

DIVERSIDAD DE BACTERIAS TOTALES Y ENDÓFITAS ASOCIADAS A RAÍCES DEL PASTO *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus

DIVERSITY OF BACTERIA TOTAL AND ENDOPHYTES ASSOCIATED GRASS ROOTS *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus

PEREZ C., ALEXANDER. Dr^{1*} ROJAS S., JOHANNA. M.Sc² FUENTES C., JUSTO Esp.³

¹ Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia. Grupo Bioprospección Agropecuaria. ² Universidad de Sucre, Colombia, Facultad de Educación y Ciencias, ³ Universidad de Sucre, Facultad de ingeniería.

*Correspondencia: alexander.perez@unisucra.edu.co

Recibido: 24-01-2010; Aceptado: 17-02-2010

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar la diversidad de comunidades cultivables de bacterias totales y endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana en el departamento de Sucre. La diversidad de comunidades de bacterias totales y endófitas fue realizada mediante aislamiento de colonias en medios de cultivos (SAKIYAMA et al., 2001). La densidad poblacional fue estimada por conteo directo de colonias en placa y las características culturales de cada morfotipo fueron obtenidas mediante observación de cada colonia formada. Una vez cuantificadas las comunidades de bacterias totales y endófitas, se determinó la riqueza de especie (R), el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) y la equitabilidad de morfotipos mediante modelos matemáticos propuestos para cada fin. Para establecer diferencias estadísticas entre comunidades de bacterias totales y endófitas se realizaron ANOVAS, test paramétricos y no paramétricos utilizando el programa R. Fueron muestreadas 14 fincas ganaderas, localizadas en la región fisiográfica de Sabanas de Sucre, donde fue reportada la presencia por primera vez de bacterias endófitas asociadas a las raíces de colosuana. Fueron encontradas diferencias significativas entre la riqueza de especies y la equitabilidad de bacterias totales y endófitas en raíces del pasto. Este es el primer reporte que se tiene sobre la presencia de bacterias endófitas en la raíces de este pasto a nivel mundial.

Palabras claves: Bacteria totales, bacteria endófitas, raíces, colosuana.

Abstract

The objective of this study was to determine the diversity of total bacterial communities and cultivable endophytes associated with grass roots colosuana in the department of Sucre. The diversity of total bacterial communities and endophytes was made by isolation of colonies in culture media (SAKIYAMA *et al.*, 2001). The population density was estimated by direct counting of colonies on plate and cultural characteristics of each morphotype were obtained by observation of each colony made. Once quantified total bacterial communities and endophytes, we determined the species richness (R), the diversity index of Shannon-Weaver (H) and equitability of morphotypes with mathematical models suggested for each purpose. To establish statistical differences between total bacterial communities and endophytes were conducted ANOVAs, parametric and nonparametric test using the program R. 14 farms Livestock were sampled, located in the physiographic region of Sabana de Sucre, where he was reported for the first time the presence of bacteria associated with endophytes colosuana roots. Significant differences were detected between species richness and evenness of total bacteria and endophytes in grass roots. This is the first report that we have about the presence of bacteria endophytes in grass roots of this worldwide.

Key words: bacteria total, bacteria endophytic, roots, colosuana.

Introducción

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (STROBEL, 2003; HUA WEI *et al.*, 2006). Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera a ellos, o viceversa. Las bacterias endófitas residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (HUREK *et al.*, 1994; BELL *et al.*, 1995).

Los estudios señalan que las bacterias endófitas interactúan con patógenos (HUANG, 1991; BACON y HINTON, 1997; SESSITCH *et al.*, 2002), promueven el crecimiento en las plantas (TSAVKELOVA *et al.*, 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (CHANWAY, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (JIMENEZ-SALGADO *et al.* 1997; ESTRADA *et al.*, 2002) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios

(BROOKS *et al.*, 1994; BERG *et al.*, 2005; TAN y ZOU, 2001; LONG *et al.*, 2003; SHIOMI *et al.*, 2006) y biorremediación (NEWMAN y REYNOLDS, 2005).

Recientemente, aislados de bacterias endófitas de *Populus sp.* fueron caracterizadas por su uso potencial en proceso de fitorremediación (MOORE *et al.*, 2006), a ejemplo del uso de *Burkholderia cepacia* G4 que incrementa la tolerancia de las plantas al tolueno (VAN DER LELIE, 2005) y de *Methylobacterium populum sp nov. BJ001* como participante de la biodegradación de compuestos, tales como: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) y octahidro-1,3,5-7-tetranitro-1,3,5-7-tetrazocine (RDX) (VAN *et al.*, 2004).

La diversidad de bacterias endófitas representa apenas una pequeña fracción de la diversidad total existente en la naturaleza. Informaciones derivadas de estudios comparativos indican, que apenas una pequeña fracción de los microorganismos en la naturaleza (entre 0,1% a 10%, dependiendo del hábitat) es cultivable mediante empleo de métodos microbiológicos convencionales (RANJARD *et al.*, 2000; GREEN y BOHANNAN, 2006). Comunidades de bacterias endófitas han sido aisladas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas comerciales, en especies de árboles forestales (BROOKS *et al.*, 1994, CANKAR *et al.*, 2005), frutales (WHITESIDES y SPOTTS, 1991; VEGA *et al.*, 2005; LACAVA *et al.*, 2006), plantas herbáceas como caña de azúcar (JACOBS *et al.*, 1985), soya (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004) y orquídeas (TSAVKELOVA *et al.*, 2007).

Las pasturas del Caribe colombiano están constituidas por gramíneas de alto potencial productivo como guinea (*Panicum máximum*), angetón (*Dichanthium aristatum*), puntero (*Hyparrhenia rufa*) y pará (*Brachiaria mutica*), algunas especies naturalizadas como Colosuana o kikuyina (*Bothriochloa pertusa*). Esta última ha colonizado en forma rápida y progresiva la región, invadiendo las especies cultivadas de tal forma que en la actualidad cubre extensas áreas de las zonas de vidas de bosques secos tropical (bs-T) y bosque muy seco tropical (bms-T) en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar y Magdalena (SIERRA *et al.*, 1997).

El pasto colosuana, alcanza un total de 274,005 ha, distribuidas en 19 municipios del departamento de Sucre (AGUILERA, 2005). En este departamento, la ganadería de doble propósito representa un 84,9% de su territorio (VILORIA, 2002). Una de las limitantes en la productividad animal es la escasez o falta total de forraje durante la época seca debido a la estacionalidad de las lluvias. Esta escasez se incrementa por los diferentes grados de compactación, problemas erosivos, bajos niveles de fertilidad, la falta de abonamientos y el pastoreo extensivo, generando la degradación de las praderas (AGUILERA, 2005).

A nivel nacional e internacional no existen evidencias de la presencia de bacterias endófitas asociadas a diferentes tejidos del pasto colosuana y más aún se desconoce la ecología funcional que estas bacterias cumple dentro de las praderas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la diversidad de comunidades cultivables de bacterias totales y endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana en el departamento de Sucre.

Metodología

Muestreo: Las zonas estudiadas fueron previamente identificadas, las fincas de cada zona se seleccionaron en forma aleatoria. En las fincas ganaderas se realizó un muestreo, representativo, tomando entre 15 y 20 submuestras al azar a una profundidad de 0-20 cm, recolectando al tiempo suelo y raíces. Las submuestras se homogenizaron para conformar una muestra por finca con un peso aproximado de 2.000 gr, las cuales se depositaron en bolsas plásticas rotuladas con el número de la finca, corregimiento, área sembrada con el pasto y fecha de recolección. La muestra tomada de cada finca ganadera fue utilizada para el análisis microbiológico.

Las muestras de suelos fueron tamizadas para separar suelos (piedras, cascajos) y raíces. Una vez tamizadas se procedió a los análisis microbiológicos de comunidades totales y endófitas en las raíces.

Aislamiento y cuantificación de bacterias totales y endófitas: diez raíces por muestras, fueron individualmente colocadas en 10 frascos Erlenmeyer de 50 mL para la desinfección superficial por lavado en agua destilada y detergente neutro, por un minuto, seguida de cuatro enjuagues en agua destilada esterilizada. Las raíces lavadas fueron transferidas a nuevos frascos conteniendo agua esterilizada, para el aislamiento de comunidades de bacterias totales y endófitas (SAKIYAMA *et al.*, 2001).

La densidad de bacterias totales por raíces, en UFC.raíces⁻¹, fue estimada por conteo directo de colonias en placas. Durante el conteo fueron observadas y seleccionadas las colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar nutritivo.

Para el aislamiento de bacterias endófitas, cada raíz fue sometida a proceso de esterilización superficial (SAKIYAMA *et al.*, 2001). El proceso consistió de: dos lavados de la raíz en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0; inmersión por 1

min en alcohol 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5 % y Tween 80%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70 % seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 y, finalmente, el lavado por cuatro veces en agua destilada esterilizada. El proceso fue repetido por dos veces. Para confirmar la esterilización de la superficie de las raíces, alícuota del último lavado fue esparcida en placa conteniendo medio de cultivo agar nutritivo e incubada a 28°C por 72 horas. Seguidamente, las raíces fueron transferida para tubo conteniendo caldo nutritivo e incubado a 28°C por 72 horas, para la certificación de la no presencia de microorganismos en la superficie de las raíces a ser utilizadas para o aislamiento de bacterias endófitas cultivables.

Para cuantificar el total de bacterias endófitas, cada raíz desinfectada superficialmente fue colocado en tubo con 10 mL de solución estéril de tampón fosfato de potasio 0,05 mM L⁻¹, pH 7,0 y triturado. La suspensión obtenida fue filtrada a través de malla de gaza y el filtrado fue recogido en tubo de ensayo estéril, seguidamente se prepararon diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ en solución tampón de fosfato de potasio, en replicas de tres por muestra y por dilución. Alícuotas de 100 µL fueron transferidas para medio sólido de agar nutritivo y esparcidas con el uso de espátula de Drigalsky, seguidamente fueron incubadas las placas a 28°C por 72 horas.

Para el aislamiento y cuantificación de comunidades de bacterias totales (epifíticas y endófitas), se siguió el mismo procedimiento para bacterias endófitas exceptuando el proceso de desinfección de raíces.

Comunidades de bacterias totales y endófitas: una vez cuantificada las comunidades de bacterias totales y endófitas, se determinó la riqueza de especie (R), el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) y la equitabilidad de individuos mediante los siguientes modelos matemáticos propuesto para tal fin (TOTOLA y CHAER, 2002).

$$\text{Riqueza de especie por Margalef: } R = \frac{S-1}{\log(n)}$$

$$\text{Índice de diversidad de Shannon-Weaver: } H' = \frac{1}{N} \log N - \sum (ni \log ni)$$

Donde:

S: número total de especies en la comunidad

ni: número total de individuos en la *enésima* población

N: número total de individuos en la comunidad

$$\text{Equitabilidad (E): } E = \frac{H'}{\log R}$$

Análisis estadísticos: Para establecer diferencias significativas entre riqueza y equitabilidad de especies de comunidades de bacterias totales y endófitas, se realizaron ANOVAS y test paramétricos y no paramétricos a los datos de UFC/gr de raíz mediante el programa estadístico R.

Resultados

La densidad poblacional para bacterias totales aisladas de raíces del pasto colosuana osciló entre $5,4 \times 10^5$ a $1,14 \times 10^6$ UFC.raíz⁻¹ y para endófitas de $3,4 \times 10^3$ a $5,3 \times 10^4$ UFC.raíz⁻¹. En la Fig. 1 se puede observar la diversidad de bacterias totales y endófitas con diferentes aspectos morfológicos.

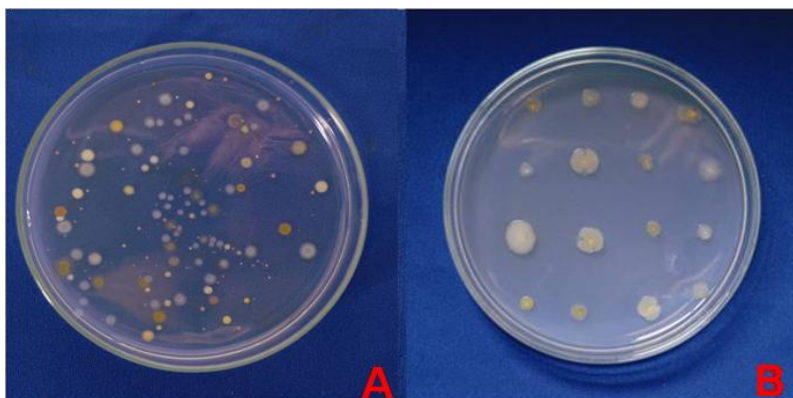


Figura 1. Aspectos morfológicos de bacterias totales (A) y endófitas (B) aisladas de raíces de pasto colosuana

Al realizar muestreos en diferentes localidades (fincas) se pudo observar que existe una riqueza de morfotipos tanto de bacterias totales como de endófitos asociadas a la raíz del pasto colosuana (Fig.2).

El ANOVA para riqueza de especies de bacterias en UFC/gr de raíz del pasto colosuana, muestra diferencias altamente significativas (p -value = 0,000001311) entre el número de bacterias totales y endófitas. La abundancia de bacterias en raíces, mediante análisis de boxplot señala diferencias altamente significativa entre número de bacterias totales con relación a bacterias endófitas (Fig. 3).

El índice de diversidad mediante Shannon-Weaver de comunidades de bacterias totales y endófitas se muestra en Fig. 4. Los resultados obtenidos muestran un mayor índice de diversidad para comunidades de bacterias totales. Similarmente

se observa en la Fig. 5 una mayor equitabilidad para bacterias totales. El ANOVA para equitabilidad mostro un valor (p-value 0,05863) cercano al valor crítico de 0,05, por tal razón se procedió a realizar una prueba de normalidad utilizando el test de Shapiro Wilk, mostrando un p-value = 0,00142 y finalmente se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, quien mostró diferencias significativas entre comunidades de bacterias totales y endófitas (p-value = 0,04306). La Fig. 6 muestra un boxplot entre las comunidades de bacterias totales y endófitas.

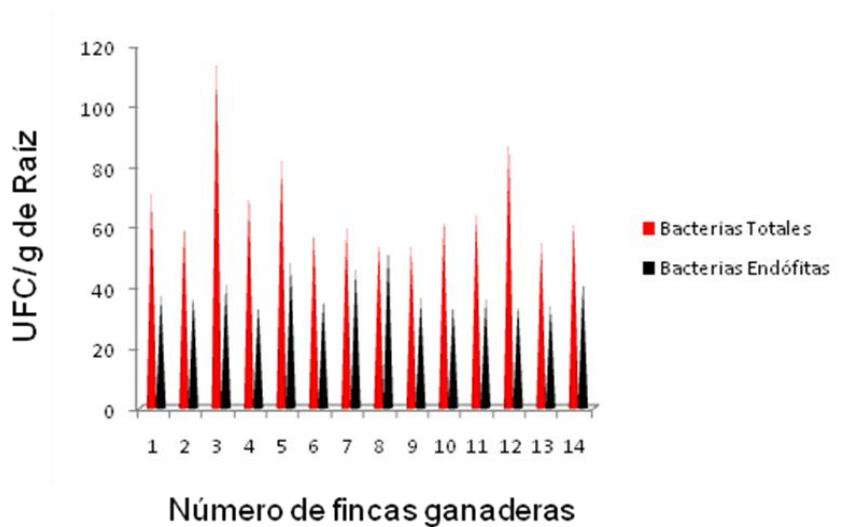


Figura 2. Riqueza de morfotipos (R) de comunidades de bacterias totales y endófitas en raíces de pasto colosuana en fincas ganaderas del Departamento de Sucre

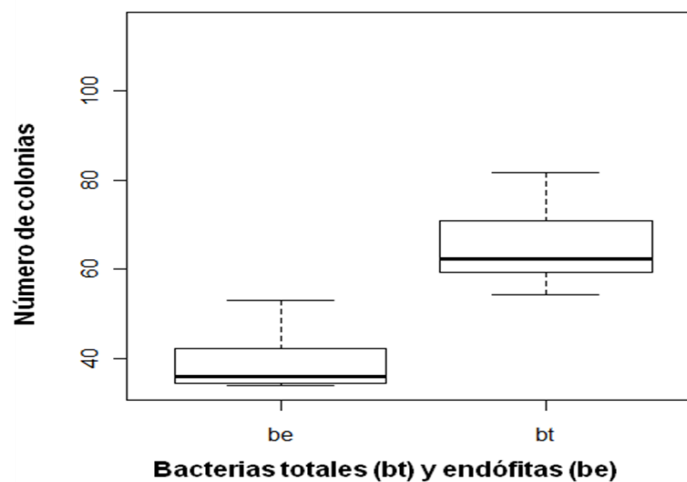


Figura 3. Boxplot del número de bacterias totales y endófitas aisladas de raíces del pasto colosuana



Figura 4. Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) de comunidades de bacterias totales y endófitas en raíces de pasto colosuana en fincas ganaderas del Departamento de Sucre

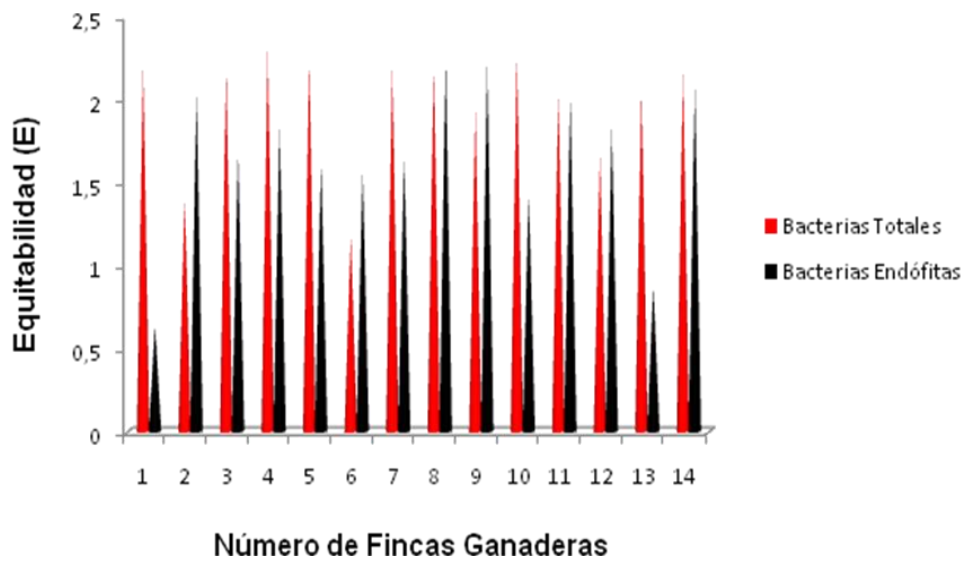


Figura 5. Equitabilidad (E) de comunidades bacterias totales y endófitas en raíces de pasto colosuana en fincas ganaderas del Departamento de Sucre

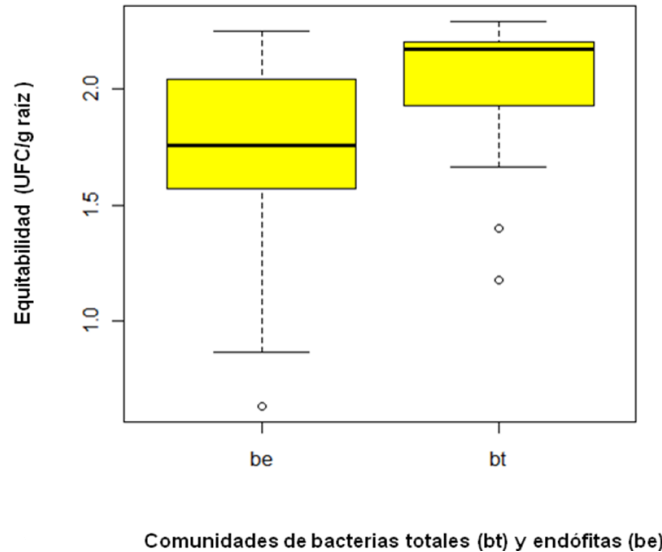


Figura 6. Boxplot de equitabilidad de comunidades de bacterias totales y endófitas en raíces de pasto colosuana

Discusión

Existe una baja densidad poblacional de bacterias endófitas con relación a comunidades totales (Fig. 3). Ha sido demostrada que la densidad poblacional de bacterias endófitas es menor que las patogénicas. Evolutivamente, los endófitos aparecen como microorganismos intermediarios entre bacterias saprofitas y patogénicas de plantas (HALLMMAN *et al.*, 1997). Los valores de densidad poblacional de bacterias endófitas nativas en tejido de la mayoría de las especies vegetales sitúense en torno de 10^3 a 10^6 UFC.g⁻¹ de tejido fresco (HALLMANN *et al.*, 1997). Las mayores densidades poblacionales, nativas o introducidas, son normalmente observadas en la raíz y en la parte inferior del tallo, presentándose decrecimiento del tallo hasta la hoja de bacterias endófitas (LAMB *et al.*, 1996). Las variaciones estacionales, el tipo de tejido vegetal (MOCALI *et al.*, 2003), especie y cultivares de hospedero y la interacción con otros microorganismos benéficos (PILLAY y NORWAK, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2002), también pueden influenciar el patrón de colonización de las bacterias endófitas.

Las bacterias están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epifitas, endófitas, simbióticas y antagónicas. Las bacterias asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos

mecanismos para adaptación y colonización (PRESTON *et al.*, 1998). Aspectos importantes de la diversidad de bacterias en el ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen. En los últimos años, ha despertado intereses cada vez mayor aspectos relacionados con la composición, estructura y función de comunidades bacterianas y, en particular las unidades fundamentales de las cuales están compuestas (WARD, 2006).

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon, también conocido como Shannon-Weaver (SHANNON y WEAVER, 1949), derivado de la teoría de información como una medida de la entropía. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. El valor de este índice aumenta al aumentar la complejidad del sistema, aunque en sistemas naturales, la diversidad específica suele ser inferior. La equitabilidad (E) es una medida del grado de similitud de la abundancia de especies diferentes. Cuando hay proporciones similares de todas las subespecies entonces la uniformidad es uno, pero cuando las abundancias son muy diferentes (algunas poco comunes y algunas especies comunes), entonces el valor es mayor a uno, indicando heterogeneidad en las especies dentro de la población microbianas. Para las poblaciones de bacterias totales se encontraron valores superiores a uno, lo que indica que existe una heterogeneidad de morfotipos aislados, esto es debido probablemente a que las comunidades de bacterias totales están representadas por bacterias epifitas y endófitas.

Existen evidencias sobre la presencia de bacterias endófitas en pasturas; HUREK y REINHOLD-HUREK (2003) aislaron e identificaron a *Azoarcus BH72* como una bacteria endófito de tejidos de raíces en la especie de pasto *Leptochloa fusca* L. Kunth, presente en Pakistán, con capacidad de fijar nitrógeno biológicamente. De otra parte, SCOTT (2003) aisló y encontró a *Epichloë*, un hongo endófito asociado con varias especies de pastos de la subfamilia y la posterior demostración de este microorganismo como un posible agente de control biológico en estas especies de plantas. Estudios moleculares reciente sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de las planta, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno. No existe evidencias sobre la diversidad, ni la funcionalidad de bacterias endófitas asociadas tejidos del pasto colosuana en condiciones

climáticas, edáficas y de manejo de este pasto en agroecosistemas a nivel mundial, de Colombia y costa Caribe, razón por lo cual se hace necesario desarrollar investigaciones básicas y aplicadas para el conocimiento de este recurso biológico y su posible papel en la sostenibilidad y producción de esta especie de pasto.

El monitoreo de la diversidad biológica en un ecosistema puede servir de criterio para detectar alteraciones ambientales. Estas informaciones pueden servir para el establecimiento de una relación más confiable entre diversidad y sustentabilidad, en la medida que se pueda definir el mínimo de diversidad capaz de permitir el funcionamiento de los ciclos dentro del ecosistema. El uso de índices de diversidad contribuye para una mejor comprensión del funcionamiento de una comunidad compleja. Es importante considerar la comunidad en función de componentes, el número de especies que componen la comunidad y el número de individuos en cada población. Los índices de diversidad de especies cuando son aplicados al estudio de comunidades microbianas, requieren la evaluación de un número grande de microorganismos (TOTOLA y CHAER, 2002).

Las bacterias endófitas son consideradas como modelo de estudio de expresión génica en su nicho natural o hábitat dentro de las plantas (MARON *et al.*, 2006). Sin embargo, cuestiones básicas sobre la diversidad microbiana existente en plantas comerciales, así como la estructura de esas comunidades y la funcionalidad en diferentes especies vegetales, localizadas en diversos ambientes geográficamente definidos, deben ser objeto de investigaciones modernas en lo referente a bacterias endófitas y productividad.

Referencias

- AGUILERA, M.M. 2005. Documento de trabajo sobre economía regional. Economía Regional: *La Economía del Departamento de Sucre: Ganadería y Sector Público*. Banco Ganadero, 63:50-54.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.JR.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied Environmental Microbiology* 68:4906-4914.
- BACON, W.C.; HINTON, D.M.1997. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi: HURST, C. *et al. Manual of environmental microbiology*. American Society for Microbiology, USA.

BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.; CHAIN, J.M. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology* 41(1):46-53.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi, *FEMS Microbiology Ecology* 5(1):215–229.

BROOKS, D.S.; GONZALEZ, C.F.; APPEL, D.N.; FILER, T.H. 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biology Conservation* 4:373–381.

CANKAR, K.; KRAIGHER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters* 244(2):341-345.

CHANWAY, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50: 149–170.

ESTRADA, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. 2002. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48:285–294.

GREEN, J.; BOHANNAN, B. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in ecology and evolution* 21(9): 501-507.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43:895-914.

HUA-WEI, Z.; YOUNG, CH.S.; REN, X.T. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* 23:753-771.

HUANG, J. 1991. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phythopatology* 24:141-157.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN M.; KELLENBERGER, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* 176:1913-1923.

HUREK T., REINHOLD-HUREK B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology* 106(2-3):169–178.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M., GABRIELSON, D.A. 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany* 63:1262-1265.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63:3676-3683.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6:1244-1251.

LACAVALA, T.P.; DINI, A.F.; ARAUJO, W.; AZEVEDO, J. 2006. Caracterização da comunidade de bactérias endofíticas de cítricos por isolamento, PCR específica e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 637-542.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology* 42:1112-1120.

LONG, H.H.; FURUYA, N.; KUROSE, D.; TAKESHITA, M.; TAKANAMI, Y. 2003. Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *Journal of the Faculty of Agriculture* 48:21–28.

MARON, P.; RANJARD, L.; MOUGEL, C.; LEMANCEAU, P. 2006. Metaproteomics: A new Approach for Studying Functional Microbial Ecology. *Microbial Ecology* 53:486-493.

MOORE F.P.; BARAC T.; BORREMANS B.; OEYEN L.; VANGRONSVELD J.; VAN DER LELIE D.; CAMPBELL C. D.; MOORE, E.R.B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology* 29:539–556.

NEWMAN, L.A., REYNOLDS, C.M. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23(1):6-8.

PILLAY, V.K.; NORWARK J. 1997. Inoculum, density, temperature, and genotype effect on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), seedling inoculated with a Pseudomonas bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* 43:354-361.

PRESTON, G.; HAUBOLD, B.; RAINEY, P. 1998. Bacterial genomics and adaptation to life plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbioses. *Current Opinion in Microbiology* 45:589-597.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, en línea 2009, disponible en:<http://www.R-project.org>.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environmental. *Research Microbiology* 151(3):167-177.

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, *Letter in Applied Microbiology* 33(2):117-121.

SCOTT, B. 2001. *Epichloë* endophytes: fungal symbionts of grasses. *Current Opinion in Microbiology* 4(4):393-398.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 39(1) :23-32.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU.

SHIOMI, H.; ALVES, S.H.; SOARES, I.; VIEIRA, F.; WAGNER, B. 2006. Bioprospecting Endophytic Bacteria for Biological Control of Coffee leaf rust. *Sci. Agric.* 63 (1):32-39

SIERRA, O.; BEDOYA, J.A.; MONSALVE, D.; OROZCO, J.J. 1997. Observaciones sobre colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) Camus) en la costa Atlántica de Colombia. Boletín Pasturas Tropicales 8 (1):1-4.

STROBEL G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5(6):535–544.

TAN, R.X.; ZOU X.W. 2001. Endophytes: A Rich source functional de metabolites. *Nature Products* 18:448 -459.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. *Tópicos em Ciências do solo*, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo 2:25-32.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* 162(1):69-76.

VAN, A. 2004. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides*). *Applied Environmental Microbiology* 70(1): 508–517.

VAN DER LELIE, D.; BARAC, T.; TAGHAVI S.; VANGRONSVELD, J. 2005. Response to Newman. New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 23 (1):8-12.

VEGA, F.; PAVA, R.M.; POSADA, F.; BUYER, J. 2005. Endophytic bacteria in *coffea arábica* L. *Journal Basic of Microbiology* 45(5):371-380.

VILORIA, H.J. 2002. Documento de trabajo sobre economía regional: La ganadería bovina en las llanuras del Caribe Colombiano. Banco de la República, Cartagena de Indias.

WARD, DA.2006. A Macrobiological perspective on microbial species. *Microbe* 1(6):269-278.

WHITESIDES, S.K.; SPOTTS, R.A. 1991. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringe* in pear trees. *Phytopathology* 81(4):453–457.