

BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias · Universidad del Cauca

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LÍNEA

El Comité Editorial de Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial informa que este manuscrito ha cumplido los requisitos editoriales y científicos y ha sido aprobado para publicación, con base en los conceptos emitidos por los pares evaluadores. Se publica anticipadamente, en versión pdf, de manera provisional, con base en la última versión electrónica del manuscrito y sin haber sido sometido a los procesos de edición, diagramación y corrección de estilo.

La versión anticipada de este manuscrito puede ser descargada, usada y citada, aclarando que la versión definitiva que se va a encontrar en la plataforma de la revista, puede diferir de ésta e aspectos de forma.

Evaluación de bacterias endofíticas solubilizadores de fósforo en café, una alternativa sostenible*

Evaluation of phosphorus solubilizing endophytic bacteria in coffee, an alternative sustainable

RAMOS-CABRERA, EFREN-VENENCIO¹; DELGADO-ESPINOSA, ZULY-YULIANA²; MURILLO-MUÑOZ, ROBINSON-ANDRES³; MUÑOZ-DIAZ, VICTOR-EDUARDO⁴; HOYOS-GARCÍA, JAVIER⁵.

RESUMEN

La fertilidad del suelo se ve afectado por sus características ácidas, que causa limitaciones en la disponibilidad del fósforo debido a que se absorbe o precipita con el hierro y el aluminio. El objetivo del trabajo fue la búsqueda de bacterias endofíticas solubilizadoras de fósforo de café variedad bourbon y su evaluación en la promoción de crecimiento en el cultivo de café. Se tomaron raíces, las cuales fueron sometidas a desinfección superficial luego se aislaron y caracterizaron las bacterias, mediante asignación filogenética (16S RNAr), por último, se evaluó el efecto de la inoculación sobre el crecimiento en café en estado de semillero. Los resultados mostraron que el café tiene bacterias endofíticas solubilizadoras de fósforo, de las cuales se obtuvieron 18 cepas con asignación a Gammaproteobacterias (72 %), Firmicutes (22,3 %) y

* Proyecto de origen: "Bacterias endofíticas solubilizadoras de fosfatos en café variedad Bourbon con potencialidad la promoción del crecimiento de cultivos café". Financiación: Corporación Universitaria Comfacauca y TECNICAFE. Culminación: 30 de noviembre del 2019.

¹. Corporación Universitaria Comfacauca (UNICOMFACAUCA), Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación cadenas de valor. M Sc En protección vegetal. PhD. Microbiología. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3619-5842>

². Corporación Universitaria Comfacauca (UNICOMFACAUCA), Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación cadenas de valor. Ph. D. Ciencias Químicas. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9391-5370>

³ Corporación Universitaria Comfacauca (UNICOMFACAUCA), Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación cadenas de valor. Tecnólogo Agroambiental. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2641-3404>

⁴ Corporación Universitaria Comfacauca (UNICOMFACAUCA), Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación cadenas de valor. Tecnólogo Agroambiental. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9177-1035>

⁵. Parque tecnológico de innovación (TECNICAFÉ). M.Sc. En desarrollo alternativo sostenible. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6485-7762>

Correspondencia: eramos@unicomfacauca.edu.co

Cómo citar este artículo

RAMOS-CABRERA, EFREN-VENENCIO; DELGADO-ESPINOSA, ZULY-YULIANA; MURILLO-MUÑOZ, ROBINSON-ANDRES; MUÑOZ-DIAZ, VICTOR-EDUARDO; HOYOS-GARCÍA, JAVIER. Evaluación de bacterias endofíticas solubilizadores de fósforo en café, una alternativa sostenible. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 2, 2021, p. xx-xx. Doi:

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 18 de Junio 2020.

Aprobado para publicación: 23 de Enero 2021.

Betaproteobacterias (5,5 %). Las cepas End-F-34 y End-F-5 se destacaron por su capacidad de solubilizar fósforo, éstas se utilizaron en ensayo de inoculación en café en etapa de semillero. Se concluye que el café variedad Bourbon tiene microorganismos solubilizadores de fósforo con hábito endofítica y capacidad de estimular las plantas de café en su crecimiento, estos resultados generan grandes expectativas para la utilización de las cepas como biofertilizante.

PALABRAS CLAVE: PBS; PGPR; Suelos ácidos; Agricultura sustentable; Biotecnología; Biofertilizante; Bacterias endofítica; Fósforo; Café; Filogenética.

ABSTRACT

Soil fertility is affected by its acidic characteristics, causing limitations in the availability of phosphorus because it is absorbed or precipitated with iron and aluminum. The objective of the work was the search for endophytic bacteria phosphorus solubilizers of coffee variety bourbon and its evaluation in the promotion of growth in the coffee crop. Roots were taken, which were subjected to superficial disinfection, then macerated, the bacteria were isolated and characterized, by phylogenetic allocation (16S RNAr) and evaluation of the effect of inoculation on growth in seedling coffee. The results showed that coffee has phosphorus-solubilizing endophytic bacteria, from which 18 strains were obtained with assignment to Gammaproteobacteria (72 %), Firmicutes (22,3 %) and Betaproteobacteria (5,5 %). The End-F-34 and End-F-5 strains stood out for their ability to solubilize phosphorus, these were used in the seed inoculation test in coffee. It is concluded that the var. bourbon has phosphorus solubilizing microorganisms with endophytic habit and ability to stimulate coffee plants in their growth, these results generate great expectations for the use of the strains as biofertilizer.

KEYWORDS: PBS; PGPR; Acidic soils; Sustainable agriculture; Biotechnology; Biofertilizer; Endophytic bacteria; phosphorus; Coffee; Phylogenetics.

INTRODUCCIÓN

El suelo juega uno de los factores más importantes en la producción agrícola, pero existen limitantes a nivel de fertilidad por escasez de nutrientes que pueden ser provocados por condiciones fisicoquímicas inapropiadas, mal manejo de suelos y por condiciones climáticas adversas que afectan la producción. Para planificar correctamente una siembra, se deben seleccionar los fertilizantes y enmiendas que se va a aplicar a los cultivos, también se deben conocer los factores ecológicos que influyen en el crecimiento de la planta y tener en cuenta las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo.

El fósforo (P), después del nitrógeno, es el macronutriente de mayor requerimiento para el crecimiento de las plantas, componente de muchas moléculas que regulan los procesos fisiológicos (Zhu *et al.*, 2018; Maharajan *et al.*, 2018). La mayor reserva de P se encuentra en el suelo, pero no todo en formas asimilables para las plantas. En suelos que contienen pH ácidos, el P disponible como iones de ortofosfato (HPO_4^{2-} o H_2PO_4^-) son fijados a los coloides del suelo por efecto de compuestos de aluminio y de hierro que limita su disponibilidad, de igual manera una gran parte del fertilizante fosforado aplicado de forma edáfica es fijada por los coloides del suelo (Bayuelo *et al.*, 2019).

Los Andisoles se caracterizan por su acidez, causa de los bajo niveles de fosforo aprovechable por la presencia de óxidos hidratados de hierro y aluminio que forman compuestos insolubles (Akram *et al.*, 2019). Dentro del contexto de agricultura sostenible, se buscan alternativas para la solubilización de fosfatos no biodisponibles en el suelo, mediante el uso de microorganismos y

de esta manera sustituir la fertilización química que genera un impacto ambiental negativo en los agroecosistemas (Klafe *et al.*, 2019).

Las bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB), producen ácidos orgánicos (glucónico y cetoglucónico) que transforman el P no disponible a formas asimilables, así las plantas aprovechan el P acumulado en el suelo, la interacción que se da entre las bacterias PSB y la planta juegan un papel clave en la nutrición de P en los cultivos (Bayuelo *et al.*, 2019). La selección de bacterias nativas con alta potencialidad de solubilizar fósforo permite la inoculación de estas poblaciones en las raíces lo que conlleva a movilizar el P a formas disponibles, para mejorar la nutrición (Ardisana *et al.*, 2018; Klafe *et al.*, 2019).

En el cultivo de café son muy limitados los estudios relacionados con microorganismos PBS, en este sentido se reportan investigaciones realizadas en café en etapa de germinación y almácigo, donde evaluaron el efecto de bacterias PBS en su estudio encontraron un aumento en el porcentaje de germinación, materia seca y crecimiento de plántulas de café y concluyen que este tipo de tecnología puede ser una alternativa sostenible para las primeras etapas fenológica del cultivo (Ramos *et al.*, 2018; Rosalba *et al.*, 2020).

El departamento del Cauca se caracteriza por tener una dinámica social y económica enfocada al sector agropecuario, entre principales actividades tienen el cultivo de café, y sus suelos presentan principalmente características ácidas, limitando la disponibilidad del P, por lo tanto, en el presente estudio se realizó la búsqueda de bacterias endofíticas PSB nativas de café var. bourbon cultivados en suelos Andisoles de la meseta de Popayán, que permita comparar la actividad solubilizadora de P *in vitro* y posteriormente evaluar su efecto sobre el crecimiento en plántulas en estado de semillero.

MÉTODO

El trabajo de investigación se desarrolló en la Hacienda Los Naranjos ubicado en el municipio de Cajibío (Cauca-Colombia). Las muestras de raíz de café variedad bourbon se tomaron del lote # 19, ubicado a una altura de 1870 m.s.n.m, con coordenadas (02° 35' 08,9' N). Las muestras de raíces fueron llevadas al laboratorio de Biotecnología de la Corporación universitaria Comfacauca sede Popayán, donde se tomaron tres replicas (5 plantas de raíz), las cuales fueron sometidas a desinfección superficial para eliminar los organismos de la parte externa de la raíz y obtener las bacterias PBS endofíticas. Las raíces se dejaron en solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 10 min; luego se lavaron con agua destilada estéril, se transfirieron a una solución de alcohol al 70 % durante 30 s, finalmente se eliminó el alcohol y se lavó los tejidos con abundante agua destilada estéril (Ben *et al.*, 2020).

Aislamiento de bacterias PBS

Las muestras desinfectadas se maceraron manualmente con 10 mL de PBS al 1 % (10 mM K_2PO_4 - KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, pH 7,2) a partir de cada macerado se preparó diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) de cada una, posteriormente se tomó 100 μ l para la inoculación en el medio de cultivo NBRIP con 5 gL^{-1} de fosfato tricálcico (Da Silva *et al.*, 2018). Las placas se incubaron a 28°C por un período de 72 h. Las colonias bacterianas con formación de halo traslúcido fueron seleccionadas, purificadas y a continuación se volvió a crecer en medio NBRIP para confirmar la capacidad solubulizadora de P. En consecuencia, se cuantificó por el índice de solubilización (IS), mediante la diferencia del diámetro de la colonia y diámetro total del halo (Nautiyal, 1999; Green y Sambrook, 2012).

Evaluación de producción de enzimas

Para la determinación de Biofilm se preparó un medio de cultivo M6, a continuación, se inoculó con las cepas de forma individual a una densidad a DO de 0,2 e incubaron a 28 °C durante 7 días. Seguidamente se determinó la presencia de biofilm mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Las proteasas se determinaron en un medio de cultivo que contiene leche descremada 5 % p/v; agar 1 % p/v e inoculadas con las bacterias aislada. Las placas se incubaron a 28 °C e inspeccionaron después de las 24 h - 48 h determinándose el halo translúcido producto de la degradación de las proteasas que contiene la leche (Janssens *et al.*, 2020).

Identificación filogenética de las cepas solubilizadoras de fósforo

La asignación filogenética de los aislamientos se realizó por análisis de secuencia del gen 16S rRNA, para ello se extrajo el ADN de los aislamientos bacterianos puros según las instrucciones del fabricante del kit QIAmp DNA (QIAGEN). Se amplificó el gen 16S rRNA por PCR, con cebadores universales fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). La mezcla de reacción en volumen final de 25 µL fue: 200 µm de dNTPs (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,5 % de DMSO (Dimetilsulfóxido) 1,25 U de Go Taq Polimerasa (Promega) y 20 ng de ADN (Di Renzo *et al.* 2012). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GenePro BIOER, luego de la amplificación se tomó 5 µl de los productos amplificados, visualizados en gel agarosa al 1% y se llevó a 100 voltios por 1 h, en seguida se tiñó en bromuro de etidio (Green y Sambrook., 2012).

El tamaño aproximado de las bandas del producto PCR se comparó con un marcador de peso molecular GeneRuler™ de 100bp Thermo Scientific®. Los amplicones fueron enviados a Macrogen inc. Korea para su secuenciación. Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con las secuencias de nucleótidos presentes en el GenBank utilizando BLAST y las quimeras fueron detectadas con el programa PINTAIL (Quadt *et al.*, 1997). Las secuencia de nucleótidos fueron alineadas en el programa Clustal Omega y el árbol filogenético se construyó mediante el método neighbor joining en el programa MEGA 4.0 (Agarwal *et al.*, 2020). Las secuencias fueron cargadas a la base de datos NCBI (GenBank), donde se encuentran disponibles con el código [SUB6997406](#).

Ensayo de promoción de crecimiento café var. Castillo en etapas almacigo

La muestra de suelo y material vegetal se obtuvo de TECNICAFFE (Parque Tecnológico del Café). Las semillas fueron esterilizadas con alcohol al 70 % durante 1 minuto, después fueron transferidas a una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 1 minuto y finalmente se lavó con abundante agua destilada estéril (Ben *et al.*, 2020). Las semillas se germinaron en papel húmedo estéril bajo condiciones controladas de temperaturas (20 °C) y humedad (80 %) por un periodo de 45 días. Una vez germinadas fueron sembradas en bolsas con 1 kg de suelo a temperatura ambiente bajo cobertura de polisombra al 30 %. Una vez las plantas emitieron el primer par de hojas verdaderas se inocularon con las cepas End-F-5 y End-F-34 en una concentración de 1X10⁸ UFC/mL.

Los tratamientos realizados fueron: **T0**: testigo absoluto; **T1**: inoculado con End-F-; **T2**: inoculado End-F-34; **T3**: inoculado con End-F-34+ End-F-5. El ensayo se mantuvo por 70 días y las variables evaluadas fueron: número de hojas, longitud de tallo, peso seco de raíz, parte aérea de planta y contenido de fósforo en tejido. Para el diseño estadístico, se establecieron tres réplicas (cada repetición tuvo 15 plantas), los datos fueron tratados por el análisis de varianza ANOVA y

las medias fueron contrastadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), software Infostat versión 2014 (Rfaki *et al.*, 2020).

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias endofíticas PBS

En el presente estudio se logró determinar que las bacterias aisladas son endofíticas, teniendo en cuenta que los tejidos desinfectados e incubados no presentaron crecimiento bacteriano. En este sentido, el protocolo de desinfección superficial empleado para eliminar las bacterias de rizoplasma de raíces resultó ser eficiente.

Los resultados obtenidos son comparables con investigaciones desarrolladas en plantas de trigo, tomate y algodón (Quadt *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2018). La comunidad endofítica cultivables resulto con $1 \cdot 10^6$ UFC/g de tejido mientras, que las bacterias PBS tienen una comunidad de $1 \cdot 10^3$ UFC/g de tejido (Figura 1), esto sugiere que las raíces de café bourbon tiene una gran diversidad de bacterias endofíticas, entre las que se encuentran las bacterias PBS.

Se puede inferir que los resultados en cuanto a la cantidad de bacterias endofíticas PBS son comparables a las poblaciones encontradas en los cultivos como arroz, trigo tomate entre otras (Agarwal *et al.*, 2020; Rfaki *et al.*, 2020). Lo que indicaría que la bacteria PBS juegan un papel de suma importancia en el interior de las plantas y por ello este grupo de bacterias son generalista.

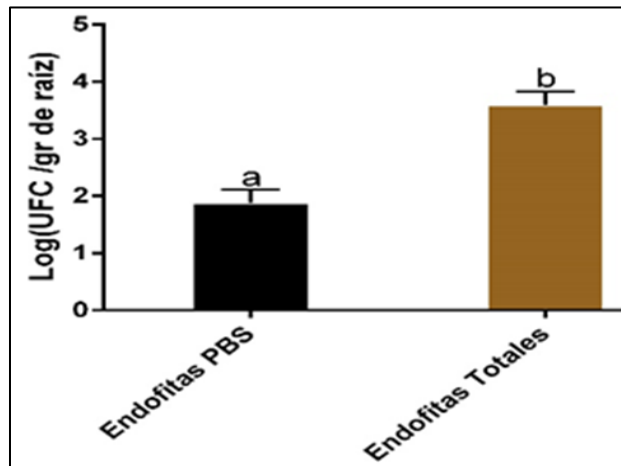


Figura 1. Cuantificación de las comunidades endofíticas totales y solubilizadoras de café var. Bourbon.

*Endófitos PBS: bacterias endofíticas solubilizadoras de fósforo, Endófitos totales. (a y b muestran diferencia significativa con un $p > 0,05$).

Índice de solubilización

Se aislaron 18 cepas con capacidad de solubilizar P, los resultados evidenciaron variación en el índice de solubilización (IS) de las diferentes cepas evaluadas con diferencias significativas entre ellas (Cuadro 1). En orden ascendente fue la End-F-4, End-F-38 y End-F-37, End-F-10 a End-F-11, mientras que las cepas de mayor IS son las cepas RF-13, End-F-5 y End-F-34, estadísticamente significativo si es comparado con las cepas que se mencionaron anteriormente. Las cepas End-F-5 y End-F-34 presentaron un IS de 1,6 y 1,7 cm respectivamente y por esta razón se eligieron para el desarrollo de ensayos de inoculación en plantas de café variedad Castillo en etapa de Almacigo.

La capacidad de solubilización de las bacterias endofíticas se ha reportado en diferentes trabajos de investigación con alta potencialidad para utilizarlas como biofertilizantes ((Torres *et al.*, 2016; Banerjee *et al.*, 2019; Kumar y Singh, 2020). La solubilización de P es de gran importancia para las plantas porque participa principalmente en el crecimiento vegetal encontrándose involucrado en diferentes procesos fisiológicos vitales (Klafa *et al.*, 2019), cabe mencionar que gran parte de los suelos son deficientes en P soluble, de tal manera que estas cepas cumplen una función importante al convertir el fosforo insoluble a fuentes asimilables y así ayudar en el proceso de nutrición de la planta (Yan *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Determinación del índice de solubilización de las cepas endofíticas aislada de café variedad Borbón.

Cepa	IS (cm)	Réplicas
End-F-4	0,31 ^{ab}	4
End-F-38	1,05 ^b	4
End-F-37	1,05 ^b	4
End-F-10	1,1 ^c	4
End-F-36	1,15 ^c	4
End-F-39	1,15 ^c	4
RF-34	1,25 ^c	4
End-F-27	1,15 ^c	4
End-F-24	1,15 ^c	4
End-F-9	1,2 ^c	4
End-F-6	1,25 ^c	4
End-F-35	1,25 ^c	4
End-F-32	1,35 ^c	4
End-F-1	1,4 ^c	4
End-F-11	1,5 ^c	4
RF-13	1,6 ^d	4
End-F-5	1,6 ^d	4
End-F-34	1,75 ^d	4

* Los subíndices marcados en el IS representan los análisis estadísticos. a, b, c y d muestran diferencia significativa se usa ANOVA contrastado las medias mediante el test de Tukey con un valor $p > 0,05$).

Evaluación de la formación de biofilm y enzimas

Las cepas dieron positivo a la formación de biofilm en la interface aire-liquido (Cuadro 2), característica relevante para la colonización de los tejidos radicales. Algunos autores han propuesto que la colonización eficiente de las raíces es una cualidad deseable para lograr un comportamiento exitoso en prácticas agrícolas y protección del sistema radical a patógenos (Malik *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 2019; Kumar y Singh, 2020). Esta colonización implica el desarrollo bacteriano de microcolonias o biofilms que protegen a los microorganismos inoculados de los cambios ambientales que pueden disminuir su población, permitir además proteger el sistema radicular del ataque de patógenos.

Con respecto a la determinación de proteasas se observó que las cepas End-F-4, End-F-37, End-F-10, End-F-36 y End-F-1 no presentó actividad proteolítica, mientras que las 14 cepas restantes sí. La actividad de las enzimas proteasas son protagonistas en el proceso de control biológico, por su actividad hidrolítica de pared de hongos y en su participación en el proceso de colonización de los tejidos internos de la planta (Wong *et al.*, 2015). Por consiguiente, se puede pensar que gran parte de las cepas aisladas puedan actuar como controlador biológico de enfermedades radicales de origen fúngico. Con respecto a la actividad de deshidrogenasa se encontró que las

cepas End-F-4, End-F-37, End-F-10, End-F-39, End-F-32 y End-F-34 no presentaron esta actividad (las restantes si la presentan). La actividad de la enzima deshidrogenasa se encuentra involucrada en la disminución de estrés en las plantas, producto de la contaminación ambiental, particularidad muy importante para la evaluación de las cepas en plantas sometidas a estrés abiótico (Cisneros *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Determinación de formación de biofilm y actividad de enzimas involucradas en la rizocompetencias.

Cepa	Biofilm	Proteasas	Hidrogenasa
End-F-4	+	-	-
End-F-38	+	+	+
End-F-37	+	-	-
End-F-10	+	-	-
End-F-36	+	-	+
End-F-39	+	+	-
RF-34	+	+	+
End-F-27	+	+	+
End-F-24	+	+	+
End-F-9	+	+	+
End-F-6	+	+	+
End-F-35	+	+	+
End-F-32	+	+	-
End-F-1	+	-	+
End-F-11	+	+	+
RF-13	+	+	+
End-F-5	+	+	+
End-F-34	+	+	-

Las cepas endófitas solubilizadoras de P aisladas en este estudio tienen la potencialidad de producir actividades PGPR a nivel laboratorio que pueden ayudar en áreas de control biológico contra patógenos y estrés abiótico que pueden potencializar sus beneficios en cultivos de café al ser sometidas a estrés biótico (Patógenos) como abiótico (sequía, salinidad) (Cisneros *et al.*, 2017).

Identificación filogenética de las cepas solubilizadoras de fosfato

La caracterización filogenética de los aislamientos (Figura 2) revelaron una prevalencia del 72,3 % a la clase taxonómica Gammaproteobacterias, los cuales se encuentran distribuidos en el orden Pseudomonadales (genero *Pseudomonas* y *Moraxella*) y Enterobacteriales (genero *Lelliottia*, *Yokenella*, *Leclercia* y *Enterobacter*). El segundo grupo más abundantes fue el Filo Firmicutes con 22,3 %, que representa la clase Bacilli (géneros *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Staphylococcus*). Sólo uno de los aislamientos pertenece a la clase Betaproteobacteria, con el 5,5% y pertenece al orden Burkholderiales (género *Massilia*). Curiosamente no se encontraron cepas de la clase taxonómica alfarproteobacterias como se han reportado en otros estudios de caracterización de bacterias endófitas de cultivos de durión, pastos entre otros (Sessitsch *et al.*, 2012). Estos resultados estarían asociados a la diversidad de microorganismos presentes en el suelo y su capacidad asociativa entre planta-bacterias y la presencia de exudado atractivos para que las bacterias de las clases taxonómicas Gamma, Beta y Firmicutes colonicen de forma

eficiente los tejidos internos de la planta de café como se ha reportado en otras especies vegetales (Wong *et al.*, 2015).

Efecto de la inoculación de las cepas End-F-5 *Staphylococcus succinus* y End-F-34 *Leclercia adecarboxylata* en el crecimiento de las plantas de café variedad Castillo

Número de hojas y longitud de tallo. Se evidenció que los tratamientos inoculados con la cepa End-F-5 y End-F-5+End-F-34 aumentó su emisión de hojas en un 4,8 y 3,7 % respectivamente, valores significativos comparados con el tratamiento control, mientras que la cepa End-F-34 no presentó cambio en su emisión de hojas frente al control (10 hojas) (Figura 3A).

Los resultados demuestran que la inoculación de cepa End-F-5 y la combinación End-F-5+End-F-34 estimula la aparición de las hojas, posiblemente relacionado con la producción de alguna hormona o porque tiene una mejor nutrición producto de la solubilización del P y en consecuencia acelera su crecimiento (Cisneros *et al.*, 2017).

La mayor emisión de hojas fue encontrada en los tratamientos sometidos a inoculación con las cepas por su capacidad de mejorar la nutrición de la planta mediante la solubilización del P y la producción de fitohormonas (actividad no determinada) lo que incrementa el crecimiento de plantas de café en su parte aérea. Pasando a otro aspecto, se observó un incremento en la longitud de tallo de un 14,8 y 12,3 %, en los tratamientos que se inocularon con la cepa End-F-34 y la End-F-5+End-F-34 respectivamente, esto en comparación con el control, mientras que con la cepa End-F-5 no difiere del control en cuanto a el parámetro evaluado (Figuras 3B).

Peso seco de raíz y parte aérea. Los resultados revelaron que la cepa End-F-5 se caracterizó por presentar un aumento significativo con respecto al control, del 20,2 %, mientras que la cepa Endo-F-34 y Endo-F-34+Endo-F-5 no difieren del control (Figura 4A y 4 B). Según los resultados de la parte aérea se resalta la cepa End-F-5 y la End-F-5+34, que presentó un incremento en peso de 12,6 y 15 % respectivamente, siendo significativo con el control mientras que la cepa End-F-34 no modifica este parámetro, esto indica que la inoculación de las cepas probablemente aumenta la biomasa de las plantas de café con mayor crecimiento en altura de tallo, emisión de hojas, área radicular y diámetro de tallo.

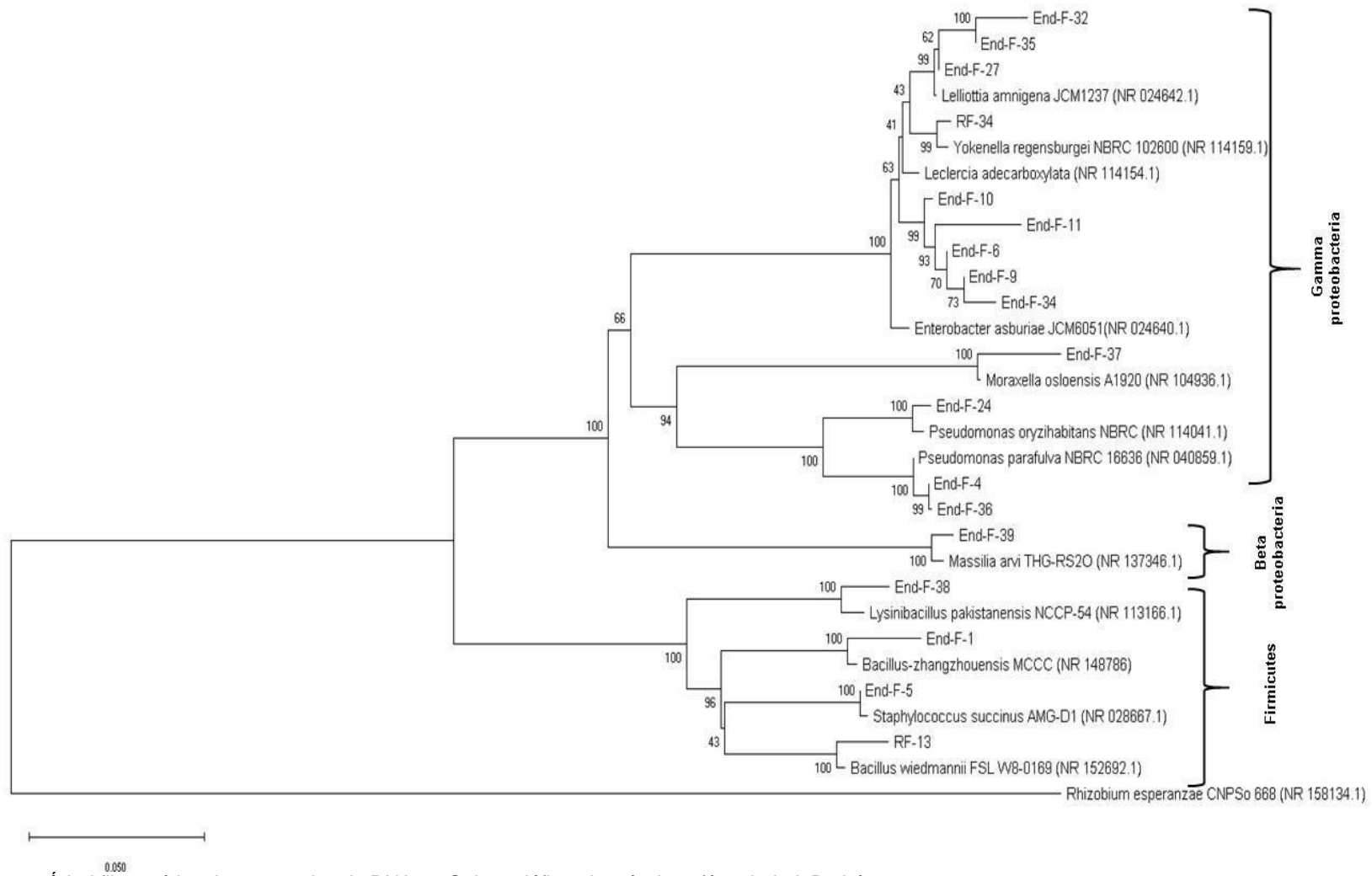


Figura 2. Árbol filogenético de secuencias de RNAr 16S de endófitos de raíz de café variedad. Borbón.

Árbol filogenético se construyó con secuencias del gen 16S rRNA por el método Neighbor Joining con el test bootstrap (1000 repeticiones).

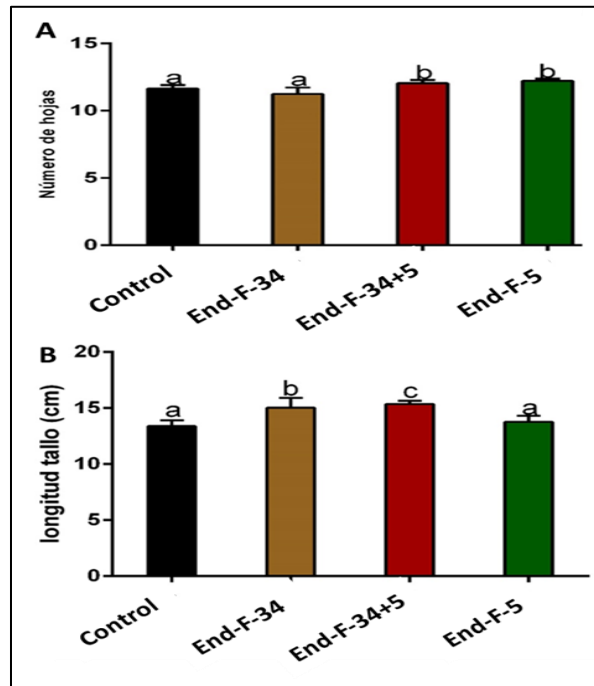


Figura 3. Efecto de la post-inoculación de cepas bacterianas en N° de hojas y Longitud el tallo. En **A** número de hojas y en **B** longitud de raíz de café var. Castillo. Las letras diferentes presentan diferencias significativas y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas al contrastar las medias con Tukey ($p \geq 0,05$)

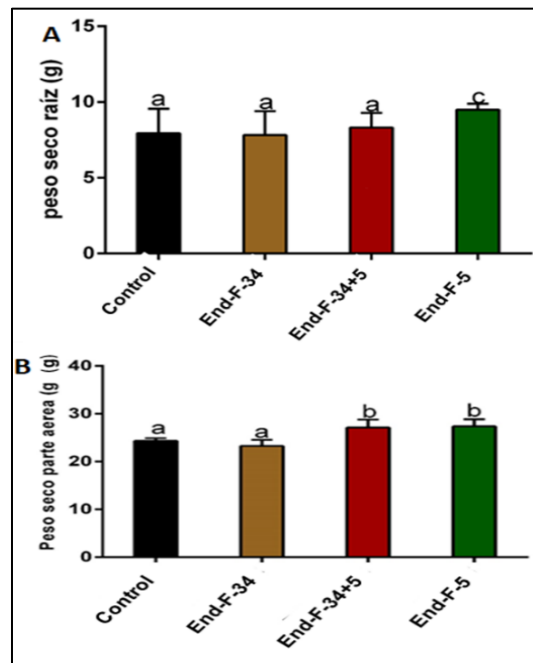


Figura 4. Efecto de la post-inoculación de cepas bacterianas en raíz y peso seco parte aérea. En **A** peso seco en raíz y **B** peso seco parte aérea. Las letras diferentes presentan diferencias significativas y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas con las medias Tukey ($p \geq 0,05$)

En ensayos realizados en cultivos de café con inoculación de *B. subtilis*, presentó mayor crecimiento en tallo, área radicular y una mayor acumulación de materia seca (2,37 %), lo que

significó este aumento de 7 veces más que el control (sin inoculación de *B. subtilis*), estos resultados fueron correlacionados con la producción de sustancias reguladoras como auxinas, giberelinas, citoquininas o por una mayor adsorción de nutriente producto de su capacidad de solubilización de fósforo (Sessitsch *et al.*, 2012).

Contenido de fósforo en tejido

Los contenidos de fósforo en tejido (Figura 5), mostraron un aumento en los tratamientos inoculados con las cepas. El tratamiento control presentó la concentración más baja de P y difirió estadísticamente con los tratamientos Endo-F-34, Endo-F-34+5 y Endo-F-5 que presentaron las mayores concentraciones de P de 3,4, 10,3 y 14,0 % respectivamente. Cabe mencionar que el tratamiento inoculado con la cepa End-F-5 (*Staphylococcus succinus*) presentó la mayor acumulación de P en tejido, estadísticamente significativo si es comparado con los demás tratamientos. Caso contrario ocurrió con estudios realizado en café en etapa de almacigo donde se reportó que la aplicación de bacterias PBS no modifican el contenido de P en tejido foliar en plantas café (Ramos *et al.*, 2018; Rosalba *et al.*, 2020).

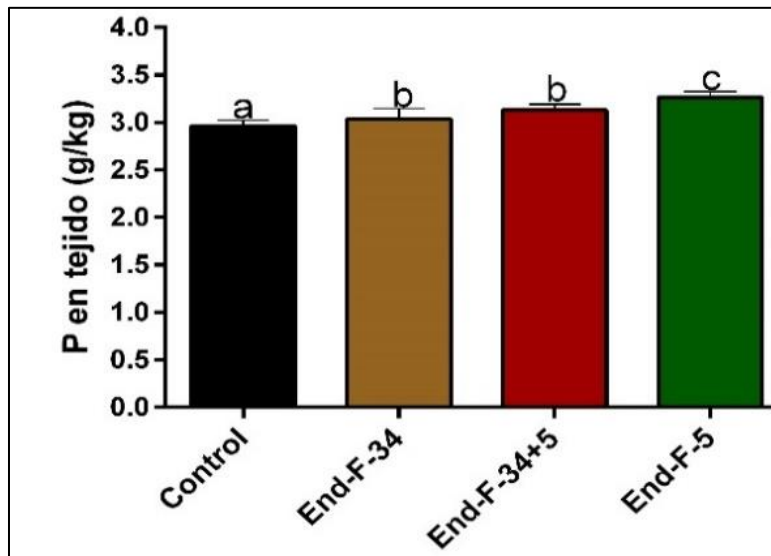


Figura 5. Determinación de P en tejido en los tratamientos evaluados.

Los promedios con letras a, b y c muestran diferencias estadísticas y los promedios con letra iguales no difirieron estadísticamente. Se utilizó análisis de varianza ANOVA y sus medias fueron contrastado mediante el test de Tukey con un valor $p > 0,05$.

Se puede inferir que los niveles de P en tejido se correlacionan con las variables de crecimiento de peso seco, longitud raíz y emisión de hojas, esto indica que las bacterias PBS solubilizan el P que se encuentra en el suelo y se lo proporciona a las plantas para promover su crecimiento y desarrollo.

CONCLUSIONES

El café borbón cultivado en los suelos de la meseta de Popayán muestra una comunidad de bacterias endofíticas diversas con capacidad para solubilizar fósforo las cuales fueron aisladas en laboratorio y caracterizadas filogenéticamente mediante la secuenciación del gen RNAr 16S, además, se logró identificar otras características PGPR como producción de biofilm y proteasas en condiciones de laboratorio que pueden potencializar a la actividad de solubilización de P e interacción con las planta café .

Las bacterias End-F-5 y End-F-34 se destacaron por la actividad solubilizadora de fósforo por esta razón se utilizaron en ensayos de inoculación en plantas de café en etapa de almacigo que promueven el crecimiento de la planta y concentran una mayor cantidad P en tejido indicando su capacidad de solubilizar fosforo en laboratorio y en campo. Cabe anotar que estos resultados se tendrán que validar en plantas de café en diferentes estados fenológicos para determinar si los resultados obtenidos en etapa de almacigo se transfieren a otras etapas fenológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan agradecimiento a TECNICAFÉ y a UNICOMFACAUCA por facilitar las instalaciones y por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS

- AGARWAL, HEENA; DOWARAH, BHASKAR; BARUAH, POOJA-MONI; BORDOLOI, KUNTALA SARMA; KRISHNATREYA, DEBASISH; AGARWALA, NIRAJ. Endophytes from *Gnetum gnemon* L can protect seedlings against infection of the phytopathogenic bacterium *R. solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological Research*, v. 238, 2020, p. 126503.
[10.1016/j.micres.2020.126503](https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126503)
- AKRAM-OTHMAN, ESMAIL; SHUELA-MOHAMMED, SHEIKH-ABDULLAH; MUHAMAD-TAHSEN, MARUF. Phosphorus Availability in Entisols, Inceptisols, and Mollisols of Iraqi Kurdistan. *Soil Science*, v. 184, n. 3, 2019, p. 95-100.
[10.1097/SS.0000000000000254](https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000254)
- ARDISANA, EDUARDO-HÉCTOR; MILLET-GAÍNZA, BÁRBARA; TORRES-GARCÍA, ANTONIO; FOSADO-TÉLLEZ, OSVALDO. Agricultura en Sudamérica: la huella ecológica y el futuro de la producción agrícola. *Revista Chakiñan de Ciencias Sociales y Humanidades*, v. 5, 2018, p. 90-101.
[10.37135/chk.002.05.06](https://doi.org/10.37135/chk.002.05.06)
- ASHOK, GANAPATHY; NAMBIKIRAN, GURUVU; BASKARAN, NAMBIKIRAN; VISWANATHAN, KRISHNAN; CHANDRAN-VISWANATHAN, XAVIER-ALEXANDER. Phylogenetic Diversity of Epiphytic Pink-Pigmented Methylophilic Bacteria and Role in Alleviation of Abiotic Stress in Plants. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Zürich (Switzerland): Springer, Cham, 2020, p. 245-262.
[10.1007/978-3-030-38453-1_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_8).
- BANERJEE, APARNA; SARKAR, SHRABANA; CUADROS-ORELLANA, SARA; BANDOPADHYAY, RAJIB. Exopolysaccharides and Biofilms in Mitigating Salinity Stress: The Biotechnological Potential of Halophilic and Soil-Inhabiting PGPR Microorganisms. In *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions*. Zürich (Switzerland): Springer, Cham. V. 56, 2019, p. 133-153.
[10.1007/978-3-030-18975-4_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_6).
- BAYUELO-JIMÉNEZ, JEANNETTE; OCHOA, IVAN; DE LA CRUZ-TORRES, EULOGIO; MURAOKA, TAKASHI. Suelo en las formas y disponibilidad de fósforo de un Andisol de la Meseta P'urhépecha, Michoacán. *Terra Latinoamericana*, v. 37, n. 1, 2019, p. 35-44.
[10.28940/tl.v37i1.367](https://doi.org/10.28940/tl.v37i1.367)
- BEN-ZINEB, AMENI; TRABELSI, DARINE; AYACHI, IMEN; BARHOUMI, FATHI; AROCA, RICARDO; MHAMDI, RIDHA. Inoculation with Elite Strains of Phosphate-Solubilizing Bacteria Enhances the Effectiveness of Fertilization with Rock Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, v. 37, n. 1, 2020, p. 22-30.
[10.1080/01490451.2019.1658826](https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1658826)

- CISNEROS-ROJAS, CARLOS-ADOLFO; SÁNCHEZ-DE PRAGER, MARINA; MENJIVAR-FLORES, JUAN-CARLOS. Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, v. 28, n. 1, 2017, p. 149-158. [10.15517/AM.V28I1.22021](https://doi.org/10.15517/AM.V28I1.22021).
- DA SILVA, RAFAEL; MOUTINHO, BRENDA; DOS SANTOS, DEISE; VASCONCELO-RODRIGUES, I.S; TALAMINI, VIVIANE; FERNANDES, MARCELO; FERNANDES, ROBERTA. Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Phytopathology*, v. 166, n. 7-8, 2018, p. 494-501. [10.1111/jph.12709](https://doi.org/10.1111/jph.12709)
- DI RIENZO, JULIO; BALZARINI, MÓNICA; CASANOVES, FERNANDO; GONZÁLEZ, LAURA; TABLADA, MARGOT; ROBLEDO, WALTER. Software estadístico infostat. Estadística y Biometría. Córdoba (Argentina): Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, 2012. <http://www.infostat.com.ar>
- EMAMI, SOMAYEH; ALIKHANI, HOSSEIN-ALI; POURBABAEE, AHMAD-ALI; ETESAMI, HASSAN; MOTASHAREZADEH, BABAK; SARMADIAN, FERAYDOON. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improve phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*, v. 14, 2020, p. 1-35. [10.1016/j.rhisph.2020.100196](https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196)
- GREEN, MICHAEL; SAMBROOK, JOSEPH. Molecular cloning: a laboratory manual. 4 ed. New York (United States Of America): Cold Spring Harbor, 2012, p. 1890.
- JANSSENS, STEVEN; COUVREUR, THOMAS; MERTENS, ARNE; DAUBY, GILLES; DAGALLIER, LEO-PAUL; ABEELE, SAMUEL-VANDEN; DROISSART, FILIP; MASCARELLO, MAURIZIO; HARDY, OLIVIER. A large-scale species level dated angiosperm phylogeny for evolutionary and ecological analyses. *Biodiversity data journal*, v. 8, 2020, p. 1-23. [10.3897/BDJ.8.e39677](https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e39677)
- KAFLE, ARJUN; COPE, KEVIN; RATHS, RACHEL; YAKHA, JAYA-KRISHNA; SUBRAMANIAN, SENTHIL; BÜCKING, HEIKE; GARCIA, KEVIN. Soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. *Agronomy*, v. 9, n. 3, 2019, p. 127. [10.3390/agronomy9030127](https://doi.org/10.3390/agronomy9030127)
- KUMAR, AJAY; SINGH, JOGINDER. Biofilms Forming Microbes: Diversity and Potential Application in Plant–Microbe Interaction and Plant Growth. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, v. 25, 2020, p. 173-197. [10.1007/978-3-030-38453-1_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_6)
- KUSAM, LATA-RANA; DIVJOT, KOUR; KAUR, TANVIR; IMRAN, SHEIKH; YADAV, AJAR-NATH; KUMAR, VINOD; SUMAN, ARCHNA; SINGH-DHALIWAL, HARCHARAN. Endophytic Microbes from Diverse Wheat Genotypes and Their Potential Biotechnological Applications in Plant Growth Promotion and Nutrient Uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B Biological Sciences*, v. 90, 2020, p. 969–979. [10.1007/s40011-020-01168-0](https://doi.org/10.1007/s40011-020-01168-0)
- MAHARAJAN, MAHARAJAN; CEASAR, STANISLAUS-ANTONY; AJEESH-KRISHNA, AJEESH-KRISHNA; RAMAKRISHNAN, MUTHUSAMY; DURAI-PANDIYAN, VEERAMUTHU; AIF-ABDULLA, NAIF-ABDULLA; IGNACIMUTHU, SAVARIMUTHU. Utilization of molecular markers for improving the phosphorus efficiency in crop plants. *Plant Breeding*, v. 137, n. 1, 2018, p. 10-26. [10.1111/pbr.12537](https://doi.org/10.1111/pbr.12537)

- MALIK, MALIK; BILAL, RAKHSHANDA; MEHNAZ, SAMINA; RASUL, G.; MIRZA, MIRZA; ALI, S. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil*, v. 194, n. 1–2, 1997, p. 37–44.
[10.1023/A:1004295714181](https://doi.org/10.1023/A:1004295714181).
- NAUTIYAL, CHANDRA-SHEKHAR. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Fems Microbiology Letters*, v. 170, n. 1, 1999, p. 265–270.
[10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x)
- QUADT-HALLMANN, ANDREA; KLOEPPER, JOSEPH; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 6, 1997, p. 577-582.
[10.1139/m97-081](https://doi.org/10.1139/m97-081)
- RAMOS-CABRERA, EFREN-VENANCIO. Investigación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en cultivos de interés agronómico mediante análisis metagenómico y microbiológico [Tesis Doctor en Ciencias Exactas, área ciencias biológicas]. La Plata (Argentina): Universidad Nacional de La Plata, 2018, 306 p.
[10.35537/10915/67081](https://doi.org/10.35537/10915/67081)
- RFAKI, ABDERRAZAK; ZENNOUHI, OMAR; ALIYAT, FATIMA-ZAHRA; NASSIRI, LAILA; IBIJBIJEN, JAMAL. Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*, v. 37, n. 3, 2020, p. 230-241.
[10.1080/01490451.2019.1694106](https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1694106).
- ROSALBA-MONROY, MIGUEL; CARRILLO-GONZÁLEZ, ROGELIO; RIOS-LEAL, ELVIRA; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, MARIA DEL CARMEN-ANGELES. Screening bacterial phosphate solubilization with bulk-tricalcium phosphate and hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of Microbiology*, v. 113, n. 7, 2020, p. 1033-1047.
[10.1007/s10482-020-01409-2](https://doi.org/10.1007/s10482-020-01409-2)
- SESSITSCH, ANGELA; HARDOIM, PABLO; DÖRING, JAN; WEILHARTER, YVONNE; KRAUSE, ANDREAS; WOYKE, TANJA; HUREK, SARKAR. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, n. 1, 2012, p. 28-36.
[10.1094/MPMI-08-11-0204](https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204).
- TORRES, VÍCTOR; GONZÁLEZ-REYES, ANDREA; RODRIGUEZ-ARTIGAS, SANDRA; CORRONCA, JOSÉ. Efectos del disturbio antrópico sobre las poblaciones de *Leprolochus birabeni* (*Araneae, Zodariidae*) en el Chaco Seco del noroeste de Argentina. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 106, 2016, p. 20-29.
[10.1590/1678-4766e2016009](https://doi.org/10.1590/1678-4766e2016009)
- WONG, W.S.; TAN, S.N; GE, L.; CHEN, X.; YONG, J.W. The importance of phytohormones and microbes in biofertilizers. In *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Zúrich (Switzerland): Springer, Cham, v. 12, 2015, p. 105-158.
[10.1007/978-3-319-24654-3_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_6).
- YAN, LIJUAN; PENTTINEN, PETRI; SIMOJOKI, ASKO; STODDARD, FREDERICK; LINDSTRÖM, KRISTINA. Perennial crop growth in oil-contaminated soil in a boreal climate. *Science of the Total Environment*, v. 532, n. 1, 2015, p. 752-761.
[10.1016/j.scitotenv.2015.06.052](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.052)
- ZHU, JING; LI, MIN; WHELAN MICK. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils. *Science of the Total Environment*, v. 612, 2018, p. 522-537.
[10.1016/j.scitotenv.2017.08.095](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095)