

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



TITULO

“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”

TESIS

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO FORESTAL Y DEL MEDIO AMBIENTE**

Bach. LUIS XAVIER LLACSA SÁNCHEZ

TUMBES – PERU

ABRIL – 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



TITULO

“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”

APROBADO EN CONTENIDO Y ESTILO POR:

Ing. Luis Bermejo Requena.
Presidente

Blgo. Jorge Echevarría Flores
Secretario

Ing. Joel Feijoo Carrillo
Vocal

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



TITULO

“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”

LOS SUSCRITOS DECLARAMOS QUE EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS ES ORIGINAL
EN SU CONTENIDO Y FORMA:

Br. Llacsá Sánchez Luis X.
Responsable

Blgo. Solís Castro, Rosa Liliana
Asesora

Ing. Beder Esmith Ramírez Segura
Co-Asesor

DEDICATORIA

A la fuerza superior que conspira para que cada ser alcance sus metas cuando existe dedicación, permitiendo conseguirlo todo a pesar de que el tiempo pase.

1 497.2, 4.9 8.141,5 53,51,5.7. 94,5 3,7.47. 4.5
3.7. 41 8, 3,7.47. 4.5 3.7. 8.51,4.93,5 , 4.5
8135 3.3.5711, 3.51.7.2, 45 2,4, 4.15.7.
73.7.1,97.2,1 1,53927. 3.7.1, 4.18,7.1,52,
47.5.52, 8, 73.7.1,911, , 71,13911, 8.141,5

A mis padres María Sánchez y Gabriel Llacsá, mis hermanas y familiares, por alentarme a luchar por mis sueños y continuar en esta lucha continua de vivir, de existir de manera correcta.

A aquellas personas que creyeron y que siguen creyendo en mí.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial al equipo de investigación de la empresa Incabiotec, Eric Mialhe, Virna Cedeño, Krizia Pretell, Ritchi Vásquez, Beder Ramírez, Paula Pinto, Marielena, por su apoyo y orientación durante la ejecución de esta investigación.

A la Blgo Liliana Solís Castro, por su apoyo incondicional y asesoramiento en el desempeño de la investigación, por su paciencia y esmero para enseñarme, por su amistad y confianza para compartir sus conocimientos.

Al personal de la Policía Nacional residentes del puesto de El Caucho, por su colaboración en mis continuos viajes de muestreo.

A mis Amigos Rodrigo Silva, José Moscol y Fiorella Ramírez, que de alguna u otra forma estaban dispuestos a ayudarme para continuar esta investigación.

RESUMEN

Las plantas en todos los ecosistemas naturales, parecen estar asociados con microorganismos benéficos como bacterias y hongos endófitos, los cuales son encontrados en el interior de plantas hospederas sin producir ningún síntoma de enfermedad evidente. En el presente estudio se realizó el aislamiento e identificación mediante técnicas de caracterización molecular de bacterias y hongos endófitos asociados a las raíces de *Centrolobium ochroxylum* y *Loxopterygium huasango*. Las muestras fueron obtenidas a partir de raíces y suelo rizosférico, fueron sembradas y aisladas en medio de cultivo generales y específicos, el ADN genómico fue extraído de cada cultivo puro y se realizó un análisis de la secuencia 16S rRNA para bacterias y de la región ITS para hongos utilizando primer universales para cada secuencia. Mediante el análisis de caracterización molecular se identificaron 11 cepas fúngicas asociadas a *Loxopterygium huasango*, 4 cepas bacterianas y 4 fúngicas asociadas a *Centrolobium ochroxylum*. Los microorganismos identificados en su mayoría no constituyen el objetivo de la investigación, a excepción de *Rhizobium tropici*, que es una bacteria fijadora de nitrógeno y formadora de nódulos asociado a leguminosas, los otros microorganismos identificados son conocidos como endófitos, los cuales para algunos cultivos pueden ser plagas perjudiciales, inclusive pueden significar un riesgo para la salud humana y animal; pero que sin embargo para los árboles del bosque, constituyen aliados importantes para sobrevivir. Con este método solo se ha identificado parte de los microorganismos cultivables asociados a las especies forestales en estudio.

Palabras clave: endófitos, fijadoras de nitrógeno, micorriza, *Centrolobium*, *Loxopterygium*.

ABSTRACT

The plants in all natural ecosystems seem to be associated with beneficial microorganisms such as bacteria and endophytic fungi, which are found inside the host plants without producing any obvious disease symptoms. In the present study the isolation and identification by means of molecular characterization techniques of bacteria and endophytic fungi associated to the roots of *Centrolobium ochroxylum* and *Loxopterygium huasango* were carried out. Samples were obtained from roots and rhizospheric soil, were seeded and isolated in general and specific culture media, genomic DNA was extracted from each pure culture and a 16S rRNA sequence analysis was performed for bacteria and from the ITS region For fungi using universal primers for each sequence. Molecular characterization analysis identified 11 fungal strains associated with *Loxopterygium huasango*, 4 bacterial and 4 fungal strains associated with *Centrolobium ochroxylum*. Most of the microorganisms identified are not the objective of the research, with the exception of *Rhizobium tropici*, a nitrogen-fixing and nodule-forming bacterium associated with legumes, The other identified microorganisms are known as endophytes, which for some crops may be harmful pests, may even pose a risk to human and animal health; But nevertheless for the trees of the forest, they are important allies to survive. With this method only part of the cultivable microorganisms associated with the forest species under study has been identified.

Keywords: *Endophytes, nitrogen fixing bacteria, mycorrhizae, Centrolobium, Loxopterygium.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	XII
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	15
CAPITULO II: ANTECEDENTES	21
CAPITULO III: MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Recolección de Muestras:	23
2. Tinción de raíces para su observación:	23
3. Procesamiento y aislamiento en medio de cultivo de bacterias y hongos de las raíces:	24
4. Aislamiento primario y secundario de muestras de suelo:	25
5. Extracción de ADN:	26
6. Amplificación:	27
7. Electroforesis y Secuenciación:	30
8. Procesamiento de la Información y Análisis de Datos:	30
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 RESULTADOS	31
4.1.1 Obtención de muestras	31
4.1.2 Morfología Macroscópica	31
4.1.3 Morfología Microscópica	32
4.1.4 Caracterización Genotípica	34
4.2 DISCUSIÓN	40
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	56
GLOSARIO DE TÉRMINOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 01: <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	32
Fig. 02: <i>Serratia marcescens</i>	32
Fig. 03: <i>Rhizobium tropici</i>	32
Fig. 04: <i>Aspergillus tubingensis</i>	33
Fig. 05: <i>Trichoderma erinaceum</i>	33
Fig. 06: <i>Rhizopus orizae</i>	33
Fig. 07: <i>Penicillium verruculosum</i>	33
Fig. 08: Resultado de la migración de ADN de hongos aislados de la rizósfera de las especies arbóreas estudiadas	34
Fig. 09: Resultado de la Migración del Producto amplificado de ADN extraído de hongos	34
Fig. 10: migración de amplicones de ADN extraído de bacterias aisladas de los nódulos de <i>Centrolobium ochroxylum</i>	35
Fig. 11: Migración de amplicones con marcador de peso molecular de 1000 pares de bases	35
Fig. 12: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para la región ITS de hongos endófitos aislados de <i>Loxopterygium huasango</i> .	38
Fig. 13: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para la región ITS para hongos aislados de <i>Centrolobium ochroxylum</i> .	39
Fig. 14: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas del gen ribosómico 16S para bacterias aislados de <i>Centrolobium ochroxylum</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Composición del Kit PCR para amplificación de hongos	28
Tabla 02: secuencias de iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS	28
Tabla 03: Programación del termociclador para la región ITS	28
Tabla 04: Composición del Kit PCR para extracción de bacterias	29
Tabla 05: Iniciadores empleados para la amplificación del gen 16S ADNr	29
Tabla 06: Programación del termociclador para bacterias gen 16S RNA	29
Tabla 07: Coordenadas UTM de los árboles de <i>Loxopterygium huasango</i> muestreados	31
Tabla 08: Coordenadas UTM de los árboles de <i>Centrolobium ochroxylum</i> muestreados	31
Tabla 09: Identificación de las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>Loxopterygium</i> mediante alineamiento en BLAST	36
Tabla 10: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de <i>Centrolobium</i> mediante alineamiento en BLAST	37
Tabla 11: Identificación de las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>Centrolobium</i> mediante alineamiento en BLAST	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 01: Medio de cultivo ELMARC (Extracto de levadura Manitol Agar Rojo Congo)	56
ANEXO 02: Rojo Congo	56
ANEXO 03: Secuencias nucleotídicas de las 11 cepas seleccionadas de Loxopterygium huasango	57
ANEXO 04: Secuencias nucleotídicas de las cepas fúngicas seleccionadas de Centrolobium ochroxylum	60
ANEXO 05: Secuencias nucleotídicas de las cepas bacterianas seleccionadas de Centrolobium ochroxylum	61
ANEXO 06: Galería de fotos	63

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza los tipos de asociaciones entre organismos son variables, siendo globalmente consideradas como simbióticas y distinguiendo el comensalismo, la amensalismo, el parasitismo y el mutualismo. Las asociaciones simbióticas de tipo mutualismo, es decir benéficas para los dos organismos asociados, son numerosas en todos los ecosistemas, en particular los ecosistemas forestales. Los microorganismos mutualistas contribuyen con una multitud de procesos fisiológicos influenciando en particular la biodisponibilidad de nutrientes. Estas asociaciones mutualistas, obligatorias o facultativas, corresponden a interacciones más o menos estrechas, siendo algunos microorganismos endófitos capaces de colonizar los tejidos de la planta huésped. Los microorganismos endófitos son esencialmente bacterias y hongos que realizan todo o parte de su ciclo de vida dentro de una planta. Tales asociaciones han sido primordiales en el proceso de colonización del medio terrestre por las plantas. Existen restos fósiles que muestran la presencia de asociación, entre hongos y plantas vasculares más evolucionadas (García *et al.*, 2002).

Endofismo o endosimbiosis es una asociación mediante la cual un organismo habita el interior de otro, permitiendo a los organismos disfrutar de la capacidad de realizar procesos conferidos por su organismo asociado. Existen bacterias endosimbiontes de la familia Rhizobiaceae, que infectan las raíces de las plantas e inducen la modificación de pelos radiculares, formando nódulos en los cuales se alojan y realizan la fijación de nitrógeno, haciéndolo disponible para la planta hospedera en la familia de las leguminosas. Asimismo encontramos otros géneros bacterianos que infectan los tejidos de poaceas ayudándole a asimilar nutrientes. Existen hongos endosimbiontes que penetran los tejidos de las raíces llegando hasta el interior de las células en muchos casos, conocidos como micorrizas, asimismo existen otros tipos de hongos endófitos que además de las raíces, penetran también hojas, tallos y otros órganos de la planta.

Las micorrizas son endosimbiontes que forman un componente clave en la microbiota del suelo, influenciando el crecimiento de las plantas y la toma de nutrientes. En las micorrizas, el hongo coloniza las raíces de la planta huésped, la colonización es realizada de forma intracelular como en las micorrizas de tipo arbuscular, o extracelular como en las ectomicorrizas. (Gianinazzi-Pearson, 1996)

las micorrizas arbusculares son un grupo pequeño pertenecientes a las división glomeromycota, comprendidos en 7 géneros y 160 especies que viven en simbiosis obligada con las raíces de alrededor del 80% plantas de la tierra y están presentes en la mayoría de ecosistemas naturales y agrícolas, son muy importantes para la salud de la planta, reciclaje de nutrientes y conservación de la estructura del suelo. Se caracterizan por la formación de arbusculos, los cuales son sitios de intercambio de fósforo, carbón, agua y otros nutrientes. Existen dos tipos de arbusculos, de tipo Paris caracterizado por el crecimiento de las hifas de una célula a otra y tipo Arum que se caracteriza por el crecimiento de hifas en el espacio entre las células (Brundrett, 2002)

Las ectomicorrizas son asociaciones entre hongos simbiosites de los filum basidiomycota y Ascomycota con alrededor del 2% de especies vegetales, se caracterizan porque no penetran en las paredes celulares del hospedero, por el contrario forma una interfaz totalmente inter celular. Las hifas forman una malla altamente ramificada entre la epidermis y las células corticales conocida como red de Harting. Las ectomicorrizas se diferencian de otras micorrizas por la formación de una vaina de hifas densa conocida como manto que rodea la superficie de la raíz (Totorá *et al.*, 2007) (Brundrett, 2002)

Un endofito es un endosimbionte, que podría ser una bacteria o un hongo. Los hongos endofitos son hongos que viven dentro de los tejidos de plantas sin causar señales inmediatas de enfermedades, son abundantes y diversos, productores de metabolitos secundarios bioactivos, algunos proporcionan tolerancia a la sequía, protección contra patógenos, aumento del crecimiento, etc. (Higginbotham *et al.*, 2013)

Al igual que los hongos, las bacterias endófitas viven dentro de los tejidos de plantas sin causar daño aparente. Las bacterias endófitas han sido aisladas de plantas esterilizadas superficialmente y tejidos internos, pueden ser gram negativos como gram positivos. Varias especies de bacterias diferentes han sido aisladas de una misma planta, las bacterias endófitas ingresan a la planta por la zona de la raíz, sin embargo también podrían ingresar por partes aéreas, como hojas, flores, tallos y cotiledones entre otras partes; estos microorganismos pueden residir dentro de las células, en los espacios intercelulares o en el sistema vascular. (Zinniel *et al.*, 2002)

Hay múltiples plantas tomados como modelos de árboles forestales, para el estudio de la biología de las plantas, *Populus* es uno de los géneros más estudiados, es originario del hemisferio norte y exhibe uno de los rangos de crecimientos más rápidos observados en árboles de climas templados, el tamaño de su genoma relativamente es corto (450-550 Mbp), además de su valor comercial; conjuntamente con otros géneros como *Pinus* y *Eucalyptus* forman parte de los modelos biológicos en los que se desarrollan nuevas aplicaciones de ingeniería (Taylor, 2002).

En las décadas pasadas, los estudios de genómica de árboles tropicales estaba limitada a los sistemas agrícolas, ahora con las nuevas tecnologías se han abierto las puertas al desarrollo de genómica de árboles forestales, estudios de diversidad genética, taxonomía molecular de árboles nativos, entre otros. Es así que se han obtenido plántulas libres de microorganismos en laboratorio a las cuales se ha inoculado bacterias endófitas y hongos micorrizicos en diversas especies arbóreas del género *Pinus*, también la inoculación con rizobios y micorrizas en *Centrolobium tomentosum* inoculado en condiciones de campo para mejorar los sistemas agroforestales (Marques, Pagano y Scotti, 2001)

En el presente trabajo de tesis el objetivo fue identificar bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrizicos asociados a la rizósfera de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engler. “hualtaco” y *Centrolobium ochroxylum* Rose ex Rudd. “amarillo”.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

3.1 Descripción de las especies arbóreas en estudio:

Loxopterygium huasango Spruce ex Engler. (Anacardiaceae), es una especie arbórea de los bosques tropicales estacionalmente seco (SDTF), crecen en grupos en gran parte en zonas con poca vegetación de la Costa suroeste del Ecuador y noroeste del Perú (Anurag, 1996). En el Perú se le encuentra en Cajamarca, Lambayeque, Piura y Tumbes (INRENA, 2002).

Es un árbol de hasta 25 m de altura y de 80 cm de diámetro, con tronco de color oscuro casi negro y de su corteza se desprenden placas rectangulares. Presenta hojas imparipinnadas y caducas, la mayoría de las hojas se caen temprano en la temporada seca. Presenta inflorescencia en panículas axilares, flores muy pequeñas de color blanco. Frutos sámara de color café. Presenta raíces leñosas fuertes de aproximadamente más de 8 metros de profundidad, presenta asociaciones simbióticas con hongos a las cuales se conoce como micorrizas. (INRENA, 2002).

La destrucción de las poblaciones de *Loxopterygium huasango* se debe a la explotación por su madera duradera y resistente al contacto con el suelo, para pilares de casas, pavimento de parquet, leña (FAO, 1987), junto con la expansión de los laboratorios de camarón costero y granjas (Anurag, 1996.).

Centrolobium ochroxylum Rose ex Rudd. (Fabaceae), es un árbol que se encuentra en el Bosque Tropical Estacionalmente Seco (SDTF), Se le encuentra en Ecuador, al oeste de los Andes y la zona adyacente de Tumbes en el Perú (Pirie *et al.*, 2009), también se ha reportado en Bolivia (INRENA, 2002).

La especie arbórea mide hasta 30 metros de altura; el diámetro de fuste es de 15–60 cm; la corteza es de color marrón claro con manchas grises, lisa o ligeramente fisurada vertical y longitudinal; presenta hojas imparipinnadas con estípulas, ovadas o elípticas, ambas superficies cubiertas con densos tricomas, en el envés con glándulas peltadas; las flores pueden ser de color amarilla, naranja con venación oscura; el fruto es de tipo sámara, la cámara de semillas con espinas, ala cartácea, espina estilar fusionada a la ala; las semillas son oblongas, con testa delgada, de color verde. Se cultiva como un árbol de cobertura y como sombra de café. Las raíces presentan un predominio del sistema primario, es decir, de aquél que

proviene de la radícula del embrión. Sus raíces son leñosas, profundas y exhiben nódulos poblados de bacterias que asimilan el nitrógeno atmosférico.

Su madera de muy buena calidad es usada en la construcción de casas, barcos y muebles. El fruto sirve de alimento para las aves y ardillas (Pirie, *et al.*, 2009; INRENA, 2002).

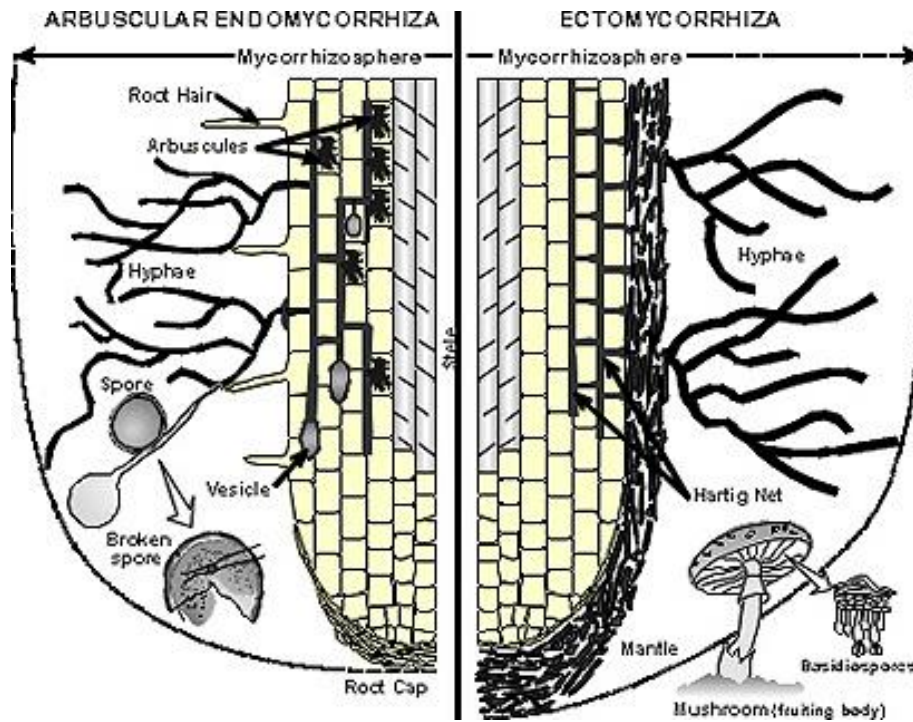
3.2 Micorrizas

Las micorrizas son una simbiosis mutualista de carácter biotrófico en la que el huésped autótrofo, la planta, proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al simbionte heterótrofo, el hongo, así como un microhábitat protegido. A cambio el hongo proporciona nutrientes minerales, principalmente fósforo y agua mediante un sistema ramificado de hifas extrarradicales capaz de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de la raíz. (Sánchez, 2009).

Hay dos tipos básicos de asociaciones micorrícicas: ectomicorrizas y endomicorrizas. En las ectomicorrizas, el hongo (un ascomiceto o un basidiomiceto) forma una vaina externa pseudoparenquimatosa y que constituye más del 40 % del peso seco de la estructura combinada hongo-raíz. Las hifas fúngicas penetran a través de los espacios intercelulares de la epidermis y de la región cortical de la raíz sin invadir las células vivas. La morfología de la raíz se altera, se forman grupos de raíces cortas que se ramifican dicotómicamente y tienen las regiones meristemáticas reducidas (Atlas & Bartha, 2002).

Las endomicorrizas invaden las células vivas de la raíz, que se llenan de grupos de micelios. Dentro de la variedad de microorganismos que colonizan la rizosfera, los hongos micorrícicos ocupan una posición ecológica muy especial, pues son los únicos que están parcialmente dentro y parcialmente fuera del hospedador. La parte del hongo del interior de la raíz no compite con otros microorganismos del suelo. Una forma generalizada de endomicorrizas son las denominadas vesículo-arbusculares (VA), en las que las hifas fúngicas forman racimos intracelulares (Atlas & Bartha, 2002). Los hongos de la clases Zygomycetes, orden Glomales y Endogonales se asocian a este tipo de micorriza, se reporta que más del 90% de las especies existentes en el planeta están micorrizadas cuando crecen en condiciones naturales (Molina *et al.*, 2005)

Las ecto-endomicorrizas generalmente presentan las características de ectomicorrizas, con la diferencia que hay penetración intracelular. Algunos autores las localizan como endomicorrizas, mientras que otros, basándose en la cercanía filogenética de los hongos asociados con los Asco y Basidiomycotina, las ubican como ectomicorrizas. Estas se encuentran en algunos subgrupos de Pinaceae y de Ericales, como los géneros *Arbutus*, (Molina *et al.*, 2005)



Diferencia fenotípica entre una ectomicorriza y una endomicorriza arbuscular
Tomado de herbmuseum, <http://www.herbmuseum.ca/content/mycorrhizal-fungi>.

3.3 Microorganismos Endófitos

El término endófito hace referencia a hongos como bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida invaden tejidos vegetales vivos y causan infecciones asintomáticas completamente dentro del tejido vegetal. Dado que algunas asociaciones micorrícicas deforman la raíz, permitiendo detectar los síntomas de su infección, ellas quedan excluidas en esta definición. Es claro entonces que los organismos endófitos no son solamente hongos ya que también existen bacterias endófitas (Gamboa, 2005)

La interacción planta-endófito se identifica por su carácter asintomático; la planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección. Por su parte, aunque se desconoce con certeza el mecanismo de acción, se ha reportado ampliamente que los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas de tipo abiótico entre las que se pueden mencionar, mayor tolerancia a la sequía y al estrés oxidativo. Tolerancia a suelos ácidos con altos contenidos de Zn y Al, y tolerancia al estrés salino, entre otras. De igual manera la interacción puede reducir el impacto negativo causado por factores bióticos como insectos herbívoros y ácaros. (Abello y Kelemu, 2006)

3.4 Fijación biológica de nitrógeno

Rodríguez *et al* (1984) mencionan que las simbiosis con *Rhizobium*, se establece como resultado de la expresión de -unas características propias del microbio, de la planta hospedadora, y de la asociación de ambos, Entre las propiedades de las simbiosis destacan:

a) Especificidad, o propiedad por la que el microbio infecta selectivamente a la planta hospedadora. La magnitud de la misma varía de unas simbiosis a otras, y así, por ejemplo, ciertas leguminosas tienen requerimientos muy concretos para “su rizobio”, mientras que otras aceptan un espectro más amplio, y, viceversa, un determinado rizobio puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de especies, o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias. Esta especificidad, que también se da en plantas actinorrícicas, aquellas que forman simbiosis con actinomicetos, han llevado a definir varios grupos de *Rhizobium* y *Frankia*.

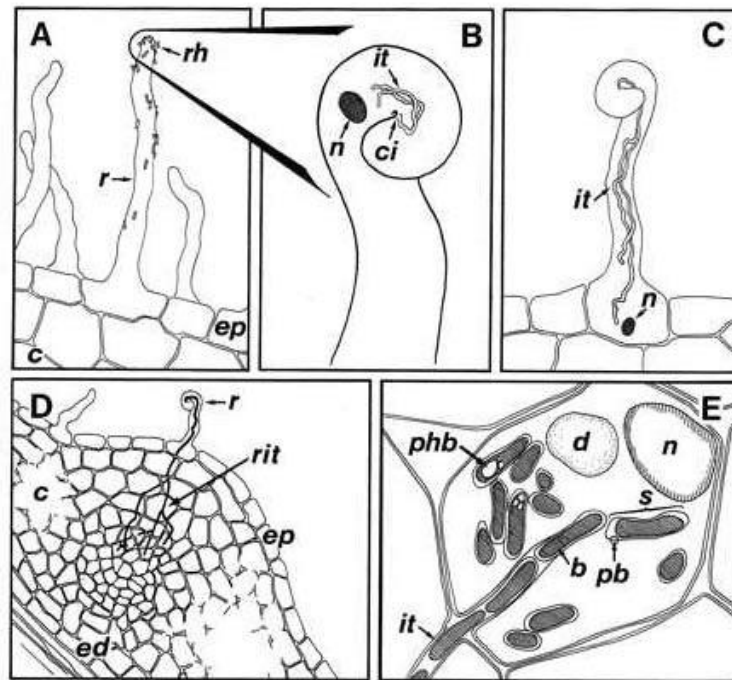
b) Infectividad, o capacidad del microbio para invadir la planta hospedadora.

c) Efectividad, o capacidad para que el nódulo se lleve a cabo la secuencia de un proceso que conduzca a la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco.

Hay una gran variedad entre las razas de un microbio infectivo, que va desde totalmente infectivas, a otras altamente infectivas.

El microbio efectúa su entrada en la planta, bien por los pelos absorbentes de la raíz, bien sea a través de su epidermis. Posteriormente, se ubica en los nódulos, aislado del ambiente exterior, encerrado en el interior de la planta hospedadora.

Esta localización plantea la necesidad de la existencia de un intercambio metabólico entre los dos simbios, que implica el suministro por la planta de los nutrientes y compuestos carbonados necesarios para el microbio, así como el transporte hacia la planta de los nutrientes y compuestos carbonados necesarios para el microbio, así como el transporte hacia la planta de los productos nitrogenados resultantes de la actividad fijadora del microbio.



Invasión de pelos radicales por *Rhizobium* sp. (A) rizobia (*rh*) coloniza la rizósfera y se adhiere al pelo radical (*r*). (B) “factores Nod” inducen el ensortijamiento del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (*ci*). El núcleo del pelo radical (*n*) precede el crecimiento del hilo de infección (*it*). (C) el hilo de infección alcanza la base del pelo radical (*it*), aun acompañado del núcleo (*n*) (D) el pelo radical (*r*) se ramifica (*rit*) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (*b*) son liberados desde el hilo de infección (*it*) y forman simbiosomas (*s*) donde se acumulan gránulos de polihidroibutarato (*phb*) rodeados por la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaturas: *c*, corteza; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis

Fuente: (Perret, *et al.*, 2000)

3.5 Género *Rhizobium*:

Pertenecen a la familia Rhizobiaceae, se definen como un grupo de especies que poseen 1-6 flagelos peritricos de crecimiento rápido y producción de ácido en medio de Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMARC), e incluye cepas con capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica, trece especies han sido descritas dentro de este género (Sawada *et al.*, 2003). La temperatura óptima de

crecimiento fluctúa entre 25-30°C. El tiempo de generación de las cepas es de 1.5-5 horas. Las colonias son usualmente color blanco o beige, circular, convexas, semitranslúcidas u opacas, y mucilaginosas, usualmente 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días en medio ELMARC. Todas las especies conocidas de *Rhizobium* incluyen cepas que inducen hipertrofismos en plantas como en nódulos de la raíz con o sin fijación simbiótica de nitrógeno. Algunas células de especies de bacterias simbióticas ingresan en las células del pelo radicular de plantas leguminosas a través de la invaginación o por heridas y provocar la producción de nódulos de las raíces en los que las bacterias participan como simbioses intracelulares, por lo general en la fijación de nitrógeno. Muchos de los genes de nodulación (Nod) y de fijación de nitrógeno (Nif) bien definidos se agrupan en grandes plásmidos o megaplásmidos (pSyms). En los nódulos de las raíces de las bacterias ocurren como endófitos presentando formas pleomórficas, denominados “bacteroides” que reducen o fijan el nitrógeno atmosférico gaseoso en una forma combinada utilizable por la planta hospedera. (Garrity, 2005).

3.6 Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención. (Rodríguez *et al.*, 2004)

3.7 Amplificación

Aumento artificial en el número de copias de un fragmento de ADN particular, en millones de copias a través de la replicación del segmento que puede ser, un gen en particular, una región clonada u otros tipos de ácido nucleico. (Miller-Keane 2003)

CAPITULO II: ANTECEDENTES

- ⌘ De Lajudie *et al.*, (1998), utilizó la amplificación del gen 16S rRNA, así como otras técnicas de biología molecular, para la caracterización de cepas de los nódulos de las raíces de especies de Acacia en Senegal con la finalidad de tener una base de datos de las cepas de bacterias que nodulan en las raíces de estas leguminosas.
- ⌘ Jiménez (2007), identificó cepas del género *Azotobacter* muestreando suelos de cultivo y aislando las cepas en medio Ashby-Sacarosa libre de nitrógeno. Los aislamientos fueron clasificados e identificados fenotípicamente y bioquímicamente. Asimismo realizaron identificación molecular mediante el análisis de restricción del DNA 16S amplificado (ARDRA). Se realizó una comparación entre los morfotipos generados en los aislamientos frente a los generados en una restricción virtual con secuencias parciales del gen 16S. Se demostró que las técnicas moleculares junto con las convencionales y la bioinformática son herramientas fundamentales para la caracterización de bacterias diazótroficas importantes.
- ⌘ González (2005), estudió los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la homeostasis de metales pesados en hongos formadores de micorrizas arbusculares de *Glomus intraradices*, identificando y caracterizando los genes que codifican proteínas implicadas en el transporte y quelación de metales pesados, así como aquellos implicados en la protección frente a estrés oxidativo.
- ⌘ Franco (2008), analizó las actividades metabólicas de aislados de actinomicetos y los catalogó como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR (por sus siglas en inglés), y su interacción con hongos formadores de micorrizas, hizo uso de la biología molecular como herramienta para identificar los géneros de hongos como de actinomicetos.
- ⌘ Aquilanti *et al.*, (2004), compararon tres diferentes métodos de aislamiento: a) estriado de diluciones de suelo en placas conteniendo medio Brown libre de nitrógeno, b) enriquecimiento en solución de Winogradsky por 7-14 días seguido por estriado en agar Brown; c) una combinación de la pasta de suelo y la siembra directa de granos individuales de suelo. Observando que el tercer método combinado con aislamiento en agar manitol fue el mejor estrategia en términos de fiabilidad y selectividad. Además el reconocimiento previo de estas bacterias en medio diferencia LG libre de

Nitrógeno resultó ser extremadamente preciso para identificar miembros de la familia Azotobacteraceae, por medio del análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado.

⌘ Parker (2008), estudió la relación simbiótica de leguminosas con bacterias formadoras de nódulos en la Isla de Barro Colorado en Panamá, aisló 129 bacterias pertenecientes a 18 géneros de leguminosas los cuales fueron identificados amplificando el gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se determinaron tres géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* este último género es común entre todas las leguminosas de la zona de estudio y que contaba con ocho linajes, los cuales se distribuyeron entre las plantas hospederas.

⌘ Landeweert *et al.*, (2003) utilizaron técnicas de identificación molecular basado en la extracción total de ADN, y amplificación de la región ITS como única herramienta para la identificación de micelios del suelo, analizando comunidades de hongos ectomicorrízicos que crecen bajo la vegetación de coníferas. En este trabajo demostraron la importancia de las técnicas moleculares en la identificación de hongos ectomicorrízicos, así como difiere del método tradicional de identificar estas comunidades de organismos.

⌘ Sánchez (2009) analizó la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos de Granada-España, en este trabajo se demuestra la importancia de las técnicas moleculares en la identificación de hongos como los micorrízicos arbusculares, en los cuales el principal inconveniente en la identificación tradicional es la estacionabilidad del proceso de esporulación y la dificultad para la identificación mediante criterios morfológicos.

CAPITULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolección de Muestras:

La selección se realizó de acuerdo a la técnica empleada por Bautista *et al.*, (2004). Se eligieron árboles adultos, los cuales presentaron fuste robusto buen follaje y buena producción de frutos.

Se seleccionaron seis árboles de *Centrolobium ochroxylum* ubicados en la zona de amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape cercano al sector el Caucho. Se cavó aproximadamente 30 cm en el suelo hasta ubicar los nódulos tratando de causar el menor estrés a la planta, los nódulos se colocaron con una porción de tierra en tubos Falcon que contenían cloruro de calcio con tapón de algodón, luego se cerraron y colocaron en fundas plásticas negras lejos de la luz solar. Asimismo se seleccionaron cinco árboles de *Loxopterygium huasango* ubicados en la rivera de la quebrada angostura en el sector de mismo nombre, para ambos muestreos se tomó aproximadamente 100 g de suelo rizosférico y una porción de raíces de 0.5 cm de diámetro. Las muestras se colocaron en fundas plásticas cerradas, manteniéndose lejos de la luz del sol para evitar pérdida humedad y mantenerlas a temperatura ambiente 28 °C aproximadamente. Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Tumbes para ser procesadas

2. Tinción de raíces para su observación:

Para observar la infección de las raíces por los hongos, se empleó el método descrito por Serralde *et al.*, (2004) que requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos para ser evaluadas en microscopio óptico. Para la tinción de raíces se realizó el siguiente procedimiento:

Las raíces fueron lavadas con agua de caño, luego se colocaron en tubos de ensayo donde se les adicionó KOH al 10% cubriendo totalmente las raíces. Posteriormente, los tubos se depositaron por 15 minutos en baño María, a una temperatura de 90°C. Luego se descartó el sobrenadante manteniendo las raíces. Los trozos de raíces fueron lavados con agua, y luego fueron sumergidos en una solución de KOH + H₂O₂ al 10% por un periodo de 10 minutos. Se realizó nuevamente otro lavado con agua y los trozos de raíz

fueron colocados en una caja petri para ser acidificados con una solución de HCl (Se preparó una solución de 10% de HCl con H₂O₂) por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, y se adicionó azul de tripán para la tinción de los trozos de raíz, dejándolos reposar por 5 minutos, posteriormente se lavo con H₂O₂. Los trozos de raíz procesados fueron colocados en láminas portaobjeto. Se adicionó una gota de glicerina, y se observó en el microscopio.

3. Procesamiento y aislamiento en medio de cultivo de bacterias y hongos de las raíces:

Esterilización de nódulos

Las raíces recolectadas fueron lavadas, y se cortaron los nódulos dejando una porción de raíz adherido al punto de inserción del nódulo. Se procedió a esterilizarlos según la metodología de Ferrera (1993): Los nódulos fueron sumergirlos en alcohol al 96% por 10 segundos, luego lavados por 10 segundos en agua desionizada o destilada haciendo esta operación dos veces, y luego se colocaron en hipoclorito de sodio durante uno a tres minutos, según sea el tamaño de los nódulos. Por último se efectuó el enjuague de los nódulos (cinco o seis enjuagues) con agua destilada estéril. Los nódulos desinfectados se cortaron para luego proceder al macerado de los mismos.

Esterilización de trozos de raíz

Se cortaron trozos de raíz de 1 cm de largo y se les practicó el procedimiento de desinfección descrito por Ferrera (1993) detallado en la esterilización de los nódulos. Luego se colocaron en placas Petri conteniendo medio de cultivo para promover el crecimiento de microorganismos de interés.

Aislamiento de bacterias a partir de los nódulos y raíces

Los nódulos macerados y el producto obtenido se sembraron en medio de cultivo ELMARC mediante el método de siembra por estria realizado como lo propone Cuadrado *et al.*, (2009). Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 10 días con observaciones diarias, y se replicaron las colonias en nuevas placas con el mismo medio de cultivo ELMARC, hasta obtener un cultivo puro y libres de impurezas.

Aislamiento de hongos a partir de raíces

Los trozos de raíz de cada muestra, previamente desinfectados, se cortaron de forma longitudinal y se colocaron en placas conteniendo medio de cultivo agar de dextrosa de papa (PDA, con 100 ug/mL de cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias), la parte interna de la raíz se colocó en contacto con la superficie del medio de cultivo. Las placas se incubaron a 30°C, y se observó el crecimiento de hifas alrededor de los trozos de raíz, se realizaron aislamientos sucesivos hasta obtener un cultivo puro.

4. Aislamiento primario y secundario de muestras de suelo:

Aislamiento de bacterias de muestras de suelo

A partir de las muestra de suelo obtenidas de la rizósfera de *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum* se realizó el aislamiento primario de bacterias empleando la técnica de gránulos de suelo, que consiste en colocar gránulos en placas Petri con medio de cultivo ELMARC, a una distancia aproximada de 1 cm (Jiménez, 2007, Aquilanti et al., 2004). Las placas Petri fueron incubadas a 28°C hasta observar alrededor de los gránulos colonias translúcidas y mucilaginosas. El aislamiento secundario de las bacterias se realizó mediante siembra por estría en placas Petri conteniendo medio de cultivo ELMARC. Las placas fueron incubadas a 28°C, la pureza de los aislamientos se verificó con pruebas de gram.

Aislamiento de hongos de muestras de suelo

De las muestra de suelo rizosférico de *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum* se realizó el aislamiento primario empleando la técnica de gránulos ya descrita. Se empleó medio PDA (con 100 ug/mL de cloranfenicol), las placas Petri se incubaron a 30°C, y se observó el crecimiento de hifas alrededor de los gránulos de suelo. El aislamiento secundario se realizó extrayendo una porción de hifas de la placa madre, colocándolo luego en nuevas placas con medio PDA hasta obtener cultivos puros.

5. Extracción de ADN:

Para Hongos:

Se realizó de acuerdo al protocolo de extracción de ADN hongos de IncaBiotec S.A.C. el procedimiento es el siguiente:

- Se depositó aproximadamente 1 cm² de micelio de siete días en eppendorf de 1.5 mL, se maceró el micelio con varilla metálica y se le agregó 500 uL de buffer de lisis de hongos (200 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 25 mM de EDTA, pH 8.0; 250 mM de NaCl; 1% de SDS; 1% de β-Mercaptoetanol; 2% de CTAB. se agregó por separado el SDS y el β-Mercaptoetanol pues la solución se hace inestable).
- Se vortexeó suavemente sin que el reactivo tope la tapa del tubo. Se añadió 2.5 uL de Proteína K (0.1 mg/ml) a cada muestra e incubó en baño María a 65°C por una hora.
- Se añadió 700 uL de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando suavemente y se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos.
- El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y fue tratado con un volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante en un nuevo tubo y se le agregó 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M (pH 5.2) y 500 uL de Isopropanol helado y se dejó incubó 1 hora o toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con 400 uL de Etanol al 75% y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Los tubos con muestras de ADN se dejaron secar a temperatura ambiente 15 minutos y se resuspendió en 50 uL de TE (10 mM de Tris-HCl ; 1mM de EDTA, pH 8) previamente calentado a 60°C y posteriormente conservar a -20°C.

Para Bacterias:

Para extraer ADN de las bacterias de los nódulos así como de la rizósfera del suelo se empleó el protocolo de extracción de ADN bacteriano propuesto por la empresa IncaBiotec SAC. el protocolo es como sigue.

- Se centrifugó 1,5mL de cultivo durante 40 segundos. A 13 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 567 uL de TE, 30uL de SDS 10% y 3 uL de proteinasa K (20mg/ml), se homogenizó e incubó 1 hora a 37°C.
- Se añadió 100 uL de NaCl 5M y mezcló completamente. Luego se adicionó 80 uL de CTAB/NaCl (CTAB 10%/0,7M NaCl) previamente calentado a 65°C, se homogenizó el contenido por inversión de los tubos eppendorf y se incubó 10 minutos a 65°C.
- Se añadió un volumen igual de cloroformo/Isoamil alcohol (24:1), se mezcló 2 minutos para formar una emulsión (los tubos fueron invertidos varias veces, apretando fuertemente la tapa), se centrifugó 5 minutos a 12 000 rpm. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo teniendo cuidado de no aspirar contaminantes de la interface.
- Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1), se mezcló 2 minutos para formar una emulsión y se centrifugó 5 minutos a 12 000 rpm. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo tener cuidado de no aspirar contaminantes de la interface.
- Se Añadió 0.6 volumen de isopropanol y se mezcló suavemente, luego se dejó incubar 1 hora a -20°C.El ADN se recupera mediante centrifugación a 12 000 rpm por 5 minutos, se eliminó el isopropanol y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%.
- Se centrifugó 5 minutos a 12 000 rpm, se eliminó el etanol y los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- El ADN se resuspendió en 30 uL de TE y se guardó a -20°C.
- Finalmente el ADN se trató con 1 uL de solución de ARNasa a 10 mg/ml, y se incubó una hora a 37°C o 15 minutos.

6. Amplificación:

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se generaron copias (amplificación) del gen Ribosomal 16S para el caso de bacterias fijadoras de nitrógeno, haciendo uso de iniciadores 27-F y 1492-R. Para hongos se amplificó la región ITS (Espacio Transcrito Interno) empleando los iniciadores universales ITS-1 e ITS-4. Para ambos procesos se empleó los kits de amplificación de la empresa IncaBiotec S.A.C.

Tabla 01: Composición del Kit PCR para amplificación de hongos

Reactivo	Concentración	Cantidad uL
Taq Buffer	10X	2.5
Taq Polimerasa	5U/uL	0.1
DNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)	40 mM C/dNTP	0.5
MgCl	50 mM	0.75
Iniciador ITS-1	15 pMoles	0.6
Iniciador ITS-4	15 pMoles	0.6
Agua Ultra Pura		18.95
ADN		1
TOTAL		25

Tabla 02: secuencias de iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS

Iniciador	Sentido	Secuencia
ITS-1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS-4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tabla 03: Programación del termociclador para la región ITS

	Temperatura	Tiempo
35 ciclos de amplificación	94°C	5 minutos
	94°C	30 segundos
	54°C	45 segundos
	72°C	45 segundos
	72°C	4 minutos

Tabla 04: Composición del Kit PCR para extracción de bacterias

Reactivo	Concentración	Cantidad uL
Taq Buffer	10X	2.5
Taq Polimerasa	5U/uL	0.1
DNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)	40 mM C/dNTP	0.5
MgCl	50 mM	0.75
Iniciador 27-F	15 pMoles	0.6
Iniciador 1492-R	15 pMoles	0.6
Agua Ultra Pura		17.95
ADN		2
TOTAL		25

Tabla 05: Iniciadores empleados para la amplificación del gen 16S ADNr

Iniciador	Sentido	Secuencia
27F	Forward	AGAGT ^M T ^Y TAGTCMTGGCTCAG
1492R	Reverse	GGYTACCT ^T GT ^T TACGACT ^T

M: Adenina o citosina

Y: Timina o citosina

Tabla 06: Programación del termociclador para bacterias gen 16S RNA

	Temperatura	Tiempo
35 ciclos de amplificación	94°C	4 minutos
	94°C	30 segundos
	58°C	45 segundos
	72°C	1 minuto
	72°C	4 minutos

7. Electroforesis y Secuenciación:

Los resultados obtenidos de la amplificación se observaron en un gel de 1.5% de agarosa con TAE 1X y 3 μ L de bromuro de Etidio para 60 mL de gel preparado, para su migración se tomó 10 μ L de amplicón y 2 μ L de tampón de depósito y se colocó en la cámara de electroforesis, posteriormente se visualizó en transiluminador UV, con la finalidad de observar si existe un producto amplificado.

La secuenciación fue realizada según algunas especificaciones de la empresa secuenciadora, se utilizó 20 μ L de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, se colocaron en tubos Eppendorf de 0,5 ml junto con los iniciadores forward 518-F y reverse 800-R y empacadas en hielo seco para ser enviadas a la empresa MacroGen en la ciudad de New York, Estados Unidos; para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

8. Procesamiento de la Información y Análisis de Datos:

Las secuencias obtenidas se alinearon en el software de alineamiento de secuencias manuales y automáticas mega 5(<http://www.megasoftware.net/>) el análisis en línea se realizó mediante el software libre: herramienta de búsqueda y alineamiento local básico (BLAST; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para verificar el grado de similitud entre las secuencias obtenidas con secuencias existentes en el banco de genes (GenBank).

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Obtención de muestras

Las muestras extraídas en la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape en los sectores de Angostura a lo largo de la quebrada del mismo nombre para el caso de *Loxopterygium huasango* en el mes de mayo de 2013 y en el sector El Caucho para *Centrolobium ochroxylum* en el mes de junio de 2013, Las coordenadas de las zonas de muestreo se observa en las tablas 07 y 08.

Tabla 07: Coordenadas UTM de los árboles de *Loxopterygium huasango* muestreados

Código	Este	Norte	Altura msnm
AH-01	565537	9586649	119
AH-02	566864	9584868	73
AH-03	565640	9586120	62
AH-13	565830	9585608	59
AH-14	565830	9585569	76

Tabla 08: Coordenadas UTM de los árboles de *Centrolobium ochroxylum* muestreados

Código	Este	Norte	Altura msnm
AMC-01	581288	9578156	425
AMC-02	581316	9578241	457
AMC-03	581298	9578253	482
AMC-04	581290	9578254	466
AMC-05	581294	9578266	473
AMC-06	581297	9578268	474

4.1.2 Morfología Macroscópica

Todas las cepas bacterianas crecieron sobre medio ELMARC y presentaron buen crecimiento, consistencia mucilaginoso, coloración crema a blanquecina, algunas emitían un hedor fuerte.

Las cepas fúngicas crecidas sobre medio PDA presentaron diferentes características, velocidad de crecimiento, textura, formación de esporas, colores de las esporas, en algunas no se observó esporulación o degradación

del medio de cultivo, según las características propias de cada genero identificado.

4.1.3 Morfología Microscópica

Tinción Gram

El método de tinción nos permite apreciar la morfología celular de cada cepa bacteriana, Según los resultados del procedimiento de tinción todas las cepas bacterianas presentaron coloración rosada (Gram negativas) y azul violácea (Gram positivas). Las bacterias Gram positivas presentaron forma de coco (*Staphylococcus haemolyticus*, *S. saprophyticus*), las gram negativas fueron bacilos cortos (*Serratia marcescens*) y bacilos (*Rhizobium tropici*). Ningún aislado presento formación de esporas.

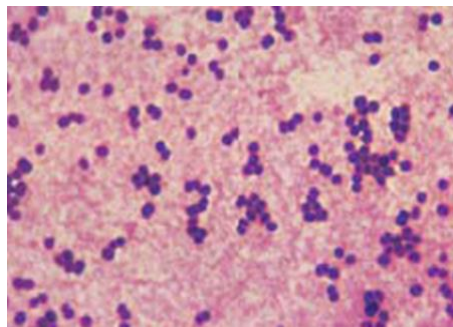


Fig. 01: *Staphylococcus haemolyticus*

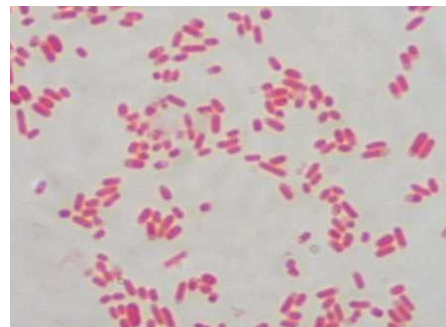


Fig. 02: *Serratia marcescens*

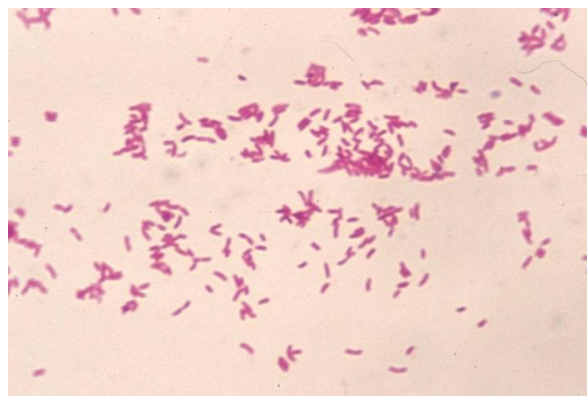


Fig. 03: *Rhizobium tropici*

Resultado de la Tinción Gram de bacterias aisladas de *Centrolobium ochroxylum*

Fuente: Autor

Tinción de Hongos

Se tomó una muestra de cada placa de las cepas de hongos, se colocaron en láminas porta objeto y se realizó un proceso de tinción con azul de algodón, luego fueron llevadas al microscopio óptico para observar la formación de estructuras, asimismo verificar la pureza de los cultivos.



Fig. 04: *Aspergillus tubingensis*

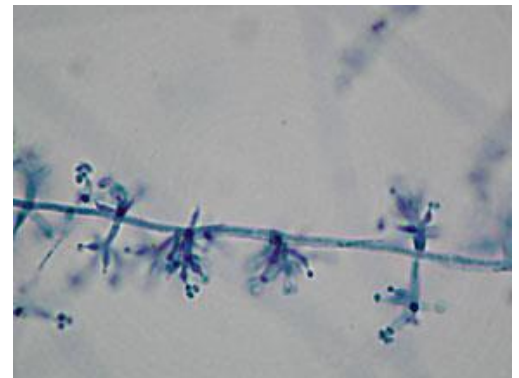


Fig. 05: *Trichoderma erinaceum*

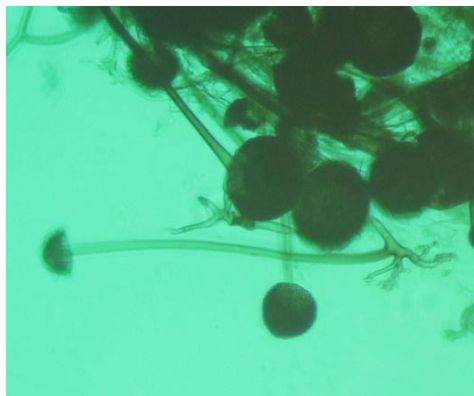


Fig. 06: *Rhizopus orizae*

Fuente: autor

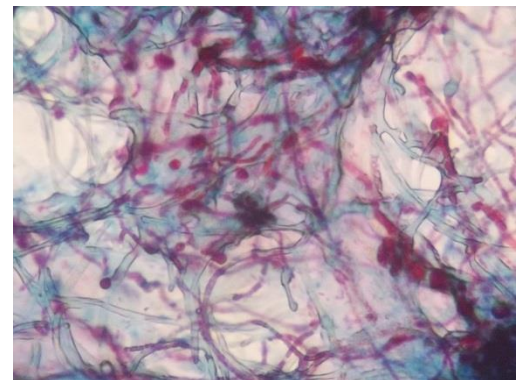


Fig. 07: *Penicillium verruculosum*

4.1.4 Caracterización Genotípica

Extracción y amplificación

Previo a la amplificación del ADN extraído de muestras de hongos y bacterias se tomó una alícuota de 5 uL de ADN se adicionó 1 uL de tampón de depósito y se colocó en un gel de agarosa al 2% con TAE 1X (Tris, Acido Acético glacial, EDTA), se migró en cámara de electroforesis a 80 voltios por media hora, los resultados fueron observados en transiluminador UV. Todo esto con la finalidad de verificar presencia de ADN en las muestras, como se observa en la figura 08. Posterior a la amplificación por PCR, se tomó 10 uL del producto amplificado y se le adicionó 2 uL de tampón de depósito, y se siguió el procedimiento anterior.

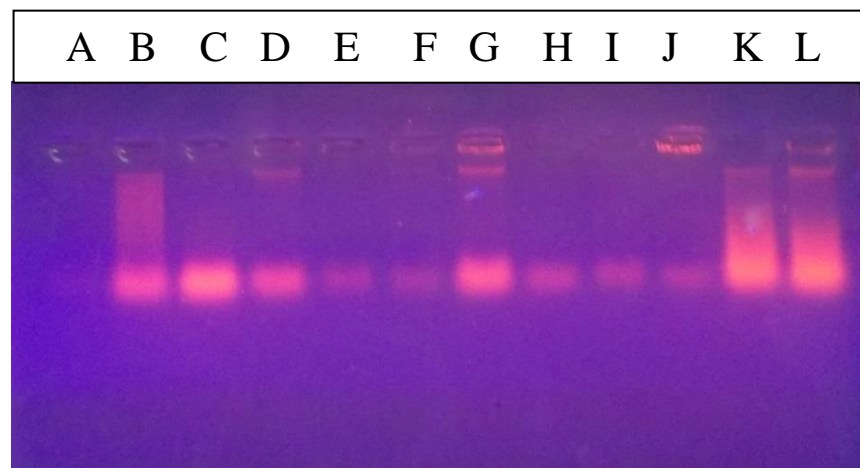


Fig. 08: Resultado de la migración de ADN de hongos aislados de la rizósfera de las especies arbóreas estudiadas.

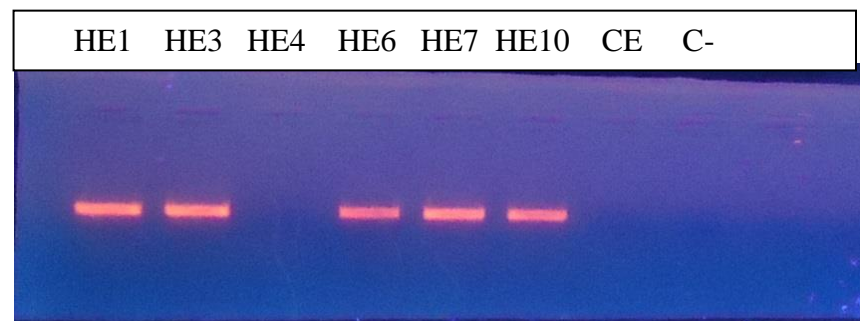


Fig. 09: Resultado de la Migración del Producto amplificado de ADN extraído de hongos

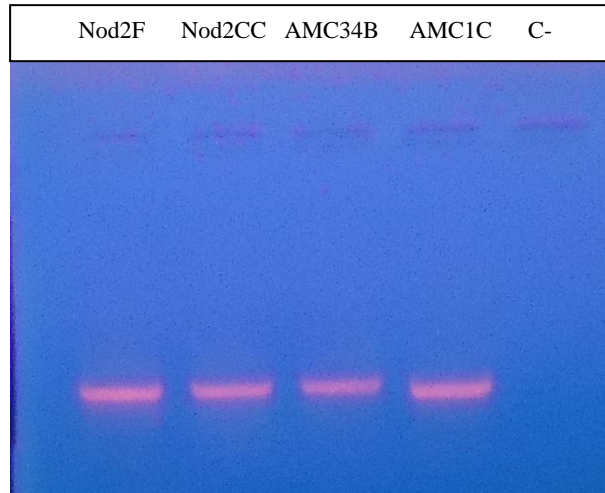


Fig. 10: migración de amplicones de ADN extraído de bacterias aisladas de los nódulos de *Centrolobium ochroxylum*

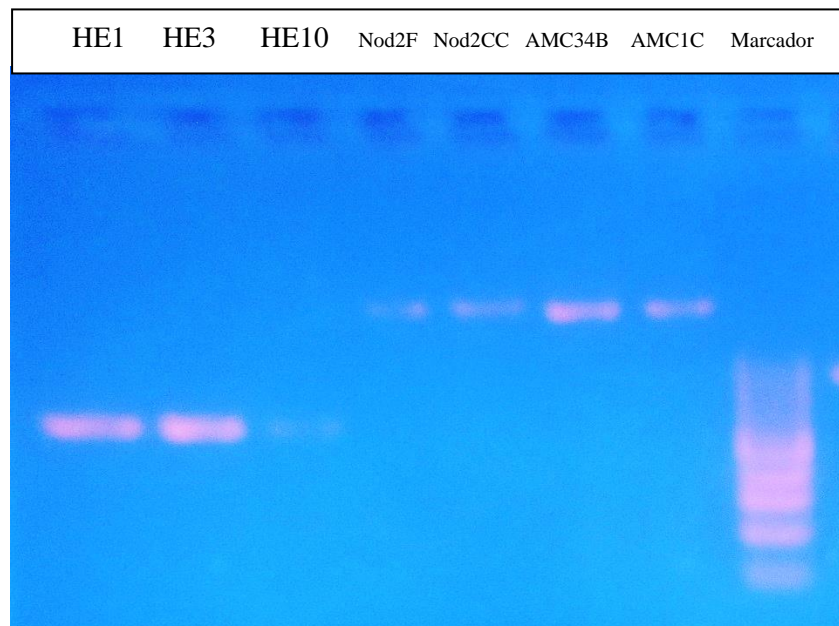


Fig. 11: Migración de amplicones con marcador de peso molecular de 1000 pares de bases, a la izquierda tenemos los productos de amplificación de la región ITS para hongos (HE1, HE3, HE10), alrededor de 750 pares de bases (bp), a la derecha más arriba se aprecia el producto amplificado del gen 16S para bacterias (Nod2F Nod2CC AMC34B AMC1C) alrededor de 1500 bp.

Análisis y comparación de las secuencias en BLAST

En las siguientes tablas se muestran las similitudes de las cepas obtenidas mediante el programa BLAST. En los resultados no se identificaron micorrizas; sin embargo las cepas encontradas pertenecen al grupo de individuos conocidos como endófitos los cuales desempeñan diferentes funciones importantes como promoción de crecimiento, asimilación de nutrientes como fosforo, nitrógeno, adaptación a factores abióticos (estrés, sequía, salinidad), resistencia a factores bióticos de las especies arbóreas, especialmente en condiciones severas como los bosques de la región tumbesina. Asociados a *Loxopterygium* se identificaron cuatro especies del género *Aspergillus* que son patógenos perjudiciales para muchos cultivos, sin embargo en condiciones de sequía favorecen la asimilación de fosfatos en especies arbóreas (Vera *et al.*, 2002), asimismo se encontró el género *Trichoderma* importante en el biocontrol ante el ataque de patógenos, entre otros géneros fueron identificados *Hypoxyylon*, *Talaromyces*, *Penicillium*. Asimismo, se identificaron dos cepas del genero *Rhizopus* extraídas del suelo rizosférico, ambas cepas no fueron identificadas en muestras de trozos de raíz.

Tabla 09: Identificación de las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de *Loxopterygium* mediante alineamiento en BLAST

cepa	Tamaño secuencia	Identificación más cercana	Similitud (%)	N° Acceso
HR3-D	498	<i>Hypoxyylon rubiginosum</i>	96	DQ223758.1
HR3-F	569	<i>Talaromyces sp.</i>	99	GU973804.1
HR13-C	558	<i>Aspergillus foetidus</i>	100	FJ545246.1
RH1-I	558	<i>Aspergillus niger</i>	100	HQ891666.1
RH1-III	589	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	JF411067.1
RH2-II	598	<i>Aspergillus awamori</i>	100	KF154413.1
RH3-E	532	<i>Penicillium verruculosum</i>	99	HM469420.1
RH13-A	589	<i>Trichoderma erinaceum</i>	100	GQ249874.1
RH14-B	550	<i>Eupenicillium hirayamae</i>	99	AF033418.1
TH2-II	609	<i>Rhizopus orizae</i>	99	AB181316.1
TH2-III	807	<i>Rhizopus orizae</i>	99	AB109754.1

La secuenciación permitió identificar 4 cepas bacterianas asociadas a *Centrolobium*, de las cuales una pertenece al género *Rhizobium* conocido por su capacidad de fijar nitrógeno de manera simbiótica, dos cepas del género *Staphylococcus* y una del género *Serratia*.

También fueron identificadas cuatro cepas fúngicas asociadas a *Centrolobium*, pertenecientes dos de ellas al género *Alternaria*, una al género *Fusarium* y otra al género *Bionectria*. Al igual que en *Loxopterygium* las cepas identificadas no se encuentran dentro del grupo de micorrizas, sin embargo, están dentro de los hongos denominados endófitos.

Tabla 10: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de *Centrolobium* mediante alineamiento en BLAST

cepa	Tamaño secuencia	Identificación mas cercana	Similitud (%)	Nº Acceso
Nod2F	1479	<i>Rhizobium tropici</i>	99	JQ085247.1
Nod 2CC	1520	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99	KF543100.1
AMC34B	1470	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	JX428964.1
AMC1C	1398	<i>Serratia marcescens</i>	100	KF686740.1

Tabla 11: Identificación de las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de *Centrolobium* mediante alineamiento en BLAST

cepa	Tamaño secuencia	Identificación mas cercana	Similitud (%)	Nº Acceso
HE1	585	<i>Alternaria sp</i>	100	HM754629.1
HE3	518	<i>Alternaria tenuissima</i>	83	HQ343444.1
HE6	569	<i>Bionectria ochroleuca</i>	97	HM037950.1
HE10	598	<i>Fusarium solani</i>	90	JN006814.1

Análisis filogenético en Clustal W

A partir de las secuencias de hongos y bacterias obtenidas se procedió a establecer sus relaciones filogenéticas mediante el software Clustal W con secuencias correspondientes a la región ITS y al gen ribosomal 16S, respectivamente. Los árboles filogenéticos fueron construidos empleando el método Neighbor-Joining

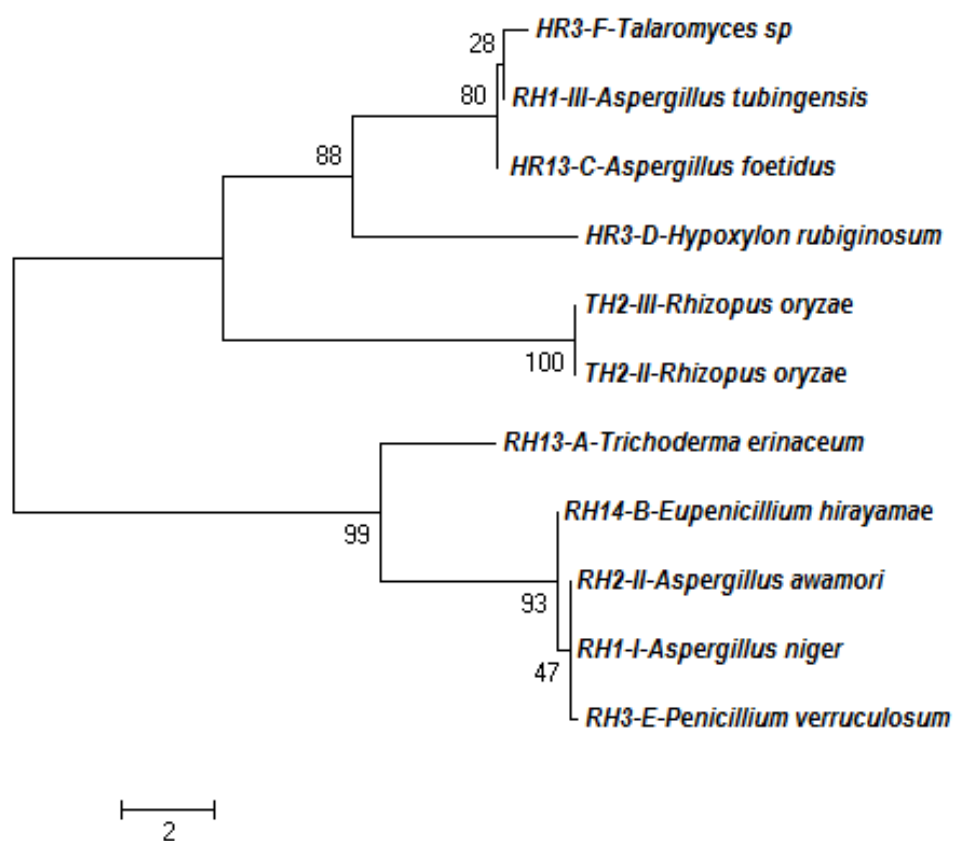


Fig. 12: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para la región ITS de hongos endófitos aislados de *Loxopterygium huasango*. Los números indican el porcentaje de similitud de la secuencia. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro likelihood, basándose en 1000 replicas

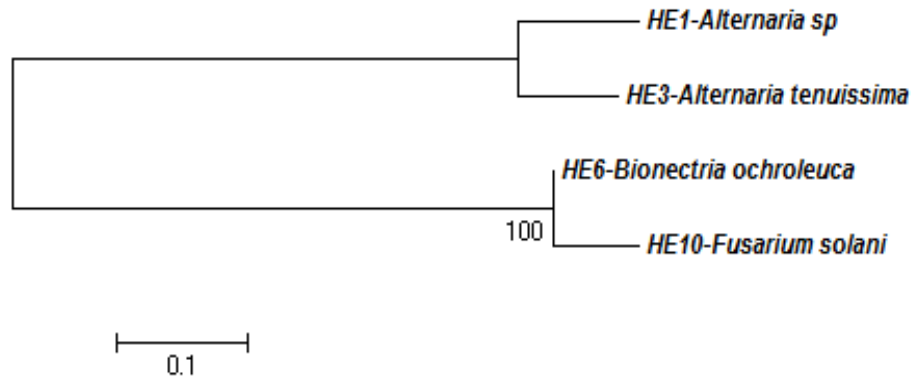


Fig. 13: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para la región ITS para hongos aislados de *Centrolobium ochroxylum*. Los números indican el porcentaje de similitud de la secuencia. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro likelihood, basándose en 1000 replicas

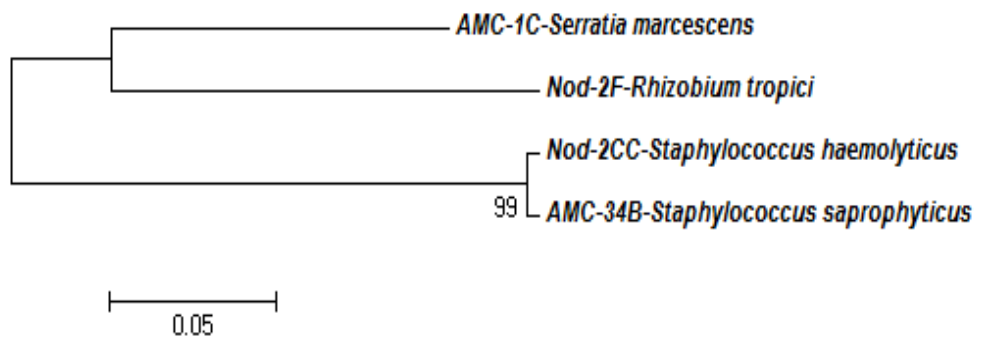


Fig. 14: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas del gen ribosómico 16S para bacterias aislados de *Centrolobium ochroxylum*. Los números indican el porcentaje de similitud de la secuencia. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro likelihood, basándose en 1000 replicas

4.2 DISCUSIÓN

En el presente estudio no se identificaron micorrizas, se identificó una cepa bacteriana de la especie *Rhizobium tropici* conocida por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas. En las tablas 10 y 11 se muestran las especies identificadas como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* entre otros que son reconocidos como patógenos de muchos cultivos y que cumplen la función de endófitos. Estudios como el descrito por Vera *et al.* (2002) demuestran que los hongos endófitos realizan una importante labor en la asimilación de fosfatos para la planta hospedera, así como ayudan en su adaptación a hábitats con condiciones adversas como sequía, defensa ante el ataque de agentes bióticos. *Loxopterygium buasango* especie arbórea estudiada en esta investigación habita sectores del bosque que son sometidos a periodos prolongados de sequía.

Las especies de *Aspergillus* identificadas son conocidas patógenos fúngicos causantes de enfermedades en humanos, animales y plantas sobre todo en cultivos agrícolas (Bengyella *et al.*, 2014), sin embargo, El-Zayat *et al.*, (2008) identificaron *Aspergillus* aislado de la rizósfera, rizoplano y diferentes partes de los órganos de *Hyoscyamus muticus*, una planta medicinal del desierto, en cuatro localidades del sur de Egipto. Chatli *et al.*, (2008) aislaron *Penicillium sp.* y *Aspergillus niger* de la rizósfera de *Salix alba* en un desierto frío en la región Himalaya, en sus resultados demuestran la capacidad de estas especies de hongos para solubilizar fosfatos. Ambos autores coinciden en la presencia de estos géneros en regiones áridas. *Aspergillus awamori* tiene la capacidad de solubilizar varias formas de fosfatos inorgánicos, en especial el fosfato tricálcico en amplios rangos de temperatura (Jain *et al.*, 2012).

El género *Hypoxylon* posee enzimas que son capaces de descomponer la madera, hidrolizar celulosa y solubilizar lignina, provocando la pérdida en la masa de gimnospermas y angiospermas (Pointing *et al.* (2003). Tomsheck *et al.*, (2010) evaluaron hongos endófitos de *Persea indicae*, identificando *Hypoxylon sp* y demostraron que esta cepa produce compuestos orgánicos volátiles (COVs) con actividad antimicrobial contra *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Cercospora beticola*, and *Sclerotinia sclerotiorum*, sugiriendo

que los COVs juegan un rol importante en la biología del hongo y su supervivencia en la planta hospedera. Por el contrario Ale-gha (2007) reporta el género *Hypoxylon* como un parásito o saprófito de especies de acacia en México. Como lo reportan los autores, las especies del género *Hypoxylon* juegan diferentes roles en la naturaleza, comportándose como endófito en defensa de su hospedero o como descomponedor de madera muerta del mismo ayudando al reciclaje de la biomasa.

El género *Talaromyces* es reportado como un endófito en diferentes especies, Bara *et al.*, (2013) lo reportan como endófito de *Aloe vera* y demuestra la capacidad de producir metabolitos que exhiben actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*. Kumar *et al.* (2013) reportaron *Talaromyces sp* como un endófito aislado de raíces de la gimnosperma *Cedrus deodara* de esta cepa obtuvieron compuestos con actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer en humanos, asimismo induce la apoptosis de células de leucemia. Estas propiedades de *Talaromyces* pueden ser usados como mecanismo de defensa ante el ataque de bacterias patógenas a la planta hospedera en estado natural, investigaciones sobre su relación con el hospedero demostrarían esta relación simbiótica.

En esta investigación se identificaron dos cepas de la especie *Rhizopus oryzae*, aisladas del suelo de la rizósfera de *Loxopterygium huasango*, no encontrándose asociado a la raíz (no se desarrolló en raíces sembradas en medio de cultivo PDA). Según los reportes es un género de patógenos descomponedores de diferentes frutas (Kwon *et al.*, 2012), otras especies de este género son reportadas como endófitos de *Camptotheca acuminata* y se demuestra que producen compuestos con actividad antimicrobiana (Ding *et al.*, 2013), asimismo este género tiene la capacidad de producir ácido fumárico a través de procesos de fermentación con rendimiento óptimo a nivel industrial (Roa *et al.*, 2008).

El género *Penicillium* ha sido reportado como endófito asociado diferentes especies, entre ellas el café (*Coffea arabica*). Vega *et al.* (2006) determinaron que varias especies *Penicillium* asociadas a café producen Ocratoxina A, el cual es

un metabolito perjudicial para la salud humana. *Penicillium verruculosum* encontrado en *Acharis hypogaea* (maní) produce una micotoxina que causa temblores severos y toxicidad aguda en pruebas realizadas con ratones (Cole et al., 1972). Se reporta el género *Eupenicillium* como endófito de hojas de *Murraya paniculata* y se evaluó el rol de este endófito en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Proenca y Rodrigues, 2005).

El género *Trichoderma* es sin duda el más estudiado y reconocido endófito, debido a todos los beneficios que brinda a su hospedero, diversos estudios demuestran que puede reducir la severidad de enfermedades en plantas inhibiendo patógenos por su actividad antagonista, actúa directamente con las raíces de plantas, incrementa el potencial de crecimiento, resistencia a enfermedades y estrés abiótico (Hermosa et al., 2012). Producen metabolitos secundarios que inducen a múltiples funciones, la interacción con otros microorganismos del suelo, modifica el transcriptoma y proteoma de la planta hospedera activando genes de defensa, así como puede modificar las propiedades físicas de la rizósfera (Mukherjee et al., 2012).

Centrolobium ochroxylum presenta una configuración diferente de hábitat donde el periodo de sequía es menos prolongado, presenta endófitos diferentes, pertenece a la familia de las leguminosas y se asocia a bacterias que tienen capacidad de fijar nitrógeno. De los nódulos obtenidos de esta planta, se identificó *Rhizobium tropici*, resultado similar fue obtenido por Pagano (2008), quien identificó este género y otros rizobios en *Centrolobium tomentosum*, además evaluó su capacidad de renodulación en plántulas de la misma especie.

Ramírez (2010) identificó *Staphylococcus haemolyticus* y *Rhizobium sp* aislados de la raíz de fresa, y describe dichas especies como endófitos con capacidad de solubilizar fosfatos y producir fitohormonas como el Ácido Indol Acético. Vespermann et al. (2007) identificaron cepas del género *Serratia* y las denominaron rizobacterias con capacidad de producir compuestos volátiles que inhiben el crecimiento de hongos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Press et al. (1997) mencionan a *Serratia marcescens* como una rizobacteria en su investigación y determinaron propiedades que inducen la resistencia sistémica

ante patógenos como hongos, bacterias y virus debido a la producción de ácido salicílico en plantas de pepino o tabaco.

Fusarium solani es reportado como endófito por Shweta *et al.* (2010) en la especie arbórea *Apodytes dimidiata*, identificando el compuesto Camptothecin y 10-hydroxycamptothecin importantes precursores de drogas contra el cáncer de uso clínico, asimismo remarca los esfuerzos realizados para la identificación de plantas y hongos endófitos para aislar compuestos para uso médico.

Blodgett y Swart (2002) reportan la especie *Alternaria tenuissima* como patógeno de las hojas de *Amaranthus hybridus*. Por el contrario Guo *et al.* (2004) reporta especies de este género como endófito de *Pinus tabulaeformis*. *Bionectria ochroleucaes* reportado por Ebrahim *et al.* (2012) como un endófito de *Sonneratia caseolarisuna* una planta de mangle, del endófito aislaron dos nuevos péptidos el Pullularin E and F.

Adicionalmente en la naturaleza ciertos insectos sociales usan los compuestos producidos por hongos para defender sus colonias del ataque de patógenos, así lo reporta Gallardo (2009), quien aisló del polen de las colmenas de abejas melíferas los géneros *Aternaria*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, estos hongos producen compuestos con propiedades antibacteriales contra *Paenibacillus larvae* un patógeno de larvas de abejas.

No hay referencias que respalden la detección de micorrizas arbusculares en *Loxopterygium* pero si se ha identificado micorrizas en otros géneros de la familia Anacardiaceae (Tawaray a *et al.*, 2003); de igual manera, para *Centrolobium* no hay reportes que identifiquen este grupo, pero si se ha estudiado la inoculación dual con cepas de micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno nativas en plántulas *Centrolobium tomentosum* (Pagano, 2008), (Marques *et al.* 2001) y en otras leguminosas en Brasil (Patreze y Cordeiro., 2005).

CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

En la presente investigación no fue posible identificar micorrizas asociadas a *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum*, sin embargo se logró el aislamiento e identificación de hongos endófitos. No hay reportes de micorrizas asociadas a estas especies arbóreas, sin embargo, no se puede afirmar que, por los resultados obtenidos, en *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum* no existan asociaciones micorrícicas, debido a que las micorrizas forman asociaciones con mas del 90% de las especies de plantas, además existen reportes de asociaciones micorrícicas con géneros dentro de ambas familias de plantas estudiadas, un método mas eficiente y disponibilidad de recursos podría mejorar la identificación.

Se identificó la especie *Rhizobium tropicia* aislada del macerado de nódulos desinfectados de *Centrolobium ochroxylum*, asimismo se identificaron bacterias endófitas de los géneros *Staphylococcus* y *Serratia*.

Se demuestra la utilidad de las técnicas de caracterización molecular mediante la amplificación de el gen Ribosómico 16S para la identificación de bacterias y de las regiones ITS para identificar hongos. Sin el uso de estas técnicas, la identificación por técnicas tradicionales nos llevaría meses, incluso años.

RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones realizar muestreos de las especies *Loxopterygium buasango* y *Centrolobium ochroxylum* en diferentes periodos estacionales, tanto en periodos de lluvia y periodos de sequía, para observar la influencia de los factores ambientales en la presencia y actividad de los microorganismos endófitos.

De contar con un mejor financiamiento ensayar diferentes métodos para la identificación de microorganismos asociados a la rizósfera, incluyendo métodos de extracción de ADN total directo de las muestras sin la necesidad de aislar y cultivar los microorganismos, lo que nos permite asimismo conocer los microorganismos no cultivables como es la metagenómica.

Diseñar iniciadores específicos para secuencias de hongos micorrícicos y así realizar la detección de micorrizas en muestras de suelo o de raíz.

Realizar la inoculación de las cepas identificadas en plántulas de *Loxopterygium buasango* y *Centrolobium ochroxylum* y así comprobar su importancia en la promoción del crecimiento en plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello, Javier Francisco , y Segenet Kelemu. «Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas.» Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7, n° 2 (2006): 55-57.
- Ale-Agha , N, M Jensen , C W Koeppen , y M Hermes . «Remarkable microfungi from Oaxaca (Mexico) of Acacia species.» CommunAgricApplBiol Sci.; 72(4), 2007: 857-866.
- Anurag, A. Agrawal. "Seed germination of *Loxopterygium guasango*, a threatened tree of coastal Northwestern South America." *Tropical Ecology* 37, no. 2 (1996): 273-276.
- Aquilanti, L, F Favilli, y F Clementi. «Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples.» *Soil Biology & Biochemistry*, 2004: 1475-1483.
- Atlas, Ronald M., y Richard Bartha. *Ecología Microbiana y Microbiológica Ambiental*. Cuarta edición. Madrid: Pearson Addison Wesley, 2002.
- Baldani, José, Leonardo Caruso, Vera L. D Baldani, Silvia R Goe, y Johanna Dobereiner. «Recent Advances In bnf With Non-legume Plants.» *Soit Bidt. Biochem*. Vol. 29, No. 516, 1997: 911-922.
- Bara , R, y otros. «Antibiotically active metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*.» *The Journal of Antibiotics* 66., August 2013: 491-493.
- Bautista Zúñiga, Francisco, Hugo Delfín González, José Luis Pacacio Prieto, y María Del Carmen Delgado Carranza. *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*. Yucatán: Dirección General de Estudios de Postgrado, 2004.
- Bengyella , Louis, y otros. «Invasion of *Solanum tuberosum* L. by *Aspergillus terreus*: a microscopic and proteomics insight on pathogenicity.» *biomed central*, 2014: 1-11.

- Blodgett, J T, y W J Swart. «Infection, Colonization, and Disease of *Amaranthus hybridus* Leaves by the *Alternaria tenuissima* Group.» APS Journals November, Volume 86, Number 11, 2002: 1199-1205.
- Brundrett, Mark C. . «Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants.» *New Phytologist*, 2002: 275–304.
- Cannon, Paul F., y Paul M. Kirk. *Fungal Families of the World*. United Kingdom: CABI, 2007.
- CBOL Plant Working Group. "A DNA barcode for land plants." *Proc Natl Acad Sci USA* 106, no. 31 (August 2009): 12794–12797.
- Chatli , A S, V Beri , y B S Sidhu . «Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh.» *J Microbiol.* Jun;48(2), 2008: 267-273.
- Cole, R J , J W Kirksey, J H Moore, B R Blankenship, U Diener, y N D Davis. «Tremorgenic Toxin from *Penicillium verruculosum*.» *APPLIED MICROBIOLOGY*, Aug. , 1972: 248-256.
- Cuadrado, Bernarda, Guillermo Rubio, y Winston Santos. «Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos.» *Rev. Colom. Cienc. Quím. Farm.* 38, nº 1 (2009): 78-104.
- de Lajudie, Philippe, y otros. «Characterization of Tropical Tree Rhizobia and Description of *Mezorhizium plurifarum* sp. nov.» *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998: 369-382.
- Ding , X, K Liu , B Deng , W Chen , W Li , y F Liu . «Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*.» *World J Microbiol Biotechnol.* Apr 12, 2013 : 1831-1838.

- Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre. "Aprueban Categorización de Especies Amenazadas de Flora Silvestre (DECRETO SUPREMO N° 043-2006-AG)." Lima - Perú, 2006.
- Dixon R, y Kanhn D. «Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation.» (Nat Rev Microbiol) 2, n° 8 (2004): 621-631.
- El-Zayat, S A, M S Nassar , F T El-Hissy , F F Abdel-Motaal , y S Ito . «Mycoflora associated with Hyoscyamusmuticus growing under an extremely arid desert environment (Aswan region, Egypt).» J Basic Microbiol, 48(2), 2008: 82-92.
- FAO. "Conservación in situ en Perú: un Estudio de Caso." Forest Genetic Resources Bulletin, 1987.
- Fernández Linares, Luis Carlos, y otros. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México D.F.: Editorial del Deporte Mexicano, 2006.
- Ferrera Cerrato, Ronald. Manual de Agromicrobiología. Mexico: Trillas, 1993.
- Franco Correa, Marcela. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Granada: Universidad de Granada, 2008.
- Gallardo,, Gabriela Laura. Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos. Tesis doctoral, Buenos Aires: Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, 2009.
- Gamboa Gaitán, Miguel A. «Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento Actual y Perspectivas.» Universidad Nacional de Colombia (Universidad Nacional de Colombia), 2005.
- García Breijo, Francisco, José Reig, Ana Ibaris, y Elena Estrelles. «La Evolución de la Simbiosis Mizorrícica.» Butil. Soc. Micol. Valencia 7, 2002: 49-54.

- Gardes, M, y T D Bruns. «ITS Primers with Enhanced specificity for Basidiomycetes: Application to the Identification of Mycorrhiza and Rusts.» (Molecular Ecology) 2, n° 2 (1993): 113-118.
- Garrity, George M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda Ed. Vol. II. United State of America: Springer, 2005.
- Gianinazzi-Pearson, Vivienne . «Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis.» The Plant Cell, 1996: 1871-1883.
- González Guerrero, Manuel. Estudio de los Mecanismos Implicados en la Homeostasis de Metales Pesados en el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices*. Tesis Doctoral, Granada: Universidad de Granada, 2005.
- Guo, Liang-Dong , Li Xu, Wei-Hong Zheng, y Kevin D Hyde. «Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS).» fungal diversity, 2004: 53-67.
- Henríquez, Priscila. Glosario de Términos Útiles para el Manejo de los Recursos Filogenéticos. San Salvador, El Salvador: REMERFI, 2002.
- Hermosa, Rosa , Ada Viterbo, Ilan Chet, y Enrique Monte. «Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes.» Microbiology, 158, 2012: 17–25 .
- Higginbotham, Sarah J. , A. Elizabeth Arnold, Alicia Ibañez, Carmenza Spadafora, Phyllis D. Coley, y Thomas A. Kurs. «Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants.» PLOS ONE, 2013: 1-11.
- INRENA. Manual Divulgativo de Especies Forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste. Tumbes, 2002.
- Jain , R, J Saxena , y V Sharma . «Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mung bean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth.» Folia Microbiol (Praha) 57, n° 6 (Noviembre 2012): 533-41.

- Jarvis, B. D.W., y otros. «Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.» *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, n° 3 (Julio 1997): 895-898.
- Jiménez Avella, Diego Javier. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA Ribosomal 16S. Tesis, Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2007.
- Jordan, D. C. «Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants.» *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, n° 1 (1982): 136-139.
- Kress, W. John, y David L. Erickson. «DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics.» *Proc Natl Acad Sci USA* 105, n° 8 (February 2008): 2761–2762.
- Krüger, Manuela, Herbert Stockinger, Claudia Krüger, y Arthur Schüßler. «DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi.» *New Phytologist*, 2009: 212-223.
- Kumar , A, y otros. «Tubulin inhibitors from an endophytic fungus isolated from *Cedrus deodara*. Kumar M, Qadri M, Sharma PR.» *J Nat Prod.*Feb ;76(2):, 2013 : 194-199.
- Kumar , M, y otros. «Tubulin inhibitors from an endophytic fungus isolated from *Cedrus deodara*.» *J Nat Prod.*Feb ;76(2):, 2013: 194-199.
- Kwon , J H, J S Ryu , T T Chi , S S Shen , y O Choi . «Soft Rot of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Banana Fruit in Korea.» *Mycobiology.* Sep;40(3), 2012 : 214-216.
- Landeweert, Renske , y otros. «Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2003: 327–333 .

- León Velandia, Daniela. Evaluación y Caracterización de Micorrizas Arbusculares Asociadas a Yuca (*Manihot sculenta*) en dos Regiones de la Amazonía Colombiana. Tesis, Bogota: Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- Lloret, Lourdes , y Esperanza Martínez-Romero. «Evolución y filogenia de *Rhizobium*.» Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 47, No. 1-2, 2005: 43-60.
- Mahajan, Anil, y R. D. Gupta. Integrated Nutrient Management (INM) in a Sustainable Rice-Wheat Cropping System. India: Springer, 2009.
- Maloy, Stanley R. Experimental Techniques in Bacterial Genetics. Boston, The United states of America: Jones and Bartlett Publisher, 1989.
- Marques, M S, M Pagano, y M R. M. M. L. Scotti. «Dual inoculation of a woody legume (*Centropogon tomentosus*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil.» Agroforestry Systems, Volume 52, Issue 2, 2001: 107-117.
- Mayz, Figueroa Juliana. «Fijación Biológica de Nitrógeno.» Revista UDO Agrícola 4, nº 1 (2004): 1-20.
- Miller-Keane. Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition. S.v. "DNA amplification.". 2003. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/DNA+amplification> (último acceso: 30 de Julio de 2015).
- Molina, Mauricio, Mahecha Mahecha, y Marisol Medina. «Importancia del Manejo de Hongos Micorrizógenos en el Establecimiento de Árboles en Sistemas Silvopastoriles.» Rev Col Cienc Pec, 2005: 162-175.
- Mukherjee, Prasun K, Benjamin A Horwitz, y Charles M Kenerley. «Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective.» Microbiology, 158,, 2012: 35–45.
- Mullis, K, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, y H Erlich. «Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction.» Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1986: 263-273.

- Pagano, M C. «Rhizobia associated with neotropical tree *Centropodium tomentosum* used in riparian restoration.» *PLANT SOIL ENVIRON.*, 54, (11), 2008: 498–508.
- Parker, Matthew A. «Symbiotic Relationship of Legumes and Nodule Bacteria on Barro Colorado Island, Panama.» *Microb Ecol*, 2008: 662-672.
- Patreze, Camila M, y Lázara Cordeiro. «Nodulation, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of some legumes native from Brazil.» *Acta bot. bras.* 19(3), 2005: 527-537.
- Peay, K. G., P. G. Kennedy, y T. D. Bruns. «Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master.» *Bioscience*, nº 58 (2008): 799-810.
- Peralvo, Manuel, Sierra Rodrigo, Young R. Kenneth, and Ulloa-Ulloa Carmen. "Identification of biodiversity conservation priorities using predictive modeling: an application for the equatorial pacific region of South America." *Biodivers Conserv*, 2007: 16:2649–2675.
- Perret, Xavier, Christian Staehelin, y William Broughton. «Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity.» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000: 180-201.
- Pirie, Michael D., Bente B. Klitgaard, and R. Toby Pennington. "Revision and Biogeography of *Centropodium* (Leguminosae - Papilionoideae)." *Systematic Botany*, 2009: 34(2): 345-359.
- Pointing , S B, M M Parungao , y K D Hyde . «Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae.» *Mycol Res.* Feb;107(Pt 2), 2003: 231-235.
- postgate, J. *Nitrogen Fixation*. Cambridge: Cambridge University Pres, 1998.
- Press, C M, M Wilson, S Tuzun, y J W Kloepper. «Salicylic Acid Produced by *Serratia marcescens* 90-166 Is Not the Primary Determinant of Induced Systemic Resistance in Cucumber or Tobacco.» *MPMI* Vol. 10, No. 6, , 1997: 761–768.

- Proenca Barros, Fabio A, y Edson Rodrigues-Filho. «Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae).» *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 2005: 257–268.
- Ramírez Rodríguez, Denisse . Bacterias endófitas aisladas de fresa (*Fragaria ananassa* Dutch) y su impacto sobre plantas de interese agrícola. Tesis maestría, México: ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, 2010.
- Roa Engel , C A, A J Straathof , T W Zijlmans , W M van Gulik , y L A van der Wielen . «Fumaric acid production by fermentation.» *Appl Microbiol Biotechnol.* Mar;78(3), 2008 : 379-389.
- Rodriguez Barrueco, C., F. Sevillano García, y P. Subramaniam. La Fijación Biológica de Nitrógeno Atmosférico una Biotecnología en la Produccion Agraria. CeresNet, 1984.
- Rodríguez Sánchez, Iram Pablo, y Hugo A Barrera Saldaña. «La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas de su Invención.» *CIENCIA UANL*, 2004: 3323-335.
- Rodriguez, R J, J F White Jr, A E Arnold, y R S Redman. «Fungal endophytes: diversity and functional roles.» *New Phytologist*, 2008: 01-17.
- Rozen, Steve, and Helen J. Skaletsky. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Edited by Misener S. Humana Press. Totowa, New Jersey Krawetz S. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* 132 (2000): 365-386.
- Russell, J. R., J. C. Weber, A. Booth, W. Powell, C. Sotelo-Montes, and J. K. Dawson. "Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis." *Molecular Ecology* 8 (1999): 199-204.
- Salas Campos, Ingrid , Norma T. Gross Martínez, y Francisco Hernández Chavarría. «Aspectos Generales de la Esporulación en Hongos.» *Revista del*

Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica 16, n° 2 (Junio 2010): 14-15.

- Sánchez Castro, Iván. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneas. Tesis Doctoral, Granada: Editorial de la Universidad de Granada, 2009, 169.
- Sawada, Hiroyuki, David Kuykendall, y John M Young. «Chansing Concepts in the Systematics of Bacterial Nitrogen-Fixing Legume Symbionts.» Gen. Appl. Microbiol, 2003: 155-179.
- Serralde O, Ana María, y María Margarita Ramirez G. «Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos.» Corpoica 5, n° 1 (2004): 31-40.
- Shweta, S, y otros. «Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin.» Phytochemistry Volume 71, Issue 1, January , 2010: 117–122.
- Smith, S. E., y D. J. Read. Mycorrhizal Symbiosis. Tercera. San Diego: Elsevier Academic Press, 2008.
- Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT). "Biotecnología y medio ambiente." Biotecnología y medio ambiente, no. 4 (2004).
- Strobel, Gary , y Bryn Daisy. «Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.» MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Dec. Vol. 67, No. 4, 2003: 491–502 .
- Sun, Gen-Lou, Oscar Díaz, Björn Salomon, and Roland von Bothmer. "Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers." NRC Canada 42 (1999): 420 - 431.

- Tawaraya, K, y otros. «Arbuscular mycorrhizal colonization of tree species grown in peat swamp forests of Central Kalimantan, Indonesia.» *Forest Ecology and Management* Volume 182, Issues 1–3, 3 September , 2003: 381–386.
- Taylor, Gail. «Populus: Arabidopsis for Forestry, Do we Need a Model Tree?» *Annals of Botany*, 2002: 681-689.
- The Plant List. The Plant List. 2010. <http://www.theplantlist.org/>.
- Tomscheck , A R, y otros. «Hypoxyton sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuelpotential.» *Microb Ecol.* Nov;60(4), 2010 : 903-914.
- Totorá, Gerard J., Berdell R. Funke, y Christine L. Case. *Introducción a la Microbiología*. EE.UU: Panamericana, 2007.
- Vega, Fernando E, Francisco Posada, Stephen W Peterson, Thomas J Gianfagna, y Fabio Chaves. «*Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production.» *Mycologia*, 98(1), 2006: 31–42.
- Vera, Diana Fernanda, Hernando Pérez, y Hernando Valencia. «Aislamiento de Hongos Solubilizadores de Fosfatos de la Rizósfera de Arazá (*Eugenia stipitata* Myrtaceae).» *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 7 No. 1 (*Acta Biológica Colombiana*, Vol. 7 No. 1, 2002 33), 2002: 33-40.
- Vespermann, Anja , Marco Kai, y Birgit Piechulla. «Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Sept., 2007: 5639–5641.
- Zinniel, Denise K. , y otros. «Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Mayo 2002: 2198–2208.

ANEXOS

ANEXO 01: Medio de cultivo ELMARC (Extracto de levadura Manitol Agar Rojo Congo)

Reactivo	cantidad
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0.2 g
NaCl	0.18 g
Manitol	9.0 g
Extracto de levadura	1.5 g
Rojo Congo	10 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

ANEXO 02: Rojo Congo

Reactivo	Cantidad
Rojo congo	1 g
Agua destilada	400 ml

ANEXO 03: Secuencias nucleotídicas de las 11 cepas seleccionadas de *Loxopterygium huasango*

1. Secuencia correspondiente a la cepa TH2-III- *Rhizopus oryzae*

T¹T¹C¹C¹T¹C¹G¹C¹T¹T¹A¹T¹T¹G¹A¹T¹G¹C¹T¹A¹A¹G¹T¹C¹A¹G¹C¹G¹G¹T¹A¹A¹T¹C¹C¹C¹A¹C¹C¹T¹
G¹A¹C¹T¹T¹C¹G¹A¹T¹A¹G¹T¹T¹G¹A¹A¹A¹G¹T¹G¹C¹T¹G¹G¹A¹T¹A¹A¹C¹T¹C¹T¹T¹G¹A¹C¹T¹T¹A¹C¹T¹
T¹C¹C¹T¹G¹G¹G¹C¹G¹A¹A¹C¹A¹A¹G¹A¹A¹A¹A¹G¹A¹T¹C¹C¹T¹G¹A¹G¹A¹C¹C¹A¹G¹C¹G¹T¹A¹A¹T¹T¹C¹C¹
G¹C¹C¹T¹A¹G¹C¹A¹A¹G¹C¹C¹A¹G¹A¹C¹A¹G¹A¹A¹A¹T¹C¹A¹C¹A¹C¹A¹C¹A¹T¹T¹T¹A¹G¹G¹T¹G¹C¹T¹C¹A¹C¹T¹G¹T¹
A¹A¹T¹A¹A¹A¹A¹C¹A¹G¹C¹G¹A¹T¹G¹C¹G¹A¹C¹C¹C¹A¹T¹T¹A¹C¹C¹A¹C¹A¹T¹A¹A¹A¹C¹A¹A¹A¹T¹G¹T¹A¹T¹G¹T¹
G¹G¹G¹T¹T¹G¹T¹G¹A¹T¹G¹A¹T¹C¹T¹G¹A¹A¹G¹C¹A¹G¹G¹C¹T¹A¹C¹T¹C¹T¹A¹T¹A¹G¹A¹A¹A¹A¹C¹C¹A¹
G¹A¹T¹G¹C¹A¹A¹G¹C¹T¹G¹C¹G¹T¹C¹A¹A¹A¹G¹A¹C¹T¹C¹G¹A¹T¹C¹A¹C¹T¹G¹A¹A¹T¹G¹C¹A¹A¹T¹
C¹A¹C¹A¹C¹T¹A¹G¹T¹T¹A¹T¹C¹G¹C¹A¹C¹T¹T¹G¹C¹T¹A¹C¹G¹T¹T¹C¹T¹C¹A¹T¹C¹G¹A¹T¹G¹C¹G¹A¹A¹C¹C¹A¹
G¹A¹G¹A¹T¹C¹C¹A¹G¹T¹G¹T¹A¹A¹A¹A¹G¹T¹G¹T¹T¹T¹A¹T¹T¹A¹A¹A¹C¹T¹T¹A¹T¹A¹A¹A¹C¹T¹G¹A¹A¹
T¹T¹C¹T¹A¹G¹G¹T¹T¹A¹T¹T¹A¹T¹G¹A¹A¹G¹G¹T¹G¹C¹T¹C¹C¹T¹G¹A¹A¹C¹C¹A¹G¹G¹A¹G¹T¹G¹G¹C¹A¹T¹C¹G¹
A¹T¹C¹A¹A¹C¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹T¹A¹G¹G¹T¹C¹T¹A¹C¹C¹C¹A¹T¹G¹A¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹G¹T¹G¹A¹G¹T¹C¹T¹C¹A¹G¹C¹
A¹A¹A¹T¹T¹T¹C¹A¹C¹A¹G¹T¹G¹A¹G¹A¹G¹C¹A¹A¹T¹C¹A¹C¹T¹T¹A¹C¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹G¹A¹A¹C¹C¹T¹A¹A¹
G¹G¹T¹A¹A¹G¹G¹C¹G¹C¹T¹T¹A¹A¹C¹A¹T¹A¹A¹T¹A¹T¹G¹A¹T¹C¹C¹T¹T¹C¹C¹G¹C¹A¹G¹G¹T¹C¹A¹C¹C¹T¹A¹
G¹G¹A¹G¹A¹G¹G¹A¹G¹A¹T¹C¹A¹T¹A¹A¹T¹A¹T¹G¹T¹A¹A¹A¹G¹C¹G¹C¹T¹A¹C¹T¹T¹A¹G¹G¹G¹T¹T¹C¹T¹C¹
T¹G¹G¹G¹T¹A¹A¹G¹T¹G¹A¹T¹G¹C¹T¹T¹C¹C¹T¹G¹T¹G¹A¹A¹A¹T¹T¹G¹G¹C¹T¹G¹A¹G¹A¹

2. Secuencia correspondiente a la cepa TH2-II- *Rhizopus oryzae*

C¹C¹T¹G¹A¹C¹T¹C¹G¹A¹T¹C¹A¹T¹A¹G¹T¹T¹G¹A¹A¹A¹G¹T¹G¹C¹T¹G¹G¹A¹T¹A¹A¹C¹T¹C¹T¹T¹G¹T¹A¹C¹T¹
T¹A¹C¹T¹T¹C¹C¹T¹G¹G¹G¹C¹G¹A¹A¹C¹A¹A¹A¹A¹A¹A¹G¹A¹T¹C¹C¹T¹G¹A¹G¹A¹C¹C¹A¹G¹C¹G¹T¹A¹A¹T¹
T¹C¹C¹T¹G¹C¹C¹T¹A¹G¹C¹A¹A¹G¹C¹C¹A¹G¹A¹C¹A¹G¹A¹A¹A¹T¹C¹A¹C¹A¹C¹A¹C¹A¹T¹T¹T¹A¹G¹G¹T¹G¹C¹T¹C¹A¹
C¹T¹G¹T¹A¹A¹A¹A¹A¹C¹A¹G¹C¹G¹A¹T¹G¹C¹G¹A¹C¹C¹C¹A¹T¹T¹A¹C¹C¹A¹C¹A¹T¹A¹A¹A¹T¹G¹T¹A¹T¹
G¹T¹G¹T¹G¹G¹T¹T¹G¹T¹G¹A¹T¹G¹A¹T¹C¹T¹G¹A¹A¹G¹C¹A¹G¹G¹C¹T¹A¹C¹T¹C¹T¹A¹T¹A¹G¹A¹A¹A¹A¹C¹
C¹A¹T¹A¹G¹A¹G¹T¹G¹C¹A¹A¹G¹C¹T¹C¹A¹A¹A¹G¹A¹C¹T¹C¹G¹A¹T¹C¹A¹C¹T¹G¹A¹A¹T¹A¹T¹G¹C¹
A¹A¹T¹C¹A¹C¹A¹C¹T¹A¹G¹T¹A¹T¹C¹G¹C¹A¹C¹T¹T¹G¹C¹T¹A¹C¹G¹T¹T¹C¹A¹T¹C¹G¹A¹T¹G¹C¹G¹A¹A¹
C¹C¹A¹A¹G¹A¹G¹A¹T¹C¹C¹A¹T¹T¹G¹T¹A¹A¹A¹A¹G¹T¹G¹T¹T¹T¹A¹T¹T¹A¹A¹A¹C¹T¹T¹A¹T¹A¹A¹A¹C¹T¹
G¹A¹A¹T¹T¹C¹T¹A¹G¹G¹T¹T¹A¹T¹T¹A¹T¹G¹A¹A¹G¹G¹T¹G¹C¹T¹C¹C¹T¹G¹A¹A¹C¹C¹A¹G¹G¹A¹G¹T¹G¹G¹C¹
A¹T¹C¹G¹A¹T¹C¹A¹A¹C¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹T¹A¹G¹G¹T¹C¹T¹A¹C¹C¹C¹A¹T¹G¹A¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹G¹T¹G¹A¹G¹T¹C¹T¹C¹
A¹G¹C¹C¹A¹A¹T¹T¹T¹C¹A¹C¹A¹G¹T¹G¹A¹G¹A¹G¹C¹A¹A¹T¹C¹A¹C¹T¹T¹A¹C¹C¹C¹C¹A¹G¹A¹G¹A¹A¹C¹C¹
C¹T¹A¹A¹G¹G¹T¹A¹A¹G¹G¹C¹G¹C¹T¹T¹A¹A¹C¹A¹T¹A¹A¹T¹A¹T¹G¹A¹T¹C¹C¹T¹T¹C¹C¹G¹C¹A¹G¹G¹T¹C¹A¹
C¹T¹A¹C¹G¹G¹A¹A¹G¹

3. Secuencia correspondiente a la cepa HR3-D- *Hypoxyylon rubiginosum*

T¹A¹C¹C¹T¹A¹A¹T¹C¹C¹G¹A¹G¹G¹T¹C¹A¹C¹C¹A¹C¹T¹A¹G¹A¹A¹A¹T¹A¹A¹A¹G¹G¹C¹T¹T¹A¹A¹C¹G¹G¹C¹A¹A¹G¹C¹A¹
G¹C¹C¹A¹G¹G¹G¹C¹C¹A¹C¹C¹C¹C¹G¹A¹G¹C¹G¹A¹G¹A¹G¹A¹A¹T¹A¹C¹T¹A¹C¹G¹C¹T¹G¹A¹G¹A¹G¹T¹G¹T¹A¹
C¹C¹C¹T¹A¹A¹C¹T¹C¹C¹G¹C¹C¹A¹C¹T¹G¹A¹C¹T¹T¹A¹A¹G¹G¹A¹G¹A¹T¹A¹C¹C¹C¹C¹C¹T¹G¹G¹A¹G¹A¹G¹G¹T¹A¹
G¹C¹T¹C¹C¹C¹A¹A¹C¹G¹C¹T¹A¹A¹G¹C¹A¹C¹A¹C¹A¹G¹G¹C¹T¹T¹A¹A¹G¹G¹G¹T¹G¹A¹A¹A¹T¹G¹A¹C¹G¹C¹T¹C¹
G¹A¹A¹T¹A¹G¹G¹C¹A¹T¹G¹C¹C¹C¹A¹C¹T¹A¹G¹A¹A¹T¹A¹C¹T¹A¹A¹T¹G¹G¹G¹C¹G¹C¹A¹A¹T¹G¹T¹G¹C¹G¹T¹C¹A¹A¹
A¹G¹A¹T¹C¹G¹A¹T¹C¹A¹C¹T¹G¹A¹A¹T¹C¹T¹G¹C¹A¹A¹T¹C¹A¹C¹A¹T¹A¹C¹T¹T¹A¹T¹C¹G¹C¹A¹T¹T¹
C¹G¹C¹T¹G¹C¹G¹T¹C¹T¹C¹A¹T¹C¹G¹A¹T¹G¹C¹C¹A¹G¹A¹A¹C¹C¹A¹A¹G¹A¹G¹A¹T¹C¹C¹G¹T¹T¹G¹T¹G¹A¹A¹A¹G¹
T¹T¹T¹A¹A¹C¹T¹A¹T¹T¹A¹G¹T¹A¹T¹T¹A¹A¹T¹T¹C¹A¹G¹A¹G¹A¹T¹A¹C¹A¹G¹T¹G¹G¹T¹A¹A¹T¹A¹C¹A¹A¹G¹
A¹G¹T¹T¹A¹G¹C¹T¹G¹T¹C¹T¹T¹C¹G¹G¹C¹G¹G¹G¹C¹G¹T¹A¹A¹G¹C¹C¹G¹G¹C¹T¹A¹C¹A¹G¹G¹G¹T¹A¹G¹C¹T¹A¹
C¹A¹G¹G¹G¹T¹A¹G¹C¹T¹C¹C¹C¹G¹G¹T¹A¹G¹C¹C¹G¹C¹A¹G¹C¹T¹C¹A¹C¹G¹C¹C¹G¹A¹G¹G¹C¹A¹C¹G¹A¹C¹G¹G¹T¹

AAGGTTACAAAGGGTTTTGGAGTTTAGATAACTCAGTAATGATCCCT
CCGCAGGTTACCTACGGAG

4. **Secuencia correspondiente a la cepa HR3-F - *Talaromyces sp.***

ACCTGATCCGAGGTCACCGTAGAAAGAATAAAGGGGTGACCAACGCCC
ACCAGTCCCTCCCGAGCGCGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACTA
GGCGGGACGTCGCCGCTGCCITTCGGGCAGGTCCCCGCCAAAGCCAG
GGGGACCACGCCAACACACAAGCCGCGCTTGAGGGCAGAAATGACG
CTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGA
AAGTTTAAACGATTATCGTGGGACTCAGACAGCCTCTCTTCATCAGGG
TTCACAGGGGTGCTCTGGCGGGCACGGGCCCGGGAGCATAGCGCTC
CCCGGCGACCGGAGTGACCCAGTGGGCCCGCCAAAGCAACAAAGTAC
GCAAGAGACACGG

5. **Secuencia correspondiente a la cepa HR13-C - *Aspergillus foetidus***

ACCTGGAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCT
ACAGAGCATGTGACAAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTG
CCGCCGCTGCCITTCGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGAC
CCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGC
ATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGA
TGATTTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACT
GATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTG
TTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAGAGGCGCCCCC
CGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACAATA
GACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGA
TCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGGG

6. **Secuencia correspondiente a la cepa RH1-I - *Aspergillus niger***

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCITTT
GGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTATAACCCTGTTGCTTCGGCGGG
CCCGCCGCTGTTCGGCCGCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCGGGCC
GTGCCCCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGT
CTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCT
TGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCCIGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCT
CAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGGAC
GGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTAT
GGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTTGGCCGGCGCCTGCCGACGT
TTTCCAACCATTTTTCAGGTGACCTCGATC

7. **Secuencia correspondiente a la cepa RH1-III - *Aspergillus tubingensis***

ACCTGATCCGAGGTCACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAG
GCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGA
GGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCITTCGGGGCCCGTCCCCCGGA
GAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAA
TGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTAGTT
ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCAT
TGTTGAAAAGTTTTAACTGATTGCATTC AATCAACTCAGACTGCACGCTT
TCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCGGG
GGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCCGCCGAA
GCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGAC
CCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG

8. **Secuencia correspondiente a la cepa RH 2-II- - *Aspergillus awamori***

GATGGAGGTTGGCCCAAAGACCCGCACTCGTAATGCTTCCGTAGGTG
AACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCCAACC
TCCCATCCGTGTCTATTTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTT
GTCGGCCCGCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCCGCC
GGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGA
TTGAATGCAATCAGTTAAAACITTC AACAATGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTA
TTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTGCTGCCCTCAAGCCCG
GCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGA
AAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
TCACATGCTCTGTAGGATTTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTCCAACCA
TTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC

9. **Secuencia correspondiente a la cepa RH 3-E - *Penicillium verruculosum***

CCAACCTCCCCACCCTTGTCTCTATACACCCGTTGCTTTGGCGGGCCCA
CCGGGGCCACCTGGTTCGCCGGGGGACGTCCGTCCCCGGGCCCCGCGCC
CGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTAC
TATGAAAATTTGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATT
CGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCT
TGTGTGTTGGGTGCGGTCCCCCGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCG
GCGACGTCCGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTACTCGCTC
GGGAAGGACCTGCGGGGGTTGGTACCACCATATTTTACCACGGTGA
CCTCGATC

10. **Secuencia correspondiente a la cepa RH 13-A - *Trichoderma erinaceum***

ACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTG
AACCATAACAAACTGTTGCCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTC
GCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACCTTTT
ACTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAAA
TTCAAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC

GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCGCCAGTATTCT
GGCGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGG
GGGGTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTCAGACGGGATCCCGGCC
CCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT
GCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACC
CAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATAAG

11. Secuencia correspondiente a la cepa RH 14-B - *Eupenicillium hirayamae*

ACCCGTGTTTATTTCGTACCTTGTTCGCTTCGGCAGGCCCGCCTCACGGC
CGCCGGGGGGCCTCCGCCCCGGGCCCGCGCCTGCCGGAGACAATCT
GAACGCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGCGATTAGCTAAATTAGTTA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
GTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCTC
CGTCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCC
GGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC
GGCGCCTGCCGACACCCATCAACCCTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGGATACCCGTTGAACTTAATCATATCAATAAG

ANEXO 04: Secuencias nucleotídicas de las cepas fúngicas seleccionadas de *Centrolobium ochroxylum*

1. Secuencia correspondiente a la cepa HE1- *Alternaria sp*

ATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTG
CTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGG
CTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACG
CCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGC
ATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGAT
GATTCACTGAATTTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTA
TTAATTTGTTACTGACGCTGATTTGCAATTAACAAAAGGTTTATGTTTGT
CTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGAC
AAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGATTCCAGCCC
GCCITCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGG

2. Secuencia correspondiente a la cepa HE3 - *Alternaria tenuissima*

CCGAGGTTAANGTTGAAANNAGGCTCAANGGAAGCTTGACCNNG
CTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCCAAACCANNAGGCANG
GCTGCCAATTACTTTAAGGCCAGCCTTCTCTAAAGCTAGAAACAAGAC
CCCCA

3. Secuencia correspondiente a la cepa HE6- *Bionectria ochroleuca*

ATCTGAGGTAACCTTGGAAGTTGGGGGTTTAAACGGCAGGGGCTCGT
CGCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCCACGACG

GGTCCGCCACTAGATTTAGGGGCGGCCGTCCCTCGCGGGCTTTGGC
 CGATCCCCAACACCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCT
 CAGACAGGTATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGTGCAATGTGCGTTCA
 AAGATTCNATGATTCACNCAATTCTGCAATTCACATTA CTTATCGCATT
 TCTCTGCGTTCTTCACCCATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
 GTTTTATTTATTTGTAAAACTACTCAGAAGATTCAAAAATAAAACAA
 GAGTTGAGTTTCCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGCACACGAGGCG
 CCCGGGGCAATCCCGCCGAAGCAACAGTAGGTATGTTACATGGGT
 TGGGAGTTGTAACTCGGAATGATCCCTCCGAGGNCCCCTACGGAGG
 GTCCCCCCCCNTTTTCTCCCCCCTCTTTTACCCCCCGTCNCTTCTC
 GGCCCGCTTCCCCCCCCCTTCTCCCCCCCCCTTCTCCNCTCCCCCTCC
 CC

4. **Secuencia correspondiente a la cepa HE10- *Fusarium solani***

ACAAGTTGGNIGTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGA
 GGTGTTAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTA
 TTTGGGGGACGGCGTTGTGCCCGTAGGGGGCTTCCGCNNATCCCCAA
 CGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCA
 TGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCT
 GATTCACTGAATCTGCAATTCACATTNNTTATCCCATTTGNTCCCT
 CTCTCTCGATTCACACCCAAAGAGATCCGNCGTTCAAAGNNTNAATTT
 ATTTGCTTGTTACTCATAAGAAACATTATATACACAGAGTTAGGGGG
 TCCTCTGGCGGGGGCGNNTNTGTTANTGGGCCNNTGTTCCCGCCC
 AGTCANCCCTATNNGTATTTTACNNGTTGATGAGTTGCATAACTC
 GCTTCTTATTTTTCNCCNCCTCTCTTC

ANEXO 05: Secuencias nucleotídicas de las cepas bacterianas seleccionadas de *Centrolobium ochroxylum*

1. **Secuencia correspondiente a la cepa Nod 2F - *Rhizobium tropici*.**

TTCGACCNCAGAGTCAGNAATGGACCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTG
 GTGTTCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCAC
 TCACCTCTTCCATACTCCAGATCGACAGTATCAAAGGCAGTTCCAGGG
 TTGAGCCCTGGGATTTACCCCTGACTGATCGATCCGCCTACGTGCGC
 TTTACGCCCAGTAATTCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCG
 GCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGATAACCGTCATT
 ATCTTCTCCGGTGAAAGAGCTTTACAACCTAGGGCCTTCATCACTCAC
 GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCCT
 GCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCT
 GATCATCCTCTCAGACCAGCTATGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTA
 CCCCACCAACTAGCTAATCCAACGCGGGCTCATCTCTTGCCGATAAATC
 TTTCTCCCGAAGGACACATAACGGTATTAGCACAAGTTTCCCTGCGTTA
 TTCCGTAGCAAAAAGGTAGATTTCCACGCGTTACTCACCCGTCTGCCGC
 TCCCCCTTGCGGGGCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGC
 GTTCGTTCTGAGCCATGATCCAACTCTATCNACTTGCATGTGTAAAG

2. Secuencia correspondiente a la cepa Nod 2CC - *Staphylococcus haemolyticus*.

CAGCGTCAGTTAAGACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC
ATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTC
TGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTG
GGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCA
ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATA
GTTACTTACACGTATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGATCCGAA
GACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCAATTG
CGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC
AGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTCGC
CTTGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCAT
CTATAAGTGATAGCAAACCATCTTCACTATCGAACCATGCGGTTTCG
AAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTA
TAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAA
GGAGCAAGCTCCTTGTCTGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGC
CGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCCAAACTCTAAA

3. Secuencia correspondiente a la cepa AMC 34B - *Staphylococcus saprophyticus*.

ACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATT
TCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGA
CTTAAGAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGGGATAAC
GCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG
GCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATTT
GTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCTTTCATCACTCA
CGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCAATTGCGGAAGATTCCCTAC
TGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCC
GATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTCGCCTTGGTAAGCCGTTA
CCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCTATAAGTGATAGCA
AAACCATCTTTCACITTAGAACCATGCGGTTCCAAATGTTATCCGGTAT
TAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCA
CGTGTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTA
TCTGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCC
TGAGCCT

4. Secuencia correspondiente a la cepa AMC 1C - *Serratia marcescens*

GCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTTCCTCCA
GATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCACCCCCCTCTACG
AGACTCTAGCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGG
GATTTACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAG
TAATTCGGATTAACGCTTGACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATTGATGAGCG
TATTAA

ANEXO 06: GALERÍA DE FOTOS:



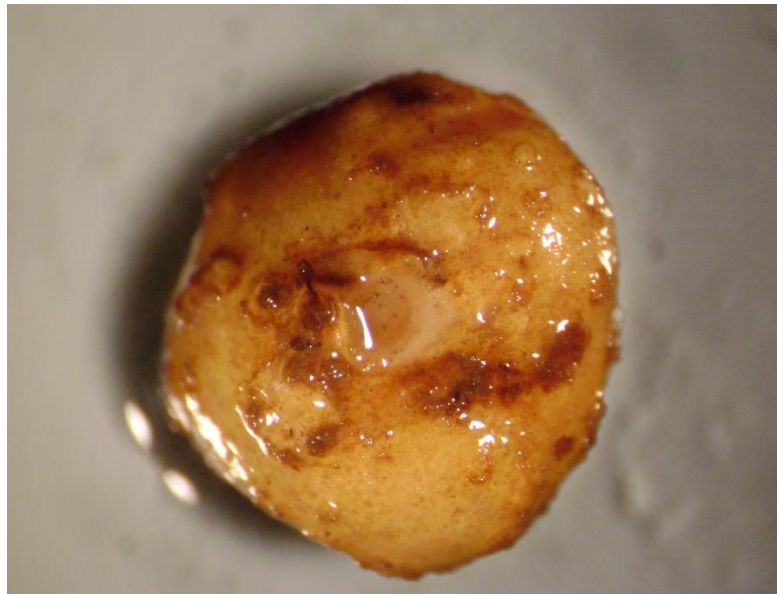
Georeferenciación de ejemplar de *Centrolobium ochroxylum* para muestreo



Ejemplar de *Loxopterygium huasango* seleccionado para muestreo de raíces



Nódulos adheridos a la raíz de *Centrolobium ochroxylum*



Nódulo de las raíces de *Centrolobium ochroxylum*. Se observa el punto de inserción



Corte longitudinal de Nódulos, se observan un color rosáceo debido a actividad de la nitrogenada.



Nódulos macerados para siembra posterior en medio de cultivo ELMARC para bacterias fijadoras de nitrógeno

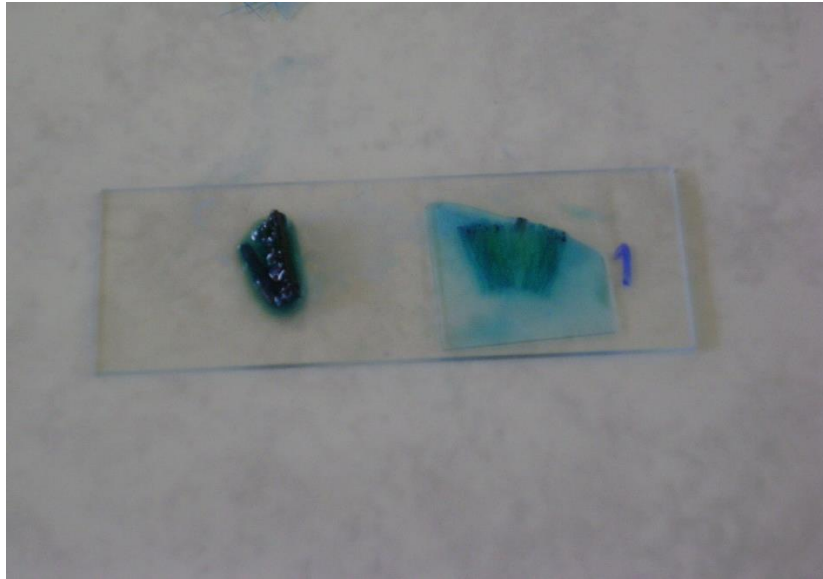
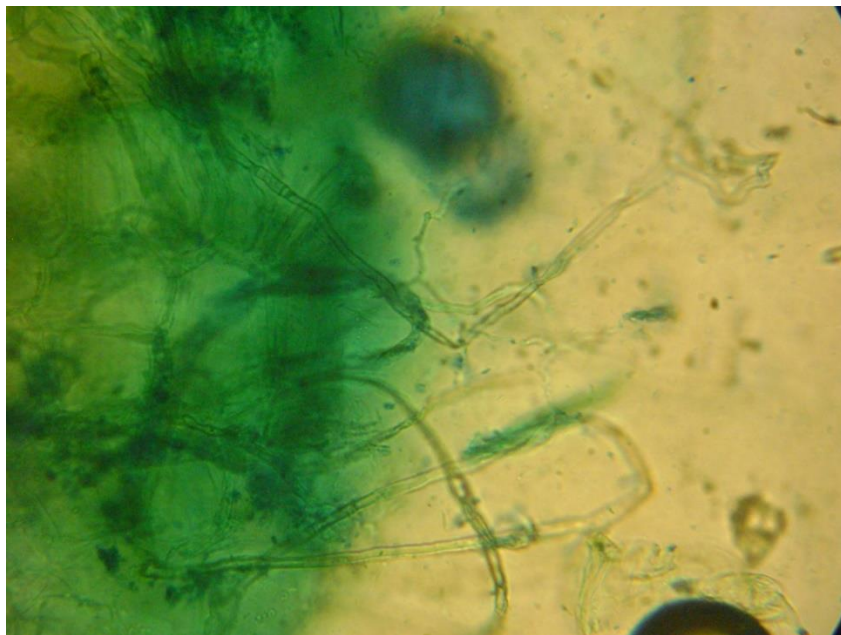


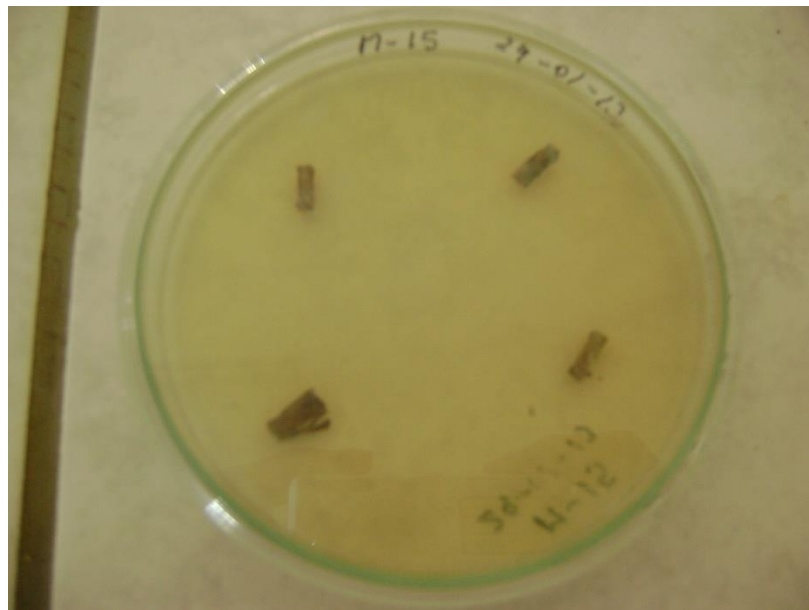
Lámina con raíces de *Loxopterygium huasango* después de un proceso de tinción para observar presencia de hongos



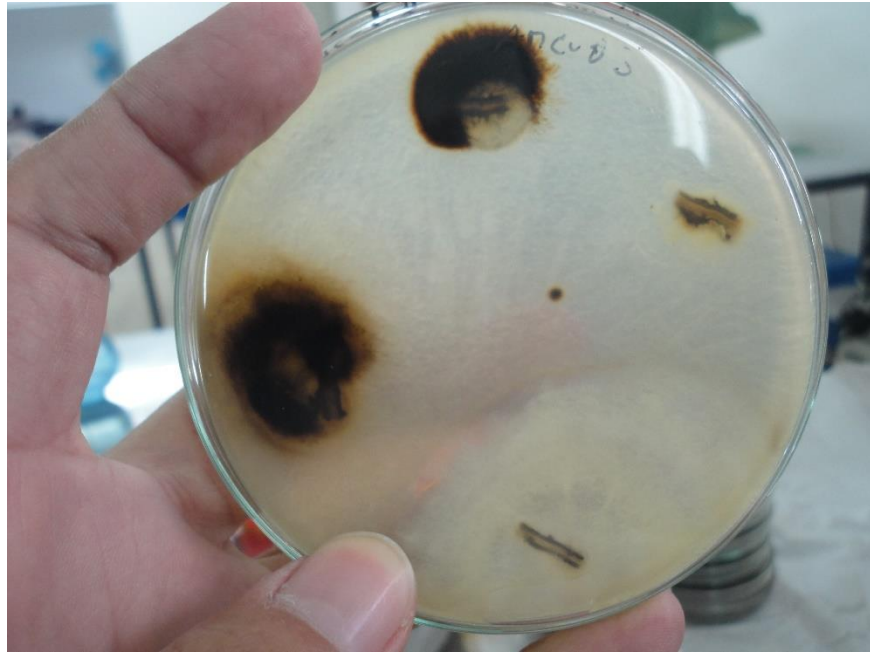
Hifas de hongos en muestra de raíces de *Loxopterygium huasango*



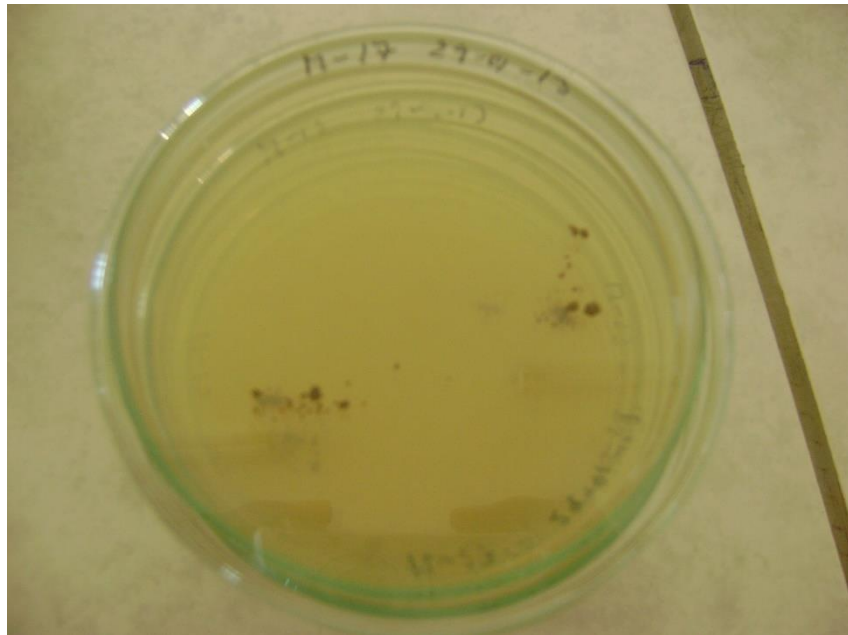
Desinfección de raíces de *Loxopterygium huasango* para posterior siembra



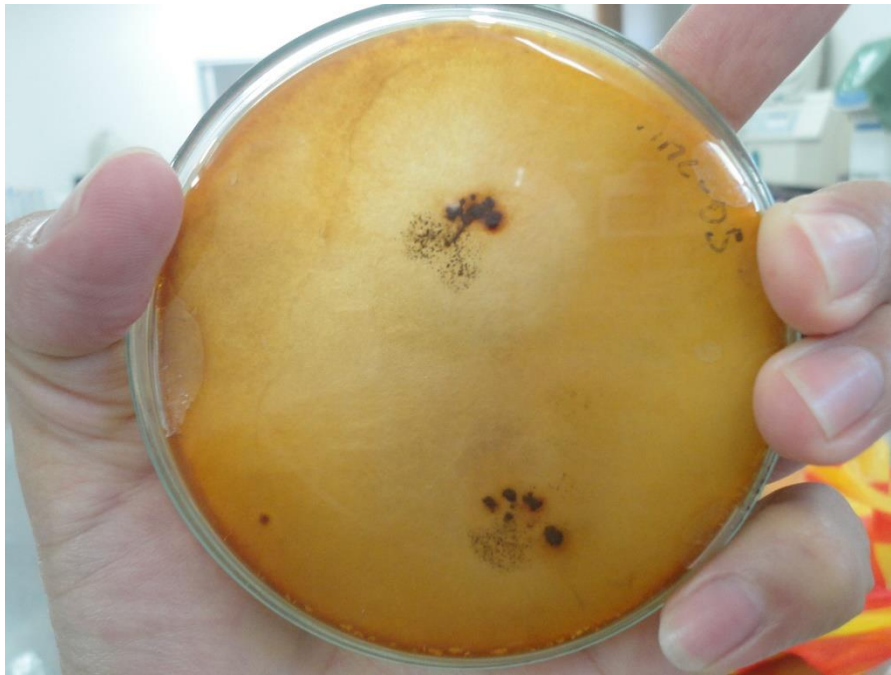
Trozos de raíz desinfectados sembrados en medio de cultivo PDA para aislamiento de hongos



Hongos sin purificar crecidos en medio de cultivo PDA a partir de trozos de raíz desinfectados de *Loxopterygium huasango*



Suelo sembrado directamente en medio de cultivo PDA para aislamiento de hongos de suelo



Hongos crecidos del suelo sembrado directamente en medio PDA



Autoclave



Incubadora



Centrifuga



Baño maría



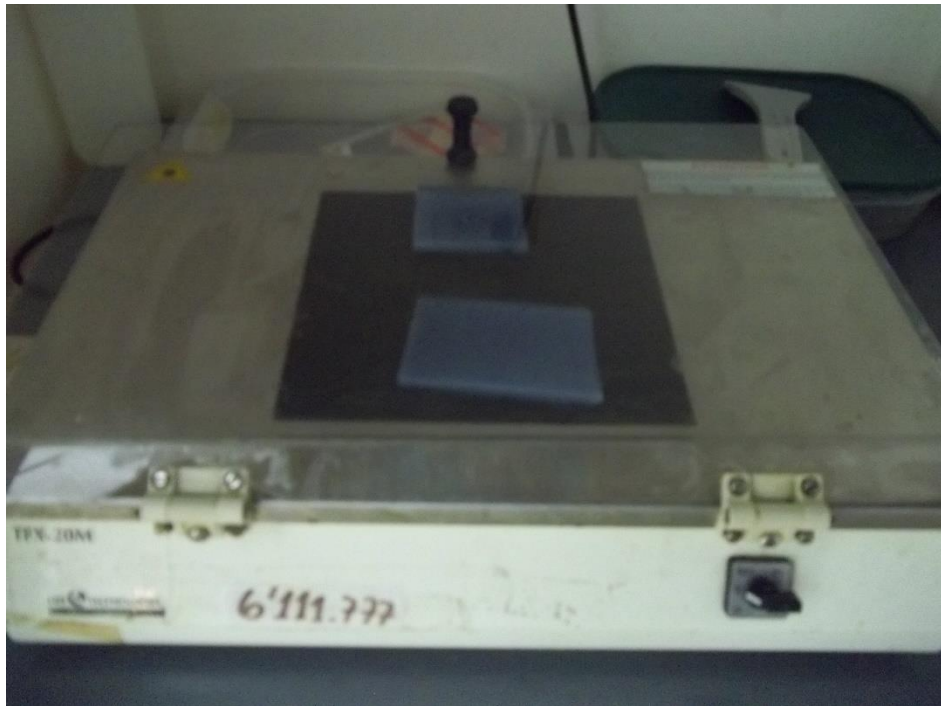
Termociclador



Espectrofotómetro



Vortex



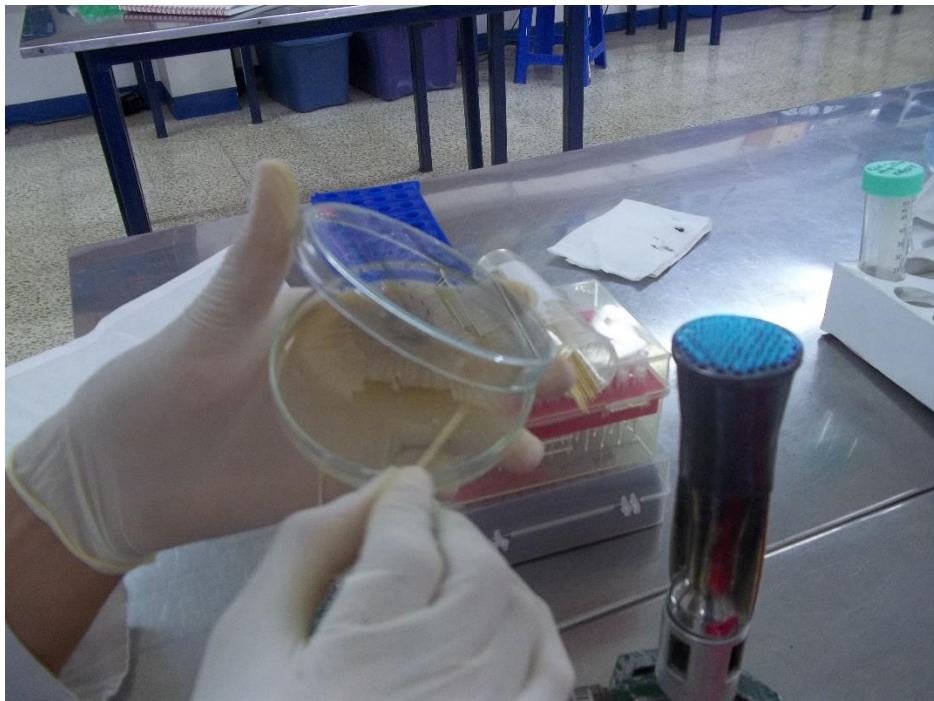
Transiluminador



Cámara de flujo laminar



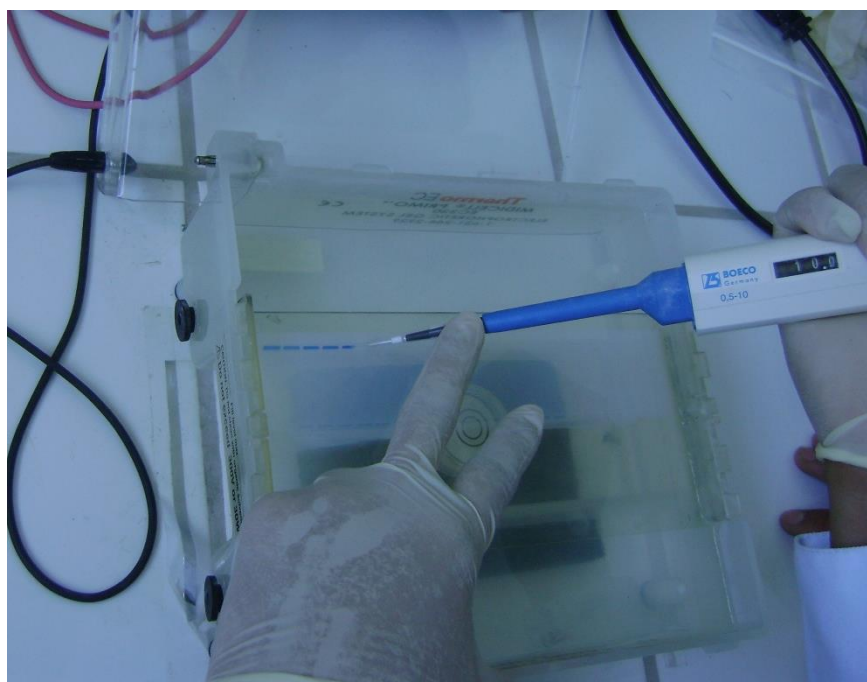
Extracción de ADN de hongos



Extracción del micelio de la placa de cultivo

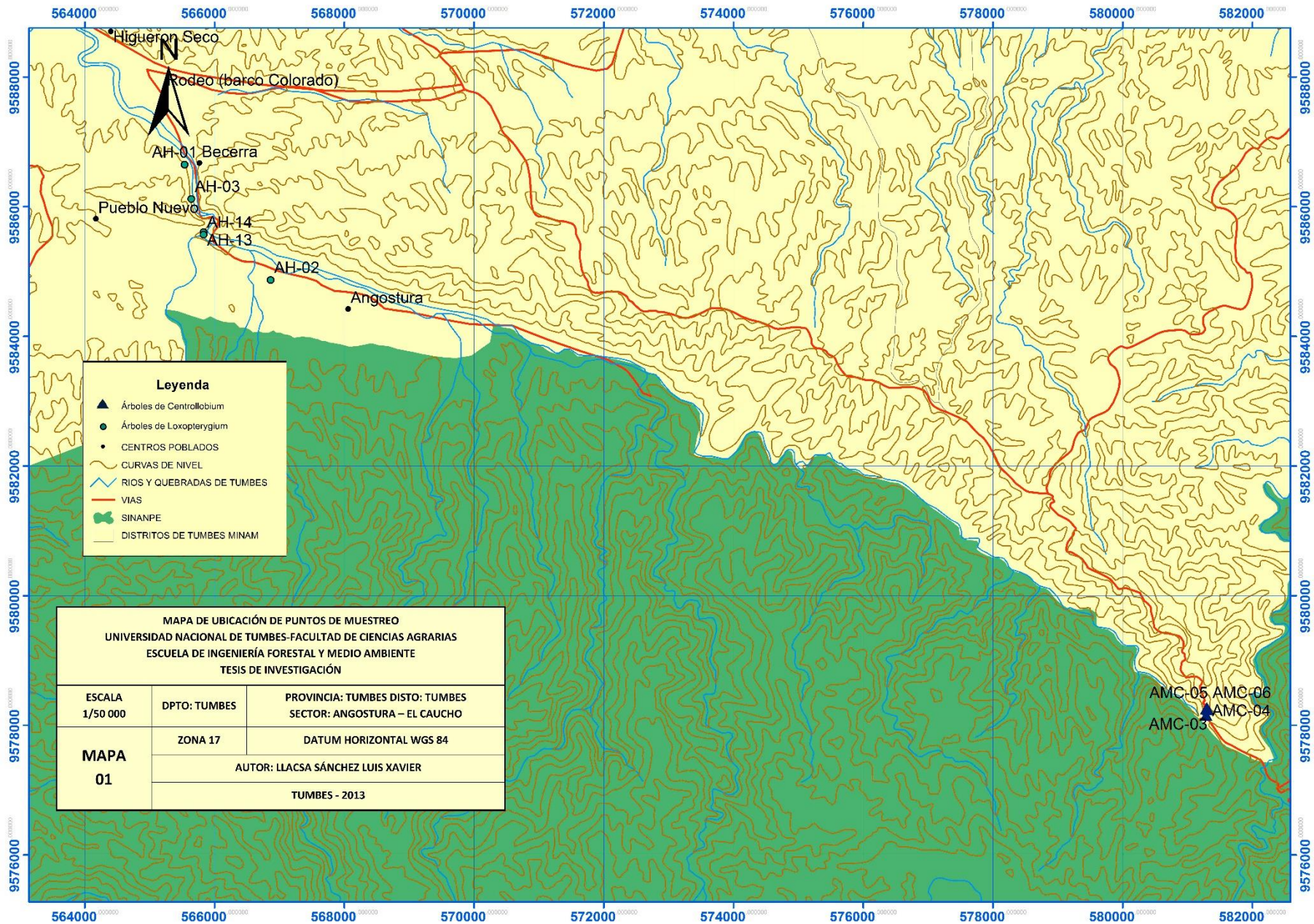


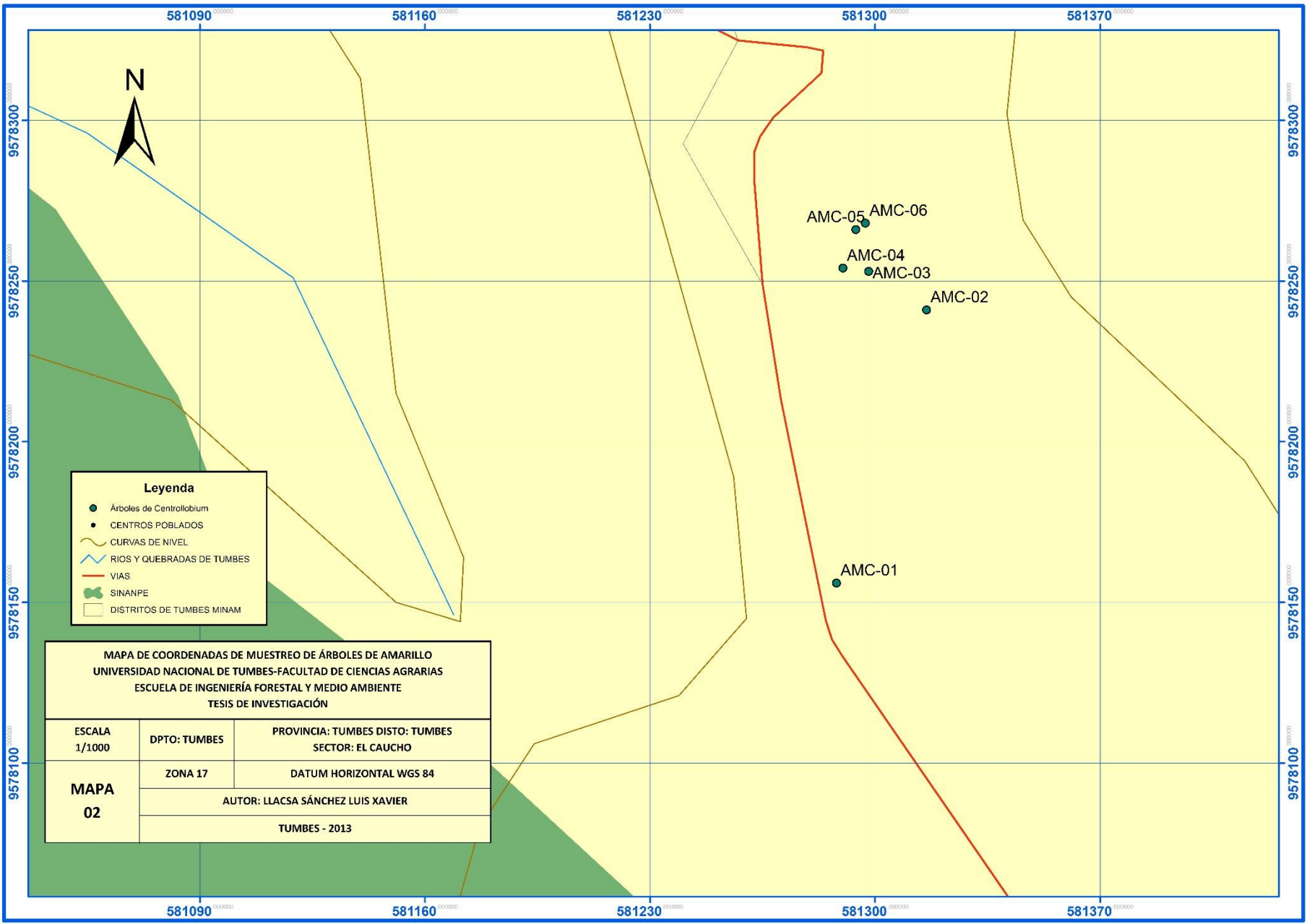
Maceración del micelio



Depósito de muestras de ADN en cámara de electroforesis para su migración

**MAPAS DE
MUESTREOS**

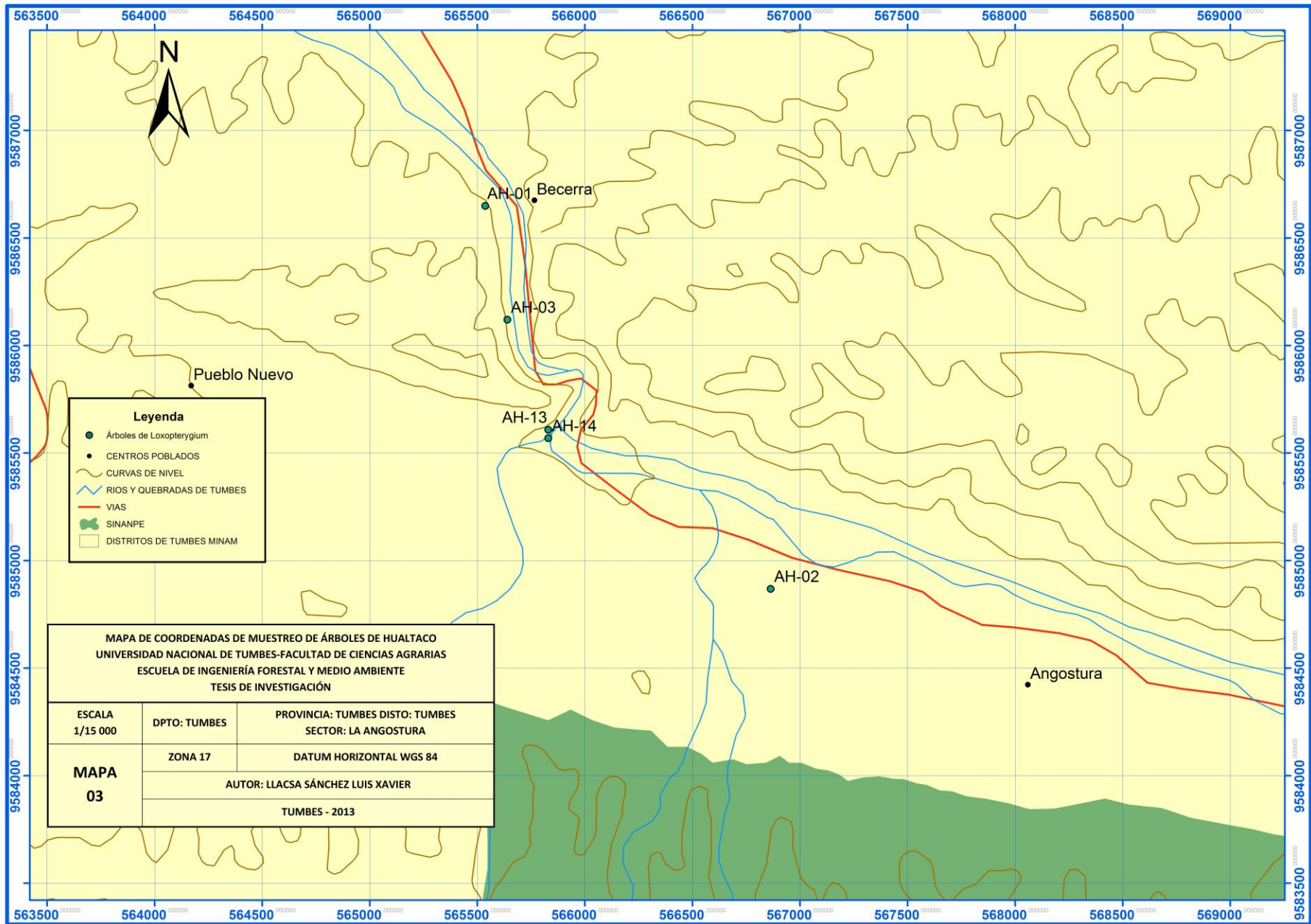




- Leyenda**
- Árboles de Centrollobium
 - CENTROS POBLADOS
 - CURVAS DE NIVEL
 - RIOS Y QUEBRADAS DE TUMBES
 - VIAS
 - SINANPE
 - DISTRITOS DE TUMBES MINAM

MAPA DE COORDENADAS DE MUESTREO DE ÁRBOLES DE AMARILLO
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES-FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
 ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE
 TESIS DE INVESTIGACIÓN

ESCALA 1/1000	DPTO: TUMBES	PROVINCIA: TUMBES DISTO: TUMBES SECTOR: EL CAUCHO
MAPA 02	ZONA 17	DATUM HORIZONTAL WGS 84
	AUTOR: LLACSA SÁNCHEZ LUIS XAVIER	
	TUMBES - 2013	



GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ácido nucleico: una molécula grande compuesta de subunidades de nucleótidos.

ADN (ácido desoxirribonucleico): La molécula responsable de almacenar y transmitir información genética. El ADN es una molécula de doble cadena se mantienen unidos por enlaces débiles entre pares de bases de nucleótidos retorcidos uno alrededor del otro en la forma de una doble hélice. Los cuatro nucleótidos en el ADN contienen las bases: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). En la naturaleza, pares de bases forman sólo entre A y T y entre G y C; Así, la secuencia de bases de cada hebra simple se puede deducir de la de su socio.

ADN polimerasa: La actividad enzimática responsable de catalizar la polimerización de ADN. Depende de un cebador o iniciador hibridado a partir del cual inicia la polimerización, y un molde de ADN de partida para copiar.

Alineamiento: El acto de dos secuencias de ácidos nucleicos de enlace de hidrógeno a través de la complementariedad de las bases que determinan sus secuencias. Generalmente sinónimo de "hibridar".

Amplificación: Un aumento en el número de copias de un fragmento de ADN específico; puede ser o bien in vivo o in vitro.

Análisis de la secuencia Base: Un método, a veces automatizado, para determinar la secuencia de bases.

ARN mensajero (ARNm): Las proteínas no son sintetizados directamente a partir de ADN genómico. En lugar de ello, una plantilla de ARN (un precursor de ARNm) se construye a partir de la secuencia del gen. Este ARN se procesa entonces en varias formas, incluyendo el empalme. ARN de una sola hebra empalmados destinados a convertirse en plantillas para la síntesis de proteínas se conocen como ARNm, el término ARNm se utiliza solamente para un transcrito maduro con cola polyA y con todos los intrones eliminados, en lugar del transcrito primario en el núcleo. Como tal, un ARNm tendrá una "región 5' no traducida,

una región codificante, un región 3' no traducida y (casi siempre) un poli (A) de la cola. Típicamente aproximadamente el 2% del ARN celular total es ARNm.

ARNr: "ARN ribosomal"; cualquiera de varios ARN que se convierten en parte del ribosoma, y por lo tanto están implicados en la traducción de ARNm y la síntesis de proteínas. Ellos son los más abundantes ARN en la célula (sobre una base de masa).

ARN ribosómico 16S: (o 16S rRNA) es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariotas. Los genes que codifican para que se les conoce como 16S rRNA y se utilizan en la reconstrucción de filogenias, debido a las bajas tasas de evolución de esta región del gen. Carl Woese y George E. Fox fueron dos de las personas que fueron pioneros en la uso de 16S rRNA en las filogenias

Banda: Un patrón de las regiones claras y oscuras por tinción Giemsa que puede servir como puntos de referencia en los cromosomas.

Base: En la biología molecular, este término se refiere a la adenina y la guanina bases de purina, y el uracilo bases de pirimidina, timina, y citosina, o modificación de estas bases.

Biología molecular: El estudio bioquímico de la base genética para el fenotipo.

Bromuro de etidio: se intercala dentro de la estructura de los ácidos nucleicos en una forma tal que emiten fluorescencia bajo luz UV. Tinción con bromuro de etidio se utiliza comúnmente para visualizar ARN o ADN en geles de agarosa colocados en cajas de luz UV. Se requieren precauciones adecuadas, ya que el bromuro de etidio es altamente mutagénico y la luz UV perjudicial para los ojos. El bromuro de etidio también se incluye en gradientes de cloruro de cesio durante ultracentrifugación, para separar el ADN circular superenrollado de ADN lineal y circular relajado.

Biotecnología: conjunto de técnicas biológicas desarrolladas a través de la investigación básica y aplicada ahora a la investigación y desarrollo de productos. En particular, el uso por la industria de ADN recombinante, fusión celular, y las nuevas técnicas de bioprocesamiento.

Cromosomas: Una estructura genética auto-replicante, condensada, fibrilar, de las células que contienen el ADN celular que lleva en su secuencia de nucleótidos al conjunto lineal de genes. En procariotas, el ADN cromosómico es circular, y todo el genoma se lleva en un cromosoma. Genomas eucariotas consisten en un número de cromosomas cuyo ADN se asocia con diferentes tipos de proteínas.

Desnaturalización: Con respecto a los ácidos nucleicos, se refiere a la conversión de cadena doble para el estado de una sola cadena, a menudo consigue calentando o alcalinas condiciones. Esto también se llama ADN "fusión". Con respecto a las proteínas, se refiere a la interrupción de la estructura terciaria y secundaria, a menudo alcanzado por el calor, detergentes, agentes caotrópicos, y agentes reductores de sulfhidrilo.

DNasa: Deoxyribonuclease, una clase de enzimas que digieren el ADN. El más común es la DNasa I, una endonucleasa que digiere tanto ADN individual y de doble cadena.

Electroforesis: Un método para separar moléculas grandes (tales como fragmentos de ADN o proteínas) de una mezcla de moléculas similares. Una corriente eléctrica pasa a través de un medio que contiene la mezcla, y cada tipo de molécula viaja a través del medio a una velocidad diferente, dependiendo de su carga eléctrica y tamaño. La separación se basa en estas diferencias. Geles de agarosa y acrilamida son los medios utilizados comúnmente para la electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Electroforesis en gel de agarosa: un método para analizar el tamaño de los fragmentos de ADN (o ARN). En presencia de un campo eléctrico, los fragmentos más grandes de ADN se mueven a través de un gel más lento que los más pequeños, la produciendo diferentes "bandas" de Migración. Por lo general, éstos se visualizan por el empapando del gel en un colorante (bromuro de etidio) que hace que el ADN muestre fluorescencia bajo luz UV. Este es el gel de elección para los ADN o ARN en la gama de miles de bases de longitud.

Expresión génica: El proceso por el cual la información codificada por los genes se convierte en las estructuras presentes y que operan en la célula. Genes expresados incluyen aquellos que son transcrito en ARNm y luego traducido en proteína y los que se transcribe en ARN, pero no traducirse en proteína (por ejemplo, ARN ribosomal y de transferencia).

Gen: La unidad física y funcional fundamental de la herencia (Por lo general, ADN, ARN Algunos organismos tienen un gen). Un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular en un cromosoma particular que codifica un producto funcional específico (es decir, una proteína o molécula de ARN) que contribuye a o influye en el fenotipo de la célula. Un gen por lo general contiene regiones codificantes, intrones, regiones no traducidas y regiones de control.

Genética: El estudio de los patrones de la herencia de rasgos específicos.

Genoma: Todo el complemento de material genético en forma de ADN permanentemente mantenido para un organismo dado. Su tamaño se da generalmente como su número total de pares de bases. ADN genómico de mamífero (incluyendo el de los humanos) contiene 6 mil millones de pares de bases de ADN por célula diploide. Hay algún lugar en el orden de unos cientos de miles de genes, incluidas las regiones de codificación, 5' y 3' regiones no traducidas, intrones, 5' y 3' de ADN que flanquea. También presenta en el genoma segmentos estructurales como ADN telomérico y centromérico y los orígenes de replicación, y el ADN intergénico.

Hibridación: La reacción mediante la cual se produce el emparejamiento de hebras complementarias de ácido nucleico. ADN es generalmente de doble cadena, y cuando se separan las hebras que se volverá a hibridar bajo las condiciones apropiadas. Los híbridos pueden formar entre el ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN. Se pueden formar entre una cadena corta y una larga cadena que contiene una región complementaria a la corta. Híbridos imperfectos también se forman, pero cuanto más imperfectas que sean, al menos estable que será (y es menos probable que se formen). Para "alineamiento" dos hebras es el mismo que para "hibridar" entre ellos.

Iniciador, cebador o Primer: Un pequeño oligonucleótido (de 6 a 50 nt de longitud) utiliza para la síntesis de ADN de primera. Las ADN polimerasas sólo son capaces de extender una pre-existente hebra a lo largo de una plantilla; no son capaces de tomar un solo filamento desnudo y producir una copia complementaria de ella de-novo. Por lo tanto, un cebador que se adhiere a la plantilla se utiliza para iniciar la replicación. Los iniciadores son necesarios para la secuenciación de ADN y PCR.

ITS: Espaciador transcrito interno, se refiere al ADN espaciador (ADN no codificante) situado entre el ARN ribosomal de subunidad pequeña (rRNA) y genes de ARNr de subunidad grande en el cromosoma o la región transcrita correspondiente en el transcrito precursor de ARNr policistrónico. En las bacterias y arqueas, ITS se encuentra entre los genes 16S y 23S rRNA. Por otro lado, hay dos de SUS en eucariotas; ITS1 se encuentra entre 18S y 5.8S rRNA genes, mientras que ITS2 está entre 5.8S y 25S (en las plantas, en los animales o 28S) rRNA genes

Kilobases (kb): Unidad de la longitud de los fragmentos de ADN igual a 1.000 nucleótidos.

Marcador de tamaño de peso molecular: una pieza de ADN de tamaño conocido, o una mezcla de piezas con tamaño conocido, utilizado en geles de electroforesis para determinar el tamaño del ADN desconocido por comparación.

Nucleótido: un bloque de construcción de ADN o ARN que consiste en una base nitrogenada (adenina, guanina, timina, o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo, citosina o en el ARN), una molécula de fosfato y una molécula de azúcar (desoxirribosa en el ADN y ribosa en ARN). Miles de nucleótidos se unen para formar una molécula de ADN o ARN.

Par de bases (pb): Un par de nucleótidos complementarios dentro de una hebra dúplex de un ácido nucleico. Bajo las reglas de Watson-Crick, estos pares se componen de una pirimidina y purina uno: es decir, CG, AT (ADN) o AU (ARN). Sin embargo, "no canónicos" pares de bases (por ejemplo, GU) son comunes en el ARN estructura secundaria.

Reacción en cadena de la polimerasa: Una técnica para la replicación de una pieza específica de ADN in vitro, incluso en presencia de un exceso de DNA no específica. Se añaden cebadores (que inician la copia de cada hebra) junto con nucleótidos y Taq polimerasa estable al calor. Por ciclo de temperatura, el ADN diana es repetitivamente desnaturalizado y copiado. Debido a que las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir posteriormente como plantillas adicionales para las mismas secuencias de los cebadores, las sucesivas rondas de hibridación del cebador, elongación hebra, y disociación producen amplificación rápida y altamente específica de la secuencia deseada. PCR también se puede utilizar para detectar la existencia de la secuencia definida en una muestra de ADN. Una sola copia del ADN diana, aunque mezclado con otro ADN indeseable, puede amplificarse para obtener miles de millones de repeticiones. PCR puede usarse para amplificar secuencias de ARN si se convierten primero a ADN a través de la transcriptasa inversa. Este procedimiento de dos fases se conoce como "RT-PCR".

Replicación: El acto de una célula de hacer una copia de toda o alguna parte de su ADN genómico.

Replicación del ADN: El uso del ADN existente como plantilla para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. En los seres humanos y otros eucariotas, la replicación se produce en el núcleo de la célula.

RNasa: Ribonucleasa; una enzima que degrada el ARN. Es ubicuo en los organismos vivos y es excepcionalmente estable.

Secuencia: Como sustantivo, la secuencia de un ADN que es una palabra de moda para la estructura de una molécula de ADN, en términos de la secuencia de bases que contiene. Como verbo, "a la secuencia" es determinar la estructura de una pieza de ADN; es decir, la secuencia de nucleótidos que contiene.

Secuencia conservada: una secuencia de bases en una molécula de ADN (o una secuencia de aminoácidos en una proteína) que ha permanecido esencialmente sin cambios a lo largo de la evolución. Los más similares que hay, las más altamente conservadas son dos secuencias.

Secuencia codificante: La porción de un gen o un ARNm que en realidad codifica para una proteína. Los intrones no son secuencias de codificación; ni son las regiones 5' o 3' no traducidas (o las regiones de acompañamiento, para el caso - ni siquiera se transcriben en ARNm). La secuencia de codificación en un ADNc o ARNm maduro incluye todo, desde AUG (o ATG) codón de iniciación hasta el codón de terminación, inclusive.

Secuencias complementarias: secuencias de bases de ácido nucleico que pueden formar una estructura de doble hebra, haciendo coincidir pares de bases; la secuencia complementaria a G- T- A- C es C- A- G T.

Secuenciación: Determinación del orden de nucleótidos (secuencias de bases) en una molécula de ADN o ARN o el orden de los aminoácidos en una proteína.

Taq polimerasa: una polimerasa de ADN aislado de la bacteria *Thermophilus aquaticus* y que es muy estable a altas temperaturas. Se utiliza en los procedimientos de PCR y secuenciación de alta temperatura.