

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



Caracterización molecular de bacterias y hongos asociados al crecimiento y concentración de N, P y K, en cuatro especies forestales, desarrolladas con distintos métodos de propagación

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE

BACH. PEÑA YACILA, KARLA ANDREA

TUMBES – PERÚ

2019

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



Caracterización molecular de bacterias y hongos asociados al crecimiento y concentración de N, P y K, en cuatro especies forestales, desarrolladas con distintos métodos de propagación

APROBADA EN CONTENIDO Y FORMADA POR:

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente

Dra. Teresa Quevedo Narváez
Secretario

Mg. César Yoel Feijoo Carrillo
Vocal

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE



Caracterización molecular de bacterias y hongos asociados al crecimiento y concentración de N, P y K, en cuatro especies forestales, desarrolladas con distintos métodos de propagación

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

Bach. Karla Andrea Peña Yacila
Ejecutor

Dr. Luis Alberto Bermejo Requena
Asesor

Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera
Co-asesor

Mg. Luis Xavier Llacsá Sanchez
Co-asesor



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
 ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA
 FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE
 CAMPUS UNIVERSITARIO S/N "LA CRUZ"
 SECRETARIA ACADEMICA
 TUMBES - PERU



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los 24 día del mes de Abol de dos mil diecinueve, se reunieron en los ambientes de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, los integrantes del jurado designados, según Resolución Decanal Nº 109-2017/UNTUMBES-FCA (31-05-2017) y con Aprobación del Proyecto de Tesis, según Resolución Nº 037-2018/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D (03-04-2018); con el objeto de evaluar la sustentación de la tesis denominada: **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS Y HONGOS ASOCIADOS AL CRECIMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE N,P,K EN CUATRO ESPECIES FORESTALES, DESARROLLADAS CON DISTINTOS MÉTODOS DE PROPAGACIÓN"** , PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL Y DEL MEDIO AMBIENTE.

A las once horas con diez minutos y, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el presidente del jurado dio por iniciado el acto.

Luego de la exposición del trabajo, la formulación de preguntas y la deliberación del jurado lo declararon aprobada por Unanimidad con el calificativo de Muy Bueno.

Por lo tanto la Bachiller, **PEÑA YACILA KARLA ANDREA**, queda apta para que el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Tumbes, les expida el Título Profesional de Ingeniero Forestal y del Medio Ambiente de conformidad con lo estipulado en el Artículo 90 del Estatuto de la Universidad Nacional de Tumbes y a lo normado en el Reglamento de Grados y Títulos.

Siendo las once horas con cinco minutos, el presidente del jurado dió por concluido el presente acto académico y para mayor constancia de lo actuado firman en señal de conformidad todos los integrantes de este jurado, presentes en el acto de sustentación.

Dr. CARLOS ALBERTO DEZA NAVARRE
 Presidente

Dra. Teresa Edith Quevedo Narváez
 Secretaria

Ing. CESAR YOEL FELJOO CARRILLO
 Vocal

RESUMEN

En los últimos 5 años el Perú ha perdido un promedio 120 782 hectáreas (ha) de bosques producto de la descontrolada extracción de especies maderables como *Tabebuia billbergii*, *Loxopterygium huasango*, *Centrolobium ochroxylum* y *Cinchona pubensces*, las cuales se encuentran protegidas por la legislación peruana. Así mismo, la baja viabilidad de las semillas y los planes de restauración no han sido muy eficientes en sus resultados debido a su alta tasa de mortalidad a los 3 meses del trasplante. Teniendo en cuenta esa problemática y haciendo uso de la biotecnología, es posible mejorar la reproducción de especies forestales mediante asociaciones de microorganismos benéficos que existen interactuando en el suelo con la planta, optimizando así su desarrollo fisiológico. Por lo tanto, se utilizaron técnicas microbiológicas para el aislamiento de bacterias y hongos, pruebas de antagonismo y detección de hormonas vegetales como el ácido indolacético. Los microorganismos fueron caracterizados molecularmente, mediante el gen 16S ARNr para bacterias y gen ITS en el caso de hongos. Asimismo, se evaluó la compatibilidad fisiológica de los microorganismos, con el fin de tener un consorcio microbiano, el cual fue inoculado a estacas y acodos de las especies antes descritas, y fueron evaluadas por 60 días para observar el comportamiento radicular de cada una de ellas.

Palabras claves: Rizobacterias, micorrizas, ácido indoleacético, antagonismo.

SUMMARY

In the last 5 years Peru has lost an average 120 782 hectares (ha) of forests due to the uncontrolled extraction of timber species such as *Tabebuia billbergii*, *Loxopterygium huasango*, *Centrolobium ochroxylum* and *Cinchona pubensces*, which are protected by Peruvian legislation. On the other hand, the low viability of the seeds and the restoration plans have not been very efficient in their results due to their high mortality rate 3 months after the transplant; taking into account this problem and the provision of biotechnology for the improvement of forest species through the associations of beneficial microorganisms that exist interacting in the soil with the plant thus allowing its physiological development. In this sense, biotechnological techniques were used that allowed us to characterize the native microbiota of each tree under study. In this work, each of the microorganisms was studied, making them compatible one with the other, whose purpose was to have a consortium of it, so that later they could be inoculated in the layers and stakes and thus be able to evaluate their behavior during the 60 calendar days.

Keywords: Rhizobacteria, mycorrhizae, indoleacetic acid, antagonism

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO | |
| 2.1. Antecedentes..... | 12 |
| 2.2. Bases teóricas – científicas..... | 16 |
| 2.3. Definición de términos básicos..... | 22 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS. | |
| 3.1. Fase de campo..... | 24 |
| 3.1.1. Recolección de muestras de suelo..... | 24 |
| 3.1.2. Colecta de estacas..... | 24 |
| 3.1.3. Realización de acodos..... | 24 |
| 3.2 Fase de laboratorio..... | 25 |
| 3.2.1. Aislamiento de bacterias..... | 25 |
| 3.2.2. Aislamiento de hongos..... | 25 |
| 3.2.3 Identificación molecular de bacterias..... | 25 |
| 3.2.3.1. Amplificación de la PCR..... | 26 |
| 3.2.3.2. Migración del gel de electroforesis al 1% para ADN genómico..... | 27 |
| 3.2.3.3. Migración del gel de electroforesis al 1.5%..... | 27 |
| 3.2.3.4. Secuenciación de los productos de la PCR..... | 28 |
| 3.2.3.5. Identificación molecular de hongos..... | 28 |
| 3.2.9 Amplificación de la PCR..... | 29 |
| 3.2.10 Migración del gel de electroforesis al 1% para ADN genómico..... | 29 |
| 3.2.11 Migración del gel de electroforesis al 1.5%..... | 30 |
| 3.2.12 Secuenciación de los productos de la PCR para la secuenciación..... | 30 |
| 3.2.13 Prueba de antagonismo..... | 30 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.14 | Cultivos trampas para la captación de hongos..... | 30 |
| 3.2.15 | Prueba de temperatura..... | 31 |
| 3.2.16 | Prueba de salinidad..... | 31 |
| 3.2.17 | Producción de ácido indolacético..... | 31 |
| 3.2.18 | Cuantificación de ácido indolacético..... | 31 |
| 3.2.19 | Curva patrón de ácido indolacético..... | 31 |
| 3.2.20 | Bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos..... | 32 |
| 3.2.21 | Bacterias y hongos solubilizadores de potasio..... | 32 |
| 3.2.22 | Preparación del inóculo a base de bacterias y hongos.... | 32 |
| 3.2.23 | Inoculación del preparado de bacterias y hongos en estacas y acodos..... | 33 |

4. RESULTADOS

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1. | Obtención de las muestras..... | 34 |
| 4.2. | Identificación macroscópica..... | 34 |
| 4.3. | Identificación microscópica..... | 35 |
| 4.4. | Visualización de ampliaciones mediante la electroforesis..... | 37 |
| 4.5. | Análisis y comparación de las secuencias obtenidas con el Blast.. | 38 |
| 4.6. | Compatibilidad bacteriana..... | 39 |
| 4.7. | Cultivos trampas para los hongos y hongos micorrízicos..... | 40 |
| 4.8. | Prueba de salinidad..... | 41 |
| 4.9. | Prueba de temperatura..... | 43 |
| 4.10. | Curva patrón del ácido indolacético..... | 44 |
| 4.11. | Producción de ácido indolacético, a través de la fermentación bacteriana..... | 45 |
| 4.12. | Microorganismos solubilizadoras de potasio..... | 47 |
| 4.13. | Microorganismos solubilizadoras de fósforo..... | 48 |
| 4.14. | Efecto del consorcio microbiano sobre las estacas..... | 49 |
| 4.15. | Análisis de la evaluación de estacas de <i>Cinchona pubescens</i> | |
| 4.15.1. | Número de hojas | 49 |
| 4.15.2. | Longitud de las hojas..... | 51 |
| 4.15.3. | Número de raíces..... | 52 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.15.4. | Longitud de raíces..... | 54 |
| 4.16. | Especie: <i>Loxopterygium huasango</i> | |
| 4.16.1. | Número de hojas..... | 57 |
| 4.16.2. | Longitud de las hojas..... | 59 |
| 4.17. | Especie: <i>Tabebuia billbergii</i> | 62 |
| 4.17.1. | Número de hojas..... | 62 |
| 4.17.2. | Longitud de las hojas..... | 64 |
| 4.17.3. | Número de raíces..... | 64 |
| 4.17.4. | Longitud de raíces..... | 68 |

5. DISCUSIONES..... ¡Error!

Marcador no definido.

6. CONCLUSIONES..... ¡Error!

Marcador no definido.

7. RECOMENDACIONES..... ¡Error!

Marcador no definido.

8. BIBLIOGRAFÍA..... ¡Error!

Marcador no definido.

9. ANEXOS..... ¡Error!

Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coordenadas geográficas UTM 17 Sur de los árboles de *Loxopterygium huasango* muestreados..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2 Coordenadas geográficas UTM 17 Sur de los árboles de *Centrolobium ochroxylum* muestreados..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 03: Coordenadas geográficas UTM 17Sur de los árboles *Tabebuia billbergii* muestreados**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla N° 04: Comparación de las secuencias de bacterias analizadas mediante el Blast.....**¡Error! Marcador no definido.**

TABLA N° 05: comparación de las secuencias de hongos analizados mediante el Blast**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla N° 06: código de cada una de las bacterias, para poder observar su compatibilidad microbiana, los colores muestran la adición de la bacteria en la base. El signo (+) muestra la compatibilidad que existen entre cada bacteria, mientras que el signo (-) muestra la incompatibilidad o antagonismo entre bacterias..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 7: Evaluación del efecto de los hongos con relación al peso (g) de la raíz y a la hoja.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 8: concentración y absorbancia de las muestras..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 9: concentración y absorbancia de cada una de las cepas bacterianas....**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 10: promedio de las repeticiones del conteo de números de hojas, especie *Cinchona pubescens*..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 11: Análisis de varianza para el número de hojas en la especie de *Cinchona pubescens***¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 12: Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 13: Evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de las hojas a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 14: análisis de varianza del número de hojas de la especie de *Cinchona pubescens* **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 15: Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 16: Evaluación del promedio de las repeticiones del número de las raíces a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 17: Análisis de varianza para el número de las raíces, en la especie de *Cinchona pubescens* **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 18: Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 19: Evaluación del promedio de las repeticiones de las longitudes de las raíces a los 60 días .. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 20: Análisis de varianza para el número de las longitudes de raíces en la especie de *Cinchona pubescens*..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 21: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 22: Evaluación de los promedio de las repeticiones del número de hojas a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 23: análisis de varianza del número de hojas de la especie, *Loxopterygium huasango* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 24: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 25: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de las hojas a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 26: Análisis de varianza para la longitudes de las hojas en la especie *Loxopterygium huasango* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 28: Evaluación de los promedio de las repeticiones del número de hojas a los 60 días. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 29: análisis de varianza para el número de las hojas en la especie *Tabebuia Bilbergi* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 30: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos Longitud de hojas **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 31: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de . hojas a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 32: análisis de varianza para las longitudes de las hojas en la especie *Tabebuia Bilbergi* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 33: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Número de Raíces **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 34: evaluación de los promedio de las repeticiones del número de raíces a los 60 días **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 35: Análisis de varianza para número de raíces en la especie *Tabebuia Bilbergi* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 36: Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos Longitud de raíces. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 38: análisis de varianza para las longitudes en las raíces de la especie *Tabebuia Bilbergi* a los 60 días calendario **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 39: resultados de las diferencias significativas entre los tratamiento73

Tabla 40: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de raíces a los 60 días

¡Error! Marcador no definido.

Tabla 41: análisis de varianza para el número de raíces en la especie de *Cinchona pubescens* ¡Error!

Marcador no definido.

Tabla 42: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos Longitud de raíces. ¡Error!

Marcador no definido.

Tabla 43: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de raíces a los 60 días

..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 44: análisis de varianza para la longitud de raíces en la especie de *Cinchona pubescens* ¡Error!

Marcador no definido.

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los países ricos en recursos forestales; pero a pesar de sus esfuerzos para la conservación de su biodiversidad, el país en estos últimos años se ha visto sujeto a la explotación irracional y a la destrucción de sus bosques. Anualmente se calcula que se pierde en promedio 120 782 hectáreas (ha) de bosques cuya principal causa es la deforestación, advirtió el Ministerio de Agricultura y Riego (Gestión 2016). Por otro lado, entre los años 2001 y 2014, los departamentos de San Martín, Loreto, Ucayali y Huánuco, fueron los departamentos que acumularon más pérdidas de bosques con 359 945 ha, 316 175 ha, 269 191 ha y 242 018 ha, respectivamente (MINAGRI 2016).

Tumbes es uno de los departamentos en la costa que no se queda atrás con el tema de la tala ilegal; se estima que por año se pierde un aproximado de 400 hectáreas, siendo las especies afectadas: Algarrobo, Zapote, Palo Santo, Palo Amarillo, Faique, Hualtaco y Guayacán. Cabe resaltar que estas especies le prestan seguridad económica potencial a los traficantes de madera, cuya principal causa es la escasa vigilancia y control en el bosque, siendo las carreteras las principales vías transporte en todo tipo de vehículo y que posteriormente son distribuidas hacia diversos puntos de la región. La falta de coordinación entre las comunidades rurales y autoridades responsables de proteger los bosques, trae consigo la poca comprensión de su valor ecológico y el desconocimiento de los servicios ambientales que brindan, tales como: barrera contra el desierto, albergue de aves para promover el ecoturismo, protección de suelos, fuente de alimento, hogar de fauna diversa, entre otros (Herrera 2018).

La extracción irracional de las especies nativas y la ausencia de estudios, obliga no solo a mejorar los métodos de conservación, sino también a mejorar los métodos de propagación vegetativa sexual o asexual y además de la calidad del material de siembra. La investigación de las especies forestales ha venido desarrollándose de manera tradicional en muchos lugares del

Perú; gracias a programas de mejoramiento se han implementado estrategias para la producción de plántones en vivero, mejorando los sistemas de riego, los sustratos, así como los recipientes de los sustratos. Sin embargo, no se ha dispuesto de la biotecnología para la mejora de especies forestales nativas producidas en vivero, más allá de la micropropagación (Morales 2019)

Las especies forestales *Tabebuia billbergii*, *Loxopterygium huasango*, *Centrolobium ochroxylum*, *Cinchona pubescens*, actualmente son consideradas en peligro de extinción, debido a que su propagación por germoplasma es de baja viabilidad, además de ser utilizado selectivamente como materia prima para la fabricación ilegal de parquet. Asimismo, la ampliación de la frontera agrícola y ganadera está amparada por el marco de las normas legales vigentes por ser considerados terrenos eriazos; de igual manera el sobrepastoreo que no permite la regeneración natural de estas especies amenazadas (Leal y Linares 2005).

Bajo este contexto, en esta investigación se utilizaron las herramientas biotecnológicas, evaluándose la aplicación de microorganismos benéficos nativos y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de especies forestales nativas, con diferentes métodos de propagación (estacas y acodos). Por lo tanto, se aislaron rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos asociados a la micorriza arbuscular, que colonizaron las raíces de las plantas, y al hacerlo, promueven su crecimiento y/o reducen las enfermedades producidas por patógenos (Antoun y Prévost, 2006), contribuyendo así en el conocimiento científico y se pueda aplicar extensivamente en otras especies forestales.

2. MARCOS DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

2.1. Antecedentes

En estudios realizados por Barreto *et al.* (2007), aislaron microorganismos rizosféricos y los evaluaron sobre la germinación y el crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*, mediante la inoculación de bio-preparados a base de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPVC), nativos de la especie arbórea; para ello, estandarizaron un medio de cultivo denominado agar extracto de suelo, el cual contenía solo los nutrientes aportados por el suelo rizosférico y la raíz, obteniendo así el crecimiento de las bacterias que resisten un bajo aporte de nutrientes.

Así mismo, López (2011), evaluó cuatro especies forestales leñosas: *Acacia macracantha*, *Acacia farnesiana*, *Luehea candida* y *Guazuma ulmifolia* de selva baja caducifolia en Veracruz. El objetivo fue mejorar el desarrollo de las plántulas de las de las especies en estudio, con una edad de dos meses, mediante la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento. Las cepas bacterianas fueron aisladas a partir de la rizósfera de *Citrus volkameriana*. La respuesta de las especies a la inoculación fue diferente entre ellas. *Acacia farnesiana* y *Acacia macracantha* durante el período de crecimiento respondieron de manera distinta a *Luehea candida* y *Guazuma ulmifolia*, concluyendo que no todos los microorganismos tienen el mismo efecto en cada una de las especies.

Bécquer *et al.* (2013), determinaron que las bacterias rizosféricas tienen influencia en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus*, utilizando cepas procedentes del cepario de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus, Cuba. Otras provenían de Alberta Research Council y de Agriculture and Agri-Food Canadá. Para la inoculación aplicaron un diseño experimental

completamente aleatorizado, con diez tratamientos y diez repeticiones, evaluaron el porcentaje de germinación, incremento de la germinación con respecto al testigo, longitud de la radícula y longitud de la plúmula; tuvieron como resultado que en la germinación, los tratamientos con las cepas MSDJ865 (100%) y ATCC9039 (100%), presentaron valores superiores al resto, con incremento de 40% con respecto al testigo, En la longitud de la plúmula, los tratamientos con ATCC9039 (19.10 mm), ATCC7486 (19.22 mm) y ORS534 (19.11 mm) resultaron superiores al testigo. En longitud de la radícula, los tratamientos HA1 (46.10 mm), ORS534 (45.33 mm) y ATCC9039 (44.30 mm) fueron superiores al testigo y a la mayor parte de los tratamientos.

Estudios en la especie *T. billbergii*, demostraron que la comunidad fúngica asociada a la rizósfera está dominada por los filos *Glomeromycota* y *Ascomycota*, siendo el género más abundante *Rhizophagus* que corresponde a una micorriza arbuscular que ha sido identificada estando asociada a la rizósfera de *T. chrysantha* en los bosques de Tumbes (Llacsá, 2016). Estos hongos micorrízicos arbusculares son microorganismos del suelo que son capaces de formar simbiosis con el 80% de las plantas terrestres, logrando formar arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan (Giovanetti *et al.*, 1998). La asociación simbiótica entre la planta y el hongo, actúa como un complemento de la raíz en donde la planta toma nutrientes, especialmente en la absorción de fósforo (Colozzi, 2000). Desde el punto de vista nutricional, el crecimiento de la planta debido al aumento en la absorción de fósforo (P) es el principal beneficio que obtiene de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), por la baja disponibilidad de este elemento, característico en los suelos tropicales. Sin embargo, si el P no es un elemento limitante en el suelo, la simbiosis puede llegar a ser reducida o hasta inhibida si se encuentran altos niveles en el suelo (Blancof *et al.*, 1997).

2.2. Bases teóricas-científicas

2.2.1. Descripción de las especies en estudio.

La especie de ***Centrolobium ochroxylum*** tiene un área de distribución que abarca desde Centro América (Panamá) hasta Sudamérica (Bolivia y Brasil). La distribución de la especie en Bolivia aún no está debidamente determinada (Chichiguad *et al.*, 1990). Es un árbol de porte mediano hasta grande de 25 a 30 m de altura y hasta 100 cm de diámetro altura del pecho (DAP); copa globosa hasta asimétrica de color verde claro intenso, frondosa con ramificación irregular y con muchas ramas gruesas, fuste cilíndrico, recto, con 5 a 7 aletones de pequeños a medianamente desarrollados tornando la base algo sinuoso (Justiniano *et al.*, 2008).

La especie ***Tabebuia billbergii***, está compuesto por un gran número de especies estrictamente leñosas. Su distribución geográfica abarca grandes regiones del trópico y subtropical americano, en el ámbito regional una parte de este género está presente en algunos países de América del Sur que son muy conocidos por la calidad de la madera que se extrae de un grupo selecto de sus especies, las cuales están consideradas entre las más pesadas y durables de la Amazonía (Gentry, 1992).

La especie ***Loxopterygium huasango***, es un árbol caducifolio de hasta 30 m de alto y 80 cm de DAP, el tronco es un poco oscuro casi negro con una corteza se desprende en unas placas rectangulares. Las hojas son de 40 a 60 cm de largo, compuestas imparipinnadas, alternas, sus foliolos de 4 a 6 cm, de ápice agudo y base obtusa. Las inflorescencias en panículas axilares, sus flores son muy pequeñas de color blanco, el cáliz es de cinco sépalos de color verde y corola cuenta con cinco pétalos de color blanco. Su fruto es una sámara de color café cuando están climatéricos, de 1 a 1,5 cm y estos son dispersados generalmente por el viento (Cueva, 2005).

La especie ***Cinchona pubescens*** es un árbol siempre verde de 10 a 25 m de altura, con un DAP de 20 a 80 cm. En su lugar introducido, por ejemplo, en Galápagos, los árboles pueden alcanzar una altura de 15 m y un DAP de 25 cm, Las hojas son opuestas, de forma elíptica u ovada, con pecíolos pubescentes y estípulas caducas, que a menudo dejan una cicatriz muy marcada en la rama (Jäger, 2011).

2.2.2. Propagación asexual.

Dentro de la propagación sexual y asexual se utilizan técnicas que han logrado una rápida aceptación en la industria, asimismo se practica tanto en especies ornamentales y leñosas. El principal objetivo es multiplicar con eficacia una planta produciendo individuos con un fenotipo similar al del individuo parental (García, Quintero y López 2004).

Las estacas de muchas especies enraízan con facilidad en una gran diversidad de medios, como suelo, arena, turba, vermiculita, piedra pómez, perlita, agregados de plástico sintéticos y corteza desmenuzada como aserrín o virutas de madera (Richards *et al.*, 1964; Bures, 1997).

2.2.3. Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR):

La actividad microbiana en la rizósfera puede tener efectos positivos como negativos sobre las plantas. Existen algunos procesos benéficos de esta actividad que es minimizar o modificar el comportamiento en el enlace de la producción y del ambiente. El conocimiento es muy amplio en cuanto a las interacciones que pueden tener los microorganismos asociados y la planta en o alrededor de la raíz (Lynch y Whipps 1990).

Hoy en día existe un marcado interés en manejar la rizósfera, así como estudiar los efectos de ciertos microorganismos sobre el desarrollo de las plantas (Schreiner *et al.*, 1997).

Según Kloepper definió en 1978, a estas bacterias de vida libre, encontradas en la rizósfera de las plantas como Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, que viene de la denominación Plant Growth Promoting Rhizobacteria), éstas demostraron ser microorganismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar sus defensas frente a otros microorganismos causantes de enfermedades”. Existe una polémica en la denominación de las bacterias promotoras de crecimiento, como denominarlas (BPCP) considerado como un grupo de diferentes especies de bacterias que logran incrementar el crecimiento y productividad vegetal (Bach, Álvarez & Díaz 2009)

Los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*, son los más conocidos dentro del grupo de las bacterias promotoras de crecimiento, en donde la bacteria logra afectar a la planta anulando a otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), logrando mejorar el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguin 1998).

Los microorganismos como *Azospirillum* sp., *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, son capaces de producir su propio ácido indolacético (AIA), una de las auxinas naturales más importantes dentro del crecimiento y desarrollo de la planta; aunque existen otros compuestos denominados auxinas sintéticas que producen efectos similares al AIA y se utilizan en la práctica agrícola (Patten & Glick 1996).

2.2.4. Beneficios de las PGPR en las plantas:

Estimulación directa del metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal. A través de este mecanismo se desarrollan procesos de asociación simbiótica de bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae (comúnmente conocidas como *Rhizobium*) con las leguminosas. Estas bacterias inducen en la planta la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, en donde se alojan como simbioses intracelulares y fijan nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta. Por medio del manejo de los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno (*Rhizobium* - leguminosa, *Frankia* - casuarina, *Anabaena* - Azolla) es posible contribuir al enriquecimiento de la fertilidad del suelo (Bach Álvarez & Díaz 2009).

Tipos de bacterias promotoras de crecimiento.

Se han realizado estudios que han identificado una variedad de bacterias que promueven directamente el crecimiento de plantas como: *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Metanobacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azoarcus*, *Zoogloea*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Pseudomonas* (López Ceballos, 2011).

Género *Rhizobium*.

Comprobaron que estos son bacilos que miden 0.5 - 1.0 x 1.2 - 3.0 μm . Se mueven por medio de 1 a 6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semi-translúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en el medio de cultivo Agar Manitol Extracto de Levadura YMA. El crecimiento en medio de glúcidos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de gelatina polisacárido

extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de glúcidos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género son *Rhizobium* de rápido crecimiento productoras de ácido en un medio YMA. Hay nueve especies definidas: *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. Nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales (Wang, Martínez Romero, & López, 2002)

Género Bacillus

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn (1872), quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae. Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados: a) el grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye a *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo que incluye a *Bacillus* sp. NRRLB-14911-coahuilensis (Alcaraz *et al.*, 2010; LPSN, 2016).

Micorrizas

Las micorrizas son una simbiosis mutualista de carácter biotrófico en la que el huésped autótrofo (planta), proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al simbionte heterótrofo (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).

Las endomicorrizas son capaces de invadir las células vivas de la raíz, la cuales se llenan de grupos de micelios. Los hongos micorrícicos ocupan una variedad ecológica, dentro de los microorganismos que colonizan la rizósfera, ya que son los únicos que están parcialmente dentro y fuera del hospedador. En la parte interior de la raíz, el hongo no compite con otros microorganismos del suelo. Las denominadas vesículo-arbusculares (VA), en las que las hifas fúngicas forman racimos intracelulares, son una forma generalizada de endomicorrizas (Atlas & Bartha, 2002).

Beneficios de los hongos micorrícicos arbuscular.

Las raíces de las plantas, tiene una de las asociaciones simbióticas más importantes con los microorganismos del suelo, la cual es efectuada por algunos hongos de la clase Zygomycetos, que habitan en los suelos con una amplia distribución en las zonas áridas y semiáridas; dando origen a la asociación micorrízica arbuscular (MA) que tiene una función de suma importancia en la productividad vegetal de los suelos tropicales (Bethlenfalvay, 1992; Diederichs y Moawad, 1993, Barea *et al.*, 2000).

Las micorrizas están dispersas en la mayoría de las comunidades vegetales, además de jugar un papel importante en la mejora de las propiedades químicas y el aspecto físico de los suelos; así como el aumento de las poblaciones microbianas (Stahl *et al.*, 1988; Dannowski y Werner, 1997).

Los principales grupos son micorrizas arbusculares y ectomicorrizas, reconocidas en la base de su morfología y el hongo, la importancia de los HMA en la agricultura radica en que por su extenso micelio extraradical se forma un vínculo entre la planta y el suelo debido a que

al darse la asociación planta-hongo, las plantas micorrizadas presentan ventajas en cuanto a la absorción de nutrientes de poca movilidad (como el P) con respecto a las plantas no micorrizadas, ya que en las primeras el micelio externo se extiende a una mayor (Hayman y Tavares, 1985; Harrison, 1997).

2.2.5. Auxinas

El ácido indolacético (AIA) es la auxina natural que se encuentra en las plantas. Su efectividad como promotor del enraizamiento es generalmente menor que la de otros compuestos sintéticos. Esto se debe a que las plantas poseen mecanismos que remueven el AIA de sus sistemas, conjugándolo con otros compuestos o destruyéndolo, lo cual reduce su efectividad; también, al ser soluble en agua es fácilmente lavado del sitio de aplicación, con lo cual obviamente deja de ejercer su efecto (Blazich, 1988).

2.3. Definición de términos básicos

El ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria (Ferrer, Sergio, 2011).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es una técnica de amplificación “in vitro” de secuencias específicas de DNA. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el DNA presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de DNA (Chesters, J.K. 1996).

Marcadores moleculares La utilización de marcadores moleculares implica la identificación, mediante técnicas bioquímicas muy perfeccionadas, de las variaciones de moléculas celulares como el ADN y las proteínas. (Rivera, *et al.*, 1998)

ITS: Espaciador transcrito interno, se refiere al ADN espaciador (ADN no codificante) situado entre el ARN ribosomal de subunidad pequeña (ARNr) y genes de ARNr de subunidad grande en el cromosoma o la región transcrita correspondiente en el transcrito precursor de ARNr policistrónico (Kaushansky, 2001)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fase de campo

3.1.1. Recolección de muestra de suelo.

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

Dentro de la zona de amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape, se seleccionaron 4 árboles adultos de *Centrolobium ochroxylum*, *Loxopterygium huasango* y *Tabebuia billbergii* de los cuales se hicieron calicatas de 15 cm de profundidad y se tomó 100 g de suelo rizosférico, de igual forma se tomó una porción de raíces de 0.5 cm diámetro. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas cerradas, para ser llevadas al laboratorio para posteriormente su análisis. Y el mismo procedimiento se realizó en el departamento de Cajamarca, para la selección de árboles de *Cinchona pubescens*.

3.1.2. Colección de estacas.

La colecta se realizó siguiendo el método (Vogel *et al.*, 2008) evaluándose las características del árbol: diámetro, forma, longitud del fuste, grosor de la corteza, forma de la copa, tamaño, ángulo, densidad y resistencia a la ruptura de las ramas; densidad del follaje y profundidad de la copa. Aproximadamente se cortaron 192 ramas de 20-30 cm de largo por especie, las cuales fueron seleccionadas de la parte basal y media de la planta donante.

3.1.3. Realización de acodos.

La selección de acodos se realizó de la parte basal y media de la planta donante. Primero se seleccionó la rama a la cual se le realizó un anillo de corteza, siempre a unos 30 cm de la punta de la rama, para luego colocarle el sustrato inoculado y finalmente se tomó un pedazo de plástico transparente que cubrió la rama para luego sujetarlo. Se realizaron 192 acodos por especie.

3.2. Fase de laboratorio.

3.2.1. Aislamiento de bacterias.

El aislamiento se realizó a partir de las muestras de suelo rizosférico de los árboles en estudios en donde se utilizó la técnica de gránulos, la cual consiste en colocar gránulos en caja Petri con medio de cultivo ELMARC, con una distancia aproximada de 1 cm (Aquilanti *et al.*, 2004).

Las placas fueron incubadas a 30°C hasta que se logró observar colonias mucilaginosas alrededor de los gránulos. Una vez que se tuvieron las colonias, el siguiente paso fue estriarlas en otra placa Petri que contiene el mismo medio de cultivo hasta obtener colonias bacterianas puras, las que fueron comprobadas por microscopía.

3.2.2. Aislamiento de hongos

Los aislamientos se realizaron a partir de las raíces colectadas, realizándose dos procedimientos, el primero mediante desinfección según la metodología de Ferrera (1993), que consiste en sumergir los trozos de raíces cortadas de forma longitudinal, en alcohol de 96% por un periodo de 10 segundos, luego se enjuaga con agua destilada estéril por 10 segundos, este procedimiento se repite dos veces, y luego un tratamiento con hipoclorito de sodio durante un periodo de 3 min. Finalmente se enjuagó entre cinco a seis veces con agua destilada estéril y se sembraron los tallos en medio de cultivo agar

papa dextrosa (PDA). Para poder aislar los hongos existentes en la raíces, se le hace un corte longitudinal y se coloca en la placa que contiene el medio de cultivo, para luego incubarlas a temperatura ambiente por un tiempo de 5 días. Luego de observar crecimiento de hifas alrededor de los trozos, se procede a sembrar a una nueva placa, con el fin de obtener cultivos puros.

3.2.3. Extracción de ácidos nucleicos en bacterias y hongos.

La extracción de ADN de bacterias y hongos fue realizada siguiendo el protocolo estandarizado por Gustincich *et al.* (1991), adaptado para células bacterianas según Dulanto (2013).

Al microtubo con las células microbianas (50 mg) se le agregó 600 μ L de solución DTAB (dodeciltrimetilamonio bromuro 8%, NaCl 1,5 M, Tris HCl 100 mM pH 8,8 y EDTA 50 mM) y con ayuda de micropistilos plásticos se homogenizó; con el fin de ayudar a la lisis celular se aplicó shock térmico, el cual se incubó a 100°C por 10 minutos para luego colocarlo rápidamente a 2°C por 5 minutos.

Luego se agitó en vortex por 20 segundos. Después, se adicionó 700 μ L de cloroformo HPLC y se agitó nuevamente en vortex por 20 segundos. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se transfirió 250 μ L del sobrenadante a otro microtubo que contiene previamente 100 μ L de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 μ L de agua destilada. Este nuevo microtubo se incubó a 75 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Inmediatamente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150 μ L de solución disolvente (NaCl 1,2 M) para incubarse a 75°C durante 5 minutos. Luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió 150 μ L de la solución a un nuevo microtubo que previamente contuvo 300 μ L de etanol absoluto. Este nuevo microtubo se agitó en vortex por 20 segundos y se centrifugó a 13000 rpm

durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN, prontamente se coloca el microtubo hacia abajo para que escurra toda la solución colocándolo sobre papel desechable, se esperó que el microtubo no contenga más de la solución, solo el pellet para agregarle agua ultrapura, se agitó en vortex para luego incubarlo a 75 °C por 5 minutos. Culminada la extracción se almacenó a -20 °C.

3.2.4. Migración en gel de electroforesis al 1% para visualización de ADN genómico

El producto obtenido de la extracción de ADN, fue migrado en un gel de agarosa al 1% para visualizar la presencia del ADN genómico. Se agregó 0.5 gr. de agarosa y 50 ml de TAE 1X en un matraz de 250 ml. El cual se homogenizó para luego llevarlo a calentar por un promedio de 3-4 min. Tiempo en cual la solución se torna de un color transparente, se deja enfriar por un lapso de 5 min, y se le agrega 3 uL de bromuro de etidio, ya que es un agente intercalante de ácidos nucleicos.

Se utilizó Blue/Orange Loading Dye 6X como tampón de depósito a una relación 5:1 uL por cada muestra. La migración del ADN se llevó a 90 V por 30 min, colocando posteriormente el gel de agarosa en el transiluminador UV.

3.2.5. PCR para gen 16S ARNr en bacterias.

La amplificación de la región específica del ADN bacteriano se realizó a través de la técnica de PCR (Reacción de la cadena Polimerasa) utilizando los cebadores universales 8F y 1510R descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud, et. al, 2003).

El volumen final de cada reacción es 20 uL, constituido por 2 uL de buffer Taq 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 pmol de cada cebador (8F 5'-AGA

GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y 1510R 5'-GGC TAC CTG TTA CGG A-3') y 2 uL de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y se programó un ciclo de 94 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

3.2.6. PCR para gen ITS en hongos

Para la amplificación de la región específica del ADN los hongos se realizaron a través de la técnica de PCR (Reacción de la cadena Polimerasa).

El volumen final de cada reacción fue 20 uL, constituido por 2 uL de buffer Taq 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 pmol de cada cebador (ITS1F 5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' y ITS4 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y 2 uL de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y se programó un ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 8 minutos.

3.2.7. Migración en gel de electroforesis al 1.5% para productos de PCR.

Los productos obtenidos de PCR fueron migrados en un gel de agarosa al 1.5% para observar si fueron de buena calidad. Para esto, se agregó 0.9 g de agarosa y 60 ml de TAE 1X en un matraz de 250 ml, se homogenizó y se calentó hasta que la solución se torne transparente, se dejó enfriar por 30 s y se agregó 3 uL bromuro de etidio agente intercalante marcador de ácidos nucleicos.

Se utilizó Blue/Orange Loading Dye 6X como tampón de depósito a una relación 5:1 uL por cada muestra. La migración del ADN se llevó a 70 V por 1 hora, colocando posteriormente el gel de agarosa en el transiluminador UV.

3.2.8. Secuenciación de los productos de la PCR.

Se utilizó 10 uL de los productos obtenidos por amplificación por PCR, y fueron colocados en microtubos de 0.2 mL. Además, se prepararon en microtubos de 0.2 mL alícuotas de 5 uL de cada cebador universales para el gen 16S ARNr e ITS. Estas fueron empacadas y enviadas a la empresa Macrogen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

3.2.9. Prueba de antagonismo.

De cada especie se seleccionaron 13 de 17 bacterias aisladas teniendo como referencia los diferentes géneros. Para poder comprobar y analizar la compatibilidad se procedió a utilizar el método de (Kumar *et al.*, 2015), en donde se le aplica 10 µL de caldo bacteriano, sembrado en medio líquido de cultivo LB (Luria Bertani) la cual fue vertida en placa que contenía medio de cultivo PCA (Plate Count Agar), se dejó reposar por cinco minutos y luego se procedió a colocar los discos, previamente estériles que contenían 10 uL de los diferentes caldos bacterianos. Las placas fueron incubadas a 30° por 48 horas.

3.2.10. Cultivos trampas para la captación de hongos.

Para observar la producción de raíces se inóculo en frijol con 10^6 número de esporas, el riego se hizo interdiario por la tarde y a los 30 días calendarios se realizó la evaluación.

Para observar la producción de la colonización de raíces por hongos micorrízicos, se colocó el cultivo trampa en una proporción 1:1 de limo estéril y sustrato de la rizósfera de cada uno de las especies en estudio.

3.2.11. Prueba de temperatura.

Las bacterias y hongos seleccionados fueron cultivados en medio PCA y PDA respectivamente, los cuales fueron posteriormente incubadas a 4°C, 30°C, 55°C y 70°C. En el caso de bacterias se evaluaron a las 48 horas y para los hongos a los 7 días.

3.2.12. Prueba de salinidad.

Inicialmente las células bacterianas fueron cultivadas en medio de cultivo líquido LB a 37° por 24 horas. Se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm mediante un espectrofotómetro, para luego ser sembradas en medio PCA (Plate Count Agar), para el caso de los hongos se utilizó medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa). Se utilizaron concentraciones de 5 ppt, 15 ppt y 20 ppt, según (Modificado de Sánchez et al., 2004). En el caso de las bacterias fueron evaluadas a las 72 horas y en el caso de los hongos a los 7 días.

3.2.13. Producción de ácido indolacético (AIA).

Para evaluar la producción de ácido indolacético en las bacterias seleccionadas, se siguió la metodología descrita por Sachdev et al., (2009). Se utilizó un medio de cultivo LB más triptófano al 1%, a este medio se le adicionó las bacterias seleccionadas previamente ya purificadas y crecidas a las 24 horas a 30°C, de las cuales se transfirieron 350 uL en tubos falcón de 15 mL, dejándose en agitación constante a 120 rpm por 96 horas a temperatura ambiente.

3.2.14. Cuantificación de ácido indolacético.

Para determinar la concentración de ácido indolacético se centrifugaron los cultivos bacterianos por 10 min a 14000 rpm, con el fin de sedimentar las células. Luego 1 mL de caldo sobrenadante se traspara a tubos de ensayos de 10 mL, que contiene 2 mL de reactivo de Salkowski, se deja reposar por 30 min a temperatura ambiente y luego se lee la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro

3.2.15. Curva patrón de ácido indolacético.

La curva patrón se realizó tomando concentraciones de 0.9, 1.87, 3.75, 7.5, 15, 30,60 ug/mL AIA (Sigma), la cual partió de una solución madre de 100 ug/ml. Se tomó 1 ml de cada concentración y se le adicionó 2 ml del reactivo de Salkowski (solución de ácido sulfúrico y cloruro férrico 40 mM), se dejó que reposar por 30 min a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro; la ecuación que relaciona la concentración de AIA, se halló en función a la lectura de la absorbancia.

3.2.16. Bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos.

La bacteria una vez purificada y crecida en caldo LB, se llevó a cabo la determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos, el procedimiento se hizo de forma directa, se colocó 10 uL de caldo bacteriano en las placas Petri que contenía medio de cultivo sólido que contiene 10 g $C_6H_{12}O_6$, 5 g Ca_3PO_4 , 0.25 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 g KCl, 0.1 g $(NH_4)_2 SO_4$, 20 g Agar, 1 L agua destilada (Nautiyal 1999). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Para el caso de los hongos, fueron reactivados en medio de cultivo PDA, y posteriormente fueron repicados en el mismo medio de cultivo sólido detallado anteriormente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 7 días.

3.2.17. Bacterias y hongos solubilizadores de potasio.

La bacteria una vez purificada y crecida en caldo LB, se llevó a cabo la determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos, el procedimiento se hizo de forma directa, se colocó 10 uL de caldo bacteriano en las placas Petri que contenía un medio de cultivo sólido que contiene 0.5 g de extracto de levadura, 10 g $C_6H_{12}O_6$, 5 g KNO_3 , 0.5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 g KCl, 0.1 g $MgSO_4$, 0.0001 g $MnSO_4$, 0.0001 g $FeSO_4$ y 15 g de agar (Correa, 2008), las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas

Para el caso de los hongos, fueron reactivados en medio de cultivo PDA, y posteriormente fueron repicados en el mismo medio de cultivo sólido detallado anteriormente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 7 días.

3.2.18. Preparación del inóculo a base de bacterias y hongos

Se preparó medio LB para hacer crecer las bacterias en tubos de 1 ml, se colocó 900 μ L del medio y 100 μ L de caldo bacteriano, se dejó incubar a 30 °C y a las 24 horas se hizo la lectura en el espectrofotómetro, una vez pasada las 24 y que hayan tenido 1×10^9 UFC, se inocula el medio que contiene bacterias, a un medio previamente esterilizado que contenía LB más triptófano, se dejó incubar por 96 horas con un movimiento de 120 rpm a una temperatura de 30 °C.

Se preparó medio PDA (agar papa dextrosa) para hacer crecer los hongos, se dejó a incubar las placas por 7 días y una vez que se observe esporulación, se hace el lavado de placa con TWEN 80, con la ayuda de la cámara de Neubauer, se realizó el conteo de las esporas llegando a 1×10^5 UFC/mL.

3.2.19. Inoculación del preparado de bacterias y hongos en estacas y acodos.

La inoculación del preparado bacteriano que contenía 1×10^9 UFC, se hizo en horas de la tarde, en donde se utilizaron 4 tratamientos los cuales fueron control (0 ml), T1 (5 ml), T2 (10 ml) y T3 (15 ml) respectivamente.

Las estacas fueron colocadas durante 1 hora en el inóculo bacteriano en las cantidades mencionadas anteriormente, luego fueron colocadas en bolsas con sustrato adecuado, después de 7 días se inició el riego.

A los 15 días se realizó la inoculación de los hongos, cada hongo a una concentración de 1×10^5 UFC, los tratamientos fueron evaluados durante 3 meses.

4. RESULTADOS.

4.1. Obtención de las muestras

La colección de las muestras de *Loxopterygium huasango*, *Centrolobium ochroxylum* y *Tabebuia billbergii*, se realizó en la zona de amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de amotape, específicamente en los sectores de Angostura y el Caucho.

Para la colección de las muestras de *Cinchona pubescens*, se hizo en el pueblo de la Cascarilla, perteneciente a la provincia de Jaén, ubicado en el departamento de Cajamarca.

| Código | Este | Norte | Altura (msnm) |
|---------------|-------------|--------------|--------------------------|
| H1 | 565537 | 9586649 | 119 |
| H2 | 566864 | 9584868 | 73 |
| H3 | 565640 | 9586120 | 62 |
| H4 | 565830 | 9585608 | 59 |

Tabla 1: Coordenadas geográficas UTM 17 Sur de los árboles de *Loxopterygium huasango* muestreados.

| Código | Este | Norte | Altura (msnm) |
|---------------|-------------|--------------|----------------------|
| A1 | 581288 | 9578156 | 425 |
| A2 | 581316 | 9578241 | 457 |
| A3 | 581298 | 9578253 | 482 |
| A4 | 581290 | 9578254 | 466 |

Tabla 2. Coordenadas geográficas UTM 17 Sur de los árboles de *Centrolobium ochroxylum* muestreados.

| Código | Este | Norte | Altura (msnm) |
|---------------|-------------|--------------|----------------------|
| A1 | 563759 | 9586558 | 70 |
| A2 | 563739 | 9586578 | 60 |
| A3 | 563762 | 9586590 | 55 |

Tabla 03. Coordenadas geográficas UTM 17 Sur de los árboles *Tabebuia billbergii* muestreados.

4.2. Identificación macroscópica

Las cepas bacterianas fueron sembradas en medio ELMARC, Cetrimide; en donde todas presentaron crecimiento, con apariencia mucilaginosa y de color rosada en el medio ELMARC y en el agar Cetrimide, tuvieron consistencia mucilaginosa de color crema, y uno de un color verduzco.

Las cepas de los hongos fueron crecidas en medio PDA, ellas presentaron varias características, debido a los diferentes géneros que se aislaron, en donde la formación de espora, el crecimiento, el olor y la textura fueron diferentes.

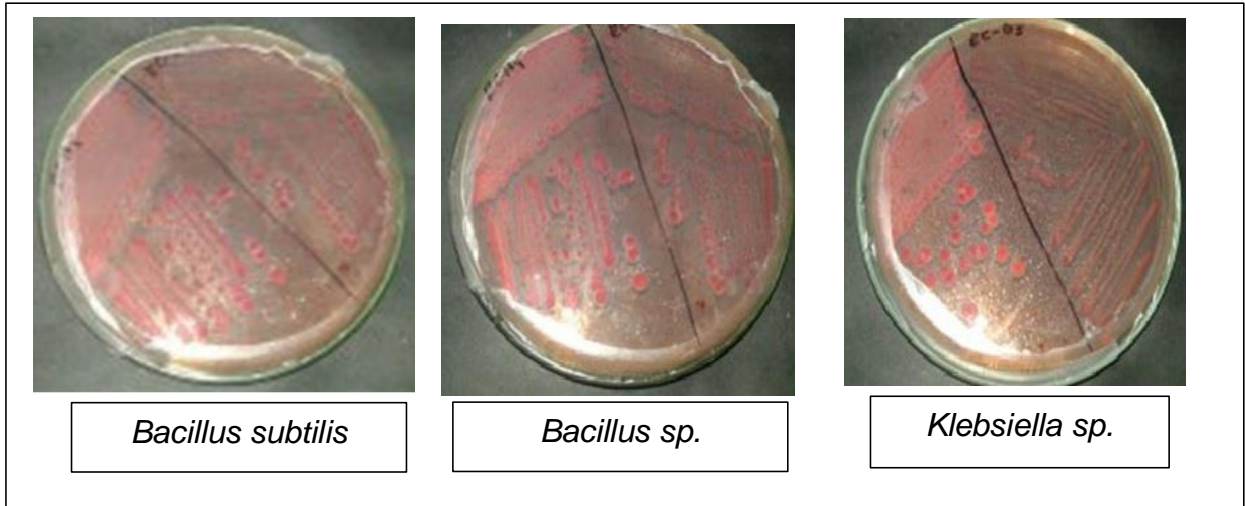


Figura 1. Crecimiento bacteriano en medio ELMARC.

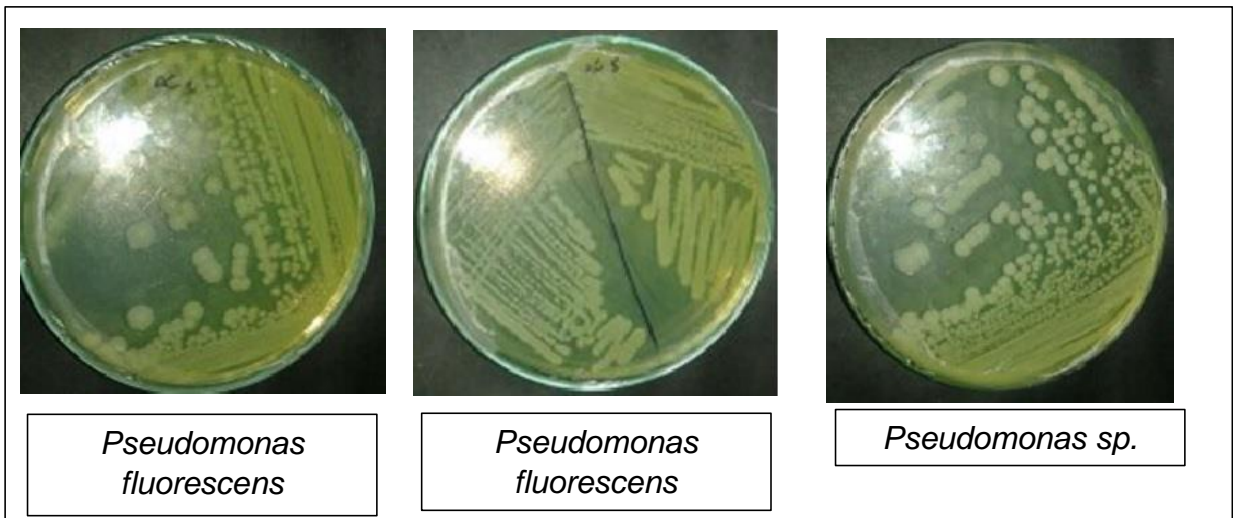


Figura 2. Crecimiento bacteriano en agar CETRIMIDE.

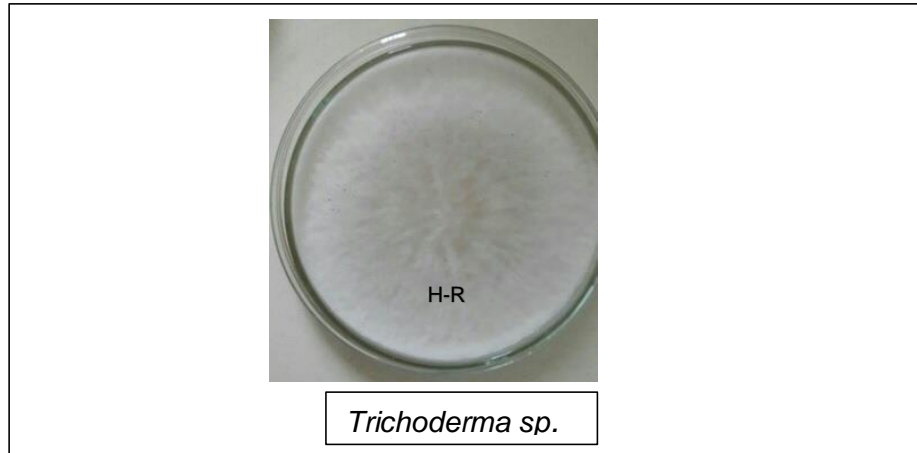


Figura 3. Crecimiento de hongo en medio PDA.

4.3. Identificación microscópica

Tinción Gram para bacterias.

Mediante este método, logramos observar la morfología de cada una de las cepas bacterianas aisladas, teniendo como resultado del procedimiento cepas de color rosadas llamadas también Gram negativas cuyo color está ligado a la pared celular y una pared de peptidoglucano, mientras tanto hubieron bacterias que tiñeron de color violeta, también llamadas Gram positivas cuya coloración es producto de que este grupo posee una pared celular más completa. Las bacterias presentaron forma de bastón largos y otros de bastón cortos.

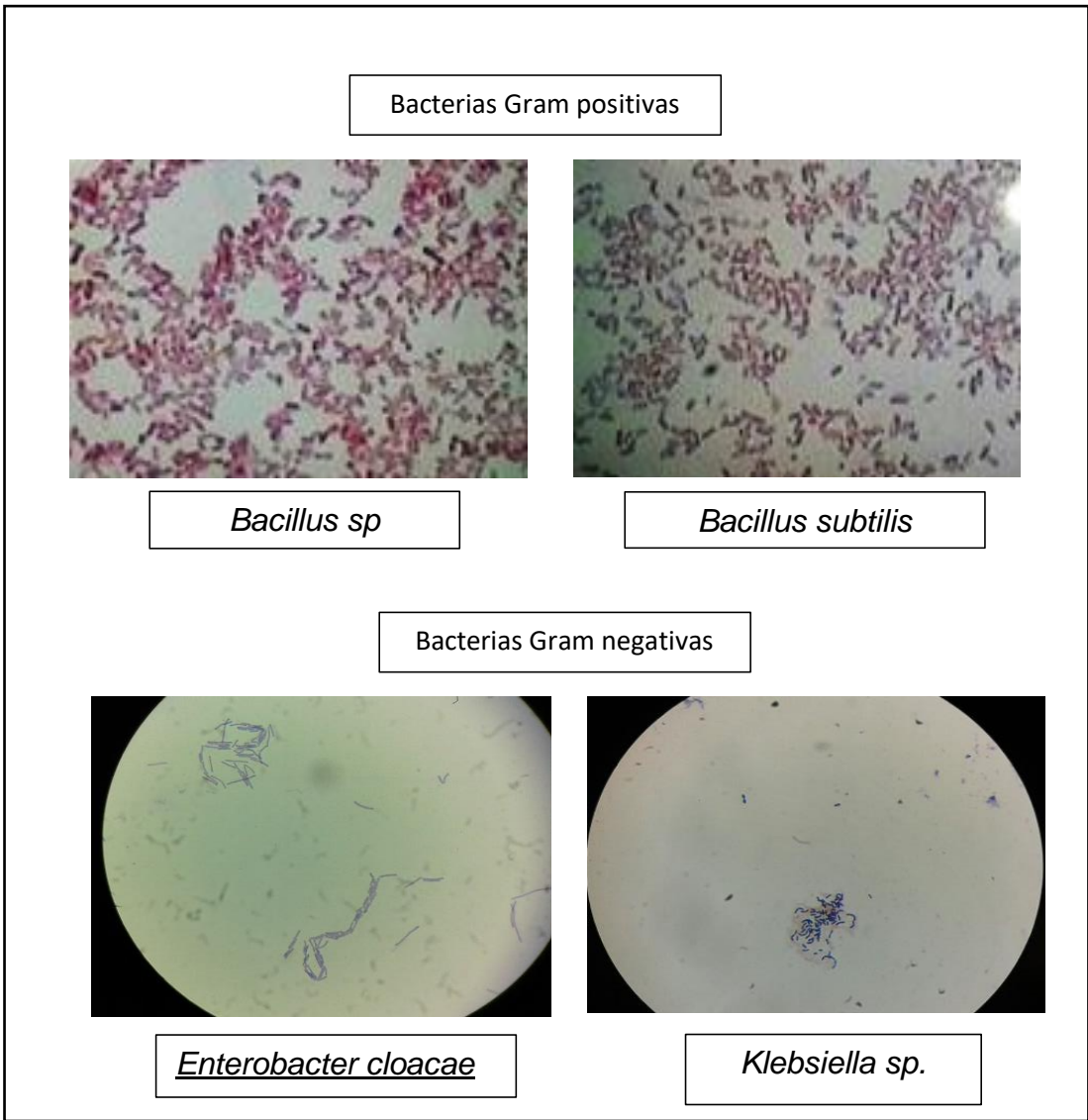


Figura 4. Tinción Gram de bacterias.

Tinción con azul de lactofenol para hongos

Mediante esta técnica, logramos observar la morfología de cada una de las cepas fúngica, teniendo como resultado la observación de esporas e hifas.

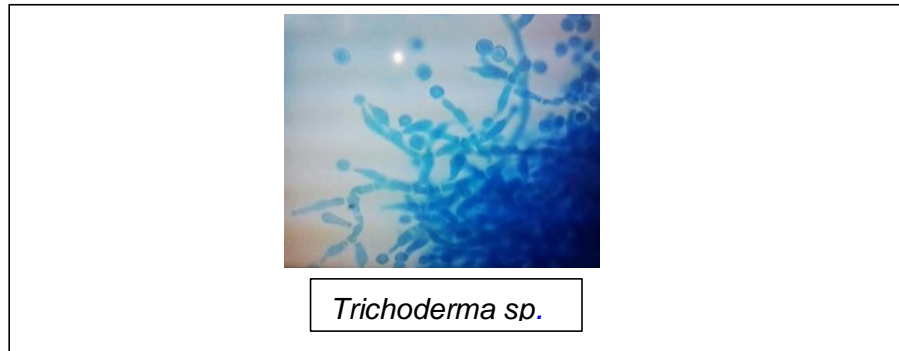


Figura 5. Tinción de azul de lactofenol para hongos.

Visualización de esporas de hongos formadores de micorrizas

Utilizando esta técnica y mediante el estereoscopio se lograron observar esporas del género *Glomus*.

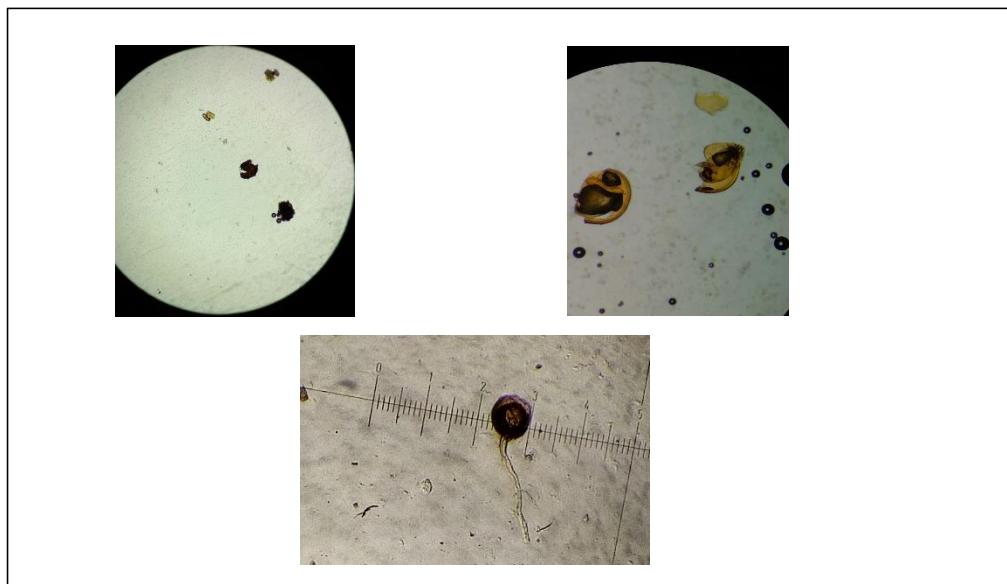


Figura 6. Visualización microscópica de esporas de hongos formadores de micorrizas.

4.4. Visualización de amplicones mediante la electroforesis

El producto obtenido de ambas extracciones de bacterias y hongos, fue migrado en un gel de agarosa al 1% para visualizar la presencia de amplicones.

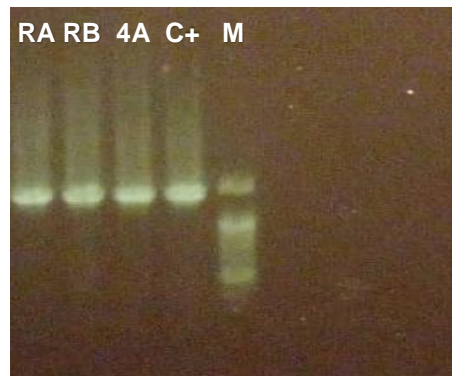


Figura 7. Migración de amplificaciones con marcador de peso de 1000 pb (M), en la parte de arriba tenemos productos de amplificación de la región ITS para hongos con alrededor de 850 pb y en la parte de abajo el producto amplificado del gen 16S ARNr para bacterias alrededor de 1500 pb.

4.5. Análisis y comparación de las secuencias obtenidas con el Blast

Las cepas obtenidas se compararon mediante el programa BLAST, en donde muestran los parámetros de similitud y accesoión. Se identificaron un total de 6 bacterias, mediante el uso de los marcadores moleculares como el 8F y 1510R, dentro de las cuales se encontraron géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, del mismo modo se identificaron un total de 3 de hongos del género *Trichoderma*.

| Muestra | Identificación más cercana | Max puntuación | Similitud | Accesión |
|---------|---|----------------|-----------|----------------------------|
| G2 | <i>Bacillus subtilis</i> | 566 | 96% | AY659864.1 |
| G5 | <i>Bacillus sp.</i> | 1373 | 99% | MF099872.1 |
| G7 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>subsp</i> | 1365 | 100% | KJ767387.1 |
| H1 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1400 | 100% | MK007476.1 |
| H2 | <i>Klebsiella sp.</i> | | | |
| H4 | <i>Enterobacter roggenkampii</i> | 1352 | 99% | CP033800.1 |

Tabla 4. Comparación de las secuencias de bacterias analizadas mediante el Blast.

| Muestra | Identificación más cercana | Max puntuación | Similitud | Accesión |
|---------|----------------------------|----------------|-----------|----------------------------|
| RA | <i>Trichoderma sp.</i> | 944 | 99% | MH284046.1 |
| 4A | <i>Trichoderma sp.</i> | 512 | 99% | MH284046.1 |
| 4B | <i>Trichoderma sp.</i> | 411 | 99% | MH284046.1 |

Tabla 5. Comparación de las secuencias de hongos analizados mediante el Blast.

4.6. Compatibilidad bacteriana.

Se le adicionó 10 µL de cada caldo bacteriano y se colocó a incubar a 30°C por 48 horas, para luego formar los consorcios necesarios.

| Bacteria Base | g1 | g2 | g3 | g4 | g5 | g8 | h1 | h3 | h4 | h5 | c2 | c3 | c4 | g6 | h2 | h6 |
|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| g1 | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| g2 | + | | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + |
| g3 | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| g4 | + | + | + | | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| g5 | + | + | + | + | | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| g8 | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| h1 | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| h3 | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| h4 | + | - | + | - | + | + | + | + | | - | - | + | + | + | + | + |
| h5 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | | + | + | + | + | + | + |
| c2 | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | | + | + | + | + | + |
| c3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + |
| c4 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| g6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + |
| h2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + |
| h6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |

Tabla 6. Código de cada una de las bacterias, para poder observar su compatibilidad microbiana, los colores muestran la adición de la bacteria en la base. El signo (+) muestra la compatibilidad que existen entre cada bacteria, mientras que el signo (-) muestra la incompatibilidad o antagonismo entre bacterias.

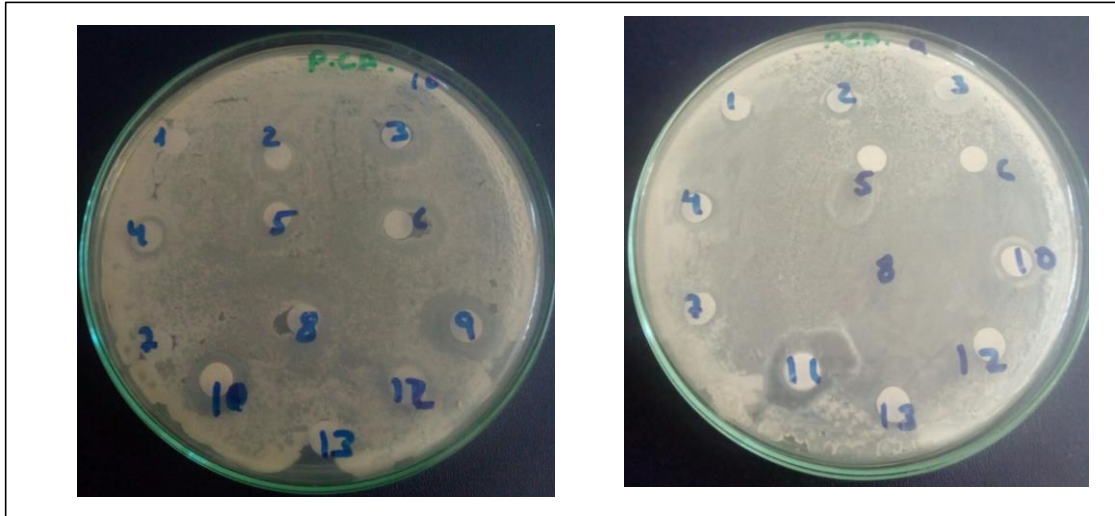


Figura 8. Enfrentamiento de bacterias en placas con medio TSA, para determinar la compatibilidad microbiana.

4.7. Cultivos trampas para los hongos y hongos micorrízicos

La evaluación se hizo a los 30 días calendarios, tanto para las *Trichodermas* y de los hongos micorrízicos, en cultivos trampas de Frijol.

| CODIGOS | PESO FRESCO DE LA RAÍZ | | | | PESO FRESCO HOJA. | | | |
|----------------|------------------------|-------|--------|-------|-------------------|--------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T1 | T2 | T3 | T4 |
| 2C | 1.182 | 1.438 | 0.607 | 1.3 | 2.9005 | 3.181 | 1.261 | 3.649 |
| 3 ^a | 1.297 | 1.071 | 1.079 | 1.417 | 2.21 | 2.4485 | 2.535 | 2.416 |
| 3B | 0.651 | 0.766 | 1.4815 | 1.17 | 1.25 | 1.095 | 2.286 | 1.75 |
| 4 ^a | 1.187 | 1.458 | 0.818 | 1.604 | 2.325 | 2.6005 | 1 | 2.618 |
| 4B | 1.758 | 1.052 | 1.246 | 1.526 | 2.5755 | 1.39 | 1.713 | 2.326 |
| RA | 1.374 | 1.337 | 1.681 | 2.016 | 1.8725 | 2.856 | 3.082 | 3.356 |
| RB | 0.881 | 1.265 | 0.689 | 0.888 | 2.1075 | 2.317 | 1.151 | 1.576 |
| RC | 0.853 | 1.386 | 1.114 | 1.055 | 1.8025 | 2.6015 | 2.094 | 2.101 |
| CONTROL | 0.908 | 0.378 | 0.616 | 0.295 | 2.0345 | 0.972 | 1.135 | 0.751 |

Tabla 7. Evaluación del efecto de los hongos con relación al peso (g) de la raíz y a la hoja.

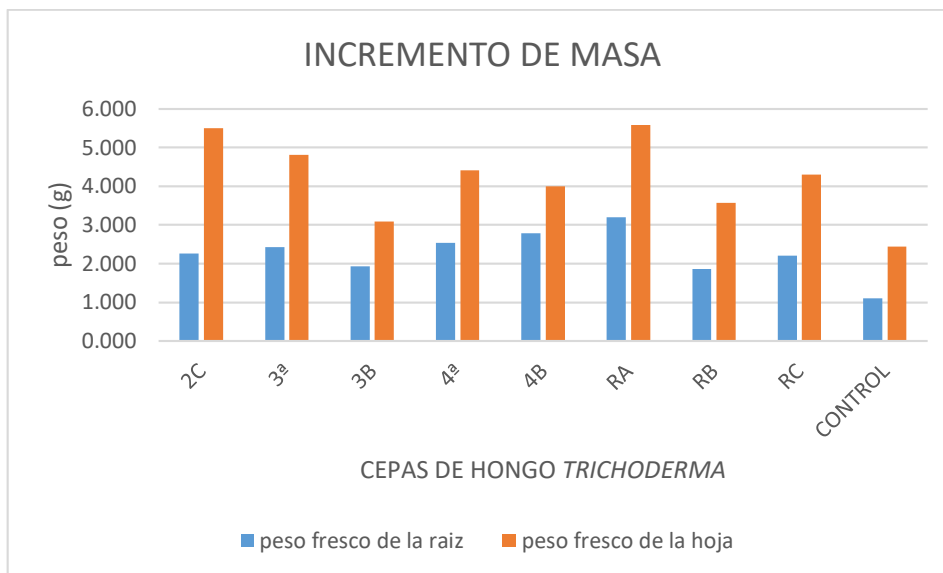


Figura 9. Parámetros evaluados en el cultivo trampa.



Figura 10. Raíces de frijol, evaluadas a los 30 días, se puede observar la diferencia que existe entre las muestras RA, 4B y 4A y el control.

4.8. Prueba de salinidad

Las bacterias *Bacillus subtilis* y *Klebsiella* presentaron crecimiento en las 4 dosis, observándose la tolerancia que tienen ante la salinidad.



Figura 11: Crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Klebsiella* en diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Los hongos del género *Trichoderma*, fueron sembrados en medio de cultivo PDA a una concentración de 1×10^4 UFC, en donde se tenían tres concentraciones diferentes de salinidad (0.5, 1.5 y 2 ppt) cuyo fin era observar que tan tolerantes eran a este medio a los 7 días en temperatura ambiente, llegando como como conclusión que no existe diferencia y que son resistentes a las 3 concentraciones, teniendo en cuenta en número de conidios.

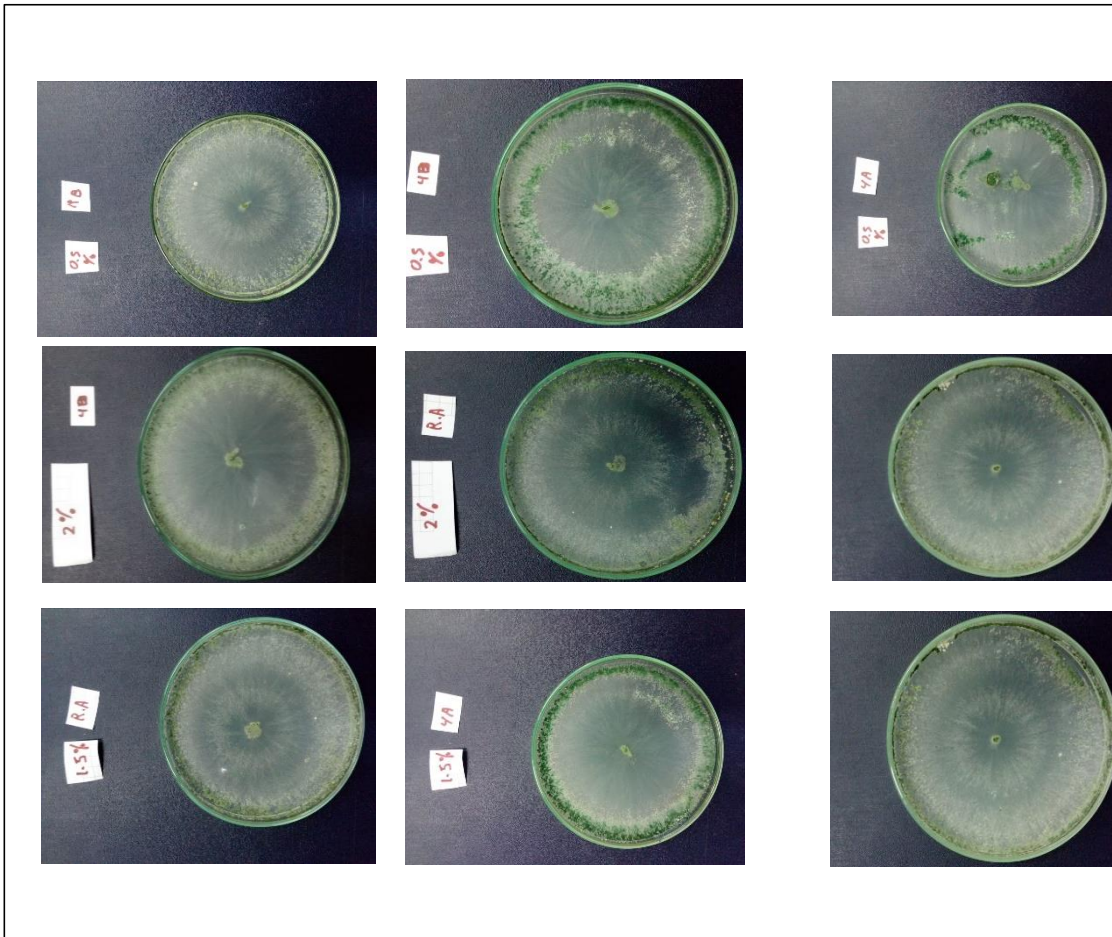


Figura 12. Crecimiento del hongo *Trichoderma* en tres concentraciones diferentes de cloruro de sodio.

4.8. Prueba de temperatura.

Las bacterias presentaron crecimiento en las temperaturas, 30°C y 55°C; mientras que en las temperaturas 70°C y -4°C no hubo presencia de crecimiento bacteriano, el mismo comportamiento se visualizó en el crecimiento de hongos.

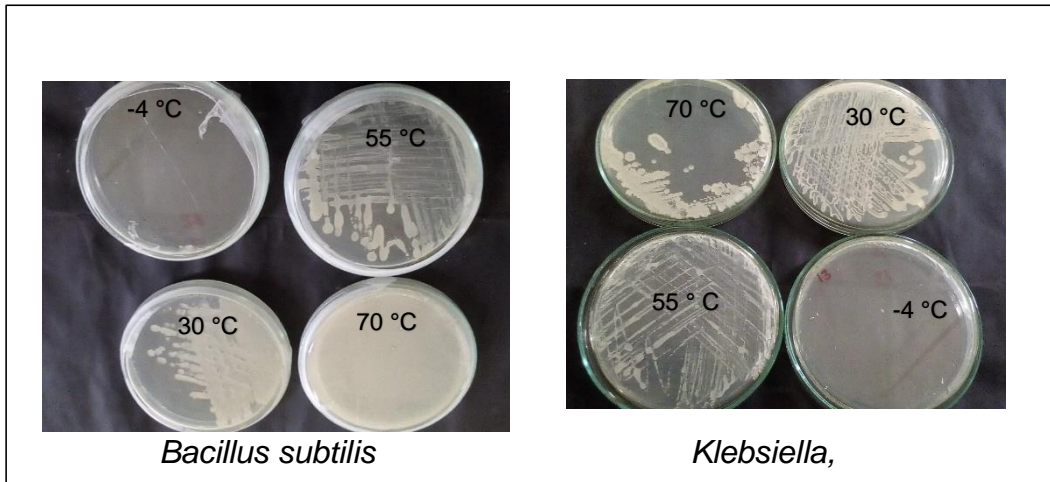


Figura 13. Crecimiento bacteriano en medio PCA en diferentes temperaturas.

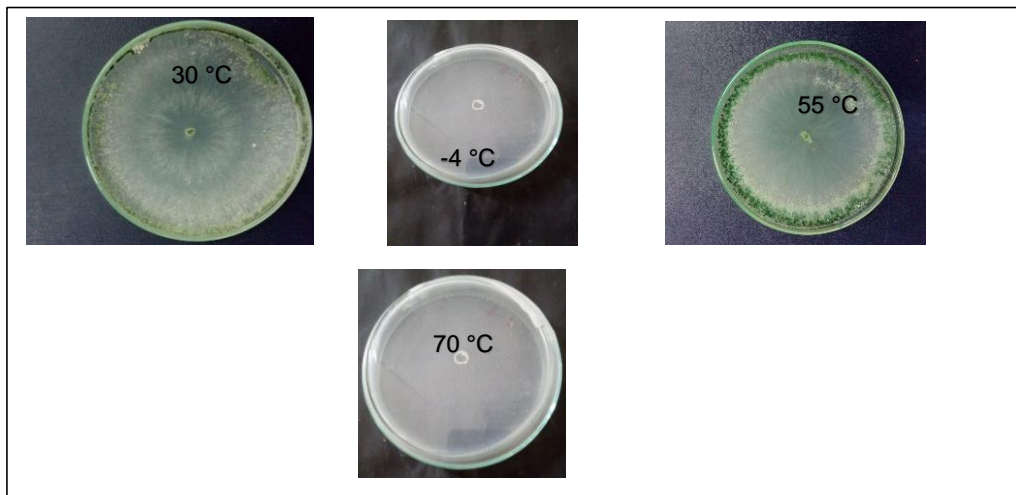


Figura 14. Crecimiento del microorganismo en diferentes temperaturas.

4.9. Curva patrón del ácido indolacético.

La curva patrón de calibración se elaboró a partir de solución madre de AIA, en donde se hicieron varias series de diluciones conocidas a las cuales se le adiciono el reactivo de Salkowski, dentro de las cual nos permite obtener la ecuación de la curva de calibración en donde la concentración está en función a la absorbancia de las muestras

| Concentración (ug/mL) | Absorbancia |
|-----------------------|-------------|
| 0 | 0 |
| 0.9 | 0.05 |
| 1.87 | 0.09 |
| 3.75 | 0.115 |
| 7.5 | 0.157 |
| 15 | 0.243 |
| 30 | 0.385 |
| 60 | 0.655 |

Tabla 8: concentración y absorbancia de las muestras

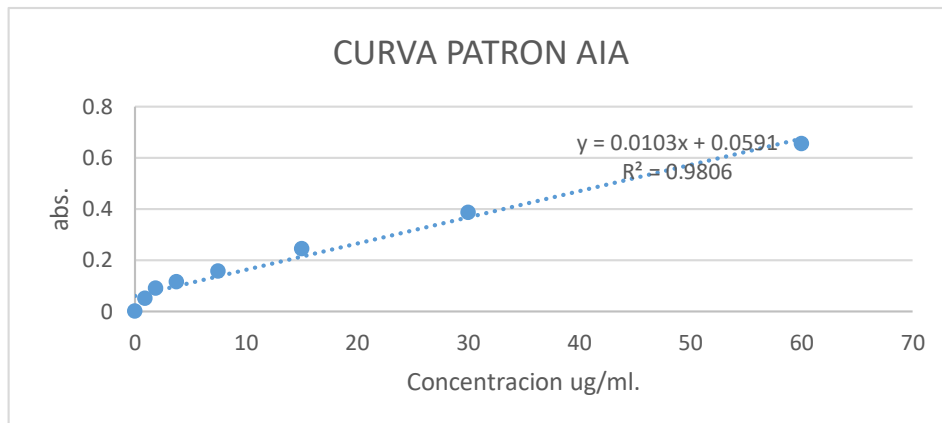


Figura 15. Curva de calibración de AIA.

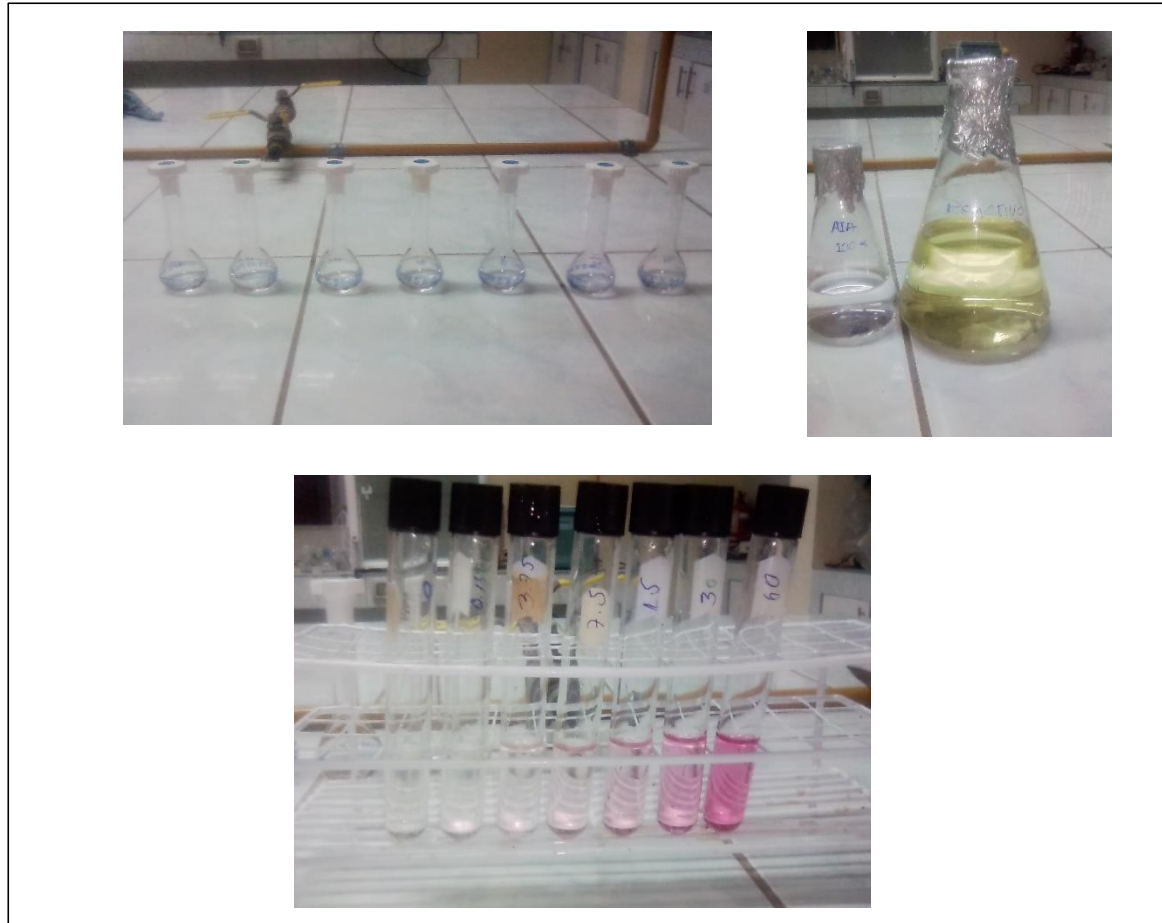


Figura 16. Concentraciones usadas para la curva patrón.

4.10. Producción de ácido indolacético, a través de la fermentación bacteriana.

Se inocularon 100 μ L de suspensión bacteriana que se ajustó una densidad óptica de 0.8 a 540 nm en un medio de cultivo que contenía lb al cual se le adicionó triptófano, se tomaron las muestras por triplicado y, se dejó reposar por 96 horas, las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm por 10 minutos, del cual se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se traspasó a un tubo de ensayo que contenía 2mL del reactivo de Salkowski, luego se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente para posteriormente llevarlas a leer a un espectrofotómetro a 540 nm, en celdas de cuarzo, se leyeron un total de 17 muestras.

| Cepa | Absorbancia | Concentración ug |
|------------------|-------------|------------------|
| g1 | 0.309 | 24.153 |
| g2 | 0.563 | 65.410 |
| g3 | 0.233 | 16.895 |
| g4 | 0.292 | 22.530 |
| g5 | 0.378 | 30.743 |
| g6 | 0.402 | 33.035 |
| g7 | 0.428 | 35.518 |
| g8 | 0.264 | 19.856 |
| h1 | 0.741 | 48.411 |
| h2 | 1.959 | 181.731 |
| h4 | 0.356 | 28.642 |
| h5 | 0.456 | 38.192 |
| h6 | 0.436 | 36.282 |
| c1 | 0.342 | 27.305 |
| c2 | 0.532 | 45.450 |
| Consortio | 0.357 | 28.737 |

Tabla 9. Concentración y absorbancia de cada una de las cepas bacterianas.

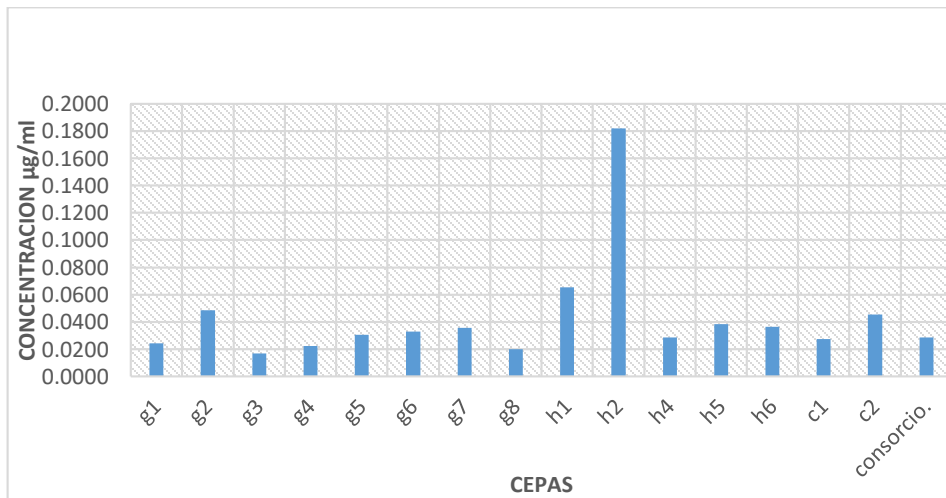


Figura 17. Producción de AIA de las bacterias en estudios, en donde muestra que *Bacillus subtilis* y *Klebsiella* tienen mayor aporte de AIA a comparación del resto y del consorcio.



Figura 18. Diferencia entre el control y producción de AIA por las bacterias.

4.11. Microorganismos solubilizadoras de potasio.

La evaluación se hizo de manera individual, en donde se seleccionaron las cepas que tenían actividad solubilizadora. Los halos de solubilización fueron de formación circular, y se hizo el análisis cualitativo.



Figura 19. Observación cualitativa de los halos formados por bacterias solubilizadoras de potasio.



Figura 20: Observación cualitativa de los halos formados por hongos solubilizadoras de potasio.

4.12. Microorganismos solubilizadoras de fósforo.

La evaluación se hizo de forma celular, en donde se seleccionaron las cepas que tenían actividad solubilizadora. Los halos de solubilización fueron de formación circular, y se hizo el análisis cualitativo.



Figura 21. Observación cualitativa de los halos formados por bacterias solubilazodoras de fósforo.

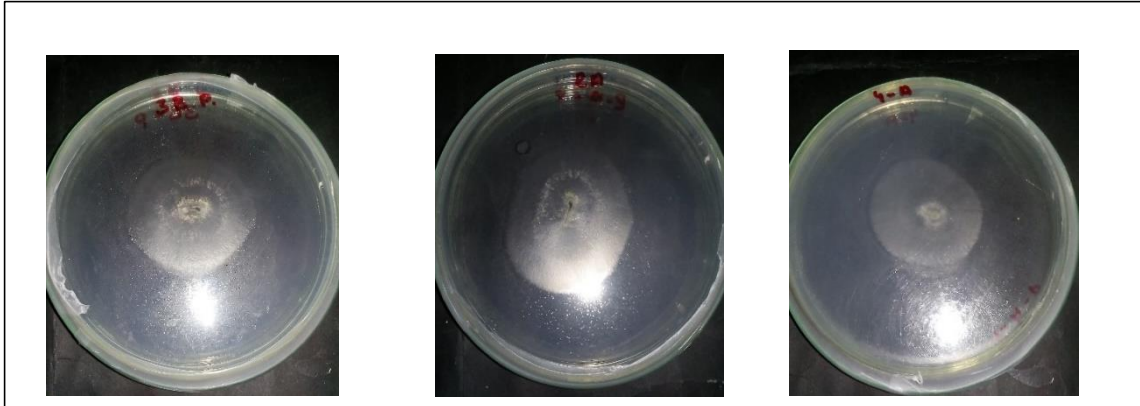


Figura 22. Observación cualitativa de los halos formados por hongos solubilizadores de fósforo.

4.13. Efecto del consorcio microbiano sobre las estacas

Dentro de la experimentación se consideró 4 tratamientos, lo cuales correspondía de un grupo control y tres grupos experimentales con distintas dosis de inoculación, para las 4 especies forestales en estacas, la comparación se hizo a los 60 días calendarios, evaluándose crecimiento de raíz, número de hoja y crecimiento de hojas. Se observó cómo es que en 3 especies del tratamiento número 2 tiene mayor eficiencia a comparación del control.

4.14. Especie: *Loxopterygium huasango*.

Esta especie no desarrolló raíces durante el tiempo evaluado, por ende solo se realizó la evaluación de las hojas.

4.14.1. Número de hojas

| PREMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 1.563 | 5.313 | 7.125 | 4.250 |
| 2.462 | 5.538 | 8.615 | 6.615 |
| 2.059 | 3.588 | 8.529 | 6.235 |

Tabla 22. Evaluación de los promedio de las repeticiones del número de hojas a los 60 días.

Para la variable número de hojas, el tratamiento T0 (control), presentó un 2.028 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 4.813 de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 8.090 de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 5.700 de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente:

Tratamiento 0 (control): Presencia de brotes a partir de los 25 días.

Tratamiento 1 (5 mL de inóculo): Presencia de brotes a los 20 días.

Tratamiento 2 (10 mL de inóculo): Presencia de brotes a los 15 días.

Tratamiento 3 (15 mL de inóculo): Presencia de brotes a los 20 días.

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto al número de hoja de la especie *Loxopterygium huasango*.

Análisis de varianza de un factor el cuanto al número de hojas

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|--------|----------|----------|
| T0 | 3 | 6.083 | 2.028 | 0.203 |
| T1 | 3 | 14.439 | 4.813 | 1.138 |
| T2 | 3 | 24.270 | 8.090 | 0.700 |
| T3 | 3 | 17.101 | 5.700 | 1.613 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 56.42546845 | 3 | 18.80848948 | 20.5873833 | 0.000405568 | 4.066180551 |
| Dentro de los grupos | 7.308744084 | 8 | 0.91359301 | | | |
| Total | 63.73421254 | 11 | | | | |

Tabla 23. Análisis de varianza del número de hojas de la especie, *Loxopterygium huasango* a los 60 días calendario.

TABLA DE RESULTADOS

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 8.090 | a |
| T1 | 5 ml | 5.700 | b |
| T3 | 15 ml | 4.813 | b |
| T0 | control | 2.028 | c |

Tabla 24. Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos.

4.14.2. Longitud de hojas

| PREMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 2.113 | 5.763 | 7.556 | 5.400 |
| 2.938 | 5.569 | 9.773 | 6.892 |
| 2.571 | 4.032 | 8.401 | 3.906 |

Tabla 25. Evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de las hojas a los 60 días.

Para la variable longitud de las hojas, el tratamiento T0 (control), presentó un 2.541cm. Como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 5.122 cm. de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 8.577 cm. de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 5.399 cm de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente.

Tratamiento 1 y 3: Mostraron casi las mismas longitudes durante los 60 días en evaluación a comparación del control

Tratamiento 2: Mostró una diferencia muy significativa en comparación al tratamiento 1 y 3 y 0

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto a la longitud de hoja de la especie *Loxopterygium huasango*

Análisis de varianza de un factor longitud de hoja

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|--------|----------|----------|
| T0 | 3 | 7.622 | 2.541 | 0.171 |
| T1 | 3 | 15.365 | 5.122 | 0.899 |
| T2 | 3 | 25.731 | 8.577 | 1.252 |
| T3 | 3 | 16.198 | 5.399 | 2.228 |

ANÁLISIS
DE
VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 55.035 | 3 | 18.345 | 16.128 | 0.001 | 4.066 |
| Dentro de los grupos | 9.100 | 8 | 1.137 | | | |
| Total | 64.135 | 11 | | | | |

Tabla 26. Análisis de varianza para la longitudes de las hojas en la especie *Loxopterygium huasango* a los 60 días calendario.

TABLA DE RESULTADOS

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 8.577 | a |
| T1 | 5 ml | 5.399 | b |
| T3 | 15 ml | 5.122 | b |
| T0 | control | 2.541 | c |

Tabla 27. Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos.

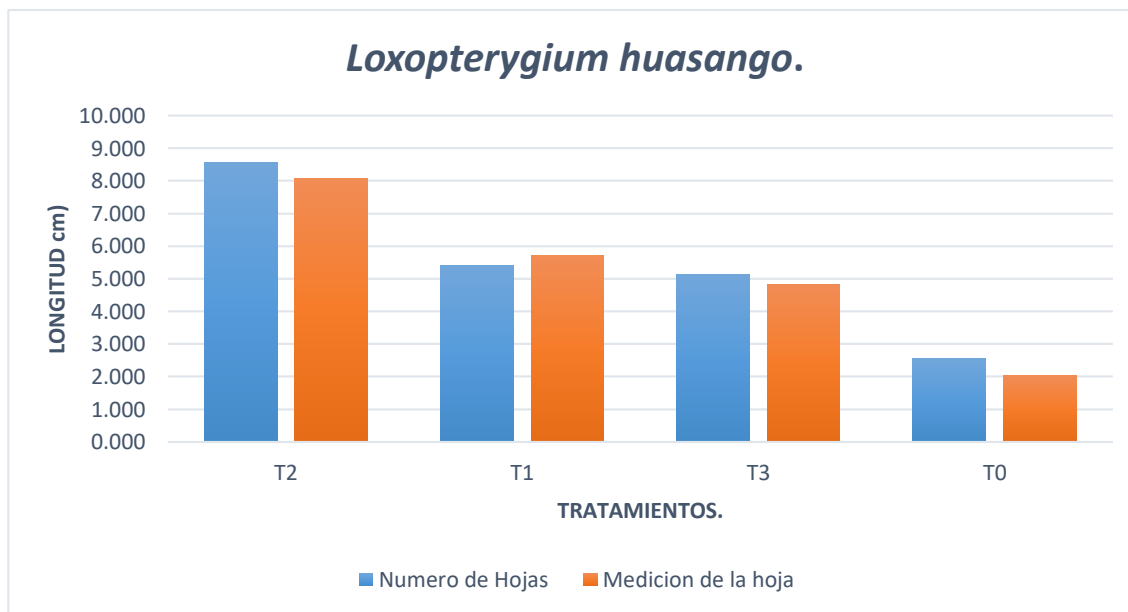


Figura 28. Gráfico comparativo del comportamiento de los tratamientos en las diferentes variables evaluadas en la especie *Loxopterygium huasango*.

4.15. Especie: *Tabebuia billbergii*

4.15.1. Número de Hojas

| T0 | T1 | T2 | T3 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3.125 | 5.625 | 9.438 | 5.063 |
| 2.923 | 7.385 | 12.231 | 7.231 |
| 2.059 | 6.353 | 12.706 | 6.235 |

Tabla 28: Evaluación de los promedio de las repeticiones del número de hojas a los 60 días.

Para la variable número de hojas, el tratamiento T0 (control), presentó un 2.70 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 6.45 de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 11.46 de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 6.18 de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente:

Tratamiento 0 (control): presentó brotes a los 30.

Tratamiento 1 (5ml de inóculo) Durante los primeros 30 días, el 70% de las muestras presentaron brotes, y un 10% a los otros 30 días.

Tratamiento 2 (10 ml de inóculo) El 90% de las muestras presentaron brotes en los primeros 30 días.

Tratamiento 3 (15 ml de inóculo) Durante los primeros 30 días, el 50% las muestras presentaron brotes, y un 10% a los otros 30 días.

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto al número de hojas de la especie *Tabebuia billbergii*

Análisis de varianza de un factor, número de hojas.

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| T0 | 3 | 8.107 | 2.70 | 0.321 |
| T1 | 3 | 19.363 | 6.45 | 0.782 |
| T2 | 3 | 34.374 | 11.46 | 3.118 |
| T3 | 3 | 18.529 | 6.18 | 1.178 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 116.866 | 3 | 38.955 | 28.862 | 0.0001 | 4.066 |
| Dentro de los grupos | 10.798 | 8 | 1.350 | | | |
| Total | 127.664 | 11 | | | | |

Tabla 29: análisis de varianza para el número de las hojas en la especie *Tabebuia* Bilbergi a los 60 días calendario

TABLA DE RESULTADOS

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|----------------|---------------------|-----------------|--------------|
| T2 | 10 ml | 11.46 | a |
| T1 | 5 ml | 6.45 | b |
| T3 | 15 ml | 6.18 | b |
| T0 | Control | 2.71 | c |

Tabla 30: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

4.15.2. Longitud de hojas

| PROMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|------------------------------|--------|--------|-------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 5.733 | 7.871 | 10.640 | 7.194 |
| 4.977 | 10.383 | 10.715 | 9.495 |
| 2.599 | 9.518 | 9.812 | 9.081 |

Tabla 31: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de hojas a los 60 días

Para la variable longitud de hojas, el tratamiento T0 (control), presento un 4.436 cm. Como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 9.257 cm. de promedio, seguido del tratamiento 2 (10ml de inóculo) con 10.389 cm. de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 9.257 cm de promedio, así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente

Tratamiento 1 y 3: Mostraron casi las mismas longitudes durante los 60 días en evaluación a comparación del control

Tratamiento 2: Mostró una diferencia muy significativa en comparación al tratamiento 1 y 3 y 0

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto a la longitud de hoja de la especie ***Tabebuia billbergii***

Análisis de varianza de un factor de longitud de hoja

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|--------|----------|----------|
| T0 | 3 | 13.309 | 4.436 | 2.674 |
| T1 | 3 | 27.772 | 9.257 | 1.628 |
| T2 | 3 | 31.167 | 10.389 | 0.251 |
| T3 | 3 | 25.770 | 9.257 | 1.504 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 60.665 | 3 | 20.222 | 13.354 | 0.002 | 4.066 |
| Dentro de los grupos | 12.114 | 8 | 1.514 | | | |
| Total | 72.780 | 11 | | | | |

Tabla 32: análisis de varianza para las longitudes de las hojas en la especie *Tabebuia billbergii* a los 60 días calendario

TABLA DE RESULTADOS

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 10.389 | a |
| T1 | 5 ml | 9.257 | b |
| T3 | 15 ml | 9.257 | b |
| T0 | Control | 4.436 | c |

Tabla 33: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

4.15.3. Número de Raíces

| PREMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|------------------------------|------|------|------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 4.19 | 6.25 | 6.50 | 3.81 |
| 5.59 | 4.00 | 7.53 | 5.12 |
| 2.60 | 5.07 | 7.53 | 5.87 |

Tabla 34: evaluación de los promedio de las repeticiones del número de raíces a los 60 días

Para la variable número de raíces, el tratamiento T0 (control), presentó un 4.125 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 5.105 de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 7.187 de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 4.932 de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente:

Tratamiento 0 (control): a los 30 días, se observó presencia de callos, y a los 40 días ya se observó presencia de raíces.

Tratamiento 1 (5ml de inóculo) a los 20 días, se observó presencia de callos, y a los 35 días ya se observó presencia de raíces.

Tratamiento 2 (10 ml de inóculo) a los 20 días, se observó presencia de callos, y a los 35 días ya se observó presencia de raíces.

Tratamiento 3 (15 ml de inóculo) a los 20 días, se observó presencia de callos, y a los 35 días ya se observó presencia de raíces

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto al número de raíces de la especie ***Tabebuia billbergii***

Análisis de varianza de un factor número de raíces.

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|-------------|-------------|-------------|
| T0 | 3 | 12.37573529 | 4.125245098 | 2.235294298 |
| T1 | 3 | 15.31666667 | 5.105555556 | 1.266759259 |
| T2 | 3 | 21.5627451 | 7.187581699 | 0.35458029 |
| T3 | 3 | 14.79681373 | 4.932271242 | 1.080673319 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 15.33111812 | 3 | 5.110372707 | 4.140210471 | 0.047982233 | 4.066180551 |
| Dentro de los grupos | 9.874614331 | 8 | 1.234326791 | | | |
| Total | 25.20573245 | 11 | | | | |

Tabla 35: Análisis de varianza para número de raíces en la especie *Tabebuia Billbergii* a los 60 días calendario

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 7.188 | a |
| T1 | 5 ml | 5.106 | b |
| T3 | 15 ml | 4.932 | b |
| T0 | control | 4.125 | c |

Tabla 36: Resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

4.15.4. Longitud de raíces.

| PREMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 0.958 | 1.474 | 1.619 | 1.057 |
| 1.121 | 1.355 | 1.936 | 1.312 |
| 0.648 | 1.464 | 1.932 | 1.445 |

Tabla37: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de raíces a los 60

Para la variable longitud de raíces, el tratamiento T0 (control), presentó un 0.909 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 1.431 cm. de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 1.829 cm. de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 1.271 cm de promedio

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto a la longitud de raíces de la especie *Tabebuia billbergii*

Análisis de varianza de un factor longitud de raíces.

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|-------------|----------|-------------|
| T0 | 3 | 2.727301471 | 0.909 | 0.057776545 |
| T1 | 3 | 4.292705882 | 1.431 | 0.004379382 |
| T2 | 3 | 5.487257353 | 1.829 | 0.032987728 |
| T3 | 3 | 3.813306373 | 1.271 | 0.038835678 |

**ANÁLISIS DE
VARIANZA**

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 1.308845257 | 3 | 0.436281752 | 13.0253448 | 0.001907547 | 4.066180551 |
| Dentro de los grupos | 0.267958666 | 8 | 0.033494833 | | | |
| Total | 1.576803923 | 11 | | | | |

Tabla 38: análisis de varianza para las longitudes en las raíces de la especie *Tabebuia Bilbergi* a los 60 días calendario

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 1.829 | a |
| T1 | 5 ml | 1.431 | b |
| T3 | 15 ml | 1.271 | b |
| T0 | control | 0.909 | c |

Tabla 39: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

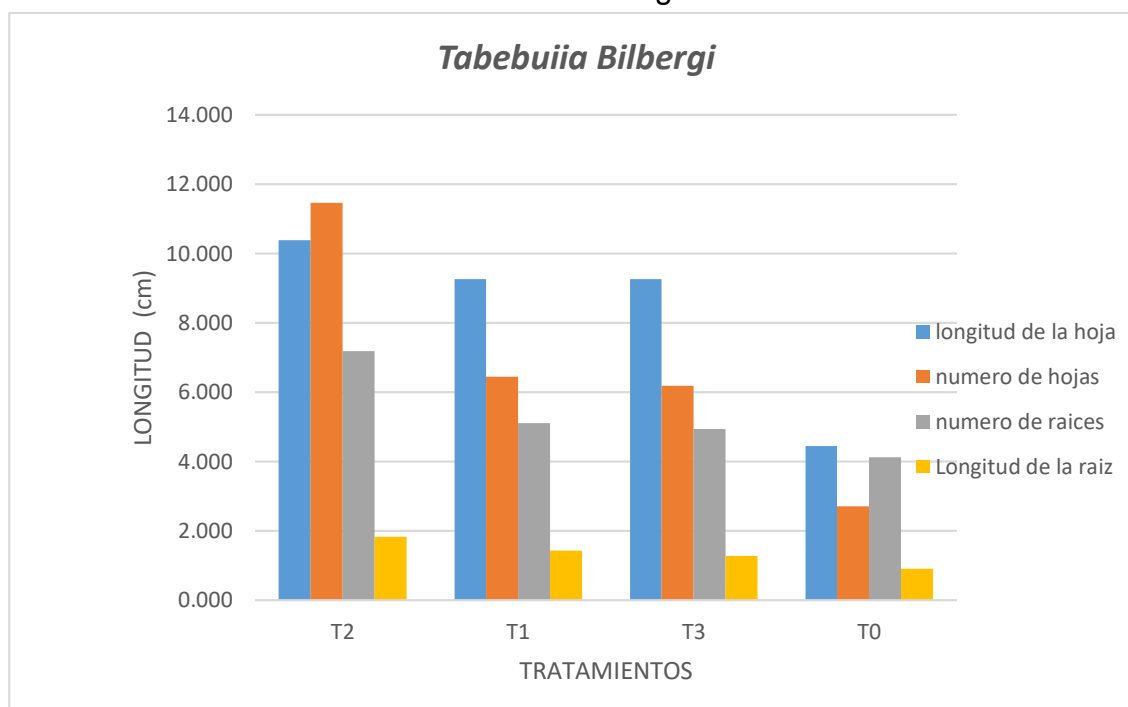


Figura 29: Gráfico comparativo del comportamiento de los tratamientos en las diferentes variables evaluadas en la especie *Tabebuia Bilbergi*

4.16. Efecto del consorcio microbiano sobre los acodos

Dentro de la experimentación se consideró 4 tratamientos los cuales correspondían de un grupo control y tres grupos experimentales con distintas dosis de inoculación, para las 4 especies forestales en estacas, la comparación se hizo a los 60 días calendario, en donde se evaluaron, crecimiento de raíz, número de raíz.

En esta técnica de propagación solo se tuvo éxito en la especie del género *Cinchona*.

4.16.1. Análisis de la evaluación de las variables en estudio de la especie *Cinchona pubescens*.

4.16.2. Número de raíces.

| 5. PROMEDIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|---------------------------------|----|---------|---------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 0 | 0.66666 | 5.3333 |
| 0 | 0 | 7 | 6.5 |
| 0 | 0 | 8.3333 | 6.33333 |

Tabla 40: evaluación de los promedios de las repeticiones de las longitudes de raíces a los 60

Para la variable número de raíces, el tratamiento T0 (control), presentó un 0 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 0 de promedio, seguido del tratamiento 2 (10ml de inóculo) con 3.223 de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 1.304 de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente:

Tratamiento 0 (control): No presentó presencia de raíces durante la evaluación a los 60 días calendario.

Tratamiento 1 (5ml de inóculo) no mostró presencia de raíces.

Tratamiento 2 (10 ml de inóculo) Durante los primeros 30 se observó la presencia de callos, y a los 50 días ya se observaba raíces.

Tratamiento 3 (15 ml de inóculo) Durante los primeros 30 se observó la presencia de callos, y a los 60 días ya se observaba raíces

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto al número de raíces de especie *Cinchona pubescens*

| RESUMEN | | | | |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
| Columna 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Columna 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Columna 3 | 3 | 22 | 7.333333333 | 0.77777778 |
| Columna 4 | 3 | 18.1666667 | 6.05555556 | 0.39814815 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad F | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|----------------|----------------------|
| Entre grupos | 136.895833 | 3 | 45.6319444 | 155.220472 | 1.989E-07 | 4.06618055 |
| Dentro de los grupos | 2.35185185 | 8 | 0.29398148 | | | |
| Total | 139.247685 | 11 | | | | |

Tabla 41: análisis de varianza para el número de raíces en la especie de *Cinchona pubescens*

Tabla de resultados.

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 6.055 | a |
| T1 | 5 ml | 7.333 | b |
| T3 | 15 ml | 0.000 | b |
| T0 | control | 0 | c |

Tabla 42: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

5.8.1. Longitud de raíces.

| 6. PREMIO DE LAS REPETICIONES | | | |
|-------------------------------|----|--------|------------|
| T0 | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 0 | 4.88 | 3.2233333 |
| 0 | 0 | 4.5225 | 4.31 |
| 0 | 0 | 5.85 | 3.75666667 |

Tabla 43: evaluación de los promedio de las repeticiones de las longitudes de raíces a los 60

Para la variable longitud de raíces, el tratamiento T0 (control), presentó un 0.909 como promedio, seguido del tratamiento 1 (5 ml de inóculo) con 1.431 cm. de promedio, seguido del tratamiento2 (10ml de inóculo) con 1.829 cm. de promedio, seguido de un tratamiento 3 (15 ml de inóculo) con 1.271 cm de promedio; así mismo debemos indicar de manera específica lo siguiente:

En la tabla de ANOVA se demuestra que si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos en cuanto a la longitud de raíces de especie *Cinchona pubescens*

Análisis de varianza de un factor, longitud de raíces.

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|-----------|--------|---------|------------|------------|
| Columna 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Columna 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Columna 3 | 3 | 15.2525 | 5.08416667 | 0.47182708 |
| Columna 4 | 3 | 11.29 | 3.76333333 | 0.29524444 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 61.3255932 | 3 | 20.4418644 | 106.596914 | 8.6455E-07 | 4.06618055 |
| Dentro de los grupos | 1.53414306 | 8 | 0.19176788 | | | |
| Total | 62.8597363 | 11 | | | | |

Tabla 44: análisis de varianza para la longitud de raíces en la especie de *Cinchona pubescens*

| CODIGOS | TRATAMIENTOS | PROMEDIO | TUKEY |
|---------|--------------|----------|-------|
| T2 | 10 ml | 5.084 | a |
| T1 | 5 ml | 3.763 | b |
| T3 | 15 ml | 0.000 | b |
| T0 | control | 0 | c |

Tabla 45: resultados de las diferencias significativas entre los tratamientos

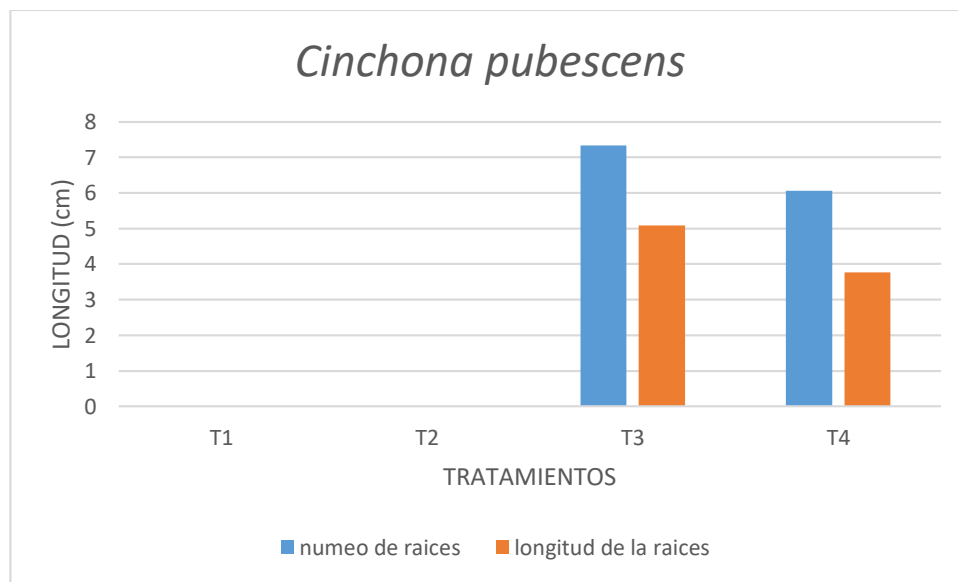


Figura 30: grafico comparativo del comportamiento de los tratamientos en las diferentes variables evaluadas en la especie *Cinchona pubescens*

7. DISCUSIONES

- En la presente investigación se lograron identificar 6 bacterias de los géneros *Bacillus* y *Enterobacter* y de 3 de hongos *Trichoderma* los cuales estaban asociados a la rizósfera de cada planta en estudio, Patten and Glick (1996), en sus investigaciones identificaron mediante pruebas de inoculación en plántulas, como estos géneros promovían el crecimiento vegetal en diferentes especies.
- En nuestra investigación los microorganismos han sido identificados mediante técnicas moleculares, haciendo uso del análisis de la secuencia ITS (espaciador transcritos internos), para la identificación de hongos, el cual fue usado por Wang y colaboradores (2011), no obstante para la identificación de las bacterias se utilizó la secuencia del gen ARNr16s, la cual fue usada por (Naveed *et al.*, 2014).
- Los microorganismos tienen la capacidad de formar asociaciones muy importantes, las cuales les permiten interactuar con la naturaleza (suelo-planta). Hoy en día se han reportado varios estudios acerca de la inoculación tanto individual como en consorcio de microorganismos nativos, los cuales una vez introducidos han tenido efectos beneficiosos para la planta. (Zinniel *et al.*, 2002).
- La cepa *Bacillus subtilis* debido a que posee un nivel alto de mecanismos, entre ellas la fijación biológica de nitrógeno como la solubilización de fosfatos y a la vez una alta producción de ácido indolacético, lo que permiten el desarrollo de raíces, afirmando lo que descubrió Tejera-Hernández B (2011), en donde estudia las variabilidades de los mecanismos del género *Bacillus*, la solubilización de fosfatos en el sector agrícola.
- Se observó que la cepa de *Klebsiella*, presentó una alta producción de ácido indolacético (AIA), y a la vez mediante un método cualitativo se pudo observar su actividad solubilizadora tanto de fósforo como de potasio, lo que está relacionado con lo que en algún momento dijo (El-Khawas y Adachi, 1999; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), donde

afirmaron, que la fitohormona más importante producida por *Klebsiella* es la auxina (AIA), la cual produce cambios importantes en la raíz, y además ellos lo relacionaron con la absorción de minerales.

- Los hongos del genero *Trichoderma*, mediante un método cualitativo, demostraron tener una actividad solubilizadora de fosforo, estando de acuerdo con lo dicho en su momento por Colozzi (2000) en donde concluyó, que los hongos actúan como complemento de la raíz, para obtención de nutrientes, especialmente en la absorción de fosforo (P)
- Las especies en estudio presentaron diferentes comportamientos al momento de la evaluación de las variables sobre todo en el número y longitud de la raíz, ya que la especie *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum* no se logró observar presencia de raíces, a diferencia de las especies *Tabebuia billbergii*, *Cinchona pubescens*, dando por afirmado lo que en su momento López Ceballos (2011), evaluó y llegó a la conclusión que no todas la especies tienen la misma respuesta ante los mismos microorganismos

8. CONCLUSIONES.

- En La evaluación de la variable número y longitud de las raíces en estacas las especies *Tabebuia billbergii* y *Cinchona pubescens* mostraron mejor resultados con el T2, a los 25 días en promedio se evidencio presencia de callos, mostrando a los 35 días promedio presencia de raíces, mientras que la especie *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum*, no mostraron presencia de callos y por ende raíces.
- En la evaluación de las variables número y longitud de raíces en acodos, la única especie que dio respuesta fue *Cinchona pubescens*, dando formación de callos a los 30 días calendarios y a los 45 raíces, mientras tanto las especies *Tabebuia billbergii*, *Loxopterygium huasango* y *Centrolobium ochroxylum*, no dieron respuesta al inóculo, en ninguno de los tratamientos

9. RECOMENDACIONES.

- Al momento de extraer el suelo de raíz, realización de acodos y estacas, seguir un protocolo, ya que este te ayudará a presentar buenos resultados al momento de la evaluación.
- Al momento de la realización de las estacas y los acodos hay que tener en cuenta la estación de floración, ya que en esta estación el árbol está saturado de hormonas y eso puede inferir en algunos resultados.
- Al momento de acodar se recomienda hacerla en época de lluvia ya que en esta época proporciona agua al sustrato y se acelera la formación de cayos radicales, otra época sería otoño, ya que en esta no pierde mucha agua.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. 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
2. Antoun, H. and Prevost, D. (2006) Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A., Ed., *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, 1-38
3. Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L and Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics. *BMC Genomics*. 11:332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
4. Atlas, Ronald M., y Richard Bartha. *Ecología Microbiana y Microbiológica Ambiental*. Cuarta edición. Madrid: Pearson Addison Wesley, 2002.
5. Bach Álvarez & Díaz, (2009). *Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura*
6. Bago, B., pfeffer P.E., and Scharchar-Hill Y. (2000). Carbón metabolism and transport im arbuscular mycorrhizal. *Plant Physiol* 124:1-10
7. Blancof, Fabio y SALAS, Eduardo. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1): 55-67. 1997
8. Barreto, Valero, Muñoz, & Peralta (2007). Efecto de Microorganismos Rizosféricos sobre Germinación y Crecimiento Temprano de *Anacardium Excelsum*
9. Bashan y Holguin, 1998 proposal for tje division of plant growth - promoting rhizobacteria into two classification:biocontrol- PGBB (plant

growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol.Biochem 30: 1225-1228).

10. 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.
11. Blazich, F .A. 1998. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting.In Adventitious Root Formation in Cuttings.(Eds. Davis, T.D., Haissig,B.e. y Sankhla, N.). Portland, Oregon. Dioscorides Press, 132-149 pp.
12. Bécquer, Salas, Slaski, Archambault, & Anya (2013). Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray
13. Bethlenfalvay G J, Andrade G, Azcón-Aguilar C 1997 Plant and soil responses to mycorrhizal fungi and rhizobacteria in nodulated or nitrate-fertilized peas. Biol. Fert. Soils. (In press)
14. (Chesters, J.K. 1996) Polymerase chain reaction. Proc Nutr Soc. 55 (1B):599-604. Review.
15. Chichignoud, M., Deon, Gerard. 1990. Atlas de maderas tropicales de América Latina. OIMT - Centre Technique Forestier Tropical. Yokohama. Japón.
16. Colozzi Filho, Arnaldo y CARDOSO, Elke. Detecção de fungos micorrizicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotolária cultivada na entrelinha. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35(10): 2033-2042. 2000
17. Correa, M., 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de

Micorrizas. Granada. <http://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>
origin=publication_detail

18. Dhara P Sachdev, Hemangi G Chaudhari, Vijay M Kasture, Dilip D Dhavale & Balu A Chopade (2009). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol. 47, December 2009, pp. 993-1000
19. Diederichs, Chr.; Moawad, A.M. 1993. The potencial of VA Mycorrhizae for plant nutrition in the tropics. *Angew. Bot.*, 67: 91-96
20. 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.
21. Ferrera Cerrato, Ronald. Manual de Agro-microbiología. Mexico: Trillas, 1993.
22. Ferrer Sergio, (2011) «El verdadero sentido de la vida.» *Journal of Feelsynapsis (JoF)*. ISSN2254-3651. 2011 (1): 119-127.
23. Herrera (2018, 10 de mayo). *Diario Correo*. Bosques secos de Tumbes en riesgo de forestación.
24. García Garibay, Quintero Ramírez, y López Munguía. 2004. *Biotechnología Alimentaria*. Mexico: LIMUSA S.A.,.
25. Gentry, A. (1992). A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 79 (1): 53-64.
26. Gerdermann y Nicholson (1963) *Methods to Process and Identify Symbiotic Fungi in the Roots of Vascular Plants*.

27. Gestión. 2016. Minagri: Perú pierde 120,782 hectáreas de bosques al año por la deforestación. 14 de noviembre de 2019. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/minagri-peru-pierde-120-782-hectareas-bosques-ano-deforestacion-120561>. Acceso 3 enero de 2019.
28. Giovanetti, Manuela y Sbrana, Cristiana. Meeting a non-host: the behavior of AM fungi. *Mycorrhiza*, 8: 123-130. 1998
29. González, E., García J. C., Correa J. (2005) "Especies Forestales del Bosque Seco "Cerro Negro – Cazaderos", Zapotillo – Puyango - Loja Ecuador. Fundación Ecológica Arco iris. Loja. Ecuador. Pp. 108.
30. Hayman, D.S., and Tavares M. (1985). Influence of soil ph on the symbiotic efficiency of different endophytes. *New phytologist* 100: 367-377
31. Morales (2019, 13 febrero) Diario la Republica. 400 hectáreas se pierden al año
32. Jäger H. 2011. *Cinchona pubescens*. Enzyklopädie der Holzgewächse. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Alemania (in press).
33. 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
34. Justiniano, J. En revisión. Fenología de árboles forestales y frutales en el bosque semideciduo chiquitano de Lomerío, Santa Cruz. Doc. BOLFOR.
35. Kumar, Manoj , y otros. 2015. «Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.)» *Plant Signaling & Behavior*

36. Kaushansky, Kenneth. 2001. Glossary of Molecular Biology Terminology. *American Society of Hematology*, 522-841.
37. Leal, J., R. Linares (2005). Los bosques secos de la Reserva de Biosfera del Noroeste (Perú): diversidad arbórea y estado de conservación. *Caldasia*, 27(2), 195-211
38. LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2016. Genus *Bacillus*. Microbiology Society. Charles Darwin House, 12 Roger St, London WC1N 2JU, United Kingdom. <http://www.bacterio.net/bacillus.html> (consultado, mayo 2017)
39. Lynch y Whipps (1990) the rhizosphere and plant growth pp. 1-10
40. López Ceballos (2011) inoculación con bacterias promotoras de crecimiento en cuatro especies leñosas de selva baja caducifolia trabajo
41. Luis Llacsá (2013) Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrízicos asociados a *Centrolobium ochroxylum* Rose ex Rudd. "amarillo" y *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engler. "hualtaco" mediante técnicas de caracterización molecular, Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape.
42. Luis Llacsá (2016) identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera y filosfera de los guayacanes (*tabebuia chrysantha* y *tabebuia billbergii*) y evaluación de cepas aisladas en el proceso inicial de desarrollo de plántulas.
43. Maughan H and van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11:789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
44. MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). 2016. Evolución de producción del sector forestal. Boletín. Dirección General de Políticas

Agrarias – DGPA. Disponible en: file:///F:/Descargas/evol-prod-forestal_nov16.pdf. Acceso 04 de marzo de 2019.

45. 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.
46. Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170, 2017-2021.
47. Richards, S., J. Warneke y F. Aljibury. 1964. Physical properties of soil mixes used by nurseries. Calif. Agr. 18(5), 12-13.
48. RIVERA B., R.; I. P.; TORRES, J.; GARZÓN, A.; HERRERA L., E. 1998. Introducción a la biología molecular e ingeniería genética de plantas. SARH-INIFAP-CINVESTAP. 222 p.
49. Sánchez Castro, Iván. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interes ecológico en ambientes mediterraneas. Tesis Doctoral, Granada: Editorial de la Universidad de Granada, 2009, 169.
50. SÁNCHEZ T, LEON J, WOOLCOTT J, ARAUCO K. 2004. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. Rev Perú biol. 11(2). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S17279933 2004
51. Schreiner, R., Mihara, K., McDaniel, H. *et al.* Plant and Soil (1997) 188: 199.

52. Stahl, D.P., Williams S.E, and Christensen M. (1988). Efficacy of native vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. 110: 347-354.
53. 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, nº 1 (2004): 31-40.
54. Sieverding, Ewald. El papel de las micorrizas en la agricultura. *Suelos Ecuatoriales*, 16(1) 52-59. 1986
55. VOGEL, H., RAZMILIC, I., SAN MARTÍN, J., DOLL, U. y GONZÁLEZ, B. 2008. *Plantas Medicinales Chilenas. Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui*. Segunda edición. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile.
56. Wang, Martínez Romero, & López, s.f) Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.

ANEXOS

Inoculación de las estacas



Se sumergieron las estacas por 30 min en el inóculo de microorganismo



Inoculación de las estacas con las diferentes dosis

**Diferencias significativas entre los tratamientos de la especie
Loxopterygium huasango en estacas.**



DIFERENCIA SIGNIFICATIVAS ENTRE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOSS



DIFERENCIA SIGNIFICATIVA TO Y T1



DIFERENCIA SIGNIFICATIVA TO Y T2



Diferencia significativa entre T0 y T3

**Diferencias significativas entre los tratamientos de la especie
Tabebuia bilbergii en estacas.**



Diferencias significativas entre los tratamientos



Diferencia significativa entre T0 y
T1



Diferencia significativa entre T0 y
T2



Diferencia significativa entre T0 y
T3

**Diferencias significativas entre los tratamientos de la especie
Cinchona pubescens en acodos**



Presencia de cayos a los 30 días en T3



Presencia de cayos a los 30 días en T2



No hubo presencia de
cayos a los 30 días en T1



Tratamiento 2



Tratamiento 0

CERTIFICADO DE ANÁLISIS N° 1512-2018

I. Datos de la muestra.

Fecha de recepción : 30/10/2018
 Solicitante : Bach. Karla Andrea Peña Yacila
 Muestra alcanzada por la solicitante
 Investigación :
 “Caracterización molecular de bacterias y hongos asociados al crecimiento y concentración de nitrógeno, fósforo y potasio, en cuatro especies forestales con distintos métodos de propagación

Distrito : Zorritos
 Provincia : Contralmirante Villar
 Región : Tumbes

II. Resultados

| Parámetros | Unidades | Resultados | | | | Metodología |
|---------------------------------|----------------|------------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | |
| Potencial de Iones de hidrogeno | Unidades de pH | 5.98 | 5.88 | 7.12 | 5.80 | Instrumental Potenciometría |
| Materia Orgánica | % | 13.86 | 15.46 | 48.21 | 25.19 | Walkley-Black |
| Fósforo | Ppm P | 2.00 | 6.00 | 14.00 | 3.00 | Olsen |
| Potasio | Ppm K | 20.00 | 29.00 | 31.00 | 28.00 | Ensayo de la llama |
| Conductividad eléctrica | mS/cm | 1.500 | 1.030 | 4.350 | 0.23 | Electrodo de ion selectivo |


 Jorge A. Delgado Soto
 ING. RESPONSABLE
 CIP. 56757


G2

GTTGCATCGCCGCTGAGTGTGG--TGGTTCTCGGTTCTGTAGCTCTGTTTTGGGGATGAACAGGTGCC

GTTCAAATAGGGCG-GCACCTTGACGGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAAGTACGTGCCAGC----

-AGCCGCGGTAATA-CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG-

GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG---TGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCA--

---TTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGA-GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA-

----GAGATGTGGAGGAACCACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCATGTGGTTAA

G5

GCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGTTGAAGTTTGGTT

CTGGCTCAGGA---CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGG--

AGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA

ACTCCGGGAAACCGGGGCTA-ATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCA-----

TGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGC----

GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACG-

ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC---TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA-

---GGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG-

TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA

AGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACC--

TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA-

GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGC

TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCAC-

GTGTAGCGGTGAAATGCGTAG-AGATGTGGAGGAAC—

ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTTGTACAAAGCCCCCGGCGATTACGAGAGGTTGTATCACCC

TCAAATCGGAAAAAGCCAGCCTGG

G7

GAGTTTGGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGG

GAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT

AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTC

GGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA

TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC

AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC

GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAA

CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT

ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG

TCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

GAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG

H1

TAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAA
CTGGCAGGCTGGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG
CTTCCGGAGCTAACCGTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGA
CATCCACAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
CAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCC
GGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
GCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAG
CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGA

AATCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTG
CTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTGCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTGCCATCAG
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT
CAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAAACCTGGCAG
GCTGGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGTGGCGAAGGCG

R4

CAAAAATCTAGATAAATGTTGATATAAACTGGCTCCCCACCCTTTAGGGACCAATGAGAGAAGCATTGCA
CAGCCGGTCTCCTACGATATCCCAGCTGCCCCACCTAAAGCGGGTAATGATCCCAAAAACAAAGTGAACCA
TACCAAATGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGA
GGGACCAACCAAACCTTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAA
TGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGG
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGGTTGGGGACCTCGGGAGCCC
CTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGAC
AACTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCACGTCCGTAACACCCAACTTTCTGAAATGTGACCTCGGATCA
TGGAC

4B_ITS4

CATTCTTCGTTCCCTTTAAGGAAGGCATAATTTAGCGGGGATTCCGTCGTTATGCCAGCTCAACATTCAATA
AAGTGTGTACTACTCGCAAGCCCAATCTGCGCCATACCGAAGTGGTTCCTGCACGGTATCACGCCGCGGGG
GTTTTGCAGACCCCCGACCCTGGTTTCGGGGTGGAGATCCGACCAAAGTGTTCGGGGGGTCCCCTCGGCGA
CCCTCTTAGTGGTTCTTGGGTTGAAATTTCA--
TGGGACACACATGCCTGCCAGAATTATTGTGGGGGTGCAAGCGAGGTGCAAGATTGGGAGATTCGGTGAG
TAATGCGATTACAGAATTCAGGGCATTTCGGTGTGTTCTTCATCGCAGCCAGAACCACAGTATTCCGGCGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGGTTGGGGACCTCGGGAGCC
CCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA

CAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGT-AAAACACCCAACCTT-----
CTGAAATGTGACCTCGGCGGAAAACCCGCTGAGACTAAGTATATCTCAAAGGAACCAAGAAGGTGGAGA
CCC

