMAGEN EN PDA 8 DÍAS
01	W.C-H-Tra 1-Caja 2	Color	Enfrente: Salmón-Blanco (Intercalado) Detrás: Blanco (Centro)-Salmón (Bordo)	
		Tamaño	5.5x4 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Cremoso-Aterciopelado	
02	W.C-H-Tra 1-Caja 3	Color	Enfrente: Salmón (Centro)-Blanco (Borde) Detrás: Salmón (Centro)-Blanco (Borde)	
		Tamaño	3x3.5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Cremoso-Aterciopelado	
03	W.C-H-Tra 1-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	4.5x4 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Cremoso-Aterciopelado	
04	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Salmón (Centro)-Blanco (Borde) Detrás: Salmón (Centro)-Blanco (Borde)	
		Tamaño	3.5x5 cm	

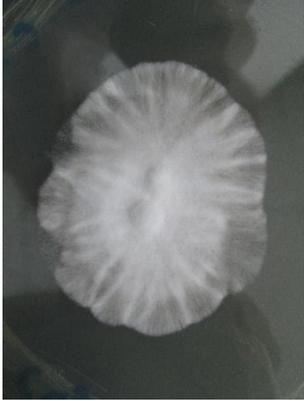
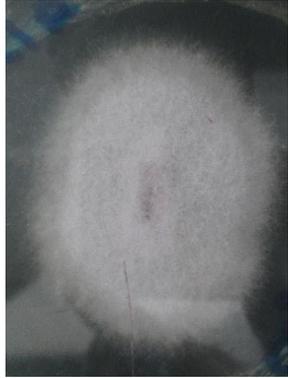
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Cremoso-Aterciopelado	
05	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Verde Oscuro Detrás: Negro	
		Tamaño	1x2 cm	
		Aspecto	Crateriforme	
		Textura	Terrosa	
06	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco-Rosa (Una parte)	
		Tamaño	6x6 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
07	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Verde Oscuro (Centro)-Gris (Luego)-Blanco (Borde) Detrás: Verde Oscuro (Centro)-Gris (Luego)-Blanco (Borde)	
		Tamaño	6x6.5 cm	
		Aspecto	Radiado Húmedo	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
08	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco con aureola violeta en el centro	
		Tamaño	8.8x8.8 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso	

09	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	5x5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
10	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	4.5x5 cm	
		Aspecto	Radiado-Plegado	
		Textura	Veloso	
11	W.C-H-Tra 2-Caja 1	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	7x7 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
12	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Morado, borde blanco Detrás: Morado, borde blanco	
		Tamaño	7x7 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Aterciopelado	

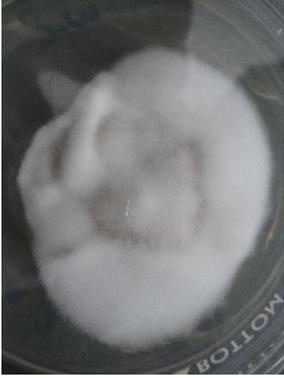
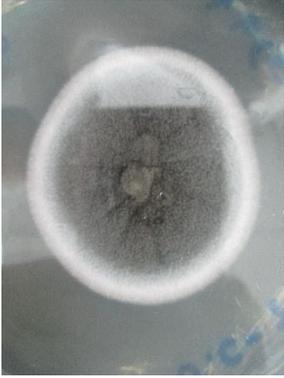
13	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco, aureola amarilla	
		Tamaño	9x9 cm	
		Aspecto	Cerebriforme	
		Textura	Polvosa	
14	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Gris Detrás: Blanco	
		Tamaño	4.4x4.4 cm	
		Aspecto	Radiado húmedo	
		Textura	Aterciopelado	
15	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Gris-Negro (centro), borde blanco Detrás: Gris-Negro (centro), borde blanco	
		Tamaño	6x6 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso	
16	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Centro morado, blanco Detrás: Centro morado, blanco	
		Tamaño	7x7.5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Velloso	

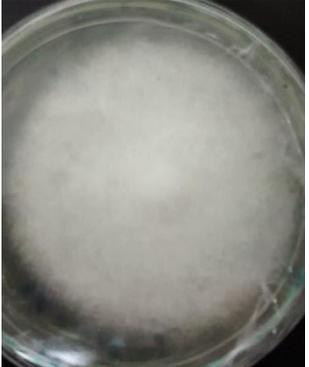
17	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Verde opaco, borde blanco Detrás: Negro, borde verde y blanco	
		Tamaño	7x7.5 cm	
		Aspecto	Radiado húmedo	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
18	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	7x 7 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Veloso	
19	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco con manchas naranjas Detrás: Blanco con manchas naranjas	
		Tamaño	5x6 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Aterciopelado	
20	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Color	Enfrente: Blanco con manchas grises Detrás: Blanco, centro negro	
		Tamaño	6x6.5 cm	
		Aspecto	Plagado-Radiado	
		Textura	Cremosa	

21	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	9x9 cm	
		Aspecto	Plegado-Radiado	
		Textura	Cremosa	
22	W.C-H-Tra 1-Caja 1	Color	Enfrente: Verde con aureolas salmón Detrás: Verde con aureolas salmón	
		Tamaño	6x6 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Cremoso	
A	W.C-T-Tra 1-Caja 3	Color	Enfrente: Blanco, café, amarillo Detrás: Blanco (borde), Amarillo (centro)	
		Tamaño	8x7 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonosa-Polvosa	
B	W.C-T-Tra 1-Caja 2	Color	Enfrente: Blanco con aureola amarilla Detrás: Blanco	
		Tamaño	8x8 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonosa-Polvosa	

C	W.C-T-Tra 1-Caja 2	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Blanco	
		Tamaño	3x4 cm	
		Aspecto	Plegado	
		Textura	Aterciopelado	
D	W.C-T-Tra 1-Caja 3	Color	Enfrente: Verde opaco (centro), blanco (borde) Detrás: Negro (centro), blanco (borde)	
		Tamaño	5.5x4 cm	
		Aspecto	Crateriforme	
		Textura	Terrosa	
E	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Verde opaco (centro), blanco (borde) Detrás: Negro (centro), blanco (borde)	
		Tamaño	2x2 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso	
F	W.C-T-Tra 2-Caja 2	Color	Enfrente: Violeta (centro), blanco Detrás: Café (centro), blanco	
		Tamaño	4.5x3.5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Polvoso	

G	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Verde opaco (centro), blanco (borde) Detrás: Negro (centro), blanco (borde)	
		Tamaño	3x 2.5 cm	
		Aspecto	Crateriforme	
		Textura	Aterciopelado	
H	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Color	Enfrente: Beige (centro), café, blanco (borde) Detrás: Vino tinto, blanco (borde)	
		Tamaño	3.5x4.5 cm	
		Aspecto	Radiado húmedo	
		Textura	Algodonoso	
I	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Color	Enfrente: Gris (centro), blanco (borde) Detrás: Gris (centro), blanco (borde)	
		Tamaño	5x4.5 cm	
		Aspecto	Radiado-Micelio aéreo-Crateriforme	
		Textura	Algodonoso-Polvoso	
J	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Color	Enfrente: Gris (centro), blanco Detrás: Gris, blanco (borde)	
		Tamaño	6x5.5 cm	
		Aspecto	Crateriforme-Radiado	
		Textura	Algodonoso-Velloso	

K	W.C-T-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Morado aureolas blancas Detrás: Negro (centro), Café (alrededor)	
		Tamaño	5x5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Velloso	
L	W.C-T-Tra 3-Caja 2	Color	Enfrente: Gris (centro), blanco Detrás: Gris, blanco (borde)	
		Tamaño	4.5x5.5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso	
M	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Color	Enfrente: Gris, blanco (borde) Detrás: Negro, blanco (borde)	
		Tamaño	4x4.5 cm	
		Aspecto	Crateriforme	
		Textura	Polvoso-Velloso (borde)	
N	W.C-T-Tra 3-Caja 3	Color	Enfrente: Verde Detrás: Café (centro), amarillo (borde)	
		Tamaño	3.5x2.5 cm	
		Aspecto	Húmedo	
		Textura	Algodonoso-Velloso (Borde)	

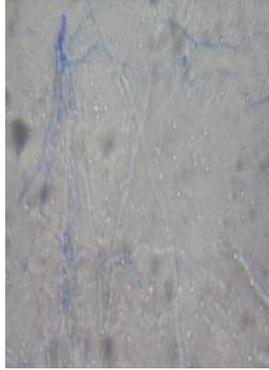
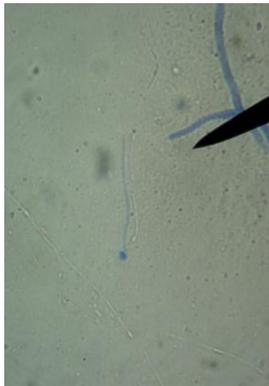
O	W.C-T-Tra 3-Caja 1	Color	Enfrente: Blanco Detrás: Café (centro), Blanco	
		Tamaño	7.5x7.5 cm	
		Aspecto	Radiado	
		Textura	Algodonoso-Veloso	

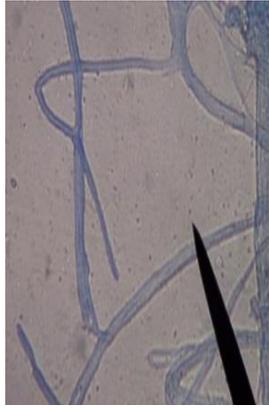
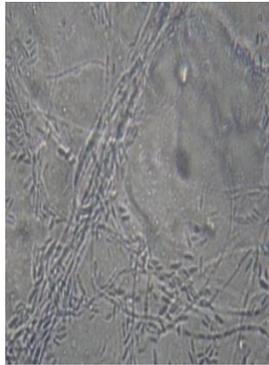
Realizando una revisión macroscópica (a simple vista) de cada uno de los hongos se observa que tienen características diferentes, aunque cambia la forma, el color y la textura de estos dependiendo del medio en el cual sean sembrados, esto es debido a los nutrientes que el agar pueda proporcionarles, y por esto se pueden ver desarrolladas diferentes características y es de aclarar que los hongos presentan dimorfismo, lo que quiere decir que cambian constantemente sus características macro pero su morfología microscópica es igual (Mártinez 2010).

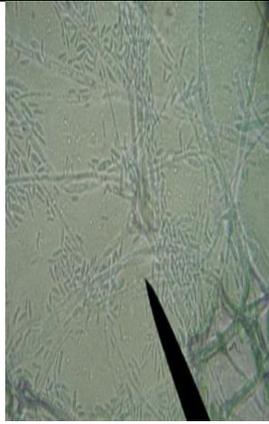
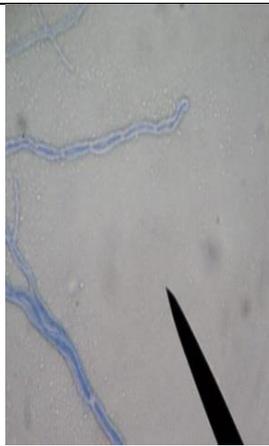
La identificación macroscópica es de gran importancia en la realización de cualquier proyecto sobre hongos, ya que si se cuenta con una buena base de datos con información confiable y verdadera, los resultados serán lo más próximo posible comparado con la literatura; esto es de gran ayuda, ya que permite seguir trabajando en la búsqueda de información sobre los hongos obtenidos, pero hay que tener en cuenta que para corroborar lo encontrado se debe continuar con un análisis microscópico, donde se llega más a profundidad sobre las características del hongo (tipo de hifas, esporas, reproducción), realizando tinciones con Azul de Lactofenol la cual permite ver la forma definida de las hifas y esporas de cada hongo, los resultados de este análisis microscópico se puede ver en la Tabla 7.

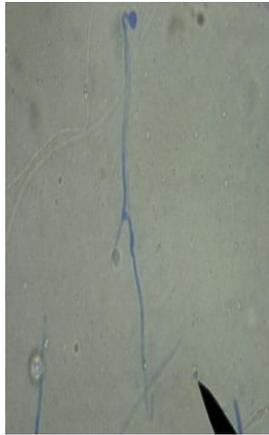
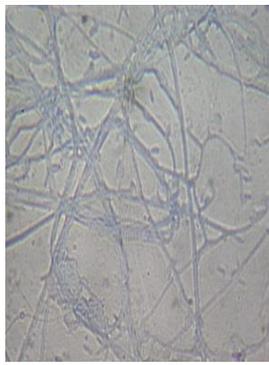
Tabla 7. Análisis microscópico.

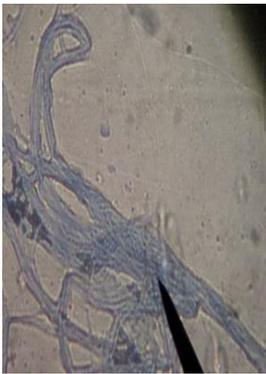
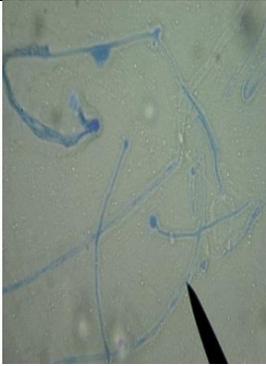
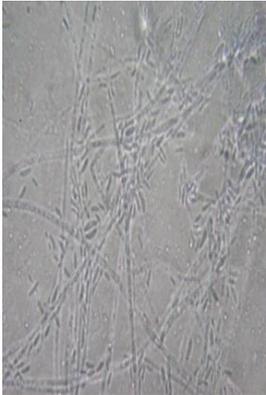
CÓDIGO PURO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS		IMAGEN A 40X
01	W.C-H-Tra 1-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	

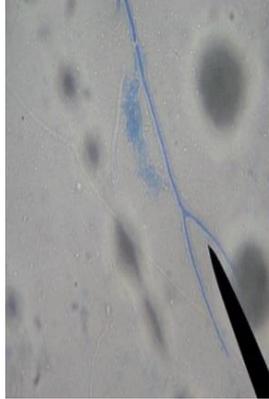
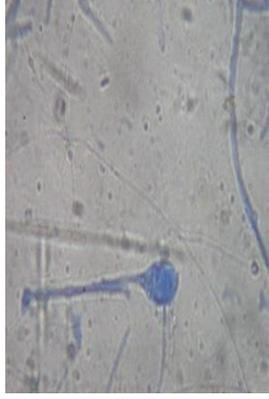
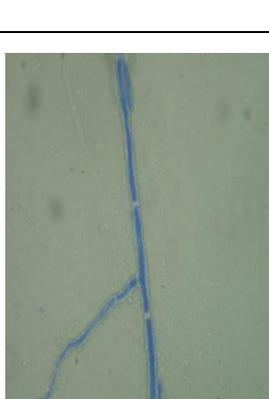
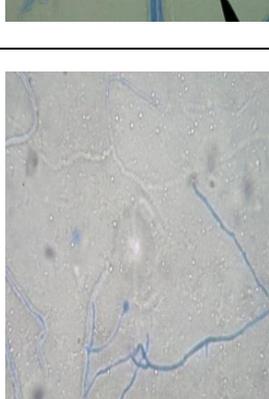
02	W.C-H-Tra 1-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
03	W.C-H-Tra 1-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
04	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
05	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Conidiosporas	

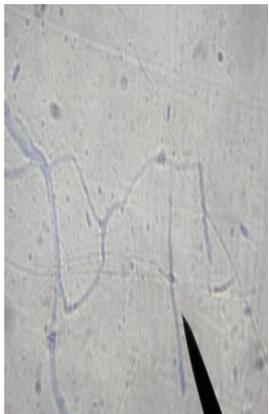
06	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
07	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
08	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
09	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	

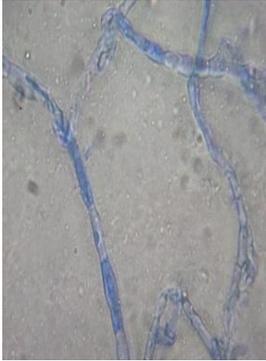
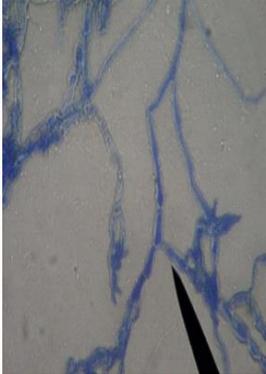
10	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
11	W.C-H-Tra 2-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
12	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
13	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	Si	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	

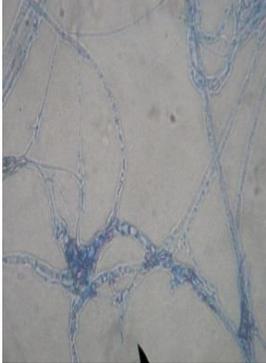
14	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
15	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
16	W.C-H-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
17	W.C-H-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	

18	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
19	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
20	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
21	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	

22	W.C-H-Tra 1-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
A	W.C-T-Tra 1-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
B	W.C-T-Tra 1-Caja 2	Septos (si/no)	Si	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
C	W.C-T-Tra 1-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	

D	W.C-T-Tra 1-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
E	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
F	W.C-T-Tra 2-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
G	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	

H	W.C-T-Tra 2-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
I	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Septos (si/no)	Si	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
J	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
K	W.C-T-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	

L	W.C-T-Tra 3-Caja 2	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
M	W.C-T-Tra 2-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Esporangiosporas	
N	W.C-T-Tra 3-Caja 3	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	X	
		Tipos de esporas	No Fructificó	
O	W.C-T-Tra 3-Caja 1	Septos (si/no)	No	
		Estructura de Reproducción	Asexual	
		Tipos de esporas	Artrosporas	

Realizando una revisión microscópica; se observa los tipos de hifas, esporas y reproducción, donde se hace hincapié en que los hongos tienen características diferentes entre ellos. Aunque los hongos procedan del mismo material vegetal de estudio y son sembrados en el mismo tipo de agar, esto no quiere decir de que van a tener las mismas similitudes y características.

6.1.2 Análisis Estadístico

6.1.2.1 Análisis de la Normalidad (Shapiro-Wilks)

A la tabla 3, la cual relaciona la cantidad de hongos aislados por caja en cada tratamiento, se le realizó un análisis de la normalidad para conocer la efectividad de los tratamientos utilizados, para luego proceder a realizar el análisis adecuado, ya sea análisis de la varianza: paramétrica (ANOVA) o no paramétrica (Kruskal Wallis).

En el Anexo 6, se puede observar un $p > 0,05$ lo que indica que los datos se comportan con una distribución normal. Como los datos presentan dicha distribución, se procedió a realizar análisis ANOVA y pos-ANOVA (Test de Duncan). El Test de Duncan se realizó, para corroborar los datos que se obtuvieron en el análisis ANOVA.

6.1.2.2 Análisis de la Varianza (ANOVA)

Al conocer el comportamiento de los datos se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) y post-ANOVA (Test de Duncan), para realizar la comparación entre las muestras, cajas y tiempos, obteniendo medias con $p > 0,05$ (Anexo 6 y 7), lo cual indica que no son significativamente diferentes, o sea, que todos los tratamientos utilizados son efectivos.

Lo observado en el Anexo 7, puede darse porque las muestras sembradas en cada caja provienen del mismo material vegetal.

En el Anexo 8, se puede observar que los tiempos de cada tratamiento no afectaron el crecimiento en cada caja, por lo cual se puede inferir que la exposición a tiempos diferentes del material vegetal en hipoclorito al 1% no afecta al microorganismo endofítico y solo inhibe el crecimiento de contaminantes externos, lo cual se pudo corroborar con la siembra de los últimos lavados de cada tratamiento (Anexo 2), los cuales no mostraron crecimiento alguno (sin contaminación).

6.1.2.3 Análisis Multivariado: Análisis de Conglomerados.

Con los datos obtenidos (segunda derivada) en el análisis espectroscópico (IR), se construyó una serie de tablas en Excel (Matrices); los rangos (longitud de onda cm^{-1}) utilizados fueron: Matriz

Total (todos los resultados), Matriz 2 (3880-2850 cm⁻¹), Matriz 3 (2810-1870 cm⁻¹) y Matriz 4 (1869-1680 cm⁻¹), estos fueron los rangos utilizados, ya que contienen los grupos funcionales (carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, aminas) más representativos en sus metabolitos primarios, luego se procedió a realizar el análisis de Conglomerados. Este análisis permite obtener un Dendograma (diagrama de datos en forma de árbol), en el cual se puede observar con mayor facilidad la similitud o cercanía que existe entre los hongos endofíticos obtenidos y las respectivas referencias. Los hongos de referencias utilizados fueron: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Aspergillus niger* y *Colletotrichum* (observar Anexo 9) (Gómez & Gutierrez, 2014).

- **Matriz Total**

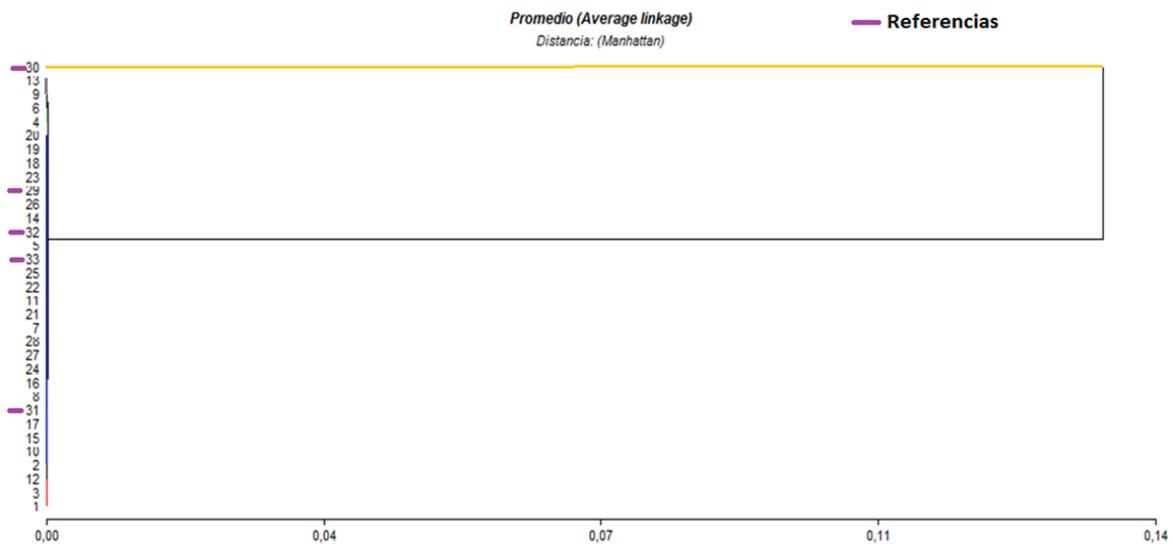


Figura 10. Dendograma obtenido para la Matriz Total.

- **Matriz 2 (3880-2850 cm^{-1})**

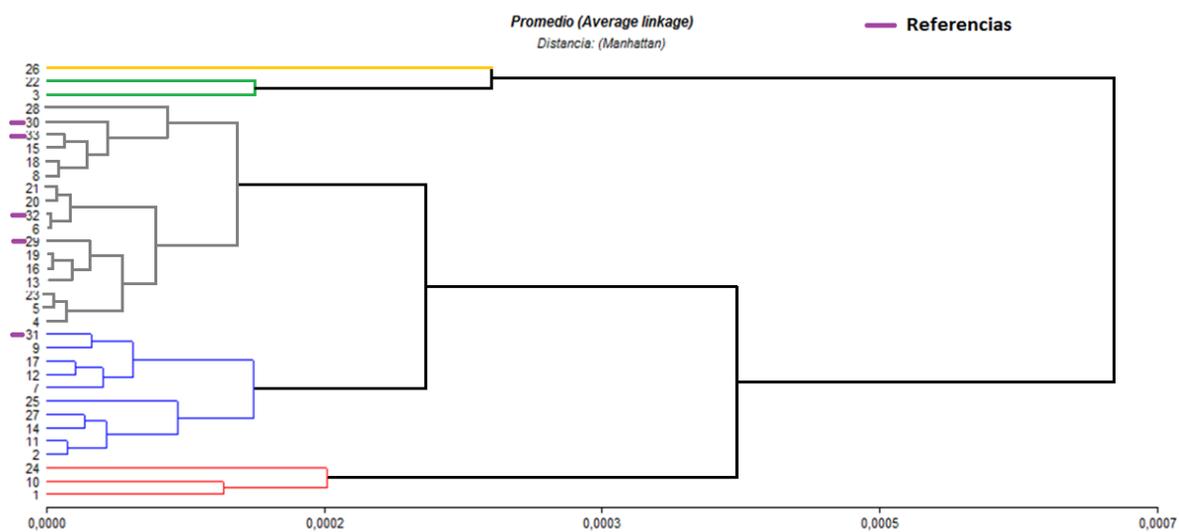


Figura 11. Dendrograma obtenido para la Matriz 2.

- **Matriz 3 (2810-1870 cm^{-1})**

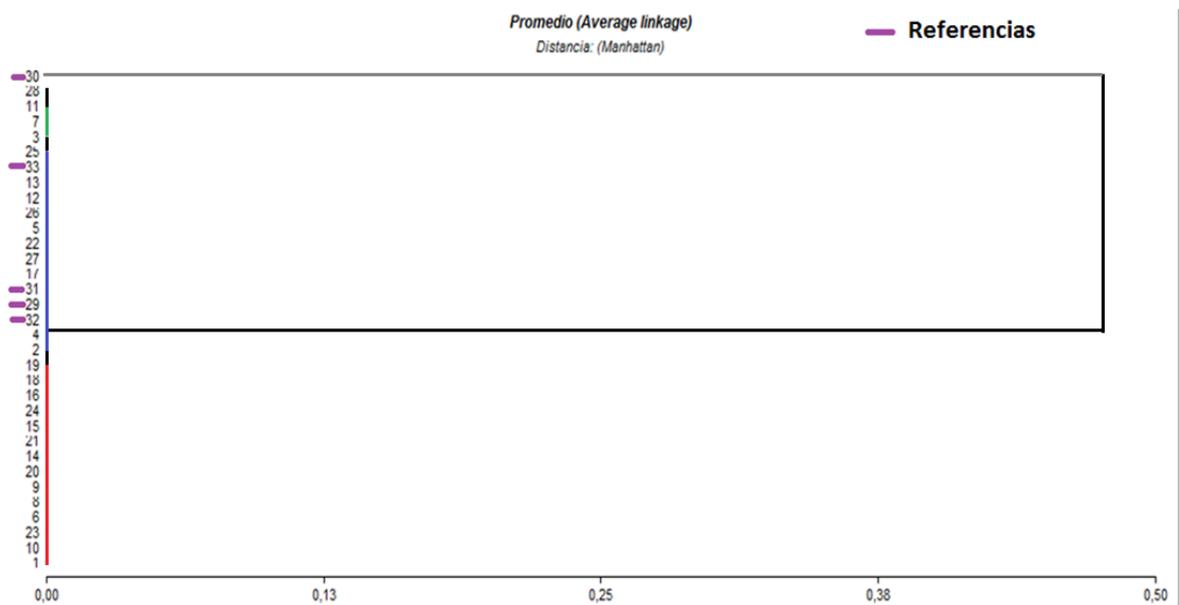


Figura 12. Dendrograma obtenido para la Matriz 3.

- **Matriz 4 (1869-1680 cm⁻¹)**

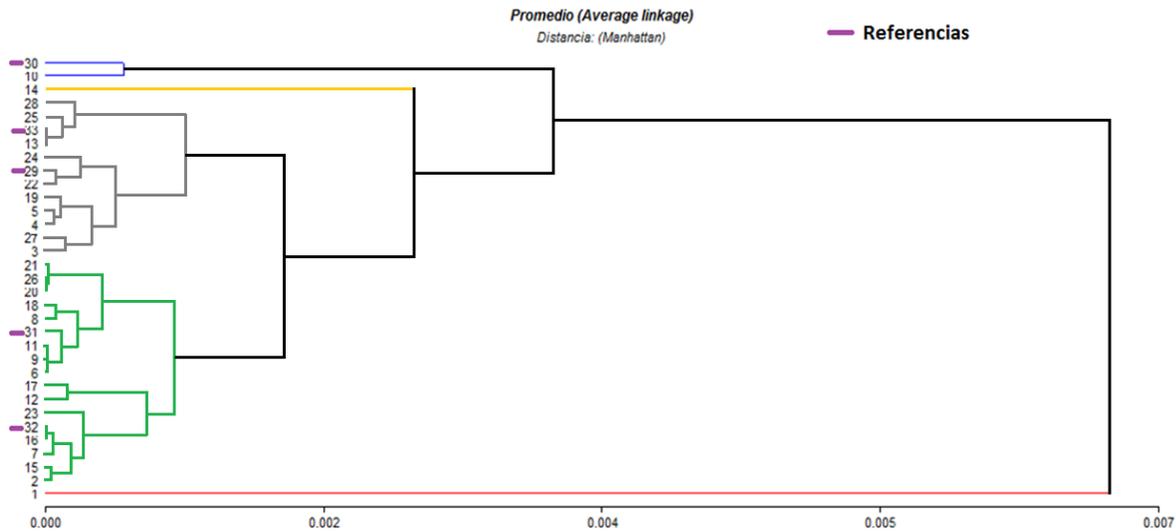


Figura 13. Dendrograma obtenido para la Matriz 4.

El análisis Cluster (análisis de conglomerados) tiene una importante tradición de aplicación en muchas áreas de investigación, ya que es un procedimiento estadístico que parte de un conjunto de datos que contiene información sobre una muestra (material de estudio) e intenta reorganizarlas en grupos relativamente homogéneos. Sin embargo, junto con lo beneficioso del Análisis Cluster existen algunos inconvenientes. El análisis Cluster es una técnica descriptiva, atórica y no inferencial. El análisis Cluster no tiene bases estadísticas sobre las que deducir inferencias estadísticas para una población a partir de una muestra, es un método basado en criterios geométricos y se utiliza fundamentalmente como una técnica exploratoria, descriptiva pero no explicativa. Las soluciones no son únicas, en la medida en que la pertenencia al conglomerado para cualquier número de soluciones depende de muchos elementos del procedimiento elegido. Por otra parte, la solución Cluster depende totalmente de las variables utilizadas, la adición o destrucción de variables relevantes puede tener un impacto substancial sobre la solución resultante (Fuente, 2011).

Ya que no existe un criterio para seleccionar cuál de los algoritmos (Cluster) es mejor, la decisión es normalmente subjetiva y depende del método que mejor refleje los propósitos de cada estudio particular, por lo cual, se puede inferir que algunos hongos presentan similitud o cercanía entre ellos mismos y respecto a los de referencia (Figura 10, 11, 12 y 13). Si se analiza los cuatro dendrogramas en conjunto, se observa que la similitud o cercanía entre los hongos va variando (algunos hongos van cambiando de familia y género), por lo tanto, analizar los hongos en conjunto no sería una forma adecuada para ir construyendo una tabla de “hipótesis” con familia y género. Aunque, tampoco sería adecuado ir deduciendo una tabla de “hipótesis” de cada Dendrograma, ya que la lectura se hace un poco complicado para la matriz total (Figura 10), donde no hubo una buena separación de las líneas para realizar el análisis Cluster. Lo mismo ocurre para la matriz 2 (Figura 11). En las otras dos matrices (Figura 12 y 13), se dio una mejor separación de las líneas,

se observa que los hongos se van distribuyendo en 5 colores (esto depende del número de hongos de referencia que se tenían) donde se van agrupando de acuerdo a las características similares (metabolitos primarios) con los de referencia., donde también se puede observar que algunos de los hongos de referencia se encontraban agrupados en un mismo color, por lo cual, la técnica es un manera de precisar las correlaciones que existen entre los hongos, mas no una forma adecuada de agrupamiento en familias y géneros.

Tabla 8. Similitud o cercanía entre los hongos aislados y los de referencia.

Hongos de Referencia	Código Hongos Aislados (Similitud o cercanía)	Familia Vegetal (Revisión Bibliográfica)	Especie Vegetal más común (Revisión Bibliográfica)
<i>Fusarium solani</i>	19, 16, 13, 23, 5, 4	Solanaceae, Fabaceae, Cucurbitaceae	<i>Pisum sativum</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>V. faba</i>
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	28, 15, 18, 8	Platanaceae, Musaceae	<i>Platanus occidentalis</i> M. <i>paradisiaca</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	9, 17, 12, 7	Solanaceae, Apiaceae, Platanaceae, Musaceae, Brassicaceae,	Más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas
<i>Aspergillus niger</i>	21, 20, 6	Solanaceae, Asteraceae, Rutaceae	<i>Lactuca sativa</i> , <i>S. lycopersicum</i> , <i>C. × limon</i>
<i>Colletotrichum</i>	15, 18, 8, 28	Solanaceae, Anacardiaceae, Passifloraceae, Moraceae	<i>S. quitoense</i> , <i>M. indica</i> , <i>Passiflora ligularis</i>

Como se observa en la Tabla 8, los hongos endofíticos aislados se fueron agrupando con respecto a los de referencia, esto es debido a que tienen características similares en sus metabolitos primarios (grupos funcionales más representativos), y el software Infostat encuentra o agrupa esta similitud o cercanía entre ellos. En la tabla también se observan algunas familias y especies en las que es más común encontrar los hongos de referencia. Esta tabla se realizó de acuerdo a lo analizado en la Matriz 2 (Figura 11), que comprende un rango en el espectro de infrarrojo de 3880-2850 cm⁻¹, en él se encuentra los carbohidratos y proteínas más representativos de sus metabolitos primarios. En el Dendograma obtenido para la Matriz 2 (Figura 11), se observa que algunos de los hongos endofíticos aislados (26, 22, 3, 24, 10, 1, 25, 27, 14, 11 y 2) no presentaron ninguna similitud o cercanía con respecto a los de referencia.

6.2 Bacterias

La recolecta del material vegetal se realizó el día 16 de septiembre en horas de la tarde en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, se transportaron al laboratorio de Biotecnología-Productos Naturales de la escuela de química y se guardaron en bolsas ziploc en la nevera, para procesarlas en un periodo no superior a 24 horas. El día 17 de septiembre en horas de la mañana se realizó la siembra del material recolectado.

Pasadas 48 horas después de la siembra del material, se observó el crecimiento de las bacterias endofíticas, y de un hongo de color blanco en algunas de las cajas, la formación de este hongo únicamente sobre las secciones de la planta sembradas, nos llevó a concluir que se podía tratar de un microorganismo característico de la descomposición de la materia.

A las cajas se les designo un código para identificar la especie, el tejido y el tratamiento del que provienen (material vegetal), las cajas de Agar bacteriológico se enumeraron de 1 a 3, esto es debido a que se realizó por triplicado. Esto se puede observar en la Tabla 2. El código del agua del enjuague es el mismo que el de la caja de Agar bacteriológico y se nombró como agua de último lavado.

Las bacterias obtenidas en la primera siembra se muestran en la Tabla 9, la cual relaciona la cantidad de aislados por caja en cada tratamiento. Para conocer la efectividad de estos, se compararon con un análisis de la normalidad (Shapiro-Wilk).

Tabla 9. Bacterias obtenidas de la primera siembra del material vegetal (H: Hojas y T: Tallos).

TRATAMIENTO	CAJA	BACTERIAS (H)	BACTERIAS (T)
Tratamiento 1	1	3	3
	2	1	1
	3	3	3
Tratamiento 2	1	3	1
	2	3	3
	3	3	1
Tratamiento 3	1	1	4
	2	1	3
	3	4	1
TOTAL BACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS		22	20

En las cajas del agua de último lavado no se observó crecimiento alguno, esto quiere decir que las bacterias obtenidas provienen del tejido interno de la planta (endofíticas); y que los tratamientos empleados fueron efectivos.

Después de realizar el repique de las bacterias, hasta obtenerlas puras, se les asignó un código puro, como se observa en la Tabla 10.

El Agar seleccionado para realizar la purificación de las bacterias fue Mueller-Hinton, debido a que en este se observó mejor crecimiento que en el Agar bacteriológico (Agar de inicio), además también hubo una comparación con el crecimiento en el Agar Sabouraud, en el cual no se pudo diferenciar las colonias a simple vista.

Tabla 10. Código puro de cada bacteria.

CÓDIGO PURO	NOMBRE
01	W.C-H-Tra 1-Caja 3
02	W.C-T-Tra 3-Caja 1
03	W.C-T-Tra 3-Caja 1
04	W.C-H-Tra 1-Caja 2
05	W.C-H-Tra 1-Caja 1
06	W.C-H-Tra 3-Caja 2
07	W.C-H-Tra 3-Caja 3
08	W.C-H-Tra 2-Caja 2
09	W.C-T-Tra 1-Caja 1
10	W.C-T-Tra 2-Caja 2
11	W.C-H-Tra 3-Caja 3
12	<i>Bacillus subtilis</i>
13	<i>Escherichia coli</i>
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	<i>Staphylococcus aureus</i>

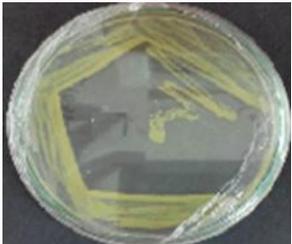
Las bacterias identificadas con los códigos puros de 12 a 16 son las referencias utilizadas para realizar el análisis multivariado (conglomerados).

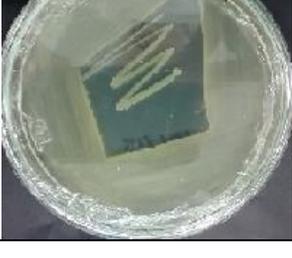
6.2.1 Análisis macroscópico

El análisis macroscópico es de gran importancia al momento de caracterizar microorganismos, en el caso de las bacterias la observación de las diferentes características de las colonias, como color, forma, superficie y borde, son el punto de partida para su clasificación. Los resultados se pueden observar en la Tabla 11.

A simple vista se pudo observar que algunas de las bacterias aisladas presentaron características similares, pero también algunas de las bacterias se pudieron diferenciar fácilmente. Para obtener información más completa se continuó con un análisis microscópico (observar Tabla 12).

Tabla 11. Análisis macroscópico.

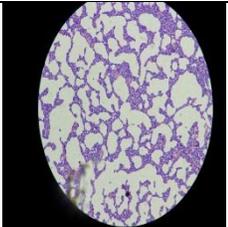
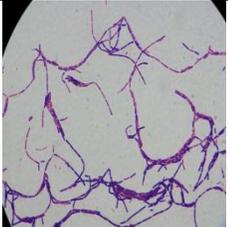
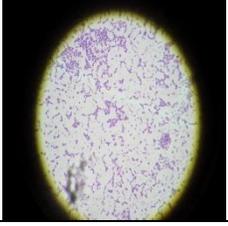
CÓDIGO PURO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS		IMAGEN EN MUELLER HINTON 2 DÍAS
01	W.C-H-Tra 1-Caja 2	Color	Amarillo	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	
02	W.C-T-Tra 3-Caja 1	Color	Amarillo	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	
03	W.C-T-Tra 3-Caja 1	Color	Amarillo	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	

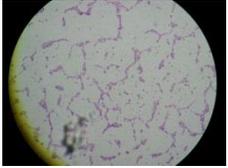
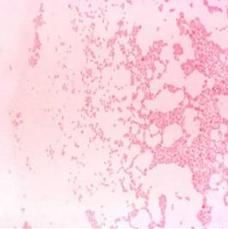
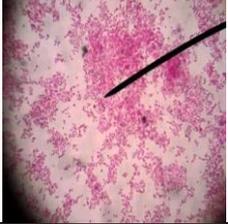
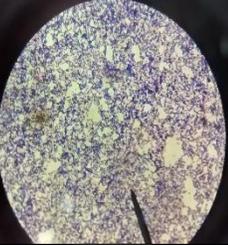
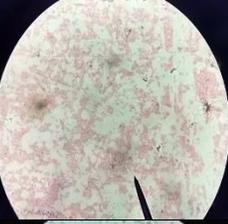
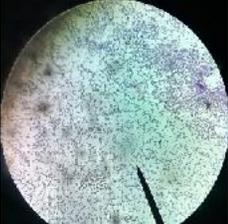
04	W.C-H-Tra 1- Caja 2	Color	Amarillo claro	
		Forma	Puntiforme	
		Superficie	Plana convexa	
		Borde	Redondeado	
05	W.C-H-Tra 1- Caja 2	Color	Amarillo claro	
		Forma	Puntiforme	
		Superficie	Plana convexa	
		Borde	Redondeado	
06	W.C-H-Tra 3- Caja 3	Color	Amarillo	
		Forma	Puntiforme	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	
07	W.C-H-Tra 3- Caja 3	Color	Amarillo claro	
		Forma	Puntiforme	
		Superficie	Plana convexa	
		Borde	Redondeado	
08	W.C-H-Tra 2- Caja 2	Color	Amarillo claro	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	
09	W.C-T-Tra 1- Caja 1	Color	Rosado	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	

10	W.C-T-Tra 2- Caja 2	Color	Blanco	
		Forma	Puntiforme	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeado	
11	W.C-H-Tra 3- Caja 3	Color	Amarillo	
		Forma	Circular	
		Superficie	Plana	
		Borde	Redondeada	

6.2.2 Análisis microscópico

Tabla 12. Análisis microscópico.

CÓDIGO PURO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS		IMAGEN A 100X
		Forma	Cocos	
01	W.C-H-Tra 1- Caja 2	Tinción de Gram	Gram positivos	
02	W.C-T-Tra 3- Caja 1	Forma	Bacilos	
		Tinción de Gram	Gram positivos	
03	W.C-T-Tra 3- Caja 1	Forma	Cocos	
		Tinción de Gram	Gram positivos	
04	W.C-H-Tra 1- Caja 2	Forma	Bacilos	

		Tinción de Gram	Gram positivos	
05	W.C-H-Tra 1-Caja 2	Forma	Cocos	
		Tinción de Gram	Gram negativos	
06	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Forma	Cocos	
		Tinción de Gram	Gram negativos	
07	W.C-H-Tra 3-Caja 3	Forma	Bacilos	
		Tinción de Gram	Gram positivos	
08	W.C-H-Tra 2-Caja 2	Forma	Cocos	
		Tinción de Gram	Gram negativos	
09	W.C-T-Tra 1-Caja 1	Forma	Bacilos	
		Tinción de Gram	Gram positivos	
10	W.C-T-Tra 2-Caja 2	Forma	Bacilos	
		Tinción de Gram	Gram positivos	
11		Forma	Bacilos	

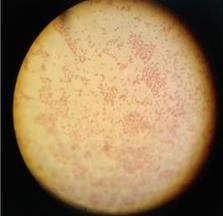
	W.C-H-Tra 3- Caja 3	Tinción de Gram	Gram negativos	
--	------------------------	--------------------	-------------------	---

Tabla 13. Análisis microscópico de las bacterias de referencia.

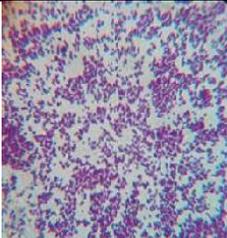
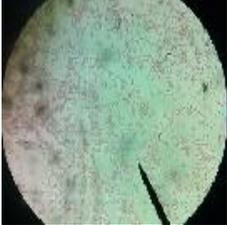
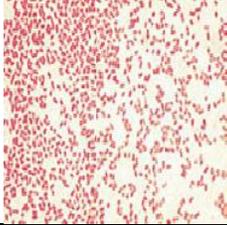
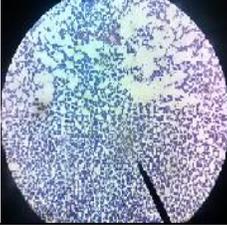
NOMBRE	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS		IMAGEN A 100X
	Forma	Bacilos	
<i>Bacillus subtilis</i>	Forma	Bacilos	
	Tinción de Gram	Gram positivos	
<i>Escherichia coli</i>	Forma	Bacilos	
	Tinción de Gram	Gram negativos	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Forma	Bacilos	
	Tinción de Gram	Gram negativos	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Forma	Bacilos	
	Tinción de Gram	Gram negativos	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Forma	Cocos	
	Tinción de Gram	Gram positivos	

Tabla 14. Pruebas bioquímicas.

CÓDIGO PURO	PRUEBA BIOQUÍMICA		CLASIFICACIÓN
01	Catalasa	Positivo	Género Staphylococcus
	Coagulasa	Negativo	
03	Catalasa	Positivo	Género Staphylococcus
	Coagulasa	Negativo	
11	Lactosa	Positivo	Familia Enterobacteriaceae
	Oxidasa	No aplica	

Cuando se estudian las características microscópicas de las bacterias se tiene especial interés en algunos rasgos de la célula individual, como forma, tamaño y tipo de agrupación. Sin embargo, en el estudio de las características físicas y bioquímicas de los cultivos, se busca el comportamiento grupal o colonial, puesto que cada colonia representa una masa densa de bacterias, originada usualmente de una sola célula que quedo dispersa en el medio sólido. Estas características coloniales propias de la especie a la que pertenecen dependen del tipo de medio de cultivo en el cual se inoculo, la temperatura y la atmosfera de incubación. La descripción de las características coloniales siempre debe de hacerse a partir de las colonias bien aisladas y de un cultivo joven (Cavallini, 2005).

En los resultados obtenidos en el análisis microscópico, se encuentra que hay similitud entre las características de algunas de las bacterias endofíticas aisladas (entre las bacterias designadas con el código puro 1, 2, 3 y 11, y también entre 4 y 5,); las pruebas bioquímicas realizadas con algunas de las bacterias (las bacterias designadas con el código puro 1, 3 y 11) permitieron establecer una clasificación hasta género siguiendo el esquema que se describe en la figura 7, cabe resaltar que esta información es menos subjetiva que la aportada por los resultados macroscópicos, permitiendo así una caracterización más confiable, la cual fue complementada con el análisis espectroscópico. La tinción de Gram y las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias se llevaron a cabo en un periodo de 48 a 72 horas, obteniendo los resultados descritos en las Tablas 13 y Tabla 14, respectivamente.

6.2.3 Análisis Estadístico

6.2.3.1 Análisis de la Normalidad (Shapiro-Wilk) y Análisis no paramétrico (Kruskal Wallis)

El test de Shapiro-Wilks es un contraste de ajuste que se utiliza para comprobar si determinada cantidad de datos viene de una distribución normal, Shapiro & Wilks definieron el estadístico de prueba (W) con un valor máximo de 1, donde entre más cercano se esté de ese valor, se puede

afirmar que la distribución es normal (Rojas, 2010). De acuerdo con esta información se analizaron los datos obtenidos en el test mostrado en el anexo 10, del cual se obtuvo un W relativamente cercano a 1, lo cual no es suficiente para dar una conclusión acerca de la distribución de los datos, para esto se debe tener en cuenta el valor de probabilidad p , el cual rechaza la hipótesis de que la distribución normal es adecuada para los datos, si su valor es <0.05 ; teniendo en cuenta esto se concluyó que los datos no provenían de una distribución normal.

El análisis de la normalidad es solo un paso a realizar cuando se desea conocer si hay o no una diferencia significativa entre cierta cantidad de datos. Existen pruebas que se realizan para determinar dicha diferencia, el test de Kruskal Wallis es un análisis de la varianza no paramétrico, con el cual se puede rechazar o aceptar una hipótesis nula. Los resultados del test (Anexo 10) muestran un estadístico H , para el cual existe un p -valor <0.05 , esto quiere decir que la hipótesis nula de que los tratamientos utilizados no son significativamente diferentes es aceptada. Los tres tratamientos son efectivos para la desinfección de la parte externa y no afectan los microorganismos presentes en el tejido interno de la planta.

Aunque con el análisis estadístico se encontró que de todos los tratamientos se pueden obtener bacterias endofíticas, es importante aclarar que con el número de aislados (Tabla 8) se logró concluir que con el tratamiento que se obtuvo mejor crecimiento de bacterias de la parte interna, en el caso de las hojas, fue del número 2, y en el de los tallos fue del número 3.

6.2.3.2 Análisis multivariado (conglomerados)

Con los datos obtenidos (segunda derivada) en el análisis espectroscópico (IR), se construyó una serie de tablas en Excel (Matrices); los rangos (longitud de onda cm^{-1}) utilizados fueron: Matriz Total (todos los resultados), Matriz 2 (3880-2850), Matriz 3 (2810-1870) y Matriz 4 (1869-1680), luego se procedió a realizar el análisis de Conglomerados. Este análisis permite obtener un Dendograma (diagrama de datos en forma de árbol), en el cual se puede observar con mayor facilidad la similitud o cercanía que existe entre las bacterias endofíticas obtenidas y las respectivas referencias. Las bacterias de referencias utilizadas fueron: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (observar Anexo 12) (Gómez & Gutierrez, 2014).

- **Matriz Total**

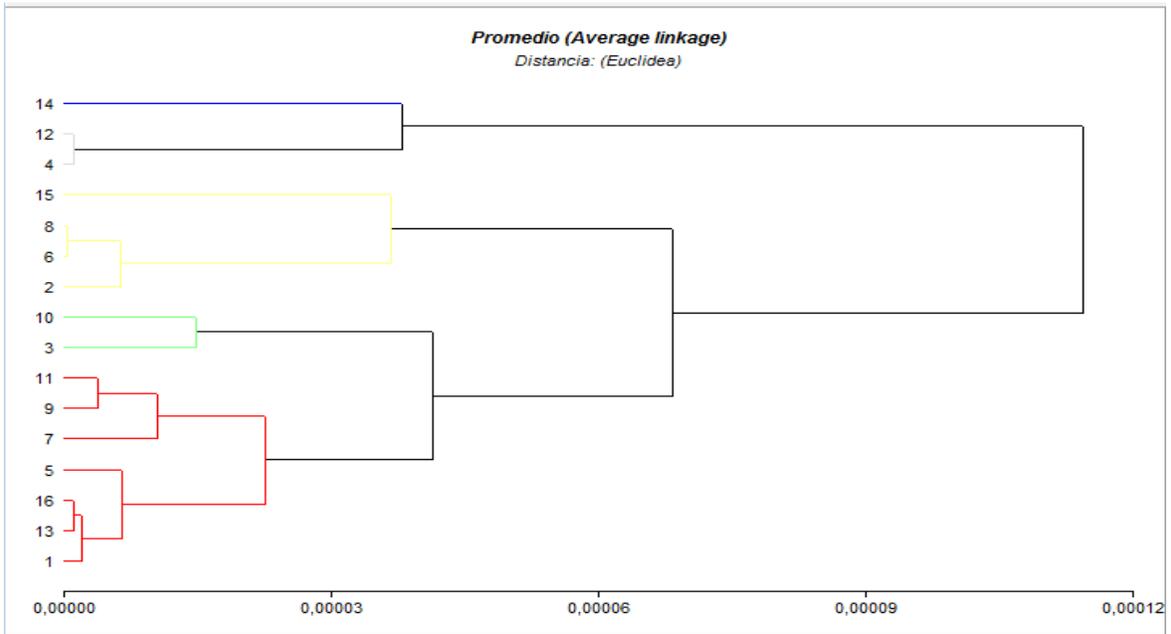


Figura 14. Dendrograma obtenido para la Matriz Total.

- **Matriz 2 (3880-2850)**

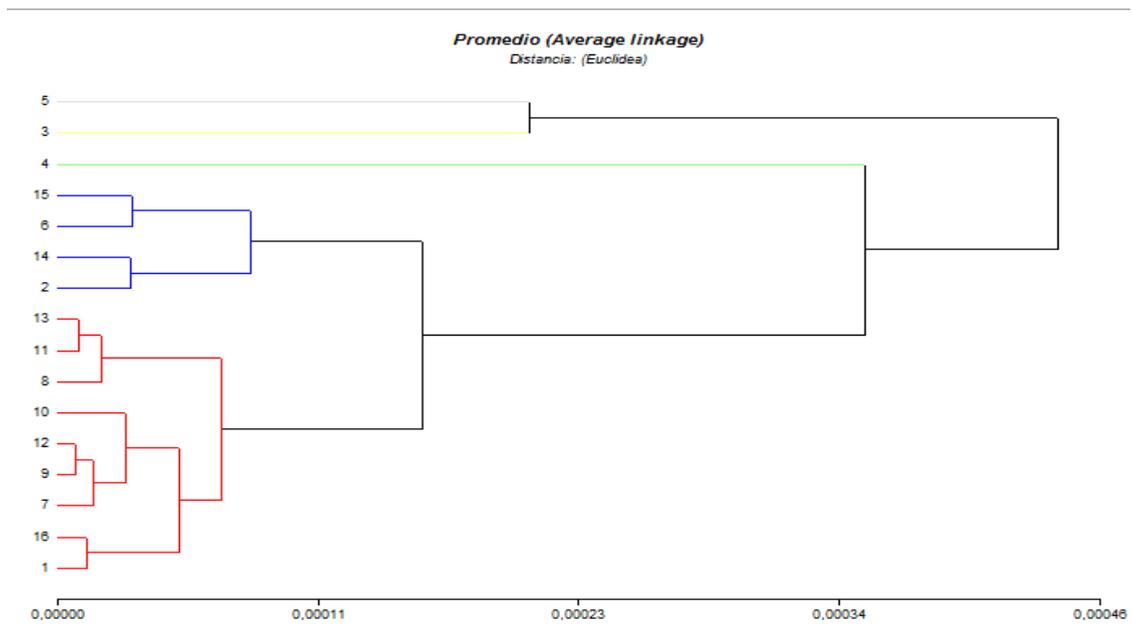


Figura 15. Dendrograma obtenido para la Matriz 2.

- **Matriz 3 (2810-1870)**

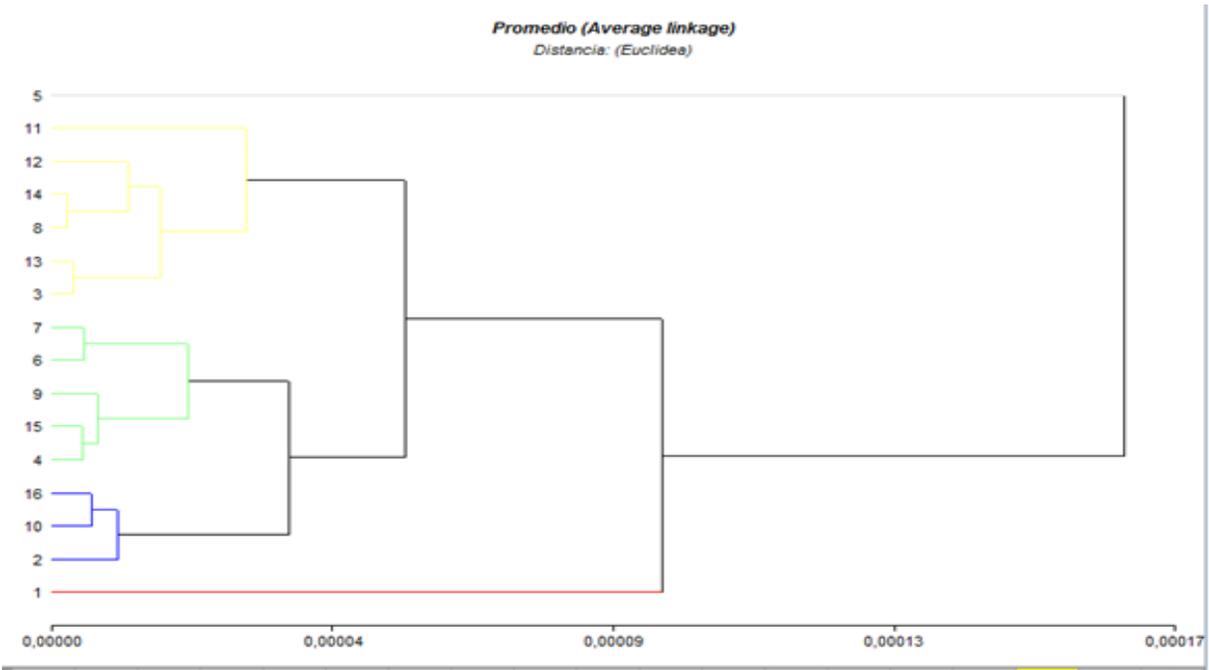


Figura 16. Dendrograma obtenido para la Matriz 3.

- **Matriz 4 (1869-1680)**

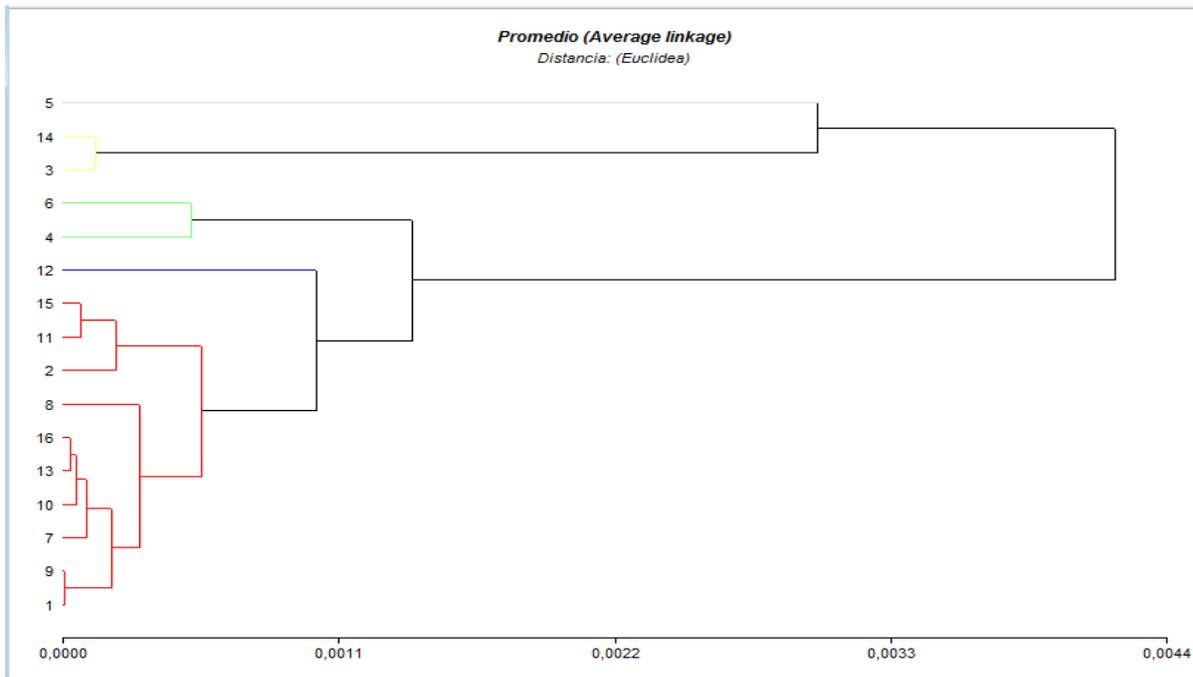


Figura 17. Dendrograma obtenido para la Matriz 4.

Tabla 15. Relación de las bacterias obtenidas con las referencias en la matriz total.

Bacteria de Referencia	Código Bacterias Aislados (Similitud o cercanía)	Familia Vegetal (Revisión Bibliográfica)	Especie Vegetal más común (Revisión Bibliográfica)
<i>Bacillus subtilis</i>	4	Myrtaceae, Solanaceae	<i>Psidium guajava</i> , <i>Solanum tuberosum</i>
<i>Escherichia coli</i>	1, 5, 11, 9, 7	Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8, 6, 2	Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1, 5, 11, 9, 7	Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i>

El análisis de conglomerados es una técnica multivariante que permite agrupar casos de una matriz rectangular en subgrupos o agrupamientos. La ocurrencia de este agrupamiento se debe a una supuesta relación natural entre los casos de cada conglomerado, de modo que esta técnica permitirá al investigador determinar si los datos de que dispone se pueden agrupar de alguna forma significativa (Rojas, 2010).

Existen dos problemas clave en la aplicación del análisis de conglomerados. El primero se refiere al tipo de medida de similitud inter-objeto más adecuado para los datos que tenemos. El segundo hace referencia al tipo de procedimiento que debemos emplear para formar los conglomerados en base a la medida de similitud escogida (Rojas, 2010).

Si se analizan los resultados obtenidos en cada Dendograma (Figura 14, 15, 16 y 17), se puede observar que en algunos de los rangos utilizados las bacterias se agrupan de forma diferente, esto se debe; como se mencionó en el párrafo anterior, la escogencia de la medida de similitud entre los datos es clave para la correcta aplicación de la técnica, esto quiere decir que al variar los rangos de longitud de onda esta medida de similitud cambia.

Para realizar una correlación de las bacterias endofíticas aisladas se utilizó la matriz total (Figura 14). Se pudo observar que las referencias utilizadas se relacionaban con la mayoría de las bacterias aisladas a excepción de las codificadas como 3 y 10, que no presentan similitud con estas. La bacteria *Klebsiella pneumoniae* no presenta relación con ninguna de las bacterias endofíticas en este caso, sin embargo cuando se analizan las otras matrices se observa que se relaciona con algunas de ellas (Ver Tabla 15).

La cepa purificada con el código 1, pertenece al género *Staphylococcus*, dando positiva la prueba de catalasa. Con los resultados obtenidos con la tinción de Gram se puede observar que presenta forma de coco y tinción Gram positiva, la cual es característica de este género. Por ultimo si se

observa la relación con las referencias en el análisis de conglomerados (Tabla 15), sus características son similares a las de la especie *Staphylococcus aureus*, pero debido a que se obtuvo un resultado negativo en la prueba de la coagulasa, se descartó que se tratase de esta especie.

La bacteria endofítica identificada con el código 3, se clasificó como *Staphylococcus* al dar positiva la prueba de la catalasa. Este resultado se pudo corroborar con la observación al microscopio de la tinción, en la cual se observó la forma de cocos Gram positivos.

La cepa purificada con el código 4, pertenece al género *Bacillus*, de acuerdo con la información aportada por el análisis de conglomerados (Tabla 15), además cuando se analizaron los resultados de la tinción se observó que tenía forma de bacilo Gram positivo, características de este género.

La bacteria endofítica identificada con el código 11, se clasificó como perteneciente a la familia Enterobacteriaceae de acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas, siendo fermentadora de lactosa. Otra característica importante es que presentó tinción Gram negativa y forma de bacilos, características particulares de géneros de esta familia como *Enterobacter* y *Escherichia*, entre otras. Además se pudo comparar esta información con la aportada por el análisis de conglomerados (Tabla 15), en el cual se observó la relación que presenta con la especie bacteriana *Escherichia coli*, perteneciente a la familia ya mencionada.

7. CONCLUSIONES

- Los tratamientos utilizados para la desinfección del material vegetal no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo cual se concluye que cualquier tratamiento es efectivo y no afecta el crecimiento de los microorganismos endofíticos, eliminando sólo contaminantes externos.
- Se obtuvieron 28 hongos y 11 bacterias endofíticas en el proceso de aislamiento y purificación de los mismos, siendo la mayoría de los microorganismos endofíticos procedentes de las hojas.
- La espectroscopia infrarroja fue útil para la clasificación de los microorganismos endófitos, siendo agrupados con las referencias utilizadas de acuerdo a características de similitud de sus metabolitos primarios.

8. RECOMENDACIONES

- Se sugiere completar la información obtenida por medio de técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos endofíticos.
- Realizar ensayos de actividad biológica con los microorganismos endofíticos que fueron dejados en conservación.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Angel, D. 2006. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN PARA HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURIFORMES EN EL CEPARIO DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, Bogotá D.C-Colombia.
- Arauz, L.. 1998. Fitopatología : Un Enfoque Agroecológico. Editorial Universidad de Costa Rica. p 467 pages.
- Azevedo, J. L.; MaCCheroni, W.; Araújo, W. L.; Pereira, J. O. 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron. J. Biotechnol*, 3(2). 40-65.
- DEPARTAMENTO de Bibliotecas. Biblioteca Universidad Tecnológica de Pereira. Disponible en : [Biblioteca: en línea]. Endophytic microorganism. [Fecha de consulta: 14 abril 2015]. Disponible en: <http://www.scopus.com>.
- Brock, T. 1997. Microbiología. *Editorial Prentice. Hall Hispanoamericana S.A, Sexta edición*, 23-28p.
- Cabañas, M. de la Luz, M. Lamothe, A. L. Suárez, D. Domínguez, Y. 2005. Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática.
- Carretero. 2004. Flora Arvense de Navarra. Universidad Pública de Navarra.
- Cavallini, E. 2005. Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. p. 475.
- Compant, S.; Reiter, B.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Clément, C.; Ait Barka, E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol*. 71:1685-1693.
- Fischer, G.; Silvia, B.; Ralf, T.; Dott, W. 2005. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64. 63-77.
- Fuente, S. 2011. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS. Empresariales, F. C. E. y., Ed. U. Autónoma de Madrid.
- García, H. 1992. Flora medicinal de Colombia. *Botanica medica. Tercer Mkundo Editores*.
- García, M. D.; Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas *Act SEM*. 30:12-6.

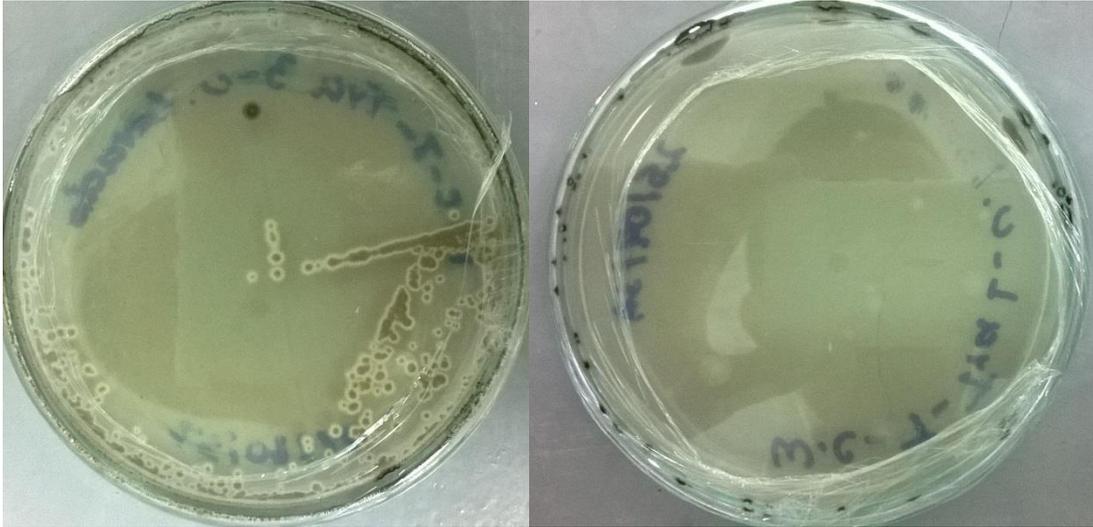
- Gómez, M. , & Gutierrez, K. (2014). *CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y QUÍMICA DE HONGOS MACROMICETOS DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA*. Escuela de Química. Universidad Tecnológica de Pereira.
- González, A. M.; Engelmann, F. 2013. Crioconservación de Plantas en América Latina. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). p 217.
- Granados, P. R. V., P. M, Microbiología Ciencias de la Salud. Editorial Paraninfo: 1997. 352 pages.
- Gyaneshwar, P.; James, E. K.; Mathan, N.; Reddy, P. M.; Reinhold-Hurek, B.; Ladha, J. K. 2001. Edophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratiamarcescens*. *J Bacteriol.* 183: 2634-2645.
- Harman, G. E. H. 2004. C.R; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology.* 2, 43-56.
- Hirsch, G. y. B., U. 1992 Communities of parasitic microfungi. En: Handbook of Vegetation Science. *Fungi in Vegetation Science (ed. Winterhoff FY), Volumen 19*, pp-225-250.
- Kikot, G. 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad: seccion IV Diversidad fenotípica de aislamientos de *F. graminearum* aplicando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Kloepper, J. W. R.-U., R; Zehnder, G. W; Murphy, J. F; Sikora, E; Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology.* 28, 21-26.
- Large, E. C. 1986. The Advance of the Fungi. *Nueva York: Dover.* 1940, Vol. 7; (b) Carroll, G. C., The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: Microbiology of the Phyllosphere (eds. Fokkema NJ, van den Huevel J). *Cambridge University Press, Cambridge.* Páginas 205–22.
- Lima, A. O.; Quecine, M. C.; Fungaro, M. H.; Andreote, F. D.; MacCheroni, W. J.; Araujo, W. L.; Silva-Filho, M. C.; PizziraniKleiner, A. A.; Azevedo, J. L. 2005. Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 68(1), 57-65.
- Mártinez , M. C. 2010. Microorganismos endófitos ¿amigos o enemigos de las plantas? *Revista Ciencia y Desarrollo.* 36, 242, p. 6-11.
- Miche, L.; Balandreau, J. 2008. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderiavietnamiensis* *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:3046-3052; (b) Ryan, R. P.; Germaine, K.; Franks, A.; Ryan, D. J.; Dowling, D. N., Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett.* 278:1-9.

- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In Fokkema, NJ; van den Heuvel, J. eds. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK. p. 175-187.
- Ramos, L.; Ramadan, S.; Lopez, C.; Bulacio, L.; Mellado, S. 2006. Empleo de discos de papel secante para la conservación de cepas de *Malassezia* spp. *Revista Iberoamericana Micol.* 23, 110-112.
- Rojas, H. A. 2010. Teoría estadística: aplicaciones y métodos. G. Ed. p. 450.
- Rojas, A. T. 2011. Conceptos y prácticas de microbiología general. U. Nacional. Ed.
- Rosenblueth, M.; Martinez Romero, E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181:337-344.
- Santos, C.; Fraga, M. E.; Kozakiewicz, Z. K. N., Lima. 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in microbiology.* 161, 168-175.
- Sessitsch, A.; Reiter, B.; Pfeifer, U.; Wilhelm, P. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS MicrobiolEcol.* 39: 23-32.
- Weller, D. M. 1997. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 1988, 26, 379-407; (b) Hallmann, J. Q.-H., A; Mahaffee, W. F; Kloepper, J. W, Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology.* 43, 895-914.

10. ANEXOS

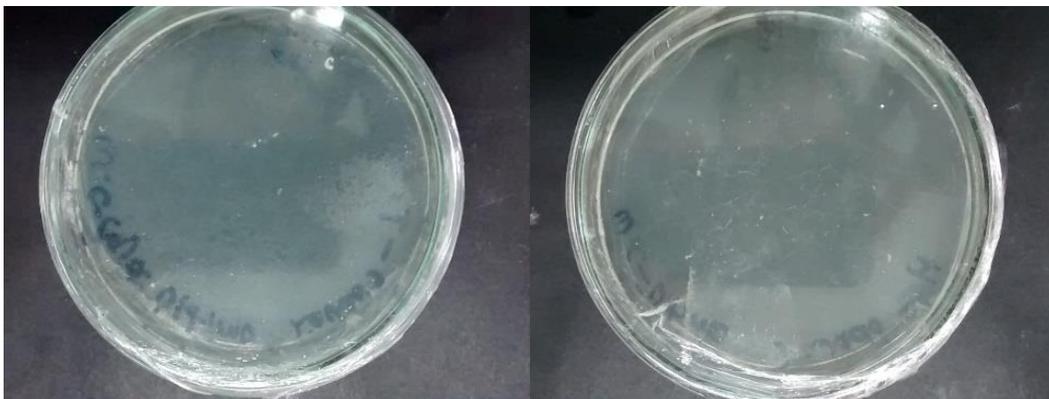
- Hongos

10.1 Contaminación de la siembra del último lavado



Anexo 1. Contaminación de la siembra del último lavado.

10.2 Siembra último lavado (sin contaminación)



Anexo 2. Siembra del último lavado sin contaminación.

10.3 Análisis Microscópico (Tinciones con Azul de Lactofenol)



Anexo 3. Tinción de hongos con Azul de Lactofenol.

10.4 Análisis Espectroscópico (determinación del IR de cada hongo)





Anexo 4. Análisis espectroscópico (espectroscopia infrarroja).

10.5 Conservación de los hongos puros.



Anexo 5. Conservación de hongos endofíticos puros.

10.6 Análisis Estadístico

10.6.1 Análisis de la Normalidad (Anexo 6)

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
HONGOS (H)	9	2,67	2,12	0,86	0,1680
HONGOS (T)	9	1,78	1,09	0,86	0,1392

10.6.2 Análisis de la Varianza (Anexo 7)

HONGOS (H)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HONGOS (H)	9	0,57	0,15	73,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,67	4	5,17	1,35	0,3897
CAJA	12,67	2	6,33	1,65	0,2999
TIEMPO (s)	8,00	2	4,00	1,04	0,4318
Error	15,33	4	3,83		
Total	36,00	8			

HONGOS (T)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HONGOS (T)	9	0,53	0,07	59,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,11	4	1,28	1,15	0,4478
CAJA	3,56	2	1,78	1,60	0,3086
TIEMPO (s)	1,56	2	0,78	0,70	0,5487
Error	4,44	4	1,11		
Total	9,56	8			

10.6.3 Test de Duncan (Anexo 8)

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,1111 gl: 4

CAJA	Medias	n	E.E.	
3	2,67	3	0,61	A
2	1,33	3	0,61	A
1	1,33	3	0,61	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,1111 gl: 4

TIEMPO (s)	Medias	n	E.E.	
90,00	2,33	3	0,61	A
180,00	1,67	3	0,61	A
30,00	1,33	3	0,61	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

10.7 Hongos de referencia (Anexo 9)



Imagen 1. *Aspergillus niger*



Imagen 2. *Fusarium oxysporum*



Imagen 3. *Colletorichum*



Imagen 4. *Mycosphaerella fijiensis*

- **Bacterias**

10. 8 Prueba de Shapiro –Wilks (Anexo 10)

Shapiro-Wilks (modificado)

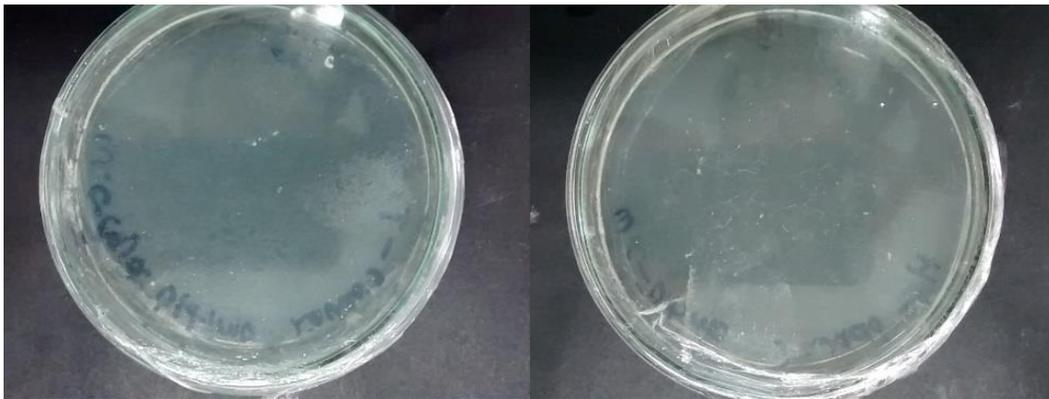
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
BACTERIAS (H)	9	2,44	1,13	0,75	0,0056
BACTERIAS (T)	9	2,22	1,20	0,75	0,0053

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	CAJA	TIEMPO (s)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
BACTERIAS (H) 1	1	30	1	3,00	0,00	3,00	6,40	0,4335
BACTERIAS (H) 1	1	90	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (H) 1	1	180	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (H) 2	2	30	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (H) 2	2	90	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (H) 2	2	180	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (H) 3	3	30	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (H) 3	3	90	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (H) 3	3	180	1	4,00	0,00	4,00		

Variable	CAJA	TIEMPO (s)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
BACTERIAS (T) 1	1	30	1	3,00	0,00	3,00	6,67	0,4335
BACTERIAS (T) 1	1	90	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (T) 1	1	180	1	4,00	0,00	4,00		
BACTERIAS (T) 2	2	30	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (T) 2	2	90	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (T) 2	2	180	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (T) 3	3	30	1	3,00	0,00	3,00		
BACTERIAS (T) 3	3	90	1	1,00	0,00	1,00		
BACTERIAS (T) 3	3	180	1	1,00	0,00	1,00		

10. 9 Siembra del último lavado.



Anexo 11. Siembra del último lavado.

10.10 Bacterias de referencia (Anexo 12)

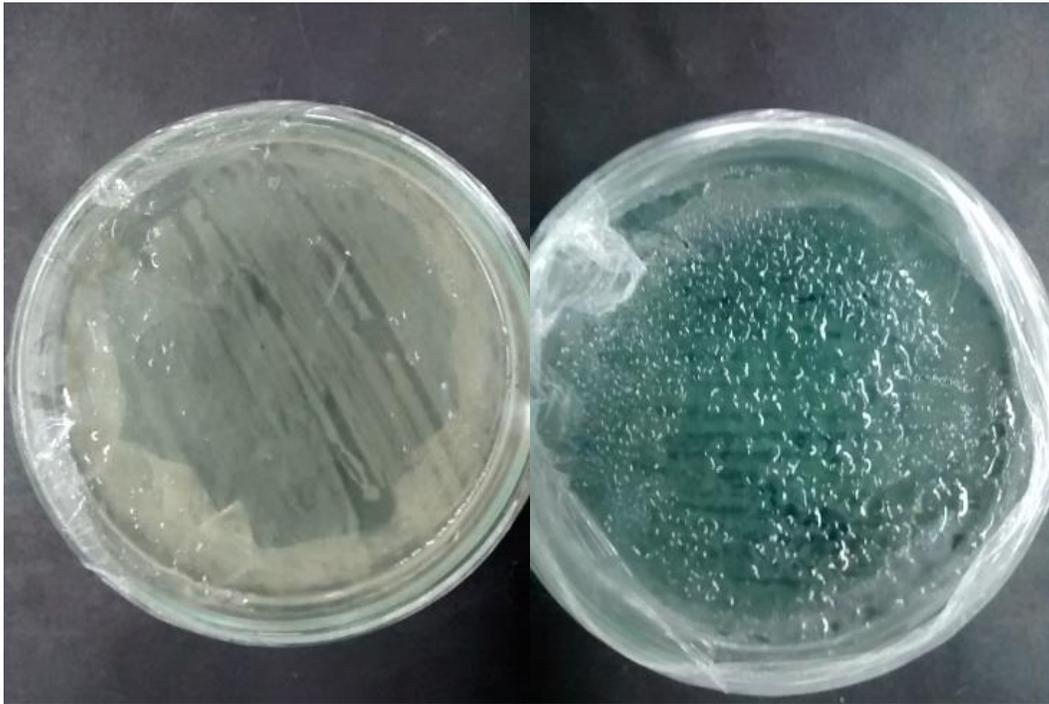


Imagen 5. *Escherichia coli*

Imagen 6. *Pseudomona aeruginosa*

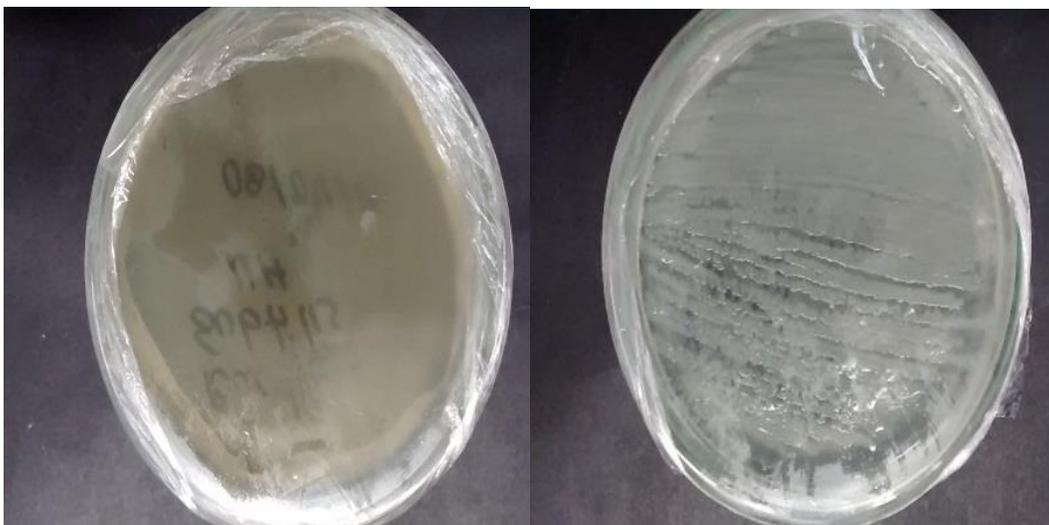


Imagen 7. *Bacillus subtilis*

Imagen 8. *Klebsiella pneumoniae*



Imagen 9. *Staphylococcus aureus*