



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS
DE HOJAS DE *Physalis peruviana* L. AGUAYMANTO”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE
BACHILLER EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

AUTORES:

GONZALEZ PACHECO, CARLOTA

CRUZ HUARAYA, MIRIAM

CHOQUE GONZALES, RONALD

ASESOR:

Mg. HUALPA CUTIPA, EDWIN

LIMA-PERÚ

2019

DEDICATORIA

Dedicado a nuestros Padres por el constante apoyo brindado, muchos de nuestros logros se lo debemos a ustedes, por habernos formado con reglas y valores, sin todo ese apoyo no seríamos lo que somos hoy en día.

Dedicado a ustedes por ser nuestros guías.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a nuestro señor por permitirnos tener y disfrutar a nuestra familia, por el despertar de cada día y sentir su compañía, por el apoyo en cada momento de nuestras vidas, a nuestra familia por la confianza brindada, a nuestros maestros por enseñarnos el camino del conocimiento y creer en nosotros.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a todos por sus aportes en amor y conocimiento que nos permitió llegar a esta primera meta profesional.

RESUMEN

Los microorganismos son considerados como los seres más primitivos y se encuentran presentes en el suelo, aire, agua, plantas, animales y también forma parte del ser humano. Son parte esencial de una variedad de ecosistemas. En particular los microorganismos endófitos presentes en las plantas con propiedades medicinales son de interés para la comunidad científica. *Physalis peruviana L.* es una planta frutal que es muy popular por sus propiedades antioxidantes y vitamínicas de sus frutos. El objetivo del presente proyecto fue aislar e identificar microorganismos endófitos presentes en las hojas de *Physalis peruviana L.* mediante técnicas microbiológicas 6 medios de cultivo diferente fueron usados para obtener una mayor diversidad y crecimiento de microorganismos endófitos (hongos y bacterias), además se realizó una siembra con diluciones sucesivas con la finalidad de separar los microorganismos, finalmente las placas sembradas fueron incubada a 26°C. Del total de placas sembradas (36), 28 presentaron crecimiento de estas; 24 mostraron crecimiento bacteriano (coco bacilos gam + y gram -) y 4 placas mostraron crecimiento de hongos endófitos (*Rhizopus sp*, *Alternaria sp* y 2 sin identificar. Estos resultados apoyan la evidencia de que los microorganismos conviven con diferentes plantas e incluso podrían estar beneficiando al vegetal a desarrollar características adaptativas.

Palabras claves: microorganismos endófitos, coco bacilos, *Physalis peruviana L.*

ABSTRACT

Microorganisms are considered to be the most primitive beings and are present in soil, air, water, plants, animals and are also part of the human being. They are an essential part of a variety of ecosystems. In particular, endophyte microorganisms present in plants with medicinal properties are of interest to the scientific community. *Physalis peruviana L.* it is a fruit plant that is very popular for its antioxidant and vitamin properties of its fruits. The objective of this project was to isolate and identify endophyte microorganisms present in the leaves of *Physalis peruviana L.* using microbiological techniques 6 different culture media were used to obtain greater diversity and growth of endophyte microorganisms (fungus and bacteria), in addition, a planting was carried out with successive dilutions in order to separate the microorganisms, finally the sowed plates were incubated at 26 °C. Of the total plates planted (36), 28 showed growth; 24 showed bacterial growth (coco bacilli gam and gram -) and 4 plates showed growth of endophyte fungi (*Rhizopus sp*, *Alternaria sp* and 2 unidentified). These results support evidence that microorganisms coexist with different plants and may even be benefiting the vegetable to develop adaptive characteristics.

Keywords: endophyte microorganisms, coconut bacilli, *Physalis peruviana L.*

PORTADA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
INDICE.....	VII
LISTA DE TABBLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
2.1. Planteamiento del problema.....	2
2.2. Formulación del problema	3
2.2.1. Problema general.....	3
2.2.2. Problemas específicos	3
2.3. Objetivos.....	3
2.3.1. Objetivo general	3
2.3.2. Objetivos específicos.....	3
2.4. Justificación	4
3. MARCO TEORICO	4
3.1. Antecedentes	5
3.1.1. Antecedentes internacionales	5
3.1.2. Antecedentes nacionales	7
3.2. Base teórica.....	10
3.2.1. Generalidades	10
3.2.2. Microorganismos endófitos.....	14
3.3. Definición de términos.....	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1. Tipo de investigación:.....	21
4.2. Nivel de investigación:	21
4.3. Diseño de la investigación:	22
4.4. Área de estudio:	22
4.5. Población y muestra: Criterios de inclusión y exclusión.....	22
4.6. Variables y operacionalización de variables.....	22
4.6.1. Variables independientes:	22
4.6.2. Variables dependientes:.....	23
4.6.3. Operalización de variables	24
4.7. Instrumentos de recolección de datos	25
4.7.1. Material biológico	25
4.7.2. Aislamiento de microorganismos endófitos.....	25
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Aislamiento de microorganismos endofitos de hojas de <i>Physalis peruviana L.</i> “aguaymanto”	28

5.2. Identificación cualitativa de bacterias endófitas de <i>Physalis peruviana</i> L. “aguaymanto”	29
5.3. Aislamiento de hongos endófitos de <i>Physalis peruviana</i> L. “aguaymanto”	36
6. DISCUSIÓN.....	39
7. CONCLUSION.....	40
8. RECOMENDACIONES.....	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40
10. ANEXOS	48
ANEXO 01: matriz de consistencia	49
ANEXO 02: recolección de la planta	50
ANEXO 03: Procedimiento aislamiento de organismo endófitos.....	50
ANEXO 04: Aislamiento de microorganismos.....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias y hongos observados macroscópicamente.....	28
Tabla 2. Bacterias endófitas observados macroscópicamente.....	30
Tabla 3. Observación macroscópica del crecimiento de hongo endófito en medio cultivo a distintas diluciones.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Observación macroscópica de hongos y bacterias endófitas.	29
Figura 2. Bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	30
Figura 3. Bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	31
figura 4. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	31
figura 5. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	32
figura 6. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	32
figura 7. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	33
figura 8. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	33
figura 9. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	34
figura 10. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	34
figura 11. bacteria endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	35
figura 12. Hongo endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	37
figura 13. Hongo endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	37
figura 14. Hongo endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	38
figura 15. Hongo endófito aislado de hojas <i>Physalis peruviana</i> L.	38

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de microorganismos es de importancia teniendo en cuenta que forman parte de la naturaleza, los microorganismos son los seres vivos más primitivos que habitan la tierra y han sido de gran utilidad para el hombre, con el descubrimiento de *Penicillium chrysogenum* hongo que permitió sintetizar la penicilina, se pudo combatir las infecciones causadas por muchos de los microorganismos, originando una nueva era en la medicina, es por ello que se busca fuentes potenciales que permitan desarrollar nuevas alternativas para su síntesis a partir de fuentes naturales como son las plantas medicinales (1).

El aislamiento de microorganismos nos permite identificar y caracterizar bacterias, hongos con potencial antagonista que permita ser una alternativa para combatir infecciones causadas por estos microorganismos, actualmente no podemos imaginar un mundo sin antibióticos, teniendo en cuenta que los antibióticos en muchos casos son producidos por algunas bacterias y hongos endófitos (2).

Los microorganismos producen una alta cantidad de metabolitos secundarios con interés farmacéutico, se puede mencionar por ejemplo los fármacos que se originaron a partir de metabolitos secundarios que fueron aplicados para el tratamiento del cáncer como es el taxol o los anticolésterolémicos, desde el punto de vista industrial también se puede mencionar el uso de microorganismos en la preparación de bebidas alcohólicas, en la fabricación de pan, yogurt, quesos, etc (3).

Con la finalidad de poder identificar los microorganismos endófitos presentes en la hoja de *Physalis peruviana L.*, se realizó el aislamiento de microorganismos utilizando diferentes tipos de medios de cultivo, obteniendo como resultados el crecimiento de bacterias y hongos endófitos. La justificación reporta la flora microbiana endófito aislada a esta planta para la obtención de cepas sobreproductoras de metabolitos para uso industrial y medicinal, mediante el conocimiento de rutas biosintéticas de un metabolito específico se puede adicionar genes de estas rutas a microorganismos que no lo producen para de este modo obtenerlos por procesos biotecnológicos como por ejemplo la insulina (4).

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema

Los microorganismos están presentes en todos los ecosistemas terrestres e incluso en el ser humano, son los seres más primitivos y numerosos e incluso uno de los primeros habitantes de la tierra, fueron los primeros seres vivos responsables de incrementar el oxígeno en la atmosfera dando inicio al desarrollo de la vida en la tierra. El éxito de su supervivencia se debe a su capacidad de adaptarse a todo tipo de ambiente. Sin embargo, del total de microorganismos solo se han descrito 30,800 especies de protozoarios, 70,000 de hongos y 45,000 de bacterias; teniendo en cuenta que en el suelo existen miles de especies de poblaciones de 100 a 2000 millones por cada gramo de suelo, 35 000 especies bacterianas y 1 500 000 de hongos sin embargo solo el 8 % a 1% respectivamente se han identificado (5)(6).

Las primeras evidencias de microorganismos endófitos se hallaron en tejidos y hojas fosilizadas, originando así la oportunidad de realizar innumerables estudios con la finalidad de determinar su relación con las plantas y su posible potencial de aplicación en agronomía y medicina (7).

En américa latina se viene desarrollando muchas investigaciones con respecto al uso de los microorganismos endófitos, existen muchos reportes de estudios realizados sobre la capacidad antagonista de microorganismos endófitos, actividad antibacteriana, actividad promotora de crecimiento vegetal, entre otros (8).

En Perú también se está promoviendo estudios de estos microorganismos endófitos aplicados básicamente a la agricultura a través de la producción de biofertilizantes, los cuales son una alternativa ecoamigable y orgánica (9).

En nuestro país los estudios realizados a microorganismos endófitos están basados en su potencial antagonista frente a fitopatógenos y como

estimulante de desarrollo de nuevas técnicas para la agricultura, la relación que existe entre la planta y los microorganismos permite la caracterización y uso de metabolitos secundarios con potencial biológico (10).

Por lo tanto el presente proyecto tiene como objetivo aislar microorganismos endófitos presentes en hojas de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”.

2.2. Formulación del problema

2.2.1. Problema general

-¿Cuáles son los microorganismos endófitos presentes en hojas de *Physalis peruviana* l. “aguaymanto”?

2.2.2. Problemas específicos

-¿Cuáles son los hongos endófitos presentes en hojas de *Physalis peruviana* l. “aguaymanto”?

- ¿Cuáles son las bacterias endófitas presentes en hojas de *Physalis peruviana* l. “aguaymanto”?

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

- Aislar microorganismos endófitos presente en hoja de *Physalis peruviana* l. “aguaymanto”.

2.3.2. Objetivos específicos

- Aislar hongos endófitos en hoja de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”.
- Aislar bacterias endófitas en hoja de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”.

2.4. Justificación

Este trabajo de información teóricamente se justifica porque se generara información acerca de los microorganismos endófitos que conviven con la planta de *Physalis peruviana* L. este reporte permitirá dar mayor detalle sobre la flora microbiana que tiene potencial en la industria.

Metodológicamente este proyecto de investigación se justifica porque se aplicara una metodología específica para el aislamiento de estos microorganismos endófitos lo cual permitirá a conocer con más detalles el género o las especies que estén presentes en esta planta *Physalis peruviana* L.

Socialmente se justifica este trabajo porque brindamos ciertas características del potencial que podría tener los microorganismos endófitos presentes en la planta de *Physalis peruviana* L. masificando el consumo de este alimento mejoraría tendría beneficio potencial en el microbiota intestinal.

En el aspecto económico se puede consolidar que este proyecto de investigación considera un estudio económico, el cual asegura la implementación de esta planta *Physalis peruviana* L.

3. MARCO TEORICO

3.1. Antecedentes

3.1.1. Antecedentes internacionales

Caviedes ¹², realizó un estudio con el objetivo de controlar el marchitamiento vascular producido por un hongo patógeno llamado *fusarium oxysporum*, la investigación se realizó a través del aislamiento y selección de *pseudomonas* sp., y *bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (*physalis peruviana* L.). Se seleccionaron 07 muestras de 05 cultivos comerciales. 02 Del municipio de cómbita, y 03 en el municipio de granada, de cada cultivo se extrajo 04 plantas sanas de focos donde hubo evidencia de marchitamiento vascular, se extrajo raíces secundarias, siguiendo un protocolo de extracción, como resultado se logra obtener 20 aislamientos de bacterias de la rizósfera de plantas de uchuva, de los cuales 14 pertenecientes al género *pseudomonas* sp. y 6 al género *bacillus* sp. Llegando a la conclusión que 06 aislamientos estimularon el porcentaje de germinación, longitud de raíz y del tallo y 18 inhibieron el crecimiento de *f. oxysporum* por la producción de metabolitos secundarios.

Gamboa¹³, realizó una recopilación para comparar la presencia de hongos endófitos en zonas templadas y tropicales, enfocándose principalmente en el árbol tropical *Gynoxis oleifolia* (Asteraceae). A través del método de recopilación de la literatura existente acerca de hongos endófitos tropicales. Analizaron y compararon la presencia de hongos en ambas zonas. También se usó como grupo modelo aspectos teóricos de la interacción ecología entre la planta y el microorganismo. Llegando a la conclusión que la biodiversidad de microorganismos presentes en plantas de

climas templados y tropicales varían según el medio ambiente en que se encuentran.

Salgado, y caridad¹⁴, efectuaron un estudio sobre la presencia de micobiota endofítica asociada a plantas de rosa (*rosa hybrida*). Estos microorganismos fueron aislados usando agar MPY (Manitol Yema de huevo- Polimixina) partir de hojas sanas. Los géneros fúngicos son; *Nigrosporaoryzae*, *Xylaria spp*, *Aureobasidium* y *Acremonium*. Y un grupo de ellos fue aislado por única vez: *Nodulisporiumsp*, *Gliocladiumvirens*, *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Phoma sp* y *Chaetomium globosum*. Los resultados obtenidos mostraron, de los 560 subfragmentos sembrados, 92 presentaron colonización por hongos endófitos. Cada subfragmento de hoja colonizado presento un solo aislamiento. De los hongos endófitos aislados, 41 presentaron micelio estéril, 31 aislamientos se identificaron hasta género o especie y 20 no pudieron ser identificados. Llegan a la conclusión que los hongos endófitos poseen capacidad de producir metabolitos con actividad biológica, plantean la posibilidad que estos microorganismos posean potencial como antagonistas frente a patógenos de estas plantas.

Tolozá y Lizarazo¹⁵, realizaron una investigación sobre poblaciones microbianas asociadas con la rizósfera y filosfera de plantas de “uchuva” *Physalis peruviana L.* las muestras se seleccionaron aleatoriamente de 03 fincas productoras de uchuva, escogiéndose solo 05 plantas de uchuva de cada finca, para el aislamiento de rizósfera se obtuvo una muestra del suelo de una profundidad de 20 cm, para el estudio de la micobiota epifita e endófito se seleccionaron raíces y hojas de la parte baja, media y alta de

planta, recolectando 11.2g de hojas, se lavaron las hojas con solución buffer estéril de fosfato de potación 0.1 M para el estudio de la microbiota epífita y para la endófito se utilizó los fragmentos de hojas y raíz disueltas en la solución buffer estéril y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , se sembraron por duplicado 100 μ L de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} . se obtuvieron los siguientes resultados donde las bacterias endófitas aisladas fue mayor que las epífitas en los dos nichos, con predominio de las formas bacilares Gram negativas con 54.36% en la rizósfera y 48.32% en la filósfera, llegando a la conclusión que las poblaciones de microorganismos endófitos fueron altas en comparación con las epífitas tanto en la rizósfera como en la filósfera, el género bacteriano predominante de la rizósfera y filósfera de las plantas de “uchuwa” fue *Pseudomonas*, mientras que *Rhodotorula* predominó en la micobiota epífita del filoplano.

Arellano¹⁶, a través de un estudio determino la presencia de *Fusarium oxysporum*, causante de la marchitez vascular de *Physalis peruviana* L. para poder realizar los estudios se visitaron cultivos y se tomaron muestras de plantas que presentaban sintomatología similar al marchitamiento, en las muestras tomadas, se obtuvieron doce hongos con morfología similar a *Fusarium*, en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Mediante la observación macro y microscópica de los hongos obtenidos, se identificaron la caracterización de cuatro genes, doce fueron identificados como *Fusarium oxysporum* mediante BLAST. A los hongos se les realizaron cultivos monospóricos para posteriormente aplicar postulados de Koch en plántulas de uvillas libres de patógenos y de microorganismos benéficos para que no se vea afectado el experimento.

3.1.2. Antecedentes nacionales

Ulloa¹⁷, estudio la flora microbiana asociada a dos plantas alto andinas: *Gentianella weberbaueri* Gil y *Valeriana sp* de la Quebrada de Churup, Huaraz- Perú a 4 500 msnm. Se aisló los microorganismos a partir de tejidos internos de la raíz y hojas. En total se obtuvieron catorce y cuatro microorganismos entre hongos y bacterias, provenientes del tejido de las plantas: los microorganismos identificados son seis hongos filamentosos y ocho bacterias; *Rahnella inusitata* VT25B, *Rahnella sp* VT34B *Rouxilla aff. chamberiensis* VT24B y bacterias *Gentianella weberbaueri*, *Pseudomonas trivialis* VT20B. Los resultados muestran que los microorganismos endófitos aislados de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri gil* poseen gran capacidad de promover el crecimiento vegetativo y podrían ser útiles para el proceso de inoculantes microbianos.

Llaca¹⁸, aisló e identificó bacterias y hongos endófitos asociados a raíces de *Centrolobium ochroxylum* y *Loxopterygium huasango*. Para alcanzar su objetivo utilizó técnicas de caracterización molecular para identificar bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos *micorrizicos* asociados a la rizósfera de las plantas evaluadas. Los resultados del análisis molecular permitieron identificar 11 sepas fúngicas asociadas a *L. huasango* 4 sepas bacterianas y fúngicas asociadas a *c.centrolobium* los géneros bacterianos identificados fueron *Rhizobium tropici* bacterias endófitas de los géneros *Staphylococcus* y *Serratia*. Bacilos Gram negativos

Mamani⁽¹⁹⁾, realizó este estudio con el objetivo de aislar y caracterizar hongos endófitos con capacidad antagonista contra *Hemileia vastatrix* y promotora de crecimiento de *Coffea arabica L* como paso inicial determino la existencia de la microbiota endófitica en hojas y tallos de café

procedentes de diferentes sectores. Se logró aislar un total de 425 cepas de hongos endófitos de tallos y hojas sanas del café de 10 sectores, los géneros fúngicos más representativos pertenecieron a los siguientes géneros: *Botryosphaeria*, *Colletotrychum*, *Pestalotiopsis*, *Xilaria*, *Fusarium* y *Trichoderma*. de los cuales se logró caracterizar 5 cepas pertenecientes a *Trichoderma* sp. Que mostraron distintas características microscópicas y culturales entre ellas. Concluyendo que se obtuvo mejores resultados en plantas con mayor altura por lo tanto resulto ser un potencial biocontrolador de *hemielia vastatrix*.

Isla et al ⁽²⁰⁾, realizaron un estudio con el objetivo de usar microorganismos promotores de crecimiento y hongos endomicorrícicos para controlar la propagación de nemátodos, para mejorar la calidad y producción del cultivo de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.). En el trabajo realizado se ha identificado al nemátodo *Meloidogyne incognita*, como un patógeno en el cultivo de aguaymanto. Los resultados obtenidos de las pruebas in vitro y en invernadero mostraron que las cepas de bacterias diazotróficas DA30 y Azo16M2 tuvieron el mayor porcentaje de capacidad de inhibición de M. llegando a la conclusión que los hongos endomicorrícicos con la cepa diazotrófica (DA30 o la cepa Azo16M2) presentaron un mayor control sobre el desarrollo de las plantas infectadas con el nemátodo, por lo cual podrían recomendarse como alternativa para reducir el uso de nematicidas.

Mendoza ⁽²¹⁾, evaluó la actividad antifúngica de extractos etanólicos de hojas de la planta *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y de hongos endofíticos aislados de la misma, frente a *Candida albicans*. En la evaluación que realizó se aislaron 18 hongos endofíticos. Los hongos fueron cultivados

en placas petri y la obtención de los extractos realizó utilizando etanol como solvente extractor. Para poder realizar la evaluación se utilizó el método de microdilución en caldo basado en el método M27-A2 del Instituto de estándares clínicos y laboratoriales. En el método de microdilución se emplearon los 18 extractos etanólicos de hongos endofíticos y 1 extracto de hojas de la planta, dado este resultado se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” por medio de pruebas de coloración, precipitación y por cromatografía en capa fina, encontrándose la presencia de antraquinonas, flavonoides. En conclusión, los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” tiene actividad antifúngica, mientras que los hongos endofíticos aislados de la planta no presentan ninguna actividad.

3.2. Base teórica

3.2.1. Generalidades

3.2.1.1. Descripción morfológica de *Physalis peruviana* L. “Aguaymanto”

El Aguaymanto es una fruta percibida por los incas y su semillero se imputa a los valles andinos de Perú y Chile. La fruta también conocida como “uvilla” presenta las siguientes características: es ovoide, redonda del tamaño de una uva grande, con una piel lisa, cerácea, de color amarillo naranja brillante; según la variedad. La pulpa es jugosa con semillas amarillas pequeñas y pulidas que se pueden engullir. Cuando la flor desciende el cáliz se propaga, componiendo un sucedo de capuchón o vejiga muy primorosa que recubre a la fruta. Cuando la fruta está madura, es dulce con un liviano sabor agrio. El

aguaymanto o también conocida como uvilla, pertenece a la familia de las *solanáceas*, es decir poseen cualidades similares a la familia de la papa. Que es una planta silvestre y semisilvestre procedente del Perú se desarrolla entre los 1800 y 2800 m.s.n.m. t. (22).

La raíz fundamentalmente alcanza una profundidad de 50 - 80 cm. La mayoría de las raíces son fibrosas y se desarrollan a una profundidad de 10 - 15 cm. El pecíolo es 2 -6 cm de largo. Las hojas son alternas, densamente pubescentes, con una base sub-cordadas, con pocos dientes, cortamente apiculadas e inconspicuos. El pedúnculo floral es de 10 - 13 mm de largo; el cáliz tiene una latitud campanulado. Las flores se muestran verticalmente erectas o algo inclinadas. De color amarillo la corola, con cinco máculas. El ovario tiene un anillo o disco en base de color verde (23).

3.2.1.2. Biología de la flor de *Physalis peruviana* l.

“Aguaymanto”

Las flores son solitarias, pedunculadas y bisexuales, son procedentes de las yemas axilares de las hojas y están constituidas de una corola amarilla en forma tubular, procedente de cinco pétalos soldados, con cinco puntos morados en su base. En una investigación floral en la India, la floración comenzó 70 a 80 días posteriormente de la siembra y el periodo entre iniciación de botones florales y la antesis fue de 19 a 23 días. Durante la floración (3 a 4 días). El National Research Council (1989), ratifica que las flores son naturalmente polinizadas por insectos y por el viento, la fertilización también es común. El involucro de *Physalis peruviana*

L. presentó fertilización mixta, el 54% de fertilización cruzada. Se delimito con un sustento de investigación del sembrado y de acuerdo con la implantación de contextura a lo extenso del ramal, la persistencia cercana de la yema floral se encuentra entre 18 a 21 días, la yema floral demuestra un desarrollo extrínseco que logra tamaños aproximados de 1.0 cm de diámetro por 1,4 cm de longitud (24).

3.2.1.3. Clasificación taxonómica de *Physalis peruviana L.*

“aguaymanto”

La lista taxonómica de *Physalis peruviana L.*, conforme la National Plant Center USDA en (2000) (25).

El aguaymanto (*Physalis peruviana*) origen de la familia de las Solanáceas y al género *Physalis* (26).

Reino: plantae

División: angiospermae

Clase: magnoliopsida

Orden: solanales

Familia: solanaceae

Género: *physalis*

Especie: *physalis peruviana L.*

Nombre vulgar: uchuva, uvilla.

3.2.1.4. Composición química de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

Los frutos del aguaymanto disponen de características cítricas, tienen un pequeño contenido de grasa y proteínas, todas las frutas universalmente son fuentes insignificantes de grasas, pero son fuentes importantes de carbohidratos. Se determina que los carbohidratos en los frutos especialmente los que disponen características cítricas, están conformados por monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Miembros, cenizas, tiamina riboflavina, vitamina A, vitamina C, potasio, calcio, sodio, fósforo, Hierro. Las peculiaridades fisicoquímicas del aguaymanto son los sólidos solubles expresados como Brix (27).

3.2.1.5. Propiedades y beneficios *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

Se le han imputado muchos beneficios medicinales tales como diurético, antiasmático, antiséptico, sedante, analgésico, fortifica el nervio óptico, alivia molestias de garganta, excluye parásitos intestinales, antidiabéticos. No existiendo estudios previos que indiquen sus posibles reacciones adversos En otros países se le atribuyen propiedades medicinales tales como las de purificar la sangre, disminuir la albúmina de los riñones, aliviar dolencias en la garganta, próstata y bronquiales y prevenir la osteoporosis (28).

3.2.1.6. Comercialización de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

Los frutos son recolectados cuando el color del cáliz permuta de verde a dorado café, formalmente después de un lapso de

desarrollo de 60 - 80 días. La gravedad del fruto sigue durante todo el tiempo de maduración. Bajo buenas condiciones de cultivo, los frutos más grandes se adquieren en la primera cosecha. La recolección de una planta individual puede emerger hasta 300 frutos. Los rendimientos de cosecha son altamente variables. La cosecha empieza en el séptimo y noveno mes ulteriormente del cultivo. La recolección se efectúa en las regiones andinas en el mes de marzo y junio. Además sólo la recolección con las manos nos asegura una buena obtención de frutos con el cáliz sin daño alguno, para una buena comercialización. Se recomienda situar mallas plásticas bajo de las plantas durante la recolección con el propósito de facilitar las labores de colecta de frutos y eludir su contacto con el suelo (29).

3.2.2. Microorganismos endófitos

3.2.2.1. Origen y evolución de endófitas

Definido literalmente del vocablo endófito que deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta. Chanway publicó un artículo sobre la definición del concepto de endófito, donde consideraba endófito a hongos *micorrizíticos* que invaden las raíces, hojas y tallos pero ciertamente a pesar de la preponderancia de informes que describen a los hongos endófitos (30). La exclusividad, no es, de los hongos, debido que hay evidencias como el *acetobacter diazotrophicus* considerada una bacteria endófito que vive en forma mutualista con la planta como fijador de nitrógeno. Pero fue Wilson en 1995 (31).

Quien propuso definir el término de endófito como hongos y bacterias que viven parcial o totalmente dentro Los primeros

indicios de la existencia de la relación de los microorganismos y las plantas, se observaron en tejidos y hojas fosilizadas, posiblemente con la aparición de las primeras plantas en la tierra (32).

La hipótesis de su origen es controversial al igual de su forma de penetración debido a los distintos mecanismos que emplean para su colonización en plantas, se considera la hipótesis de una colonización desde semillas, de la rizósfera, también se considera que puede ser por estomas, se determinó que es el espacio intercelular como nicho más adecuado para los microorganismos endófitos (30)(33).

La evolución de las investigaciones en ecología microbiana, estudian las bacterias endófitas desde el punto de vista simbiótico y patogénico. Determinan que colonizan en el interior de los tejidos de las plantas, generalmente en espacios intercelulares, escasamente en espacios intracelulares y dentro de los tejidos vasculares sin ocasionar ningún indicio de afección a la planta, siendo que estas bacterias pueden elaborar enzimas hidrolíticas capaces de disminuir la pared celular de los vegetales (30). Actualmente la aparición de la resistencia bacteriana hace mayor la importancia del estudio de estos microorganismos como alternativa que permite descubrir moléculas biológicamente activas contra patógenos que afecta al ser humano (34)(35).

3.2.2.2. Clasificación de microorganismos endófitos

La importancia de la presencia de microorganismos en diferentes partes de las plantas radica en el beneficio que estas aportan a su desarrollo y evolución de su biomasa, brindando protección ante diferentes plagas y en muchos

casos a depredadores. Los microorganismos endófitos con mayor importancia presentes en las plantas se dividen en bacterias endófitas y hongos endófitos que están presentes como simbioses (36).

- Hongo endófito.- los estudios muestran la relación simbiótica que existen entre los hongos endófitos y la planta hospedera incluyendo la actividad antagonista y la resistencia a fitopatógenos, así como la promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizósfera hacia la planta (37).
- La mayoría de hongos encontrados pertenecen al *phylum Ascomycota*, aunque también se han encontrado en los *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota*. Los estudios realizados para determinar el sobre patógenos que afecta al ser humano son amplios por citar uno de ellos es Amna et al, realizaron un estudio sobre biorreactores sobre el hongo endofítico *Entrophospora infrequens* para la producción de un alcaloide anticancerígeno, Se descubrió que uno de los aislamientos del tejido interno de la corteza de la planta *N. foetida* que crece en la región de Jammu, estado de la India, produce cantidades detectables de camptotecina y sus derivados cuando se cultiva en un medio líquido semisintético (38).

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético. Se clasifican, basados en su filogenia e historia de vida. Según Rodríguez et al, en su estudio de endófitos fúngicos diversidad y roles funcionales realiza una clasificación tomando en cuenta su taxonomía, su evolución

y sus funciones ecológicas, se clasifican en dos grupos: Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos.

Los Clavicipitáceos son hongos que se encargan de colonizar los pastos y los Clavicipitáceos se encargan de colonizar las plantas no vasculares, helechos y angiospermas. Este último se divide en tres: clase dos, clase tres y clase cuatro, tres grupos funcionales distintos basados en el huésped, colonización y transmisión, en su biodiversidad y beneficios de aptitud conferidos.

La transmisión de hongos se realiza en forma vertical a través de las semillas y horizontal se adquiere del medio ambiente (38)(39).

La producción de metabolitos secundarios realizado por los hongos endófitos que inhiben a un patógeno en particular o algún otro hongo endófito ejerciendo un efecto aleopático. La contribución, se realiza por tres mecanismos:

- a) Directos: se da por medio de metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, elaborado por el hongo endófito.
- b) Indirectos: consisten en el aumento de la defensa químicos o fisiológicos propios a la planta hospedera.
- c) Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación (38) (40).

- Las bacterias endófitas.- son una clase de microorganismos endosimbióticos, la asociación de plantas y bacterias endofíticas incluye una gran diversidad de taxones bacterianos y anfitriones de plantas, durante la última década, han surgido nuevos aspectos de la diversidad microbiana con la

aplicación de nuevos métodos de análisis metagenómicos en estudios de endófitos bacterianos. La estructura de la comunidad bacteriana endofítica está determinada por el genotipo de la planta. Los endófitos bacterianos son una clase de microorganismos que colonizan los espacios intercelulares e intracelulares de todos los compartimentos de la planta sin causar cambios patológicos en ellas, por lo contrario establece una relación mutualista muy beneficiosa para la planta. Algunas cepas establecen colonizaciones robustas y duraderas de las superficies de las raíces y producen o liberan una variedad de compuestos que otorga a la planta resistencia localizada y sistémica. Las bacterias endófitas adquieren mayor importancia en la agricultura (40)(41).

Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, que significa que dos especies distintas conviven, aunque no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbiote (43).

3.2.2.3. Mecanismos de acción

Orlando Petrini a través de su artículo de microorganismos endófitos en hojas de árbol propuso tres mecanismos que explican la llegada de microorganismos endófitos al tejido vegetal (39).

- a) Llegada e incorporación de esporas aerotransportadas.
- b) Transmisión por semillas.

- c) Esporas inoculadas por insectos directamente en las plantas.

El primer mecanismo, también es conocido como transmisión horizontal, y predomina en plantas leñosas donde el microorganismo generalmente se dispersa mediante esporas. La transmisión por semillas ha sido ampliamente estudiada en gramíneas, donde se transmiten de generaciones en generación a través de las semillas de la planta hospedera (44).

3.2.2.4. Relación de los microorganismos con la producción de metabolitos secundarios

Una de las principales características de los microorganismos endófitos es producir metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos son antibióticos con propiedades antifúngicas, antibacteriales e insecticidas, los cuales pueden inhibir eficazmente el desarrollo de otros microorganismos, incluyendo fitopatógenos. Strobel (44).

En los sistemas planta-insecto-hongo endófito, la producción de metabolitos secundarios es importante para mantener la relación simbiótica entre la planta y el hongo debido a la capacidad de los hongos endófitos para alterar el comportamiento de alimentación de los invertebrados, así como la reducción de la tasa de desarrollo de los insectos que protege, a su vez, a la planta hospedera. Cuando colonizan pasturas de importancia agronómica, contribuyen en la reducción de poblaciones de insectos asociados, mejorando así la aptitud ecológica de la planta y reduciendo la del insecto (45).

3.2.2.5. Actividades biológicas y farmacológicas registradas para los hongos endófitos.

La investigación de nuevos compuestos activos contra las diversas enfermedades es persistente y los productos naturales son una fuente fundamental de nocivas moléculas bioactivas. Los hongos, desde un punto de vista químico, son poco explotado, siendo hongos aislados del suelo los más importantes y más estudiados. Los hongos endofíticos deberían de ser muy destacados, puesto que de ellos se han aislado un gran número de moléculas y han servido mucho de interés biológico (46).

El aislamiento se originaron a partir de diferentes vías biosintéticas: isoprenoides, poliequiacidos, derivados de aminoácidos, y pertenecieron a diversos grupos estructurales como: terpenoides, esteroides, xantonas, chinonas, fenoles, isocumarinas, benzopirononas, los hongos endófitos poseen las exoenzimas y crecen bien en el líquido de lavado aploplástico del huésped (42)(43).

3.3. Definición de términos

1. **Pericarpio:** capa exterior dura y fibrosa que encierra al grano (47).
2. **Hifas** reciben el nombre de micelio son tubos largos y finos, por lo que tiene una gran superficie externa (48).
3. **Endófito:** En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas (48).
4. **Lisígeno:** espacio intercelular originado por lisis de las células que lo rodean (48).
5. **Esferosomas:** son pequeños cuerpos de apariencia granular rodeado por una membrana simple (48).
6. **Hipodermis:** tejido celular subcutáneo (48).

7. Pluriestratificada: son aquellos constituidos por dos o más capas, se denominan epitelios estratificados o pluriestratificados (47).
8. Astringente: que produce desecación y contracción de los tejidos del vientre y dificulta la evacuación de los excrementos (48).
9. Pepsina: Enzima que segregan algunas glándulas del estómago de los vertebrados y que interviene en procesos digestivos (48).
10. Fitoterapéuticos: Producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen del material de una planta medicinal o sus asociaciones (48).
11. Fitopatógeno: Organismo capaz de causar una enfermedad a plantas (48).
12. Exógeno: que forma o nace en el exterior (48).
13. Endógeno: que se forma o engendra en el interior de algo, como la célula que se forma en el interior de otra (48).
14. Deletéreos. Que es venenoso y/o mortífero (48).
15. Filosfera: superficie de la hoja de la planta (48).
16. Rizósfera. Relacionado al suelo con contacto directo a la raíz (48).
17. Epifito: que vive sobre pero sin ser parasito (48).

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación:

Es una investigación del tipo descriptivo básico debido a que los estudios a realizar se caracterizan por la no asignación de sujetos, permite el control de la validez externa (47).

4.2. Nivel de investigación:

La presente investigación es de nivel explorativo puesto que tiene por propósito identificar cualitativamente los microorganismos endófitos presentes en hojas de *Physalis peruviana L.* (46).

4.3. Diseño de la investigación:

El diseño de la investigación es descriptivo simple, debido que solo busca realizar la descripción objetiva de los microorganismos endófitos presentes en hojas de *Physalis peruviana L.*

4.4. Área de estudio:

La planta proviene del departamento de lima provincia de lima. Las muestras fueron obtenidas del mercado Valle Sagrado ubicado en el paradero 10 de canto grande distrito de san juan de Lurigancho.

4.5. Población y muestra: Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: se tomaron como criterios de inclusión

- Hojas sin evidencia de daño
- Hojas de color homogéneo
- Hojas enteras
- Hojas sin distinción de tamaño siempre y cumplan los criterios anteriores.

Criterios de exclusión: se tomaron como criterios de exclusión

- Hojas marchitas
- Hojas de color pardas o marrones.
- Hojas con evidencia de daño
- Hojas secas.

4.6. Variables y operacionalización de variables

4.6.1. Variables independientes:

- Microorganismos endófitos.

4.6.2. Variables dependientes:

- No cuenta con variable dependiente.

4.6.3. Operalización de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA
Microorganismos endófitos	Son microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente y habitan en diversas partes de la planta.	Aislamiento de microorganismos	Presencia de Hongos y Bacterias endófitas	Crecimiento de microorganismos en medios de cultivo	UFC (unidades formaciones colonias)

4.7. Instrumentos de recolección de datos

4.7.1. Material biológico

La planta de *Physalis peruviana L.* fue adquirida en el mercado Valle Sagrado ubicado en el paradero de 10 de canto grande distrito de San Juan de Lurigancho, entre los meses de setiembre y noviembre de 2019.

4.7.2. Aislamiento de microorganismos endófitos.

El aislamiento de microorganismos se realizó en el laboratorio de la Universidad María Auxiliadora, escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, se aplicó la técnica de aislamiento de microorganismos endófitos según Qingmiao modificado (44).

4.7.2.1. Protocolo de desinfección

Los tejidos vegetales (hojas) fueron colocados en frascos de vidrio estéril.

- la desinfección de las hojas recolectadas se realizó mediante lavados continuos con agua potable común, posteriormente fue sumergido en una solución de etanol al 70% por un periodo de tiempo de 3'.
- luego se aclara 3 veces con agua destilada, adicionalmente la muestra fue sumergida en hipoclorito de sodio al 3% por 6' luego se aclara 6 veces con agua destilada con el fin de esterilizar la superficie y evitar el crecimiento de microorganismos epifitos.

4.7.2.2. Protocolo de maceración

Se colocaran las hojas en un mortero estéril, con un bisturí se corta las hojas para poder facilitar la salida de los microorganismos seguidamente se agrega NaCl 0,9 %, con un pilón estéril procederemos a triturar las hojas por un periodo de 5', luego se tomara alícuotas de 100 μ l para realizar el cultivo.

4.7.2.3. Preparado de diluciones para el cultivo de microorganismos.

Con una micropipeta se tomaron alícuotas del mortero, se tomó una alícuota de 1 ml y se realizaron diluciones en 9 ml de solución salina (0.9%).

Se realizaron diluciones sucesivas hasta la 10^{-5} , se agitaron las muestras para homogenizar.

4.7.2.4. Cultivo de microorganismos.

Con las diluciones obtenidas se realizó el sembrado en medios de cultivo. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron (42).

- AGAR LB para la identificación de *Pseudomonas* y enterobacterias.
- AGAR PAPA DEXTROSA : para identificación de hongos
- AGAR BACTO PEPTONA: para identificación de enterobacterias.
- AGAR MANITOL- SAL: para identificación de Bacillus.
- AGAR SABOURAUD: aplicado para el cultivo de Streptococcus.

- AGAR NUTRITIVO: aplicado para el cultivo de todo tipo de bacteria.

Se colocó una alícuota de 100 μ L en cada medio de cultivo de las distintas soluciones obteniendo 4 medios de cultivo para cada dilución, la alícuota se colocaron con la ayuda de una micropipeta en el centro de cultivo, con la ayuda de una asa de drigalsky y un mechero para garantizar un medio estéril, , posteriormente se selló la placa cultivo y se rotuló con los datos de la muestra, la (dilución, fecha y el medio de cultivo), este mismo procedimiento se repetirá para cada una de las muestras, posteriormente se incubaron a una temperatura de 26°C por un periodo de 5 días, el crecimiento de microorganismos fue verificado cada 24 horas.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de microorganismos endófitos de hojas de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo en el laboratorio 2B01 de la universidad María Auxiliadora en el distrito de San Juan de Lurigancho, el cultivo se realizó en 6 distintos medios de cultivo, Agar Papa Dextrosa , Bacto Peptona Agar, Manitol Sal Agar, Agar LB, Agar Nutritivo, Agar Sabouraud, teniendo en cuenta que se realizaron 6 diluciones para cada medio de cultivo, obteniendo un total de 36 muestras cultivadas, el crecimiento de microorganismos endófitos se observó solo en 23 muestras. Del total de muestras evaluadas 4 corresponden a hongos y 19 a bacterias. (Tabla 1).

Tabla 1. Bacterias y hongos observados macroscópicamente.

AGARES DILUCIONES	PDA	BPA	AMS	LB	AN	AS
10⁰	X	X		X	√	X
10⁻¹	X	√		X		X
10⁻²	X	√		X	X	X
10⁻³	X	√		X	X	
10⁻⁴		X		X	X	X
10⁻⁵		X				

Leyenda: (X) Bacterias (√) Hongos

Según los datos de la tabla 1, se observó macroscópicamente el crecimiento de hongos y bacterias endófitas, sin embargo hubo mayor presencia de crecimiento de bacterias endófitas, teniendo mayor predominio en el agar LB, caso contrario se observó en el agar AMS donde no hubo crecimiento de microorganismo por ser un medio cultivo selectivo para colonias de *Staphylococcus* (sospechosas de ser patógenas).

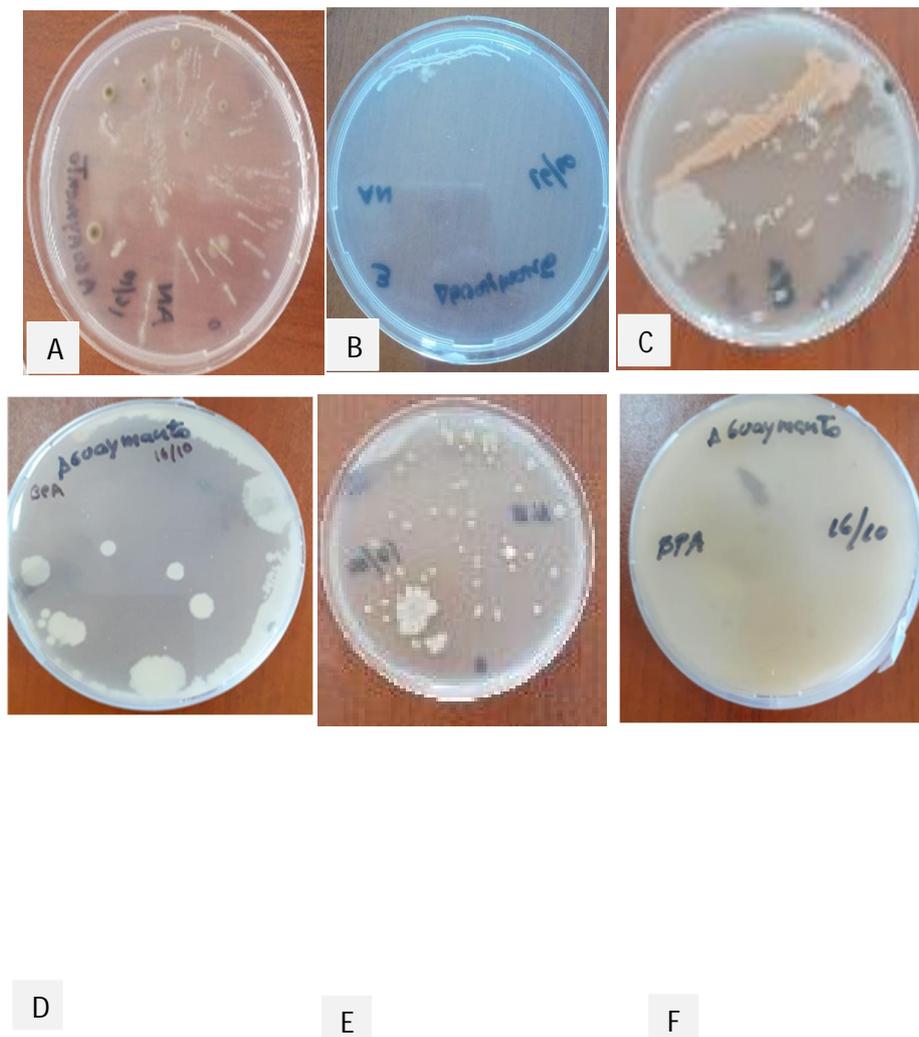


Figura.1 Observación macroscópica de hongos y bacterias endófitas.

Observación macroscópica del aislamiento de microorganismos endófitos. A.B.C. se observa crecimiento de bacterias endófitas. D.E.F. se observa crecimiento de hongos endófitos.

5.2. Identificación cualitativa de bacterias endófitas de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

Los resultados que se obtuvo a partir del aislamiento de microorganismos endófitos nos muestra: el crecimiento de bacterias se presentó en 19 agares de distintas diluciones y en la mayoría de los medios de cultivo con predominio en medio de cultivo LB y PDA.

Tabla 2. Bacterias endófitas observados macroscópicamente.

AGARES	PDA	BPA	AMS	LB	AN	AS
DILUCIONES						
10^0	X	X		X		X
10^{-1}	X			X		X
10^{-2}	X			X	X	X
10^{-3}	X			X	X	
10^{-4}		X		X	X	X
10^{-5}		X				

Legenda: (X) Bacterias

Según los resultados de la tabla 2, se observó macroscópicamente crecimiento de bacterias endófitas con predominio en agares LB y PDA.

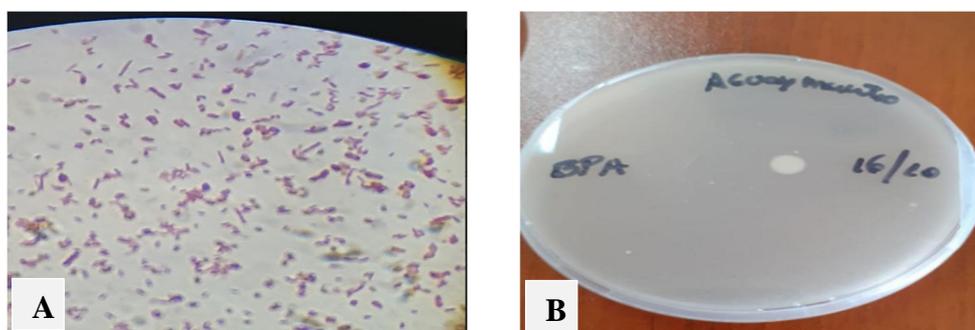


Fig. 1 Bacteria endófitas aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas visto a 10x B vista macroscópica de la bacteria crecida sobre el agar BPA en una dilución 10^{-4}

Microscópicamente y macroscópicamente en la fig. 1 se visualiza la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica son cocos Gram negativo.

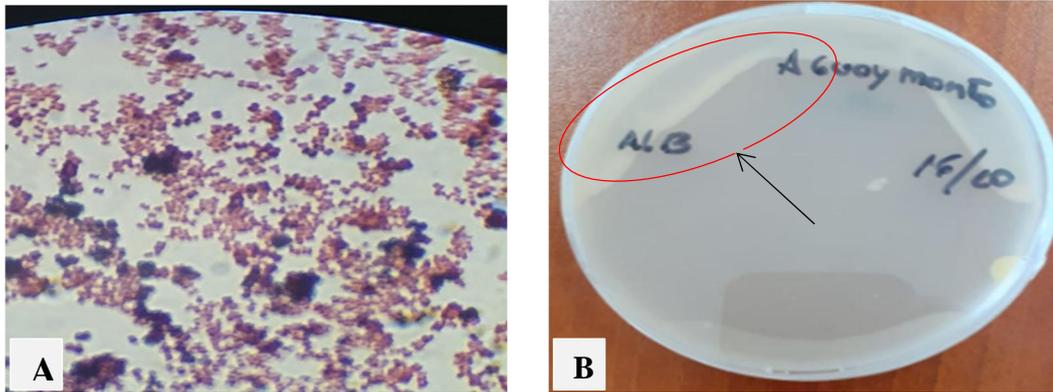


Fig. 4 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas visto a 10x B vista macroscópica (flecha) de la bacteria crecida sobre el agar ALB en una dilución 10^{-3} ^(a)

En las fotos mostradas en la fig. 4 se visualizan microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es un coccus Gram positivos.

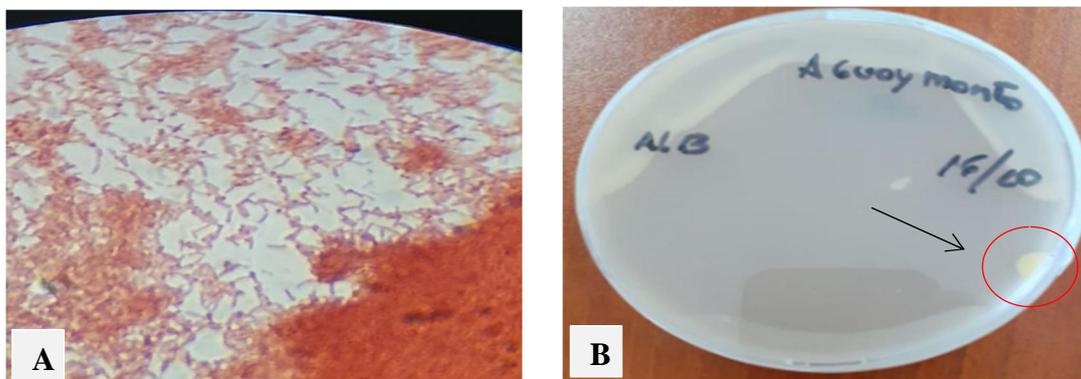


Fig. 5 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas visto a 10x B vista macroscópica (flecha) de la bacteria crecida sobre el agar ALB en una dilución 10^{-3} ^(b)

Las fotos mostradas en la fig.5 se puede visualizar microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es un bacilos Gram negativo.

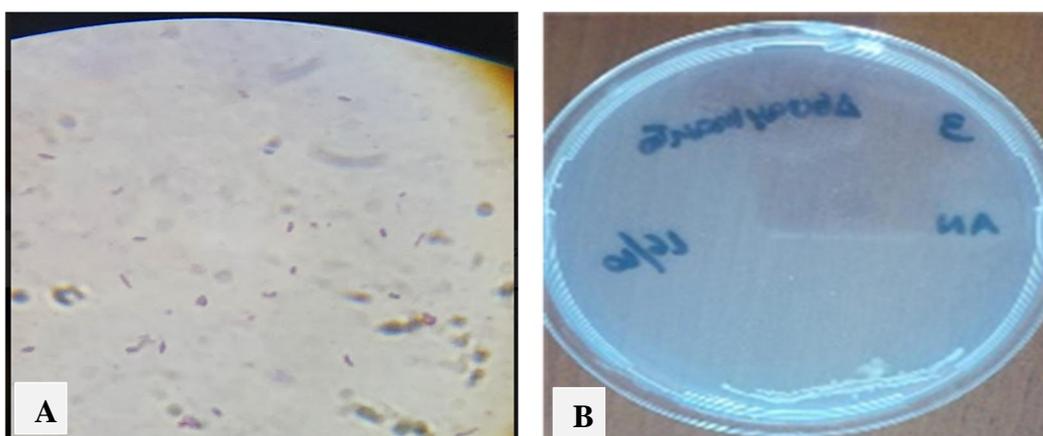


Fig. 6 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L.A. bacteria endófitas vistas a 10x B. vista macroscópica de la bacteria crecida sobre el agar AN en una dilución 10^{-3}

En fig.6 se observa microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es bacilos Gram positivos.

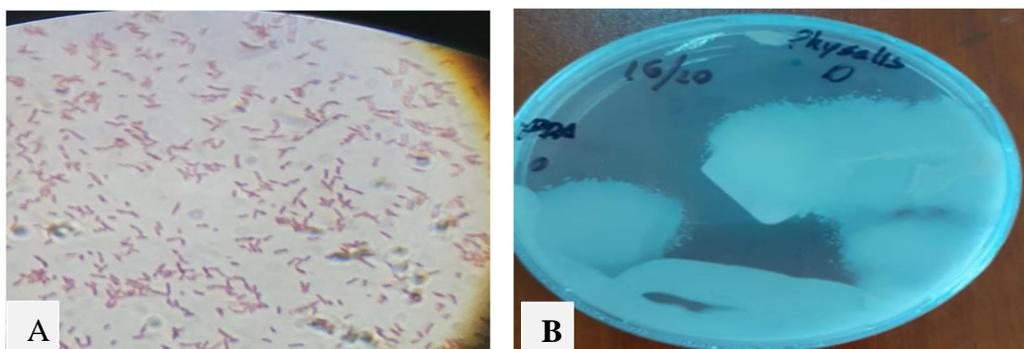


Fig. 7 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas vistas a 10x B. vista macroscópica de la bacteria crecida sobre el agar PDA en una dilución 10^0

Analizando la fig. 7 se puede visualizar microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es un bacilos Gram negativo

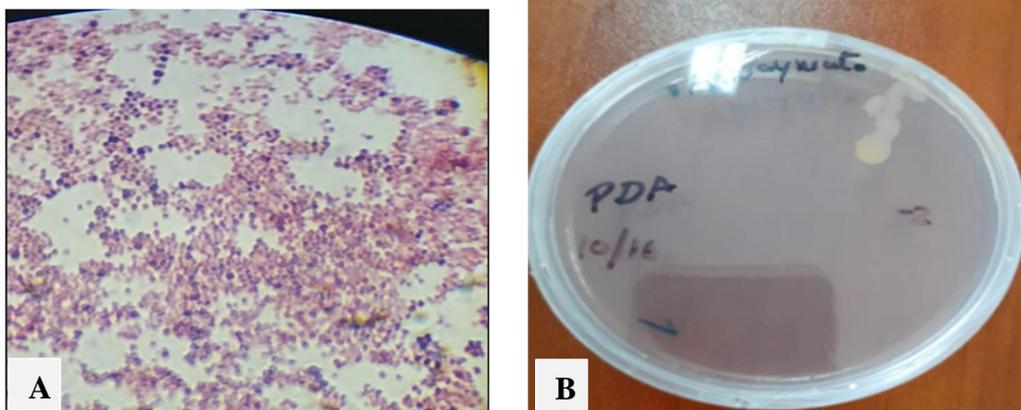


Fig. 8 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas visto a 10x B vista macroscópica de la bacteria crecida sobre el agar PDA en una dilución 10^{-1}

Según las imágenes de la fig. 9 se visualiza microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es un coccus Gram positivos

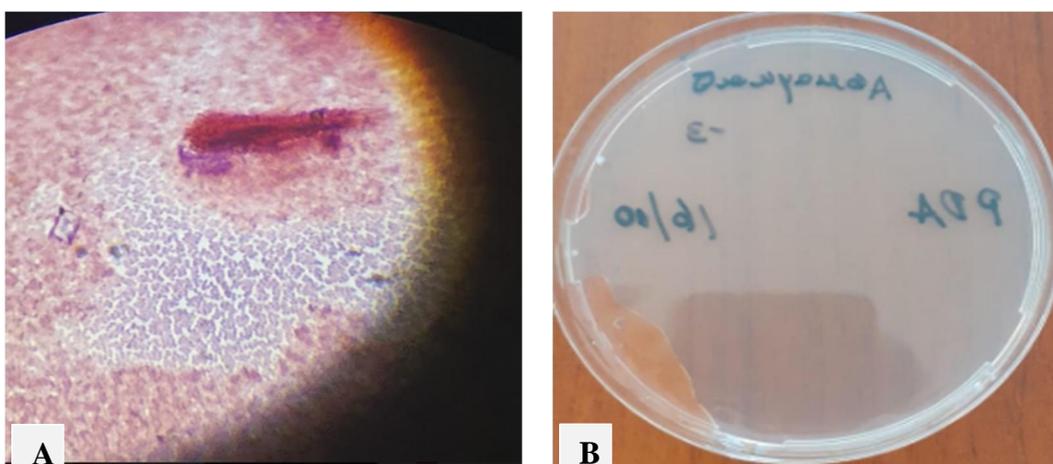


Fig. 9 Bacteria endófitas aisladas de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófitas visto a 10x B vista macroscópica de la bacteria crecida sobre el agar PDA en una dilución 10^{-3}

La fig.10 muestra microscópicamente y macroscópicamente la forma de una bacteria endófitas la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es un coccus Gram negativo.

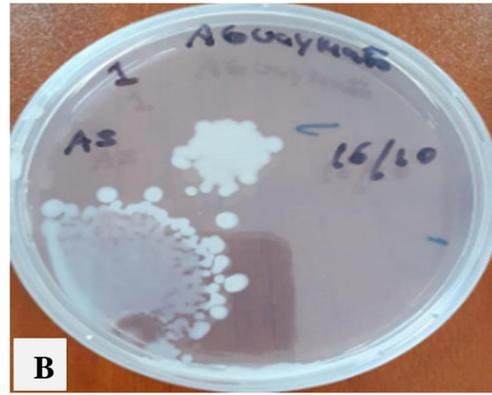
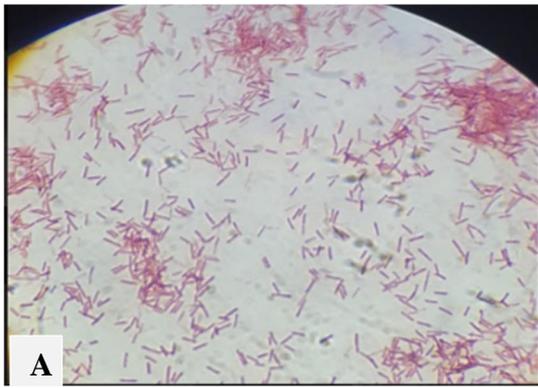


Fig. 10 Bacteria endófito aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. bacteria endófito visto a 10x B vista macroscópica de la bacteria crecido sobre el agar AS en una dilución 10^{-1}

Observando la fig. 10 microscópicamente y macroscópicamente se puede visualizar la forma de una bacteria endófito la cual fue aislada de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su característica morfológica es bacilos Gram negativo.

5.3. Aislamiento de hongos endófitos de *Physalis peruviana l.*
“aguaymanto”

Para llevar a cabo este objetivo, se consideró importante identificar cualitativamente los hongos que se desarrollaron en los medios de cultivo, utilizando las 36 muestras sembradas, 4 corresponden a hongos endófitos.

Tabla 3. Observación macroscópica del crecimiento de hongo endófito en medio cultivo a distintas diluciones.

AGARES DILUCIONES	PDA	BPA	AMS	LB	AN	AS
10^0					√	
10^{-1}		√				
10^{-2}		√				
10^{-3}		√				
10^{-4}						
10^{-5}						

Leyenda: presencia Hongos (+) ausencia de hongos (-)

Según la Tabla 3. Se muestra un total de 4 agares con presencia de crecimiento de hongos endófitos, teniendo en cuenta que el crecimiento predominó, sin embargo se tiene que considerar que en un mismo medio de cultivo se observó el crecimiento de hongos a distinta diluciones.

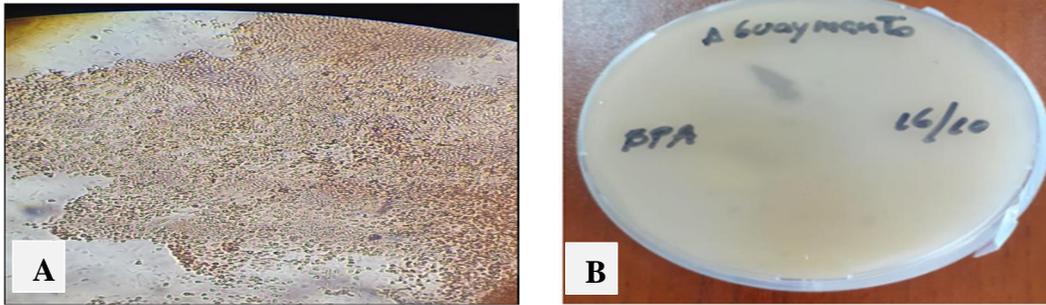


Fig. 11 Hongo endófito aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. Hongo endófito visto a 40x B vista macroscópica del hongo crecido sobre el agar BPA a una dilución 10^{-1}

En la fig.11 se puede visualizar microscópicamente y macroscópicamente la forma de un hongo endófito que fue aislado de las hojas *Physalis peruviana* L. este hongo no fue identificado debido al poco tiempo de crecimiento.

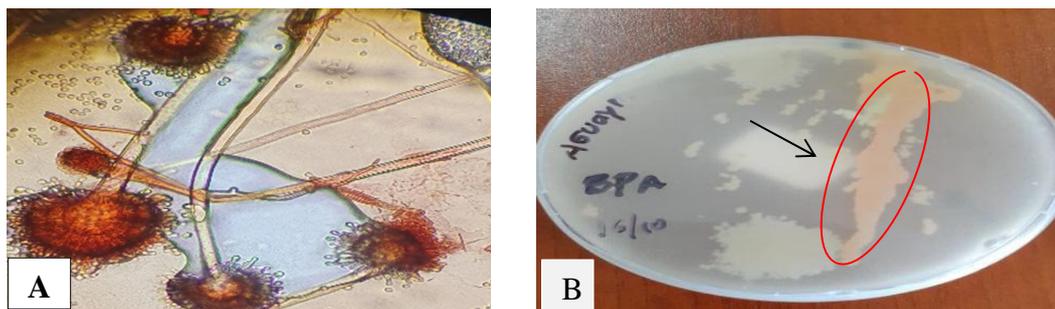


Fig. 12 Hongo endófito aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. Hongo endófito visto a 40x B vista macroscópica (flecha) del hongo crecido sobre el agar BPA a una dilución 10^{-2}

Analizando la fig.12 se puede visualizar microscópicamente y macroscópicamente la forma de un hongo endófito que fue aislado de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su morfología probablemente pertenece al género *Rhizopus* sp.

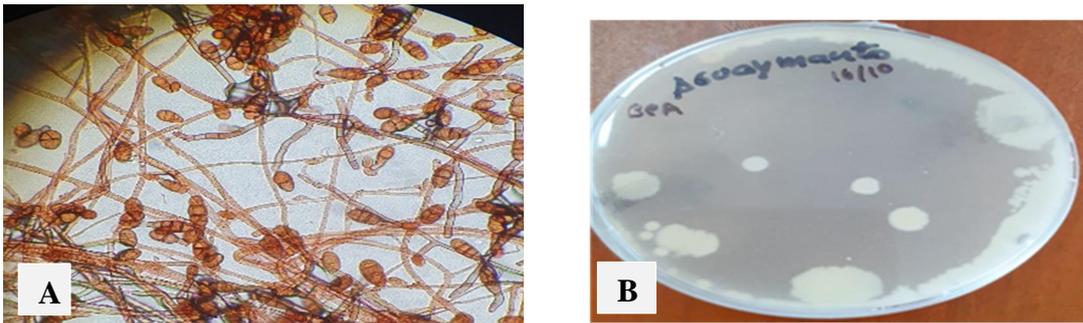


Fig. 13 Hongo endófito aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. Hongo endófito visto a 40x B vista macroscópica del hongo crecido sobre el agar BPA en una dilución 10^{-3}

Microscópicamente y macroscópicamente en la fig. 13 se visualiza la forma de un hongo endófito que fue aislado de las hojas *Physalis peruviana* L. que por su morfología probablemente pertenece al género *Alternaria* sp.

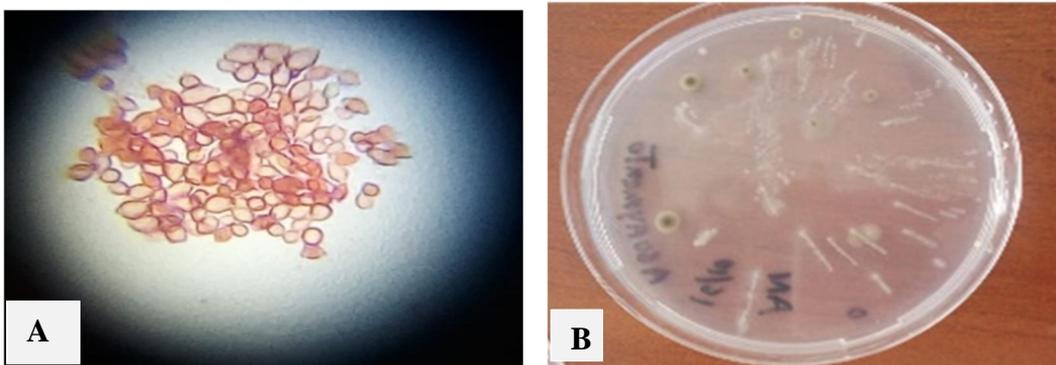


Fig. 14 Hongo endófito aislado de hojas *Physalis peruviana* L. A. Hongo endófito visto a 40x B vista macroscópica del hongo crecido sobre el agar AN en una dilución 10^{-0}

La fig.14 se puede observar microscópicamente esporas de hongos endófitos y macroscópicamente la forma de un hongo endófito que fue aislado de las hojas *Physalis peruviana* L este hongo no pudo ser identificado debido al poco tiempo de crecimiento.

6. DISCUSIÓN

- Se aislaron bacterias endófitas de las hojas de *Physalis peruviana L.* en las cuales observó (cocos gram + y gram -). Sin embargo Caviedes (12), encontró mayor número de bacterias (gram + y gram -) con potencial antagonista asociadas a la rizósfera de *Physalis peruviana L.* por lo tanto este proyecto coincide con los resultados obtenidos en este estudio debido a la probabilidad que teniendo en cuenta que las bacterias endófitas encontradas fueron de hojas de *Physalis peruviana L.* los microorganismos pueden hallarse en hojas, tallo y raíz.
- Se aislaron hongos endófitos de las cuales se observó 4 hongos endófitos de los géneros (*Rhizopus sp.* y *Alternaria sp.*) y dos no identificados. Hasta la fecha hay poca cantidad de reportes a cerca de la presencia de hongos endófitos en las hojas de *Physalis peruviana L.* por lo cual, este estudio reporta por primera vez hongos endófitos asociados a esta planta.

7. CONCLUSION

Según los resultados obtenidos del aislamiento de microorganismos endófitos, se llega a la conclusión siguiente:

- En el aislamiento de microorganismos endófitos de las hojas de *Physalis peruviana L.* se encontraron la presencia de hongos y bacterias endófitas.
- En el aislamiento de hongos solo se logró observar en 4 de 36 placas sembrados, se identificó la presencia de hongos de diferentes géneros tales como: *Rhizopus sp.* y *Alternaria sp.*; y dos no identificados.
- En el aislamiento de bacterias se evidencio presencia de bacterias endófitas con formas coco bacilos perteneciente a los grupos (gram + y gram -)

8. RECOMENDACIONES

- El presente trabajo solo busca las características cualitativas de los microorganismos endófitos presente en la hoja, por lo tanto se sugiere una investigación más detallada caracteriza molecularmente la cepas obtenida poder determinar su estructura molecular para poder constituir la como fuente natural de microorganismos endófitos con fines medicinales.
- Se recomienda realizar más estudios para caracterizar molecularmente estas bacterias y hongos y así definir la especie.
- Se recomienda realizar más estudios sobre diferentes tejidos vegetales de la planta de *Physalis peruviana L.* tales como (tallos, fruto, semilla.).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castañeda B, Salazar A, Estudio fitoquímico, toxicidad aguda y efectos antiulceroso y antitumoral de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *Capsicum pubescens*, «Rocoto». Universidad san Martín de porras, Facultad de medicina humana. 2014; 319-314. [citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en: https://www.researchgate.net/publication/271527405_phytochemical_study_acute_toxicity_and_antiulcer_and_antitumor_effects_of_aqueous_ethanolic_and_methanolic_extracts_of_Capsicum_pubescens_Rocoto
2. Villavicencio B. Caracterización químico-nutricional y actividad antioxidante de dos muestras de *Capsicum pubescens* (“rocoto rojo y amarillo”) provenientes de villa rica (Pasco). Universidad Cayetano Heredia, Facultad de ciencias y filosofía “Alberto Cazorla Talleri”, 2016, Lima-Perú. [citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en: <http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/637/Caracterizaci%C3%B3n%20qu%C3%admiconutricional%20y%20actividad%20antioxidante%20de%20dos%20muestras%20de%20Capsicum%20pubescens%20%28Rocoto%20rojo%20y%20amarillo%29%20provenientes%20de%20Villa%20Rica%20%28Pasco%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. Rozete M. Caracterización fitoquímica y evaluación sensorial de variedades de Chile Habanero (*capsicum chinense Jacq.*) de Yucatán. Centro de Investigacion Científica de Yucatán, Posgrado en ciencias Biológicas, 2019, Yucatán -México, [citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1506/1/PCB_M_Tesis_2019_Mary_Jose_Rozete_Navarro.pdf
4. Gonzalez A, Almaraz J, Ferrera R, Rodríguez M, Taboada O, Trinidad A, et al. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum l.*) Revista Internacional de Contaminacion Ambiental 33 (3) 463-474, 2017. [Citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado el 30 de noviembre 2019. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/rica.2017.33.03.09/46702>

5. Sánchez A, Salcedo S, Mendoza R, Pinedo J, Moreno S, Aislamiento e Identificación de Micorrizas Arbusculares (MA) Asociadas a la Rizósfera del chile piquín (*Capsicum annuum var. aviculare L.*). Investigación y Desarrollo en ciencias y tecnología de alimentos, Universidad Autónoma Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Vol. 3; 2018. [citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/2/16.pdf>

6. Delgado R. Optimización de los métodos de obtención de la capsaicina del ají limo (*capsicum sinense jacq*) para la determinación de la dosis letal del pulgón verde (aphididae), Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de ciencias Naturales y Formales, Arequipa-Perú, 2018. [citado el 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en:<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5923/QUdezekr.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

7. Sánchez M. Estudio Investigativo del ají, análisis de sus propiedades y nuevas recetas para la cocina, Universidad tecnológica equinoccial, facultad de turismo, hotelería y gastronomía. Quito-Ecuador, 2015. [citado 30 de noviembre de 2019]. Recuperado en:http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/16110/63339_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. Montaña Arias NM, Sandoval Pérez AL, Camargo Ricalde SL, Sánchez Yáñez JM. Los microorganismos: pequeños gigantes. Rev Cienc y Cult Elem. 2010;77(0187-9073):15-23.

9. Rodríguez K. El hábitat de los microbios. Ciencia. 2017;68(2):18-25.

10. Guzmán-Trampe S. Los microbios y la ecología. Ciencia [Internet]. 2017;68(2):50-9. Available from: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/MicrobiosEcologia.pdf

11. Strobel G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. [Internet].2003;(5), 535-544. [citado el 08 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.google.com/search?q=strobel+gary+a.+2003.+Endophytes+as+sources+of+bioactive+products.+Microbes+and+Infection>

12. Caviedes d, aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias de la salud [Tesis], Colombia – Bogotá, 2010, [citado el 30 de noviembre de 2019] disponible a partir de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8628/tesis588.pdf?sequence=1&isallowed=y>

13. Perez, C. A, Chamorro, A L. Bacterias endófitas: una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en Colombia. *Rev Colomb Cienc Anim - Recia*. 2012;4(1):172.

14. Antifúngica A, Extracto DEL, Hojas EDE, Candida FA, Montesinos BT, Alejandra M. Universidad Católica De Santa. 2013;1–122.

15. Camacho González A, Fernández Valiente E. Un mundo dominado por los microorganismos: ecología microbiana de los lagos antárticos. 2005;(June).

16. Tacanga WAR. Características y propiedades funcionales de *Physalis peruviana* "Aguaymanto ". *Bibl Digit Dir Sist Inform Y Comun*. 2015;1–43.

17. Sánchez E-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M, et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*. 2013;16(2):132–46.

18. Gamboa-gaitán MA, Sc M. Hongos Endófitos Tropicales Conocimiento Actual Y Perspectivas. *Acta Biológica Colomb*. 2006;11(1):3–20.

19. Salgado Salazar C, Cepero De García MC. Aislamiento de hongos endofitos en *rosa (Rosa hybrida)* en Bogotá, Colombia. Rev Iberoam Micol. 2005;22(2):99–101.
20. Moreno L, Forero LM. Microbial Populations Associated with the Rhizosphere and Phyllosphere Plants of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana L.*). Rev ciencias. 2014;18(2):27–38.
21. Mayolo Sade, Académico E, Agronomía PDE, Rocio B, Pilar DEL, Al U. Univer.sidad nacional “santiago antúnez de mayolo.” 2016;
22. Llacsá S. Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrícicos asociados a *Centrolobium ochroxylum* Rose ex Rudd. “amarillo” y *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engler. “hualtaco” mediante técnicas de caracterización molecular, procedentes de la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape. Universidad nacional de tumbes. 2015;
23. De E, Programa P, Doctorado D, Paola Y, Coila A, Optar P, et al. Universidad Nacional Del Altiplano. 2000;2006–11.
24. Cuicapusa M. Caracterización bromatológica microbiológica y sensorial del néctar del aguaymanto (*physalis peruviana L.*) edulcorado con stevia (*stevia rebaudiana bertonii*). Univ Nac Huancavelica [Internet]. 2015;68. Available from: <http://181.65.181.124/handle/UNH/115>
25. Doster N, Jose R. *Physalis L*, Luebert TF. Hoja botánica : Aguaymanto. 2011
26. Madriñan C. Caracterización morfológica de accesiones de *physalis peruviana l.* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Trab Maest - Investig en Recur Fitogenéticos Neotrop Universidad Nac Colomb [Internet]. 2010;(2007). Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1875/1/07505002.2010.pdf>

27. Maria C. Caracterización bromatologica microbiologica y sensorial del néctar del aguaymanto (*physalis peruviana l.*) edulcorado con stevia (*stevia rebaudiana bertonii*). Univ Nac Huancavelica [Internet]. 2015;68. Available from: <http://181.65.181.124/handle/UNH/115>

28. La uchuva. Taxonómica de *Physalis peruviana L.* [Internet].2015. [citado el 03 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://frutopromisorio.blogspot.com/>

29. Contreras X. Influencia de la temperatura de secado en la degradación térmica del ácido ascórbico en el aguaymanto (*physalis peruviana l.*). 2015;

30. Camacho González A, Fernández Valiente E. Un mundo dominado por los microorganismos: ecología microbiana de los lagos antárticos. 2005;(June).

31. Cavalcante VA, Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil. 1988;108(1):23–31.

32. Perez, C. A, Chamorro, A L. Bacterias endófitas: una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en Colombia. Rev Colomb Cienc Anim - Recia. 2012;4(1):172.

33. Soundarapandian S. Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and endophytes with medicinal plants – new avenues for phytochemicals [Internet].2010; vol.2 No.7 pp. 91-100 [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: T.N. Taylor, E.L. Taylor, the rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions, in: C.W. Bacon, J.F. White (Eds.), Microbial Endophytes, Marcel Decker Inc, New York.

34. McCully. Nichos para endófitos bacterianos en plantas de cultivo: la visión de un biólogo de plantas [Internet].2012. researchGate [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280798673_Niches_for_bacterial_endophytes_in_crop_plants_A_plant_biologist's_view

35. Hurek T. Viviendo dentro de las plantas: endófitos bacterianos. [Internet].2011; 14(4): 435-43. Pubmed [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536480>
36. Perez, C. A, Chamorro, A L. Bacterias endófitas: una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en Colombia. Rev Colomb Cienc Anim - RECIA. 2012;4(1):172.
37. Sánchez E-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M, et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Tip. 2013;16(2):132–46.
38. Gao F, Dai C, Liu X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African J Microbiol Res. 2010;4(13):1346–51.
39. Touseef A, Satish C, Verma V, Jai S, Rajinder K, Javed M, Michael S, Bioreactor studies on the endophytic *Fungus Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin, Canadian Journal of Microbiology, 2006, Vol. 52, No. 3 : pp. 189-196, [Citado el 02 de noviembre del 2019] Disponible en: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/w05-122>
40. Rodríguez S. Fungal endophytes. [internet].2009;182(2): 314-30. Pubmed [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236579>
41. Rojas E. Ecología tropical hongos endofitos[Internet].2007; 88(3) 550-8 Pubmed [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503581>
42. Gao F, Dai C, Liu X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African J Microbiol Res. 2010;4(13):1346–51

43. Harman G. Especies de Trichoderma: simbiontes de plantas oportunistas y avirulentos. [Internet].2004; 2(1): 43-56. Pubmed. [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008>
44. Medina P, Mendoza M. Zemdirbyste-Agriculture, Endófitos bacterianos en cultivos agrícolas y su papel. en tolerancia al estrés: una revisión [Internet].2015. vol. 102, No. 4, p. 465–478. . Pdf [citado el 02 de noviembre del 2019]. Disponible en: http://www.zemdirbysteagriculture.lt/wpcontent/uploads/2015/11/102_4_str60.pdf
45. Carroll, G. The Biology of Endophytism in Plants with Particular Reference to Woody Perennials. En: Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge, Inglaterra: University Press, 1986. p. 205-222
46. Petrini O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. En: Microbial Ecology of Leaves. Nueva York, Usa: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197
47. Gary S. Bryn D. Bioprospección de endófitos microbianos y sus productos naturales [Internet].2003; 67(4): 491-502. PMC [citado el 03 de noviembre del 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309047/>
48. Psicoactiva. Diccionario de términos Biologicos. wwwPsicoActiva.com. 2015;
49. Ezra D, Castillo UF, Strobel GA, Hess WM, Porter H, Jensen JB, et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces sp.* (MSU-2110) endophytic on *Monstera sp.* Microbiology. 2004;150(4):785–93.

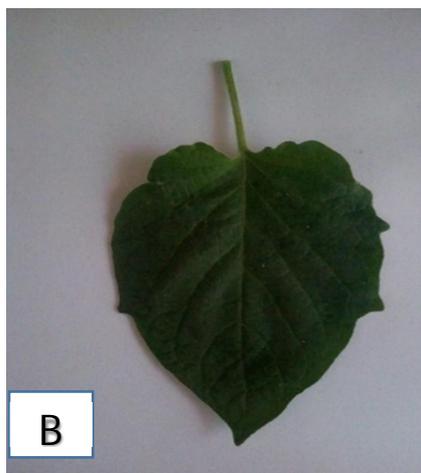
10.ANEXOS

ANEXO 01: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: aislamiento de microorganismos endófitos de hojas de *Physalis peruviana* L “aguaymanto”

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODOLOGIA
<p>1. Problema general:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles son los microorganismos endófitos presentes en hojas de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”? <p>2. Problemas específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles son los hongos endófitos presentes en hojas de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”? • ¿Cuáles son las bacterias endófitas presentes en hojas de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”? 	<p>1. Objetivo general:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aislar microorganismos endófitos presente en la hoja de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”. <p>4. Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • aislamiento de hongos endófitos en la hoja de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”. • aislamiento de bacterias endófitas en la hoja de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”. 	<p>Implícita</p>	<p>5. Tipo de investigación Básico</p> <p>6. Nivel de investigación Exploratorio</p> <p>7. Diseño de la investigación Descriptivo simple</p> <p>8. Área de estudio Planta proveniente del departamento de lima provincia de lima. Se extrajo la muestra del mercado Valle Sagrado del paradero N° 10 de canto grande distrito de San Juan de Lurigancho.</p> <p>9. Población y muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Población: planta de <i>Physalis peruviana</i> L. departamento de la lima provincia de lima. • Muestra: 150 mg de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L en buen estado • Criterios de inclusión: <ul style="list-style-type: none"> • Hojas sin evidencia de daño • Hojas de color homogéneo • Hojas enteras • Hojas sin distinción de tamaño siempre y cumplan los criterios anteriores. • Criterios de exclusión: <ul style="list-style-type: none"> • Hojas marchitas • Hojas de color pardas o marrones. • Hojas con evidencia de daño • Hojas secas.

ANEXO 02: Recolección de la planta



a) Planta de *Physalis peruviana*. b) hoja de *Physalis peruviana*.

ANEXO 03: Procedimiento aislamiento de organismo endófitos

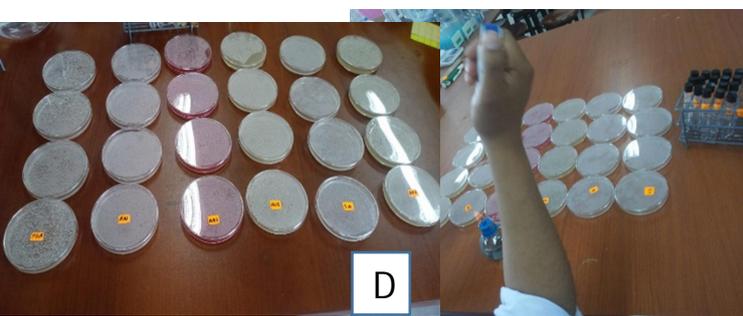


a) Presentación de materiales de trabajo b) desinfección con etanol al 70%.
c) Desinfección hipoclorito de sodio al 3%.

ANEXO 04: Aislamiento de microorganismos



C



D

E

a) Cortes realizados a la hoja. b) muestra vegetal triturada en un mortero.
c) toma de alícuotas. d) medios de cultivo. e) cultivo de alícuotas de muestra vegetal.