



Determinación de organismos endófitos en semillas de *j. Curcas* l y *j. Macrocarpa* griseb

Determination of endophytic organisms in seeds of *j. Curcas* l and *j. Macrocarpa* griseb

10.56238/isevmjv3n1-005

Recebimento dos originais: 03/12/2023

Aceitação para publicação: 15/01/2024

Nancy Tavecchio

Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias

E-mail: n_tavecchio@hotmail.com

Lihué Olmedo Sosa

Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias

E-mail: lihueolmedososa@gmail.com

Daniel Grasso

Inta Castelar. Hurlingham. Bs.As.

E-mail: grasso.daniel@inta.gob.ar

Silberman Juan

Inta Castelar. Hurlingham. Bs.As.

E-mail: juan.silberman@gmail.com

Hilda Pedranzani

Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

E-mail: hildaeliz@gmail.com

RESUMEN

Los endófitos son microorganismos que toda su vida o parte de ella residen en tejidos vegetales en una relación simbiótica, de parasitismo o mutualismo, sin causar inmediatamente efectos negativos (Stone y col., 2000). Como resultado de dichas asociaciones por largo tiempo los microorganismos endofíticos y las plantas han desarrollado gran transferencia de información (Strobel y Daisy, 2003). Ciertas plantas medicinales sintetizan sustancias químicas, brindando material para la industria farmacéutica y cosmética (Karthikeyan y col., 2008) y los endofíticos participan en vías metabólicas de estos vegetales y producen compuestos bioactivos (Zhao y col., 2011).

Palabras claves: Organismos, Endófitos, *Jatropha*, Semilla.

1 INTRODUCCIÓN

Los endófitos son microorganismos que toda su vida o parte de ella residen en tejidos vegetales en una relación simbiótica, de parasitismo o mutualismo, sin causar inmediatamente efectos negativos (Stone y col., 2000). Como resultado de dichas asociaciones por largo tiempo los microorganismos endofíticos y las plantas han desarrollado gran transferencia de información



(Strobel y Daisy, 2003). Ciertas plantas medicinales sintetizan sustancias químicas, brindando material para la industria farmacéutica y cosmética (Karthikeyan y col., 2008) y los endofíticos participan en vías metabólicas de estos vegetales y producen compuestos bioactivos (Zhao y col., 2011).

Diferentes estudios han revelado diversas funciones de actinobacterias endofíticas (Qin y col., 2009). Se ha informado en los últimos años, que los actinomicetes endofíticos producen gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica, como antibióticos, sustancias antitumorales y promotores del crecimiento vegetal, contribuyendo a mitigar estreses ambientales en las plantas huéspedes (Qin y col., 2011). Actinomicetes aislados de la rizósfera asociada a *Trifolium repens* L. mostraron gran capacidad para solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno y producir sideróforos, todas ellas características de las Rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), además, incrementaron el crecimiento y la nutrición beneficiando la colonización de raíces por hongos micorrícicos (Franco-Correa y col., 2010). Se aislaron 30 hongos endófitos en diferentes órganos vegetales, tales como hojas, tallos, raíces y semillas, en los siguientes cultivos promisorios para biodiesel: *J. curcas* L., *Pongamia pinnata* (L) Pierre, *Ricinus communis* L. Estos hongos acumulaban grandes cantidades de lípidos intracelulares (Susmita y col., 2019). El microorganismo KLBMP 1115^T se aisló de raíces de *J. curcas* colectadas en el Sudoeste de China. El análisis de secuencia de genes de RNAr 16 S indicó que pertenece al género *Pseudonocardia*. En base a características fenotípicas e hibridización DNA-DNA se determinó que representa una nueva especie de este género, para el cual se propuso el nombre *Pseudonocardiasichuanensis* sp. nov., un actinomiceto Gram-positivo y aeróbico (Qin y col., 2011). Otro endófito que se encontró en raíces de esta especie es el KLBMP1111^T con el nombre *Kibdelosporangium phytohabitans* sp. nov. (Xing y col., 2012). Se ha secuenciado el genoma completo de *Enterobacter* sp. R4-368, gammaproteobacteria endofítica, fijadora de nitrógeno, aislada de raíces de *J. curcas*. Esta bacteria muestra un fuerte efecto promotor del crecimiento, con incremento de biomasa vegetal y de producción de semillas (Madhaiyan y col., 2013).

En tallo de *J. curcas*, también se aislaron endófitos designados como KLBMP 1050^T cuyo nombre es *Nocardioide spanzhuhuaensis* sp. nov. (Qin y col., 2012).

Entre los endófitos aislados de hojas de *J. curcas* en Nueva Delhi, India, se identificó a *Colletotrichum truncatum* EF13 que exhibe actividad antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum*, brindando protección al vegetal contra hongos patógenos, siendo de esta manera, un potencial agente de control biológico. Por otra parte, *Colletotrichum truncatum* EF10 produce aceites con un perfil de ácidos grasos similar al de su huésped *J. curcas* (Kumar y Kaushik, 2013).



Un actinomiceto endófito aislado de semillas de *J. curcas* es el KLBMP1221^T para el cual se sugirió el nombre *Amycolatopsisendophytica* sp. nov. (Qian y col., 2011). Sin embargo, no se encontraron trabajos previos que indiquen la presencia de endófitos en órganos de *J. macrocarpa*.

Para la extracción e identificación de comunidades microbianas se utilizan técnicas microscópicas, bioquímicas y moleculares, entre estas últimas son muy utilizadas la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y t-RFLP: análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción (Stefanis y col., 2013).

2 OBJETIVO

Determinar la presencia de endófitos en semillas de *J. curcas* y *J. macrocarpa* e identificarlos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos estrategias complementarias que permitieron estudiar los microorganismos endófitos. Una de ellas, consistió en sembrar macerados de semillas esterilizadas superficialmente, en diferentes medios de cultivo. La otra estrategia fue el estudio de los ADN ribosomales bacterianos presentes en la semilla.

3.1 MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Para la esterilización, molienda y plaqueo, se utilizaron 10 g de semillas de *J. curcas* y de *J. macrocarpa*. Se enjuagaron con agua de canilla para eliminar epífitos y se esterilizaron superficialmente de acuerdo a Sun y col. (2008), etanol 70% durante 5 min y hipoclorito de sodio 5%, 2 min. Se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Se colocaron 3 semillas desinfectadas de cada especie en medio de cultivo Luria Bertani (LB), selladas con parafilm y se llevaron a 28 °C, 24/48 h para control de esterilidad.

Se trituraron las semillas en mortero estéril, cortándolas previamente con bisturí. El producto de la molienda se transfirió a un erlenmeyer con 90 ml de solución fisiológica (8,5 ‰) y se realizaron las suspensiones-diluciones hasta 10⁻⁵.

Se sembró 0,1 ml de cada dilución en placas, por duplicado. Se utilizaron los medios Luria Bertani (LB) por 3 días a 30° C y Agar Propionato de Sodio (ISP 3) a 28° C por 2 semanas (Shirling y Gottlieb, 1966), líquido y sólido. El LB contiene triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml, pH 7,5 y el ISP 3 contiene propionato de sodio 1 g, L-



asparragina 0.2 g, KH_2PO_4 0.9 g, K_2HPO_4 0.6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.02 g, agar 18 g, agua destilada 1000 ml, pH 7.2.

3.2 MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES

Para la esterilización superficial y molienda se siguió la metodología descrita para microorganismos cultivables. El producto de molienda se colocó en un tubo Falcon y se suspendió en 2 ml de agua + 2 ml de buffer NaH_2PO_4 90 mM /g de PS de semilla. En la extracción y cuantificación de ADN se utilizó 1 ml de la suspensión antes mencionada y se llevó a tubo Eppendorf. Se realizó empleando el Kit comercial FAST DNA SPIN KIT for SOIL, de acuerdo al protocolo del fabricante. Se utilizaron 2 μl de solución para cuantificar el ADN por espectrofotometría (Nanodrop) a 260 nm. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

La visualización del ADN se realizó por electroforesis en gel. Se preparó un gel de agarosa con 1% de buffer TAE 1X con el agregado de bromuro de etidio. Se mezcló el ADN y el buffer en una relación 5:1 y se sembró en el gel. Se corrió 1 h a 70 V. Se llevó a digitalizador de imagen Gel Doc.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con primers específicos para el Dominio Bacteria. Se utilizaron diferentes cantidades de ADN (50, 25, 5, y 2,5 ng) en un volumen de 50 μl con buffer PCR 1X, MgCl_2 1,5mM, dNTPs 0,2 μM de cada uno, primer 27f 0,08 μM , primer 1495r 0,08 μM , Go Taq DNA polimerasa 1,25 U. La amplificación por PCR fue realizada en Eppendorf Mastercycler Gradient con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C, 5 min, con desnaturalización del ADN a 95° C, 30 s; enfriamiento a 55° C, 30 s y extensión a 72° C, 2 min, seguido de 35 ciclos y una extensión final a 72° C, 5 min. Los productos de PCR que codifican para RNA ribosomal 16S (Li y col., 2007), se detectaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % 70 V durante 1 h, con 2 repeticiones para cada especie. Se utilizó la muestra pura y diferentes diluciones para *J. curcas*, mientras que solamente la muestra pura en *J. macrocarpa*. Se llevó a digitalizador de imagen Gel Doc.

3.2.1 Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)

En la PCR, se utilizaron primers 27f/1495r específicos del Dominio Bacteria que no amplifican ADN mitocondrial ni de cloroplasto de la célula vegetal (Bianciotto y col., 2004).



La digestión con enzimas de restricción de los productos de amplificación se realizó con buffer RE 10X, Acetylated BSA 10 µg/µl, 1µg DNA, 10 µg/µl enzima de restricción (Hae III) 4 h.

Para comprobar la eficiencia de la digestión se llevó a cabo el análisis del producto de digestión mediante electroforesis en gel Metaphor 3. La separación de los fragmentos para su análisis por fluorescencia fue realizada en el servicio de genotificación de la Unidad de Genómica de INTA.

Mediante la herramienta de asignación filogenética (PAT) se realizó el análisis de los productos de digestión obtenidos en el procedimiento de t-RFLP (Kent y col., 2003).

3.2.2 Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante(DGGE)

Para este análisis, se llevaron a cabo dos PCR. La primera PCR se realizó con los cebadores fD1/rD1 y se detectó por electroforesis en gel de agarosa 1% el producto de PCR (1500 pb). La segunda PCR, con el par F341/R534 se realizó con ADN de 27f/1494r PCR, buffer PCR 5X, MgCl₂ 7,5 mM, dNTPs 20 µM, primer F 341 5ppm/µl, primer R 534 5ppm/µl, Go Taq DNA polimerasa 5 U/µl. Los primers utilizados (27f/1494r)son específicos para bacterias (Ogino y col., 2001). La amplificación por PCR fue realizada en Eppendorf Mastercycler Gradient con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 93° C, 5 min, con desnaturalización a 94° C, 30 s; enfriamiento a 53° C, 30 s y extensión a 72° C, 2 min, seguido de 29 ciclos y una extensión final a 72° C, 10 min. Se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8 % los productos de PCR (200 pb). El armado del gel DGGE se realizó mediante el sistema de bomba peristáltica con gradiente desnaturalizante: urea + formamida 40-60 %.Se armó el gel y se lo dejó polimerizar hasta el día siguiente. Se preparó el buffer de corrida con 140 ml TAE 1X (kit Biorad), se llevó a 7000 ml con agua bidestilada. Se cargó el buffer en la cuba y se calentó a 60°C. Se colocó el gel en la cuba.

El producto de la segunda amplificación fue sembrado en un gel de poliacrilamida con un gradiente de urea. Se sembraron las muestras en cada calle: 20µl de ADN + 5 µl con buffer de carga 6X. Se corrió inicialmente (precorrida) a 100 V durante 20 min y luego a 70 V durante 16 h (corrida). Se apagó la cuba, se dejó enfriar y se retiró el gel y dejó enfriar a temperatura ambiente.

Los productos se detectaron y visualizaron mediante tinción con 6 µl de Sybr Green I (solución 1:40 en buffer TAE 1X) durante 1 h y se llevó a Gel Doc.

Se identificaron y cortaron las bandas de interés. La secuenciación y análisis de las bandas permiti6 la identificaci6n de los microorganismos, que se realiz6 mediante la comparaci6n con secuencias de nucle6tidos conocidos contenidos en la base de datos (Benson y col., 2013).

4 RESULTADOS

4.1 MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Pese a ensayar distintos medios y condiciones de cultivo, no fue posible el aislamiento de microorganismos mediante m6todos microbiol6gicos.

4.2 MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES

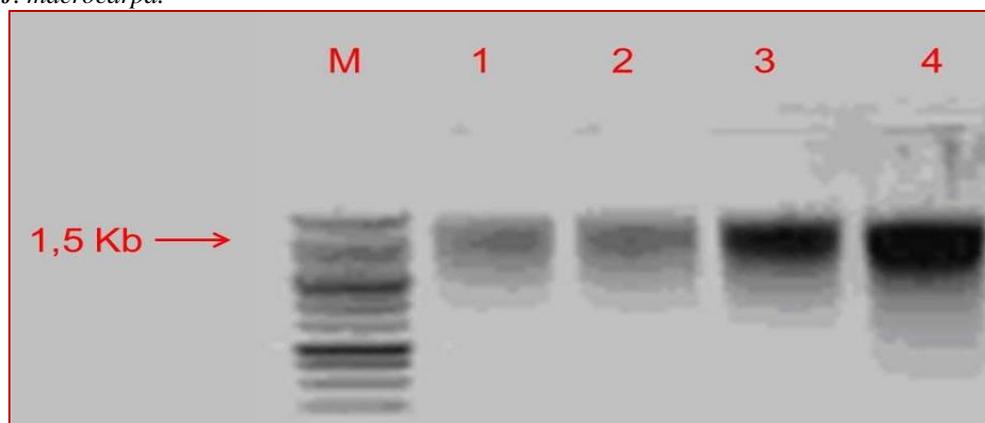
Los rendimientos obtenidos en la cuantificaci6n de ADN oscilaron entre 9,4 y 20 μg ADN g semilla⁻¹. Para *J. curcas* se obtuvo 10,0449324 μg ADN g PS semilla⁻¹, mientras que para *J. macrocarpa* el rendimiento fue superior, de 17,6030405 μg ADN g PS semilla⁻¹ (Tabla 1).

Tabla 1: Rendimientos de ADN de *J. curcas* y *J. macrocarpa*

Especie	ng/ μl DNA	μg DNA/g PS semilla
<i>J. curcas</i>	43,72	10,0449324
<i>J. macrocarpa</i>	76,6	17,6030405

El an6lisis por electroforesis en gel de agarosa, mostr6 que el tama6o del ADN extra6do es de buena calidad seg6n el tama6o de las bandas que se presentaron tanto en *J. curcas* como en *J. macrocarpa*, correspondiendo la m6s ancha a 1,5 Kb (Fig. 1).

Fig.1: Electroforesis del ADN en *J. curcas* y *J. macrocarpa*. Referencias: M, marcador; 1 y 2 ADN de *J. curcas*; 3 y 4 ADN de *J. macrocarpa*.



La electroforesis llevada a cabo en gel de agarosa de los productos de PCR 16S del ADN que codifica para el RNA ribosomal 16S, útil desde el punto de vista taxonómico y filogenético, evidenció que la calidad del ADN permitió una exitosa amplificación para los cebadores utilizados en ambas especies. La banda más gruesa se presentó en 1,5 Kb. En *J. curcas* el primer número representa la muestra, el segundo las repeticiones (1 y 2) y el tercero la muestra pura ó las diluciones correspondientes (fig. 2). En *J. macrocarpa* sólo se utilizaron las muestras puras (Fig. 3).

Fig. 2 :Electroforesis de los productos de PCR en *J. curcas*. Referencias: 1, 1 puro; 2, 1 1:2; 3, 1 1:10; 4, 1 1:20; 5, 2 puro; 6, 2 1:2; 7, 2 1:10; 8, 2 1:20; 9, *E. coli*, control (+); 10, control (-); M, marcador

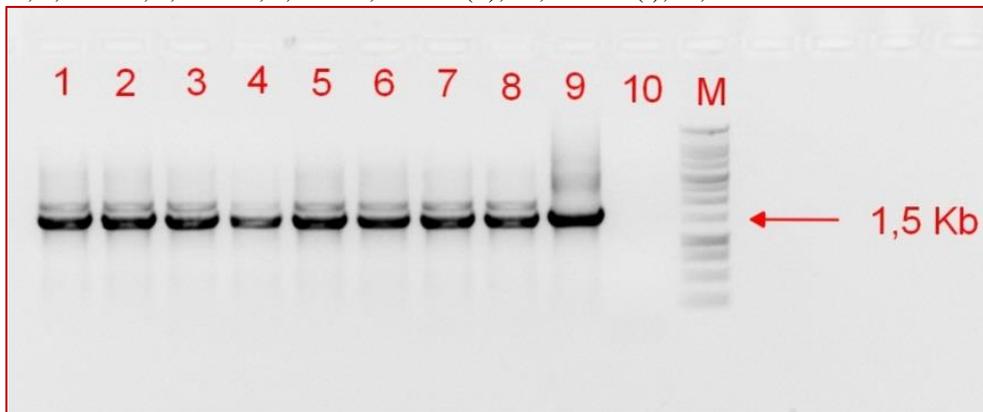
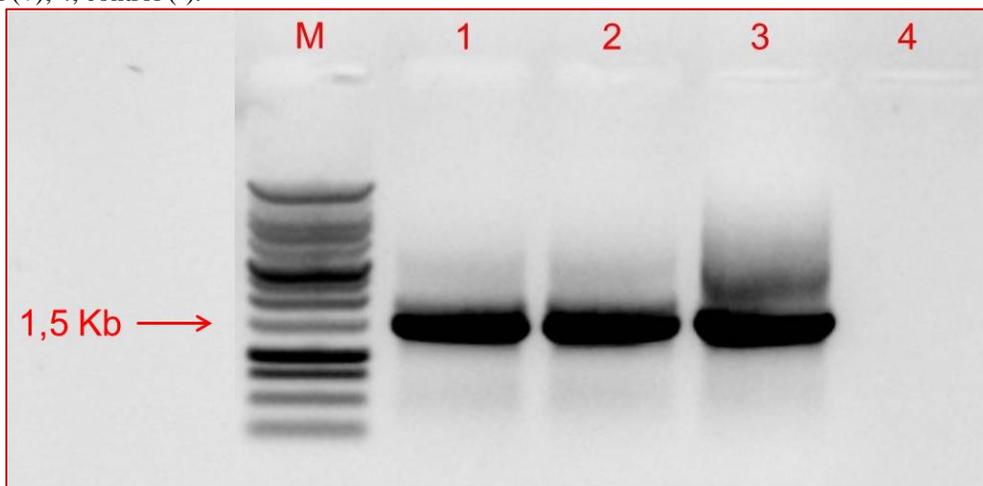


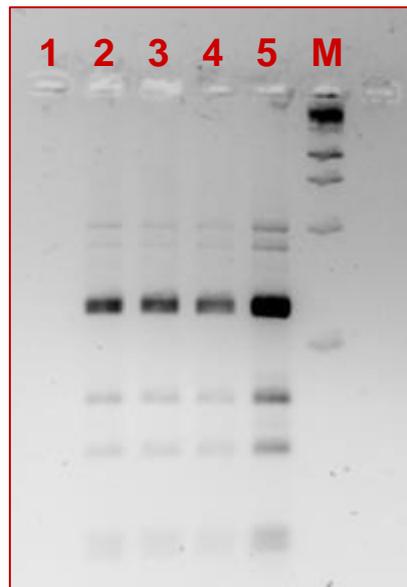
Fig. 3: Electroforesis de los productos de PCR en *J. macrocarpa*. Referencias: M, marcador; 1, 1 puro; 2, 2 puro; 3, *E. coli*, control (+); 4, control (-).



4.2.1 Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)

Posteriormente a la digestión con enzimas de restricción de los productos de amplificación, la electroforesis permitió visualizar las diferentes bandas. Éstas indican la presencia de grupos de endófitos tanto en *J. curcas* como en *J. macrocarpa*(Fig. 4).

Fig. 4: Electroforesis de los productos de digestión. Referencias: 1, control (-); 2-3: *J. curcas*. 4-5: *J. macrocarpa*; M, marcador.



Los productos de digestión obtenidos en el procedimiento de t-RFLP fueron analizados por la herramienta de asignación filogenética (PAT), que permitió comparar los fragmentos TRFs con fragmentos de una base de datos que contienen secuencias génicas conocidas de 16S RNAr. En la tabla 13 se presentan: el tamaño del fragmento generado in silico a partir de la secuencia cargada, el tamaño observado en el experimento (77 ± 1 bp), el número de acceso de la secuencia y el listado de microorganismos posibles para el fragmento obtenido, con la homología presentada de mayor a menor similitud. El patrón obtenido se corresponde con bacterias no cultivables, bacterias no cultivables del suelo, *Streptomycesxiamenensis* y otros microorganismos del género *Streptomyces*, en ambas especies (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de TRFs mediante PAT

Tamaño generado	Tamaño observado	Número de acceso	Microorganismo
76	77.00	EU881345	bacteria no cultivable
76	77.00	EF688396	bacteria no cultivable del suelo
76	77.00	EF492901	bacteria no cultivable
76	77.00	EU223962	bacteria no cultivable
76	77.00	EU335158	bacteria no cultivable
76	77.00	EU669624	bacteria no cultivable
76	77.00	EU881177	bacteria no cultivable
76	77.00	EU881180	bacteria no cultivable
76	77.00	EU786140	bacteria no cultivable
76	77.00	GQ488014	bacteria no cultivable
76	77.00	FJ444638	bacteria no cultivable
76	77.00	FJ444657	bacteria no cultivable
76	77.00	FJ444756	bacteria no cultivable
76	77.00	FJ444756	bacteria no cultivable
76	77.00	EF688354	bacteria no cultivable del suelo

76	77.00	EU881104	bacteria no cultivable
76	77.00	EU881271	bacteria no cultivable
76	77.00	FJ444736	bacteria no cultivable
76	77.00	EF012099	<i>Streptomyces xiamenensis</i> (T)
76	77.00	EF012115	<i>Streptomyces</i> sp 1A01564
76	77.00	EF012140	<i>Streptomyces</i> sp. 13-32
76	77.00	EF056496	<i>Streptomyces</i> sp. 1A01646
76	77.00	EF012129	<i>Streptomyces</i> sp. z78

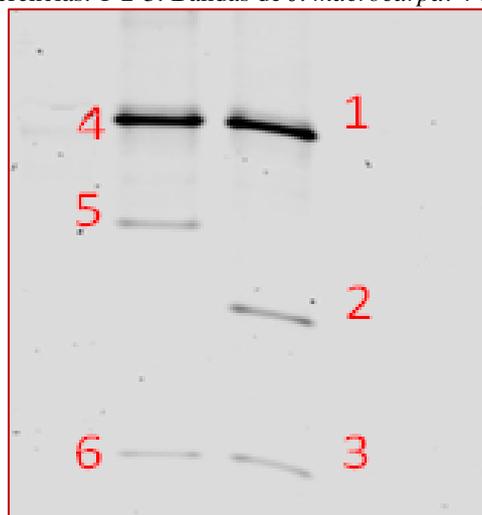
4.2.2 Análisis de electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante(DGGE)

76 77.00 0.012048 EU881345 U881345; uncultured bacteriu

4.2.3 Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de la segunda amplificación de PCR fueron sembrados en gel de DGGE, mediante el sistema de bomba peristáltica. En dicho gel se identificaron tres bandas de interés para cada especie. Cada banda representa un genotipo diferente. Las bandas 1 y 4; 3 y 6 se ubican a la misma altura indicando la presencia de los mismos microorganismos. Las bandas 2 y 5 se presentan a diferentes niveles mostrando que hay diferentes microorganismos en una especie respecto a la otra (Fig. 5).

Fig.5: Gel DGGE. Referencias: 1-2-3: Bandas de *J. macrocarpa*. 4-5-6: Bandas de *J. curcas*.



La secuenciación y posterior análisis de las bandas obtenidas mediante DGGE se analizaron en la Unidad de Genómica de INTA Castelar, donde están depositadas las secuencias de nucleótidos conocidos contenidos en la base de datos. En la tabla 14, se presenta para cada microorganismo, el porcentaje de cobertura, extensión o apareamiento y el porcentaje de identidad con la secuencia analizada.

La banda 1 y 2 tuvieron un porcentaje de identidad de 84% y 85% y aparearon el 94% y 67% de su longitud respectivamente. La banda 3 no presentó coincidencias. La banda 4 es 84% idéntica y apareó el 100% de su longitud. La banda 5 no presentó coincidencias. La banda 6 tuvo un 86% de identidad y apareó solamente un 35%.

Este análisis indicó la presencia del género *Pseudanabaena* en ambas especies y *Chthonomonas* en *J. curcas*.

Tabla 3. Secuenciación y análisis de datos de bandas de DGGE

Banda (especie)	Microorganismo	% de cobertura	% de identidad
DGGE 1 (<i>J. macrocarpa</i>)	<i>Pseudanabaena</i> sp.	94	84
DGGE 2 (<i>J. macrocarpa</i>)	<i>Pseudanabaena</i> sp.	67	85
DGGE 3 (<i>J. macrocarpa</i>)	-	-	-
DGGE 4 (<i>J. curcas</i>)	<i>Pseudanabaena</i> sp.	100	84
DGGE 5 (<i>J. curcas</i>)	-	-	-
DGGE 6 (<i>J. curcas</i>)	<i>Chthonomonas calidirosea</i>	35	86

5 DISCUSIÓN

Los microorganismos endófitos establecen una asociación simbiótica por largo tiempo con las plantas, desarrollando gran transferencia de información entre ambos (Ludwig-Müller, 2015). Estudios previos indican la presencia de actinomicetes endófitos en órganos vegetativos de *J. curcas*, tal es el caso de *Kibdelosporangium* y *phitohabitans* sp. Nov. (Xing y col., 2012) y *Psleudonocardia sichanensis* sp. Nov., aislados en raíces (Qin y col., 2011), *Nocardiodes panzhihuarensis* sp. Nov., en tallos (Qin y col., 2012) y *Colletotrichum truncatum* EF13 en hojas (Kumar y Kaushik, 2013). Además, en hojas de esta especie se hallaron hongos endófitos en hojas de 10 días (D' Jonsiles y col., 2020). En semillas de *J. curcas*, Qian y col. (2011) aislaron *Amycolatopsis endophytica* sp. Nov., un actinomicete, gram-positivo, aeróbico, inmóvil, formador de esporas. En *J. curcas* los únicos endófitos asociados encontrados hasta el presente fueron actinomicetes y no se hallaron endófitos en órganos vegetativos o reproductivos de *J. macrocarpa*.

En nuestra investigación, no se aislaron endófitos en semillas de *J. curcas* y *J. macrocarpa* mediante métodos microbiológicos, utilizando diferentes medios y condiciones de cultivo. En este sentido, Davis y col. (2005) informaron que los métodos microbiológicos clásicos limitan el conocimiento de la diversidad de los microorganismos, ya que sólo un 1% de ellos pueden ser



aislados por lo tanto no es representativo de la comunidad microbiana y pueden brindar información errónea acerca de la no asociación con microorganismos de una especie vegetal. Una planta completamente libre de microorganismos representa una excepción exótica en la naturaleza, más que una regla de relevancia biológica (Partida Martínez y Heil, 2011).

Los estudios con técnicas moleculares independientes de cultivo: análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción (t-RFLP) y electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE), son estudios complementarios que emplean diferentes cebadores para amplificar las secuencias de rADN.

Nuestros resultados, según el análisis de t-RFLP en *J. curcas* y *J. macrocarpa*, se corresponden con bacterias no cultivables asociadas a plantas, bacterias no cultivables del suelo y varios representantes del género *Streptomyces*, entre ellos *Streptomyces xiamenensis*.

El predominio de *Streptomyces* dentro de las actinobacterias endófitas, coincide con investigaciones previas realizadas en *J. curcas* (Qin y col., 2015) y en otras especies vegetales (Zhao y col., 2011; Kim y col., 2012). *Streptomyces*, pertenece al grupo de los Actinomicetes, bacterias filamentosas, generalmente Gram-positivas, aerobias, formadoras de esporas; muchas producen antibióticos naturales como la estreptomicina, tal es el caso de *Streptomyces griseus*. Los actinomicetes endófitos producen gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica y sustancias antitumorales (Qin y col., 2011) y generan resistencia a estrés biótico y abiótico en las plantas huéspedes (Qin y col., 2014). En estudios anteriores realizados en *J. curcas*, *Streptomyces*, mostró actividad promotora del crecimiento vegetal mediante producción de auxinas y sideróforos, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Qin y col., 2015). Además, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de patógenos vegetales, tanto hongos como bacterias (Tchinda y col., 2016; Misk y Franco, 2011; Kumar y Kaushik, 2013; Golinska y col., 2015). Las bacterias endófitas asociadas a semillas que poseen características benéficas, como estimulación de la germinación y promoción del establecimiento de la plántula, suelen ser seleccionadas por el vegetal y transferidas vía semilla, asegurando de esta manera dichas características a futuras generaciones (Truyens y col., 2015).

Streptomyces xiamenensis debe su nombre a la producción de un fármaco útil para tratamiento de la fibrosis: la xiamenimina. Esta especie produce compuestos tales como terpenoides, sideróforos y ectoínas, estos últimos son osmolitos protectores que ayudan al vegetal a sobrevivir ante un estrés osmótico (Hwang y col., 2014).



En este estudio, con la utilización de la técnica de electroforesis en gel en gradiente desnaturizante se determinó la presencia de los géneros *Pseudanabaena* en *J. curcas* y *J. macrocarpa* y *Chthonomonas* en *J. curcas*.

Pseudanabaena, pertenece al grupo de las cianobacterias, antiguamente llamadas algas verde-azuladas, son bacterias Gram-negativas y los únicos procariontes que realizan fotosíntesis. Recientemente, se ha establecido que las cianobacterias poseen enzimas nitrogenasas situadas en heterocistos que fijan el nitrógeno atmosférico y lo convierten en formas accesibles para la planta, con gran impacto en el ciclo de este elemento (Tsedek y col., 2016). El tipo de asociación cianobacteria-planta es simbiótica; el procarionte fija nitrógeno y lo transfiere en forma de amonio a las plantas mediante mecanismos moleculares desconocidos y como la actividad fotosintética de las cianobacterias es baja, la planta le provee carbohidratos (Ekman y col., 2013).

De acuerdo a investigaciones recientes, *Chthonomonas calidirosea*, es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, termófila, móvil, no formadora de esporas, que se aisló por primera vez en Nueva Zelandia mediante 16S rRNA; es el primer representante de la nueva clase Chthonomonadetes y del Phylum Armatimonadetes (Lee y col., 2016). Ese microorganismo es no cultivable por métodos microbiológicos y en cuanto a su metabolismo no degrada polisacáridos complejos, utiliza carbohidratos menos comunes y derivados como sorbitol y galactanos y puede establecer una relación mutualista por su capacidad de remoción de azúcares de cinco carbonos componentes de la hemicelulosa del medio ambiente, facilitando la degradación de la celulosa que muchas especies no pueden realizar (Lee y col., 2014).

En esta investigación, el aislamiento de microorganismos no cultivables asociados a plantas y no cultivables del suelo mediante la técnica molecular de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción, explicaría la dificultad encontrada en lograr aislar microorganismos en cultivos. Mediante esta técnica, se lograron identificar algunos de los géneros potencialmente presentes en ambos tipos de semillas, algunos de los cuales o bien son no cultivables o quizás se logre su identificación con técnicas de mayor resolución como la secuenciación profunda y microscopía electrónica de barrido (Ranjard y col., 2000). Laser biospeckle activity (LBSA) to be used for the detection of endophytic colonization of leaves *Jatropha curcas*. Considering that endophytes plays important roles in plant fitness, and traditional techniques to study them are most often destructive, this noninvasive technique could be used as a good indicator of endophytic colonization (D' Jonsiles y col., 2020).

Como *J. curcas* y *J. macrocarpa*, crecen en suelos marginales pobres en nutrientes, sus requerimientos nutricionales resultan mayores que en otros cultivos. Los hallazgos de esta



investigación, indican la importancia de la presencia de microorganismos nativos presente en sus semillas, en especial, las actinobacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal que cumplen un importante rol en la planta hospedante. Además, debemos considerar el aporte de las cianófitas simbióticas que contribuyen en la fijación del nitrógeno. En *J. curcas*, la asociación con *Chthonomonas calidirosea* suma otras vías en el metabolismo de carbohidratos. Este microorganismo hasta la actualidad sólo se lo había encontrado en ambientes de elevadas temperaturas como volcanes. Investigaciones previas señalan que la inoculación de endófitos en hojas de *J. curcas*, incrementa características agronómicas deseables en plantas (D' Jonsiles y col., 2019).

6 CONCLUSIONES

El análisis de electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante indica la presencia de los géneros *Pseudanabaena* en *J. curcas* y *J. macrocarpa* y *Chthonomonas* en *J. curcas*. El patrón de polimorfismos de longitud de fragmentos terminales de restricción se corresponde con microorganismos no cultivables o del género *Streptomyces*, en ambas especies.



BIBLIOGRAFIA

- Bianciotto V., Genre A., Jargeat P., Lumini E., G. Be´card G., Bonfante P. 2004. Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through vegetative spore generations. *Applied Environmental Microbiology*, 70:3600-3608
- Bogani P., Calistri E., Biricolti S., Ruffini Castiglione M., Turrini A., Giovannetti M., Buiatti M. 2015. The rat glucocorticoid receptor integration in *Nicotiana langsdorffii* genome affects plant responses to abiotic stresses and to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Biotechnology Reports*, 9: 209-220
- Davis K.E.R., Joseph S.J., Jansen P.H. 2005. Effects of growth medium, inoculum size and incubation on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 826-834
- Dhakshanamoorthy D, Selvaraj R, Chidambaram A.L.A. 2011. Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. Using gama rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. *Comptes Rendus Biologies*, 334: 24-30
- D’Jonsiles M., Carmarán C., Robles C., Ceriani N., Novas M. 2019. Mycorrhizal Colonization and Soil Parameters Affected by Foliar Endophytes in *Jatropha curcas* L. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*: 1-10
- D’Jonsiles M., Galizzi G., Dolinko A., Novas M., Ceriani N., Carmarán C. 2020. Optical study of laser biospeckle activity in leaves of *Jatropha curcas* L. A noninvasive analysis of foliar endophyte colonization. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 1-22
- Franco-Correa M., Quintana A., Duque C., Suarez C., Rodríguez M.X., Barea J.M. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*, 45: 209-217
- Golinska P., Wypij M., Agarkar G., Rathod D., Dahm H., Rai M. 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108:267-289
- Gregory P. 2006. *Plant root: growth, activity and interaction with soils*. Ed. Blackwell PublishingLtd, Oxford, UK. pp 318
- Hwang K.S, Kim H.U, Charusanti P, O, Lee S.Y. 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32 (2): 255-268
- Karthikeyan B., Jaleel C.A., Lakshmanan G.M. 2008. Studies on rhzosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, 62: 143-145
- Kent A.D., Smith D.J., Benson B.J., Triplett E.W. 2003. Web-Based Phylogenetic Assignment Tool for Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiles of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6768-6776



- Kim T., Cho S., Han J., Shin Y.M., Lee H.B., Kim S.B. 2012. Diversity and physiological properties of root endophytic actinobacteria in native herbaceous plants of Korea. *Journal of Microbiology*, 50: 50-57
- Kumar S., Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PlosOne*, 8 (2): 1-8
- Lee K.C.Y., Morgan X.C., Dunfield P.F., Tamas I., McDonald I.R., Stott M.B. 2014. Genomic analysis of *Chthonomonas calidirosea*, the first sequenced isolate of the phylum Armatimonadetes. *International Society for Microbial Ecology*, 8: 1522-1533
- Lee K.C., Stott M.B., Dunfield P.F., Huttenhower C., McDonald I.R., Morgan X.C. 2016. The *Chthonomonas calidirosea* Genome Is Highly Conserved across Geographic Locations and Distinct Chemical and Microbial Environments in New Zealand's Taupō Volcanic Zone. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12): 3572-3581
- Li W.J., Xu P., Schumann P., Zhang Y. Q., Pukall R., Xu L.H., Stackebrandt E., Jiang C.L. 2007. *Georgenia ruanii* sp. Nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China) and emended description of the genus *Georgenia*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 57: 1424-1428
- Ludwig-Müller J. 2015. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production?. *Biotechnol Lett*, 37: 1325-1334
- Madhaiyan M., Peng N., Ji L. 2013. Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. strain R4-368, an endophytic N-fixing gammaproteobacterium isolated from surface-sterilized roots of *Jatropha curcas* L. *Genome Announcements*, 1(4):e00544-13. doi:10.1128/genomeA.00544-13.
- Montes Osorio L.R., Torres Salvador A.F., Jongschaap R.E.E., Azurdia Perez C.A., Sandoval J.E.B, Trindade L.M., Visser R.G.F, Van Loo E.N. 2014. High level of molecular and phenotypic biodiversity in *Jatropha curcas* from Central America compared to Africa, Asia and South America. *Plant Biology*, 14 (77): 1-19
- Partida Martinez L.P., Heil M. 2011. The microbe-free plant: fact or artifact? *Plant Science*, 2 (100): 1-16
- Pedranzani H., Tavecchio N., Gutiérrez M., Garbero M., Porcel R., Ruiz-Lozano J. M. 2015. Differential Effects of Cold Stress on the Antioxidant Response of Mycorrhizal and Non-Mycorrhizal of *Jatropha curcas* (L.) *Plants Journal of Agricultural Science*, 7 (8): 35-43
- Qian M., Sheng Q., Guang-Kai B., Bo Y., Ke X., Yue-Ji Z., Qin L., Shu-Kun T., Wen-Jun L., Ji-Hong J. 2011. *Amycolatopsis endophytica* sp. a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100: 333-339
- Qin S., Li J., Chen H.H, Zhao G.Z, Zhu W.Y, Jiang C.L, Xu L.H, Li W.J. 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6176-6186



Qin S., Xing K., Fei S.M., Lin, Q., Chen X.M., Cao C. L., Sun Y., Wang Y., Li W.J., Jiang J.H. 2011. *Pseudonocardia sichuanensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from the root of *Jatropha curcas* L. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99: 395-401

Qin S., Yuan B., Zhang Y.J., Bian G.K., Tamura T., Sun B.Z., Li W.J., Jiang J.H. 2012. *Nocardioides panzhuhuaensis* sp. Nov., a novel endophytic actinomycete isolates from medicinal plant *Jatropha curcas* L, *Antonie van Leeuwenhoek*, 102: 353-360

Qin S., Zhang Y.J., Yuan B., Xu P.Y., Xing K., Wang J., Jiang J.H. 2014. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth- promoting activity under salt stress. *Plant Soil*, 374: 753-766

Qin S., Miao Q., Feng W.W., Wang Y., Zhu X., Xing K., Jiang J.H. 2015. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Applied Soil Ecology*, 93: 47-55

Ranjard L., Poly F., Nazaret F. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151: 167-177

Shah M., Soares E.L., Carvalho P.C., Soares A.A., Domont G.B., Nogueira F.C.S., Campos F.A.P. 2015. Proteomic Analysis of the Endosperm Ontogeny of *Jatropha curcas* L. *Seeds Journal of Proteome Research*. 14: 2557-2568

Shirling E. B., Gottlieb D., 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16 (3): 313-340

Stefanis C., Alexopoulos A., Voidarou C., Vavias S., Bezirtzoglou E. 2013. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiologica*, 58:61-68

Stone J.K., Charles W.B., James F.W. 2000. An overview of endophytic microbes. *Endophytism defined*. Ed. Dekker, New York, USA, pp 3-5

Strobel G.A, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67:491-502

Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. 2008. Endophytes Bacterial Diversity in Rice (*Oriza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology*, 55: 415-424

Susmita P., Bhagobaty R., Nihalani M., Joshi S. 2020. Characterization of oleaginous endophytic fungi of biodiesel plants as potential biofuel minifactories. *India*. 1-20 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953420302841>

Tchinda R.A.M., Boudjeko T., Simao-Beaunoir A.M., Lerat S., Tsala E., Monga E., Beaulieu C. 2016. Morphological, Physiological, and Taxonomic Characterization of Actinobacterial Isolates Living as Endophytes of Cacao Pods and Cacao Seeds. *Microbes and environments*, 3 (1): 56-62



Truyens S., Weyens L., Cuypers A., Vangronsveld J. 2015. Bacterial seeds endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7 (1): 40-50

Xing K., Bian G.K., Qin S., Klenk H.P., Yuan B., Zhang Y.J., Li W.J., Jiang J.H. 2012. *Kibdelosporangium phytohabitans* sp. Nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil seed plant *Jatropha curcas* L. containing 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid deaminase. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101: 433-441

Zhao K., Penttinen P., Guan T., Xiao J., Chen Q., Xu J., Lindstrom K., Zhang L., Zhang X., Strobel G.A. 2011. The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. *Current Microbiology*, 62: 182-190