

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
“SANTIAGO ANTUNEZ DE MAYOLO”**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA**



**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO, PRODUCCIÓN  
DE AIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES HONGOS  
ENDOFÍTICOS ALTOANDINOS EN EL LABORATORIO DE  
CIByRGA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – UNASAM, 2021”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR:  
SILVA VILLAFANA, Alex Cristian**

**ASESOR  
Dr. VASQUEZ CRUZ, Walter Juan**

**CO-PATROCINADOR  
Dr. OLIVERA GONZALES, Percy Eduardo**

**Huaraz-Áncash-Perú**

**2023**





UNIVERSIDAD NACIONAL  
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO

"Una Nueva Universidad para el Desarrollo"

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSITARIA DE SHANCAYÁN TELEFAX 043 426 588 - HUARAZ - ANCASH - PERÚ



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado de Tesis que suscriben, se reunieron para escuchar y evaluar la sustentación de la Tesis presentado por el Bachiller en Ciencias Agronomía **ALEX CRISTIAN SILVA VILLAFANA**, denominada: "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO, PRODUCCIÓN DE AIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES HONGOS ENDOFÍTICOS ALTOANDINOS EN EL LABORATORIO DE CIByRGA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS- UNASAM, 2021", Escuchada la sustentación, las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, la declaramos:

APROBADA.

CON EL CALIFICATIVO (\*)

APROBADO DIECISEIS (16)

En consecuencia, queda en condición de ser calificada APTO por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias y por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" y recibir el Título de **INGENIERO AGRÓNOMO**, de conformidad con la Ley Universitaria y el Estatuto de la Universidad.

Huaraz, 19 de abril de 2023.

Dra. **NELLY PILAR CAYCHO MEDRANO**

**PRESIDENTE**

Mag. **HUGO MENDOZA VILCAHUMAN**

**SECRETARIO**

Ing. **CLAY EUSTERIO PAJUELO ROLDAN**

**VOCAL**

Dr. **WALTER JUAN VASQUEZ CRUZ**

**ASESOR**

Dr. **PERCY EDUARDO OLIVERA GONZALES**

**CO-ASESOR**

(\*) De acuerdo con el Reglamento de Tesis, éstas deben ser calificadas con términos de: APROBADO CON EXCELENCIA (19 - 20), APROBADO CON DISTINCIÓN (17 - 18), APROBADO (14 - 16), DESAPROBADO (00 - 13).





UNIVERSIDAD NACIONAL  
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO

*"Una Nueva Universidad para el Desarrollo"*

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

CIUDAD UNIVERSITARIA DE SHANCAYÁN TELEFAX 043 426 588 - HUARAZ - ANCASH - PERÚ



### ACTA DE CONFORMIDAD DE TESIS

Los miembros del jurado, luego de evaluar la tesis denominada: **"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO, PRODUCCIÓN DE AIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES HONGOS ENDOFÍTICOS ALTOANDINOS EN EL LABORATORIO DE CIByRGA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – UNASAM, 2021"**, presentado por el Bachiller en Ciencias Agronomía **SILVA VILLAFANA, ALEX CRISTIAN**, y sustentada el día 19 de abril del 2023, por **Resolución Decanatural N° 174-2023-UNASAM-FCA**, la declaramos **CONFORME**.

Huaraz, 19 de abril de 2023

Dra. CAYCHO MEDRANO NELLY PILAR

PRESIDENTA

Mag. MENDOZA VILCAHUMAN HUGO

SECRETARIO

Ing. PAJUELO ROLDAN CLAY EUSTERIO

VOCAL

Dr. VASQUEZ CRUZ WALTER JUAN

ASESOR

Dr. OLIVERA GONZALES PERCY EDUAR

CO-ASESOR



Anexo de la R.C.U N° 126 -2022 -UNASAM  
**ANEXO 1**  
**INFORME DE SIMILITUD.**

El que suscribe (asesor) del trabajo de investigación titulado:

“Evaluación del potencial antifúngico, producción de AIA y caracterización molecular de tres hongos endofíticos altoandinos en el Laboratorio de CIBYRGA de la Facultad de Ciencias – UNASAM, 2021”

Presentado por: SILVA VILLAFANA, Alex Cristian

con DNI N°: 76954533

para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Informo que el documento del trabajo anteriormente indicado ha sido sometido a revisión, mediante la plataforma de evaluación de similitud, conforme al Artículo 11° del presente reglamento y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 0% de similitud.

**Evaluación y acciones del reporte de similitud de los trabajos de los estudiantes/ tesis de pre grado (Art. 11, inc. 1).**

Porcentaje		Evaluación y acciones	Seleccione donde corresponda
Trabajos de estudiantes	Tesis de pregrado		
Del 1 al 30%	Del 1 al 25%	Esta dentro del rango aceptable de similitud y podrá pasar al siguiente paso según sea el caso.	<input checked="" type="radio"/>
Del 31 al 50%	Del 26 al 50%	Se debe devolver al estudiante o egresado para las correcciones con las sugerencias que amerita y que se presente nuevamente el trabajo.	<input type="radio"/>
Mayores a 51%	Mayores a 51%	El docente o asesor que es el responsable de la revisión del documento emite un informe y el autor recibe una observación en un primer momento y si persistiese el trabajo es invalidado.	<input type="radio"/>

Por tanto, en mi condición de Asesor/ Jefe de Grados y Títulos de la EPG UNASAM/ Director o Editor responsable, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera hoja del reporte del software anti-plagio.

Huaraz, 19/06/2023



FIRMA

Apellidos y Nombres: Dr. VASQUEZ CRUZ, Walter Juan

DNI N°: 31663683

Se adjunta:

1. Reporte completo Generado por la plataforma de evaluación de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**Tesis Para pasar turnitin.pdf**

RECUENTO DE PALABRAS

**21609 Words**

RECUENTO DE PÁGINAS

**116 Pages**

FECHA DE ENTREGA

**Jun 19, 2023 2:51 PM GMT-5**

RECUENTO DE CARACTERES

**117401 Characters**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**9.1MB**

FECHA DEL INFORME

**Jun 19, 2023 2:52 PM GMT-5****● 0% de similitud general**

Esta entrega no coincidió con ningún contenido comparado.

- 0% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 0% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente

Este presente trabajo lo dedico  
mis abuelos y tío, sin ellos no  
lo había logrado. A Dios por  
haberme dado la vida.



## AGRADECIMIENTO

A la Dr. Carmen Tamariz Angeles, estoy muy agradecido por haberme apoyado en mi proyecto de tesis, quien me ha guiado en el camino largo a pesar de los obstáculos, la mayor parte del excelente trabajo se lo debo a Ud.

Al Dr. Percy Olivera Gonzales, por haber sido mi co-patricinador muchas gracias por haberme enseñado y colaborado durante el periodo del proyecto de investigación. Por haberme tenido paciencia.

Al Dr. Walter Vasquez Cruz, por haber sido mi patrocinador de mi proyecto de tesis.

A mis abuelos Urbano Villafana y Magnolia Benites, así mismo a tío Richard que fueron las personas que más se preocuparon, los callos de sus manos son el resultado de su sacrificio.

A mis compañeros: Alberto Castañeda, Becky Soria, Bryan Sanchez, Flor y Steysi Rosales.

A CONCYTEC-PROCIENCIA: por haber financiado este trabajo de tesis en el marco de la convocatoria Proyecto de investigación básica 2019-01 [Contrato N° 381-2019-FONDECYT].

# I. ÍNDICE

II. RESUMEN.....	1
III. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. OBJETIVOS .....	4
3.1.1. Objetivo general .....	4
3.1.2. Objetivos específicos.....	4
IV. MARCO TEORICO .....	5
4.1. HONGOS ENDOFÍTICOS.....	5
4.2. IMPORTANCIA DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN LA AGRICULTURA.....	5
4.3. HONGOS ENDOFÍTICOS PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL .....	6
4.4. PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS DE MICROORGANISMOS .....	6
4.5. ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) .....	7
4.6. SIDERÓFOROS EN HONGOS ENDOFÍTICOS .....	8
4.7. SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO DE CALCIO .....	8
4.8. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA .....	8
4.9. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR .....	9
4.10. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO CON CEPAS INOCULADAS.....	9
4.11. HIPÓTESIS .....	9
4.12. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS .....	10
V. MATERIALES Y METODOS.....	11
5.1. AREA DE ESTUDIO .....	11
5.2. MATERIALES .....	11
5.2.1. Material biológico.....	11

<b>5.3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
5.3.1. Tipo de investigación.....	16
5.3.2. Población o universo .....	16
5.3.3. Análisis estadísticos.....	16
5.3.4. Diseño completamente al azar .....	17
5.3.5. Evaluación antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos..	19
5.3.6. Producción de ácido indol acético (AIA) .....	19
5.3.7. Producción de sideróforos .....	20
5.3.8. Evaluación de actividad de solubilización de fosfato de calcio .....	20
5.3.9. Evaluación de actividad celulolítica.....	21
5.3.10. Caracterización morfológica.....	21
5.3.11. Caracterización molecular de los microorganismos .....	22
5.3.12. Bioensayo .....	22
a. Efecto de la inoculación de hongos endofíticos en la germinación de alfalfa.....	22
b. Efecto de la inoculación en crecimiento de plantas de alfalfa .....	23
c. Evaluación de clorofila de alfalfa inoculada.....	23
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
6.1. Actividad antagónica de las cepas de hongos endofíticos frente cepas de patógenos.....	24
6.1.1. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium osyosporum</i> CTLM12.....	24
6.1.2. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium sp.</i> FH.....	26
6.1.3. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC7275.....	27
6.1.4. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria sp.</i> ATCC20084.....	28
6.1.5. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria sp.</i> T2.....	30
6.1.6. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente al patógeno <i>Geotrichum candidum</i> P1 .....	31
6.2. Determinación de la producción de ácido indol acético (AIA) .....	33
6.2.1. Resultados de ácido indol acético (AIA) en temperatura de 15 °C..	33

6.2.1.1.	Producción de AIA de la cepa HE15ct .....	33
6.2.1.2.	Producción de AIA por la cepa HE20Cct .....	34
6.2.1.3.	Producción de AIA de la cepa HE21ct .....	35
6.2.1.4.	Producción de AIA por la cepa HE27Cct .....	36
<b>6.2.2.</b>	<b>Resultados de ácido indol acético (AIA) a 24 °C .....</b>	<b>38</b>
6.2.2.1.	Producción de AIA por la cepa HE15ct.....	38
6.2.2.2.	Producción de AIA por la cepa HE20ct.....	39
6.2.2.3.	Producción de AIA por la cepa HE20Cct .....	40
6.2.2.4.	Producción de AIA por la cepa HE21ct.....	41
6.2.2.5.	Producción de AIA por la cepa HE27Cct .....	42
6.2.2.6.	Producción de AIA por la cepa HE27Rct .....	43
<b>6.3.</b>	<b>Producción de sideróforos a 15 y 20 °C .....</b>	<b>45</b>
<b>6.4.</b>	<b>Evaluación de actividad de solubilización de fosfato de calcio .....</b>	<b>47</b>
<b>6.4.1.</b>	<b>Temperatura de 15 °C .....</b>	<b>47</b>
<b>6.4.2.</b>	<b>Temperatura de 24 °C .....</b>	<b>47</b>
<b>6.5.</b>	<b>Evaluación de actividad celulolítica .....</b>	<b>49</b>
<b>6.6.</b>	<b>Selección de tres cepas de hongos endófitos .....</b>	<b>49</b>
<b>6.7.</b>	<b>Caracterización molecular.....</b>	<b>50</b>
<b>6.8.</b>	<b>Prueba de bioensayo con inoculantes.....</b>	<b>52</b>
<b>6.8.1.</b>	<b>Efecto de inoculación en la germinación de alfalfa .....</b>	<b>52</b>
6.8.1.1.	Porcentaje de germinación en temperatura de 15 °C .....	52
a.	Índice de germinación en 24 horas .....	52
b.	Índice de germinación en 48 horas .....	53
6.8.1.2.	Porcentaje de germinación a 24 °C .....	54
a.	Índice de germinación en 24 horas .....	54
b.	Porcentaje de germinación en 24 horas .....	55
<b>6.8.2.</b>	<b>Efecto crecimiento de alfalfa inoculados con hongos endófitos.....</b>	<b>57</b>
6.8.2.1.	Crecimiento de plantas de alfalfa inoculadas a 15 °C .....	57
a.	Crecimiento de la parte radicular de la alfalfa inoculada.....	57
b.	Crecimiento del tallo de la alfalfa inoculada.....	58
6.8.2.2.	Crecimiento de plantas de alfalfa inoculadas en temperatura de 24 °C .....	59
a.	Crecimiento de la parte radicular de la alfalfa inoculada.....	59

b.	Crecimiento del tallo de la planta de alfalfa inoculada .....	60
<b>6.8.3.</b>	<b>Resultado de biomasa seca de cultivo de alfalfa inoculadas .....</b>	<b>62</b>
6.8.3.1.	Biomasa seca de la parte radículas crecidos a 15 y 24 °C .....	62
6.8.3.2.	Biomasa seca del tallo crecidos a 15 y 24 °C .....	63
6.8.3.3.	Evaluación de clorofila A y B del tallo con inoculantes .....	65
a.	Clorofila A en 15 °C .....	65
b.	Clorofila A en 24 °C .....	66
c.	Clorofila B a 15 °C .....	67
d.	Clorofila B en 24 °C .....	68
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo 1. Medios y soluciones utilizados en diferentes pruebas.....</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo 2. Fotografías de los métodos aplicados en la parte experimental .....</b>	<b>86</b>
	<b>Anexo 3. Fotografías de las evaluaciones cualitativas de las diferentes pruebas realizadas.....</b>	<b>89</b>
	<b>Anexo 4. Análisis estadísticos aplicados a las diferentes pruebas realizadas .....</b>	<b>93</b>

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofítico frente a Fusarium oxysporum CTLM12</i> .....	24
<b>Figura 2</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofítico frente a fusarium sp</i>	26
<b>Figura 3</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a Aspergillus niger ATCC7275</i> .....	27
<b>Figura 4</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a Alternaria sp. ATCC20084</i> .....	28
<b>Figura 5</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a Alternaria sp. T2</i> .....	30
<b>Figura 6</b> <i>Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a Geotrichum candidum P1.</i> .....	31
<b>Figura 7</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE15ct</i> .....	33
<b>Figura 8</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20Cct</i> .....	34
<b>Figura 9</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE21ct</i> .....	35
<b>Figura 10</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Cct</i> .....	36
<b>Figura 11</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE15ct</i> .....	38
<b>Figura 12</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20ct</i> .....	39
<b>Figura 13</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20Cct</i> .....	40
<b>Figura 14</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE21ct</i> .....	41
<b>Figura 15</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Cct</i> .....	42
<b>Figura 16</b> <i>Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Rct</i> .....	43
<b>Figura 17</b> <i>Capacidad de solubilización de fosfato de las cepas HE16ct y HE20ct</i> .....	47
<b>Figura 18</b> <i>Árbol filogenético de la secuencia de la region ITS de las cepas HE15ct y HE20Cct y su respectico genero relacionado del NCBI GenBank</i> .....	51
<b>Figura 19</b> <i>Árbol filogenético de la secuencia de la region ITS de la cepa HE16ct y su</i>	

<i>respectivo genero relacionado del NCBI GenBank.....</i>	51
<b>Figura 20</b> <i>Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 15 °C en 24 horas.....</i>	52
<b>Figura 21</b> <i>Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 15 °C en 48 horas.....</i>	53
<b>Figura 22</b> <i>Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 24°C en 24 horas.....</i>	54
<b>Figura 23</b> <i>Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 24°C en 48 horas.....</i>	55
<b>Figura 24</b> <i>Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 15 °C.....</i>	57
<b>Figura 25</b> <i>Índice de crecimiento del tallo a los 28 días en 15 °C.....</i>	58
<b>Figura 26</b> <i>Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 24 °C.....</i>	59
<b>Figura 27</b> <i>Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 24 °C.....</i>	60
<b>Figura 28</b> <i>Resultado de biomasa seca de la raíz de alfalfa crecidas a 15 y 24 °C.....</i>	62
<b>Figura 29</b> <i>Resultado de biomasa seca del tallo de alfalfa crecidos a 15 y 24 °C.....</i>	63
<b>Figura 30</b> <i>Producción de clorofila A con inoculantes a 15°C.....</i>	65
<b>Figura 31</b> <i>Producción de clorofila A con inoculantes a 24°C.....</i>	66
<b>Figura 32</b> <i>Resultado de clorofila B a 15 °C con inoculantes.....</i>	67
<b>Figura 33</b> <i>Resultado de clorofila B a 24 °C con inoculantes.....</i>	68
<b>Figura 34</b> <i>Actividad antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos.....</i>	86
<b>Figura 35</b> <i>Actividad de producción de ácido indol acético (IAA) .....</i>	86
<b>Figura 36</b> <i>Actividad de producción de sideróforos en diferentes medios de cultivo. ....</i>	87
<b>Figura 37</b> <i>Solubilización de fosfato de calcio.....</i>	87
<b>Figura 38</b> <i>Porcentaje de germinación con cepas inoculadas.....</i>	88
<b>Figura 39</b> <i>Crecimiento de la planta de alfalfa con cepas inoculadas .....</i>	88
<b>Figura 40</b> <i>Evaluación antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos.....</i>	89
<b>Figura 41</b> <i>Evaluación de producción de ácido indol acético .....</i>	89
<b>Figura 42</b> <i>Evaluación producción de sideróforos.....</i>	90
<b>Figura 43</b> <i>Evaluación de solubilización de fosfato de calcio a temperatura de 24 °C.....</i>	90
<b>Figura 44</b> <i>Porcentaje de germinación en temperaturas a 15 y 24 °C.....</i>	91

<b>Figura 45</b> Índice de plantas crecidas con cepas inoculadas .....	92
--	----

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Randomización del experimento .....	17
<b>Tabla 2</b> Croquis del experimento .....	17
<b>Tabla 3</b> Análisis de varianza .....	18
<b>Tabla 4</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium oxysporum</i> <i>CLTM12</i> .....	25
<b>Tabla 5</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium sp. FH</i> .....	26
<b>Tabla 6</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Aspergillus niger</i> <i>ATCC7275</i> .....	27
<b>Tabla 7</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria sp.</i> <i>ATCC20084</i> .....	29
<b>Tabla 8</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria sp. T2</i> .....	30
<b>Tabla 9</b> Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a <i>Geotrichum candidum</i> <i>P1</i> .....	31
<b>Tabla 10</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE15ct</i> .....	34
<b>Tabla 11</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE20Cct</i> .....	35
<b>Tabla 12</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE21ct</i> .....	36
<b>Tabla 13</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE27Cct</i> .....	37
<b>Tabla 14</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE15ct</i> .....	38
<b>Tabla 15</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE20ct</i> .....	39
<b>Tabla 16</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE20Cct</i> .....	40
<b>Tabla 17</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE21ct</i> .....	41
<b>Tabla 18</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE27Cct</i> .....	42
<b>Tabla 19</b> Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa <i>HE27Rct</i> .....	43

<b>Tabla 20</b> <i>Producción de sideróforos a 15 °C</i> .....	45
<b>Tabla 21</b> <i>Producción de sideróforos a 24 °C</i> .....	46
<b>Tabla 22</b> <i>Comparación de Tukey de solubilización de fosfato de calcio a 24 °C</i> .....	47
<b>Tabla 23</b> <i>Código, caracterización molecular de tres hongos endofíticos</i> .....	50
<b>Tabla 24</b> <i>Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 15 °C en 24 horas</i> .....	53
<b>Tabla 25</b> <i>Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 15 °C en 48 horas</i> .....	54
<b>Tabla 26</b> <i>Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 24 °C en 24 horas</i> .....	55
<b>Tabla 27</b> <i>Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 24 °C en 48 horas</i> .....	56
<b>Tabla 28</b> <i>Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada de la raíz</i> .....	57
<b>Tabla 29</b> <i>Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada del tallo</i> .....	58
<b>Tabla 30</b> <i>Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada de la raíz</i> .....	60
<b>Tabla 31</b> <i>Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada del tallo</i> .....	61
<b>Tabla 32</b> <i>Comparación de Tukey de biomasa seca de la raíz a 15 °C</i> .....	62
<b>Tabla 33</b> <i>Comparación de Tukey de biomasa seca del tallo a 15 y 24°C</i> .....	64
<b>Tabla 34</b> <i>Comparación de Tukey de clorofila A en 15 °C</i> .....	65
<b>Tabla 35</b> <i>Comparación de Tukey de clorofila A en 24 °C</i> .....	66
<b>Tabla 36</b> <i>Comparación de Tukey de clorofila B en 15 °C</i> .....	67
<b>Tabla 37</b> <i>Comparación de Tukey de clorofila B en 15 °C</i> .....	68
<b>Tabla 38</b> <i>Medio de cultivo para la prueba antagónica</i> .....	84
<b>Tabla 39</b> <i>Medio de cultivo para la prueba de sideróforos</i> .....	84
<b>Tabla 40</b> <i>Medio para ácido indol acético (AIA)</i> .....	85
<b>Tabla 41</b> <i>Medio utilizado para prueba de solubilización de fosfato de calcio</i> .....	85

<b>Tabla 42</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium oxysporum</i> CLTM12</i> .....	93
<b>Tabla 43</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a <i>Fusarium</i> sp. FH</i> .....	93
<b>Tabla 44</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC7275</i> .....	93
<b>Tabla 45</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria</i> sp. ATCC20084</i> .....	94
<b>Tabla 46</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a <i>Alternaria</i> sp. T2</i> .....	94
<b>Tabla 47</b> <i>Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofítico frente a <i>Geotrichum candidum</i> P1</i> .....	94
<b>Tabla 48</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE15ct a 15 °C</i> .....	95
<b>Tabla 49</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE20Cct a 15 °C</i> .....	95
<b>Tabla 50</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE21ct a 15 °C</i> .....	95
<b>Tabla 51</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Cct a 15 °C</i> .....	96
<b>Tabla 52</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE15ct a 24 °C</i> .....	96
<b>Tabla 53</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE20ct a 24 °C</i> .....	96
<b>Tabla 54</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE20Cct a 24 °C</i> .....	97
<b>Tabla 55</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE21ct a 24 °C</i> .....	97
<b>Tabla 56</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Cct a 24 °C</i> .....	97
<b>Tabla 57</b> <i>Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Rct a 24 °C</i> .....	97
<b>Tabla 58</b> <i>Solubilización de fosfato de calcio de las cepas HE16ct y HE20ct a 24 °C</i> ....	98
<b>Tabla 59</b> <i>Porcentaje de germinación inoculadas a 15 °C en 24 horas</i> .....	98
<b>Tabla 60</b> <i>Porcentaje de germinación inoculadas a 15 °C en 48 horas</i> .....	98
<b>Tabla 61</b> <i>Porcentaje de germinación inoculadas a 24 °C en 24 horas</i> .....	99

<b>Tabla 62</b> <i>Porcentaje de germinación inoculadas a 24 °C en 48 horas</i> .....	99
<b>Tabla 63</b> <i>Crecimiento de la planta de alfalfa parte de la raíz a 15 °C</i> .....	99
<b>Tabla 64</b> <i>Crecimiento de la planta de alfalfa parte del tallo a 15 °C</i> .....	100
<b>Tabla 65</b> <i>Crecimiento de la planta de alfalfa parte de la raíz a 24 °C</i> .....	100
<b>Tabla 66</b> <i>Crecimiento de la planta de alfalfa parte del tallo a 24 °C</i> .....	100
<b>Tabla 67</b> <i>Biomasa seca de raíz de plántones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C</i> .....	101
<b>Tabla 68</b> <i>Biomasa seca del tallo de plántones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C</i> .....	101
<b>Tabla 69</b> <i>Producción de clorofila A en 15 °C</i> .....	101
<b>Tabla 70</b> <i>Producción de clorofila B a 15 °C</i> .....	102
<b>Tabla 71</b> <i>Producción de clorofila A en 24 °C</i> .....	102
<b>Tabla 72</b> <i>Producción de clorofila B a 24°C</i> .....	102

## II. RESUMEN

La presente investigación se ejecutó del 9 de noviembre del 2021 hasta el 6 de enero del 2023. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de promoción de crecimiento vegetal y caracterización molecular de algunos hongos endofíticos altoandinos. Se inició con siete hongos endofíticos de los cuales se seleccionaron tres. La capacidad antagonica se evaluó mediante cultivo dual frente seis hongos: *Fusarium sp.* (02), *Geotrichum candidum* (01), *Alternaria sp.* (02) y *Aspergillus niger* (01). La capacidad de producir ácido indol acético (AIA), sideróforos, solubilizar el trifosfato de calcio y actividad celulolítica se ensayó a 15 y 24°C. Las tres cepas seleccionadas fueron identificadas mediante la técnica molecular ITS, además se inocularon en alfalfa para evaluar el porcentaje de germinación, crecimiento y producción de clorofila. Las cepas con mejores resultados fueron HE15ct que inhibió a *Alternaria sp.* ATCC20084 (85.71%± 2.89), HE20Cct sobre *Alternaria sp.* T2 (84 %) y HE16ct sobre *G. candidum* P1 (45.3%± 2.67). La mayor producción de IAA a 15 °C fue de HE20Cct (80.9 ± 2.09 µg/ml), HE15ct (48 ± 0.5 µg/ml); a 24 °C fue de HE20Cct (202.80± 4.9 µg/ml), HE27Cct (181.80± 2.6 µg/ml) y HE15ct (147.8 ± 1.2 µg/ml). Las cepas HE16ct, HE20ct y HE27Rct a 15°C y HE15ct, HE16ct y HE20ct a 24 °C produjeron sideróforos; ninguna solubilizó trifosfato de calcio a 15 °C, pero a 24 °C HE16ct y HE20ct solubilizaron ligeramente. No se observó actividad celulolítica a 15 y 24 °C. Mediante el análisis ITS se identificaron las cepas HE15ct y HE20Cct como *Fusarium sp.* y HE16ct como *Penicillium sp.* Las semillas inoculadas y no inoculadas no mostraron diferencias significativas en su germinación a 15 y 24 °C. Sin embargo, las plantas inoculadas tuvieron mejor crecimiento sin diferencias en biomasa seca. Se resalta que la producción de clorofila B en las plantas inoculadas y cultivadas a 15 °C fue mayor, mientras que a 24°C las plántulas inoculadas con HE20Cct mostró un ligero decrecimiento.

**PALABRAS CLAVE:** Antifúngico, ácido indol acético (AIA), sideróforos, bioensayo.

## ABSTRACT

It ran from November 9, 2021 to January 6, 2023. The objective of this research was to evaluate the plant growth promotion capacity and molecular characterization of some high Andean endophytic fungi. It started with seven endophytic fungi of which three were selected. The antagonistic capacity was evaluated by dual culture against six fungi: *Fusarium* sp. (02), *Geotrichum candidum* (01), *Alternaria* sp. (02) and *Aspergillus niger* (01). Indole acetic acid (IAA) production, siderophores, calcium triphosphate solubilization, and cellulolytic activity were tested at 15 and 24 °C. The three selected strains were identified by the ITS molecular technique, and they were also inoculated in alfalfa to evaluate their effect on germination, growth, and chlorophyll production. The strains with the best results were HE15ct, which inhibited *Alternaria* sp. ATCC20084 ( $85.71\% \pm 2.89$ ), HE20Cct on *Alternaria* sp. T2 (84 %) and HE16ct on *G. candidum* P1 ( $45.3\% \pm 2.67$ ). The highest production of IAA at 15 °C was HE20Cct ( $80.9 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$ ), HE15ct ( $48 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ ); at 24 °C it was HE20Cct ( $202.80 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ ), HE27Cct ( $181.80 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ ) and HE15ct ( $147.8 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ ). Strains HE16ct, HE20ct and HE27Rct at 15°C and HE15ct, HE16ct and HE20ct at 24°C produced siderophores; none solubilized calcium triphosphate at 15 °C, but at 24 °C HE16ct and HE20ct slightly solubilized. No cellulolytic activity was observed at 15 and 24 °C. Through the ITS analysis, the strains HE15ct and HE20Cct were identified as *Fusarium* sp. and HE16ct as *Penicillium* sp. The germination of the inoculated and non-inoculated seeds did not show significant differences at 15 or 24 °C. However, the inoculated plants had better growth without differences in dry biomass. It is highlighted that the production of chlorophyll B in the plants inoculated and cultivated at 15 °C was higher, while at 24 °C the seedlings inoculated with HE20Cct showed a slight decrease.

**KEY WORDS:** Antifungal, indole acetic acid (AIA), siderophores, bioassay.

### III. INTRODUCCIÓN

Vasquez (2018), menciona en los últimos años existen grandes pérdidas que están afectando la agricultura y la alimentación segura, esto dado por múltiples enfermedades y plagas; así mismo, la protección y cuidado de los cultivos frente a los microorganismos fitopatógenos, los compuestos químicos sintéticos son los más usados, pero éstos tienen efectos dañinos sobre el componente medio ambiental y la salud de las personas (Abello & Kelemu 2007). Por lo tanto, se están planteando, frente al uso al excesivo uso de productos sintéticos, la alternativa por parte de los agricultores el uso de microorganismos que promuevan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Leal-Almanza et al. 2018). Esta aplicación se debe a que los microorganismos tienen mecanismos que promueven el crecimiento vegetal, tales como: síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y control de organismos fitopatógenos (Loredo-Osti et al 2004), además Gamboa-Gaitán (2006) indica que varios hongos pueden vivir en los tejidos de las plantas como los hongos endofíticos sin causar daño a su hospedero. En consecuencia, existen investigaciones que muestran que los hongos asociados a plantas (endofíticos) tienen muy buena capacidad de sintetizar compuestos bioactivos, así mismo, modifican la manera de defensa de su planta hospedera incrementando la supervivencia de ambos (Sánchez et al. 2013). Del mismo modo, permiten un mejor desarrollo y crecimiento de la parte radicular, incrementando la maquinaria natural de resistencia frente a problemas como enfermedades que pueden causar enfermedades o plagas causadas por insectos mejorando la producción (González 2015).

Por los motivos anteriormente planteados, se evaluó la capacidad bioactiva de siete cepas de hongos endofíticos aislados de *Hypericum laricifolium* planta altoandina y que se encuentran depositadas en el Banco de cepas del Centro de Investigación de la

Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) de la Facultad de Ciencias de la UNASAM, considerando las propiedades importantes como alternativa hacia a los agroquímicos, tales como el antagonismo con cepas de hongos patógenos en las plantas y la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio y actividad celulolítica, de los cuales se seleccionaron tres cepas y se complementó con su caracterización molecular para su identificación taxonómica y pruebas de bioensayo mediante la inoculación en semillas *Medicago sativa* “alfalfa” donde se evaluó el porcentaje de germinación y desarrollo de las plantas con y sin inoculación con las cepas endofíticas.

### **3.1. OBJETIVOS**

#### **3.1.1. *Objetivo general***

- Evaluar el potencial antifúngico, producción de AIA, sideróforos y caracterización molecular de tres hongos endofíticos

#### **3.1.2. *Objetivos específicos***

- Evaluar la actividad antifúngica de siete hongos endofíticos frente hongos asociados a enfermedades de algunas plantas.
- Evaluar la producción de AIA, sideróforos, la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio y la actividad celulítica de siete hongos endofíticos
- Caracterizar molecularmente para la identificación taxonómica de tres hongos endofíticos seleccionados.
- Comparar el efecto de la inocular tres hongos endofíticos seleccionados sobre el porcentaje de germinación, crecimiento y producción de clorofila en condiciones de laboratorio.

## **IV. MARCO TEORICO**

### **4.1. HONGOS ENDOFÍTICOS**

Según Gamboa (2006) menciona que los organismos endófitos, han recibido interés en los últimos años; porque forman un grupo de microorganismos que habitan al interior de las plantas sin causarles daño (Aragón & Beltran 2018). Los hongos endofíticos son microorganismos que desarrollan en los tejidos de los vegetales hospederos durante parte o toda su vida (Sánchez et al. 2013), así mismo Abello & Kelemu (2007) mencionan que los microorganismos son inherentes a sus hospederos que realizan asociación específica con las plantas para protegerse mutuo; por lo que son importantes en la economía de la agricultura y la medicina (Gamboa 2006).

### **4.2. IMPORTANCIA DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN LA AGRICULTURA.**

Según Peteira et al. (2021) mencionan los microorganismos están en constante contacto con sus hospederos y viven al interior de los tejidos de los hospederos obteniendo nutrientes elaborados por ellas mismas, también ayudan en el crecimiento y desarrollo de las plantas proporcionando protección frente a las enfermedades (Guerrero et al., 2020), además poseen gran potencial adaptativo a las plantas hospederas, así mismo en condiciones desfavorables genera protección, siendo de factor abiótico (salinidad, acidez) y biótico (infección de enfermedades y ataque de plagas) (Abello & Kelemu 2007). Orberá et al. (2012) indican las estrategias para controlar las enfermedades con la inoculación de cepas endofíticas planta-microorganismo que es amigable para el medio ambiente.

### 4.3. LOS HONGOS ENDOFÍTICOS Y LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL

Tejera et al. (2015) indican que promoción de crecimiento vegetal por lado de microorganismos puede ocurrir de manera directa o indirecta, los microorganismos benéficos promueven el desarrollo de sus hospederos y evitan el ataque en los tejidos de las plantas por los patógenos (Moreno et al. 2018). Las relaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos son muy complejas debido al uso de diversos mecanismos para proporcionar el crecimiento y desarrollo de sus hospederos, así como la biofertilización, fito-estimulación y el control biológico (Moreno et al. 2019). Inocular las plantas de rizobacterias poseen capacidad de promoción de crecimiento vegetal reduce sustancialmente su uso de fertilizantes (Moreno et al. 2019), según Pérez et al. (2017) los microorganismos pueden tener la capacidad de favorecer el crecimiento vegetal debido a los ácidos orgánicos, ácido indolacético (IAA), acetoína, capacidad para fijar nitrógeno y de solubilizar fosfato ayudando a aumentar el tamaño de las plantas. Por ejemplo, la bacteria *Pseudomonas fluorescens* C119 inoculada en *Medicago sativa* tiene capacidad de incrementar su crecimiento vegetal en 40% sin infección de la comunidad microbiana en la rizosfera de la alfalfa (Braga 2015), del mismo modo la cepa *Bacillus subtilis* HZ18 controla *Salmonella* incrementando la germinación de la alfalfa en 46.44 % aunque las condiciones ambientales no fueron favorables (Salazar 2017).

### 4.4. PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS DE MICROORGANISMOS

Según Wisniewski & Wilson (1992) manifiestan, los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de controlar biológicamente las enfermedades en las plantas. Se están ejecutando de biocontrol para combatir diversos plagos constituyendo más alternativas enfocadas en el manejo integrado del cultivo (Hernández et al. 2007).

Dentro de los fundamentales mecanismos que usan los antagonistas para combatir se encuentran: parasitismo, disputa y producción de metabolitos antifúngicos (Hernández et al. 2007). En los cultivos *in vitro* donde los microorganismos antifúngicos proporcionan metabolitos secundarios con propiedades antagonicas o demuestran clara obstrucción en el incremento del patógeno (Sánchez et al. 2013). Por ejemplo, algunos géneros del hongo *Fusarium* no son patogénicas y son muy importantes para producir plantas, porque varios de ellos mostraron un efecto de fortaleza para los cultivos colonizadas, incitando a la resistencia de los cultivos para combatir frente al agresión de plagas y patógenos (Martinuz, 2020), disminuyendo la agresión de algunos fitopatógenos más nocivos exponiendo un potencial antifúngico de *Fusarium sp.* contra los patógenos (Arenas et al. 2013).

#### **4.5. ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)**

Vega et al. (2016) manifiestan que la fitohormona natural más común de la clase de las auxinas que actúa a nivel de los ápices de los cultivos donde el ácido indol acético participa en varias actividades fisiológicas como el alargamiento y división celular, el cambio morfológico y fisiológico de los tejidos, comportamiento frente a la luz y gravedad. Las concentraciones de ácido indol acético se tienen reguladas en los cultivos (Romero et al 2020), y tiene efecto en su crecimiento y desarrollo mostrando a veces un aumento en el rendimiento (Arenas et al. 2013). Se ha encontrado que los microorganismos también producen AIA, por ejemplo, Huasasquiche et al. (2020) aisló 184 cepas entre hongos y bacterias de la planta *Lupinus mutabilis* de la parte de las raíces, tallos y rizosfera de los cuales 36 cepas dieron resultados positivos a la frente a la producción de AIA.

#### **4.6. SIDERÓFOROS EN HONGOS ENDOFÍTICOS**

Significa (en griego: traslado de hierro) que viene ser un elemento insignificante casi para todos los seres vivos además es de mucha importancia para el funcionamiento celular, así como en la formación del ADN, aireación y la eliminación de radicales libres (Aguado – Santa Cruz et al. 2012). En ese sentido han aumentado la importancia es los últimos tiempos ya que tiene una gran capacidad en control biológico de los microorganismos fitopatógenos además constituyen mecanismos que prueben el crecimiento vegetal (Aguado et al. 2012). Así mismo poseen moléculas de bajo peso con capacidad a uni6nal hierro (Vara 2020). Por ejemplo, la cepa de *Lasiodiplodia brasiliense* produjo sider6foros en gran cantidad llegando hasta un 46 % (Vara 2020).

#### **4.7. SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO DE CALCIO**

Según Corrales et al. (2014) indican que los hongos endof6ticos tienen que permiten mantener el equilibrio del suelo, adem6s de ayudar al crecimiento de la planta con muchos mecanismos tales como solubilizaci6n de fosfatos, donde se deja libre el i6n fosfato volvi6ndose disponible para los cultivos. As6 mismo los hongos endof6ticos utilizan muchos mecanismos solubilizadores, que les permiten producir 6cidos org6nicos para solubilizar los fosfatos insolubles de la zona rizosf6rica y de este modo pueden ser asimilados por los cultivos (Beltr6n 2015).

#### **4.8. ACTIVIDAD CELULOL6TICA**

Rodr6guez (2019) se define a las celulasas como conjunto de enzimas hidrol6ticas. Para su descomponen o liberaci6n de la celulosa es mediante microorganismos lo cual es por tres actividades sin6rgicas tales como: endoglucanasa, exoglucanasa y la  $\beta$  – glucosidasa (Agudelo et al. 2013). Los hongos endof6ticos que poseen actividad celulol6tica est6n ubicados en la naturaleza y viven asociados muchas veces con las plantas (Alvarado et al. 2019); y se reconocen porque poseen capacidad de generar enzimas que son catalizadores para degradar la lignocelulosa en m6ltiples subproductos (Ram6rez et

al. 2019).

#### **4.9. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

Rodríguez et al. (2007) mencionan que la utilización de las moléculas tales como el ADN, ARN y proteínas nos ayudan a identificar los caracteres genotípicos de las células o los tejidos, la región más utilizada para identificar especies fúngicas es la que contiene el complejo de los ácidos ribonucleicos (ARN ribosómico), ya que contiene secuencias conservadas comunes a todos los hongos. Según Orberá (2004), Por lo general, se usan las secuencias del ITS (Internal Transcribed Spacer) que se encuentran codificando para regiones del ARN ribosomal, además, existen otras secuencias de esta misma región que pueden ser usados si fuera necesario.

#### **4.10. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO CON CEPAS INOCULADAS**

Garcés et al. (2015) mencionan que interactúan fisiológicamente entre los hongos y los cultivos empiezan poco después de tener contacto. Los hongos benéficos pueden ser explicados por mejoras en procesos fisiológicos inoculadas directamente en las semillas (Ortiz et al. 2020). Según Ordoñez et al. (2012) los hongos endofíticos brindan protección efectiva a las plantas o pueden estimular su crecimiento contribuyendo el uso de bioinoculantes, disminuyendo el uso el uso de productos químicos y se fomentando prácticas ecoamigables.

Según Santiago et al. (2019) la clorofila es responsable de realizar la fotosíntesis en las plantas, presenta color verde y absorbe la energía lumínica y la transforma en energía química, además la síntesis de compuestos orgánicos es necesario para la planta lo cual se encuentra en espinacas, berros y acelgas en altas concentraciones.

#### 4.11. HIPÓTESIS

- Hipótesis nula ( $H_0$ ): por lo menos algunos hongos endofíticos evaluados presentan actividad de promoción decrecimiento vegetal y un gen relacionado a la actividad biológica reconocida.
- Hipótesis alterna ( $H_1$ ): ninguno de los hongos endofíticos evaluados presenta actividad de promoción decrecimiento vegetal y un gen relacionado a la actividad biológica reconocida.

#### 4.12. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Antifúngico:** significa oposición, rivalidad y contrariedad. En microorganismos es la relación que tienen los hongos endofíticos confrontándose a patógenos lo cual se inhiben, deterioran o mueren por la causa del más fuerte (Pérez-Terrón et al. 2014).
- **Ácido indol acético (AIA):** es una hormona producida por las plantas y es fundamental en los cultivos controlando varios procesos fisiológicos, por ejemplo: elongación y multiplicación de las células, diferencia morfológica de los tejidos y controla las respuestas de las plantas frente a la luz, además la planta regula la concentración de ácido indol acético (Vega-Celedón et al. 2016).
- **Sideróforos:** son moléculas con atracción al hierro, que son indispensables en los seres vivos, así mismo son importantes para el funcionamiento celular para formación y síntesis del ADN, la respiración celular y la eliminación de radicales libres, además la disponibilidad del hierro es importante porque los microorganismos salen con éxito luego de haber invadido un organismo para colonizar (Aguado 2012).
- **Caracterización molecular:** asegura la fiabilidad de la información, donde la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) es utilizada para identificar de manera molecular, amplificando fragmentos del ADN utilizando cebadores que forman

regiones ITS, los espaciadores internos transcritos ITS que son caracterizados por frecuentes repeticiones de ADNrt regiones conservadas que contienen menor cantidad de regiones conservadas, cuyas características están dadas por los ITS2, 5.8 S e ITS1 (Froeschke et al. 2014).

- **Bioensayo:** son técnicas realizadas con organismos vivos en condiciones de laboratorio y se podrían incluir cultivos celulares, bacterias, hongos, insectos, plantas e incluso animales pequeños como artrópodos. Los bioensayos se utilizan en varios campos de la ciencia para determinar la reacción de los organismos vivos en presencia controlada de una o más sustancias (Ávila-Cervantes et al. 2019).

## V. MATERIALES Y METODOS

Presente investigación se ejecutó del 9 de noviembre del 2021 hasta el 6 de enero del 2023.

### 5.1. AREA DE ESTUDIO Y EPOCA DE EJECUCIÓN

Todo el proyecto se desarrolló en el Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo (UNASAM).

### 5.2. MATERIALES

#### 5.2.1. Material biológico

##### a) Microorganismos

Siete cepas de hongos endófitos aislados de *Hypericum laricifolium* que fue coleccionada de la quebrada de Pitec y fueron obtenidos del banco de cepas del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Facultad de Ciencias de la UNASAM.

Cepa de hongos fitopatógenos o patógenos oportunistas aislados de plantas con síntomas de infección provenientes del banco de cepas del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Facultad de Ciencias de la UNASAM (*Fusarium sp.* FH fue aislado de tomate producida en Huaraz, *Alternaria sp.* T2 fue aislado de maíz y *Geotrichum candidum* P1 fue aislado de la papa).

*Fusarium oxysporum* CTLM12, *Aspergillus niger*. ATCC7275 y *Alternaria sp.* ATCC20084, como cepas estándares obtenidos del banco de cepas del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Facultad de Ciencias de la UNASAM.

Donde: HE15ct, HE significa hongo endofítico, el número significa que es la muestra 15, ct es el nombre de la investigadora Carmen Tamariz.

## b) Material vegetal

Semillas de *Medicago sativa* “alfalfa”

- **Medios de cultivo**
- Agar Czapek
- Agar Sabouraud
- Caldo Tripticasa Soya
- Caldo papa dextrosa
- Agar Tripticasa Soya
- Agar papa Dextrosa
- Agar Czapek más extracto de levadura
- Agar extracto de malta
- Agar extracto de levadura más sacarosa
- Agar Malta
- Caldo Sabouraud
- Carboximetil Celulosa
  
- **Reactivos y soluciones**
- Agua destilada estéril
- Agar-Agar
- Solución NBRIP
- Glicerol
- Agar Cas (azul de cromo azurol)
- Etanol de 96°
- Peptona, glucosa y Extracto de levadura

- L-Triptófano
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- Reactivo de Salkowsky (HC104+FeC13)
- Fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- Sulfato de magnesio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Dicloruro de magnesio exa-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- $\text{NaHPO}_4$
- Cloruro de potasio (KCl)
- Sulfato de manganeso tetrahidratado  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Citrato férrico
- Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Dicloruro de sodio ( $\text{NaCl}_2$ )
- Sulfato de zinc heptahidratado  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Triton x-100 0,01%
- Soluciones para regular el pH: HCl, NaOH 0.1N
- Sulfato de cobre pentahidratado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- Fosfato de potasio mono básico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Fosfato de potasio mono básico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Di cloruro de mercurio  $\text{HgCl}_2$
- Molibdato se sodio dihidratado  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Tween 20
- Lejía y jabón líquido
- **Material de vidrio de laboratorio y otros**

- Placas Petri
- Matraces Erlenmeyer
- Probetas de diferentes volúmenes
- Pipeta de 5 y 10 ml
- Beakers de diferentes volúmenes
- Tubos de ensayo
- Viales de 10 mililitros
- Tips de 2, 5, 10, 100, 200  $\mu$ l, y de 1, 5 y 10 ml
- Microtubos de plástico para centrifuga de 1.5 y 2 ml
- Embudos, Micropipetas
- Timers, Gradillas y Barras magnéticas para agitación
- Frascos de vidrio de 200 ml, Envase de vidrio de 250 ml
- Papel aluminio
- Morteros y Papel filtro
- Parafilm, Pizeta
- Tapones de algodón
- **Equipos**
- Balanzas analíticas
- Cabina de bioseguridad
- Autoclave horizontal
- Microcentrífuga
- Rotador orbital
- Destilador de agua
- Vortex mixer
- Hornos Microonda

- Incubadoras
- Agitador magnético
- pH metro y pH ise benchtop
- Estufa
- Ultrarefrigeradora – 86°C
- Espectrofotómetro
- Refrigeradoras
- Congeladoras
- Cámara fotográfica
- Computadoras

- ***Hypericum laricifolium* (Romerillo)**

Según Carraz (2001) Pertenece al género *Hypericum*, familia Hypericaceae. Este género se encuentra en todo el mundo, que engloba a especies nativas con especies nativas, *Hypericum laricifolium* se encuentra distribuida en la Cordillera de los Andes desde la parte occidental de Venezuela, hasta la parte oriental de Colombia, Ecuador y Perú en américa del sur, en Perú, *H. laricifolium* se utiliza tradicionalmente en los altos andes para el baño contra el resfriado y el posparto con el nombre de romerillo.

## **5.3. METODOLOGÍA**

### **5.3.1. Tipo de investigación**

Según su finalidad, es investigación es básica, puesto que está orientado a generar conocimientos relacionados al área de los organismos endofíticos y algunas característica de los mismos que podrían ser aplicados posteriormente.

De acuerdo con su profundidad es de tipo exploratoria, debido a que se indagó sobre un tema aún no estudiado.

De acuerdo con la naturaleza de las variables la investigación es experimental debido a que su realizaron varios tratamientos y la metodología científica. Sin embargo, en la partede identificación molecular de genes tendrá un componente descriptivo.

### **5.3.2. Población o universo**

Todos los hongos filamentosos endofíticos altoandinos de plantas medicinales del Parque Nacional Huascarán.

### **5.3.3. Análisis estadísticos**

La información cuantitativa fue analizada estadísticamente. Para lo cual se usó las siguientes herramientas: (i) Para la evaluación de las actividades biológicas (antifúngica y promoción de crecimiento vegetal) se hicieron tres repeticiones. Los resultados se sometieron al análisis de varianza (ANVA) y de comparación de medias de Tukey con  $p < 0.05$ , (ii) en los análisis genéticos se aplicaron las metodologías de Neighbord Joining con 1000 boot straps, para contrastar la información obtenido de la herramienta BlastN del GenBank (los cuales son herramientas de bioinformática). Para la prueba antifúngica, AIA, sideróforos, solubilización de trifosfato de calcio, celulolítica, biomasa seca y clorofila se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) y para las pruebas antifúngicas el análisis de varianza se realizó con el índice y para los gráficos se llevó en porcentaje y las pruebas

de bioensayo (porcentaje de germinación y crecimiento de las plantas con y sin inóculos) se utilizó el diseño completamente al azar (DCA).

#### 5.3.4. Diseño Completamente al Azar (DCA)

**Tabla 1**

*Randomización del experimento*

	TRATAMIENTO						
<b>R1</b>	HE15ct	HE16CT	HE20ct	HE20Cct	HE21ct	HE27Cct	HE27Rct
<b>R2</b>	HE16CT	HE20ct	HE15ct	HE27Rct	HE27Cct	HE20Cct	HE21ct
<b>R3</b>	HE20Cct	HE27Cct	HE21ct	HE16CT	HE27Rct	HE20ct	HE15ct

**Tabla 2**

*Croquis del experimento*

<b>R1</b>	HE15ct	HE16ct	HE20ct	HE20Cct	HE21ct	HE27Cct	HE27Rct
<b>R2</b>	HE16ct	HE20ct	HE21ct	HE27Cct	HE27Rct	HE20Cct	HE15ct
<b>R3</b>	HE20Cct	HE27Cct	HE27Rct	HE15ct	HE20Cct	HE16ct	HE21ct

##### a. Modelo aditivo lineal

Según Mentiburu (2007)

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, t \quad j = 1, \dots, r$$

$Y_{ij}$ : es el valor o rendimiento observado en el  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición.

$\mu$ : es el efecto de la media general.

$T_i$ : es efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$ : es el efecto del error experimental en el  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición.

$t$  es el número de tratamientos

$r$  es el número de repeticiones para el  $i$ -ésimo tratamiento

**Tabla 3**

*Análisis de varianza*

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Tratamiento	t-1	SCTRAR	SCTRAT./t-1	SCTRAT./CMError	Sig
Error	t(r-1)	SCError	SCError./t(r-1)		
Total	tr-1	SCTotales			

### **5.3.5. Evaluación antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos oportunistas.**

Para determinar la prueba de actividad antifúngica se utilizó el cultivo dual de Alfiky (2019). Consistió cultivar en una misma placa de PDA en un extremo las cepas de hongos endofíticos (HE), y en el otro extremo a los hongos patógenos (HP), primero se sembraron los hongos endofíticos y después de 4 días los hongos patógenos. La siembra se hizo usando una solución de esporas (2 µl), las placas con PDA se incubaron a 24°C. Después de ocho días de la siembra de los HE se evaluó el índice de inhibición. El índice de antagonismo se obtuvo de la medida del radio interno de la colonia del HP del hongo (es decir en la dirección de los hongos endofitos) y el radio de la colonia control del HP (ha sido cultivado sin HE). Además, para el análisis de varianza ANVA se usó el índice antifúngico y para los gráficos se pasó en porcentaje.

$$\text{Índice de inhibición} = (1 - \text{RP}/\text{RC}) * 100$$

Donde:

RP: radio medido de la colonia del hongo patógeno frente al hongo endofítico

RC: radio medido de la colonia del hongo patógeno control.

### **5.3.6. Producción de ácido indol acético (AIA)**

Fue realizada mediante el método usado por Kumla et al. (2014). Se preparó en medio de caldo papa-dextrosa (PDB) suplementado con 2mg/ml de L- triptófano. Se distribuyó 10 ml en matraces de 100 ml. Se inocularon con 5 cuadrados (5mm<sup>2</sup>) de micelio de hongo fresco, se cultivó a 15 °C y 24 °C bajo agitación orbital de 150 rpm. Se prepararon 2 repeticiones por HE y un control sin inóculo. Se evaluó la producción de AIA a 6, 9, 12 y 15 días extrayendo 600µl de caldo en un microtubo.

Para su lectura de concentración de AIA, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm x 2 minutos. Se dispuso 100µl del sobrenadante en una microplaca de 96 pocillos y se agregó 100ul de solución de Salkowski y luego se incubó en oscuridad por 20 minutos. Posteriormente se realizó la medición de la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro monocromador de microplaca.

También, se preparó la curva estándar para el AIA químicamente pura a 0, 25, 50, 75 y 1000 µg/ml, que se usó para determinar la concentración de AIA en las muestras evaluadas.

### **5.3.7. Producción de sideróforos**

Se determinó mediante la prueba cualitativa según Ulloa-muñoz et al. (2020). En una misma placa se usaron dos medios de cultivo (PDA, YES y MEA) en una mitad y agar CAS en la mitad. La siembra se hizo inoculando una solución de esporas (2µl) sobre un disco de papel filtro estéril colocado en medio de placa entre los dos medios de cultivo, se usaron discos sin inóculo como blancos negativos. Se prepararon tres repeticiones por tratamiento. Se incubó a dos temperaturas 15°C y 24°C y se evaluó en siete días. La coloración rojiza-grosella en la parte del agar CAS se considera como positiva para la producción de sideróforos.

### **5.3.8. Evaluación de actividad de solubilización de fosfato de calcio**

La capacidad para solubilizar fosfatos se hizo con la metodología de Nautiyal (1999). Al medio NBRIP se le adicionó Tritón-X al 0.1 %. Se ubicaron discos de papel filtro estériles sobre el medio y fueron inoculados con 2 µl de solución de esporas, se realizaron tres repeticiones por cepa y un control libre de inóculo y se incubaron en oscuridad a 15 y 24°C y la evaluación se realizó a los siete días. Se determinó el índice de solubilización de fosfato de calcio según Cisneros & Sánchez (2015), de acuerdo con la siguiente fórmula:

Índice de solubilización de fosfato (ISP) = A/B

Dónde:

A = Diámetro del halo en centímetros formado por la solubilización del fosfato (diámetro colonia + halozonal) y B = Diámetro (cm) formado por el crecimiento de la colonia.

### **5.3.9. Evaluación de la actividad celulolítica**

Se realizó mediante la técnica descrita por Tamariz (2014). La actividad celulolítica fue evaluada en placas en medio Agar Sabouraud (AS) más 0,1% de carboximetilcelulosa (CMC). Se sembraron 2µl de solución de esporas sobre discos de papel con cuatro replicas por placa. Se incubó a temperaturas de 15 y 24 °C por 7 días. Posteriormente se reveló con rojo Congo al 0.1% (p/v) por 20 minutos en un rotador orbital a 120 rpm y tres lavadas con NaCl 1M por 10 minutos.

La degradación de la celulosa se determinó por la aparición de zonas más transparentes (halos) en el agar con rojo Congo. El diámetro del halo donde se degradó la celulosa indica la actividad celulolítica mediante la fórmula:

Índice Actividad Celulolítica = A/B

Dónde:

A: Diámetro del halo de degradación de celulosa + diámetro de crecimiento de la colonia del hongo

B: Diámetro de crecimiento de la colonia del hongo

### **5.3.10. Caracterización morfológica**

Los hongos se cultivaron en Agar extracto de levadura sacarosa (YES), agar Czapek (CYA) y agar extracto de malta (MEA) y. Las placas de YES y MEA, se incubaron a 24°C y CYA a 24°C por 7 días. Se hicieron tomas fotográficas para obtener el registro de la macro morfología.

### 5.3.11. Caracterización molecular de los microorganismos

La preparación del micelio para la extracción del ADN realizó con la metodología de Muñoz-Silva et al. (2019), y para la extracción se usó el Kit AxyPrep Multisource Genomic Miniprep (Axigen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El PCR del ITS se hizo con los cebadores forward “ITS1” y reverse “ITS4” realizado por por Ulloa-Muñoz et al. (2020). El secuenciamiento lo realizó la empresa Macrogen (Korea). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias tipo buscadas y existentes del GenBank y el análisis filogenético se hizo con el programa bioinformático Mega v.7 usando el método Maximum Likelihood y Kimura-2-parameters with 1000 bootstraps.

### 5.3.12. Bioensayo

El bioensayo se preparó con la metodología usada por Ulloa-Muñoz et al. (2020). Se usó el diseño DCA (Diseño Completamente al Azar) que estuvo conformado por 4 tratamientos incorporado el control y tres repeticiones por tratamiento.

#### a. Efecto de la inoculación de hongos endofíticos en la germinación de alfalfa

Se inocularon semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) con 3 cepas de hongos endofitos (por separado) como bioensayo para evaluar sus efectos sobre la germinación de estas plantas. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad.

Las semillas fueron esterilizadas con lejía (hipoclorito de sodio) al 4 %, durante 4 minutos, y fueron lavadas seis veces usando agua destilada estéril (3 minutos por cada vez); fueron puestas en placas de Petri con papel absorbente esterilizadas previamente. Las semillas esterilizadas se remojaron durante 4 h con inóculo al 3% de solución de esporas y el control usó agua destilada.

Después, se transfirieron 30 semillas a placas de Petri que contenían Agar Agua (Agar-Agar 1,5 %). Todas las muestras se prepararon con tres replicas y la prueba se incubaron a dos temperaturas 15 y 24°C por 48 horas. Se contabilizaron las semillas que germinaron

para calcular los porcentajes de germinación.

#### **b. Efecto de la inoculación en el crecimiento de las plantas de alfalfa**

Las semillas germinadas que fueron previamente inoculadas fueron transferidas de manera aséptica a vasos de plástico de 9 onzas con sustrato estéril compuesto por 50% de turba y 50% de arena. El riego se realizó con 50 ml de agua del caño estéril. Las plántulas sembradas se colocaron a temperatura constante de 15 °C y ambiental (aprox. 24 °C) con fotoperiodo de 16 horas luz. Se sembraron 8 plántulas por pote y se prepararon tres replicas por cada muestra.

Luego de 28 días de la siembra se evaluaron: la longitud del tallo, de la raíz y la biomasa seca (peso seco) de las plantas por tratamiento y repeticiones.

#### **c. Evaluación de la clorofila en alfalfa inoculada**

La parte aérea se secó en estufa a 40 °C durante 24 horas, se molió en mortero y se maceró con metanol (100mg/ml) por 2 horas, luego se centrifugaron a 1200 rpm x 4 minutos y se recuperó el líquido sobrenadante. La solución se diluyó a 2 mg/ml y la clorofila se cuantificó en absorbancias de 652 y 665 del extracto de clorofila en un espectrofotómetro de microplaca. La clorofila A y B se calcularon siguiendo la fórmula de Ritchie y el camino óptico 0.51 (Warren 2008).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

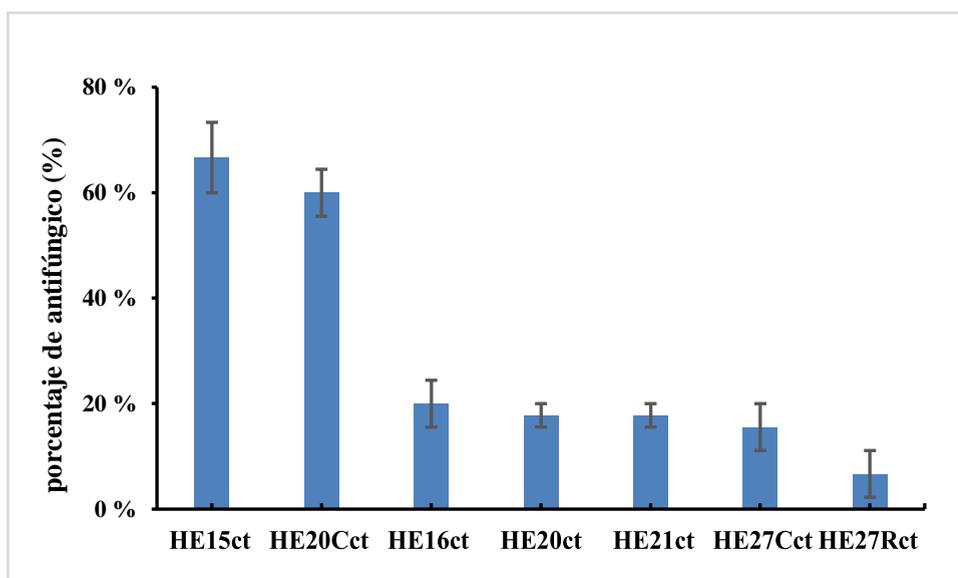
### 6.1. Actividad antagonica de las cepas de hongos endofíticos frente cepas de patógenos.

Los ensayos se realizaron a 24°C con siete hongos endofíticos HE15ct, HE16ct, HE20ct, HE20Cct, HE21ct, HE27Cct, y HE27Rct, frente a seis hongos *Fusarium oxysporum* CTLM12, *Fusarium* sp. FH, *Aspergillus niger* ATCC27275, *Alternaria* sp. ATCC20084, *Alternaria* sp. T2 y *Geotrichum candidum* P1.

#### 6.1.1. Actividad antagonica de hongos endofíticos frente a *Fusarium osysporum* CTLM12

##### Figura 1

Porcentaje de actividad antagonica de hongos endofítico frente a *Fusarium oxysporum* CTLM12



**Tabla 4**

*Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a fusarium oxysporum CLTM12*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-CLTM12	3	66.67	a
HE20Cct-CLTM12	3	60.00	a
HE16ct-CLTM12	3	20.00	b
HE21ct-CLTM12	3	17.78	b
HE20ct-CLTM12	3	17.78	b
HE27Cct-CLTM12	3	15.56	b
HE27Rct-CLTM12	3	6.67	c

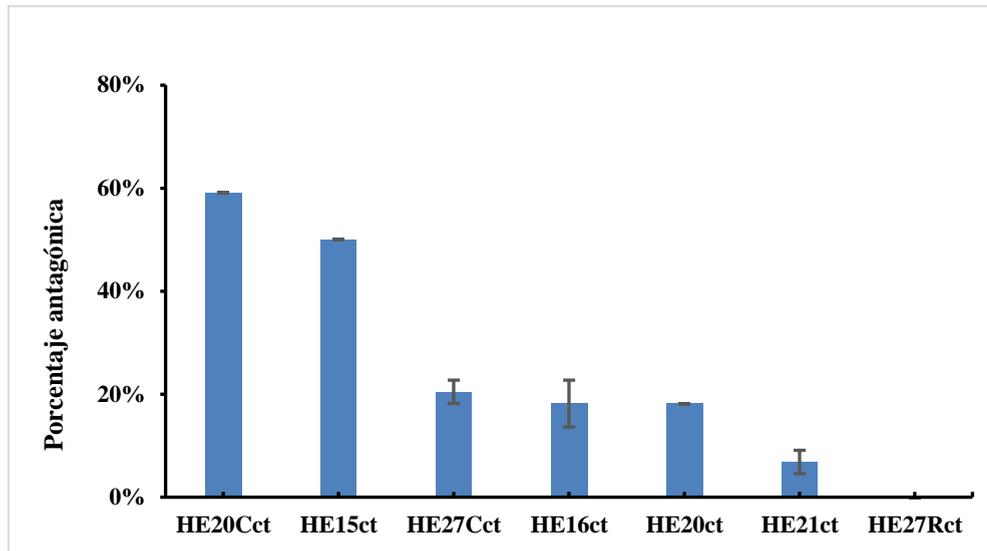
El análisis de varianza ANVA muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas y la prueba de Tukey muestra que existen diferencias estadísticas significativas en la cepa HE27Rc que inhibe en 6.67%, además no hubo diferencias estadísticas significativas en las cepas HE27Cct, HE20ct, HE21ct y HE16ct que inhibieron en 15.56%, 17.78%, 17.78% y 20 %, respectivamente, así mismo no hay diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE15ct que inhibió en 66.67% y HE20Cct inhibió en 60%.

Todos los hongos endofíticos mostraron alguna capacidad antagónica frente a *Fusarium oxysporum* CTML12, pero las mejores cepas fueron HE15ct y HE20Cct.

### 6.1.2. Actividad antagonica de hongos endofiticos frente a *Fusarium sp. FH*

**Figura 2**

Porcentaje de actividad antagonica de hongos endofiticos



**Tabla 5**

Comparación de Tukey de hongos endofiticos frente a *Fusarium sp. FH*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20Cct-FH	3	59.09	a
HE15ct-FH	3	50.00	b
HE27Cct-FH	3	20.45	c
HE16ct-FH	3	18.18	c
HE20ct-FH	3	18.18	c
HE21ct-FH	3	6.82	d
HE27Rct-FH	3	0.00	e

El análisis de varianza ANVA muestra que existe diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey indica que tuvo diferencias estadísticas significativas la cepa HE21ct que inhibió en 6.82%, además no tuvieron diferencias estadísticas significativas las cepas HE16ct, HE20ct y HE27Rct que inhibieron en 18.18%, 18.18% y 20.50 %, respectivamente, así mismo hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE15Cct que inhibió en 50%, también hubo diferencias

estadísticas significativas en la cepa HE20Cct que inhibe en 59.09%.

El hongo endofítico HE27Rct no tuvo la capacidad antagonica, pero las demás cepas si tuvieron crecimiento frente a *Fusarium sp.* FH, siendo las mejores cepas la HE20Cct y HE15ct.

### 6.1.3. Actividad antagonica de hongos endofíticos frente a *Aspergillus niger*

ATCC7275.

Figura 3

Porcentaje de actividad antagonica de hongos endofíticos frente a *Aspergillus niger*

ATCC7275

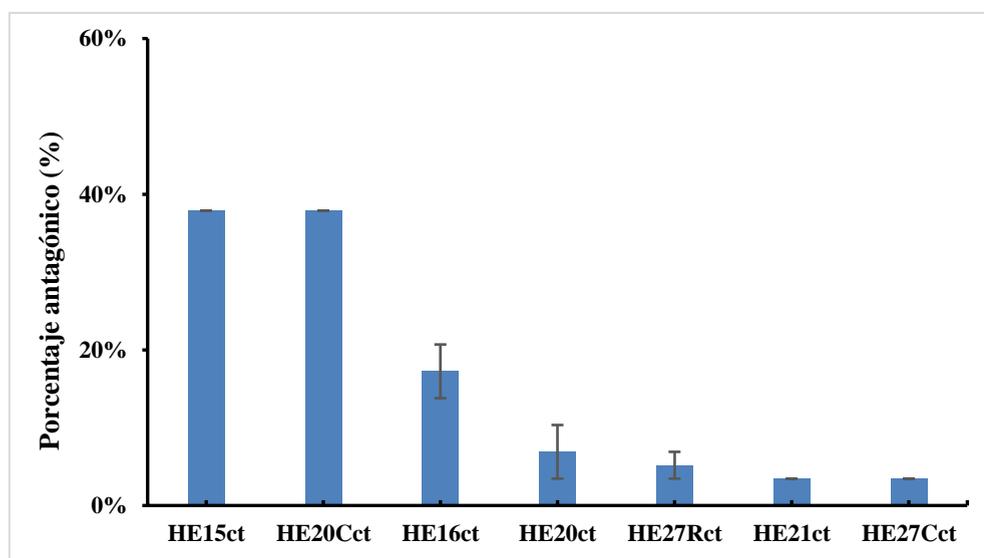


Tabla 6

Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a *Aspergillus niger* ATCC7275

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-ATCC7275	3	37.93	a
HE16ct-ATCC7275	3	37.93	a
HE20ct-ATCC7275	3	17.24	b
HE20Cct-ATCC7275	3	6.90	c
HE21ct-ATCC7275	3	5.17	c
HE27Cct-ATCC7275	3	3.45	c
HE27Rct-ATCC7275	3	3.45	c

El análisis de varianza ANVA muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas, y la prueba de Tukey indica que no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE21ct, HE27Cct, HE27Rct, HE20ct que inhibieron en 3.45%, 3.45%, 3.45%, 6.90%, respectivamente. Además, hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE16ct que inhibió en 17.24%. Así mismo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre estas cepas HE15ct y HE20Cct que inhibieron en 37.93 %.

Todas las cepas de hongos endofíticos tuvieron capacidad antagónica, así mismo dos cepas tienen mayor capacidad antagónica los HE15ct y HE20Cct que inhibieron en 37.93%.

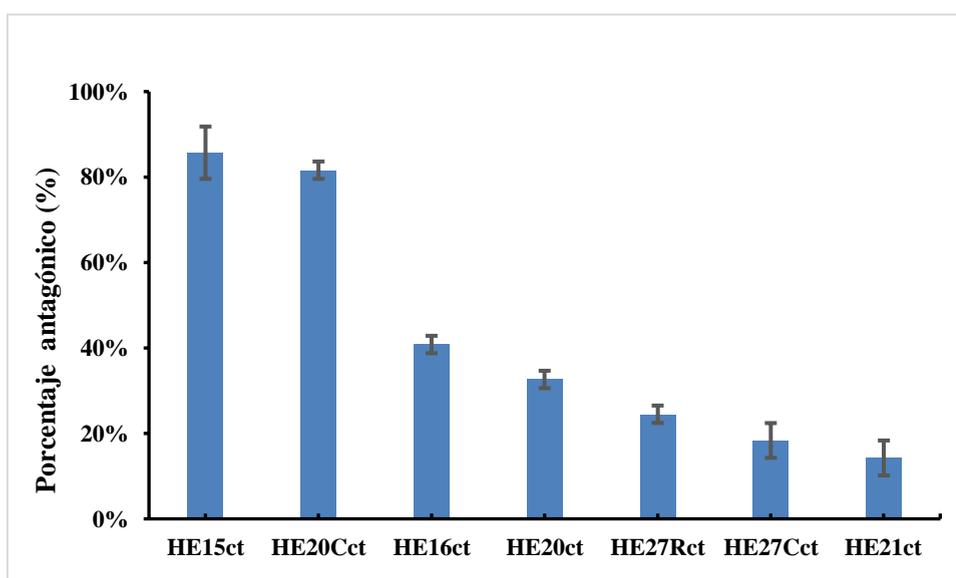
#### 6.1.4. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a *Alternaria sp.*

*ATCC20084.*

##### Figura 4

Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a *Alternaria sp.*

*ATCC20084*



**Tabla 7**

*Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a Alternaria sp. ATCC20084*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
HE15ct-ATCC20084	3	85.71	a	
HE20Cc-ATCC20084	3	81.63	a	
HE16ct-ATCC20084	3	40.82	b	
HE20ct-ATCC20084	3	32.65	bc	
HE27Rct-ATCC20084	3	24.49	cd	
HE27Cct-ATCC20084	3	18.37	de	
HE21ct-ATCC20084	3	14.39	e	

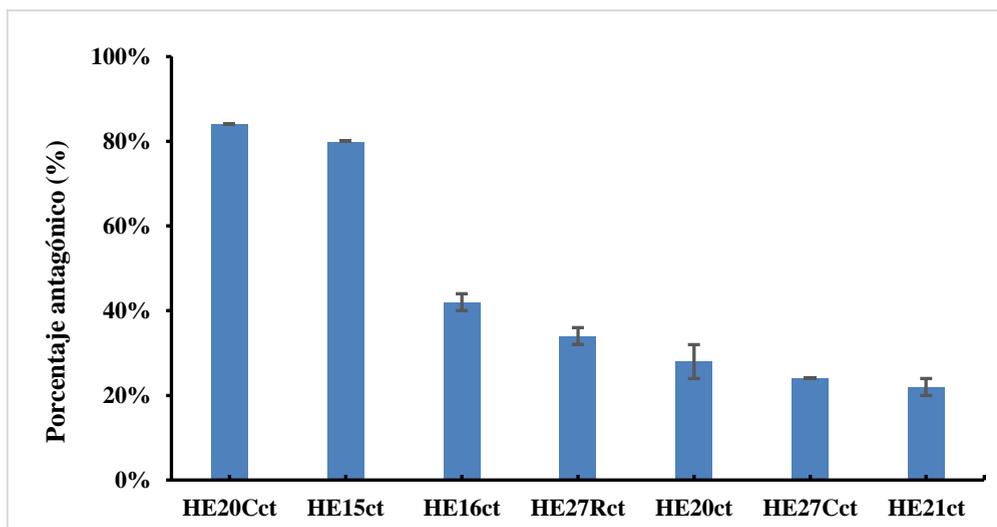
El análisis de varianza ANVA muestra que existe diferencias estadísticas significativas entre las cepas y la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE21ct que inhibió en 14.29%, también tuvo diferencias estadísticas significativas la cepa HE27Cct que inhibió en 18.37%, además hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE27Rct que inhibió 24.49%, así mismo hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE20ct que inhibió en 32.65%, así mismo demostró que hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE16ct que inhibió en 40.82%. también no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE20Cct y HE15ct que inhibieron en 81.63% y 85.71%, respectivamente.

Todos los hongos endofíticos mostraron capacidad antagónica, pero las cepas HE15ct y HE20Cct tuvieron mayor capacidad antagónica.

### 6.1.5. Actividad antagonica de hongos endofiticos frente a *Alternaria* sp. T2

**Figura 5**

Porcentaje de actividad antagonica de hongos endofiticos frente a *Alternaria* sp. T2



**Tabla 8**

Comparación de Tukey de hongos endofiticos frente a *Alternaria* sp. T2

Factor	Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )		
	N	Media	Agrupación
HE20Cct-T2	3	84.00	a
HE15ct-T2	3	80.00	a
HE16ct-T2	3	42.00	b
HE27Rct-T2	3	34.00	c
HE27Rct-T2	3	28.00	d
HE27Cct-T2	3	24.00	de
HE21ct-T2	3	22.00	e

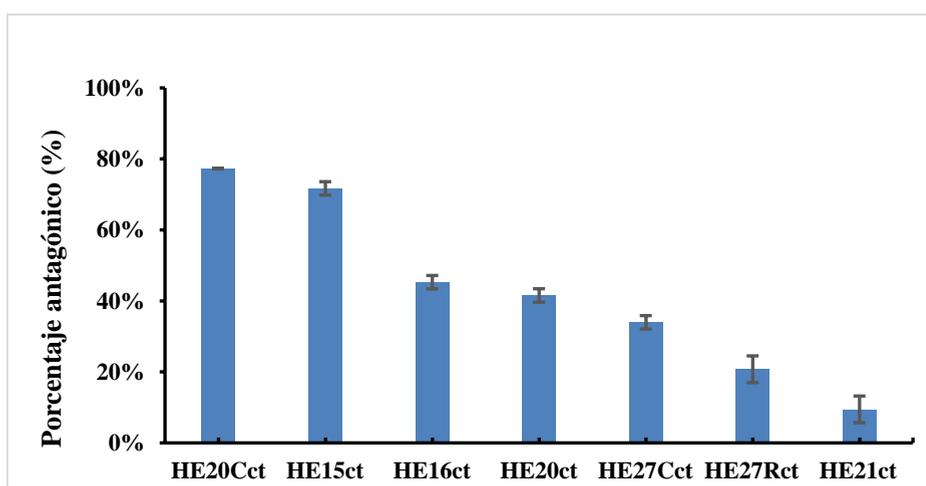
El análisis de varianza ANVA muestra que existe diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE21ct que inhibió en 22%, además hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE27Cct que inhibió en 24%, además tuvo diferencias estadísticas significativas la cepa HE20ct que inhibió en 28%, así mismo mostro diferencias estadísticas significativas la cepa HE27Rct que inhibió en 34%, también hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE16ct que inhibió en 42%, así también

no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE15ct y HE20Cct que inhibieron en 80% y 84% respectivamente. Todos los hongos endofíticos tuvieron capacidad de antagonismo frente al patógeno *Alternaria* sp. T2, además las cepas HE15ct y HE20Cct tuvieron mayor capacidad antagónica.

#### 6.1.6. Actividad antagónica de hongos endofíticos frente a *Geotrichum candidum* P1

**Figura 6**

Porcentaje de actividad antagónica de hongos endofíticos frente a *Geotrichum candidum* P1.



**Tabla 9**

Comparación de Tukey de hongos endofíticos frente a *Geotrichum candidum* P1.

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
HE20Cct-P1	3	77.36	a	
HE15ct-P1	3	71.70	a	
HE16ct-P1	3	45.28	b	
HE20ct-P1	3	41.51	b	
HE27Cct-P1	3	33.96	c	
HE27Rct-P1	3	20.75	d	
HE21ct-P1	3	9.43	e	

El análisis de varianza ANVA muestra que existe diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey indica que tuvo diferencias estadísticas significativas la cepa HE21ct que inhibió en 9.43%, además hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE27Rct que inhibió en 20.75%, también hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE27Cct que inhibió en 33.96%. pero no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE20ct y HE16ct que inhiben en 41.51% y 45.28%, respectivamente. también no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE15ct inhibió en 71.70% y HE20Cct en 77.36%. Todas las cepas de hongos endofíticos mostraron capacidad de inhibición frente al patógeno *Geotrichum sp.* P1, además las mejores cepas fueron HE15ct y HE20Cct.

Los resultados obtenidos de la prueba de actividad antagónica al enfrentarse las cepas de hongos endofíticos HE15ct, HE16ct, HE20ct, HE20Cct, HE21ct, HE27Cct y HE27Rct frente a los hongos *Fusarium oxysporum* CTLM12, *Fusarium sp.* FH, *Aspergillus niger* ATCC7275, *Alternaria sp.* ATCC20084, *Alternaria sp.* T2 y *Geotrichum candidum* P1. Demostró el HE27Rct no tuvo capacidad antagónica frente al patógeno *Fusarium sp.* FH, además las mejores cepas fueron HE15ct que inhibió a *Alternaria sp.* ATCC20084 en  $85.71\% \pm 2.89$ , HE20Cct que inhibió a *Alternaria sp.* T2 en 84 % y HE16ct que inhibió a *Geotrichum candidum* P1 en  $45.3 \pm 2.67$  %.

Otra investigación realizada de la cepa *Bacillus sp.* evidenció su control al patógeno *Fusarium oxysporum* con capacidad de inhibición en 78%, fue evaluada a los 12 días y a 30 °C (Rodríguez et al. 2017). Además, las cepas de hongos endofíticos VT22H y *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H evaluadas en cinco días a 24 °C tuvieron capacidad inhibición frente a *Fusarium oxysporum* en 29% y 26%, respectivamente (Ulloa-muñoz et al. 2020). *Aspergillus sp.* demostró que tiene actividad antagónica contra *Fusarium sp.* muestreado en 336 horas e incubado a 27 °C, además fue clasificado en nivel tres porque

fue la mejor cepa (Arenas et al. 2013). La cepa que presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) fue *Trichoderma sp.* que dominó por completo al fitopatógeno *Fusarium spp.* a los 14 días a 24 °C (Espino et al. 2017).

## 6.2. Determinación de la producción de ácido indol acético (AIA)

Según Vega et al. (2016) el ácido indol-3-acético (AIA) es una auxina muy importante que se encuentra en las plantas debido a que participa controlando varios procesos relacionados al funcionamiento de las plantas, tales como el alargamiento, la división de las células, la diferenciación morfológica y fisiológica de los tejidos y la respuesta a la luz.

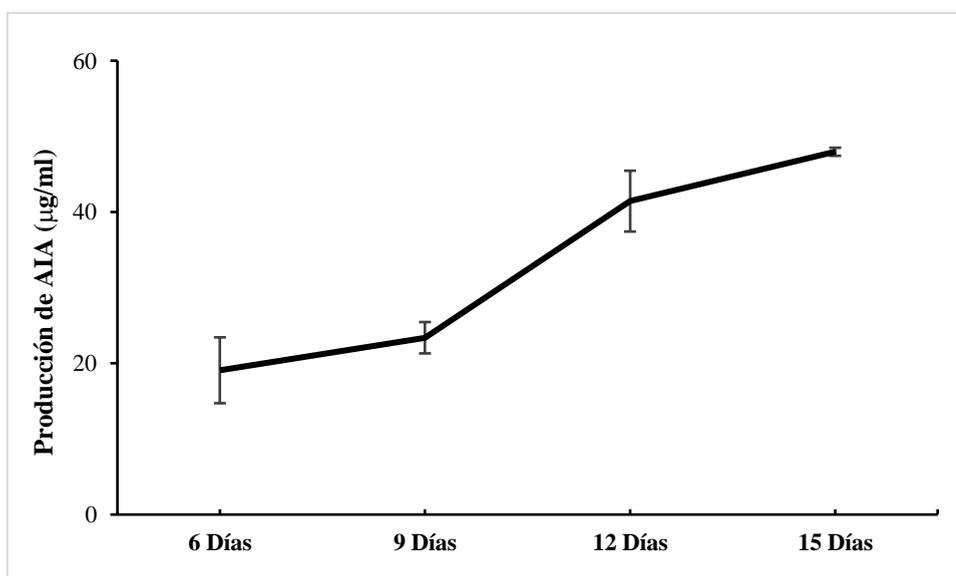
Es importante mencionar que se realizaron las pruebas a dos temperaturas 15 y 24 °C, la prueba para ambas temperaturas fue de siete cepas de hongos endofíticos HE15ct, E16ct, HE20ct, HE20Cct, HE21ct, HE27Cct y HE27Rct.

### 6.2.1. Resultados de ácido indol acético (AIA) en temperatura de 15 °C

#### 6.2.1.1. Producción de AIA de la cepa HE15ct.

#### Figura 7

Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE15ct



**Tabla 10**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE15ct*

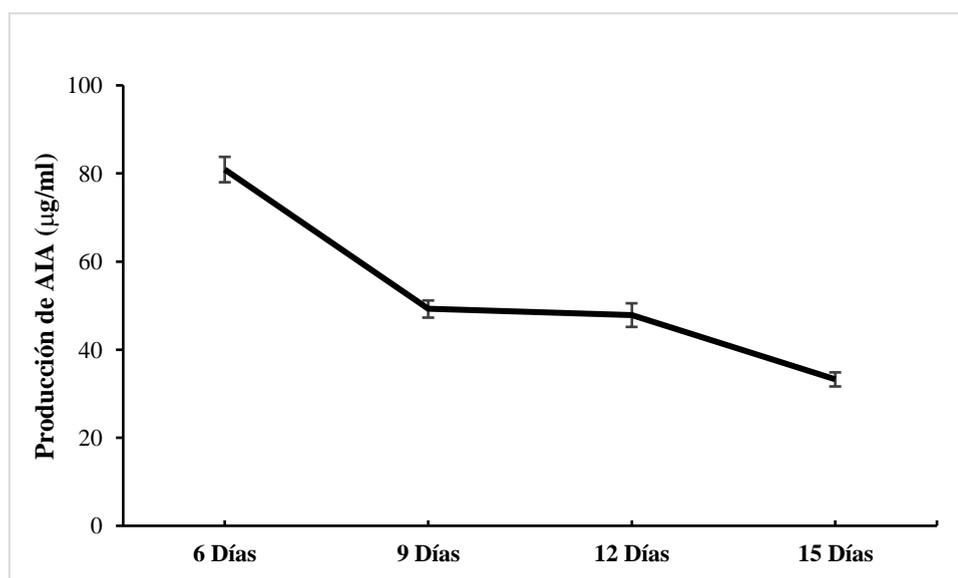
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-15D	4	47.97	a
HE15ct-12D	4	41.44	a
HE15ct-9D	4	23.39	b
HE15ct-6D	4	19.08	b

El análisis de varianza ANVA muestra que existe diferencias estadísticas significativas entre los días de incubación y la prueba de Tukey indica que no existen diferencias estadísticas significativas en 6 y 9 días que se produjo 19.1 y 23.4  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Así mismo no hubo diferencias estadísticas significativas en los 12 y 15 días que se produjo 41.4 y 48  $\mu\text{g/ml}$ , habiéndose obtenido mayor producción a 12 y 15 días.

#### **6.2.1.2. Producción de AIA por la cepa HE20Cct**

**Figura 8**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20Cct*



**Tabla 11**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE20Cct*

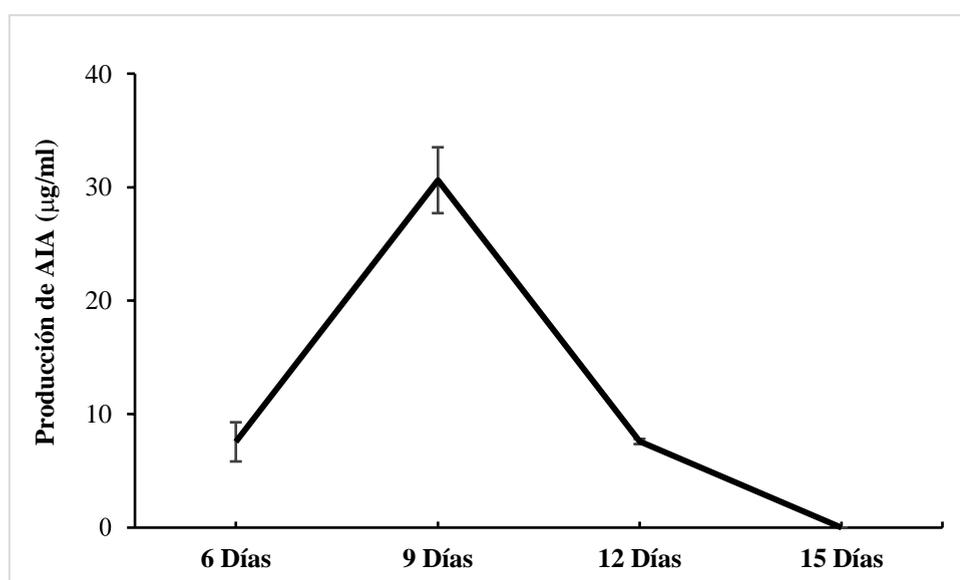
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20Cct-6D	4	80.89	a
HE20Cct-9D	4	49.22	b
HE20Cct-12D	4	47.83	b
HE20Cct-15D	4	33.26	c

El análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y según la prueba de Tukey indica en 15 días produjo 33.3 ug/ml, además no hubo diferencias estadísticas significativas en 9 y 12 días produjeron 49.2 y 47.8 ug/ml respectivamente, pero si hubo diferencias estadísticas significativas en 6 días produciendo 80.9 ug/ml. La cepa HE20Cct tuvo capacidad de producir AIA a los 6,9, 12 y 15 días, siendo en 6 días con mejor concentración con 80.9  $\mu\text{g/ml}$ .

### 6.2.1.3. Producción de AIA de la cepa HE21ct

**Figura 9**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE21ct*



**Tabla 12**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE21ct*

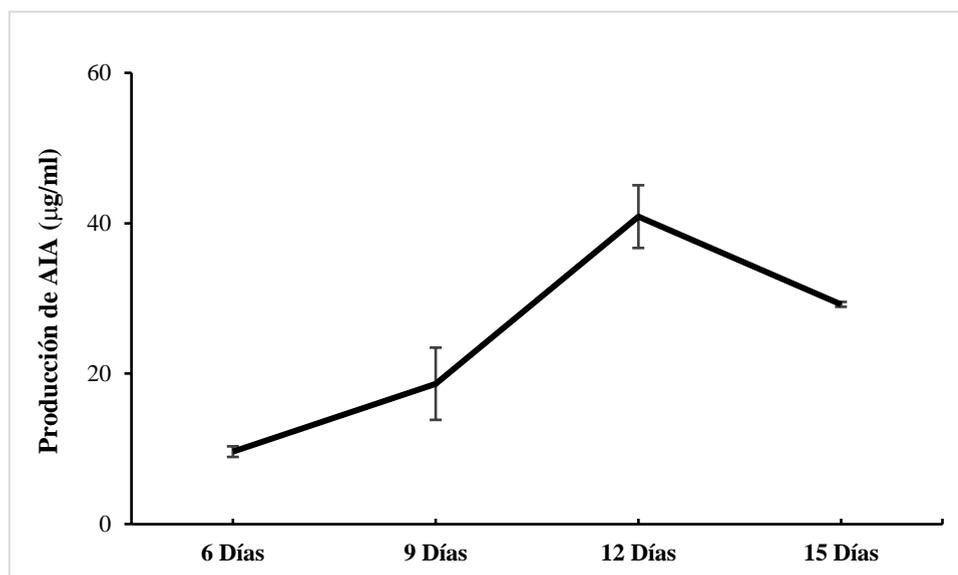
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE21ct-9D	4	30.61	a
HE21ct-12D	4	7.58	b
HE21ct-6D	4	7.58	b
HE21ct-15D	4	0.00	c

El análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y la prueba de Tukey muestra que no existen diferencias estadísticas significativas en 6 y 12 días se produjo 7.6  $\mu\text{g/ml}$ , además, si hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo 30.6  $\mu\text{g/ml}$ . Siendo este último que tuvo la mayor producción y a los 15 días no produjo.

#### **6.2.1.4. Producción de AIA por la cepa HE27Cct**

**Figura 10**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Cct*



**Tabla 13**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE27Cct*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE27Cct-12D	4	40.89	a
HE27Cct-15D	4	29.22	b
HE27Cct-9D	4	18.67	c
HE27Cct-6D	4	9.64	d

Los resultados sometidos al análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y según la prueba Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en 6 días que produjo 9.6  $\mu\text{g/ml}$  además hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo 18.7  $\mu\text{g/ml}$ , también hubo diferencias estadísticas significativas en 15 días que produjo 29.2  $\mu\text{g/ml}$ . Así mismo, hubo diferencias estadísticas significativas en 12 días que produjo 40.9  $\mu\text{g/ml}$ .

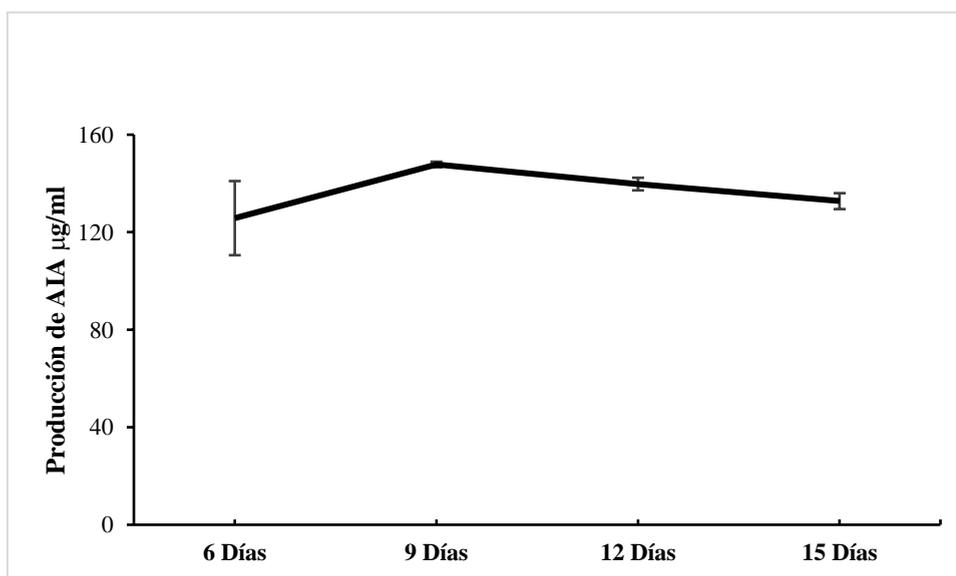
Es importante mencionar del resultado obtenido de la prueba de AIA a 15 °C. donde se encontró que las cepas HE16ct, HE20ct, HE27Rct no produjeron AIA y la cepa HE21ct produjo AIA a los 6, 9 y 12 días. Así mismo, las cepas con mayor concentración de AIA fueron: HE20Cct con (80.9  $\mu\text{g/ml}$  en 6 días) y HE15ct con (48  $\mu\text{g/ml}$  en 15).

## 6.2.2. Resultados de ácido indol acético (AIA) a 24 °C

### 6.2.2.1. Producción de AIA por la cepa HE15ct

**Figura 11**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE15ct*



**Tabla 14**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE15ct*

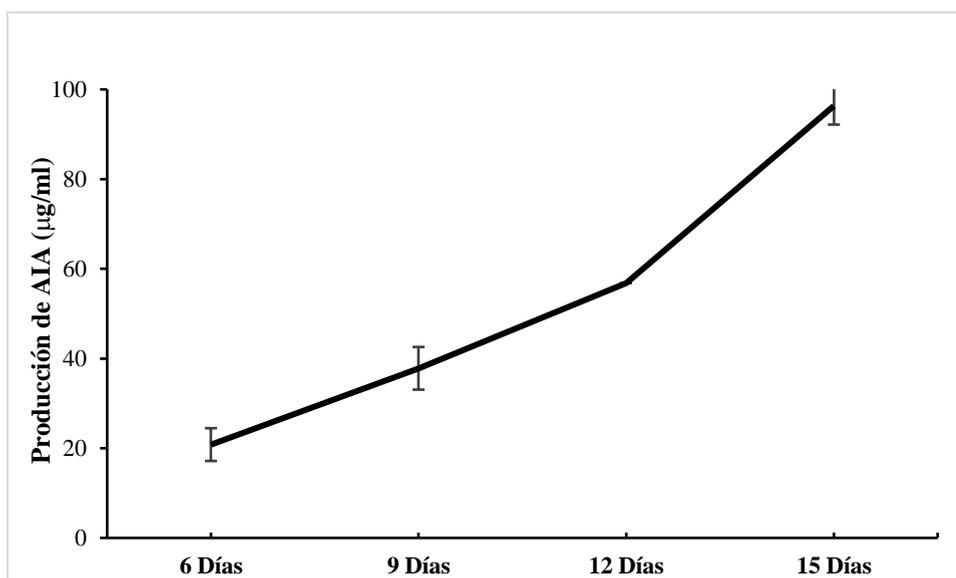
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-9D	4	147.80	a
HE15ct-12D	4	139.80	ab
HE15ct-15D	4	132.80	ab
HE15ct-6D	4	125.80	b

Los resultados analizados con el análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y según la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en 6 días que produjo 125.8 µg/ml, además no hubo diferencias estadísticas significativas entre los 12 y 15 que produjeron 139.8 y 132.8 µg/ml respectivamente, Así mismo, hubo diferencias estadísticas significativas a los 9 días que produjo 147.8 ug/ml, además produjo mayor cantidad de AIA.

### 6.2.2.2. Producción de AIA por la cepa HE20ct

**Figura 12**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20ct*



**Tabla 15**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE20ct*

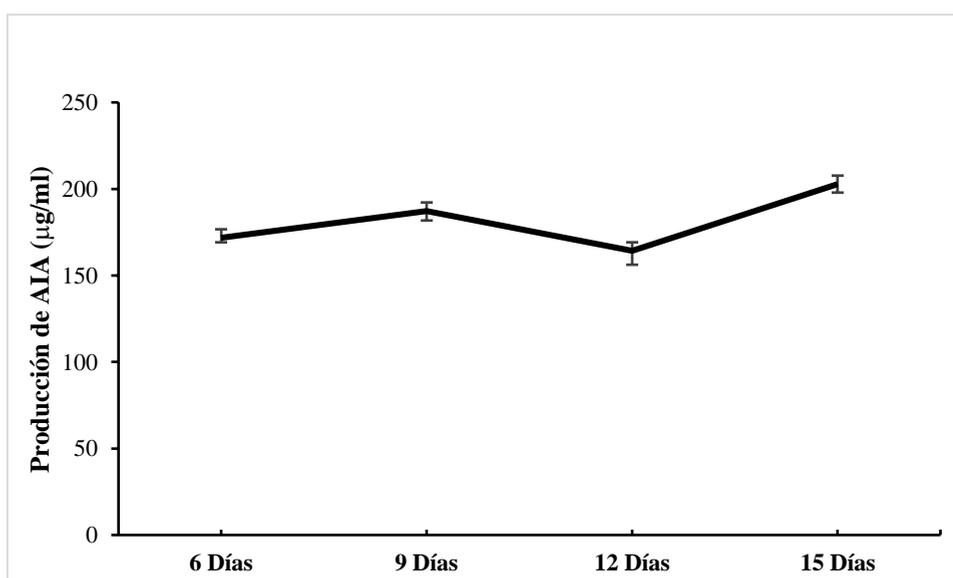
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20ct-15D	4	96.30	a
HE20ct-12D	4	56.80	b
HE20ct-9D	4	37.80	c
HE20ct-6D	4	20.80	d

El análisis de varianza ANVA muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre los días y la prueba de Tukey muestra que existen diferencias estadísticas significativas en 6 días que produjo 20.8 µg/ml, además se encontró diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo 37.8 µg/ml. Asimismo, si hubo diferencias estadísticas significativas en 12 días que produjo 56.8 µg/ml, también diferencias estadísticas significativas en 15 días que 96.3 µg/ml.

### 6.2.2.3. Producción de AIA por la cepa HE20Cct

**Figura 13**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE20Cct*



**Tabla 16**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE20Cct*

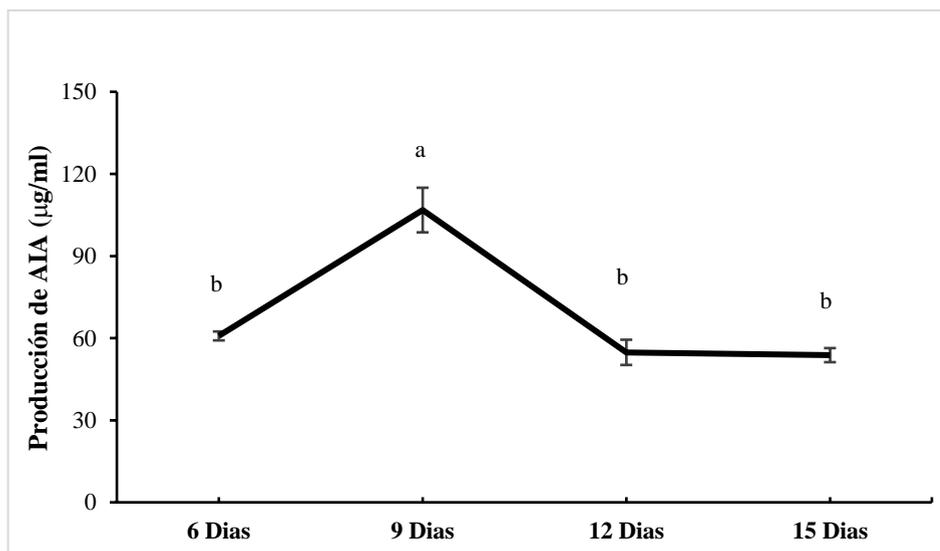
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20Cct-15D	4	202.80	a
HE20Cct-9D	4	187.30	b
HE20Cct-6D	4	171.80	c
HE20Cct-12D	4	164.30	c

Los resultados sometidos al análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días, mientras que la prueba de Tukey muestra que no existen diferencias estadísticas significativas en 6 y 12 días se produjo 171.8 y 164.3  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Así mismo, hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo 187.3  $\mu\text{g/ml}$ . además hubo diferencias estadísticas significativas en 15 días que produjo 202.8  $\mu\text{g/ml}$  que obtuvo la mayor producción.

#### 6.2.2.4. Producción de AIA por la cepa HE21ct

**Figura 14**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE21ct*



**Tabla 17**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE21ct*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE21ct-9D	4	106.80	a
HE21ct-6D	4	60.80	b
HE21ct-12D	4	54.80	b
HE21ct-15D	4	53.80	b

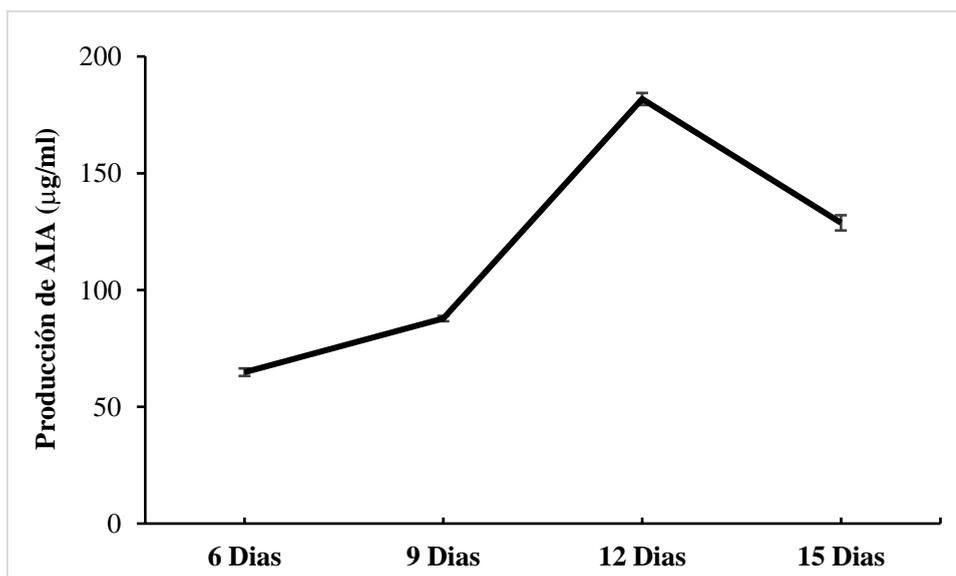
Los resultados sometidos al análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días, mientras que la prueba de Tukey indica que no hubo diferencias estadísticas significativas en 15, 12 y 6 días que produjeron 53.8, 54.8 y 60.8  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Así mismo, si hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días con 106.8  $\mu\text{g/ml}$ .

La cepa HE21ct tuvo la capacidad de producir AIA en 6, 9, 12 y 15 días, se encontró que la mayor producción 106.8  $\mu\text{g/ml}$  fue a los 9 días.

### 6.2.2.5. Producción de AIA por la cepa HE27Cct

**Figura 15**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Cct*



**Tabla 18**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE27Cct*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE27Cct-12D	4	181.80	a
HE27Cct-15D	4	128.80	b
HE27Cct-9D	4	87.80	c
HE27Cct-6D	4	64.80	d

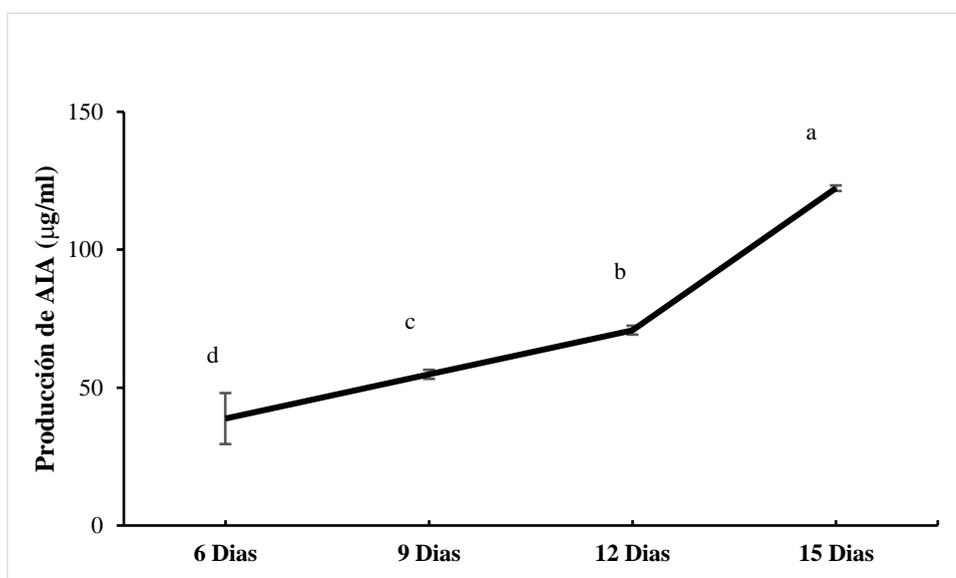
Los resultados sometidos al análisis de varianza ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en 6 días que produjo 64.8 µg/ml, además hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo de 87.8 µg/ml. Así mismo, se encontró diferencias estadísticas significativas en 15 días que produjo 128.8 µg/ml. También diferencias estadísticas significativas en 12 días que produjo 181.8 µg/ml.

La cepa HE27Cct tuvo capacidad de producir AIA a los 6, 9, 12 y 15 días. Obteniendo la mayor concentración en 12 días con 181.8 ug/ml.

#### 6.2.2.6. Producción de AIA por la cepa HE27Rct

**Figura 16**

*Producción de AIA en 6, 9, 12, 15 días por la cepa HE27Rct*



**Tabla 19**

*Comparación de Tukey en la producción de AIA de la cepa HE27Rct*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE27Rct-15D	4	122.30	a
HE27Rct-12D	4	70.80	b
HE27Rct-9D	4	54.80	c
HE27Rct-6D	4	38.80	d

Los resultados sometidos al análisis de varianza ANVA muestran la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los días y la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en 6 días que produjo 38.8 µg/ml, además hubo diferencias estadísticas significativas en 9 días que produjo 54.8 µg/ml. Así mismo, se encontró diferencias estadísticas significativas en 12 días que produjo 70.8 µg/ml.

También hubo diferencias estadísticas significativas a los 15 días que donde se produjo 122.3µg/ml.

Los resultados a 15°C en la prueba realizada de ácido indol acético indican que las cepas HE16, HE20ct, HE27Rct no tuvieron capacidad de producirlo, además HE21 en 15 días no produjo. las mejores cepas fueron HE20Cct con (80.9 µg/ml en 6 días) y HE15ctcon (48 µg/ml en 15). Así mismo a 24 °C se encontró que la cepa HE16ctno produjo y la cepa producida con menor concentración es HE20ct con (20.8 µg/ml en 6 días) y las mejores cepas HE20Cct con (202.8 µg/ml en 15 días) y HE27Cct con (181.8 µg/ml en 12días).

Quintero (2016) evidenció que existen cepas que tienen muy buena producción de (AIA) y que corresponde a la cepa C4T con 59.57 ppm a 120 horas y a 28 °C. Según Ulloa-muñoz et al. (2020) reportaron 5 cepas bacterianas que tuvieron capacidad de producción de ácido indol acético en un rango entre 28.69 y 61.51 µg/ml, este último correspondiente a *Rahnella inusitata* VT25B incubadas a 24 °C, además esta última con mayor producción. Otra investigación menciona la mejor producción de AIA es de *Pisolithus albus* con (33.68 ± 0.98 µg/ml) seguido de *Phlebopus portentosus* con 20.45±1.13 µg/ml y *Astraeus odoratus* con (15.93±1.03 µg/ml), además la más baja es de *Scleroderma sinnamariense* con (12.84±1.32 µg/ml) evaluadas en 15 días a 30 °C (Kumla et al., 2014).

### 6.3. Producción de sideróforos a 15 y 20 °C

*Tabla 20*

*Producción de sideróforos a 15 °C*

HONGOS ENDOFITICOS	MEDIOS DE CULTIVO		
	CAS-YES	CAS-MEA	CAS-PDA
HE15ct	1+	-	-
HE16ct	1+	-	-
HE20ct	2+	-	-
HE20Cct	-	-	-
HE21ct	-	-	-
HE27Cct	-	-	-
HE27Rct	-	-	1+
	-	-	1+

Resultado positivo (+); 1+, ligero; 2+, moderado; 3+ abundante y resultado negativo (-)

Es valioso mencionar de los resultados obtenidos a 15 °C las cepas HE20Cct, HE21ct y HE27Cct no produjeron sideróforos. Además, ninguna cepa produjo en medio agar CAS-MEA. Las cepas HE15ct, HE16ct y HE20ct solo produjeron en medio agar CAS-YES, así mismo la cepa HE27Rct solo produjo en medio agar CAS-PDA, siendo el último que mostro mejor tamaño de halo y pigmentación.

**Tabla 21**

*Producción de sideróforos a 24 °C.*

HONGOS ENDOFÍTICOS	MEDIOS DE CULTIVO		
	CAS-YES	CAS-MEA	CAS-PDA
HE15ct	1+	2+	-
	1+	2+	-
HE16ct	1+	1+	-
	1+	1+	-
HE20ct	3+	-	-
	3+	-	-
HE20Cct	-	-	-
	-	-	-
HE21ct	-	-	-
	-	-	-
HE27Cct	-	-	-
	-	-	-
HE27Rct	-	1+	-
	-	1+	-

Resultado positivo (+); 1+, ligero; 2+, moderado; 3+ abundante y resultado negativo (-)

Es de consideración mencionar de los resultados obtenidos a 24 °C las cepas HE20Cct, HE21ct y HE27Cct no produjeron sideróforos y en medio de cultivo agar CAS-PDA ninguna cepa produjo, además las cepas HE15ct y HE16ct produjeron en medios de cultivo agar CAS-YES y agar CAS-MEA. Además, la cepa HE20ct solo produjo en medio agar CAS-YES y la cepa HE27Rct solo en medio de cultivo agar CAS-MEA. La mejor cepa fue HE20ct en medio de cultivo agar CAS-YES.

Los resultados a 15 y 24 °C de la prueba de producción de sideróforos las cepas HE20Cct, HE21ct y HE27Cct no produjeron, así mismo ninguna cepa en a 15 °C en medio de cultivo agar CAS-MEA y a 24 °C en agar CAS - PDA. La mejor cepa en la producción sideróforos fue HE20ct en medio de cultivo agar CAS-YESa 15 y 24 °C.

Otra investigación menciona la producción de sideróforos de las cepas *Lasiodiplodia brasiliense* MXBCL28 con (38.82±3.92mm) y *Lasiodiplodia gilanensis* UCD256M con (43.46±3.76mm) que fue evaluados en día 15 e incubados a 30 °C (Vara 2020), así también las cepas de hongos endófitos de plantas altoandinas con mayor

producción de sideróforos fueron VT22H, *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H y *Pyrenochaeta gentianicola* GT23H con 34; 25,75 y 20,75 mm de diámetro del halo de coloración respectivamente y evaluadas a los siete días e incubadas a 24°C (Ulloa- Muñoz et al. 2020).

#### 6.4. Evaluación de la actividad de solubilización de trifosfato de calcio

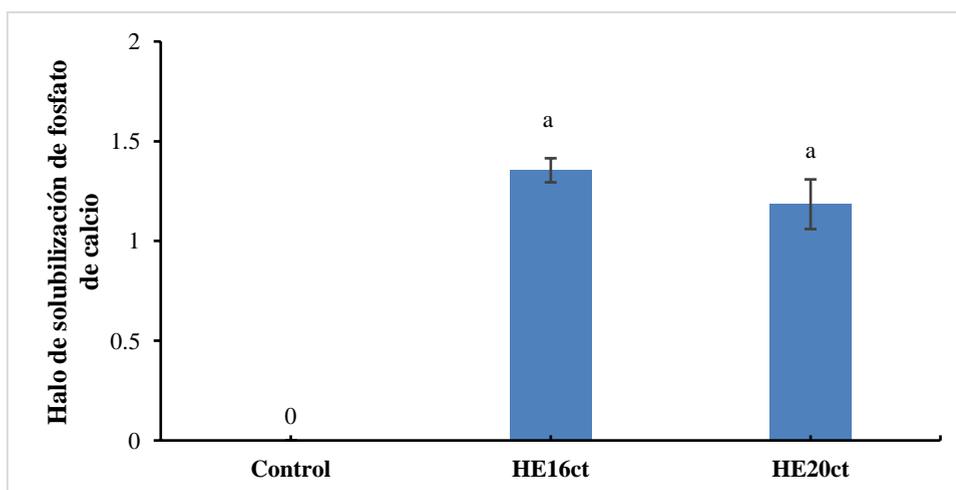
##### 6.4.1. Temperatura de 15 °C

Los resultados obtenidos a 15 °C las cepas HE15ct, HE16ct, HE20ct, HE20Cct, HE27Ccty HE27Rct no tuvieron capacidad solubilizadora de fosfato de calcio.

##### 6.4.2. Temperatura de 24 °C

**Figura 17**

*Capacidad de solubilización de fosfato de calcio de las cepas HE16ct y HE20ct*



**Tabla 22**

*Comparación de Tukey en la solubilización del fosfato de calcio a 24 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct	4	1.35	a
HE20ct	4	1.18	a

Realizado el análisis de varianza ANVA esta muestra que no existen diferencias estadísticas significativas de los halos de solubilización del fosfato de calcio entre las cepas evaluadas. La prueba de Tukey indica que no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas HE20ct y HE16ct, además, estas tuvieron índice de solubilización de fosfato de calcio entre 1.19 y 1.35 respectivamente.

Las cepas HE15ct, HE20Cct, HE21ct, HE27Cct y HE27Rct no tuvieron capacidad de solubilizar fosfato de calcio, pero las cepas HE20ct y HE16ct solubilizaron fosfato de calcio, siendo esta última la mejor con un índice de solubilización de fosfato de 1.35.

Los resultados obtenidos de las temperaturas de 15 y 24 °C demuestran a 15 °C las cepas HE15ct, HE16ct, HE20ct, HE20Cct, HE27Cct y HE27Rct no lograron solubilizar el fosfato de calcio. Así mismo, a 24 °C las cepas HE15ct, HE20Cct, HE21ct, HE27Cct y HE27Rct tampoco presentaron capacidad de solubilización del fosfato de calcio, pero dos cepas tuvieron capacidad solubilizadora y fueron las cepas HE20ct con índice de 1.19 y HE16ct con índice de 1.35.

Los microorganismos que solubilizan el fosfato tienen diversas maneras de solubilizarlo, así como la formación de ácidos orgánicos con capacidad de solubilizar a los fosfatos insolubles, haciéndolos solubles, que se encuentran próximos a las zonas rizosféricas para que sean ingresados hacia el interior de la planta (Beltran 2014). Otra investigación demuestra que el mayor halo de solubilización se obtuvo en las cepas de *Bacillus brevis*, *Bacillus. Pumilus* y *B. licheniformis* con 20, 15 y 12 mm respectivamente (Tejera et al. 2015) y según (Ulloa-muñoz et al. 2020) los hongos endofíticos aislados de *Valeriana sp* y *Gentianella waberbaueri*, plantas altoandinas, mostraron que no tuvieron capacidad de solubilización de fosfato de calcio.

## 6.5. Evaluación de actividad celulolítica

Los resultados obtenidos en las temperaturas de 15 y 24 °C demostraron que las cepas HE15ct, HE16ct, HE20ct, HE20Cct, HE27Cct y HE27Rct no tuvieron capacidad celulolítica.

Otra investigación menciona que cepas de 4 géneros evaluados (*Phanerochaetes* sp., *Xylaria* sp., *Stereum* sp. y *Ganoderma* sp.) mostraron actividad celulolítica con halos de 12 mm, 9 mm 8.5 mm y 6 mm respectivamente evaluadas en 72 horas e incubados a 30°C (Ramírez & Isaza 2019). La actividad celulolítica se evaluó con el reactivo rojo Congo en placas con agar carboximetilcelulosa, la mayor capacidad de degradar celulosa lo presentaron los hongos *Aspergillus niger*, *A. funigatus* y la cepa POHCeFi (Galván, 2018).

La bacteria *Ruminococcus flavefaciens* produjo hidrólisis de CMC con ligera degradación de 2 mm incubada a 37 °C durante 48 horas (Teather & Wood 1982). Ulloa-muñoz et al., (2020) encontraron que dos cepas bacterianas, *Pseudomonas trivialis* VT20B y *Rahnella* sp. GT24B con índices de 3.43 y 3.04 incubadas por 4 días a 24 °C, lograron la solubilización del fosfato de calcio.

## 6.6. Selección de tres cepas de hongos endofíticos

Se seleccionaron tres cepas para las siguientes pruebas de caracterización molecular mediante el análisis de ITS y para el bioensayo con inoculantes para evaluarla germinación, crecimiento, biomasa y clorofila de la alfalfa. Los resultados obtenidos de las pruebas anteriores permitieron la selección de las cepas: HE15ct que inhibió en 85.71 a *Alternaria* sp ATCC20084, tuvo capacidad de producción de AIA ( $48 \pm 0.5$  µg/ml a 15 días) a 15 °C y ( $147.8 \pm 1.2$  µg/ml a 9 días) a 24 °C. También tuvo capacidad de producción de sideróforo a 15 y 24 °C. Así mismo, la cepa HE16ct inhibió en 45.28% frente al *Geotrichum candidum* P1, produjo sideróforo a 15 y 24°C, así mismo, solubilizo fosfato de calcio con índice  $1.35 \pm 0.09$  a 24 °C, y la cepa HE20Cct inhibió en 84% a

*Alternaria* sp. T2, también produjo AIA a 15 °C ( $80.9 \pm 2.09$  µg/ml a 6 días) y a 24 °C ( $202.80 \pm 4.9$  µg/ml a 15 días).

### 6.7. Caracterización molecular

La caracterización molecular permitió la identificación hasta el nivel taxonómico de género.

Tabla 23

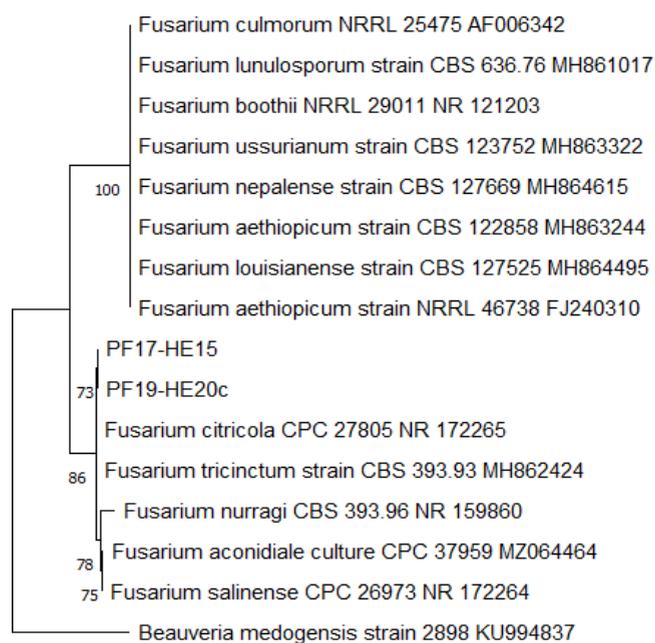
*Código y caracterización molecular de tres hongos endofíticos*

CÓDIGO	IDENTIFICACION TAXONOMICA
HE15ct	<i>Fusarium</i> sp.
HE16ct	<i>Penicillium</i> sp.
HE20Cct	<i>Fusarium</i> sp.

Para la identificación taxonómica a nivel molecular se usó la región ITS que se encuentra en el ADN ribosomal. Los productos del PCR tuvieron tamaños correspondientes a la región evaluada. La evaluación del alineamiento múltiple y filogenético indican que las cepas HE15ct y HE20Cct no alinean con ninguna especie de *Fusarium* tipo del GenBank, pero sí es claro que se encuentran en el género de *Fusarium* (Ver la **Fig. 18**). Del mismo modo, la evaluación del alineamiento múltiple y filogenético indican que las cepas HE16ct pertenece al género *Penicillium*, pero no se diferencia de *P. tardochrysoenum*, *P. Rubens* y *P. goetzii* (Ver la **Fig.19**).

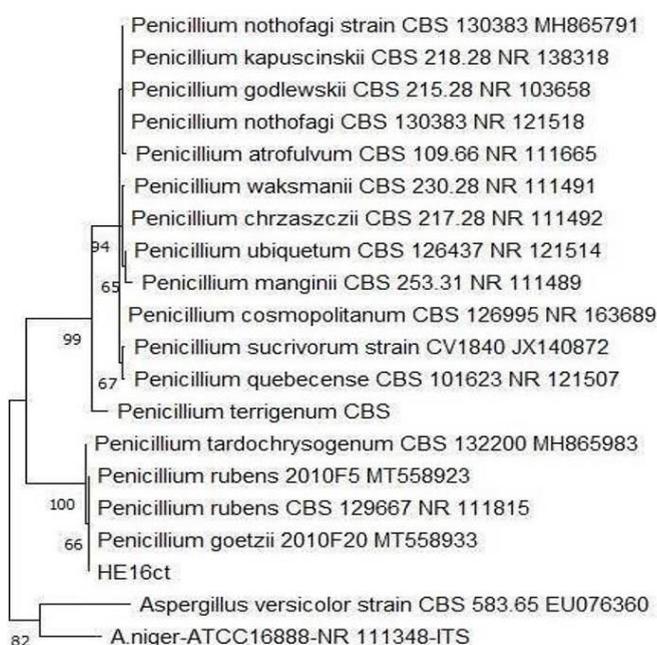
**Figura 18**

*Árbol filogenético de las secuencias de la región ITS de las cepas HE15ct y HE20Cct y su respectivo genero relacionado del NCBI GenBank*



**Figura 19**

*Árbol filogenético de las secuencias de la región ITS de la cepa HE16ct y su respectivo genero relacionado del NCBI GenBank.*



De la prueba de caracterización molecular por secuenciamiento de la región ITS, entonces logró la confirmación del género, pero para la especie en estos casos se requiere análisis de otras secuencias y debido a que la zona de donde fueron extraídos estos hongos no ha sido estudiada aún podrían tratarse de especies nuevas.

Ulloa-muñoz et al. (2020) caracterizó dos cepas aisladas de *Valeriana sp.* y cuatro cepas de *Gentianella weberbaueri*, usando la identificación molecular la región ITS del ADNr las cepas GT20H, GT23H y GT24H correspondientes al género *Pyrenochaeta*; la cepa GT28H a *Scleroconidioma sp*; VT22H a *Plenodomus* y VT25H a *Cryptococcus*.

## 6.8. Prueba de bioensayo con inoculantes.

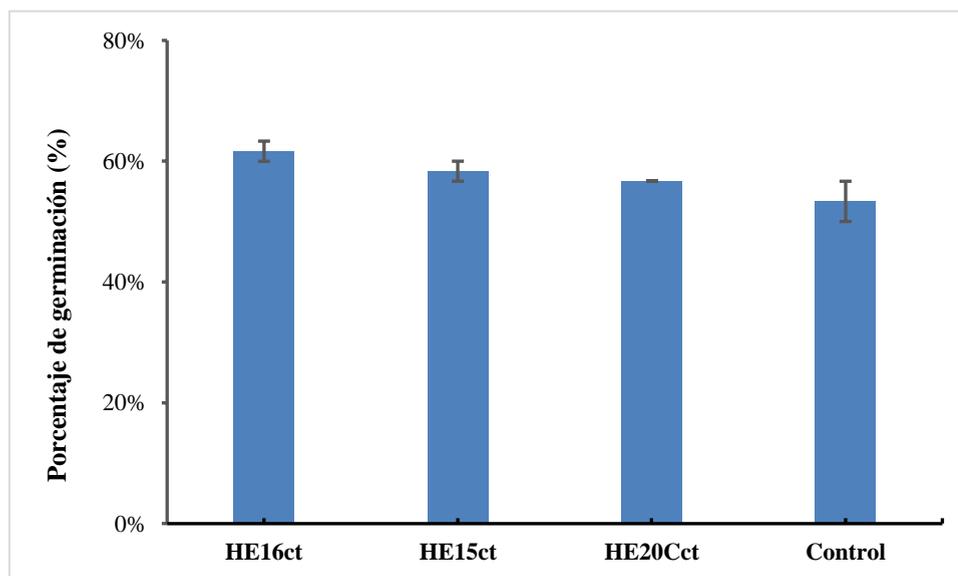
### 6.8.1. Efecto de inoculación en la germinación de alfalfa

#### 6.8.1.1. Porcentaje de germinación en temperatura de 15 °C

##### a. Porcentaje de germinación en 24 horas

**Figura 20**

*Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 15 °C en 24 horas*



**Tabla 24**

*Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 15 °C en 24 horas*

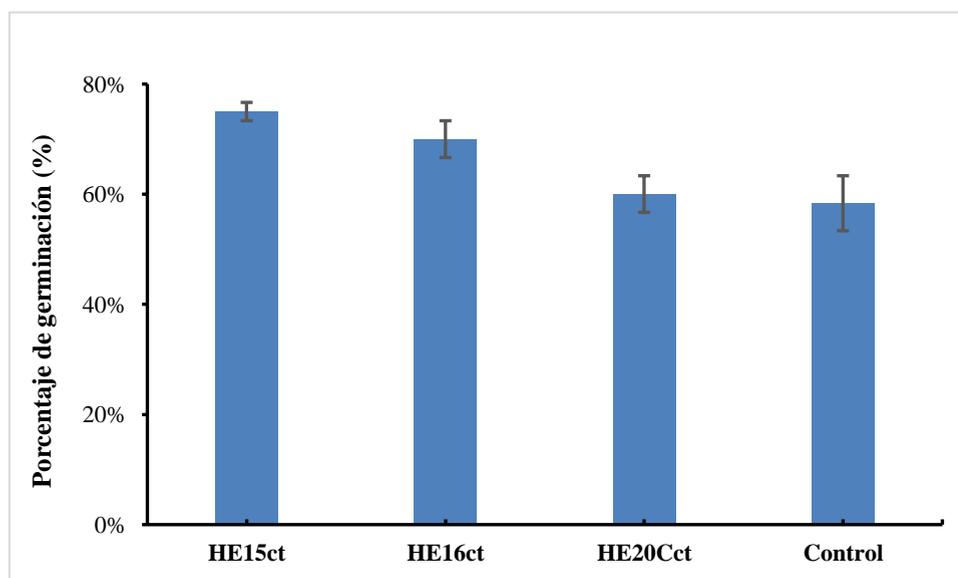
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct-15°C-24h	3	0.62	a
HE15ct-15°C-24h	3	0.58	a
HE20Cct-15°C-24h	3	0.57	a
Control- 15°C-24h	3	0.53	a

El análisis ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas HE15ct, HE16ct y HE20Cct inoculadas.

**b. Índice de germinación en 48 horas**

**Figura 21**

*Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 15 °C en 48 horas*



**Tabla 25**

*Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 15 °C en 48 horas*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-15°C-48h	2	0.75	a
HE16ct-15°C-48h	2	0.70	a
HE20Cct-15°C-48h	2	0.60	a
Control- 15°C-48h	2	0.58	a

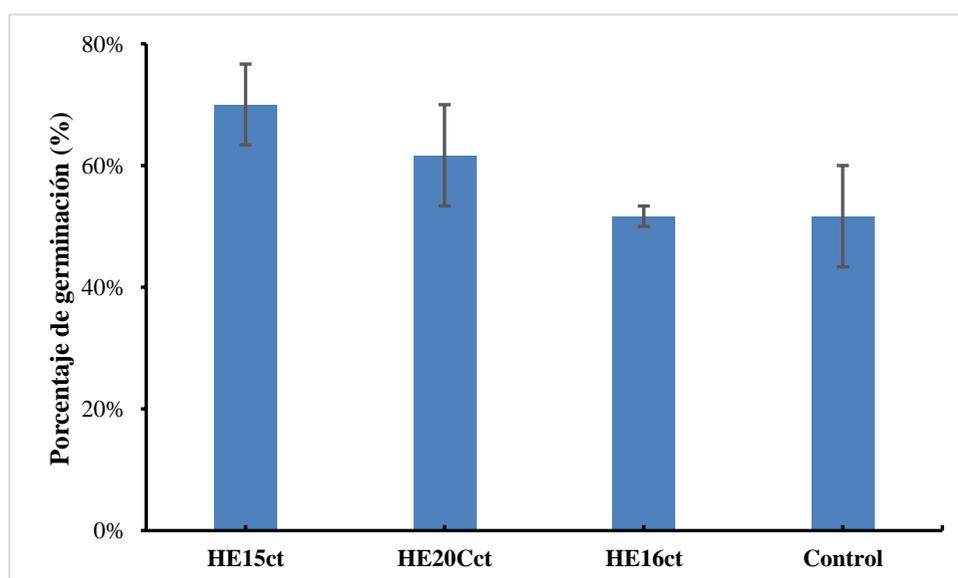
El análisis ANVA muestra que no hay diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey muestra que no hay diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas HE15ct, HE16ct y HE20Cct inoculadas.

### 6.8.1.2. Porcentaje de germinación a 24 °C

#### a. Porcentaje de germinación en 24 horas

**Figura 22**

*Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 24°C en 24 horas*



**Tabla 26**

*Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 24 °C en 24 horas*

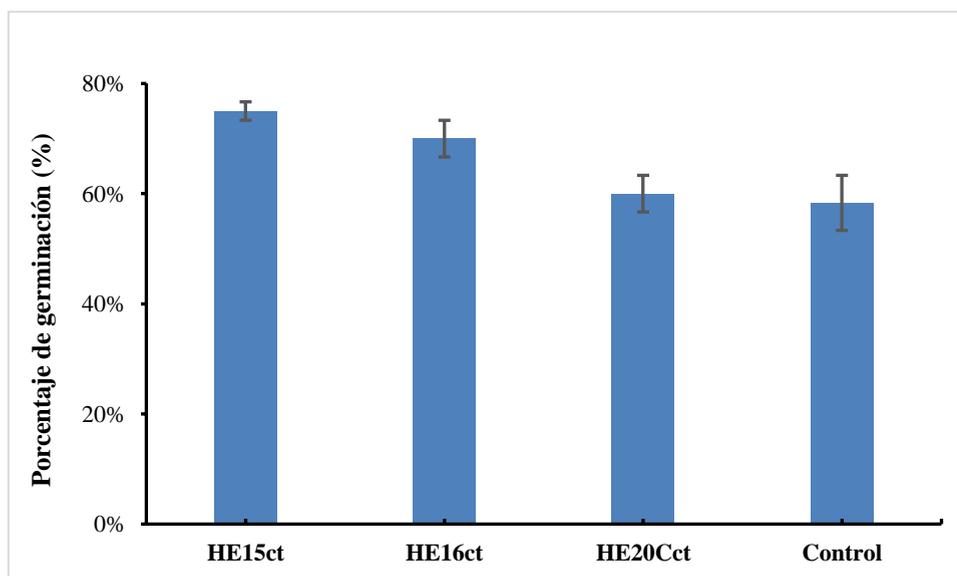
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-24°C-24h	3	0.70	a
HE20Cct-24°C-24h	3	0.61	a
HE16ct-24°C-24h	3	0.51	a
Control- 24°C-24h	3	0.51	a

El análisis ANVA muestra la no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras que la prueba de Tukey muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas HE15ct, HE16ct y HE20Cct inoculadas.

**b. Porcentaje de germinación en 24 horas**

**Figura 23**

*Porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas a 24°C en 48 horas*



**Tabla 27**

*Comparación de Tukey en la germinación de alfalfa inoculada a 24 °C en 48 horas*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE15ct-24°C-48h	3	0.77	a
HE16ct-24°C-48h	3	0.65	a
HE20Cct-24°C-48h	3	0.63	a
Control- 24°C-48h	3	0.58	a

El análisis de varianza muestra que entre los tratamientos no existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas, mientras y la prueba de Tukey indica que entre los tratamientos no existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas HE15ct, HE16ct y HE20Cct inoculadas.

Es fundamental mencionar de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas se encontró que no existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas HE15, HE16 y HE20Cct en las 24 y 48 horas a temperatura de 24 °C.

El proceso de germinación es muy importante durante el periodo de vida de los hongos endofíticos, la cual va a depender el éxito teniendo relación de mutualismo planta-hongo (Fernández et al. 2005). En la determinación del porcentaje de germinación de las semillas de la planta altoandina “Corehuajay” se encontró que las semillas sin inóculo presentaron un porcentaje de germinación que las semillas inoculadas en pruebas realizadas a 10,15 y 20 °C (Miranda, 2019) y según Blanco et al. (2018) el efecto de germinación a 24°C con 100 semillas de pimiento en el cuarto día se observó con cepas inoculadas de RmB y ME01 germinaron en 47 y 44 %, respectivamente, mientras que en el control fue de 25 %.

## 6.8.2. Efecto crecimiento de alfalfa inoculados con hongos endófitos.

### 6.8.2.1. Crecimiento de plantas de alfalfa inoculadas a 15 °C

#### a. Crecimiento de la parte radicular de la alfalfa inoculada.

Figura 24

Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 15 °C

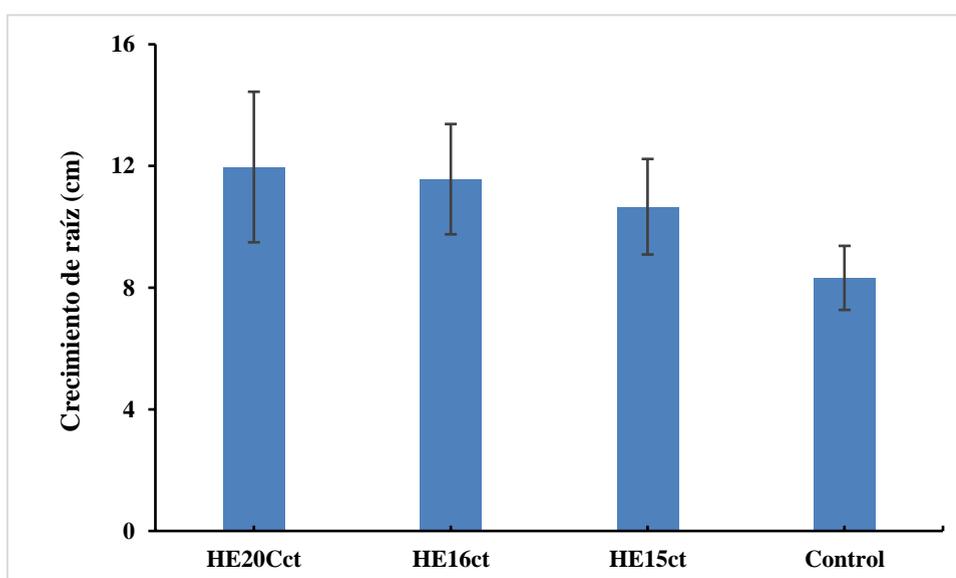


Tabla 28

Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada de la raíz

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
HE20Cct-R-15°C	3	11.80	a	
HE16ct-R-15°C	3	11.80	a	
HE15ct-R-15°C	3	10.66	ab	
Control- R-15°C	3	8.33	b	

El ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas, mientras que la prueba de Tukey nos muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control que creció en 8.33 cm y *Fusarium* sp HE15ct que creció 10.66 cm, así mismo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre las plantas que fueron inoculadas con las cepas de *Penicillium* sp HE16ct y *Fusarium* sp HE20Cct que crecieron

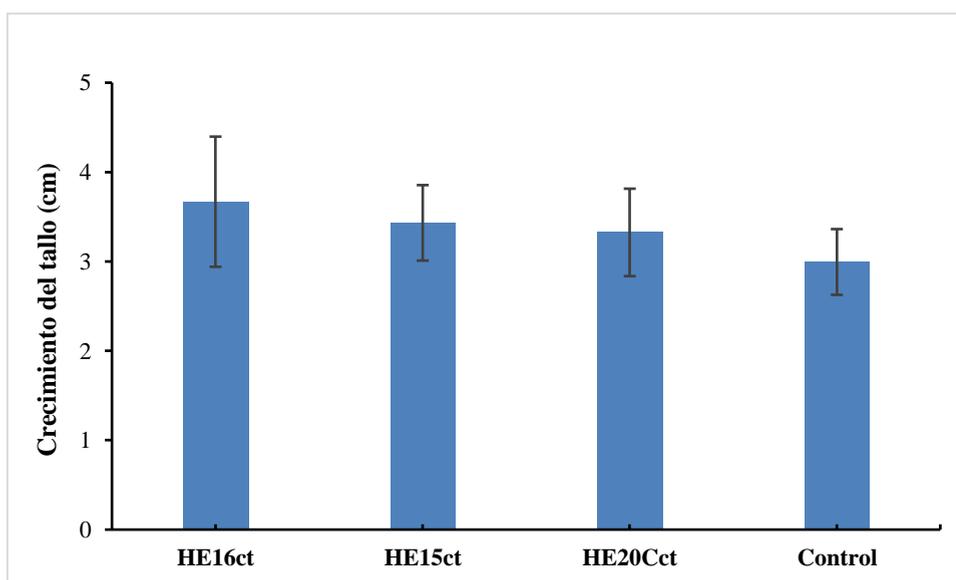
11.57 cm y 11.97cm, respectivamente.

Del resultado obtenido de crecimiento de la raíz que el control tuvo menor crecimiento que las plantas inoculadas de *Fusarium* sp HE15ct, *Penicillium* sp HE16ct *Fusarium* sp HE20Cct.

**b. Crecimiento del tallo de la alfalfa inoculada.**

**Figura 25**

*Índice de crecimiento del tallo a los 28 días en 15 °C*



**Tabla 29**

*Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada del tallo*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct-T-15°C	3	3.67	a
HE15ct-T-15°C	3	3.43	ab
HE20Cct-T-15°C	3	3.32	ab
Control- T-15°C	3	2.99	b

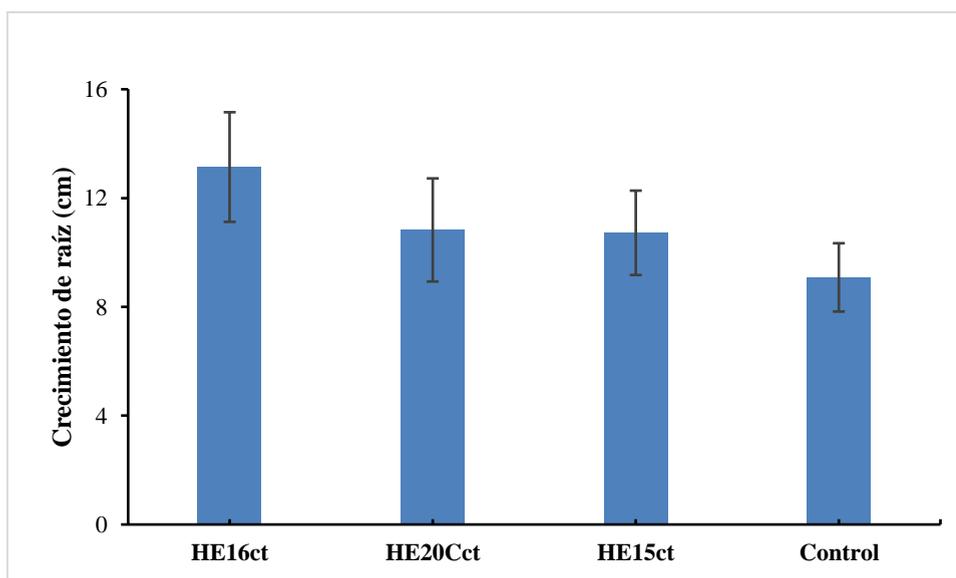
El ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control con altura de 2.89 cm, además no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas *Fusarium* sp HE20Cct y *Fusarium* sp HE15ct que crecieron 3.25 y 3.38 cm, respectivamente. Así mismo, hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa *Penicillium* sp HE16ct con altura de 3.87 cm.

### 6.8.2.2. Crecimiento de plantas de alfalfa inoculadas en temperatura de 24 °C

#### a. Crecimiento de la parte radicular de la alfalfa inoculada.

**Figura 26**

*Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 24 °C*



**Tabla 30**

*Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada de la raíz*

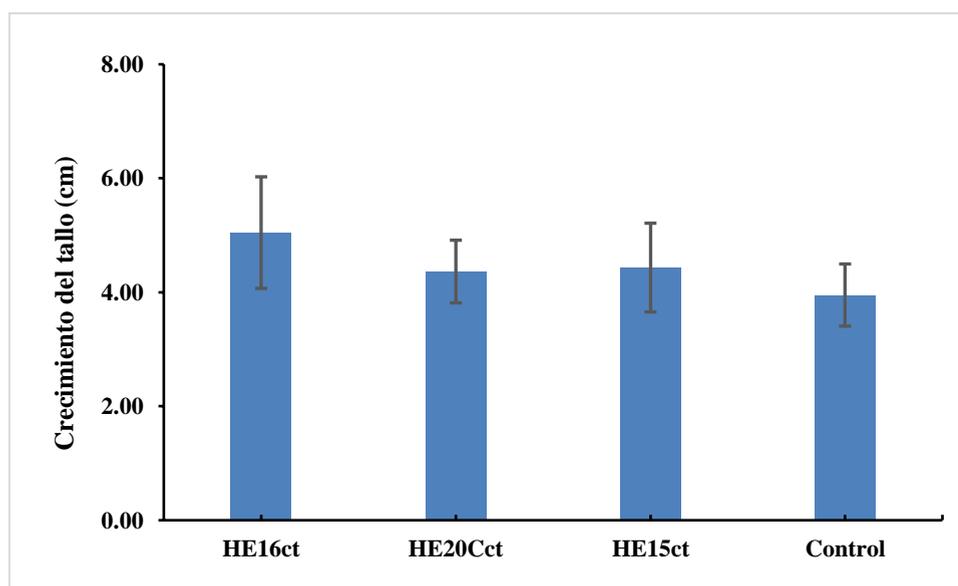
Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct-R-15°C	3	13.14	a
HE15ct-R-15°C	3	10.83	b
HE20Cct-R-15°C	3	10.72	b
Control- R-15°C	3	9.09	c

El ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en el tratamiento control que creció 9.09 cm, además no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas *Fusarium sp.* HE15ct, *Fusarium sp.* HE20Cct que crecieron 10.73 cm y 10.83 cm, respectivamente. Así mismo, se encontró diferencias estadísticas significativas en la cepa *Penicillium sp.* HE16ct que creció 13.14 cm.

**b. Crecimiento del tallo de la planta de alfalfa inoculada.**

**Figura 27**

*Índice de crecimiento de la raíz a los 28 días en 24 °C*



**Tabla 31**

*Comparación de Tukey en crecimiento de alfalfa inoculada del tallo*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct-T-24 °C	16	5.04	a
HE15ct-T-24 °C	16	4.43	ab
HE20Cct-T-24 °C	16	4.36	ab
Control- T-24 °C	16	3.95	b

El ANVA muestra la existencia de diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey indica que hubo diferencias estadísticas significativas en el control que creció 3.95 cm, además no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cepas *Fusarium sp* HE20Cct y HE15ct que crecieron de 4.37 y 4.43cm. así mismo, hubo diferencias estadísticas significativas la cepa *Penicillium sp* HE16ct que creció 5.04 cm.

Los resultados obtenidos a 15 y 24 °C en la evaluación del crecimiento de la raíz y del tallo de la planta de alfalfa con y sin inóculos se encontró en 15 °C crecimiento de la parte radicular del control fue menor que las plantas inoculadas y en la parte del tallo el control creció menos las plantas inoculadas, además la cepa HE16ct tuvo mayor tamaño con 3.87 cm, así mismo a 24 °C el crecimiento de la raíz en el control fue menor que con cepas inoculadas, siendo el mejor la cepa HE16 con 13.41 cm. Además, en crecimiento del tallo en el control tuvo menor altura que las cepas inoculadas, siendo el mejor la cepa HE16ct con 5.04cm. el crecimiento fue mayor a 24 °C.

Braga (2015) menciona la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 inoculada en alfalfa no mostro resultados con diferencias significativa frente al control a los 21 días. En cuanto a las pruebas realizadas al interior del laboratorio a condiciones ambientales (ex vitro) las plantas de alfalfa tuvieron un mayor crecimiento cuando fueron inoculadas con las bacterias endofíticas en el ambiente donde la temperatura era de aproximadamente 20 °C, el crecimiento de las raíces también fue mayor (Miranda, 2019). Asimismo, las bacterias

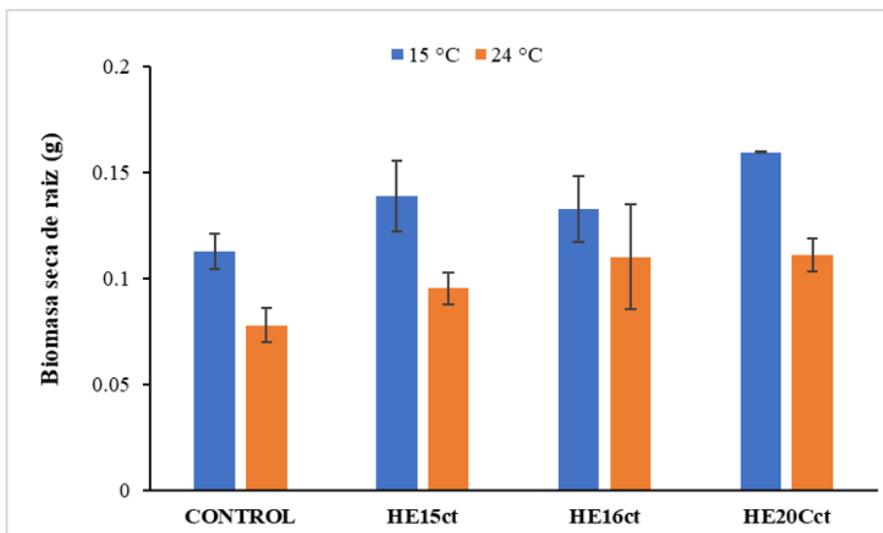
*Azotobacter sp.* (B) y *E. aerogenes* (H) mostraron efecto contrario inhibiendo totalmente el crecimiento de la alfalfa y alargando el periodo de germinación de las semillas de alfalfa a 22 días (González & Fuentes 2017).

### 6.8.2.3. Resultado de biomasa seca de cultivo de alfalfa inoculadas

- a. Biomasa seca de la parte radicular donde varas de color azul a 15 °C y anaranjado a 24 °C, además no tienen diferencia significativa estadísticamente

**Figura 28**

*Resultado de biomasa seca de las raíces de alfalfa crecidas a 15 y 24 °C*



**Tabla 32**

*Comparación de Tukey de biomasa seca de la raíz a 15 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20Cct-R-15 °C	2	0.160	a
HE15ct-R-15 °C	2	0.140	a
HE16ct-R-15 °C	2	0.133	a
Control-R-15 °C	2	0.113	a
HE20Cct-R-24 °C	2	0.111	a
HE16ct-R-24 °C	2	0.110	a
HE15ct-R-24 °C	2	0.095	a
Control-R-24 °C	2	0.078	a

El ANVA y la prueba de Tukey de la biomasa seca de las plantas evaluadas a los 28 días a 15 °C, muestran que no existen diferencias estadísticas significativas entre el control y las plantas inoculadas con las cepas de *Fusarium sp* HE15c, *Penicillium sp* HE16ct y *Fusarium sp* HE20Cct.

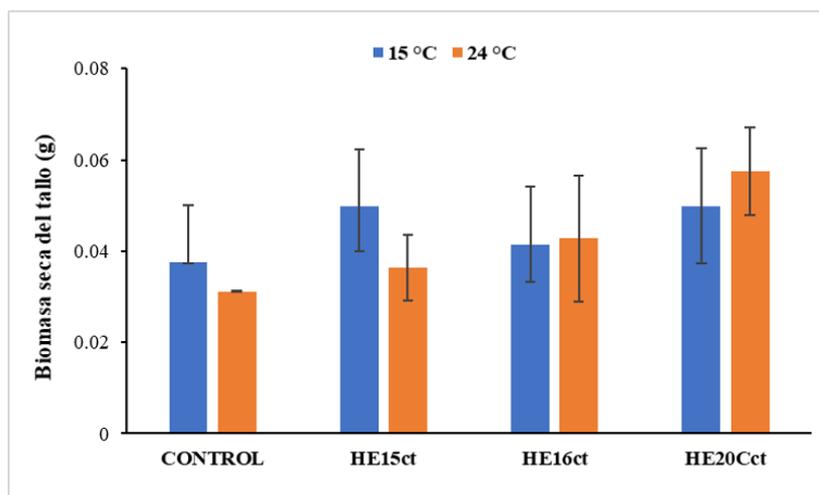
Además, el análisis de varianza y la prueba de Tukey de la biomasa seca evaluadas a los 28 días a 24 °C demuestran que no existen diferencias estadísticas significativas entre el control y la biomasa seca de las plantas inoculadas con *Fusarium sp* HE15ct, *Penicillium sp* HE16ct y *Fusarium sp* HE20Cct.

Los resultados obtenidos muestran que a 15 y 24 °C la biomasa seca de la raíz y de la parte aérea de las plantas de alfalfa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la biomasa seca del control con la de las plantas inoculadas.

**b. Biomasa seca del tallo donde varas de color azul es a 15 °C y anaranjado a 24 °C**

**Figura 29**

*Resultado de biomasa seca del tallo de alfalfa crecidos a 15 y 24 °C.*



**Tabla 33**

*Comparación de Tukey de biomasa seca del tallo a 15 y 24°C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
HE20Cct-T-24 °C	2	0.057	a	
HE20Cct-T-15 °C	2	0.050	a	
HE15ct-T-15 °C	2	0.050	a	
HE16-T-24 °C	2	0.043	a	
HE16-T-15 °C	2	0.042	a	
Control-T-15 °C	2	0.038	a	
HE15ct-T-24 °C	2	0.036	a	
Control-T-24 °C	2	0.031	a	

El ANVA y la prueba estadística de Tukey muestran que las plantas evaluadas a los 28 días a 15 °C no presentan diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y los tratamientos con inoculación de *Fusarium* sp HE15ct, *Penicillium* sp HE16ct y *Fusarium* sp HE20Cct.

Además, el ANVA y la prueba de Tukey muestran que las plantas evaluadas a los 28 días a 24 °C no presentan diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y los tratamientos con inoculación de *Fusarium* sp HE15ct, *Penicillium* sp HE16ct y *Fusarium* sp HE20Cct. Los resultados obtenidos a 15 y 24 °C de la biomasa seca de la raíz y de la parte aérea de la planta no mostraron diferencias estadísticas significativas entre el control y con las cepas inoculadas.

De los resultados obtenidos del peso seco (biomasa seca) de la parte aérea y de la raíz de la alfalfa a 15 y 24 °C no presentan diferencias estadísticas significativas entre el control y las plantas inoculadas. También, González & Fuentes (2017) encontraron que la longitud de la raíz, el número de raíces y la biomasa seca de la raíz comparados con el control no presentan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos realizados a las plantas. Además, Ulloa-Muñoz et al. (2020) no encontraron diferencias estadísticas significativas respecto a la biomasa entre el control y las plantas que fueron

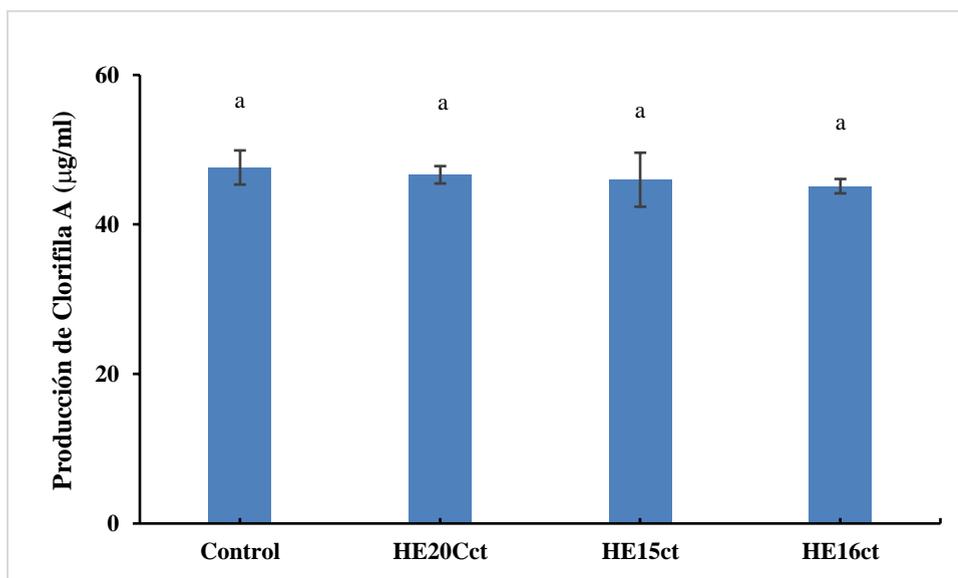
inoculadas.

#### 6.8.2.4. Evaluación de clorofila A y B del tallo con inoculantes

##### a. Clorofila A en 15 °C

**Figura 30**

*Producción de clorofila A con inoculantes a 15°C.*



**Tabla 34**

*Comparación de Tukey de clorofila A en 15 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
Control-A-15 °C	4	47.62	a	
HE20Cct-A-15 °C	4	46.65	a	
HE15ct-A-15 °C	4	45.98	a	
HE16ct-A-15 °C	4	45.13	a	

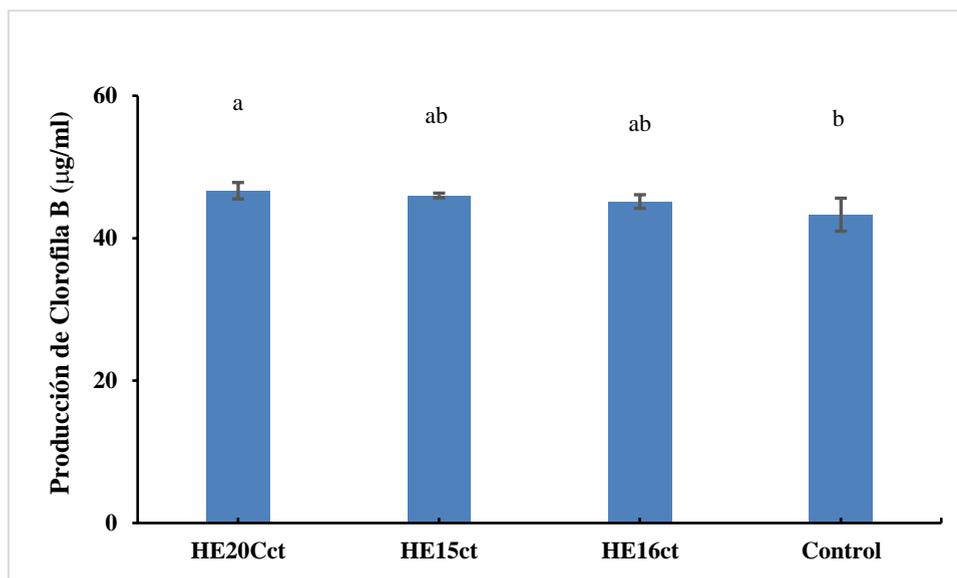
El ANVA indica que no existen diferencias estadísticas significativas en la prueba de Tukey. Asimismo, no existen diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control con las plantas inoculadas con las cepas HE15ct, HE16ct y HE20Cct.

Respecto a la clorofila A de las plantas a 15 °C no presentan diferencias estadísticas significativas entre el control y las cepas inoculadas.

**b. Clorofila A en 24 °C**

**Figura 31**

*Producción de clorofila A con inoculantes a 24°C.*



**Tabla 35**

*Comparación de Tukey de clorofila A en 24 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE20Cct-A-24 °C	4	46.65	a
HE15ct-A-24 °C	4	46.00	ab
HE16ct-A-24 °C	4	45.13	ab
Control-A-24 °C	4	43.29	b

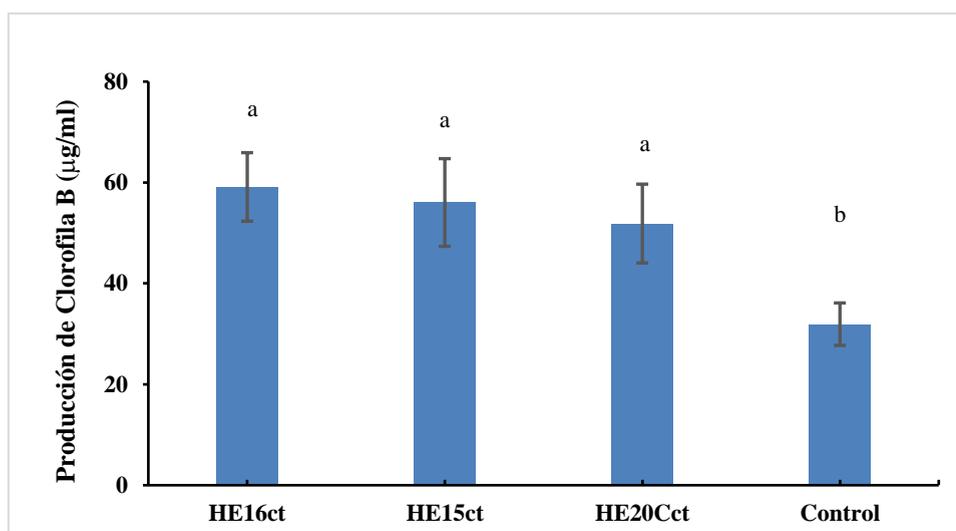
De acuerdo al ANVA se encontró la existencia de diferencias estadísticas significativas en la prueba de Tukey, demostrando que si hubo diferencias estadísticas significativas entre en control con 43.29 µg/ml, además no diferencias estadísticas significativas en las cepas inoculados HE15ct, HE16ct que tuvieron concentración de 46,45.13 µg/ml, respectivamente. Además, si hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE20Cct con 46.65µg/ml.

En resultados obtenidos de clorofila A en 15 °C no tuvieron diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las cepas inoculadas. Además, a 24 °C las cepas inoculadas tuvieron mejor concentración que el control.

### c. Clorofila B a 15 °C

**Figura 32**

*Resultado de clorofila B a 15 °C con inoculantes.*



**Tabla 36**

*Comparación de Tukey de clorofila B en 15 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )			
Factor	N	Media	Agrupación
HE16ct-B-15 °C	4	59.12	a
HE15ct-B-15 °C	4	56.02	a
HE20Cct-B-15 °C	4	51.86	a
Control-B-15 °C	4	31.89	b

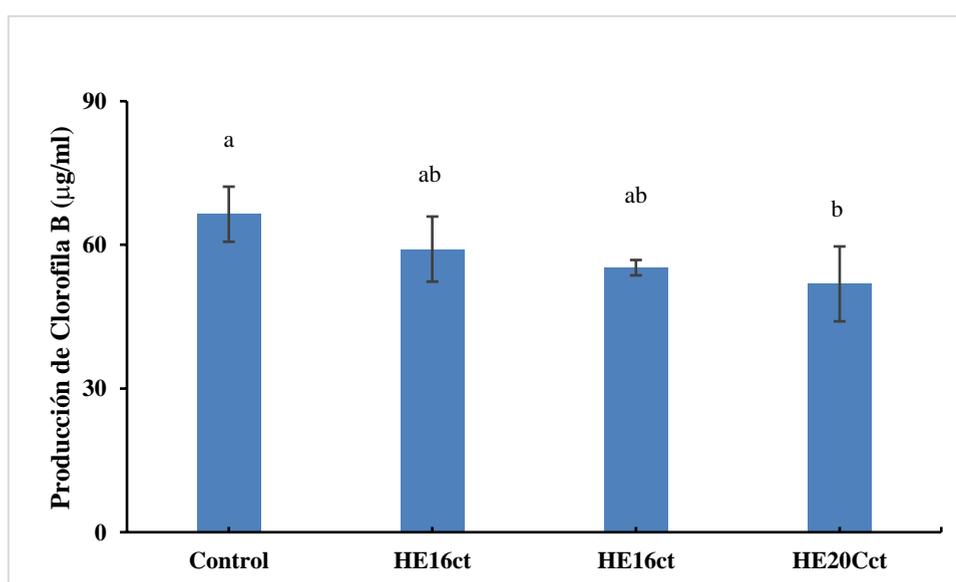
El ANVA indica la existencia de diferencias estadísticas significativas en la prueba de Tukey. Se demostró que si hubo diferencias estadísticas significativas entre en control con 31.89 µg/ml, además no hubo diferencias estadísticas significativas en las cepas inoculados HE15ct, HE16ct y HE20Cc tuvieron concentración de 56.02, 59.12 y 51.86, respectivamente.

Los resultados obtenidos para la clorofila B a 15 °C de las plantas de alfalfa, muestran que el control produjo menos de este pigmento fotosintético que las plantas que fueron inoculadas.

#### d. Clorofila A en 24 °C

**Figura 33**

*Resultado de clorofila B a 24 °C con inoculantes.*



**Tabla 37**

*Comparación de Tukey de clorofila B en 15 °C*

Prueba de Tukey para ( $\alpha=0.05$ )				
Factor	N	Media	Agrupación	
Control-B-24 °C	4	66.41	a	
HE16ctl-B-24 °C	4	59.12	ab	
HE15ctl-B-24 °C	4	55.22	ab	
HE20Cct-B-24 °C	4	51.86	b	

De acuerdo con el ANVA se encontró la existencia de diferencias estadísticas significativas en la prueba de Tukey ( $p = 0,05$ ). Demuestro si hubo diferencias estadísticas significativas en la cepa HE20Cct con 51.86 µg/ml, además no hubo diferencias

estadísticamente significativas entre las cepas HE15ct y HE16ct con 55.22 y 59.12  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Así mismo, existen diferencias estadísticas significativas en el tratamiento control con 66.41 $\mu\text{g/ml}$ .

En resultados obtenidos de clorofila A en 15 °C no presentaron diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento control y las plantas que fueron inoculadas con las cepas. Además, a la temperatura de 24 °C las plantas inoculadas con las cepas evaluadas tuvieron mayor cantidad de clorofila A que el control. Por otro parte, en la clorofila B a 15 °C se encontró que las cepas inoculadas tuvieron mayor concentración que en el control. Así mismo, a 24°C en el control se produjo más clorofila B que en las cepas inoculadas.

González et al. (2014) encontró en las plantas de los manglares que la concentración de pigmentos está relacionada con la especie vegetal, con los factores ambientales y con los cambios estacionales, mientras que los niveles de clorofila en *Avicennia germinans*, disminuyen en épocas calurosas como el verano y aumentan en épocas frías como en el invierno.

## VII. CONCLUSIONES

- De los siete hongos endofíticos provenientes de *Hypericum laricifolium* tres de ellos presentan actividad antagonista: la cepa HE15ct inhibe a *Alternaria sp.* ATCC20084 con un índice  $84.71 \% \pm 2.89$ , la cepa HE20Cct inhibe a la cepa *Alternaria sp.* T2 con un índice  $84 \%$  y la HE16ct inhibe a *Geotrichum candidum* P1 en  $45.3 \% \pm 2.67$ .
- La mejor producción de AIA a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron con las cepas HE20Cct ( $80.9 \pm 2.09\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 6 días), HE15ct ( $48 \pm 0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 15 días) y HE27Cct ( $40.9 \pm 4.2\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 15 días), a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  con las cepas HE20Cct ( $202.80 \pm 4.9\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 15 días), HE27Cct ( $181.80 \pm 2.6\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 12 días) y HE15ct ( $147.8 \pm 1.2\text{ }\mu\text{g/ml}$  a 9 días). Las cepas que produjeron sideróforos a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  fueron: HE15ct, HE16ct y HE20ct en medio Agar CAS-YES, además la cepa HE27Rct en medio Agar CAS-PDA y a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  las cepas HE15ct, HE16ct y HE20ct en medios de cultivo Agar CAS-YES, Agar CAS-MEA, además la cepa HE20ct en medio de cultivo Agar CAS-YES y la cepa HE27Rct en medio Agar CAS-MEA. Las cepas HE20ct y HE16ct solubilizaron fosfato de calcio con ISP 1.18 y 1.36, respectivamente. Por otra parte, ninguna cepa tuvo capacidad celulolítica.
- Molecularmente se identificaron que las cepas de los hongos HE15ct y HE20Cct corresponden a *Fusarium sp.* y la cepa HE16ct corresponde a *Penicillium sp.*
- En la prueba de porcentaje de germinación con inoculantes a la semilla de alfalfa, no tuvieron diferencias significativas entre el tratamiento control y las inoculadas con las cepas a las 24 y 48 horas a  $15$  y  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Así mismo a  $15$  y  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el crecimiento de tallo y raíz en el control fue menor. En la prueba de biomasa seca del tallo a  $15$  y  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y las cepas inoculadas. En la clorofila A en  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  no hubo diferencias significativas entre el tratamiento control y las que fueron inoculadas con las cepas a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cepa HE20Cct tuvo mayor

concentración con 46.65  $\mu\text{g/ml}$ . Así mismo, en la clorofila B a 15 °C el control tuvo menor concentración que las cepas inoculadas a 24 °C el control tuvo mayor concentración con 66.41  $\mu\text{g/ml}$ .

## VIII. RECOMENDACIONES

- Continuar con los estudios de hongos endófitos altoandinos aislados de *Hypericum laricifolium* con presencia de genes metabólicos asociados a la producción de metabolitos que ayuden con la promoción del desarrollo de la planta.
- Continuar con otros marcadores moleculares para la caracterización molecular de los hongos endofíticos, debido a que solo se identificaron a nivel de género, se busca conocer hasta la especie.
- Persistir con más pruebas de bioensayo con otros hospederos, sustratos, diferentes % de inóculos en otras temperaturas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abello, J. F., y Kelemu, S. (2007). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 7(2), 55-57.  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol7\\_num2\\_art:70](https://doi.org/10.21930/rcta.vol7_num2_art:70)
- Aguado-Santacruz, G. A. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Artículo de* 35 (1), 9 – 21  
<https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.9>
- Agudelo, J., Daza, Z., y Gil, N. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. Evaluation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108-117.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752013000100011](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752013000100011)
- Alfiky, A. (2019). Effects of ultraviolet irradiation on the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against soil-borne fungal pathogens. *Heliyon*, 5(7), 1-7  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02111>
- Alvarado-Ibáñez, J., Estela-Urbina, R., Lopez-Cuadra, Y. M., Santamaría-Baldera, N., Mori-Zavaleta, R., & Gutiérrez-Araujo, M. (2019). Aislamiento y evaluación de la actividad celulolítica de bacterias rizosféricas del distrito de Bagua, amazonas. *Rebiol*, 39(2), 41-48.
- Aragón, S., y Beltran, C. (2018). *Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia).  
[https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/34157/CB-CAPITULO 19 - WEB.pdf?sequence=5](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/34157/CB-CAPITULO%2019%20-%20WEB.pdf?sequence=5)

- Arenas, Y. A., Torres-González, C., Díaz Ortiz, J. E. (2013). Identificación de microorganismos antagonistas del hongo *Fusarium Sp.* En órganos de *Heliconia Spp.* *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente* 12, 69-78  
<https://www.redalyc.org/pdf/2311/231130851007.pdf>
- Ávila-Cervantes, R. A., Montelongo-Mancilla, G., González-Pech, P., Sandoval-Castro, C. A., y Torres-Acosta, F. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Revista BioAgrociencias*, 12(1), 51-58.
- Beltrán Pineda, M. E. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num1\\_art:401](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401)
- Blanco, E. L., Castro, Y., Olivo, A., Skwierinski, R., y Barrios, F. M. (2018). Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e Identificación Molecular De Las Cepas. *Bioagro*, 30(3), 207-218.  
<https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2719/1701>
- Braga, L. (2015). *Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una cepa de Pseudomonas fluorescens y la influencia de su inoculación sobre la comunidad microbiana de la rizosfera de alfalfa.* (Tesis de licenciatura en biología-laboratorio de ecología y micología-IIBCE)  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8456/1/uy24-17746.pdf>
- Carraz M, Lavergne C, Jullian V, Wright M, Gairin JE, Gonzales de la Cruz M, et al (2001). Actividad antiproliferativa y modificación fenotípica inducida por plantas medicinales peruanas seleccionadas en células Hep3B de carcinoma hepatocelular humano. *Etnofarmacología*. 5(2), 185-99.

- Cisneros A. Sánchez R. Menjívar C. (2015). Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. 1, 21-28. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65966>
- Corrales Ramírez, L. Arévalo Galvez, Z. y Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- Eleonora Pineda, B. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Artículo de revisión* 15(1), 101-113. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449944863010.pdf>
- Eliezer Romero, González-Prieto Juan, Rosa-Quijano Raymundo, Hernández-Delgado Sanjuana Jesús, Quiroz-Velázquez Di Carlo.(2020). Genómica de la producción de ácido indol acético en *Trichoderma koningiopsis* Y *T. asperellum*. *Centro de Biotecnología Genómica-IPN*, 4(1), 88-100. <http://inifapcirne.gob.mx/Congreso/RESUMENES EN PDF/209.pdf>
- Espino, C. Á., Morales, G. J, Pedraza, S. M, & Morales, M. K. (2017). Pruebas de antagonismo con hongos asociados al síntoma de marchitez de árboles de aguacate en Michoacán, México. *Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate*, 4, 173-180. [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_173.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_173.pdf)

- Fernández, Kalyanne; Fernández, F.; Rivera, R.; Olalde, V. (2005). Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. *Cultivos Tropicales* 26(2) 11-16.  
<https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215934002.pdf>
- Galván Quintero, B. (2018). Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de *Pinus hartwegii* [ Para Obtener El Grado De Licenciada En Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de México].  
<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/95216/TesisBereniceGalvanQuintero-ActividadCelulolitica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gamboa-Gaitán, M. (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Biológica Colombiana*, 11(1), 3-20.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf>
- Garcés- Granada, E., Correa de Restrepo, M., Cova de Gutierrez, B., Orozco de Amézquita, B., Zapata, A., Anaconda-Chingana, A., & Sbogal, S. (2015). Morfología y Clasificación de los Hongos. *Departamento De Biología Colombia*, 11(1), 3-20.  
[http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Morfologia\\_y\\_Clasificacion\\_de\\_los\\_Hongos/Morfologia\\_y\\_clasificacion\\_de\\_los\\_hongos\\_libro.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Morfologia_y_Clasificacion_de_los_Hongos/Morfologia_y_clasificacion_de_los_hongos_libro.pdf)
- González, A. D. (2015). Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie *Piper aduncum* (Piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas (En Trabajo de Tesis, Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnología Escuela de Tecnología Química Programa).  
<https://core.ac.uk/download/pdf/71398524.pdf>
- González Arelis, Briceño Henry, Chirinos José, Buonocore Renzo, Ángel. Villareal (2014). Variación de la concentración de clorofila a y b clorofila total y tasa de fotosíntesis en *Avicennia germinans* en el manglar de Punta de Palmas. *Revista*

*Investigaciones Científicas*, 5 (2), 67-82.

<http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/incien/v5n1-2/art07.pdf>

González F., H., & Fuentes M., N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17.

<https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>

Guerrero, R., Cevallos, O., Eguez, E., & Peñaherrera, S. (2020). El potencial del uso de microorganismos endofíticos como agentes de control de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*). *Revista Centrosur*, 7(1), 1-18.

<https://centrosuragraria.com/index.php/revista/article/view/33>

Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de Microorganismo Comparación de Tukey de clorofila B en 15 °C mismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66-74. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>

Heyden, G. F. von der. (2014). A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host–Parasite Relationships. *Advances in Parasitology*, 84, 209-252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1>

Huwasquiche Sarmiento, L., Moreno Díaz, P., & Jiménez Dávalos, J. (2020). Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Ecología Aplicada*, 19(2), 65. <https://doi.org/10.21704/rea.v19i2.1557>

Leal-Almanza J. Gutiérrez-Coronado A. Castro-Espinozal L. Lares-Villa F. Cortes-Jiménez M. (2018) Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum L.*) bajo casa sombra vegetable. Artículo en

Agrociencia 52: 1149-1159. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n8/1405-3195-agro-52-08-1149.pdf>

Kumla, J., Suwannarach, N., Bussaban, B., Matsui, K., & Lumyong, S. (2014). Indole 3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. *Annals Of Microbiology*, 64(2), 707-720.

<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0706-x>

Loredo -Osti, C., López-Reyes, L., y Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *TERRA Latinoamericana* 22(2), 225-239.

<https://www.redalyc.org/pdf/573/57322211.pdf>

Martinuz, A. (2020). Interacción entre el hongo endofítico *Fusarium oxysporum* cepa 162 y la bacteria endofítica *Rhizobium etli* cepa G12. *La Calera Revista Científica*. 20 (34), 1-9.

<https://www.lamjol.info/index.php/CALERA/article/view/9601/10981>

Mendiburo, F. (2007). Diseño Completamente Al Azar: DCA. *Revista estadístico* 3(1), 1-2. <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>

Miranda Zamora, G. L. (2019). “Efecto de microorganismos endófitos de plantas altoandinas sobre la germinación y crecimiento de semillas bajo condiciones de estrés de temperatura. (Tesis para optar el título profesional, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Maloyo).

[https://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/4410/T033\\_72962620\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/4410/T033_72962620_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno Salazar, S. F., Rentería Martínez, M. E., Ochoa Meza, A., Guzmán Ortiz, J. M., Fernández Herrera, E., & Barrera Silva, M. Á. (2019). Actividad in vitro de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de rizobacterias aisladas de zacate bermuda ruderal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(2), 311-324.  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1541>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Microbiology Letters* 170, 265-270.  
<https://watermark.silverchair.com/170>
- Orberá de los M Teresa, Manuel de Jesús Serrat, E. O. (2012). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(1), 15-19.  
<https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02.8>.
- Orberá Ratón, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(1), 15-19.  
<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>
- Ordóñez N.F., Otero j., Díez G. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *En Acta Agronómica*. 61(3), 282-290.  
[http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/37544/39](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/37544/39)

- Pérez-y-Terrón, R., Gonzalez-Montfort, T. S., & Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60.
- Pérez, I., Lidieska, L., Reyes, M., & Arelis, D. C. (2017). Características promotoras de crecimiento vegetal en rizobacterias aisladas de suelos contaminados con compuestos fenólicos. *Revista Cubana de Química*, 29(1), 73-88. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v29n1/ind06117.pdf>
- Peteira, B., Arévalo, J., Ynfante, D. Y., & Martínez, B. (2021). Los hongos endófitos y sus aplicaciones potenciales en la agricultura. *Revista de Protección Vegetal*, 36(3), 1-20. <https://eqrcode.co/a/BoiMuO>
- Quintero Bermúde, C. (2016). Evaluación de la producción de ácido indol acético(AIA) y fijación libre de nitrógeno en cepas nativas de *Azotobacter sp.* Aisladas de suelos del altiplano cundiboyacense. *Nature Methods*, 7(6), 2016.
- Ramírez A. & Isaza B Maria, C. (2019). Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Micro- ciencia*, 12-19. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/view/7394/6450>
- Rodríguez-Tudela, J. L., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L., & Cuenca-Estrella, M. (2007). Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 47-53. <https://doi.org/10.1157/13128780>
- Rodríguez Andachi, A. A. (2019). *Actividad celulolítica de hongos filamentosos aislados del parque nacional de Foz de Iguacu-Brasil en sustratos agrícolas mediante la*

*planificación experimental* [Tesis Para optar Título Profesional en Biotecnología, Universidad Federal da Intedraçao Latino-Americano].  
<https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/5591/TCCII.Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodríguez, C., Buitrago, J., Betancurt, A., & Lara, R. (2017). Actividad antagonista de *Bacillus* sp frente a *fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible Rodríguez González Revista Nova. *Revista Nova*, 3(1), 9-19.  
<http://revistas.sena.edu.co/index.php/rnova/article/view/1515/1691>

Ruiz Santiago, F. L., Ruiz Velázquez, J. A., Hernández Becerra, J. A., García Jiménez, R., & Valadez Villareal, A. (2019). Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 891-896.  
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/10/126.pdf>

Salazar López, J. M. (2017). “*Efecto de Bacillus spp. en el control de Salmonella y en el crecimiento de germinado de alfalfa*”. [Tesis Para Optar Título de Maestro Ciencia y Tecnología de Alimentos. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO]

Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*, 16(2), 132-146.  
[https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)

Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M. del C., Peña-Cabriales, J. J., & Farías-Rodríguez, R. (2010). Role of Siderophores in Antagonic Activity of *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 Against Plant Fungi. *Terra Latinoamericana*, 28, 53-60.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316076006>

Tamariz Angeles, C. D. R. (2014). *Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas* [Tesis Para Optar de Título de optar. Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. [http://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/20.500.12390/350/1/2014\\_Tamariz\\_Diversidad-de-bacterias.pdf](http://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/20.500.12390/350/1/2014_Tamariz_Diversidad-de-bacterias.pdf)

Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Applied and Environmental- Microbiology*, 43(4), 777-780.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241917/pdf/aem00185-0051.pdf>

Tejera-Hernández B. Rojas-Badía M. y Heydrich-Pérez M. (2015). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.

<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

Ulloa-muñoz, R., Olivera-Gonzales, P., Castañeda-Barreto, A., Villena, G. K., & Tamariz-Angeles, C. (2020). Diversity of endophytic plant-growth microorganisms from *Gentianella weberbaueri* and *Valeriana pycnantha*, highland Peruvian medicinal plants. *Microbiological Research*, 233(December 2019), 126413.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126413>

Vara Castro, G. M. (2020). *Identificación de sideróforos y ácido oxálico producidos por Lasiodiplodia spp.* [Tesis Para Optar el Grado de en Microbiología Celular y Molecular. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California Maestría en Ciencias en Ciencias de la Tierra con orientación en Geociencias Ambientales].

[https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3326/1/tesis\\_Andrea](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3326/1/tesis_Andrea)

- Vasquez, E. C. (2018). *aislamiento, selección y caracterización de bacterias endófitas promotoras del crecimiento de plantas* [Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica. Instituto de investigaciones fármacobiológicas]. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18261/T-1940.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vega-celedón, P., Martínez, H. C., & González, M. (2016). Revisión bibliográfica biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales* 37, 33-39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Warren, C. R. (2008). Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. En *Journal of Plant Nutrition*. *Journal of Plant Nutrition* 31 (7) 1321-1332. <https://doi.org/10.1080/01904160802135092>
- Wisniewski, M. E., & Wilson, C. L. (1992). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: *Recent Advances*. *HortScience*, 27(2), 94-98. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.2>

## X. ANEXOS

### Anexo 1. Medios y soluciones utilizados en diferentes pruebas

**Tabla 38**

*Medio de cultivo para la prueba antagónica*

<b>Papa Dextrosa agar (PDA)</b>	
20 gramos de papa	100 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Glucosa	2%
Agar-agar	1.5%

**Tabla 39**

*Medio de cultivo para la prueba de sideróforos*

<b>Papa Dextrosa agar (PDA)</b>	
20 gramos de papa	100 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Glucosa	2%
Agar-agar	1.5%
<b>Agar extracto de malta (MEA)</b>	
Extracto de malta	5%
Solución de elementos traza stock (ml)	0.1%
pH	7
<b>Sucrose yeast extract agar (YES)</b>	
Extracto de levadura	2%
Sacarosa	15%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05%
Solución de elementos traza stock (ml)	0.1%
pH	7

**Tabla 40**

*Medio para ácido indol acético (AIA)*

<b>Potato dextrose broth (PDB)</b>	
20 gramos de papa	100 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Glucosa	2%
suplementado con L-tryptophan	
20 mg/ml	100ml de PDB

**Tabla 41**

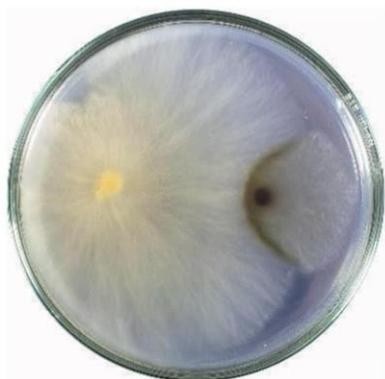
*Medio utilizado para prueba de solubilización de fosfato de calcio*

<b>MEDIO N-BRIP</b>	
Glucosa	1.0%
Ca <sub>3</sub> (P <sub>04</sub> ) <sub>2</sub>	0.5%
MgCl.6H <sub>2</sub> O	0.5%
MgS <sub>04</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.025%
KCl	0.02%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>04</sub>	0.01%
Agar Agar	1.50%
pH	7

## Anexo 2. Fotografías de los métodos aplicados en la parte experimental

**Figura 34**

*Actividad antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos*



**Figura 35**

*Actividad de producción de ácido indol acético (IAA)*



**Figura 36**

*Actividad de producción de sideróforos en diferentes medios de cultivo.*



**Figura 37**

*Solubilización de fosfato de calcio.*



*Figura 38*

*Porcentaje de germinación con cepas inoculadas.*



*Figura 39*

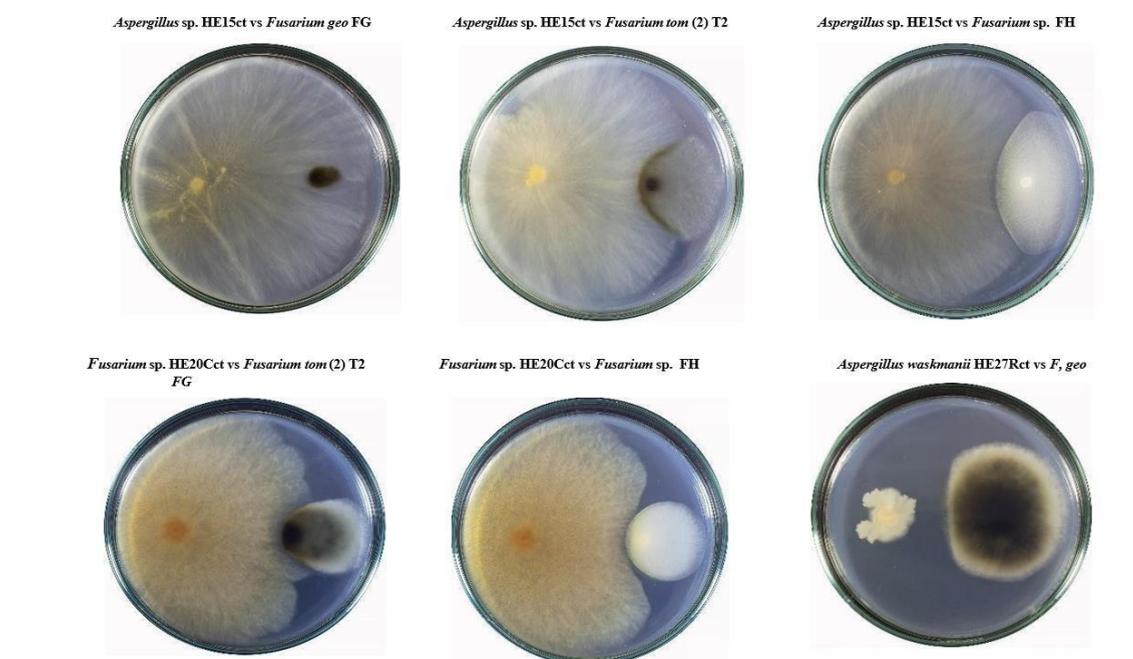
*Crecimiento de la planta de alfalfa con cepas inoculadas.*



**Anexo 3. Fotografías de las evaluaciones cualitativas de las diferentes pruebas realizadas.**

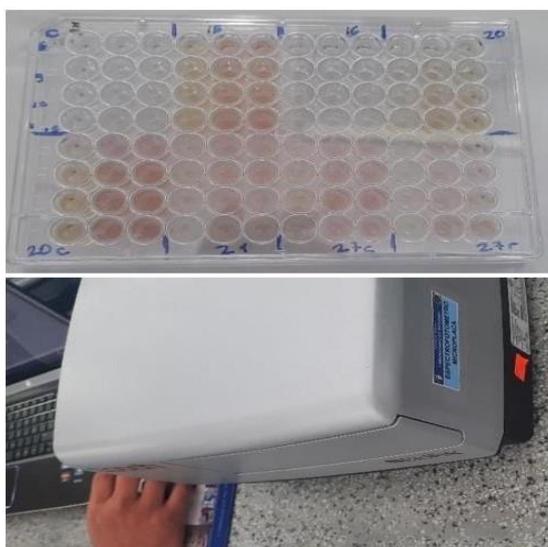
**Figura 40**

*Evaluación antifúngica de hongos endofíticos frente a patógenos*



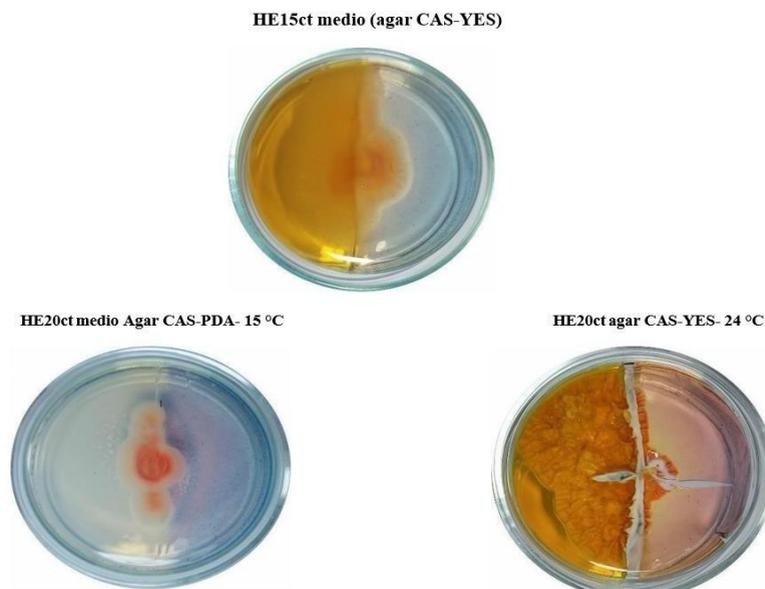
**Figura 41**

*Evaluación de producción de ácido indol acético*



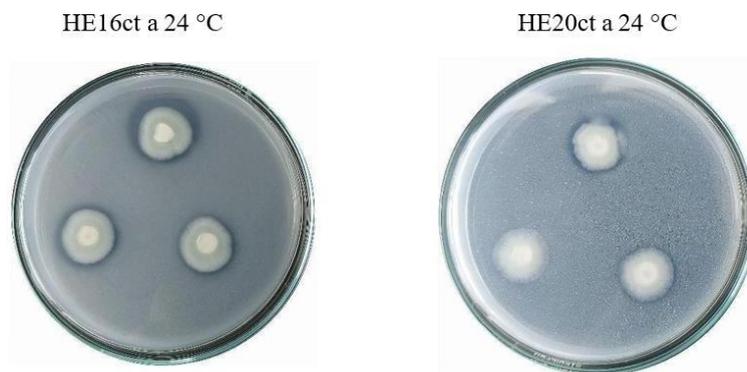
**Figura 42**

*Evaluación producción de sideróforos.*



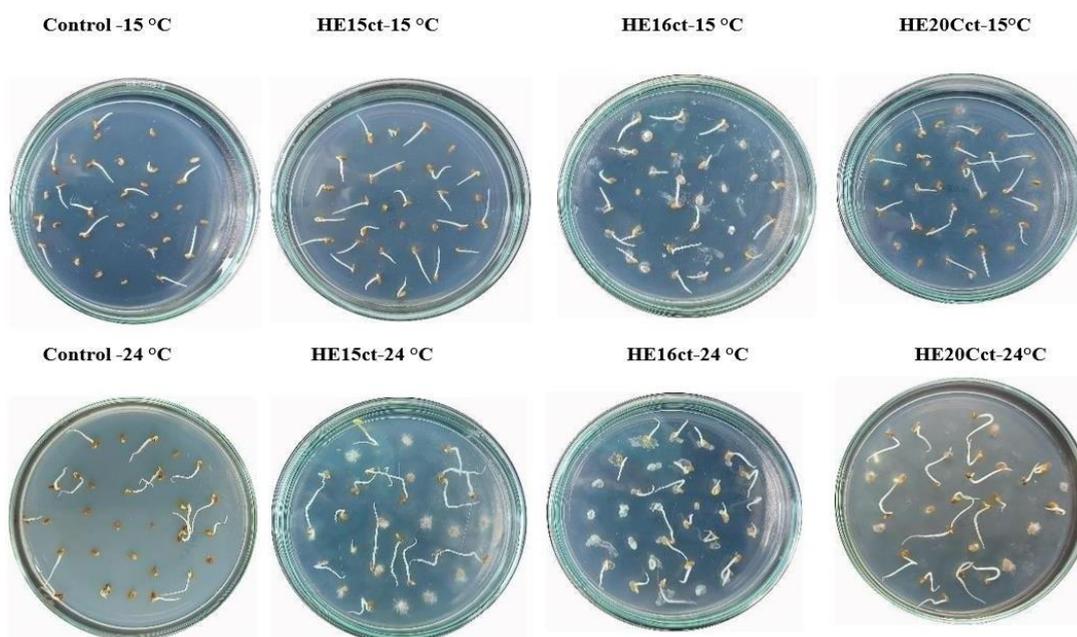
**Figura 43**

*Evaluación de solubilización de fosfato de calcio a temperatura de 24 °C*



**Figura 44**

*Porcentaje de germinación en temperaturas a 15 y 24 °C.*



**Figura 45**

*Índice de plantas crecidas con cepas inoculadas*

Control -15 °C



*Fusarium sp.* HE15ct-15 °C



*Penicillium* HE16ct-15 °C



*Fusarium sp.* HE20Cct-15°C



#### Anexo 4. Análisis estadísticos aplicados a las diferentes pruebas realizadas.

##### Análisis de varianza ANVA de un factor de antagonismo de hongos endofíticos frente a patógenos.

**Tabla 42**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a Fusarium oxysporum CLTM12*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa CLTM12				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	1.0176	0.1696	89.04 *
Error	14	0.0267	0.0019	
Total	20	1.0442		

**Tabla 43**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a Fusarium sp. FH*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa FH				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	0.8567	0.1428	322.50 *
Error	14	0.0062	0.0004	
Total	20	0.8629		

**Tabla 44**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a Aspergillus niger ATCC7275*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa ATCC7275				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	0.4436	0.0739	193.44 *
Error	14	0.0054	0.0003	
Total	20	0.4489		

**Tabla 45**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a Alternaria sp.*

*ATCC20084*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa ATCC20084				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	1.56	0.2600	208.1 *
Error	14	0.02	0.0012	
Total	20	1.58		

**Tabla 46**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofíticos frente a Alternaria sp. T2*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa T2				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	1.2404	0.2074	516.86 *
Error	14	0.0056	0.0004	
Total	20	1.2461		

**Tabla 47**

*Análisis de varianza ANVA de un factor de hongos endofítico frente a Geotrichum*

*candidum P1*

ANVA de un factor				
Porcentaje de antagonismo de hongos endofíticos frente a la cepa P1				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	6	1.1144	0.1857	304.3 *
Error	14	0.0085	0.0006	
Total	20	1.1229		

**Análisis de varianza ANOVA de un factor de producción de ácido indol acético(IAA) a 15 °C.**

**Tabla 48**

*Producción de ácido indol acético de la cepa HE15ct a 15 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE15ct a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	2326.10	775.36	78.0 *
Error	12	119.30	9.94	
Total	15	2445.40		

**Tabla 49**

*Producción de ácido indol acético de la cepa HE20Cct a 15 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE20Cct a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	4834.63	1611.54	294.51 *
Error	12	65.66	5.47	
Total	15	4900.29		

**Tabla 50**

*Producción de ácido indol acético de la cepa HE21ct a 15 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE21ct a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	2113.64	704.55	78.00 *
Error	12	34.41	2.80	
Total	15	2148.06		

**Tabla 51***Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Cct a 15 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE27Cct a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trar.	3	2189.90	727.64	70.77 *
Error	12	123.40	10.28	
Total	15	2306.30		

**Análisis de varianza ANOVA de un factor de producción de ácido indol acético(IAA) a 24 °C.**

**Tabla 52***Producción de ácido indol acético de la cepa HE15ct a 24 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE15ct a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	1067.00	355.36	5.71 *
Error	12	748.00	62.33	
Total	15	1815.00		

**Tabla 53***Producción de ácido indol acético de la cepa HE20ct a 24 °C*

ANVA de un factor						
Producción de AIA del hongo endofítico HE20ct a 24 °C						
Fuente	GL	SC	CM	Fc	Ft	Sig
Trat.	3	12628.80	4209.58	317.70	0.00	*
Error	12	159.00	13.25			
Total	15	12787.80				

**Tabla 54***Producción de ácido indol acético de la cepa HE20Cct a 24 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE20Cct a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	2509.00	1169.67	37.13 *
Error	12	378.00	31.50	
Total	15	3887.00		

**Tabla 55***. Producción de ácido indol acético de la cepa HE21ct a 24 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE21ct a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	7715.00	2571.67	105.68 *
Error	12	292.00	24.33	
Total	15	8007.00		

**Tabla 56***Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Cct a 24 °C*

ANVA de un factor						
Producción de AIA del hongo endofítico HE27Cct a 24 °C						
Fuente	GL	SC	CM	Fc	Ft	Sig
Trat.	3	31640.00	10546.70	1977.50	0.00	*
Error	12	64.00	5.30			
Total	15	31704.00				

**Tabla 57***Producción de ácido indol acético de la cepa HE27Rct a 24 °C*

ANVA de un factor				
Producción de AIA del hongo endofítico HE27Rct a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Trat.	3	15716.70	5238.92	228.61*
Error	12	275.00	22.92	
Total	15	15991.70		

**Análisis de varianza ANVA de un factor para la solubilización de fosfato de calcio a 24 °C.**

**Tabla 58**

*Solubilización de fosfato de calcio de las cepas HE16ct y HE20ct a 24 °C*

ANVA de un factor				
Solubilización de fosfato de calcio de las cepas HE16ct y HE20ct				
Fuente	GL	SC	CM	F
Factor	1	0.06	0.06	5.66 *
Error	6	0.06	0.01	
Total	7	0.12		

**Análisis de varianza ANVA de un factor de porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas con cepas a 15 °C.**

**Tabla 59**

*Porcentaje de germinación inoculadas a 15 °C en 24 horas*

ANVA de un factor				
Porcentaje de germinación a 15 °C en 24 horas				
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F
Factor	3	0.007	0.002	2.89 NS
Error	8	0.003	0.001	
Total	11	0.010		

**Tabla 60**

*Porcentaje de germinación inoculadas a 15 °C en 48 horas*

ANOVA de un factor					
Porcentaje de germinación a 15 °C en 48 horas					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.038	0.012	5.11	0.07 NS
Error	8	0.010	0.002		
Total	11	0.048			

**Análisis de varianza ANVA de un factor de porcentaje de germinación de alfalfa inoculadas con cepas a 24 °C.**

**Tabla 61**

*Porcentaje de germinación inoculadas a 24 °C en 24 horas*

ANVA de un factor					
Porcentaje de germinación a 24 °C en 24 horas					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.047	0.016	1.69	0.30 NS
Error	8	0.037	0.093		
Total	11	0.084			

**Tabla 62**

*Porcentaje de germinación inoculadas a 24 °C en 48 horas*

ANVA de un factor					
Porcentaje de germinación a 24 °C en 48 horas					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0.036	0.012	1.88	0.27 NS
Error	8	0.025	0.006		
Total	11	0.061			

**Análisis de varianza ANVA de un factor crecimiento de la planta de alfalfa inoculadas con cepas a 15 °C.**

**Tabla 63**

*Crecimiento de la planta de alfalfa parte de la raíz a 15 °C*

ANVA de un factor				
Crecimiento de la raíz a 15°C				
Tratamiento	GL	SC	CM	F
Factor	3	127.80	42.60	13.14 *
Error	60	194.50	3.24	
Total	63	322.30		

**Tabla 64***Crecimiento de la planta de alfalfa parte del tallo a 15 °C*

ANOVA de un factor				
Crecimiento del tallo a 15 °C				
Tratamiento	GL	SC	CM	F
Factor	3	3.77	1.26	0.01 *
Error	60	16.25	0.27	
Total	63	20.02		

**Análisis de varianza ANVA de un factor crecimiento de la planta de alfalfainoculadas con cepas a 24 °C.**

**Tabla 65***Crecimiento de la planta de alfalfa parte de la raíz a 24 °C*

ANOVA de un factor				
Crecimiento de la raíz a 24 °C				
Tratamiento	GL	SC	CM	F
Factor	3	133.50	44.51	15.33 *
Error	60	174.20	2.90	
Total	63	307.70		

**Tabla 66***Crecimiento de la planta de alfalfa parte del tallo a 24 °C*

ANOVA de un factor				
Crecimiento del tallo a 24 °C				
Tratamiento	GL	SC	CM	F
Factor	3	9.77	3.26	0.00 *
Error	60	32.51	0.54	
Total	63	42.28		

**Análisis de varianza ANVA de un factor de la biomasa seca de raíz de  
plantones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C**

**Tabla 67**

*Biomasa seca de raíz de plantones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C*

ANVA de un factor				
Biomasa seca de la raíz a 15 y 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Factor	7	0.001	0.000	1.810 NS
Error	8	0.000	0.000	
Total	15	0.001		

**Análisis de varianza ANVA de un factor de biomasa seca del tallo de  
plantones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C**

**Tabla 68**

*Biomasa seca del tallo de plantones de alfalfa inoculada a 15 y 24 °C*

ANVA de un factor				
Biomasa seca del tallo a 15 y 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Factor	7	0.001	0.000	1.81*
Error	8	0.000	0.000	
Total	15	0.001		

**Análisis de varianza ANVA de un factor en la producción de clorofila A y B a 15  
°C**

**Tabla 69**

*Producción de clorofila A en 15 °C*

ANVA de un factor				
Producción de clorofila A a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Factor	3	13.24	4.41	0.86 *
Error	12	61.82	5.15	
Total	15	75.06		

**Tabla 70***Producción de clorofila B a 15 °C*

ANOVA de un factor				
Producción de clorofila B a 15 °C				
Fuente	GL	SC	CM	F
Factor	3	1802.20	600.75	11.98 *
Error	12	601.80	5015.00	
Total	15	2404.00		

**Análisis de varianza ANVA de un factor en la producción de clorofila A y B a 24**

°C

**Tabla 71***Producción de clorofila A en 24 °C*

ANOVA de un factor				
Producción de clorofila A a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	Fc
Factor	3	25.46	8.49	4.40 *
Error	12	23.17	1.93	
Total	15	48.64		

**Tabla 72***Producción de clorofila B a 24°C*

ANOVA de un factor				
Producción de clorofila B a 24 °C				
Fuente	GL	SC	CM	Fc
Factor	3	469.60	156.53	4.38 *
Error	12	428.70	35.72	
Total	15	898.30		