



Caracterización molecular de bacterias endofíticas de *Elodea potamogeton* (“llachu”) del Lago Titicaca

Molecular characterization of endophytic bacteria of *Elodea potamogeton* (“llachu”) from Titicaca Lake

Pedro Ubaldo Coila Añasco^{1,*}; Julio César Bernabé Ortiz²; Domingo Alberto Ruelas Calloapaza¹

¹ Universidad Nacional del Altiplano – Puno, Av Floral 1153, Puno, Perú.

² Universidad Nacional de San Agustín Arequipa, Santa Catalina 117, Arequipa, Perú.

*Autor correspondiente: pcoila@unap.edu.pe (P. Coila).

ID ORCID de los autores

P. Coila:  <https://orcid.org/0000-0002-5708-7464>

J. Bernabé:  <https://orcid.org/0000-0003-0313-1033>

D. Ruelas:  <https://orcid.org/0000-0003-0313-1033>

RESUMEN

El objetivo fue aislar y caracterizar molecularmente bacterias endofíticas del “llachu”, planta acuática del Lago Titicaca que sobrevive en ambientes hipereutrofizados. Para el aislamiento, las muestras fueron desinfectadas en alcohol 70%, hipoclorito de sodio 0,5% y Tween 80%; luego, se homogenizaron y una alícuota sembrada en medio Luria-Bertani (LB). Se eligieron tres cepas para su resembrado en agar LB sólido. De las cepas puras, se extrajo DNA con la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se amplificó el gen 16S rDNA por PCR; los amplicones se remitieron para su secuenciación. Las secuencias se editaron con BioEdit 7.0.0 y se eligieron secuencias similares con BLASTn del GenBank, se hizo el alineamiento múltiple de secuencias con Clustal W. Para las relaciones evolutivas se utilizó el MEGA7 construyéndose árboles filogenéticos por el método de Neighbor-Joining. El análisis molecular demuestra que la cepa Sample10ped corresponde a *Pantoea* sp. con una identidad superior al 76%; la cepa Sample11pe a *Pseudomonas* sp. con un 100% de identidad; y, a la cepa Sample12ped a *Raoultella terrigena* sp. o *Klebsiella* sp. con una identidad de 99%. Las secuencias de las dos últimas, fueron registradas en el GenBank.

Palabras clave: Elodea; bacteria endofítica; gen 16S rDNA; filogenia.

ABSTRACT

The aim was to isolate and molecularly characterize endophytic bacteria from “llachu”, an aquatic plant from Lake Titicaca that survives in hypereutrophic environments. For isolation, the samples were disinfected in 70% alcohol, 0.5% sodium hypochlorite and 80% Tween; then, they were homogenized, and an aliquot seeded in Luria-Bertani (LB) medium. Three strains were chosen for reseeded on solid LB agar. From the pure strains, DNA was extracted with the phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture. The 16S rDNA gene was amplified by PCR; amplicons were submitted for sequencing. The sequences were edited with BioEdit 7.0.0 and similar sequences were chosen with BLASTn from GenBank, multiple sequence alignment was done with Clustal W. For evolutionary relationships, MEGA7 was used, constructing phylogenetic trees by the Neighbor-Joining method. Molecular analysis shows that the Sample10ped strain corresponds to *Pantoea* sp. with an identity greater than 76%; the Sample11pe strain to *Pseudomonas* sp. with 100% identity; and, to the strain Sample12ped to *Raoultella terrigena* sp. or *Klebsiella* sp. with an identity of 99%. The sequences of the last two were registered in GenBank.

Keywords: Elodea; endophytic bacteria; 16S rDNA gene; phylogeny.

Recibido: 30-06-2021.

Aceptado: 10-08-2021.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

INTRODUCCIÓN

A casi 4 000 m de altitud, el Lago Titicaca cumple un rol importante en la vida del poblador altoandino, tanto ecológica como económicamente. Sin embargo, en los últimos tiempos, viene sufriendo un acelerado proceso de contaminación y de eutrofización, por un mal manejo de las aguas residuales y de residuos sólidos de las ciudades y pueblos aledaños. Por ejemplo, Beltrán et al. (2015), al evaluar la calidad del agua de la bahía interior de la ciudad de Puno, a través de determinaciones físico-químicas y microbiológicas (temperatura, oxígeno disuelto, pH, fosfatos, nitratos, nitritos, transparencia, conductividad eléctrica, alcalinidad y coliformes fecales) concluyeron que es una zona crítica en contaminación, alcanzándose niveles hipereutróficos. Sin embargo, a pesar de estas condiciones, muchas especies de plantas acuáticas sobreviven en ese ambiente, siendo una de ellas el "llachu" (*Elodea potamogeton*) una macrófita que sirve de alimento para el ganado vacuno que se cría en todo el anillo circunlacustre. Es probable, que alguna asociación simbiótica entre la planta y microorganismos rizosféricos y endofíticos cumplan un rol importante en la vida de estas especies. Los endofíticos (bacterias, hongos o actinomicetos) son microorganismos que colonizan la planta, sin causar ningún signo o enfermedad aparente (Nair & Padmavathy, 2014). Existen muchos estudios que demuestran las interacciones simbióticas de las bacterias endofíticas con las plantas. Algunas bacterias endofíticas promueven el crecimiento y proporcionan tolerancia al estrés ambiental (Alvarado-Marchena et al., 2016; Conn & Franco, 2004; Munif et al., 2012; Nair & Padmavathy, 2014;

Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Sessitsch et al., 2002; Wang et al., 2006); otras actúan como agentes de control biológico para los fitopatógenos a través de sus metabolitos secundarios (de Oliveira Costa et al., 2012); otras interactúan con los patógenos y aumentan la resistencia de las plantas a las enfermedades mediante la producción de agentes antifúngicos, antibacterianos, sideróforos o confiriendo inmunidad (Alvarado-Marchena et al., 2016; Pérez & Chamorro, 2012), mientras que otras aumentan la capacidad de fijación de nitrógeno y aceleran la germinación de semillas y el crecimiento de plantas (Compant et al., 2005; Iniguez et al., 2004; Li et al., 2008; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

En la actualidad, existe un interés por caracterizar las bacterias endofíticas de diversas especies vegetales con fines biotecnológicos; especialmente, en la biorremediación, en la biofertilización y en el control biológico de los agentes patógenos de las plantas, ya que el uso de fertilizantes químicos, pesticidas y otros, tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud humana y animal.

Pérez & Chamorro (2012) indican que el número de bacterias endofíticas depende de la especie bacteriana, el genotipo y la etapa de desarrollo de la planta huésped, así como las condiciones ambientales. En ese contexto, el presente estudio se diseñó con el objetivo de aislar y caracterizar molecularmente a través de la amplificación y análisis del gen 16S rDNA. algunas bacterias endofíticas de la macrófita *Elodea potamogeton* ("llachu") que desarrolla en aguas de la bahía interior del Lago Titicaca, Puno, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento, purificación y conservación de las bacterias endofíticas

Las muestras de la planta *Elodea potamogeton*, fueron colectadas en bolsas de polietileno estériles de las orillas de la bahía interior del Lago Titicaca de la ciudad de Puno, ubicada a 3 825 m de altitud. El muestreo se realizó aleatoriamente, colectándose sólo aquellas con aparente buen estado fitosanitario y sin signos de fitotoxicidad. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa. En el laboratorio, la planta fue sometida a un proceso de desinfección y esterilización superficial, siguiendo el protocolo de Sakiyama et al. (2001) que consta de los siguientes pasos: 1) lavado con agua de caño y enjuague con agua destilada por tres veces, 2) inmersión en alcohol 70% por un minuto y enjuague con agua destilada dos veces, 3) inmersión en hipoclorito de sodio 5% y agitación durante cinco minutos y enjuague con agua destilada, y 4) inmersión en Tween 80% y agitación por tres minutos, para finalizar con un lavado con agua destilada por cuatro veces.

Para el aislamiento de las bacterias endofíticas y la obtención de un cultivo puro se empleó el método

de Vincent (1970). Primero, la planta fue triturada en NaCl 0,9% hasta homogenización completa, luego centrifugarla por cinco minutos. El sobrenadante se sembró en 10 mL de medio LB (Luria-Bertani), para finalmente seleccionar las colonias y cultivarlas en placa Petri con medio LB sólido a 37 °C por 24 horas.

Para el proceso de purificación, las cepas obtenidas de los aislamientos se volvieron a cultivar en caldo PY hasta la obtención de cepas puras. Los cultivos puros obtenidos se conservaron en viales con glicerol 15%, los que fueron congelados primero a -20 °C y luego a -70 °C.

Caracterización molecular de los aislados Extracción, cuantificación y evaluación de la calidad del DNA

La extracción de DNA de los cultivos puros se realizó mediante la técnica descrita por Sambrook & Russell (2006), mediante la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mientras que la precipitación y purificación con alcohol isopropílico y etanol al 75% en frío. La cuantificación de DNA se realizó por espectrofotometría ultravioleta (UV) a 260 nm de longitud de onda. La integridad del DNA se comprobó

mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la visualización en cámara ultravioleta previo teñido del gel con bromuro de etidio.

Amplificación del gen 16S rDNA

La amplificación del gen 16S rDNA de las bacterias aisladas, se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes primers: 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' (forward primer) y 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (reverse primer). Las reacciones fueron realizadas en una mezcla que contenía: 2 µL de muestra (DNA), 2 µL de primers y 29 µL del master mix conteniendo la *Taq polimerasa*, MgCl₂ y los dNTPs en buffer. Se utilizó el termociclador GeneAMP PCR System bajo las siguientes condiciones de reacción: 1) desnaturalización inicial y activación de la polimerasa a 95 °C/5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C/1 min), anillamiento (60 °C/1 min) y extensión (72 °C/2 min); y, una extensión final a 72 °C/5 min. Los amplicones se purificaron con reactivos Qiagen System ® y verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. La visualización se hizo en transiluminador ultravioleta previo teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fig.)

Secuenciamiento

Para el secuenciamiento, se remitieron 20 µL de los productos amplificados al laboratorio Functional Biosciences, Inc. (USA) que utiliza el método de

Sanger en una plataforma Big Dye V3.1 en instrumentos ABI 3730xl.

Análisis bioinformático de las secuencias

Las secuencias del gen 16S rDNA fueron editadas con el software BioEdit Versión 7.0.0© (Hall, 1999). Luego, se buscaron secuencias similares en la base de datos del GenBank del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando su herramienta BLASTn. El alineamiento múltiple de secuencias (AMS) entre las secuencias que presentaron los más altos porcentajes de homología (coincidencias) del GenBank y las secuencias obtenidas en el estudio, se realizó con el programa Clustal W del software BioEdit version 7.0.0 ©. Finalmente, se realizó el análisis filogenético utilizando el software MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 7.0) (Kumar et al., 2016). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta (Tamura et al., 2004) basada en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Para la reconstrucción filogenética se utilizó el método de agrupamiento Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap (Saitou & Nei, 1987; Tamura et al., 2004). Dos de las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se eligieron tres cultivos puros de bacterias endofíticas, a las cuales se les denominó cepa 1 (Sample10ped 16sf), cepa 2 (Sample11ped 16sf) y cepa 3 (Sample13ped 16sf), nombres con los cuales fueron enviados a secuenciar. Las secuencias obtenidas del gen 16S rDNA para cada una de las cepas tuvieron una longitud de 1057, 1112 y 1115 nucleótidos, para las cepas 1, 2 y 3, respectivamente.

Cepa 1 (Sample10ped 16sf)

Al compararse la secuencia del gen 16S rDNA de esta cepa Sample10 con la base de datos del GenBank, se encontraron siete coincidencias cuyos porcentajes de similitud oscilan entre 76 y 80% con

bacterias del género *Pantoea sp.* (Tabla 1), lo cual indicaría que la bacteria endofítica *Sample10ped 16sf* podría ser una especie de este género.

Según la matriz de distancia genética entre las accesiones, la especie más relacionada es con la accesión KF202812.1_Pantoea_sp., con la cual tiene una divergencia de 0.

La Figura 1, muestra el árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample10ped 16sf con las siete bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank utilizando el método Neighbor-Joining, donde el número en los nodos indica el valor del porcentaje bootstrap basada en 1000 réplicas y la escala indica el número de sustituciones por posición de los nucleótidos.

Tabla 1

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa Sample10ped 16sf del GenBank

	Accesiones/descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
1	KF202734.1_Pantoea_sp.	163	163	56%	4e-36	78%
2	KF202775.1_Pantoea_sp.	178	178	51%	2e-40	80%
3	KF202784.1_Pantoea_sp.	159	159	50%	6e-35	79%
4	KF202790.1_Pantoea_sp.	154	154	45%	3e-33	80%
5	KF202791.1_Pantoea_sp.	189	189	68%	1e-37	76%
6	KF202807.1_Pantoea_sp.	161	161	51%	2e-35	79%
7	KF202812.1_Pantoea_sp.	161	161	51%	2e-35	79%

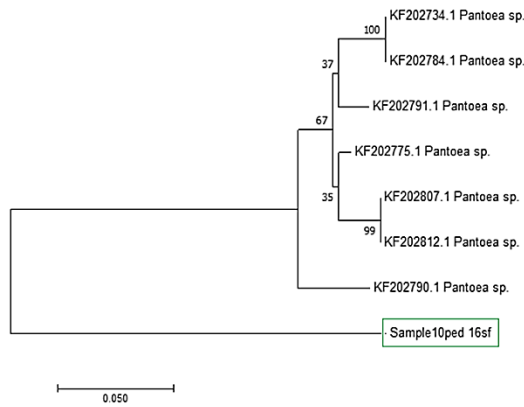


Figura 1. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample10ped 16sf y de siete bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining.

En este árbol se puede observar que la cepa de estudio se encuentra en una rama distinta, lo que demuestra una elevada variabilidad existente entre las cepas, indicando que se trataría de una nueva especie. Cordero et al. (2008) y Li et al. (2008) , indican que las bacterias endofíticas *Pantoea sp.*, son solubilizadoras de fosfatos incrementando la capacidad de las plantas de absorber el fósforo del agua. Como se sabe, la mayor de fósforo se encuentra formando compuestos insolubles, poco o nada utilizables o disponibles para las plantas, pero algunas especies bacterianas como *Pantoea sp.*, tienen la capacidad de solubilizar estos compuestos insolubles de fosfatos inorgánicos como el tricálcico y el dicálcico, la hidroxiapatita y las rocas fosfatadas en fósforo útil.

Lara-Cortés et al. (2019) también aislaron *Pantoea vagans* de flores de dalia con fines de florifagia e indican que las bacterias *Pantoea* son bacterias que se pueden encontrar en el suelo, agua y plantas, así como formando parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales y del hombre; y, que potencialmente son patógenas pudiendo ocasionar enfermedades gastrointestinales.

Cepa 2 (Sample11ped 16sf)

Las secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa Sample11ped del GenBank (100% de identidad) corresponden a las del género *Pseudomonas sp.*(Tabla 2) por lo que se

infiere que la bacteria endofítica aislada en el presente estudio pertenece a este género.

La matriz de distancias genéticas indica que la cepa en estudio tiene una divergencia de 0 con las especies *P. syringae*, *P. Coronafaciens* y *Pseudomonas* sp.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (AMS) y la reconstrucción filogenética con las 12 secuencias obtenidas en la base de datos (Figura 2). El número en los nodos indica el valor del porcentaje bootstrap basada en 1000 réplicas y la escala el número de sustituciones por posición de los nucleótidos.

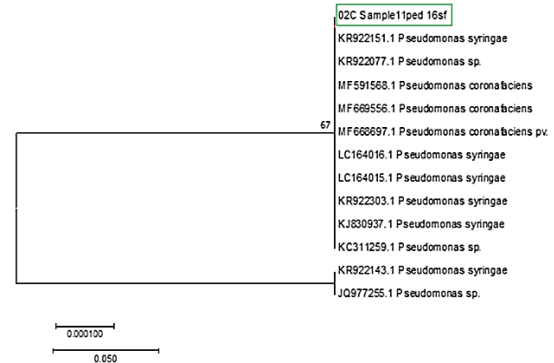


Figura 2. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample11ped 16sf con las 12 bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining.

Como se aprecia, la bacteria endofítica aislada en el presente estudio (sample 11ped 16sf) quedó agrupada en una de las dos ramas generadas en el árbol filogenético. La bacteria podría corresponder a las especies *P. syringae* o *P. coronafaciens*, ya que con estas especies tiene un 100% de homología.

La mayor parte de estudios indican que las *Pseudomonas* son bacterias que habitan en el suelo y aguas estancadas y que pueden penetran a las plantas por los estomas, heridas y otras aberturas produciendo enfermedades (Montero, 2012). Sin embargo, el reciente estudio de Devi et al. (2017), ha permitido identificar una bacteria endofítica promotora de crecimiento de la planta *Achyranthes aspera L.*, designado como AL2-14B, el cual basados en sus características fenotípicas y fisiológicas y análisis de la secuencia del gen 16S rDNA fue identificado como *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 2

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa Sample11ped 16sf del GenBank

	Acciones/descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
1	KR922151.1_Pseudomonas_syringae	1672	1672	100%	0,0	100%
2	KR922077.1_Pseudomonas_sp.	1672	1672	100%	0,0	100%
3	MF591568.1_Pseudomonas_coronafaciens	1666	1666	100%	0,0	99%
4	MF669556.1_Pseudomonas_coronafaciens	1666	1666	99%	0,0	100%
5	MF668697.1_Pseudomonas_coronafaciens.pv.	1666	1666	100%	0,0	99%
6	LC164016.1_Pseudomonas_syringae	1666	1666	100%	0,0	99%
7	LC164015.1_Pseudomonas_syringae	1666	1666	100%	0,0	99%
8	KR922303.1_Pseudomonas_syringae	1666	1666	100%	0,0	99%
9	KR922143.1_Pseudomonas_syringae	1666	1666	100%	0,0	99%
10	KJ830937.1_Pseudomonas_syringae	1666	1666	100%	0,0	99%
11	JQ977255.1_Pseudomonas_sp.	1666	1666	100%	0,0	99%
12	KC311259.1_Pseudomonas_sp.	1666	1666	100%	0,0	99%

Este es el primer estudio en donde se indica que la especie *Pseudomonas* es una bacteria endofítica. El mismo autor, señala que la bacteria *P. aeruginosa* AL2-14B produce una buena cantidad del sideróforo (IAA, ácido indol acético) y solubiliza fosfatos inorgánicos lo que promueve el crecimiento y las propiedades antioxidantes de la planta hospedera. Por lo tanto, la cepa aislada podría ser utilizado como biofertilizante y, por su actividad antioxidante, tiene la ventaja adicional de ser utilizado como una planta medicinal, lo cual también podría inferirse a la planta *Elodea potamogeton* explorada en el presente estudio; es decir, podría ser utilizado como biofertilizante y antioxidante.

Otros estudios han demostrado que las especies de *Pseudomonas* son utilizadas para degradar detergentes en ecosistemas acuáticos, que son un problema amenazante para la flora y microbiota acuática. Es el caso del estudio de Guevara et al. (2013), quienes utilizaron a las bacterias propias de aguas residuales para biodegradar detergentes, encontrándose que las *Pseudomonas* son las que tienen la capacidad más alta de utilizar los detergentes. La cepa en estudio fue registrada en el GenBank bajo la accesión N° SUB4288247 (cultured Prokaryotic 16S rRNA / Sample11ped).

Cepa 3 (Sample12ped 16sf)

Al realizar la búsqueda de secuencias que producen alineaciones significativas en el GenBank, la cepa en estudio podría pertenecer a los géneros *Raoultella terrigena* sp. o *Klebsiella* sp, por los altos porcentajes de identidad con estas especies (99%) y un E-valor de 0 (Tabla 3).

La matriz de distancias genéticas muestra que la cepa aislada tiene una divergencia entre 0,01 y 0,03 con las especies indicadas.

Al realizar el alineamiento múltiple de secuencias (AMS) y con las doce primeras secuencias del GenBank se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 3. El número en los nodos indica el valor del porcentaje bootstrap basada en 1000 réplicas y la escala el número de sustituciones por posición de los nucleótidos.

Brise et al. (2006), indican que las *Klebsiella* spp. se han recuperados de ambientes acuáticos contaminados y que reciben residuos industriales y otros productos; además, señalan que son encontrados en una variedad de fuentes ambientales

como suelo y plantas contribuyendo en los procesos bioquímicos y geoquímicos. Arenas et al. (2009), indican que las bacterias del género *Klebsiella* son organismos saprófitos, que crecen en zonas contaminadas con herbicidas, sugiriendo que podrían tener una relación simbiótica y benigna con su hospedero. Por lo tanto, la bacteria endofítica aislada en el presente trabajo estaría cumpliendo un rol protector en la planta que crece en aguas muy contaminadas, tal como lo es el "llachu".

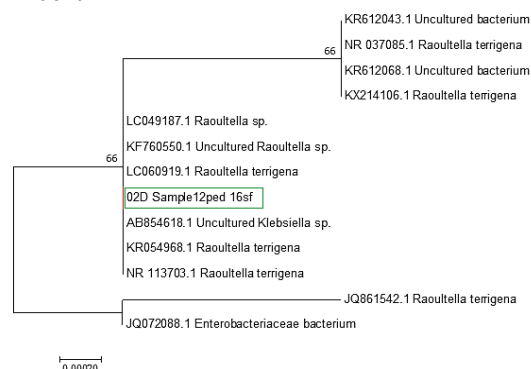


Figura 3. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample12ped 16sf y de bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining.

Schicklberger et al. (2015) aislaron la cepa R1Gly de *Raoultella* en medio libre de nitrógeno y utilizando glicerol como única fuente de carbono, encontrando que, además de los genes para la fijación biológica de nitrógeno, la cepa aislada contenía todos los genes necesarios para la producción de sustancias promotoras del crecimiento de la planta: ácido indol-acético, 2,3-butanodiol, entre otros.

Por otra parte, Luo et al. (2016) indican que las bacterias fijadoras de N₂ que pertenecen al género *Raoultella* de la familia *Enterobacteriaceae* están ampliamente asociadas con las plantas. Estos autores aislaron la cepa L03 de *Raoultella* sp. de las raíces de caña de azúcar y determinaron la fijación de nitrógeno atmosférico. Los resultados que encontraron fueron un incremento de la biomasa de la planta, del nitrógeno total y de la clorofila, además de aliviar los signos de deficiencia de nitrógeno de las plantas en condiciones de limitación de este elemento.

Tabla 2

Secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa Sample12ped 16sf del GenBank

	Acciones/descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
1	LC060919.1_Raoultella_terrigena	1733	1733	100%	0,0	99%
2	AB854618.1_Uncultured_Klebsiella_sp.	1731	1731	100%	0,0	99%
3	KF760550.1_Uncultured_Raoultella_sp.	1731	1731	100%	0,0	99%
4	KR054968.1_Raoultella_terrigena	1729	1729	100%	0,0	99%
5	KX214106.1_Raoultella_terrigena	1727	1727	100%	0,0	99%
6	KR612068.1_Uncultured_bacterium	1727	1727	100%	0,0	99%
7	KR612043.1_Uncultured_bacterium	1727	1727	100%	0,0	99%
8	LC049187.1_Raoultella_sp.	1727	1727	100%	0,0	99%
9	JQ861542.1_Raoultella_terrigena	1727	1727	100%	0,0	99%
10	JQ072088.1_Enterobacteriaceae_bacterium	1727	1727	100%	0,0	99%
11	NR_113703.1_Raoultella_terrigena	1727	1727	100%	0,0	99%
12	NR_037085.1_Raoultella_terrigena	1727	1727	100%	0,0	99%

Este estudio, demostró por primera vez que una bacteria *Raoultella* es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico en asociación con la planta hospedera, hecho que también estaría ocurriendo en la *Elodea potamogeton*.

La cepa en estudio fue registrada en el GenBank bajo la accesión N° SUB4252655 (cultured Prokaryotic 16S rRNA).

CONCLUSIONES

De la planta acuática *Elodea potamogeton* ("llachu") proveniente de aguas eutrofizadas de la Bahía Interior de Lago Titicaca se lograron aislar tres bacterias endofíticas, cuyo análisis molecular a través del secuenciamiento del gen 16S rDNA, indican que pertenecen a los siguientes géneros: cepa 1 (*Sample10ped 16sf*) a *Pantoea sp.*; cepa 2

(*Sample11ped 16sf*) a *Pseudomonas sp.* y cepa 3 (*Sample12ped 16sf*) a *Raoultella terrigena sp.* o *Klebsiella sp.* Se registraron las secuencias de las cepas 11 y 12 en el GenBank del NCBI cuyas accesiones son SUB4288247 y SUB4252655, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio "ADN Uchumayo" de Arequipa, por habernos brindado sus instalaciones y equipos para

la extracción de ADN y amplificación del gen 16S rDNA por PCR,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado-Marchena, L., Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., & Flores-Mora, D. (2016). Molecular characterization of the endophytic bacteria found in the fig crops (*Ficus carica* var. Brown Turkey) in Costa Rica. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 11(7), 290–297.
- Arenas, N. E., Gutiérrez, A. J., Salazar, L. M., Polanco, J. C., & Gómez, A. (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de La Salud*, 7(2), 22–29.
- Beltrán, D. F., Palomino, R. P., Moreno, E. G., Peralta, C. G., & Montesinos-Tubée, D. B. (2015). Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. *Revista Peruana de Biología*, 22(3), 335–340.
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. (2006). The genus *Klebsiella*. In *The Prokaryotes* (Vol. 6, pp. 159–196).
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. (2005). Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsjN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(4), 1685–1693.
- Conn, V. M., & Franco, C. M. M. (2004). Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3), 1787–1794.
- Cordero, J., Ortega-Rodes, P., & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, X(1), 111–121.
- de Oliveira Costa, L. E. E. de O., de Queiroz, M. V., Borges, A. C., de Moraes, C. A., & de Araújo, E. F. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562–1575.
- Devi, K. A., Pandey, G., Rawat, A. K. S., Sharma, G. D., & Pandey, P. (2017). The endophytic symbiont-*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–14.
- Guevara, J., Castañeda, I., Juárez, J., & Mendoza, A. (2013). Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en solución mínima de sales con detergente Ace. *Revista Rebiol.*, 33(1), 1–8.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Iniguez, A. L., Dong, Y., & Triplett, E. W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(10), 1078–1085.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*, 33(7), 1870–1874.
- Lara-Cortés, E., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Hernández-Zárate, G., & León-Rodríguez, R. (2019). Detección e identificación molecular de *Pantoea vagans* en flores de *Dahlia* sp. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–8.
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 238–246.
- Luo, T., Ou-Yang, X. Q., Yang, L. T., Li, Y. R., Song, X. P., Zhang, G. M., Gao, Y. J., Duan, W. X., & An, Q. (2016). *Raoultella* sp. strain L03 fixes N₂ in association with micropropagated sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 1–7.
- Montero, M. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos [Universitat Autònoma de Barcelona].
- Munif, A., Hallmann, J., & Sikora, R. (2012). Isolation of Endophytic Bacteria from Tomato and Their Biocontrol Activities against Fungal Diseases Bacteria from Tomato and Their Biocontrol Activities against Fungal Diseases. *Microbiology Indonesia*, 6(4), 148–156.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014(March).
- Pérez, A., & Chamorro, L. (2012). Bacterias endófitas: una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 4(1), 172–184.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827–837.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sakiyama, C. C. H., Paula, E. M., Pereira, P. C., Borges, A. C., & Silva, D. O. (2001). Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 117–121.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot4455.
- Schicklberger, M., Shapiro, N., Loqué, D., Woyke, T., & Chakraborty, R. (2015). Draft genome sequence of *Raoultella terrigena* R1Gly, a diazotrophic endophyte. *Genome Announcements*, 3(3), 1–2.
- Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., & Martínez, E. (2002). Advances in Rhizobium Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323–378.
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030–11035.
- Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. In *IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford*. Wiley.
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Guo, X. W., Rodríguez-Duran, R., Boll, G., & Martínez-Romero, E. (2006). Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. *Archives of Microbiology*, 186(4), 251–259.