

**UNIVERSIDAD NACIONAL
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE
MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS CULTIVABLES DE
ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES DE LA CORDILLERA
BLANCA, ANCASH, COMO LÍNEA BASE PARA PROMOVER SU
CONSERVACIÓN**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AMBIENTAL

Tesista: Br. STEYSI NATSA ROSALES DÍAZ

Asesor: Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES

Huaraz-Perú

2023





"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

ACTA DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los Miembros del Jurado en pleno que suscriben, reunidos en la fecha, en el Auditorium de la FCAM-UNASAM, de conformidad a la normatividad vigente conducen el Acto Académico de Sustentación y Defensa de la tesis "EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS CULTIVABLES DE ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES DE LA CORDILLERA BLANCA, ANCASH, COMO LÍNEA BASE PARA PROMOVER SU CONSERVACIÓN", que presenta ROSALES DÍAZ STEYSI NATSA para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental.

En seguida, después de haber atendido la exposición oral y escuchada las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, lo declaramos:

APROBADO CON DISTINCIÓN

Con el calificativo de: *DIECISIETE (17)*

En consecuencia, ROSALES DÍAZ STEYSI NATSA queda expedito para que el Consejo de Facultad de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" apruebe el otorgamiento de su **Título Profesional de Ingeniero Ambiental** de conformidad al Art. 113 numeral 113.9 del Reglamento General de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario N° 399-2015-UNASAM), el Art. 48° y 4ta disposición complementaria del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 761-2017-UNASAM) y el Art. 160° del Reglamento de Gestión de la Programación, Ejecución y Control de las Actividades Académicas (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 232-2017-UNASAM).

Huaraz, 21 de noviembre de 2022

Dr. HERACLIO FERNANDO CASTILLO PICON
Presidente
Jurado de sustentación

Dr. ELADIO GUILLERMO TUYA CASTILLO
Primer miembro
Jurado de sustentación

MSc. ROSARIO ADRIANA POLO SALAZAR
Segundo miembro
Jurado de sustentación

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
Asesor del tesista





"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

INFORME DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en la fecha, en el Auditorium de la FCAM UNASAM, en el Acto Académico de Sustentación y Defensa de Tesis "EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS CULTIVABLES DE ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES DE LA CORDILLERA BLANCA, ANCASH, COMO LÍNEA BASE PARA PROMOVER SU CONSERVACIÓN", informamos que:

- 1) El proceso de sustentación y defensa de la tesis se desarrolló en forma normal dentro de la fecha y hora programada, con la asistencia en pleno de los miembros del Jurado y con la presencia del asesor.
- 2) El Tesista **ROSALES DÍAZ STEYSI NATSA**, ha:
 - Aprobado sin observación, con el calificativo ()
 - Aprobado con observación, con el calificativo (17)

Por consiguiente, para efectos de conformidad deberá subsanar lo siguiente:

 - Mejorar la población y muestra de la tesis
 - Incluir temas acerca de la línea base, resaltándolo en las conclusiones y recomendaciones
 - Desaprobado, con el calificativo ()
- 3) El Acta de Sustentación y Defensa de la Tesis se eleva a la Dirección de Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de conformidad al Art. 68° inc. f) del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 761-2017-UNASAM)

Huaraz, 21 de noviembre de 2022

Dr. HERACLIO FERNANDO CASTILLO PICON
Presidente
Jurado de sustentación

Dr. ELADIO GUILLERMO TUYA CASTILLO
Primer miembro
Jurado de sustentación

MSc. ROSARIO ADRIANA POLO SALAZAR
Segundo miembro
Jurado de sustentación

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
Asesor del tesista



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

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

Presentado por:

con DNI N°:

para optar el Título Profesional de:

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 : de similitud.

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

Porcentaje			
Trabajos de estudiantes	Tesis de pregrado	Evaluación y acciones	Seleccione donde corresponda <input checked="" type="radio"/>
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.	
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.	
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.	

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,



FIRMA

Apellidos y Nombres: _____

DNI N°: _____

Se adjunta:

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

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS STEYSI.pdf

AUTOR

Steysi Rosales

RECUENTO DE PALABRAS

20526 Words

RECUENTO DE CARACTERES

110478 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

132 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.1MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 19, 2023 5:50 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Aug 19, 2023 5:52 PM GMT-5**● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

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

DEDICATORIA

¡A mis Padres, hermanos y novio!

Por todo su amor incondicional y su respaldo, porque juntos logramos cumplir un objetivo más, porque nunca faltó su motivación de siempre seguir adelante como persona y profesional.

Steysi Rosales Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios por poner en mi camino personas que me han alentado e inspirado a ser mejor, haciendo posible la culminación de esta investigación.

A mi madre Marlene, mi padre Luis Ángel, mis hermanos y mi novio por todo su respaldo y aliento.

A la Dra. Carmen Tamariz por su asesoramiento incondicional en todas las etapas de mi trabajo de Investigación.

Al Dr. Percy Olivera por su co-asesoramiento en el trabajo de campo, laboratorio y gabinete.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Alberto, Becky y Alex por todo su apoyo y cooperación en las salidas de campo y trabajos de laboratorio.

Al Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) donde se llevó a cabo la investigación.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo de investigación.

Este trabajo fue financiado por PROCENCIA - CONCYTEC en el marco de la convocatoria Proyecto Investigación Básica, 2019-01 [Contrato N° 381-2019-FONDECYT].

RESUMEN

La cordillera peruana cuenta con una gran diversidad plantas medicinales nativas las cuales son se extraídas y comercializadas en las ferias populares. Los registros de biodiversidad de esta región se basan en la flora y fauna, pero es poco lo que se conoce de la diversidad microbiana, es por ellos que en la presente investigación se planteó aislar microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales nativas para identificar sus propiedades biotecnológicas que sustenten la promoción de su conservación.

Se estudiando a 6 plantas medicinales de la cordillera Blanca, *Werneria nubigena*, *Buddleja incana*, *Xenophyllum dactylophylla*, *Perezia coerulescens*, *Loricaria ferruginea* y *Senecio calvus* colectadas en dos puntos la quebrada de Quilcayhuanca (3866 msnm) y Punta Olímpica (4875 msnm), obteniendo 49 microorganismos aislados, 14 hongos y 35 bacterias endofíticas, asimismo se adicionó a la investigación 8 cepas del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) las cuales fueron aisladas de las plantas medicinales *Senecio calvus*, *Valeriana pycnantha* y *Oreocallis grandiflora*, colectadas de la quebrada de Llaganuco y de Pitec.

Estos microorganismos fueron aislados y se les realizó pruebas de promoción de crecimiento vegetal, propiedades antimicrobianas y antioxidantes, y se procedió con la identificación taxonómica de las cepas aisladas. Dentro del estudio de promoción de crecimiento vegetal se realizaron pruebas de solubilización de fosfato de calcio, determinando que 23 cepas de bacterias endofíticas tienen actividad y siendo la cepa 24H quien presenta mayor porcentaje; prueba de actividad de producción de ácido indol acético (AIA) encontrando actividad solo en 15 cepas de hongos endofíticos, siendo la cepa 4H la que presenta mayor actividad; prueba de actividad de producción de sideróforos, encontrando que 9 hongos y 22 bacterias presentan resultados favorables, siendo la cepa HW51a el hongo endofítico y la cepa 30B la bacteria endofítica las que presentaron mayor actividad de producción; prueba de la actividad hidrolítica de Carboximetil celulosa encontrando resultados solo en 14 hongos endofíticos, siendo la cepa 39H quien presenta mayor actividad;

prueba de la actividad enzimática proteasa determinó que solo el hongo HBi12H tiene esta actividad; prueba de la actividad antagonica de las bacterias endofíticas, demostrando que 12 bacterias tienen esta actividad, siendo la bacteria BW53T quien presenta mayor actividad antagonica; prueba de actividad enzimática de amilasa encontrando que 21 hongos y 25 bacterias tiene esta actividad, siendo la cepa HW51b hongo y la cepa 51B bacteria endofíticas quienes presentan mayor actividad. Para las propiedades antimicrobianas y antioxidantes encontramos que 15 cepas de hongos tienen actividad antimicrobiana, entre antibacteriana y anticandida, asimismo, para la actividad antioxidante se determinó que 9 cepas de hongos poseen esta característica; asimismo los resultados de la identificación taxonómica detallan el género de las cepas de hongos endofíticos, como también las características bioquímicas de las bacterias.

Estos resultados demuestran que los microorganismos endofítico-aislados poseen propiedades biotecnológicas de gran importancia para la promoción de su conservación dentro de la cordillera Blanca.

PALABRAS CLAVE: Cordillera Blanca, hongo endofítico, bacteria endofítica, promotor de crecimiento, antimicrobiana, antioxidante, taxonómica, morfológica, biodiversidad, diversidad microbiana.

ABSTRACT

The Peruvian Mountain range has a great diversity of native medicinal plants which are extracted and marketed at popular fairs. The biodiversity records of this region are based on the flora and fauna, but little is known about microbial diversity, it is for them that in the present investigation it was proposed to isolate endophytic microorganisms from some native medicinal plants to identify their biotechnological properties that support the promotion of its conservation.

Studying 6 medicinal plants from the Cordillera Blanca, *Werneria nubigena*, *Buddleja incana*, *Xenophyllum dactylophylla*, *Perezia coerulescens*, *Loricaria ferruginea* and *Senecio calvus* collected at two points, the Quilcayhuanca ravine (3866 masl) and Punta Olímpica (4875 masl), obtaining 49 isolated microorganisms, 14 fungi and 35 endophytic bacteria, likewise, 8 strains from the Ancash Biodiversity and Genetic Resources Research Center (CIByRGA) were added to the investigation, which were isolated from the medicinal plants *Senecio calvus*, *Valeriana pycnantha* and *Oreocallis grandiflora*, collected from the Llaganuco and Pitec ravines.

These microorganisms were isolated and tests for plant growth promotion, antimicrobial and antioxidant properties were performed, and the taxonomic identification of the isolated strains was carried out. Within the plant growth promotion study, calcium phosphate solubilization tests were carried out, determining that 23 strains of endophytic bacteria have activity and the 24H strain is the one with the highest percentage; indole acetic acid (IAA) production activity test, finding activity only in 15 strains of endophytic fungi, the 4H strain being the one with the highest activity; siderophore production activity test, finding that 9 fungi and 22 bacteria present favorable results, being the HW51a strain the endophytic fungus and the 30B strain the endophytic bacteria which presented the highest production activity; test of the hydrolytic activity of Carboxymethyl cellulose, finding results only in 14 endophytic fungi, being the 39H strain the one with the highest activity; protease enzymatic activity test determined that only the fungus HBi12H has this activity; proof of the antagonistic activity of endophytic bacteria, showing that 12 bacteria have this activity, being the BW53T bacterium the one that presents

the greatest antagonistic activity; amylase enzymatic activity test finding that 21 fungi and 25 bacteria have this activity, being the fungus strain HW51b and the endophytic bacteria strain 51B the ones with the highest activity. For the antimicrobial and antioxidant properties, we found that 15 strains of fungi have antimicrobial activity, between antibacterial and anticandida, likewise, for the antioxidant activity, it was determined that 9 strains of fungi have this characteristic; Likewise, the results of the taxonomic identification detail the gender of the strains of endophytic fungi, as well as the biochemical characteristics of the bacteria.

These results show that the isolated endophytic microorganisms have biotechnological properties of great importance for the promotion of their conservation within the Cordillera Blanca.

KEY WORDS: Cordillera Blanca, endophytic fungus, endophytic bacteria, growth promoter, antimicrobial, antioxidant, taxonomic, morphological, biodiversity, microbial diversity.

INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INDICE	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.2. Hipótesis	2
1.3. Variables	3
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Bases teóricas	6
2.3. Definición de términos básicos	9
CAPITULO III	
MARCO METODOLÓGICO.....	11
3.1. Tipo de Investigación	11
3.2. Diseño de Investigación	11

3.3. Métodos o técnicas	13
3.4. Población y muestra	27
3.5. Instrumentos validados de recolección de datos	27
3.6. Plan de procesamiento y análisis estadístico de la información	30
CAPITULO IV	
RESULTADOS	31
4.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca	31
4.2. Actividad promotora de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados	34
4.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los microorganismos aislados	46
4.4. Identificación taxonómica mediante técnicas moleculares	55
4.5. Resumen de resultados	68
CAPITULO V	
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
5.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca	74
5.2. Actividad promotora de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados	74
5.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los microorganismos aislados	79
5.4. Identificación taxonómica mediante técnicas moleculares	81
5.5. Prueba de hipótesis	82

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
6.1. Conclusiones	83
6.2. Recomendaciones	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	90
ANEXO N° 01	91
MAPA DE UBICACIÓN DE LOS PUNTOS COLECTADOS	91
ANEXO N° 02	94
CURVAS DE CALIBRACIÓN	94
ANEXO N° 03	96
PANEL FOTOGRAFICO	96
ANEXO N° 04	106

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diseño experimental de la investigación.....</i>	12
<i>Tabla 2. Colecta de muestras vegetales.....</i>	15
<i>Tabla 3. Instrumentos de recolección de datos</i>	30
<i>Tabla 4. Número de cepas aisladas por planta</i>	31
<i>Tabla 5. Hongos endofíticos aislados</i>	32
<i>Tabla 6. Bacterias endofíticas aisladas.....</i>	33
<i>Tabla 7. Hongos endofíticos del banco CIByRGA.....</i>	34
<i>Tabla 8. Resumen de resultados del antagonismo de las bacterias endofíticas... </i>	44
<i>Tabla 9. Microbios estandarizados de patógenos humanos comunes.....</i>	46
<i>Tabla 10. Reporte de los resultados de las pruebas bioquímicas</i>	56
<i>Tabla 11. Identificación taxonómica de hongos.....</i>	57
<i>Tabla 12. Resumen de resultado de los hongos endofíticos aislados.....</i>	70
<i>Tabla 13. Resumen de resultados de las bacterias endofíticas aislada.....</i>	72

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Capacidades de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal con fines de comercialización</i>	8
<i>Figura 2. Diagrama general del trabajo.....</i>	14
<i>Figura 3. Cálculo del índice de solubilización de fosfato.</i>	18
<i>Figura 4. Cálculo del Índice de inhibición.....</i>	23

<i>Figura 5. Corresponde a la formación del halo por las cepas de Werneria nubigena(i); Xenophyllum dactylophylla, Perezia coerulescens y Senecio Calvus (ii): y Xenophyllum dactylophylla y Perezia coerulescens (iii).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 6. Índice de solubilización de fosfato de bacterias endofíticas.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 7. Concentración AIA producidos por hongos endofíticos (los valores corresponden al promedio de dos repeticiones).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 8. Índice de producción de Sideróforos de hongos endofíticos.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 9. Índice de producción de Sideróforos de bacterias endofíticas.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 10. Índice de actividad de celulolítica de hongos endofíticos.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 11. Índice de actividad de proteasa</i>	<i>40</i>
<i>Figura 12. Placas control de hongos patógenos. (i)Fus. geo (ii)Fus.H (iii)F.Tom (3) (iv)Fus 12 (v)Phy (vi)F.Tom (2) (vii)Asp.Dis.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. Crecimiento de los hongos patógenos sin antagonismo.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 14. Antagonismo de bacterias endofíticas frente a hongos patógenos.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Índice de actividad amilasa de los hongos endofíticos.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 16. Índice de actividad amilasa de las bacterias endofíticas.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 17. Actividad antimicrobiana de la cepa HW47</i>	<i>47</i>
<i>Figura 18. Actividad antimicrobiana de la cepa HW49</i>	<i>47</i>
<i>Figura 19. Actividad antimicrobiana de la cepa HBi12H.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 20. Actividad antimicrobiana de la cepa HBi21T</i>	<i>48</i>
<i>Figura 21. Actividad antimicrobiana de la cepa 2H.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 22. Actividad antimicrobiana de la cepa 4H.....</i>	<i>49</i>

<i>Figura 23. Actividad antimicrobiana de la cepa 22H.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 24. Actividad antimicrobiana de la cepa 39H.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 25. Actividad antimicrobiana de la cepa H13.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 26. Actividad antimicrobiana de la cepa H14.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 27. Actividad antimicrobiana de la cepa H17.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 28. Actividad antimicrobiana de la cepa H22.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 29. Actividad antimicrobiana de la cepa H24.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 30. Actividad antimicrobiana de la cepa H25.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 31. Actividad antimicrobiana de la cepa H28.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 32. Actividad antioxidante de las cepas de hongos endofíticos</i>	<i>55</i>
<i>Figura 33. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW48T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa</i>	<i>58</i>
<i>Figura 34. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW47, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa</i>	<i>58</i>
<i>Figura 35. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HBi12H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa</i>	<i>59</i>
<i>Figura 36. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HBi21T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa</i>	<i>59</i>
<i>Figura 37. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW49, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa</i>	<i>60</i>

Figura 38. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW51a, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 60

Figura 39. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW51b, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 61

Figura 40. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW40, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 61

Figura 41. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW53T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 62

Figura 42. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 2H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 62

Figura 43. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 4H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 63

Figura 44. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 22H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 63

Figura 45. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 39H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 64

Figura 46. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 84H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 64

Figura 47. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE14, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 65

Figura 48. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE23, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 65

Figura 49. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE13, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 66

Figura 50. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE25, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 66

Figura 51. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE24, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 67

Figura 52. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE17, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 67

Figura 53. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE28, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 68

Figura 54. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE28, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa 68

Figura 55. Puntos ubicados en la quebrada Quilcayhuanca 92

Figura 56. Puntos ubicados en la Punta Olímpica 93

Figura 57. Curva de calibración de Acido Indol Acético (AIA) 95

<i>Figura 58. Curva de la calibración de la actividad antioxidante.....</i>	95
<i>Figura 59. Fotografía de trabajo de campo y laboratorio. A: Recolección de las especies en punta olímpica, acompañada de la Dr. Tamariz, asesora de la investigación, B: Aislamiento de los hongos y bacterias endofíticas.....</i>	101
<i>Figura 60. Prueba antimicrobiana de los hongos endofíticos aislados.....</i>	101
<i>Figura 61. Preparación de micelios para macerarlos - prueba antioxidantes (DPPH).....</i>	102
<i>Figura 62. Preparación del espectrofotómetro para las pruebas.....</i>	102
<i>Figura 63. Fotografía de la primera prueba de descarte de AIA</i>	103
<i>Figura 64. Fotografía representativa de los resultados de la actividad de producción de sideróforos de las bacterias endofíticas aisladas (A y B)</i>	103
<i>Figura 65. Fotografía representativa de los resultados de la actividad de producción de sideróforos de los hongos endofíticos aislados, A: HW48T y B: HW49</i>	104
<i>Figura 66. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad hidrolítica de carboximetil celulosa de los hongos endofíticos A: H17 Y B: HW40</i>	104
<i>Figura 67. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad antagónica de la cepa BW53T bacterias endofíticas A: (i)Fus. geo (ii)Fus.H (iii)F.Tom (3) B: (iv)Fus 12 (v)Phy (vi)F.Tom (2) (vii)Asp.Dis</i>	105
<i>Figura 68. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad antimicrobiana A: hongos endofíticos vs SEP13 Y B: hongos endofíticos vs CA105</i>	

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La cordillera peruana cuenta con una gran diversidad plantas medicinales nativas conocidas y comercializadas por el poblador andino. Una zona representativa de este ecosistema es la cordillera Blanca, la cual presenta condiciones hostiles dentro de las diversas quebradas, donde extraen diversas plantas medicinales silvestres que son comercializadas en las ferias populares de los poblados del Callejón de Huaylas (Ancash, Perú), entre ellos, la ciudad de Huaraz.

La cordillera Blanca día con día enfrenta amenazas, como la pérdida de la cobertura vegetal, sobrepastoreo, presión del turismo, actividades mineras, colecta indiscriminada, efecto del calentamiento global, entre otros, lo cual pone en riesgo a la biodiversidad que alberga. Actualmente, los registros de biodiversidad se basan en describir la flora y fauna, pero existe un mundo microbiano menos explorado. Estudios actuales muestran la importancia de los microorganismos asociados a las plantas adaptadas a ambientes extremos y resaltan que su participación es esencial para el crecimiento y adaptación en estos ecosistemas.

Por lo tanto, la presente investigación buscó evaluar a aquellos microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales nativas que habitan



en la cordillera Blanca, para identificar sus propiedades biotecnológicas, como las de promoción de crecimiento, propiedades antimicrobianas o antioxidantes, que sustenten la promoción de conservación de estas plantas medicinales e incentiven continuar con la investigación de los microorganismos endofíticos que habitan en ellas con la finalidad de encontrar alternativas de soluciones biotecnológicas para las problemáticas ambientales que enfrenta la cordillera Blanca.

1.1. Objetivos

1.1.1. General:

Evaluar la presencia de propiedades biotecnológicas que poseen los microorganismos endofíticos cultivables de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca que sustenten la promoción de su conservación.

1.1.2. Específicos:

- Aislar microorganismos endofitos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca.
- Evaluar las actividades de promoción de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los microorganismos aislados.
- Identificar taxonómicamente mediante técnicas moleculares las cepas estudiadas

1.2. Hipótesis

Existe presencia de microorganismos endofíticos cultivables en alguna planta medicinal de la cordillera Blanca con propiedades biotecnológicas, que permite promover su conservación.

1.3. Variables

- V.I. Microorganismos endófitos cultivables en algunas plantas medicinales.
- V.D. Propiedades biotecnológicas.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Investigaciones donde aislaron microorganismos endofíticos de plantas medicinales

Alrededor del mundo se han realizado estudios donde aislaron microorganismos endofíticos de plantas medicinales con la finalidad de encontrar el potencial que pudieran ofrecer para la aplicación en distintos campos. Por ejemplo, Toghueo et al. (2017) aisló e identificó hongos endofíticos de *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* y *Cananga odorata*, plantas medicinales utilizadas en Camerún para tratar varias enfermedades y determinó sus actividades enzimáticas, aisló 21 géneros de ascomicetos y los caracterizó en base a la actividad enzimática de amilasa, celulosa, lipasa y lacasa, determinando que podrían ser un depósito de valiosos productos químicos bioactivos útiles para la producción de enzimas de importancia industrial.

Asimismo, Chowdhury et al. (2017) aisló e identificó microorganismos endofitos bacterianos del Ginseng cultivado en la montaña en 24 diferentes sitios de Corea, logrando aislar un total de 1886 bacterias de la raíz, el tallo y la hoja, evaluó a 252 aislamientos



bacterianos para determinar sus rasgos beneficiosos para plantas hospedadoras, demostrando que algunas bacterias poseen la aptitud de promover la planta, crecimiento y producción de β -glucosidasa, lo que indica sus posibles funciones en la promoción del crecimiento de las plantas y biotransformación. En así, que este estudio proporcionó no solo recursos valiosos para la utilización de microorganismos endófitos bacterianos en Ginseng sino también información sobre comunidades bacterianas dentro de una planta medicinal muy con gran importancia.

En el Perú, Cervantez Tenorio de Reyna & Reyna Pizán (2019) estudian los microorganismos endófitos existentes en hojas de *Agave americana*, logrando aislar 14 bacterias y 3 hongos pertenecientes a los géneros *Colleotricum* y *Penicillium* sp e identificaron sus componentes bioactivo, carbohidratos, aminoácidos, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, saponinas y alcaloides, los cuales son de interés industrial y sus resultados reportan por primera vez la presencia de microorganismos endófitos tanto bacterias como hongos en la planta *Agave americana*.

En Ancash, Ulloa-Muñoz et al. (2020) logró aislar nueve especies de bacterianas y seis fúngicas de *Gentianella weberbaueri* y *Valeriana pycnantha*, plantas medicinales altoandinas peruanas, encontrando microorganismos con propiedades promotoras del crecimiento de las plantas incluso en condiciones de frío, este estudio es el primer reporte de microorganismos endofíticos de plantas medicinales del altiplano peruano, muestra una valiosa diversidad microbiana y su posible papel en la promoción del crecimiento de cultivos y plantas medicinales silvestres.

2.1.2. Estudios de microorganismos endofíticos con resultados que promueven su conservación.

Realizaron estudios dentro de la región de Ancash, por ejemplo, Huamán de la Cruz (2018) aisló bacterias y hongos rizosféricos a partir de muestras de suelos asociados a *Belloa longifolia*, *Senecio* sp., *Senecio serratifolia* y *Distichia muscoides*, asimismo, aisló microorganismos endofíticos de las raíces y tallos de dichas plantas, evaluó la producción

de sideróforos de hierro y aluminio, la concentración mínima de inhibitoria (CMI), la capacidad para solubilizar CdCO_3 y PbCO_3 , producción de Ácido Indol Acético (AIA) y solubilización de fosfatos, evidenciando que las que las bacterias y hongos endofíticos y rizosféricos, poseen propiedades metabólicas importantes que podrían ayudar a mejorar procesos de biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Plantas medicinales y su conservación

Las plantas han sido por mucho tiempo una fuente ejemplar de medicina, existen diversas literaturas que mencionan el uso de plantas en tratamiento de diversos malestares (Grover et al., 2002). El Perú permite contar con más de 20 000 especies vegetales a razón de por sus múltiples pisos ecológicos y ecosistemas, los cuales constituyen aproximadamente un 8% del total de las existentes sobre la Tierra (Instituto Médico del Perú, 2018).

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas ancestrales de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el sostenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2010).

2.2.2. Microorganismos endofíticos y sus propiedades metabólicas

El término "endofito" es un término topográfico que abarca todo y que incluye a todos los organismos que, durante un período variable de su vida, colonizan sin síntomas los tejidos internos vivos de sus huéspedes, esta definición es lo suficientemente amplia como para incluir prácticamente cualquier organismo que reside dentro de una planta huésped (Zhang et al., 2006) , es así que, los microorganismos endofíticos se describe a los hongos y bacterias que durante todo o parte de su ciclo de vida viven sin producir deterioro en la parte interna de las células o

tejidos de plantas superiores, viven en los espacios intercelulares e intracelularmente, utilizando los nutrientes que sintetiza la planta favoreciéndose de los metabolitos bioactivos que ellos producen, actividad que promete adelantos en el área biotecnológica y en sistemas agrícolas (Wilson, 1995).

Los microorganismos endofíticos son un importante reservorio de diversidad genética y una fuente importante para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios bioactivos, es así como los endófitos son una rica fuente de productos naturales que muestran un amplio espectro de actividades biológicas y la fitoquímica de los microbios endofíticos sigue aumentando en importancia (Zhang et al., 2006).

2.2.3. Aplicaciones biotecnológicas de los endofíticos.

a. Microorganismos endofíticos en la fitorremediación

Los microorganismos endofíticos naturales o genéticamente modificadas se utilizan con éxito para los estudios de fitorremediación. Estas bacterias u hongos pueden optimizar la capacidad de una planta para resistir patógenos, metales pesados y herbívoros. Además, la mejora del crecimiento de las plantas y el suministro de nitrógeno fijo contribuyen al rendimiento de las plantas, esto ocurre debido a que las paredes celulares de hongos o bacterias pueden secuestrar cantidades sustanciales de metales, parece posible un aumento en las cargas metálicas de la biomasa cosechable aérea (Lawrence, 2014).

b. Microorganismos endofíticos como potenciadores del crecimiento vegetal.

El reino vegetal está ampliamente colonizado por microorganismos endofíticos que forman relaciones no patógenas con sus huéspedes, uno de los beneficios de esta relación es la de proteger a las plantas de las influencias bióticas y abióticas, pero también se extienden otros beneficios nutricionales de tales

asociaciones. En la actualidad encontramos evidencia empírica que indica que algunos microbios endofíticos pueden actuar como fertilizantes para las plantas mejorando la fijación de nitrógeno y la asimilación del fósforo, aumento de numerosas especies de rizobacterias endofíticas (PGPR) la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, con beneficios directos para el crecimiento y la morfología de las raíces, y son beneficiosos para muchos aspectos de las simbiosis planta-endófito (Zhang et al., 2006).

La figura 1 muestran algunos mecanismos de la relación microorganismo-hospedero, a éstos se asocian algunos ensayos para la evaluación del potencial agrícola de los microorganismos, tales como: la producción de ácido indol acético (AIA), solubilización de trifosfato de calcio, producción de sideróforos, producción de enzimas hidrolíticas, actividad ACC, actividad antagónica frente a patógenos, entre otras.

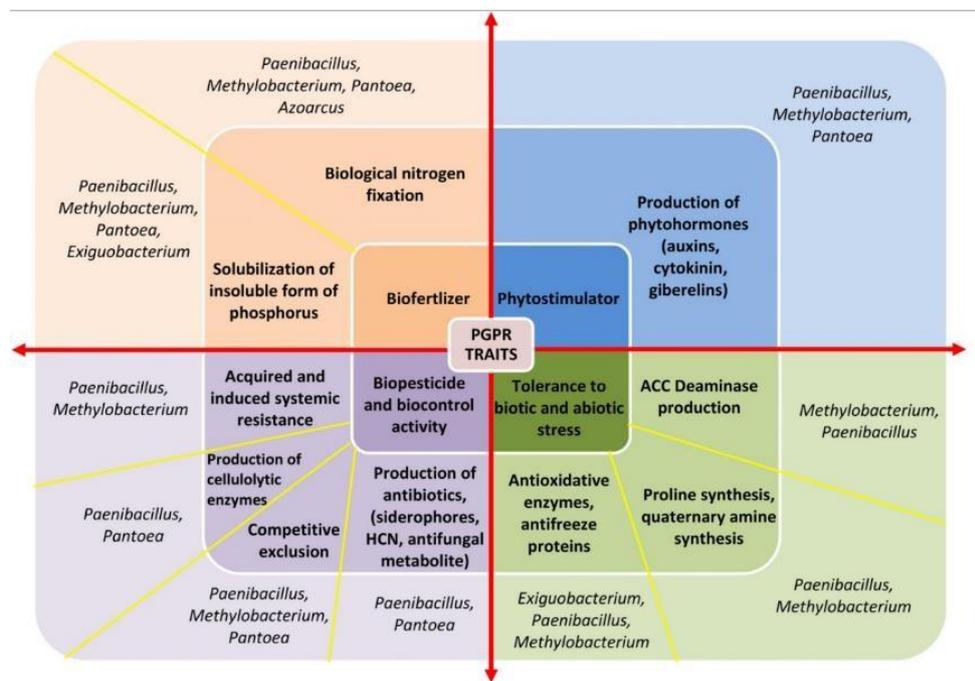


Figura 1. Capacidades de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal con fines de comercialización (Chauhan et al., 2015).

c. Microorganismos endofíticos como biocontroladores

Los microorganismos endofíticos logran producir metabolitos secundarios que le proporcionan resistencia al hospedero contra factores bióticos como enfermedades causadas por fitopatógenos, lo cual mejora la resistencia contra insectos herbívoros (Aragón & Beltran Acosta, 2018)

2.3. Definición de términos básicos

2.3.1. Ácido Índol Acético: Es la principal auxina nativa de las plantas superiores, está implicado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente en una serie de procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo y en respuestas defensiva, destacando un importante rol en la formación de la xilema y la raíz (Vega Celedón et al., 2016)

2.3.2. Antagonismo: Los microorganismos antagonistas como las bacterias, levaduras y hongos, tienen la aptitud de ejercer un efecto de biocontrol sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales a lo largo de la historia (Hernández Lauzardo et al., 2007).

- **Bacterias:** Son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. En general, son de vida libre, excepto por alguna vida intracelular obligada. Tienen los mecanismos para generar la energía y el material genético necesarios para el desarrollo y crecimiento. Las bacterias forman parte del reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo) (M. Pérez & M. Mota, 2019).
- **Conservación:** Es la acción que se realiza para prevenir el deterioro y la gestión dinámica del cambio, incluyendo todas las conductas de prolongación de la vida (Correia, 2007).
- **Endofíticos:** Son organismos no patogénicos que pueden o no colonizar los tejidos internos de la planta durante su ciclo de vida sin causar ningún síntoma o daño notorio (Díaz González, 2015).
- **Fosfatos:** El fósforo inorgánico se puede encontrar como parte de minerales de calcio, hierro y aluminio producidos por mecanismos de

precipitación, los cuales también puede liberar fósforo muy lentamente por meteorización (Beltrán Pineda, 2014).

- Hongos: Son organismos que presentan características únicas entre todos los seres vivos. Tienen capacidades que pueden usarse para dañar o beneficiar a los organismos vivos y a los ecosistemas. Evolucionaron con el desarrollo del ser humano y actualmente se utilizan en diversos campos como alimento, elementos transformadores de los mismos y tratamiento de enfermedades (Cuevas Moreno, 2016).
- Línea base: Es una investigación aplicada que tiene como objetivo describir la situación inicial de la población objetivo del proyecto, así como del contexto relevante, para que esta información pueda ser comparada con posteriormente y así evaluar objetivamente la magnitud de los cambios logrados por el proyecto como resultado de la implementación de un proyecto (Medianero Burga, 2014).
- Microorganismos: Los microorganismos son la primera y más vieja comunidad que existe en la Tierra, se asentaron en todos los ambientes: agua, tierra y aire, y están en interacción permanente con los seres humanos, los animales y las plantas (Montaño Arias et al., 2010).
- Plantas medicinales: La medicina herbaria se basa en utilizar las plantas medicinales a modo de substitutas a las drogas químicas o en conjunto. Sus extractos vegetales se utilizan en diversas formas de preparación con el objetivo de aumentar la salud (Gallegos Zurita, 2016).
- Sideróforos: Esta es una estrategia desarrollada por microorganismos donde actúan como solubilizadores de hierro en compuestos minerales u orgánicos a bajo peso molecular del hierro (Rajkumar et al., 2010).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de Investigación

- Según el manejo de información: Descriptiva, porque abarca la descripción, registro, análisis e interpretación de la naturaleza actual, así como la comprensión de procesos y fenómenos de la realidad estudiada
- Según el enfoque: Mixto, porque esta investigación recolectará, analizará y vinculará datos cuantitativo y cualitativo.
- Según la temporalidad: Transversal, porque esta investigación comparará diferentes grupos de población en un solo punto en el tiempo.
- Según su orientación: Básica orientada, porque esta investigación busca incrementar el conocimiento sobre los microorganismos endofíticos.

3.2. Diseño de Investigación

El trabajo tiene componentes experimentales como descriptivos.



- a) Experimentales: Para la evaluación de las actividades de promoción de crecimiento vegetal y la evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes se empleó ensayos *in vitro* con varias réplicas y su respectivo grupo control. Estos ensayos implicaron pruebas de coloración, formación de halo y tamaño de colonia. Las pruebas son semi-cuantificables y cuantificables.

Para ambos casos se usó el diseño con dos grupos “después”, donde se hace la toma de datos después del estímulo, desconociéndose la situación de “antes” del grupo experimental y testigo.

	Antes	Después
Grupo experimental	X	X'
Grupo testigo	Z	Z'

En este sentido, el diseño es el siguiente:

Variable independiente A (Cepa endofítica)	Variable dependiente B (Efecto)			
	Brep1	Brep2	...	BrepN
A1				
...				
Testigo				

Tabla 1. Diseño experimental de la investigación

- b) Descriptivos: Aislamiento de microorganismos endófitos se identificaron taxonómica molecular

Para aislar microorganismos endófitos de las plantas medicinales cada planta se seccionó en 10 - 20 piezas dependiendo de la planta y su hábito (tipo de hojas, tallos, raíces; postrado, arbusto, etc.) cada pieza funciona como sub-muestra, se siembra en medios selectivos y luego se observa la presencia o ausencia de microorganismo endofítico en cada una.

Para la identificación molecular se realizó 01 muestra con 02 lecturas (forward y reverse), con análisis estadísticos propios de los programas bioinformáticos

En ambos casos se hará el diseño será de una sola casilla, que nos permitirá resolver problemas de identificación (codificación en caso de presencia) o identificación taxonómica (cepas seleccionadas) y se realiza por cada sub-muestra o cepa.

3.3. Métodos o técnicas

3.3.1. Diagrama general del trabajo

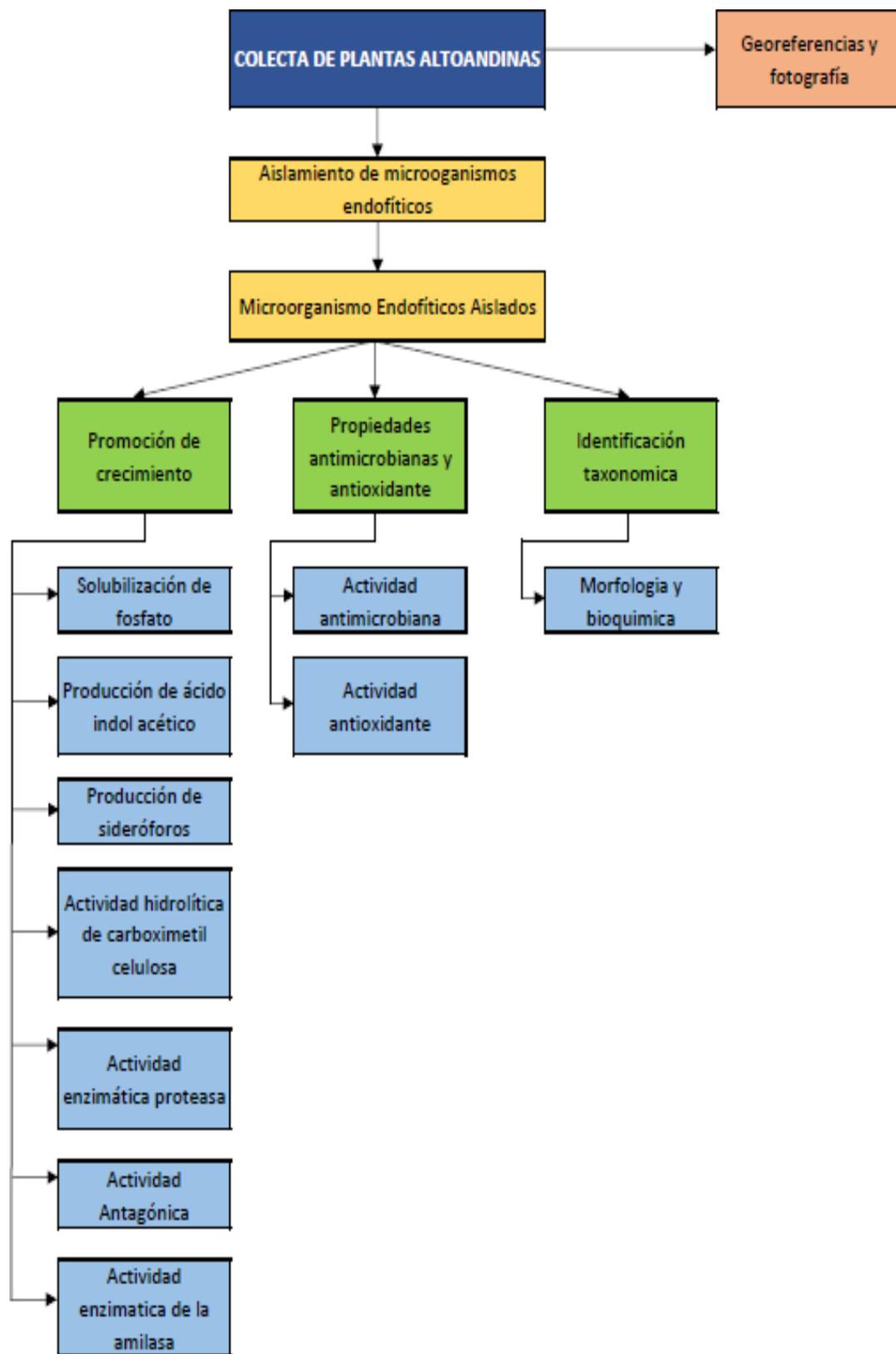


Figura 2. Diagrama general del trabajo

3.3.2. Material vegetal

Las muestras enteras o parte aérea se recolectaron en la quebrada Quilcayhuanca y en la Punta Olímpica (Parque Nacional Huascarán, Ancash), en las coordenadas mostradas en la tabla 2.

<i>Especie</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Altura msnm</i>
<i>Buddleja incana, punto 1</i>	9° 29.515'S	77° 24.504'O	3866
<i>Buddleja incana, punto 2</i>	9° 29.493'S	77° 24.480'O	3853
<i>Werneria nubigena</i>	9° 29.568'S	77° 24.500'O	3854
<i>Senecio calvus</i>	9° 7'43.48"	77°31'1.20"	4845
<i>Xenophyllum dactylophylla, punto 1</i>	9° 7'44.43"	77°31'1.16"	4858
<i>Xenophyllum dactylophylla, punto 2</i>	9° 7'47.32"	77°30'52.07"	4875
<i>Loricaria ferruginea</i>	9° 7'43.11"	77°31'1.67"	4842
<i>Perezia coerulescens</i>	9° 7'43.27"	77°30'59.22"	4814

Tabla 2. Colecta de muestras vegetales

Las zonas de corte fueron desinfectadas con alcohol 70° y selladas con parafilm. Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel estéril directamente al laboratorio y se mantuvieron a 4 °C durante 24h máximo para proceder con el aislamiento de sus microorganismos endofíticos.

3.3.3. Aislamiento de microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca

a. Limpieza, selección y desinfección:

Para esta primera parte se procedió según Olivera Gonzales et al. (2017) con algunas modificaciones. Las plantas recolectadas se

lavaron con agua corriente para eliminar las hojas secas y suelo. Las hojas, tallos cortos y raíces de especímenes limpios se separaron y cortaron aproximadamente a 2 cm de longitud. Luego se lavaron con solución jabonosa al 20% por 20 minutos con agitación constante y se enjuagó con agua de caño 3 veces por 3 minutos, repetimos este lavado 3 veces. Inmediatamente después del lavado, los fragmentos fueron desinfectados sumergiéndolos en alcohol de 70° por 30 segundos y se volvió a lavar con agua estéril, se procedió a una segunda desinfección, la cual fue bajo condiciones de esterilidad usando HgCl₂ (0.1% p/v) por 10 minutos, para luego ser lavados 3 veces con agua estéril.

A fin de comprobar la desinfección adecuada y descartar los falsos positivos de microorganismos endofíticos, los fragmentos de las plantas fueron sumergidas en 3 ml de Caldo Saborand por 60 segundos.

b. Siembra:

Para esta segunda parte se procedió según Ulloa Muñoz et al. (2020), los fragmentos desinfectados se colocaron en placas Petri estériles con papel absorbente para ser cortados diagonalmente por la mitad a fin de exponer la parte interna de los tejidos vegetales, una parte fue usada para aislar hongos y otro para aislar bacterias.

Para la siembra de hongos, por cada fragmento se usó 3 ml de Agar Sabourand (AS) suplementado con los antibióticos Estreptomycin al 50 µl/ml y Tetraciclina al 50 µl/m; y para la siembra de bacterias por cada fragmento se usó 3 ml de Trypticase de Soya Agar (TSA) suplementado con Fluconazol.

Los fragmentos sembrados en AS, TSA Y CS (en donde fue sumergido los fragmentos) se incubaron por 15 días a 25 °C.

c. Aislamiento:

Para esta tercera parte se procedió según Ulloa Muñoz et al. (2020), una vez que terminó el periodo de incubación, las cepas que crecieron fueron seleccionadas. Estas cepas fueron purificadas mediante siembras continuas en Agar Sabouraud para el caso de hongos y Trypticase de Soya Agar para bacterias.

Finalmente fueron sembradas en tubos inclinados en medio nutritivos e incubadas a 25 °C durante 5 a 7 días para hongos y 24 horas para bacterias, después de este proceso fueron almacenados a 4 °C para continuar con la evaluación en diferentes pruebas.

3.3.4. Actividad promotora de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados

3.3.4.1. Evaluación de la actividad de solubilización de fosfato de calcio

La evaluación cualitativa se realizó siguiendo la metodología propuesta por Shekhar Nautiyal (1999) con las modificaciones de Ulloa Muñoz et al. (2020).

a. En hongos:

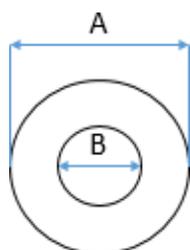
La evaluación de la solubilización con hongos se usó el medio NBRIP suplementado con Triton X-100 al 0.1%. Se sembró 5 mm aproximadamente de micelio del hongo, la prueba se realizó en placa cuadrada y por duplicado. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 25 °C durante 72 horas.

b. En bacterias:

Para el caso de bacterias, se usó el medio NBRIP sin suplementación. Se preparó inóculos jóvenes con 0.08 de densidad óptica a 620 nm, se sembró 2 µl del inóculo sobre discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro, en placas

cuadradas y se incubaron a 25 °C durante 48 horas hasta la aparición de halos alrededor de la colonia.

La capacidad de solubilizar fosfato se determinó por el diámetro de formación del halo transparente alrededor y debajo de la colonia de acuerdo con la siguiente fórmula:



$$IPS = A/B \text{ (Kumar \& Narula, 1999)}$$

Dónde:

A: Diámetro del halo de solubilización + diámetro de la colonia

B: Diámetro de la colonia

Figura 3. Cálculo del índice de solubilización de fosfato.

3.3.4.2. Producción de ácido índol acético (AIA)

La evaluación de esta prueba se realizó siguiendo el método aplicado por Ulloa Muñoz et al. (2020).

a. En hongos:

Se inocularon micelio de hongo fresco en 4 ml de 1/7 Caldo de papa dextrosa (PDB) suplementado con 2 mg/ml de L-triptófano y se incubaron durante 7 días a 30 °C. Después de la incubación se extrajo 1 ml de caldo en un microtubo y se centrifugó por 2 minutos a 1300 rpm, después se separó 100 µl del sobrenadante y se mezcló en 100 µl de reactivo Salkowski (10 ml 35% HClO₄ + 200 µl 1% FeCl₃) en una microplaca, finalmente se dejó incubar por 20 minutos.

b. En bacterias:

Las colonias fueron sembradas en tubos de ensayo conteniendo 4 ml de TSB suplementado con 2 mg/ml de L-Triptófano, incubadas a 24 °C durante 48 horas. Las células

bacterianas se separaron del sobrenadante por centrifugación a 1300 rpm durante 2 minutos, la mezcla se realizó en microplacas, 100 µl del sobrenadante con 100 µl de reactivo Salkowsky, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.

Para ambos casos se midieron la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro.

La concentración de AIA en cada muestra se determinó a partir de la curva estándar de AIA (medio de 7 valores). Los patrones que comprenden concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 µg/ml; puesto que dentro ese rango se encuentra los valores promedios de producción AIA.

3.3.4.3. Producción de sideróforos

Esta prueba se realizó de acuerdo con el método aplicado por Ulloa Muñoz (2016), con algunas modificaciones. La solución reveladora CAS indica la producción de este metabolito mediante un cambio de coloración en el medio, de azul a naranja.

a. En hongos:

En una misma placa se usaron dos medios de cultivo, el Agar CAS (Solución reveladora) y Papa Dextrosa Agar (PDA) el cual fue el medio nutritivo, se sembró en medio de la placa un disco micelial, esta prueba se realizó dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C por 10 días.

b. En bacterias:

Para este caso, se usaron dos medios de cultivo, el Agar CAS (Solución reveladora) y TSA (medio nutritivo), se preparó inóculos jóvenes con 0.08 de densidad óptica a 620 nm, se

sembró en medio de la placa 2 μ l del inóculo sobre discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C por 48 horas.

3.3.4.4. Actividad hidrolítica de carboximetil celulosa

Esta prueba se realizó de acuerdo con el método aplicado por Ulloa Muñoz (2016), con algunas modificaciones. La capacidad de los microorganismos aislados de hidrolizar celulosa fue evaluada en placas con medio de cultivo modificado.

a. En hongos:

Se usó medio de cultivo de PDA (50% papa, 50% H₂O, 0.5% glucosa, 1.5% Agar Agar) modificado con 0.25% de carboximetilcelulosa (CMC). Se extrajeron micelio de hongos sembrados en AS y se inocularon sobre el medio CMC con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 10 días.

El revelado de los halos se hizo agregando una solución de Rojo Congo al 0.1% en rotación orbital a 120 rpm por 10 minutos y se lavó con NaCl por 10 minutos, este revelado se realizó 3 veces por placa.

b. En bacterias:

Para esta prueba se usó placas con medio de cultivo TSA modificado con 0.25% de carboximetilcelulosa (CMC). Se preparó inóculos jóvenes con 0.08 de densidad óptica a 620 nm, se sembró 2 μ l del inóculo sobre discos de papel

filtro estéril de 6 mm de diámetro, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 horas.

El revelado de los halos se hizo agregando una solución de Rojo Congo al 0.1% en rotación orbital a 120 rpm por 10 minutos y se lavó con NaCl por 10 minutos, este revelado se realizó 3 veces por placa.

La capacidad de degradar la celulosa de las cepas se demuestra a base de la formación de los halos de degradación de estos compuestos en medio de cultivo sólido. La actividad de cada sustrato se expresó como el diámetro del halo de degradación siguiendo la siguiente fórmula: *Índice Ac. Celulolítica* = A/B , donde: A: Diámetro del halo de degradación + diámetro de la colonia y B: Diámetro de la colonia.

3.3.4.5. Actividad enzimática proteasa

Esta prueba se realizó de acuerdo con el método aplicado por Ulloa Muñoz (2016) y Hamza Fouda et al. (2015) con algunas modificaciones. La capacidad de los microorganismos aislados de sintetizar la proteasa fue evaluada en placas con medio de cultivo modificado.

a. En hongos:

Se usó medio de cultivo de AS suplementado con 1% de gelatina y 0.01% de tritón. Se extrajeron micelio de hongos sembrados en AS y se inocularon sobre el medio modificado, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días.

b. En bacterias:

Para esta prueba se usó placas con medio de cultivo TSA modificado con 1% de gelatina. Se preparó inóculos jóvenes con 0.08 de densidad óptica a 620 nm, se sembró 2 μ l del inóculo sobre discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 horas.

La capacidad de degradar la proteína de las cepas se demuestra a base de la formación de los halos de degradación de estos compuestos en medio de cultivo sólido, para ello se realiza el revelado agregando una solución de Cloruro acido de Mercurio (1.5 g $HgCl_2$ + 2 ml HCl_c + 10 ml H_2O). La actividad de cada sustrato se expresó como el diámetro del halo de degradación siguiendo la siguiente fórmula: *Índice Ac. Proteasa* = A/B , donde: A: Diámetro del halo de degradación + diámetro de la colonia y B: Diámetro de la colonia

3.3.4.6. Actividad antagónica de las cepas de microorganismos frente a Hongos patógenos.

a. Antagonismo: Bacterias endofíticas – Hongos patógenos

Esta prueba se realizó de acuerdo con el método aplicado por Anith et al. (2021) con algunas modificaciones.

Se usó inóculos frescos de los hongos patógenos sembrados en medio de cultivo PDA y cultivo joven bacteriano en TSA, luego se prepararon inóculos de 0.08 de densidad óptica a 620 nm en agua destilada. El inóculo fue sembrado en forma de más (+) en placas de PDA y se dejó incubando a 25 °C. Después de las 24 horas de incubación se sembró solo un disco de micelios de hongos patógenos en cada cuarto de la placa de forma equidistante de dos brazos de la placa con forma de “más”. Se prepararon placas

de control que contenían los hongos patógenos en el mismo orden, pero sin ninguna inoculación bacteriana.

Para la determinación del índice de antagonismo se procedió con la medición del diámetro de crecimiento del hongo patógeno sin la presencia de la bacteria endofítica, antagonista y con la interacción de la bacteria endofítica.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición:

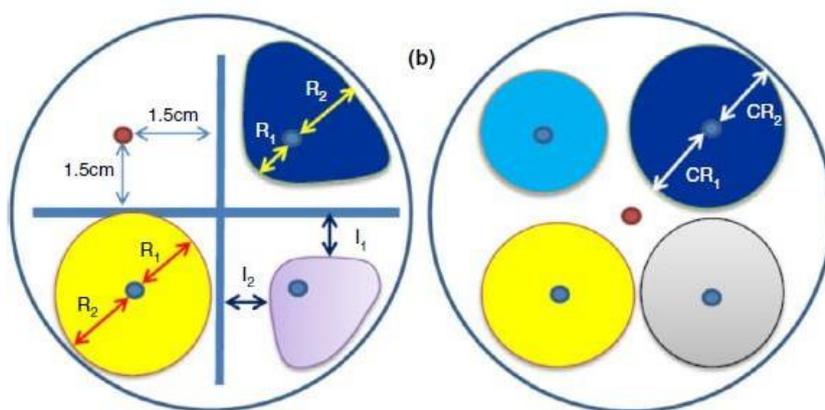


Figura 4. Cálculo del Índice de inhibición

$$\%Inh.Halo = [(CR-R)/CR]*100$$

Dónde:

CR: El promedio de CR1 Y CR2, que son los radios de la colonia de hongos en placas de control

R: El promedio de R1 Y R2, que son los radios de las colonias fúngicas en las placas de ensayo.

Para esta investigación se dio como bacteria endofítica inhibidora aquella que tenía un % inh.halo =<50%.

3.3.4.7. Actividad enzimática de la amilasa.

La capacidad de los microorganismos aislados de sintetizar la amilasa fue evaluada en placas con medio de cultivo modificado.

a. En hongos:

Se usó medio de cultivo de AS suplementado con 0.1% de almidón y 0.01% tritón. Se extrajeron micelio de hongos sembrados en AS y se inocularon sobre el medio modificado, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días.

b. En bacterias:

Para esta prueba se usó placas con medio de cultivo TSA modificado con 0.1% de almidón. Se preparó inóculos jóvenes y se sembró 2 µl, esta prueba se realizó con dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 horas.

La capacidad de sintetizar la amilasa de las cepas se demuestra a base de la formación de los halos de degradación de estos compuestos en medio de cultivo sólido, para ello se realiza el revelado agregando una solución de Lugol. La actividad de cada sustrato se expresó como el diámetro del halo de degradación siguiendo la siguiente fórmula: *Índice Ac. Amilasa = A/B*, donde: A: Diámetro del halo de degradación + diámetro de la colonia y B: Diámetro de la colonia.

3.3.5. Propiedades antimicrobiana y antioxidante de los microorganismos aislados

3.3.5.1. Actividad antimicrobiana

Se utilizó microbios estandarizados de patógenos humanos comunes mediante las técnicas de difusión y dilución de Tamariz Angeles et al. (2018).

Para esta prueba, se usaron micelios sembrados en agar extracto de Malta (MEA), agar Czapek autolisado de levadura (CYA), agar extracto de levadura sacarosa (YES), agar Sabouraud (AS) y en agar papa dextrosa (PDA); en placas cuadradas con contenido de Muller and Hinton Agar se expandió dos veces las bacterias estandarizadas patógenas humanas e inmediatamente se colocaron los micelios recién cortados.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 35 °C, la actividad antimicrobiana se midió de acuerdo con los halos de inhibición.

3.3.5.2. Actividad antioxidante

Se usó las técnicas de microdilución de DPPH descrita por Tamariz Angeles et al. (2018) y modificaciones.

a. En hongos:

Para esta prueba, se usaron micelios sembrados en agar extracto de Malta (MEA), agar Czapek autolisado de levadura (CYA), agar extracto de levadura sacarosa (YES), agar Sabouraud (AS) y en agar papa dextrosa (PDA), los cuales fueron maceraron en microtubos con metanol de 25 a 2000 µg/ml en oscuridad a temperatura ambiente. Después de la incubación se centrifugó por 2 minutos a 1300 rpm, para luego separar 100 µl del sobrenadante en una microplaca y se agregó inmediatamente 10 µl de DPPH fresco (10 mg/l disuelto en MeOH) sobre el sobrenadante, en otros pocillos de la microplaca se agregó 10 µl de MeOH.

b. En bacteria:

Para esta prueba, se usaron inóculos en TSB incubados a 25 °C, después de la incubación se centrifugó por 2 minutos a 1300 rpm, para luego separar 100 µl del sobrenadante en una microplaca y agregar inmediatamente 10 µl de DPPH fresco (10 mg/l disuelto en MeOH) sobre el sobrenadante, en otros pocillos de la microplaca agregar 10 µl de MeOH.

Para esta investigación, tanto para hongos como para bacterias, utilizamos el ácido ascórbico como estándar.

Las microplacas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 30 minutos y se midieron la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro, se realizó dos mediciones.

La actividad antioxidante de cada cepa se determinó a partir de la curva estándar de DPPH, el cual se calculó a partir del porcentaje de inhibición versus la concentración del extracto.

3.3.6. Identificación taxonómica de las cepas estudiadas

3.3.6.1 Caracterización bioquímica de bacterias

La caracterización bioquímica incluye: actividad de gelatinasa, producción de lisina-hierro, glucosa, citrato, y metabolismo de la urea. Cada ensayo se realizó siguiendo los protocolos estándar de Ulloa Muñoz (2016).

3.3.6.2 Identificación molecular y morfología de Hongos

- a. La identificación taxonómica de los hongos se realizó analizando su ADNr.

Para la identificación taxonómica, se analizó el ITS1/ITS4 para hongos según protocolos del fabricante, la

extracción de los ADN se emplearon pallets producto de la centrifugación a 13400 RPM por 2 minutos de los cultivos de 7 días. El secuenciamiento de productos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de ADN se realizó en Macrogen Korea. Finalmente, se utilizó programas informáticos para la edición y ensamblaje.

b. Identificación morfológica

Se cultivó en placas de agar extracto de Malta (MEA), agar Czapek autolisado de levadura (CYA) y agar extracto de levadura sacarosa (YES), tres micelios de las cepas de hongo endofíticos estudiados en esta investigación. Todas las placas fueron conservadas a 25 °C durante 5 días y 7 días.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población:

Los microorganismos endofíticos de las plantas medicinales nativas que habitan en la cordillera Blanca.

3.4.2. Muestra:

Los microorganismos endofíticos de dos especies de plantas medicinales nativas colectadas en la quebrada Quilcayhuanca y tres especies de plantas medicinales nativas colectadas en la Punta Olímpica.

Asimismo, los microorganismos endofíticos del banco del Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash (CIByRGA) pertenecientes a una planta medicinal nativa colectada en la quebrada de Llanganuco y dos plantas medicinales nativas colectadas de Pitec.

3.5. Instrumentos validados de recolección de datos

No hay normas estandarizadas para la recopilación de información dado que este trabajo es experimental en que se recogerán datos de los ensayos aplicados, mas no contiene encuestas que si requieren ser validados.

La información fue recopilada en cuadros en Excel, fotografías, documentos y archivos en programas bioinformáticos.

Los instrumentos de recolección de datos se señalan en la tabla 3.

Evaluaciones	Equipos	Materiales
Recolección de plantas medicinales	<ul style="list-style-type: none"> • GPS • Cámara fotográfica 	<ul style="list-style-type: none"> • Fichas de campo • Alcohol 70° • Parafilm • Bolsa de papel
Aislamiento de microorganismos endofíticos	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara fotográfica 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol 70° • Solución jabonosa • Agua para lavado • Agua estéril • Viales • Placas petri • Papel absorbente • Medio de cultivo (TSA, caldo y agar Saboraud)

Actividad promotora de crecimiento vegetal

- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro
- Centrifuga

- Placas petri
- Microtubo
- Microplaca
- Placas cuadradas
- Reactivo Salkowski
- Solución reveladora CAS
- Solución de NaCl
- Rojo Congo
- Tritón al 1%
- Lugol
- Medio de cultivo (NBRIP, PDA, PDB, TSB, TSA, CMC, AS, agar Gelatina)

Actividad antimicrobiana y antioxidante

- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro
- Centrifuga

- Microtubos
 - Placas petri
 - Placas cuadradas
 - DPPH
 - MeOH
 - Medio de cultivo (MEA, CYA, YES, AS, PDA, Agar Muller and Hilton y TSB)
-

Identificación taxonómica		<ul style="list-style-type: none"> • Placas petri
	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara fotográfica 	<ul style="list-style-type: none"> • Placas cuadradas
	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotómetro 	<ul style="list-style-type: none"> • Medio de cultivo (Agar gelatina, agar LIA, caldo glucosa, agar citrato y caldo urea, MEA, CYA, YES)
	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuga 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Termociclador 	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de ADN

Tabla 3. Instrumentos de recolección de datos

3.6. Plan de procesamiento y análisis estadístico de la información

Se aplicó el análisis de varianza ANOVA a un solo factor, de clasificación unidireccional con efectos paramétricos, además se realizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey ($\rho = 0,05$), los tratamientos y repeticiones dependen del tipo de prueba realizadas.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca

En total se obtuvieron 49 microorganismos entre hongos y bacterias provenientes de los tejidos de las plantas *Werneria nubigena*, *Buddleja incana*, *Xenophyllum dactylophylla*, *Perezia coerulescens*, *Loricaria ferruginea* y *Senecio calvus*.

En el siguiente cuadro se presenta el resumen de los microorganismos encontrados por muestra.

Microorganismos	Números de cepas aisladas					
	<i>Werneria nubigena</i>	<i>Buddleja incana</i>	<i>Xenophyllum dactylophylla</i>	<i>Perezia coerulescens</i>	<i>Loricaria ferruginea</i>	<i>Senecio Calvus</i>
Hongos	7	2	2	2	1	0
Bacterias	10	-	4	12	0	9
Total	17	2	6	14	1	9

Tabla 4. Número de cepas aisladas por planta

Asimismo, 8 hongos del banco CIByRGA, aislados del *Senecio calvus* (1), recolectado de la quebrada de Llanganuco, *Oreocallis grandiflora* (6) y *Valeriana Pycnantha* (1), recolectados de Pitec, ambos puntos dentro de la Cordillera Blanca.

Resumen de las cepas aisladas:

- Hongos endofíticos aisladas:

POBLACIÓN	MUESTRA	CEPAS AISLADAS	
QUILCAYHUANCA	<i>Werneria nubigena</i>	HW40	
		HW47	
		HW48T	
		HW49	
		HW51a	
		HW51b	
		HW53T	
		HBi12H	
PUNTA OLIMPICA	<i>Buddleja incana</i>	HBi21T	
		<i>Xenophyllum</i>	2H
		<i>dactylophylla</i>	4H
		<i>Perezia coerulescens</i>	22H
		<i>Loricaria ferruginea</i>	39H
		84H	

Tabla 5. Hongos endofíticos aislados

- Bacterias endofíticas aisladas:

POBLACIÓN	MUESTRA	CEPAS AISLADAS
QUILCAYHUANCA	<i>Werneria nubigena</i>	BW36H
		BW40T

	BW41T
	BW47T
	BW49Ta
	BW49Tb
	BW50T
	BW51T
	BW52T
	BW53T
	2B
<i>Xenophyllum</i>	3B
<i>dactylophylla</i>	5B
	16B
	22B
	24B
	26B
PUNTA OLIMPICA	27B
	29B
<i>Perezia coeruleascens</i>	30B
	36B
	37B
	38B
	39B
	40B
	81B
	41B
	42B
	43B
	44B
<i>Senecio calvus</i>	45B
	46B
	51B
	53B
	54B

Tabla 6. Bacterias endofíticas aisladas

- Hongos endofíticos del banco CIByRGA:

POBLACIÓN	MUESTRA	CEPAS DEL BANCO
LLANGANUCO	<i>Senecio calvus</i>	HE13
		HE14
		HE17
		HE22
PITEC	<i>Oreocallis grandiflora</i>	HE23
		HE25
		HE28
		HE24
	<i>Valeriana pycnantha</i>	HE24

Tabla 7. Hongos endofíticos del banco CIByRGA

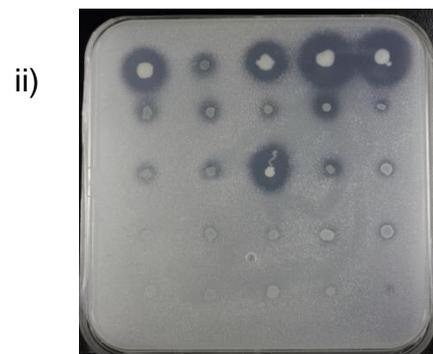
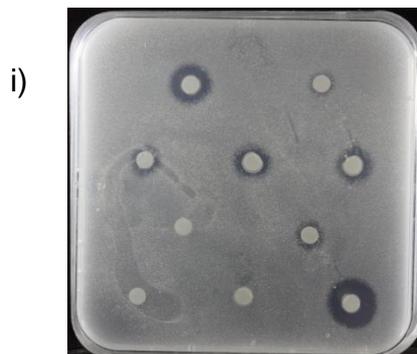
4.2. Actividad promotora de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados

4.2.1. Evaluación de la actividad de solubilización de fosfato de calcio:

a. En hongos:

Las pruebas realizadas con hongos aislados resultaron negativas, no habiendo ninguna cepa con capacidad de solubilizar fosfato de calcio.

b. En bacterias:



iii)



Figura 5. Corresponde a la formación del halo por las cepas de *Werneria nubigena*(i); *Xenophyllum dactylophylla*, *Perezia coerulescens* y *Senecio Calvus*

De las 35 cepas de bacterias endofíticas aisladas, 23 cepas que fueron capaces de solubilizar el fosfato de calcio in vitro, como se puede apreciar en la figura 6, el IPS de las cepas tiene valores entre 1.38 a 3.60 y siendo la cepa BW47T quien presenta el mínimo IPS y la cepa 24B quien presenta el máximo IPS.

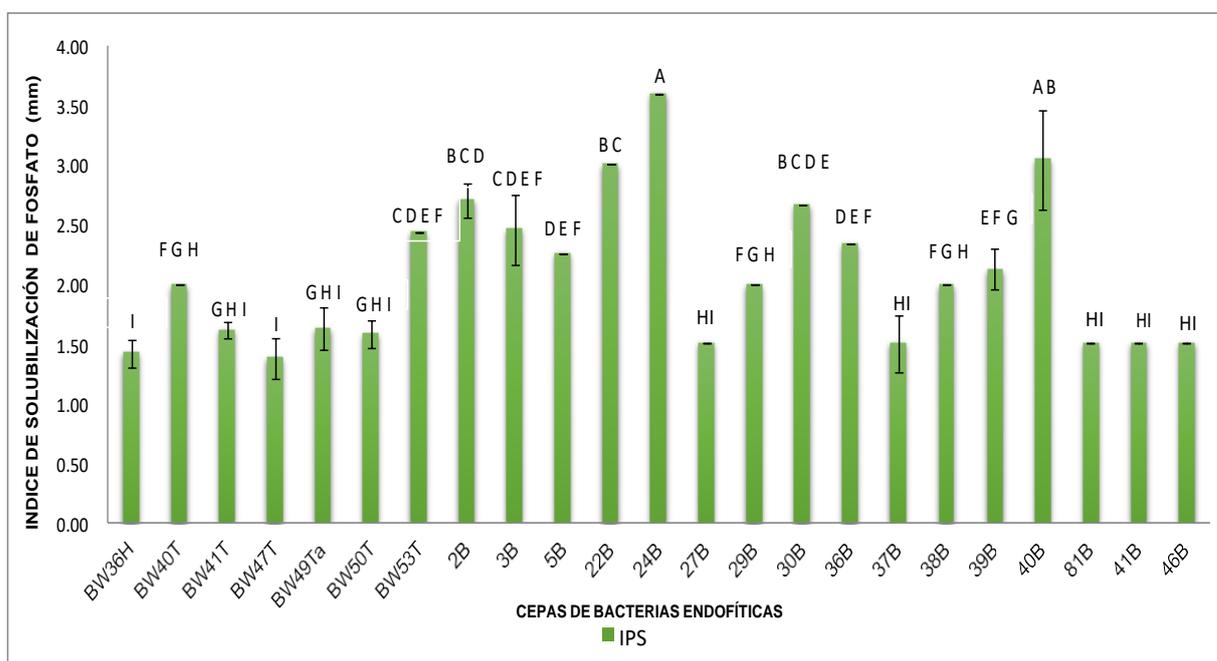


Figura 6. Índice de solubilización de fosfato de bacterias endofíticas

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que

encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tunkey, $p < 0.05$).

4.2.2. Producción de ácido índol acético (AIA)

a. En hongos:

De los 22 hongos endofíticos aislados, 15 cepas producen AIA en un rango de 6.3 a 763.8 $\mu\text{g/ml}$, como se puede apreciar en la figura 7, siendo la cepa 4H el hongo endofítico que tiene mayor producción de AIA, seguida de HBi12H y HBi21T con una producción de 668.6 y 584.8 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, y la HE24 el hongo que tiene menor producción de AIA.

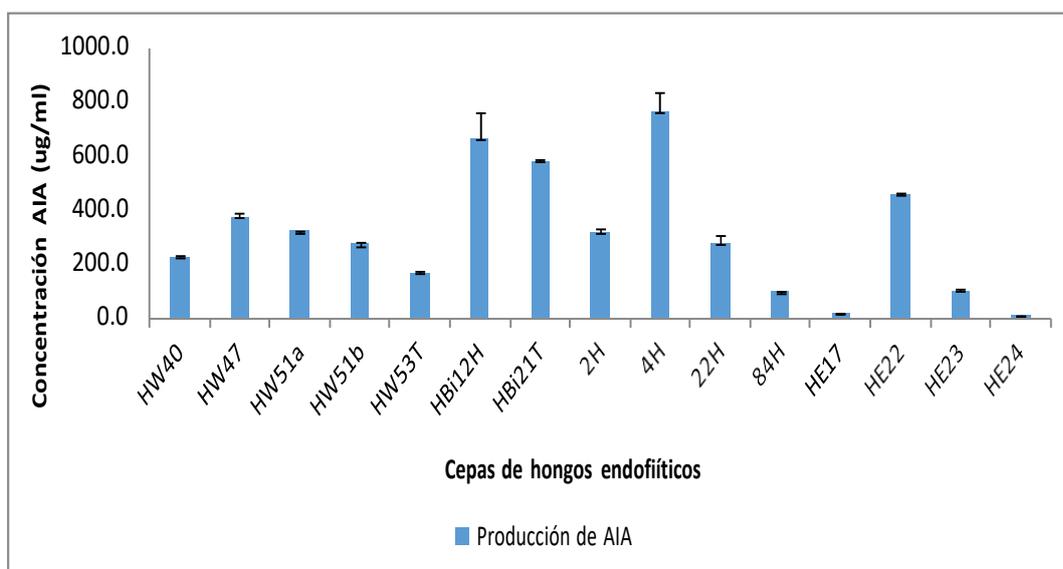


Figura 7. Concentración AIA producidos por hongos endofíticos (los valores

b. En bacterias:

Se realizó la prueba inicial para la selección de las cepas, teniendo como resultados que ninguna de las cepas cambie de color a púrpura que es señal de AIA, concluyendo así que las bacterias endofíticas aisladas en esta investigación no producen AIA.

4.2.3. Producción de sideróforos

a. En hongos:

Después de realizar las pruebas a las 22 cepas endofíticas aisladas, se determinó que 9 cepas tienen la capacidad de producir sideróforos, como podemos apreciar en la figura 8, el rango de producción de sideróforos va de 2.33 a 3.50 mm, siendo la cepa HW51a, la que presenta mayor índice de producción (3.50 mm) y la HE14 es la que tiene menor producción de sideróforos (2.33 mm).

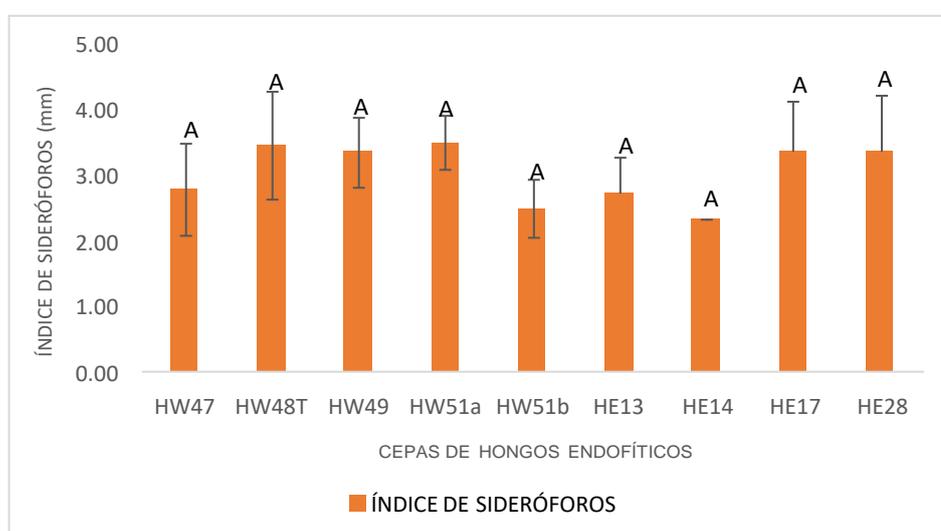


Figura 8. Índice de producción de Sideróforos de hongos endofíticos

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que no encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

b. En bacterias:

De las 35 bacterias endofíticas aisladas, se determinó que 22 cepas tienen la capacidad de producir sideróforos, como se aprecia en la figura 9, el rango de producción de sideróforos va de 1.25 a 12.50 mm, siendo la cepa 30B quien produce mayor índice (12.50 mm) y la cepa 24B con menor producción (1.25 mm).

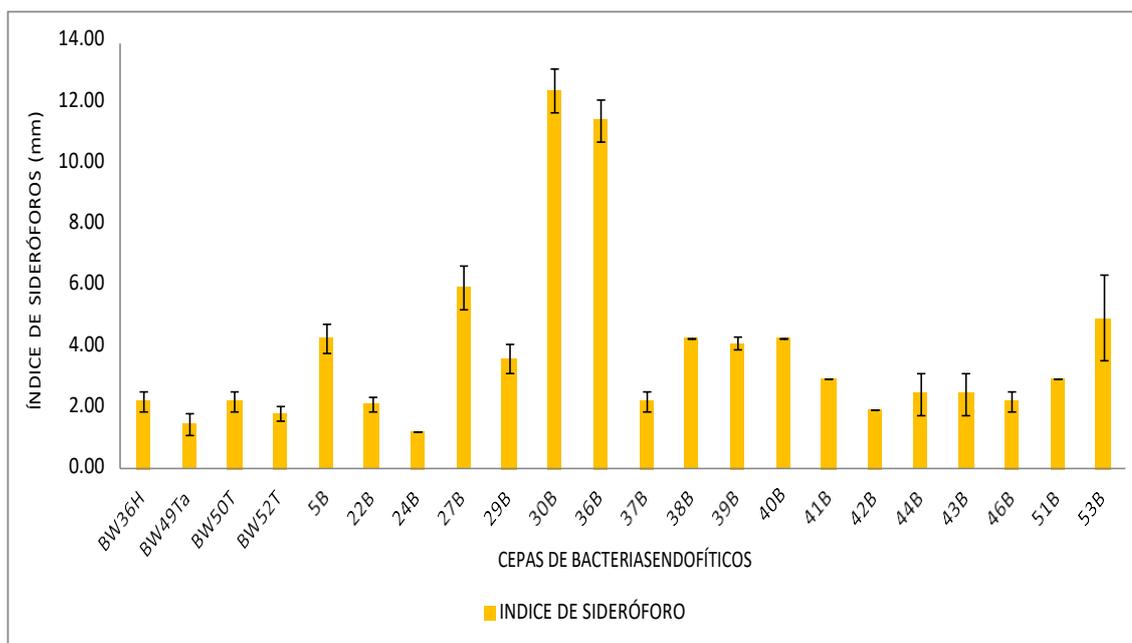


Figura 9. Índice de producción de Sideróforos de bacterias endofíticas

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que no encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tunkey, $p < 0.05$).

4.2.4. Actividad hidrolítica de Carboximetil Celulosa

a. En hongos:

De las 22 cepas de hongos endofíticos aislados, se determinó que 14 cepas tienen la capacidad para degradar CMC, como se puede apreciar en la figura 10, los resultados tienen un rango de 1.14 a 10.42 mm, siendo la cepa 39H quien presenta mayor índice de actividad celulolítica (10.42 mm) y la cepa 22H quien presenta el menor índice (1.14 mm).



Figura 10. Índice de actividad de celulolítica de hongos endofíticos

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que no encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tunkey, $p < 0$).

b. Bacteria

Las pruebas realizadas con cepas aisladas de bacterias endofíticas resultaron negativas, no se encontró ninguna cepa con la capacidad de degradar CMC.

4.2.5. Actividad enzimática proteasa

a. En hongos:

Después de realizar las pruebas a las 22 cepas, se determinó que solo un hongo endofítico aislado tiene actividad, como se muestra en la figura 11, la cepa HBi12H tiene un índice de actividad de 1.35 mm.



Figura 11. Índice de actividad de proteasa

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar.

b. En bacterias:

Las pruebas realizadas con cepas aisladas de bacterias endofíticas resultaron negativas, no se encontró ninguna cepa con la actividad enzimática de proteasa.

4.2.6. Actividad antagónica de las cepas bacterianas de microorganismos frente a Hongos patógenos.

a. Antagonismo: Bacterias endofíticas – Hongos patógenos

Los hongos patógenos pertenecen al banco de microorganismos del CIByRGA, los cuales pertenecen a la familia de los *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora infestans* y *Aspergillus oryzae*.

Hongos patógenos:

1. *Fusarium sp* (FG)
2. *Fusarium sp* (FH)
3. *Fusarium sp* (T3)
4. *Fusarium oxysporium* (CTLM12)

5. *Geotrichum candidum* (P1)
6. *Alternaria* sp (T2)
7. *Aspergillus niger*

En la figura 12, se aprecia el crecimiento que tuvieron los hongos patógenos sin presencia de la bacteria endofítica antagónica.

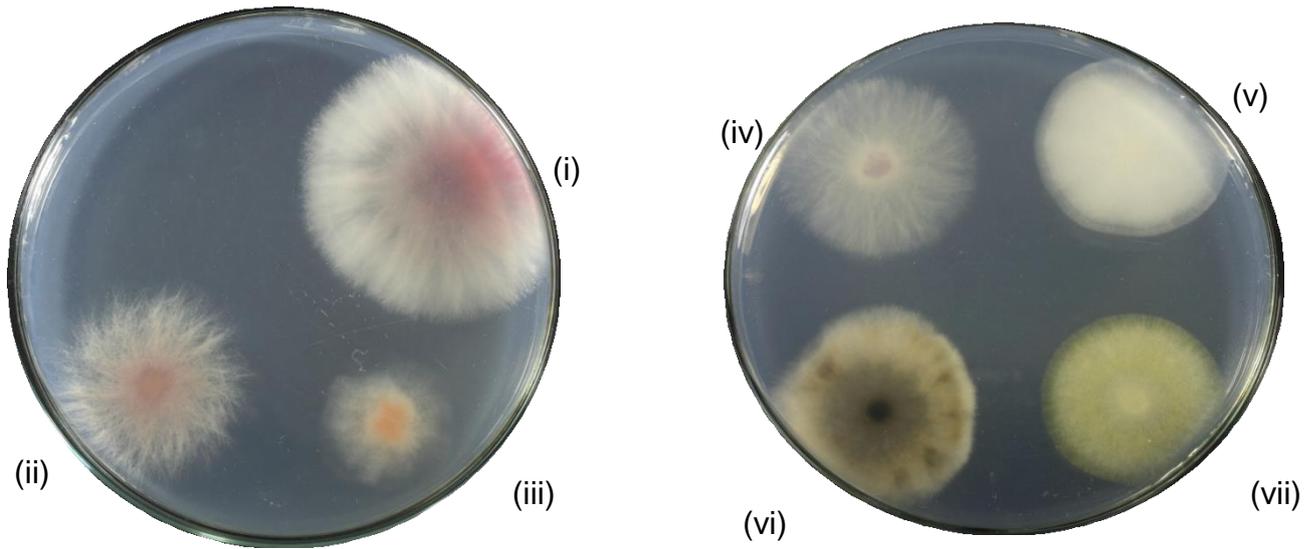


Figura 12. Placas control de hongos patógenos. (i)FG (ii)FH (iii)T3 (iv)CTLM12 (v)P1 (vi)T2 (vii)*Aspergillus niger*

Y en la siguiente figura 13 se aprecia el resultado de los promedios de diámetros medidos de cada hongo patógeno, teniendo que el patógeno *FG* es quien tiene mayor crecimiento.

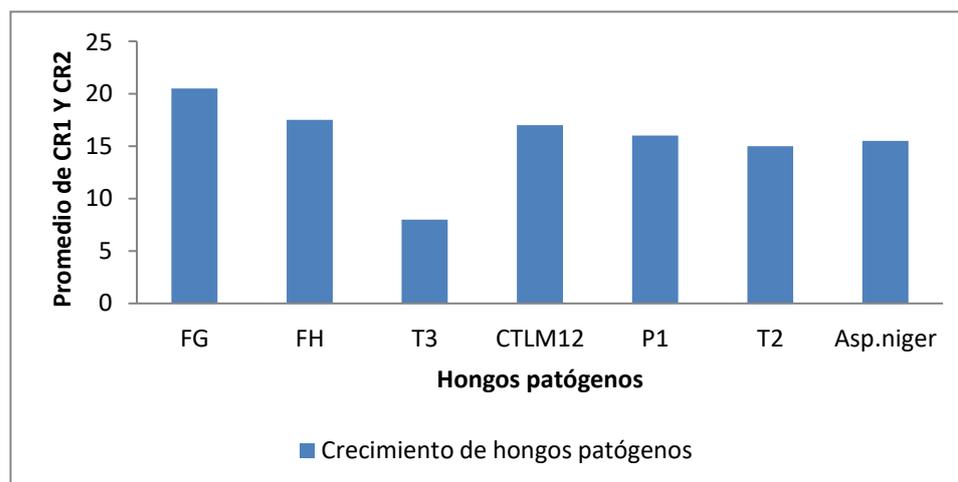


Figura 13. Crecimiento de los hongos patógenos sin antagonismo

Se consideraron antagonistas para aquellas bacterias endofíticas que presentaron inhibición mayor o igual a 50%, resultando que 12 bacterias endofíticas de las 35 aisladas tiene características antagonistas a los hongos patógenos.

Como podemos apreciar en la figura 14, el % de inhibición de cada cepa aislada versus los hongos patógenos, resultando que la cepa BW53T tiene % de inhibición hacia 4 hongos patógenos.

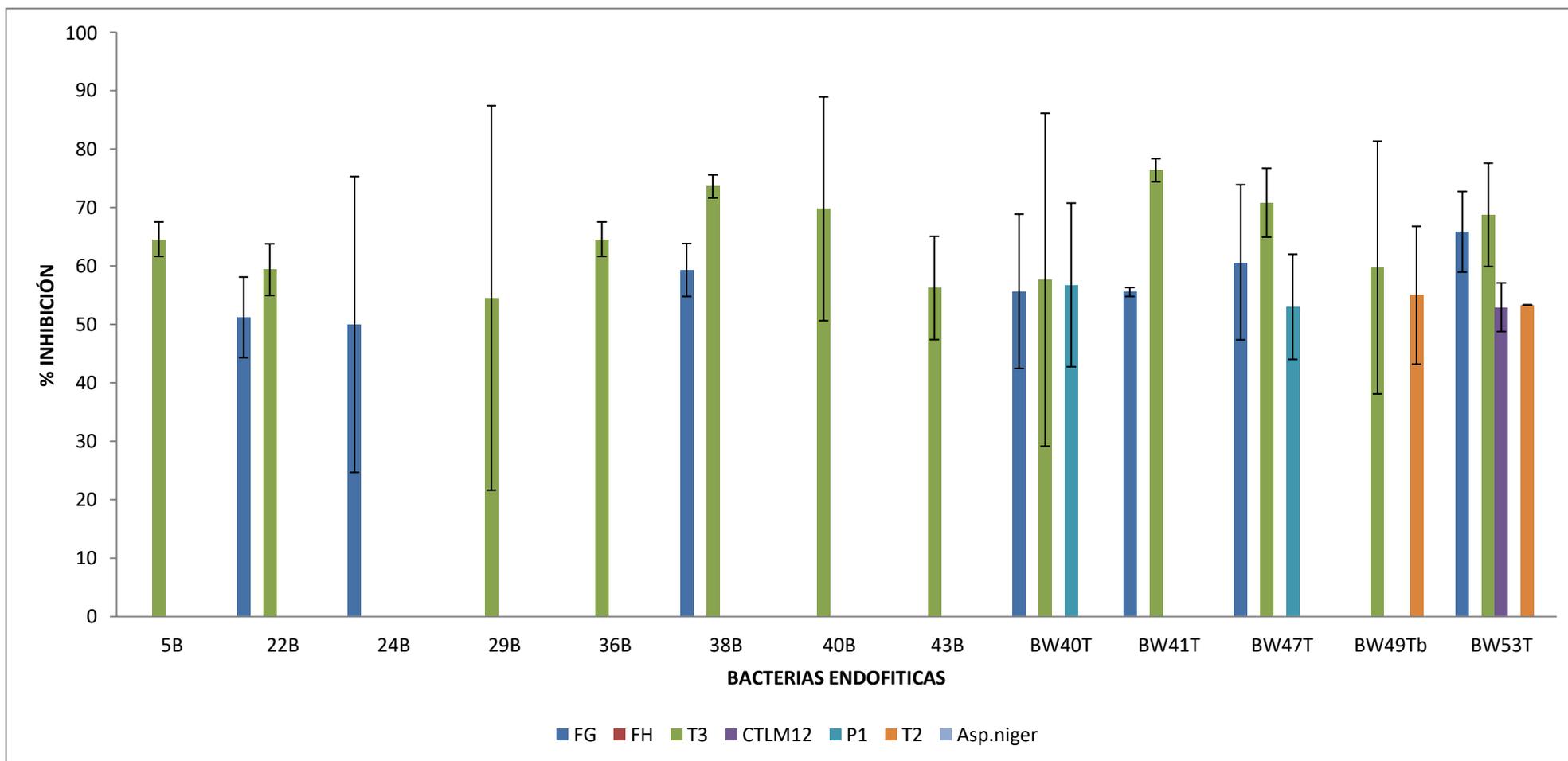


Figura 14. Antagonismo de bacterias endófitas frente a hongos patógenos
 (Los valores corresponden al promedio de dos repeticiones)

Estos resultados lo podemos resumir en la tabla 8:

Bacteria Endofítica	Hongo Patógeno que inhibe
5B	<i>T3</i>
22B	<i>FG y T3</i>
24B	<i>FG</i>
29B	<i>T3</i>
36B	<i>T3</i>
38B	<i>FG y T3</i>
40B	<i>T3</i>
43B	<i>T3</i>
BW40T	<i>FG, T3 y P1</i>
BW41T	<i>FG y T3</i>
BW47T	<i>FG, T3 y P1</i>
BW49Tb	<i>T3 y T2</i>
BW53T	<i>FG, T3, CTLM12 y T2</i>

Tabla 8. Resumen de resultados del antagonismo de las bacterias endofíticas

4.2.7. Actividad enzimática de la amilasa.

a. En hongos:

De las 35 cepas de hongos endofíticos, 21 cepas tienen la capacidad sintetizar la amilasa, como se aprecia en la figura 15, los resultados tienen un rango de 1.08 a 5.93 mm, siendo la cepa HW51b quien presenta mayor índice (5.93 mm) y la cepa 84H quien presenta el menor índice de actividad amilasa (1.04 mm).

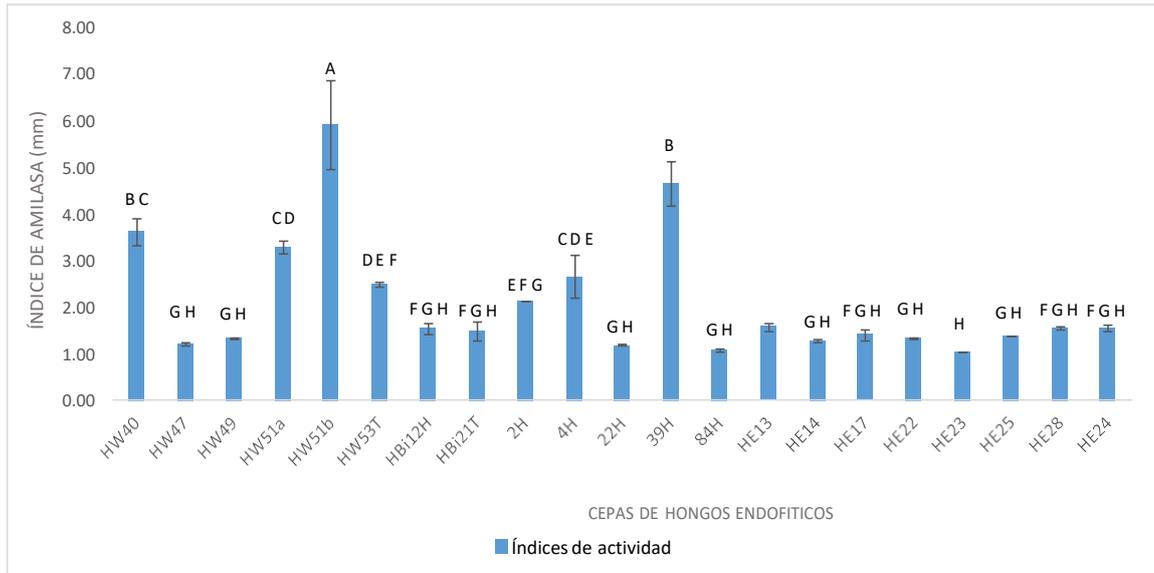


Figura 15. Índice de actividad amilasa de los hongos endofíticos

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

b. En bacterias:

Se determinó que 25 bacterias endofíticas tienen la capacidad sintetizar la amilasa, como se aprecia en la figura 16, los resultados tienen un rango de 1.42 a 5.75 mm, siendo la cepa *BW49Ta* la que presenta menor índice (1.42 mm) y la cepa de 51B la que presenta mayor índice de actividad de amilasa (5.75 mm).

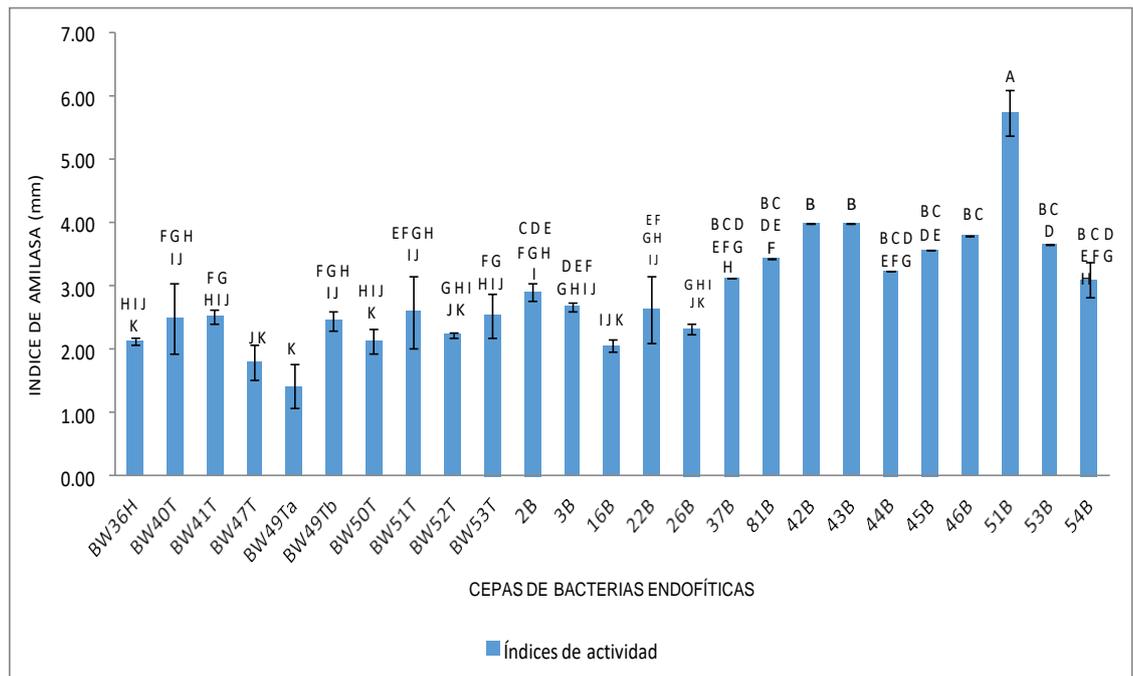


Figura 16. Índice de actividad amilasa de las bacterias endofíticas

Nota: Los valores corresponden al promedio de 2 repeticiones +/- desviación estándar. De acuerdo con el Análisis de varianza ANOVA se mostró que encontramos diferencias estadísticas significativas. Promedios con diferente letra son significativamente diferente (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

4.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los microorganismos aislados

4.3.1. Actividad antimicrobiana:

Los microbios estandarizados patógenos humanos comunes utilizadas en esta investigación las dividimos en dos, las bacterianas y candidas.

BACTERIAS	CANDIDA ALBICANS
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus epidermis</i> (SEP) • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (ST00) • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (ST13) • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (ST23) • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (ST99) • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 (EF) • <i>E. coli</i> ATCC35218 (EC18) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> ATCC10231 (CAN) • <i>Candida albicans</i> ATCC90028 (CA) • <i>Candida tropicalis</i> ATCC750 (CT)

Tabla 9. Microbios estandarizados de patógenos humanos comunes

Los resultados de la siembra nos arrojan que 15 de las 22 las cepas aisladas tienen actividad antimicrobiana.

Como podemos apreciar en la figura 17, la actividad antimicrobiana de la cepa HW47 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13 y ST23.

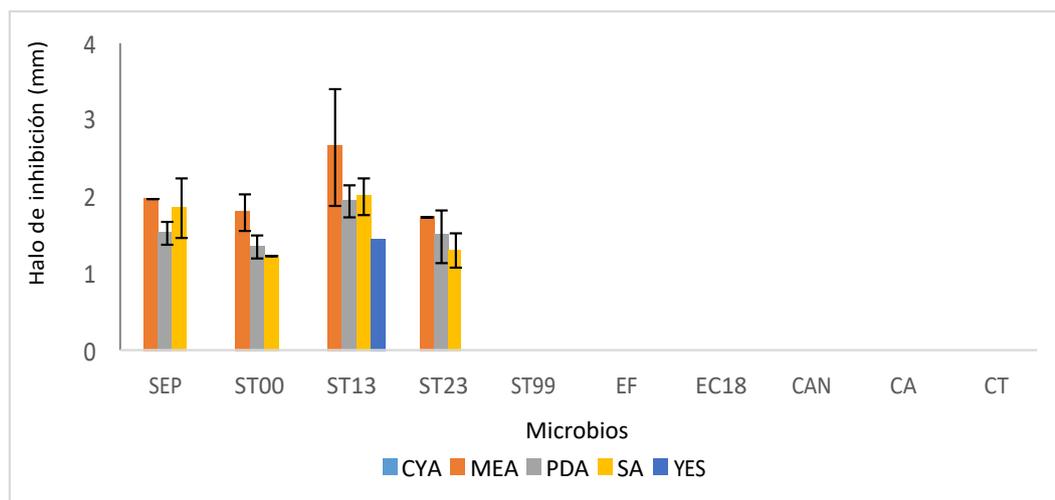


Figura 17. Actividad antimicrobiana de la cepa HW47

Como podemos apreciar en la figura 18, la actividad antimicrobiana de la cepa HW49 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP y ST13.

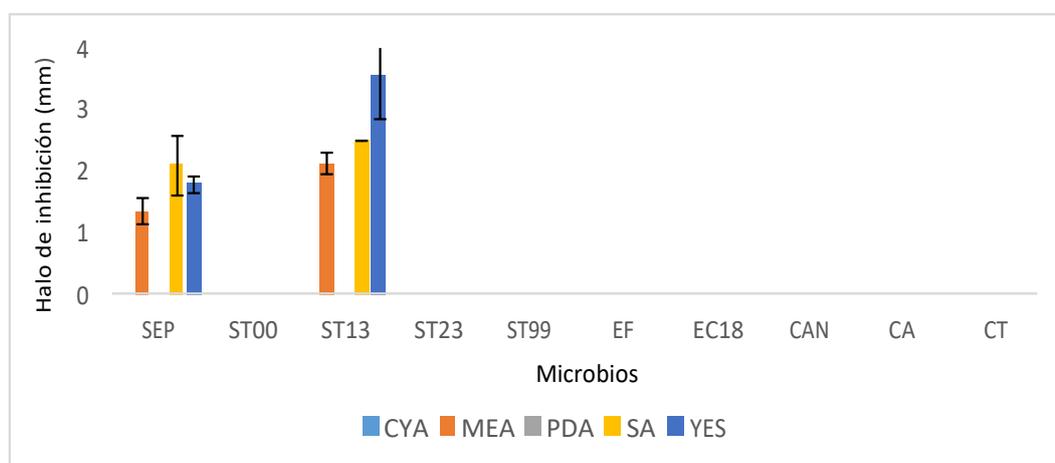


Figura 18. Actividad antimicrobiana de la cepa HW49

Como podemos apreciar en la figura 19, la actividad antimicrobiana de la cepa HBi12H (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13 y ST99, además a las cándidas CAN y CA.

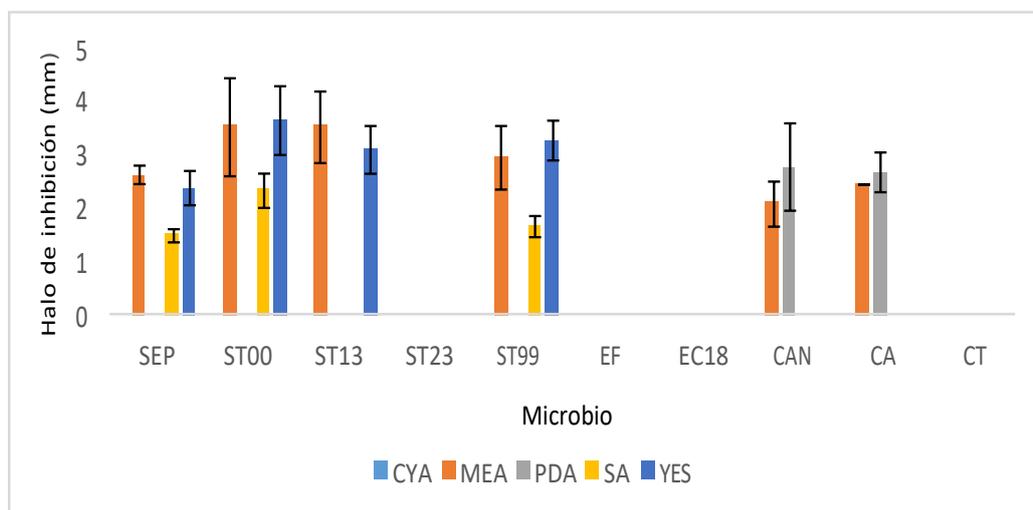


Figura 19. Actividad antimicrobiana de la cepa HBi12H

Como podemos apreciar en la figura 20, la actividad antimicrobiana de la cepa HBi21T (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13 y ST99, además a las cándidas CAN y CA.

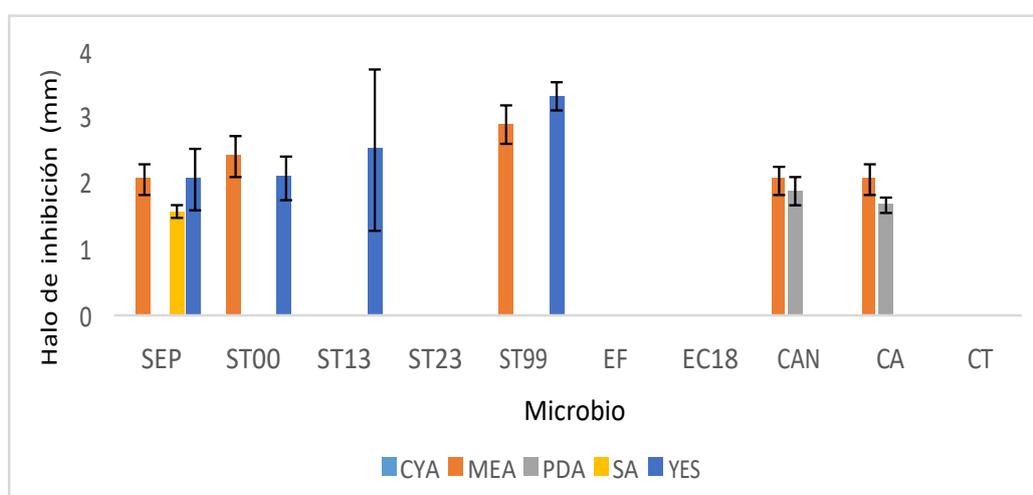


Figura 20. Actividad antimicrobiana de la cepa HBi21T

Como podemos apreciar en la figura 21, la actividad antimicrobiana de la cepa 2H (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias ST00, ST13 y EF, además a las cándidas CAN, CA y CT.

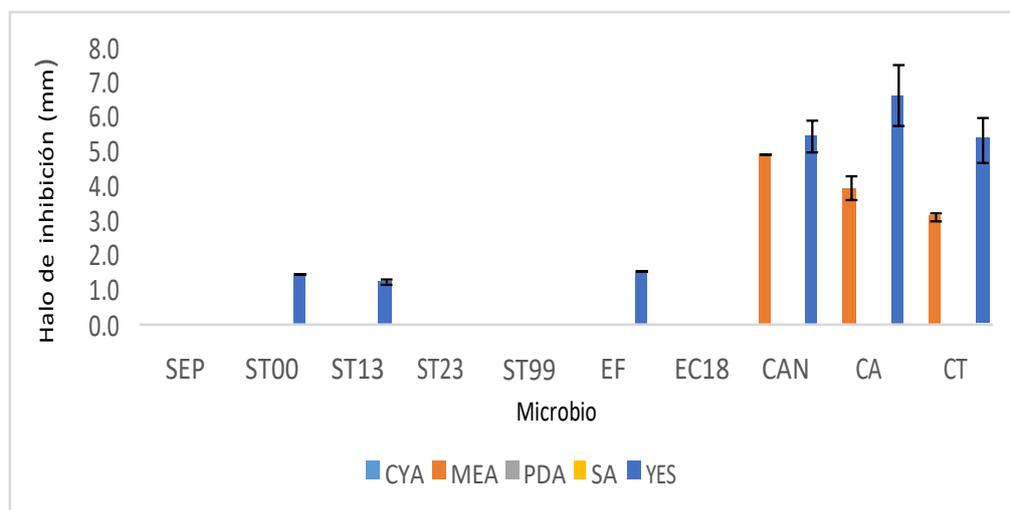


Figura 21. Actividad antimicrobiana de la cepa 2H

Como podemos apreciar en la figura 22, la actividad antimicrobiana de la cepa 4H (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de la bacteria ST23.

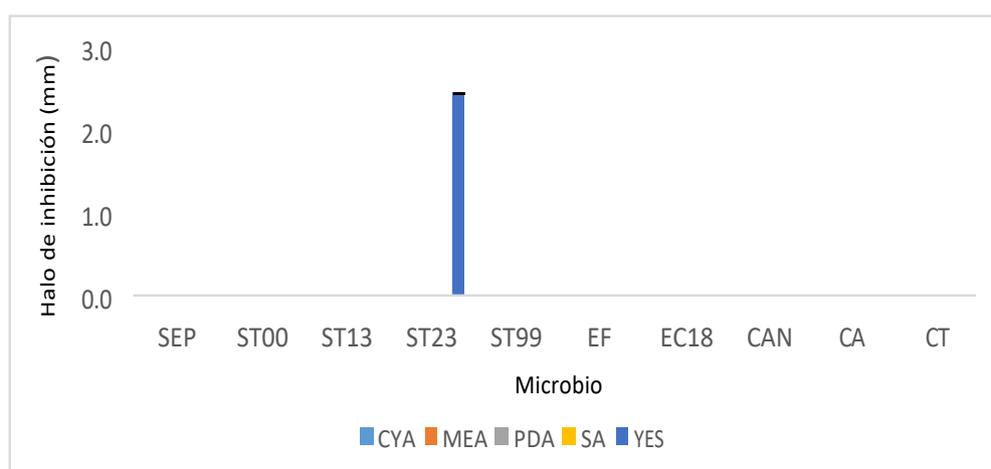


Figura 22. Actividad antimicrobiana de la cepa 4H

Como podemos apreciar en la figura 23, la actividad antimicrobiana de la cepa 22H (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13, ST23 y ST99.

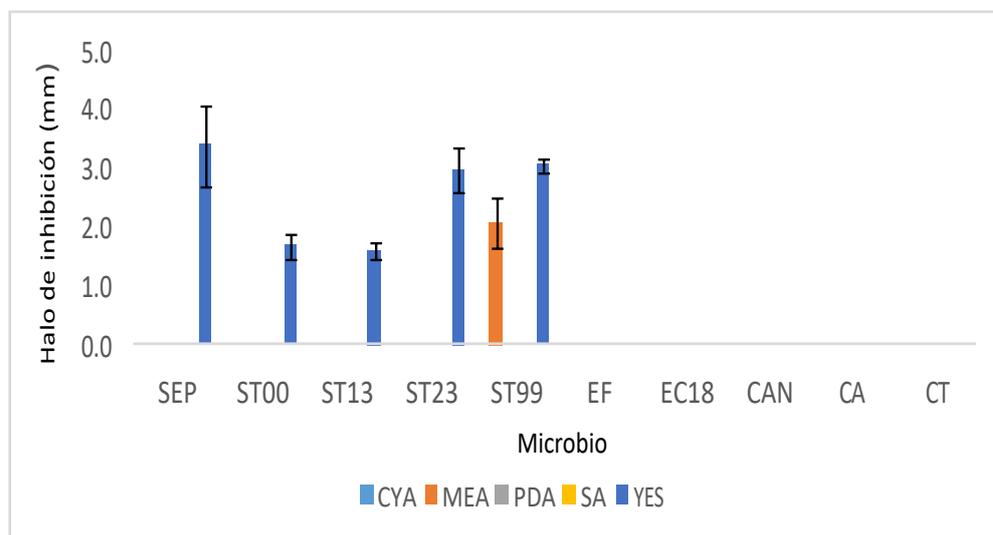


Figura 23. Actividad antimicrobiana de la cepa 22H

Como podemos apreciar en la figura 24, la actividad antimicrobiana de la cepa 39H (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de la bacteria ST23.

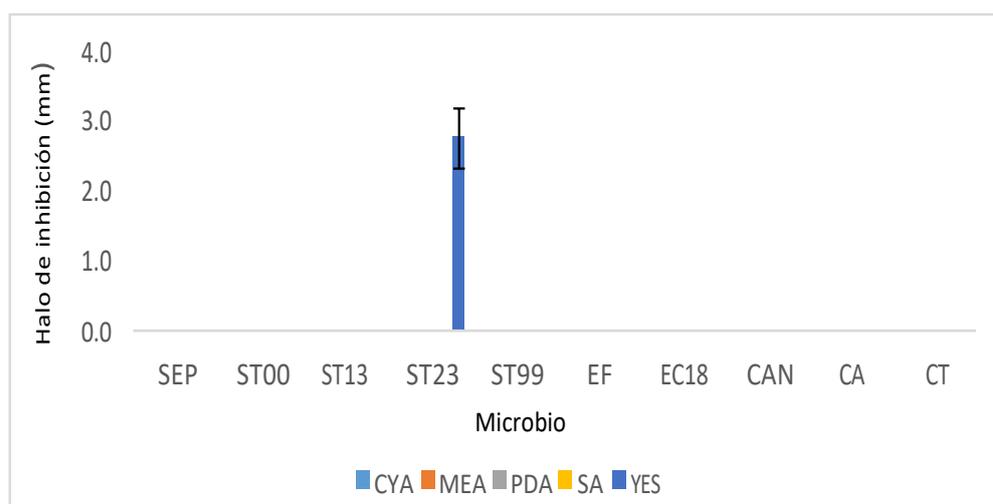


Figura 24. Actividad antimicrobiana de la cepa 39H

Como podemos apreciar en la figura 25, la actividad antimicrobiana de la cepa H13 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de la bacteria SEP.

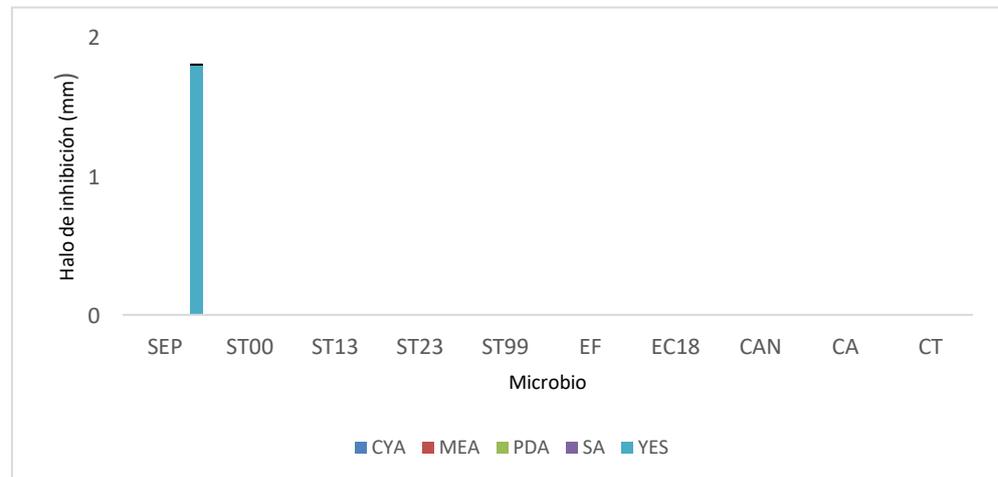


Figura 25. Actividad antimicrobiana de la cepa H13

Como podemos apreciar en la figura 26, la actividad antimicrobiana de la cepa H14 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST13 y ST23.

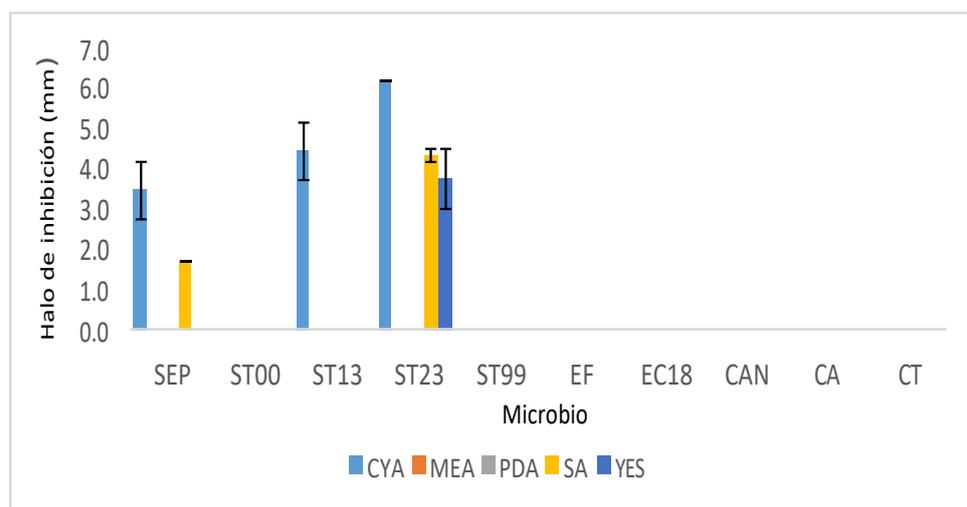


Figura 26. Actividad antimicrobiana de la cepa H14

Como podemos apreciar en la figura 27, la actividad antimicrobiana de la cepa H17 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13, ST23 y EF.

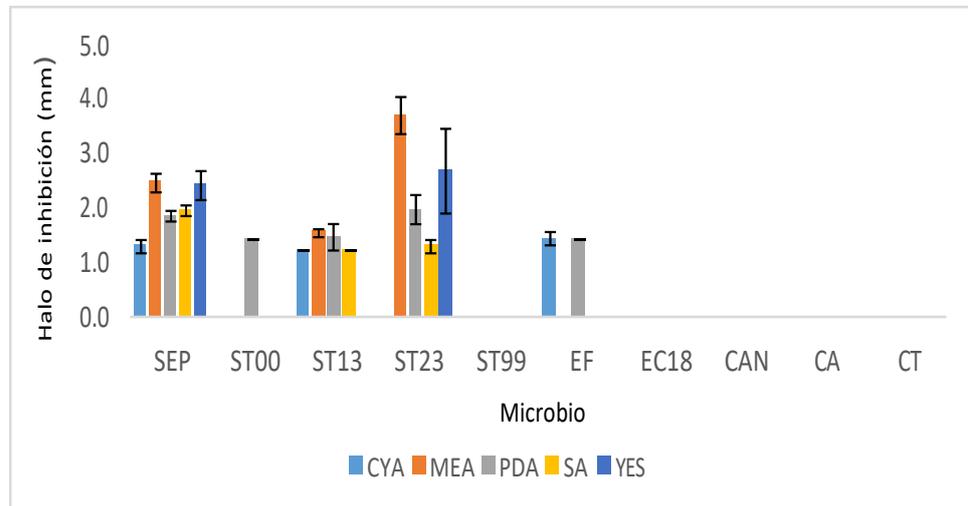


Figura 27. Actividad antimicrobiana de la cepa H17

Como podemos apreciar en la figura 28, la actividad antimicrobiana de la cepa H22 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00 y ST13.

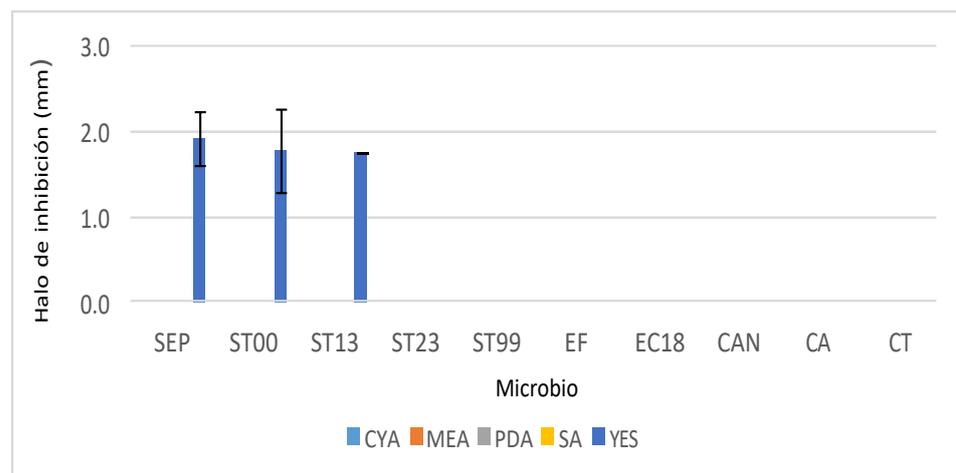


Figura 28. Actividad antimicrobiana de la cepa H22

Como podemos apreciar en la figura 29, la actividad antimicrobiana de la cepa H24 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13, ST23, ST99 y EF.

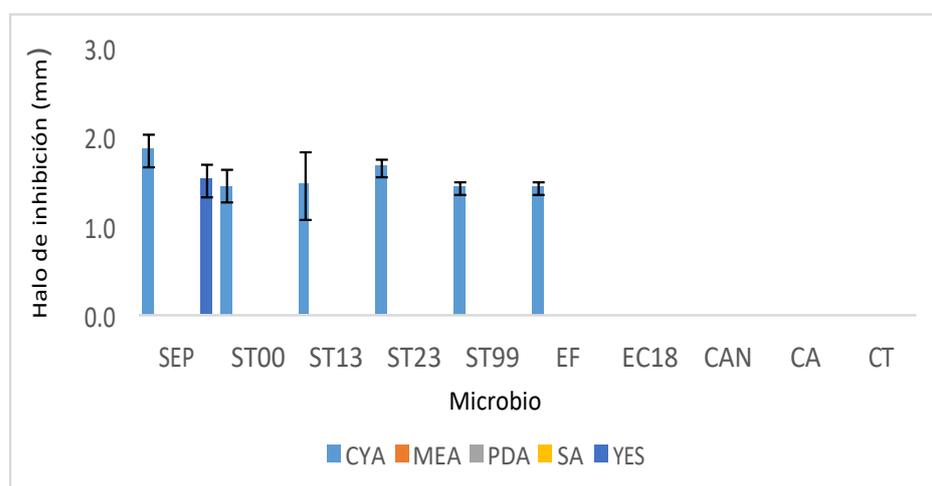


Figura 29. Actividad antimicrobiana de la cepa H24

Como podemos apreciar en la figura 30, la actividad antimicrobiana de la cepa H25 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13, ST23, ST99 y EF, y de las candidas CAN, CA y CT.

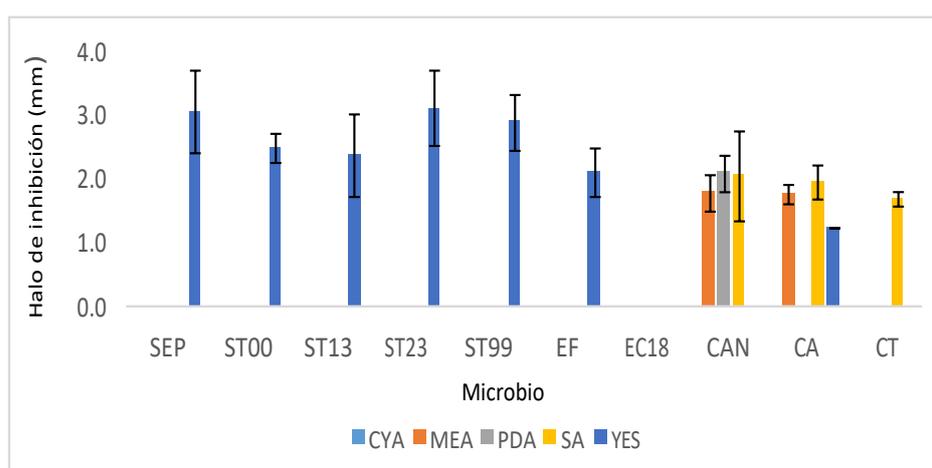


Figura 30. Actividad antimicrobiana de la cepa H25

Como podemos apreciar en la figura 31, la actividad antimicrobiana de la cepa H28 (sembrada en 5 medios diferentes), inhibe el crecimiento de las bacterias SEP, ST00, ST13, ST23, ST99 y EF, y de las candidas CAN, CA y CT.

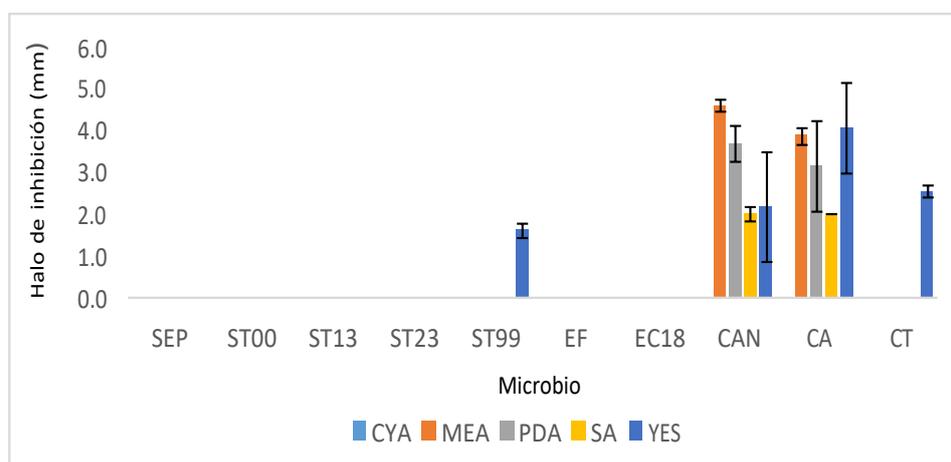


Figura 31. Actividad antimicrobiana de la cepa H28

4.3.2. Actividad antioxidante:

a. En hongos:

De las 22 cepas estudiadas, se encontró que 9 cepas tienen actividad antioxidante, como se puede apreciar en la figura 32, el resultado obteniendo de la siembra en 5 medios diferentes (CYA, MEA, PDA, SA, YES) nos muestra que, en el medio CYA se obtuvo el porcentaje de inhibición entre los rangos de 22 y 102%, siendo la cepa HW47 y HW49 quienes presentan mayor porcentaje; en el medio MEA se obtuvo el % de inhibición entre los rangos de 14 y 80%, siendo la cepa HE17 quien presenta mayor porcentaje; en el medio PDA se obtuvo el % de inhibición entre los rangos de 25 y 84%, siendo la cepa HBi21T quien presenta mayor porcentaje; en el medio SA se obtuvo el % de inhibición entre los rangos de 15 y 85%, siendo la cepa HE17 quien presenta mayor porcentaje y en el medio YES se obtuvo el % de inhibición entre los rangos de 12 y 97%, siendo la cepa HE17 quien presenta mayor porcentaje.

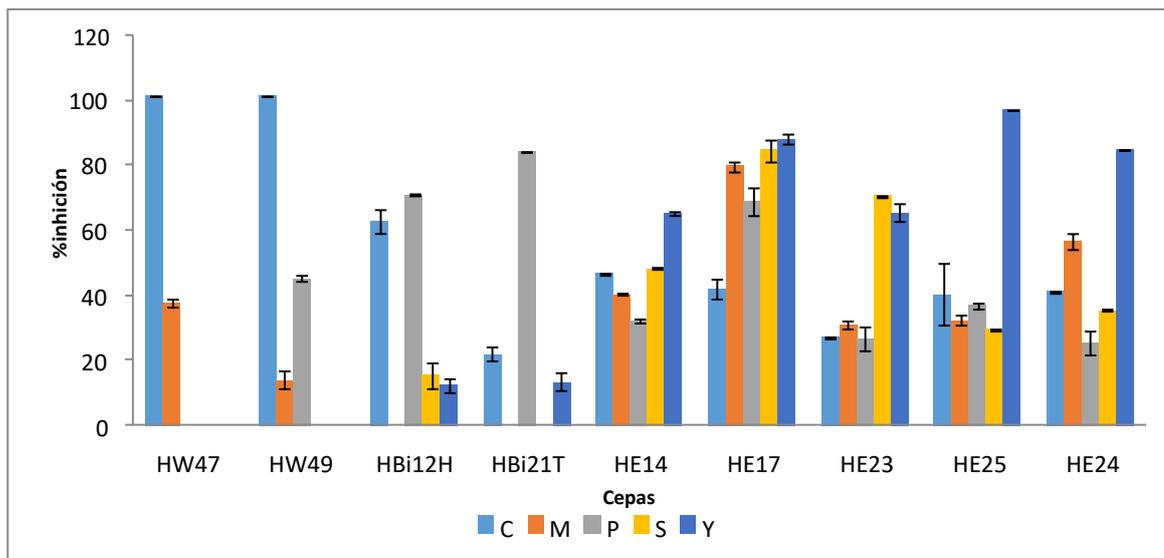


Figura 32. Actividad antioxidante de las cepas de hongos endofíticos

b. En bacterias:

Se realizó la prueba inicial para la selección de las cepas, teniendo como resultados que ninguna de las cepas cambió de color que es señal de actividad antioxidante, resultando que las bacterias endofíticas aisladas en esta investigación tienen dicha actividad.

4.4. Identificación taxonómica mediante técnicas moleculares

4.4.1. Caracterización bioquímica de bacterias

Se aislaron 35 bacterias, en la tabla 10 se muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

MUESTRA	CEPAS AISLADAS	Citrato	LIA	UREA	Glucosa	Gelatina
Werneria nubigena	BW36H	+	K/K	+	-	-
	BW40T	+	A/A	+	-	-
	BW41T	+	A/A	+	-	-
	BW47T	+	A/A	+	-	-
	BW49Ta	+	A/A	+	-	-
	BW49Tb	+	A/A	+	-	-
	BW50T	+	K/K	-	+	-

	BW51T	-	K/A	+	-	-
	BW52T	+	K/K	-	+	-
	BW53T	-	A/A	-	+	-
Xenophyllum dactylophylla	2B	+	A/K	-	+	-
	3B	+	A/A	-	+	-
	5B	+	K/K	-	+	-
	16B	-	A/A	+	-	-
Perezia coerulescens	22B	+	K/K	-	+	-
	24B	+	K/K	-	+	-
	26B	-	A/A	-	+	-
	27B	+	K/K	-	+	-
	29B	+	K/K	-	+	-
	30B	-	K/K	-	+	-
	36B	-	K/K	-	+	-
	37B	+	K/K	-	+	-
	38B	+	K/K	-	+	-
	39B	-	K/K	+	-	-
	40B	+	A/K	+	-	-
	81B	+	K/K	-	+	-
Senecio calvus	41B	+	A/K	+	-	-
	42B	+	K/K	+	-	-
	43B	+	K/K	+	-	-
	44B	+	K/K	+	-	-
	45B	+	K/K	-	+	-
	46B	-	A/A	+	-	-
	51B	-	K/K	+	-	-
	53B	+	K/K	+	-	-
	54B	+	K/K	+	-	-

Tabla 10. Reporte de los resultados de las pruebas bioquímicas

4.4.2. Identificación molecular y morfológica de los hongos

a. Identificación taxonómica de hongos:

La identificación taxonómica de los microorganismos endofíticos se realizó mediante la técnica molecular de gen 16Sr DNA e ITS, los análisis de identidad realizados en el BlasTN

mostraron porcentajes de identidad del 88-100% con algunas cepas del GenBank y el análisis de alineamiento filogenético muestra la presencia de especies como *Phialophora sp.*, *Beaveria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Penicillium sp.*, *Didymella sp.*, *Diaphorte sp.*, *Alternaria sp.*, *Epicoccum sp.*, *Absidia sp.*, *Plenodomus sp.* y hongo endofítico.

En la siguiente tabla 11, se aprecia la identificación taxonómica de los hongos aislados.

CEPAS AISLADAS	GÉNERO SEGÚN BLASTN	% DE IDENTIDAD
HW40	<i>Phialophora</i>	92.12
HW47	<i>Plenodomus</i>	98.68
HW48T	<i>Absidia</i>	88.07
HW49	<i>Beaveria</i>	100
HW51a	<i>Phialophora.</i>	99.12
HW51b	<i>Phialophora</i>	99.13
HW53T	<i>Phialophora</i>	98.94
HBi12H	<i>Epicoccum</i>	100
HBi21T	<i>Epicoccum</i>	100
2H	Hongo endofítico	
4H	<i>Diaphorte</i>	97.84
22H	<i>Alternaria</i>	100
39H	<i>Penicillium</i>	99.79
84H	<i>Didymella</i>	100
HE13ct	<i>Penicillium</i>	100
HE14ct	<i>Penicillium</i>	100
HE17ct	<i>Penicillium</i>	100
HE22ct	<i>Aspergillus</i>	99.78
HE23ct	<i>Chaetomium</i>	100
HE25ct	<i>Aspergillus</i>	99.78
HE28ct	Hongo endofítico	
HE24ct	<i>Aspergillus</i>	99.78

Tabla 11. Identificación taxonómica de hongos

b. Identificación morfológica de hongos:

En las siguientes figuras se observan el efecto de la composición nutricional de los medios de cultivo agar extracto de Malta (MEA), agar Czapek autolisado de levadura (CYA) y agar

extracto de levadura sacarosa (YES) sobre la expresión morfológica de las cepas de hongos aislados después de 5 días de cultivo a 25 °C.

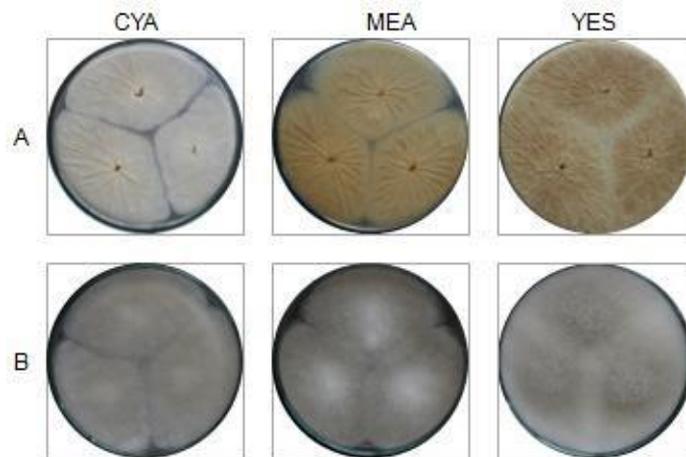


Figura 33. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW48T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

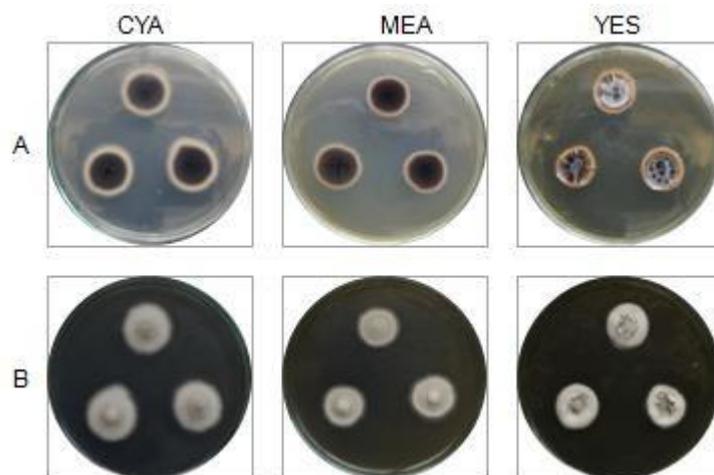


Figura 34. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW47, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

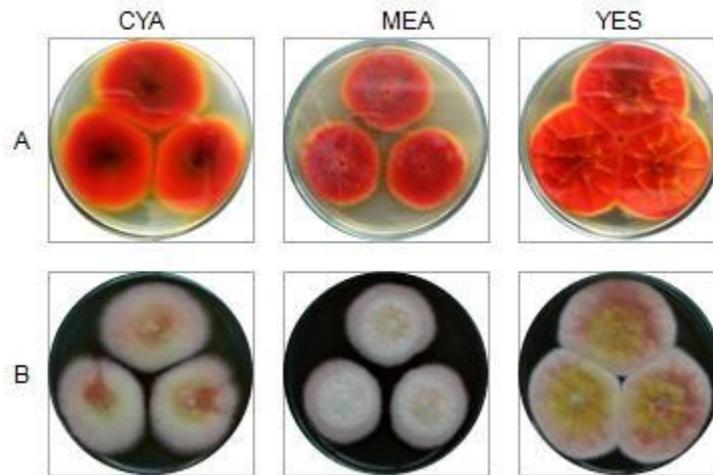


Figura 35. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HBi12H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

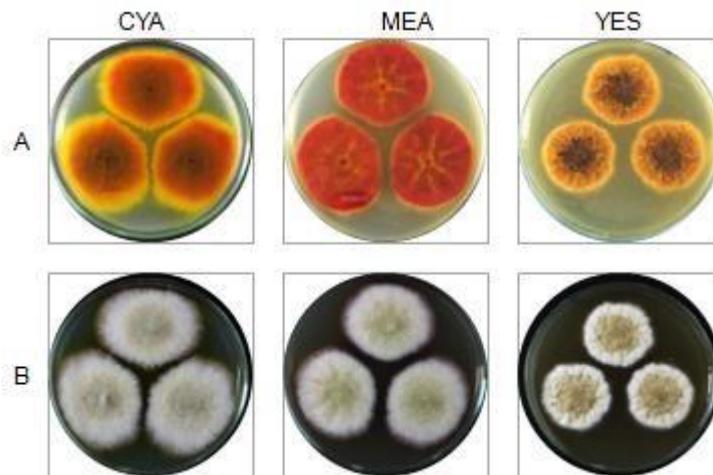


Figura 36. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HBi21T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

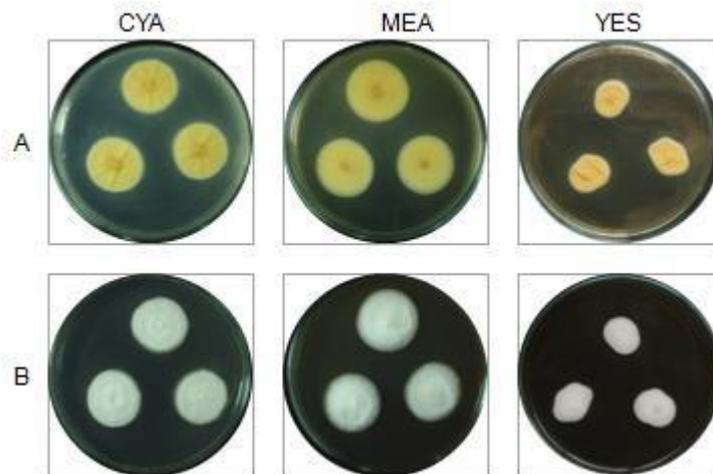


Figura 37. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW49, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

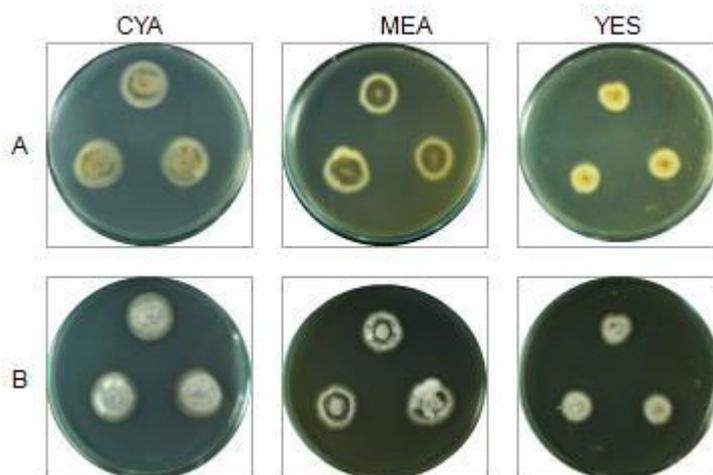


Figura 38. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW51a, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

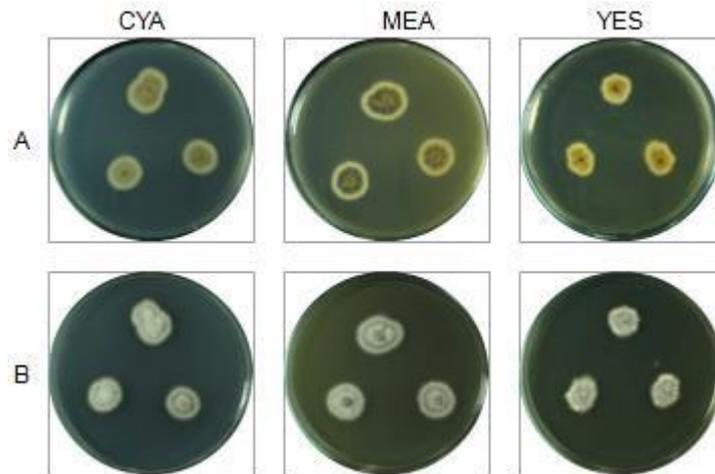


Figura 39. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW51b, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

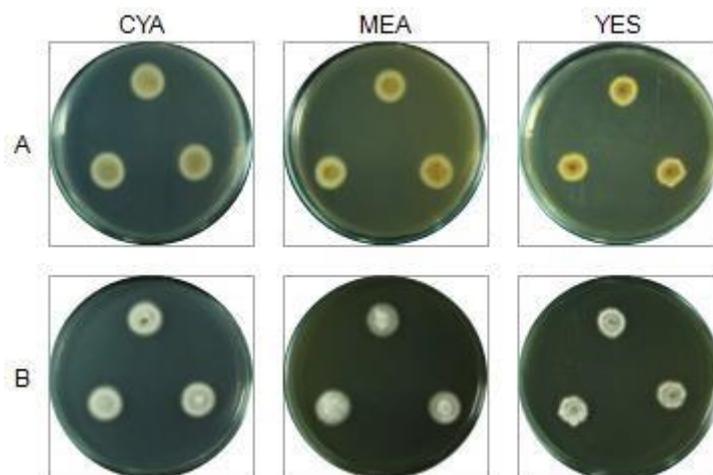


Figura 40. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW40, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

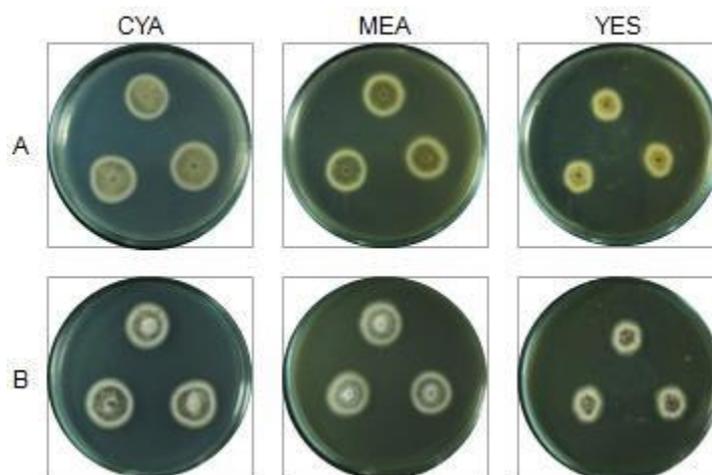


Figura 41. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HW53T, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.



Figura 42. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 2H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

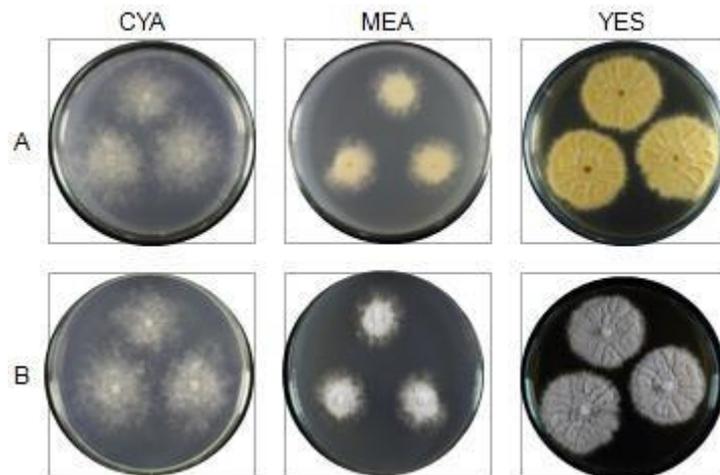


Figura 43. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 4H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

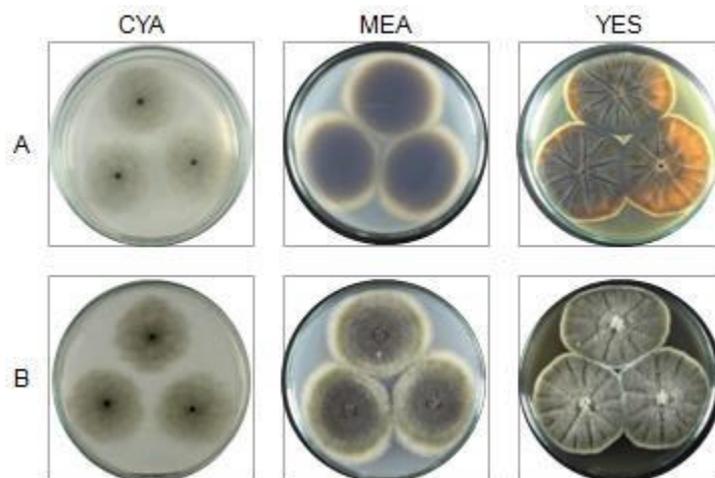


Figura 44. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 22H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

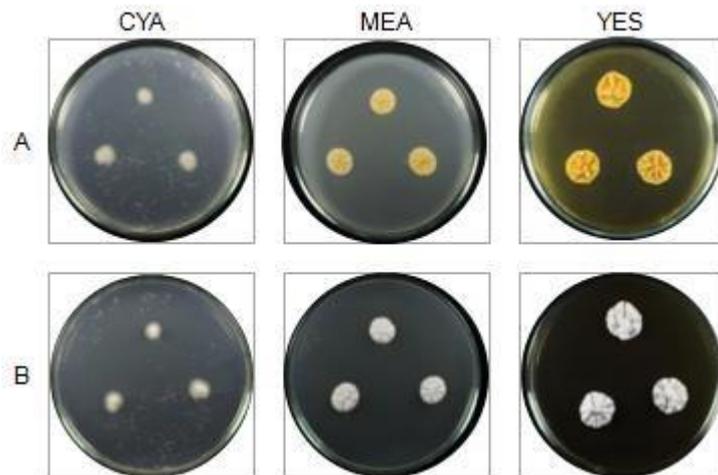


Figura 45. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 39H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

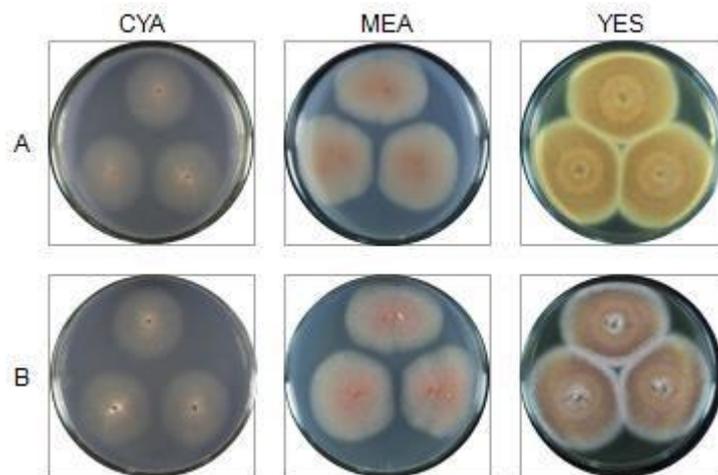


Figura 46. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica 84H, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.



Figura 47. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE14, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

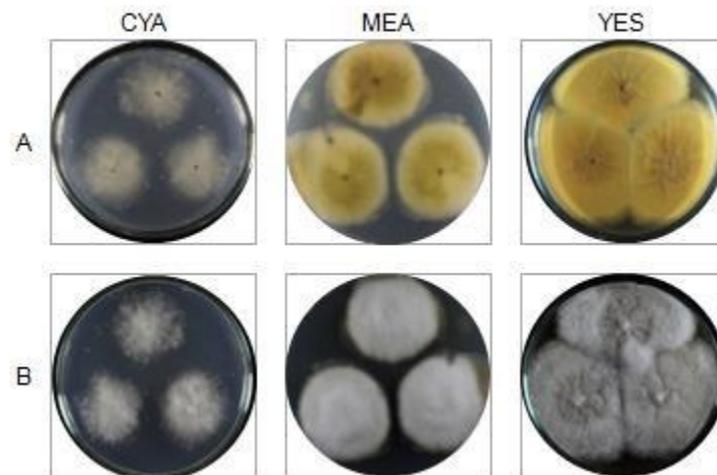


Figura 48. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE23, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

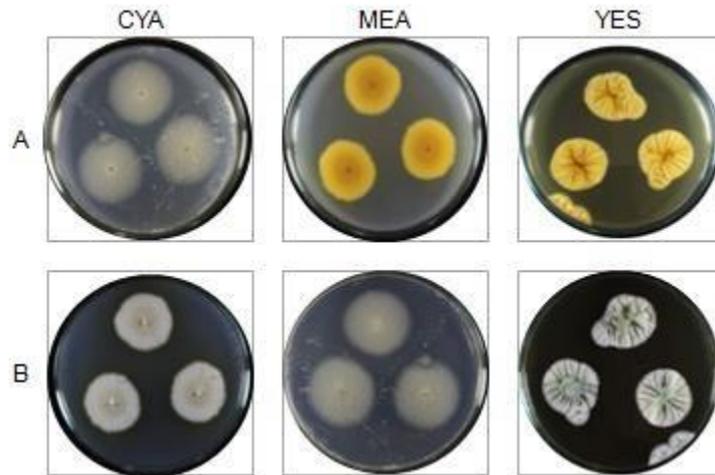


Figura 49. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE13, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.



Figura 50. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE25, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

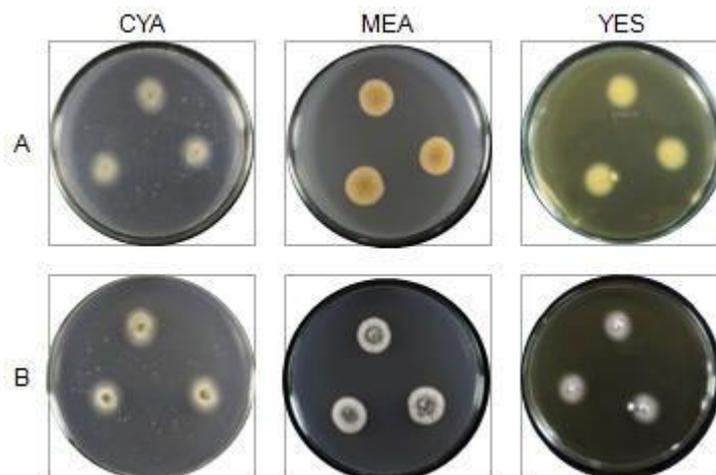


Figura 51. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE24, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.



Figura 52. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE17, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

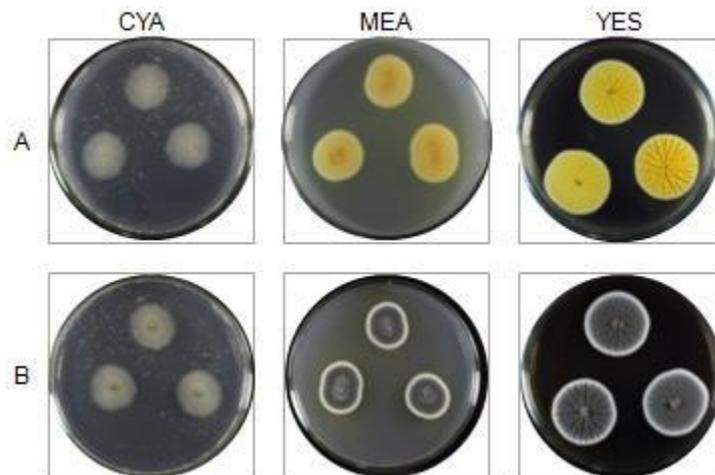


Figura 53. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE28, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.



Figura 54. Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HE28, A: fotografía tomada de la cara de la placa, B: fotografía tomada de la espalda de la placa.

4.5. Resumen de resultados

4.5.1. Resultados de los hongos endofíticos estudiados:

POBLACIÓN	MUESTRA	GÉNERO	CEPAS AISLADAS	PROMOTORAS DE CRECIMIENTO						PROPIEDADES		IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA
				SOL. FOSFATO	PROD. IAA	PROD. SID	CELULOLÍTICA	PROTEASA	AMILASA	ACT. ANTIMICROBIANA	ACT. ANTIOXIDANTE	MORFOLOGIA
QUILCAYHUANCA	Werneria nubigena	Philophora sp.	HW40	-	+	-	+	-	+	-	-	∩
		Plenodomus sp.	HW47	-	+	+	-	-	+	+	+	∩
		Absidia sp.	HW48T	-	-	+	-	-	-	-	-	∩
		Beaveria sp.	HW49	-	-	+	-	-	+	+	+	∩
		Philophora sp.	HW51a	-	+	+	+	-	+	-	-	∩
		Philophora sp.	HW51b	-	+	+	+	-	+	-	-	∩
	Buddleja incana	Philophora sp.	HW53T	-	+	-	+	-	+	-	-	∩
		Epicoccum sp.	HBi12H	-	+	-	-	+	+	+	+	∩
PUNTA OLÍMPICA	Xenophyllum dactylophylla	Epicoccum sp.	HBi21T	-	+	-	-	-	+	+	+	∩
		Hongo endofítico	2H	-	+	-	+	-	+	+	-	∩
	Perezia coerulea	Diaphorte sp.	4H	-	+	-	+	-	+	+	-	∩
		Alternaria sp.	22H	-	+	-	+	-	+	+	-	∩
	Loricaria ferruginea	Penicillium sp.	39H	-	-	-	+	-	+	+	-	∩
	Didymella sp.	84H	-	+	-	+	-	+	-	-	∩	

LLANGANUCO	Senecio Calvus	Penicillium sp.	HE13	-	-	+	+	-	+	+	-	∅
		Penicillium sp.	HE14	-	-	+	+	-	+	+	+	∅
PITEC	Oreocallis grandiflora	Penicillium sp.	HE17	-	+	+	+	-	+	+	+	∅
		Aspergillus sp.	HE22	-	+	-	-	-	+	+	-	∅
		Chaetomium sp.	HE23	-	+	-	+	-	+	+	+	∅
		Aspergillus sp.	HE25	-	-	-	-	-	+	+	+	∅
		Hongo endofítico	HE28	-	-	+	+	-	+	+	-	∅
	Valeriana pycnantha	Aspergillus sp.	HE24	-	+	-	-	-	+	+	+	∅

Tabla 12. Resumen de resultado de los hongos endofíticos aislados

4.5.2. Resultados de las bacterias endofíticas estudiadas

POBLACIÓN	MUESTRA	CEPAS AISLADAS	PROMOTORAS DE CRECIMIENTO							PROPIEDAD	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS				
			SOL. FOSFATO	PROD.AIA	PROD. SID	CELULOLÍTICA	PROTEASA	ACT. ANTAGONICA	AMILASA		ACT. ANTIOXIDANTE	Citrato	LIA	UREA	Glucosa
QUILCAYHUANCA	Werneria nubigena	BW36H	+	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	+	-	-
		BW40T	+	-	-	-	-	+	+	-	+	A/A	+	-	-
		BW41T	+	-	-	-	-	+	+	-	+	A/A	+	-	-
		BW47T	+	-	-	-	-	-	+	-	+	A/A	+	-	-
		BW49Ta	+	-	+	-	-	-	+	-	+	A/A	+	-	-
		BW49Tb	-	-	-	-	-	+	+	-	+	A/A	+	-	-
		BW50T	+	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	-	+	-
		BW51T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	K/A	+	-	-
		BW52T	-	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	-	+	-
		BW53T	+	-	-	-	-	+	+	-	-	A/A	-	+	-
PUNTA OLÍMPICA	Xenophyllum dactylophylla	2B	+	-	-	-	-	-	+	-	+	A/K	-	+	-
		3B	+	-	-	-	-	-	+	-	+	A/A	-	+	-
		5B	+	-	+	-	-	+	-	-	+	K/K	-	+	-
		16B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	A/A	+	-	-

	Perezia coeruleascens	22B	+	-	+	-	-	+	+	-	+	K/K	-	+	-
		24B	+	-	+	-	-	+	-	-	+	K/K	-	+	-
		26B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	A/A	-	+	-
		27B	+	-	+	-	-	-	-	-	+	K/K	-	+	-
		29B	+	-	+	-	-	+	-	-	+	K/K	-	+	-
		30B	+	-	+	-	-	-	-	-	-	K/K	-	+	-
		36B	+	-	+	-	-	+	-	-	-	K/K	-	+	-
		37B	+	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	-	+	-
		38B	+	-	+	-	-	+	-	-	+	K/K	-	+	-
		39B	+	-	+	-	-	-	-	-	-	K/K	+	-	-
		40B	+	-	+	-	-	+	-	-	+	A/K	+	-	-
		81B	+	-	-	-	-	-	+	-	+	K/K	-	+	-
	Senecio calvus	41B	+	-	+	-	-	-	-	-	+	A/K	+	-	-
		42B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	+	-	-
		43B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	K/K	+	-	-
		44B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	+	-	-
		45B	-	-	-	-	-	-	+	-	+	K/K	-	+	-
		46B	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A	+	-	-
		51B	-	-	+	-	-	-	+	-	-	K/K	+	-	-
		53B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	K/K	+	-	-
54B	-	-	-	-	-	-	+	-	+	K/K	+	-	-		

Tabla 13. Resumen de resultados de las bacterias endofíticas aislada

CAPITULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El Cordillera Blanca , en las 340 mil hectáreas que abarca, presenta amenazas, una de ellas es, la pérdida de cobertura vegetal, presencia de ganado en su interior, presión del turismo, actividades mineras, caza furtiva, proyectos de hidroenergía, limitaciones en la gestión del área y la reducción de glaciares por efecto del calentamiento global (Shoobridge, 2005), pero aún no se considera los grandes potenciales que tiene a nivel microscópico, los cuales podrían ser capaces de brindar características especiales a la vegetación y promover una conservación adecuada de nuestra flora.

En este estudio se realizaron diversas pruebas en laboratorio de propiedades metabólicas a nivel semicuantitativo, las cuales marcan un inicio a la investigación de microorganismos endófitos que habitan en plantas medicinales de la cordillera Blanca. Los resultados revelaron diferencias en las propiedades entre hongos y bacterias, así como también, entre microorganismos aislados de distintas especies de plantas, esto demuestra la importancia de la conservación de la diversidad de plantas medicinales nativas y nos anima a continuar la investigación a lo largo de la cordillera Blanca, especialmente en zonas con estrés biótico alto (contaminación con metales pesados, temperaturas extremas, radiación solar, disponibilidad de



nutrientes bajo, etc). Asimismo, brinda una línea base para promover la conservación de las plantas medicinales nativas estudiadas.

5.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos de algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca

En este estudio se obtuvo 49 microorganismos endofíticos entre hongos y bacterias provenientes de los tejidos de las plantas medicinales *Werneria nubigena*, *Buddleja incana*, *Xenophyllum dactylophylla*, *Perezia coeruleascens*, *Loricaria ferruginea* y *Senecio calvus*; estas plantas medicinales se encuentran dentro de la cordillera Blanca, en el estudio realizado por (Ulloa Muñoz, 2016) obtiene 14 microorganismos endofíticos entre hongos y bacterias provenientes de las plantas medicinales *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri gil*, este estudio también fue realizado dentro de la cordillera Blanca.

5.2. Actividad promotora de crecimiento vegetal de los microorganismos aislados

5.2.1. Evaluación de la actividad de solubilización de fosfato de calcio

El fosfato juega un papel importante en el proceso que transferencia de energía del suelo a la planta (Munuera & Meza, 2012) y la interacción que existe entre el fósforo y el calcio es fundamental puesto que se ha encontrado una acción estimulante del calcio en la absorción de fósforo (Fernandez, 2007).

Según Constanza et al. (2014), la solubilización del fosfato de calcio se debe a la producción extracelular de ácidos orgánicos, los cuales, entre otras funciones, intervienen en la detoxificación de los metales y en la quimiotaxis microbiana, respuesta eficiente y rápida a cambios de la composición química en su ambiente.

En el presente estudio obtuvo como resultado que los hongos endofíticos aislados no solubilizan el fosfato de calcio, a diferencia de las bacterias endofíticas aisladas, este resultado concuerda con la

investigación de Ulloa Muñoz (2016), así como también con Palacios Robles (2018), a diferencia de la investigación realizada por Huamán de la Cruz (2018), donde si encuentra resultados para uno de los hongos endofíticos aislados del *Senecio* sp.

Se determino que 23 cepas aisladas fueron capaces de solubilizar el fosfato de calcio en distintos índices de solubilización de fosfatos, teniendo a la bacteria endofítica 24B con mayor resultado; esta cepa también es productora de sideróforos y tiene características antagonicas al *Fusarium Geo*.

Por lo que nos da una lectura interesante y se determina que esta cepa es promotora de crecimiento vegetal, por lo cual es buena opción para procesos biotecnológicos como: fitorremediación de suelos y agua por metales pesados, biolixiviación de minerales, agricultura ecológica entre otras (Oteino et al., 2015), lo que sustenta la conservación de la biodiversidad de las presentes plantas medicinales.

5.2.2. Producción de ácido indol acético (AIA)

El AIA está involucrado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente en el proceso fisiológicos, pero no solo se da a nivel de plantas superiores sino también a nivel microscópico, puesto que la producción de AIA lo pueden realizar bacterias, hongos y algas, los cuales pueden afectar directamente sobre procesos fisiológicos como la elongación y división celular (Vega Celedón et al., 2016).

En esta investigación obtuvimos resultados de los hongos endofíticos aislados, 15 cepas, más no de las bacterias endofíticas, a diferencia del estudio realizado por Huamán de la Cruz (2018) y Palacios Robles (2018), quienes registraron AIA positivo en bacterias y hongos endofíticos.

Los resultados obtenidos tienen un rango de 6.3 a 763.8 $\mu\text{g/ml}$, siendo el hongo endofítico 4H quien presenta el mayor valor, sin embargo, es válido resaltar que Huamán de la Cruz (2018) en la investigación que realizó obtuvo el máximo valor de 5.68 $\mu\text{g/ml}$ del hongo endofíticos HEP06 aislado desde *Senecio sp.*

En definitiva, la capacidad de producción de AIA de las 15 cepas aisladas brinda evidencia de asociación benéfica el cual podría promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que proporcionaría una herramienta muy importante para la conservación de la biodiversidad dentro de la Cordillera Blanca.

5.2.3. Producción de sideróforos

Los microorganismos productores de sideróforos desempeñan un papel importante en la defensa de la planta frente a patógenos, puesto que existe una competencia por el hierro disponible (Manias et al., 2020); asimismo, también se ha encontrado reporte como responsables de la regulación y generación de hormonas de crecimiento de plantas bajo estrés de metales, puesto que a través del proceso de quelación se unen a metales tóxicos, evitando que estos inhiban la síntesis de la fitohormona y el hierro sea asimilado por la planta (Ma et al., 2016).

En el presente estudio obtuvimos resultados positivos de 9 cepas de hongos endofíticas y de 22 cepas de bacterias endofíticas, lo que demuestra que existen microorganismos endofíticos productores de sideróforos dentro de las plantas medicinales de la Cordillera Blanca, resultando concordante con el estudio realizado por Huamán de la Cruz (2018).

En definitiva, la capacidad de producción de sideróforos de las 9 cepas de hongos y 22 cepas de bacterias aisladas brinda características de resistencia a las plantas estudiadas, lo que

proporcionaría una herramienta muy importante para la conservación de la biodiversidad dentro de la Cordillera Blanca.

5.2.4. Actividad hidrolítica de Carboximetil celulosa

La celulosa es considerada como uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que puede ser degradado por una serie de microorganismos (Ramirez & Cocha, 2003), la utilización de la celulosa por estos microorganismos ocasiona mayor flujo de materiales a la biosfera y es de gran interés en relación con la transformación y el movimiento del carbono (Galván Quintero, 2018), es por ello que se propone que las enzimas celulíticas producidas por microorganismos endofíticos contribuyen a procesos de infección en las plantas puesto que en el proceso de colonización microbiana penetra y daña los tejidos de las plantas, lo que ocasiona que se active sus genes de defensa para protegerse de los daños (Ulloa Muñoz, 2016).

En la presente investigación obtuvimos resultados de los hongos endofíticos aislados, 14 cepas, más no de las bacterias endofíticas, lo que concuerda el estudio realizado por Ulloa Muñoz (2016).

Siendo el género *Penicillium sp.* el que presenta mayor índice de actividad celulolítica, no se han encontrado reportes de esta interacción.

Pero que según literatura se determina que estas 14 cepas de hongos endofíticos tienen gran relevancia para la promoción del crecimiento vegetal de sus hospedadoras y conservación de estas dentro de la cordillera Blanca.

5.2.5. Actividad enzimática proteasa

Las enzimas proteasa son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos, están involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas distribuidas en las plantas (Vigueras Morales,

2019), la producción de estas enzimas por parte de los endofíticos puede implicar una estrategia de resistencia de la planta hospedadora frente a los microorganismos patógenos, así mismo mejora el estado nutricional de la planta (Fouda et al., 2015), lo cual es una herramienta necesaria para la conservación de las especies utilizando la biotecnología.

En el presente estudio la cepa *Buddleja incana HBi12H* fue el único hongo endofítico aislado que logró producir enzimas proteasas, a diferencia del estudio realizado por (Amirita et al., 2016), quien describe que el 65% de los hongos endofíticos que aisló son buenos productores de proteasa.

5.2.6. Actividad antagónica de las cepas de microorganismos frente a Hongos patógenos.

Los microorganismos endofíticos con actividad antagónica frente a hongos patógenos se les denomina agentes de biocontrol, una alternativa al control químico (Nair & Padmavathy, 2014) los patógenos fúngicos son aquellos que limitan la producción de cultivos, enfermando a la planta, dentro de estos patógenos fúngicos la familia de los *Fusarium* es la más son las más representativa (Ulloa Muñoz, 2016).

En el presente estudio, encontramos a 12 bacterias endofíticas con actividad antagónica, siendo la *Werneria nubigena BW53T* la que tiene mayor actividad frente a 5 de los 7 patógenos fúngicos estudiados, siendo estos de la familia *Fusarium*.

Además, la bacteria endofítica *Werneria nubigena BW53T* ha demostrado tener actividad de solubilización de fosfato, por lo que se coincide con los resultados obtenido en el estudio de Ulloa Muñoz et al. (2020) donde también la cepa con mayor antagonismo tiene esta característica.

Esta relación se hace realmente interesante y atribuye herramientas importantes para el biocontrol de los patógenos, el crecimiento y la conservación de las plantas.

5.2.7. Actividad enzimática de la amilasa.

Las enzimas de amilasa son comúnmente utilizadas en la industria biotecnológica, puesto que permiten la bioconversión de diferentes sustratos ricos en almidón (Sánchez Castelblanco et al., 2020).

Son escasos los estudios que relacionen los microorganismos endofíticos de las plantas con la actividad enzimática de la amilasa, pero en el presente estudio encontramos actividad tanto de hongos como bacterias endofíticas, obteniendo que el 60% de las cepas de hongos y el 71% de cepas de bacterias aisladas tienen actividad enzimática de la amilasa.

Es así como, el hongo endofítico *Werneria nubigena HW51b* tiene mayor índice de actividad amilasa, resultando que este hongo mencionado también presenta producción de AIA, produce sideróforos y actividad celulolítica, haciendo de este hongo endofítico un promotor de crecimiento y potencial opción para el aporte de la conservación de las plantas de la Cordillera Blanca.

En el caso de las bacterias, tenemos a la cepa endofítica *Senecio calvus 51B*, el cual presenta el mayor índice de actividad amilasa, el cual a su vez produce sideróforos, haciendo que esta bacteria sea promotora de crecimiento con características potenciales para la conservación de las plantas.

5.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los microorganismos aislados

5.3.1. Actividad antimicrobiana:

Los microorganismos endofíticos aislados de plantas son conocidos por su actividad microbiana, la cual ayuda a controlar los patógenos microbianos en plantas (Nair & Padmavathy, 2014).

En el presente estudio, el 68% de las cepas de hongos endofíticos aislados de las plantas medicinales tienen actividad antimicrobiana, dividiendo estas en dos subactividades, como actividad antibacterial y anticandida, demostrando que 45% de las cepas aisladas tienen actividad antibacterial y el 23% de las cepas aisladas tienen actividad antibacterial y anticandida.

Siendo la cepa *Valeriana pycnantha* HE24 el cual presenta mayor actividad antimicrobiana inhibiendo a hasta 6 bacterias patógenas humanas comunes y la cepa *Oreocallis grandiflora* HE25 es aquella que presenta mayor actividad antibacterial y anticandida, inhibiendo hasta 6 bacterias patógenas y 3 candidas, siendo estas dos cepas de género *Aspergillus* sp.

La *Valeriana pycnantha* y *Oreocallis grandiflora* son plantas medicinales, usualmente utilizado y colectados de la Cordillera Blanca, los cuales tienen actividad antimicrobiana (Tamariz Angeles et al., 2018).

La cepa *Valeriana pycnantha* HE24, aparte de tener actividad antimicrobiana, es productora de AIA, tiene actividad amilolítica y actividad antioxidante, la cual hace que esta cepa pueda afectar positivamente sobre el crecimiento y resistencia a la planta hospedadora, proporcionando una herramienta importante para la conservación de la biodiversidad haciéndola resistente hacia cualquier cambio climático y del suelo.

Y la cepa *Oreocallis grandiflora* HE25, aparte de tener actividad antimicrobiana, tiene actividad amilolítica y actividad antioxidante, haciendo que esta cepa pueda afectar positivamente a la planta hospedadora, proporcionando una herramienta importante para la

resistencia ante fitopatógenos que podrían existir, lo cual aporta a la conservación de la biodiversidad dentro de la Cordillera Blanca.

5.3.2. Actividad antioxidante:

La oxidación de las moléculas biológicas es inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, este proceso degenerativo es normal y naturales en los seres vivos (Castañeda et al., 2008).

En el presente estudio, el 41% de las cepas aisladas tienen actividad antioxidante, siendo las especies con mayor %inhibición son las cepas de *Werneria nubigena* HW47 y *Werneria nubigena* HW49, del género *Plenodomus* sp. y *Beaveria* sp. respectivamente.

La cepa *Werneria nubigena* HW47, aparte de tener actividad antioxidante, es productora de AIA, es productora de sideróforos, tiene actividad amilolítica y actividad antimicrobiana, y la cepa *Werneria nubigena* HW49, aparte de tener actividad antioxidante, es productora de sideróforos, tiene actividad amilolítica y actividad antimicrobiana, estas combinaciones hacen que estas cepas puedan afectar positivamente sobre el crecimiento y resistencia a la planta hospedadora, proporcionando una herramienta importante para la conservación de la biodiversidad y haciéndola resistente hacia el cambio climático.

5.4. Identificación taxonómica mediante técnicas moleculares

Las cepas estudiadas pertenecen a distintos géneros, *Philophora* sp., *Beaveria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Didymella* sp., *Diaphorte* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Absidia* sp., *Plenodomus* sp. y hongo endofítico, predominando ligeramente el género *Philophora* sp., encontrada en cuatro cepas aisladas de la *Werneria nubigena*.

Huamán de la Cruz (2018), en su estudio realizado dentro de la Cordillera Blanca encontró especie de género *Penicilium sp.*, *Hydroxylon monticulosum* y *Tolypocladium cylindrosporum*, coincidiendo con este estudio con el género *Penicilium sp.*, el cual fue identificado de las cepas aisladas de la *Perezia coerulescens* y *Senecio Calvus*.

Asimismo, la identificación morfológica realizada en el presente estudio brinda una base de datos de crecimiento de los hongos endofíticos aislados de plantas medicinales de la cordillera Blanca, el cual puede ser utilizado en otras investigaciones.

5.5. Prueba de hipótesis

Según los resultados obtenidos nos muestra que si existe presencia de microorganismos endofíticos cultivables en algunas plantas medicinales de la cordillera Blanca con propiedades biotecnológicas, que permite promover su conservación.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Se evidenció que algunas plantas medicinales que habitan dentro de la Cordillera Blanca presentan microorganismos endofíticos, con características biotecnológicas potenciales que podría ser utilizado como línea base para promover su conservación.

- Se aislaron un total de 49 microorganismos endofíticos, 14 hongos y 35 bacterias, asociados a las plantas medicinales que habitan la cordillera Blanca.
- Se demuestra que los microorganismos endofíticos estudiados tienen actividades de promoción de crecimiento vegetal, obteniendo resultados positivos para las siguientes pruebas: solubilización de fosfato de calcio, producción de ácido indol acético (AIA), producción de sideróforos, actividad hidrolítica de Carboximetil celulosa, actividad enzimática proteasa, actividad antagónica, actividad enzimática de amilasa, encontrando diferencias significativas de estas propiedades entre hongos y bacterias, y las cepas aisladas de diferentes especies de plantas medicinales.

- Se encontró actividad antimicrobiana en 15 hongos endofíticos estudiados, evidenciando que algunas cepas presentaron actividad antibacteriana y anticandida. Asimismo, se encontró actividad antioxidante en 9 hongos endofíticos, no encontrando actividad en bacterias.
- Se identificó taxonómicamente las cepas y se determinó que las cepas aisladas pertenecen a los géneros, *Philophora sp.*, *Beaveria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Penicillium sp.*, *Didymella sp.*, *Diaphorte sp.*, *Alternaria sp.*, *Epicoccum sp.*, *Absidia sp.* y *Plenodomus sp.*

6.2. Recomendaciones

- Continuar con los estudios de los microorganismos endofíticos que obtuvieron los mejores resultados en las diferentes pruebas de promoción de crecimiento vegetal.
- Realizar estudios para la evaluación cuantitativa de las cepas que presentan actividad en este estudio.
- Continuar con el aislamiento de microorganismos endofíticos de las plantas medicinales que habitan en la cordillera Blanca, se pueden encontrar grandes potencialidades metabólicas que podrían influenciar en la conservación de la biodiversidad.
- Tomar de referencia esta investigación que brinda una línea base para promover la conservación de las plantas medicinales nativas, demostrando el potencial de los microorganismos endofíticos cultivables para futuros proyectos de impacto dentro de la cordillera Blanca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N. S., & Kannan, K. P. (2016). *Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. February.*
- Anith, K. N., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/lam.13495>
- Aragón, S., & Beltran Acosta, C. (2018). Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia)*, 19(October 2018), 854–873.
- Beltran Pineda, M. (2014). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth.* 15, 101–113.
- Castañeda, B. C., Ramos, L. E., & Ibáñez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Medico*, 8(1), 56–72.
- Cervantez Tenorio de Reyna, R. M., & Reyna Pizán, T. N. (2019). Identificación fitoquímica y aislamiento de microorganismos endófitos de agave americana [universidad maría auxiliadora]. IN FLENS 2019 - IEE International Conference on Flexible and Printable Sensors and Systems, Proceedings (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125084>
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria — Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>
- Chowdhury, E. K., Jeon, J., Rim, S. O., Park, Y. H., Kyu Lee, S., & Bae, H. (2017). Composition, diversity and bioactivity of culturable bacterial endophytes in mountain-cultivated ginseng in Korea. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10280-7>
- Constanza, L., Ramírez, C., Galvez, Z. Y. A., & Burbano, V. E. M. (2014). *Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal.*
- Correia, M. (2007). Teoría de la conservación y su aplicación al patrimonio en tierra. *Revista de Estudios Sobre Patrimonio Cultural - Journal of Cultural Heritage Studies*, 20(2), 202–219.

- Cuevas Moreno, J. A. (2016). Los Hongos: héroes Y villanos de la prosperidad humana. *Revista Digital Universitaria*, 17(9), 1–10.
- Díaz González, A. (2015). Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie piper ADUNCUM (*piperaceae*) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas. In *Trabajo de Tesis* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fernandez, M. T. (2007). Fósforo: Amigo o enemigo. *ICIDCA*, XLI(2), 51–57.
- Fouda, A. H., Hassan, S. E. D., Eid, A. M., & Ewais, E. E. D. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.04.001>
- Gallegos Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327–332. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- Galván Quintero, B. (2018). *Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de Pinus hartwegii*. Universidad Autónoma del estado de México.
- Grover, J. K., Yadav, S., & Vats, V. (2002). Medicinal plants of India with anti diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 81–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00059-4)
- Hamza Fouda, A., El Din Hassan, S., Mohamed Eid, A., & El Din Ewais, E. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.04.001>
- Hernández Lauzardo, A. N., Bautista Baños, S., Velázquez del Valle, M. G., & Hernández Rodríguez, A. (2007). Uso de Microorganismos 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>
- Huamán de la Cruz, G. D. (2018). “Evaluación De Las Potencialidades De Los Microorganismos Asociados a Plantas Altoandinas Para Procesos De Biorremediación, Punta Olímpica - Parque Nacional Huascarán – 2016.” 62, 34–93. http://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/2449/T033_74169385_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Instituto Médico del Perú. (2018). *Plantas Medicinales*. Medicina Tradicional. <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales>
- Kumar, V., & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28(3), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s003740050497>
- Lawrence, T. R. N. and J. R. (2014). Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123(July 2015), 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>
- M. Pérez, & M. Mota. (2019). Morfología y estructura bacteriana. In *Lectura 1 - Bachelors in Computer Applications - Universidad - Nacional de Ingeniería* (Vol. 2, Issue 1, pp. 23–42).
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Freitas, H., & Zhang, C. (2016). *Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation*. 7(June), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00918>
- Manias, D., Verma, A., & Soni, D. K. (2020). Isolation and characterization of endophytes: Biochemical and molecular approach. In *Microbial Endophytes*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818734-0.00001-2>
- Medianero Burga, D. (2014). Metodología de Estudios de Línea de Base. *Pensamiento Crítico*, 15, 061. <https://doi.org/10.15381/pc.v15i0.8994>
- Montaño Arias, N. M., Sandova Pérez, A. L., Camargo Ricalde, S. L., & Sánchez Yáñez, J. M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista Ciencia y Cultura Elementos*, 77(0187–9073), 15–23. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- Munuera, G. A., & Meza, D. C. (2012). El fósforo elemento indispensable. In *Universidad tecnológica de Pereira facultad de tecnología*.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/250693>
- Olivera Gonzales, P., Espinoza Del Río, R., & Tamariz Angeles, C. (2017). Multiplicación in vitro y embriogénesis somática de *Perezia pinnatifida* (Asteraceae) planta medicinal andina. *Revista Peruana de Biología*, 24(3), 323–328. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13911>

OMS. (2010). *Medicina tradicional: Definiciones*. OMS.

https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). *Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates*. 6(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>
- Palacios Robles, E. D. (2018). “*Caracterización de la comunidad microbiana asociada a la vegetación del pasivo minero ambiental Chauapampa- Utcuyacu-Cátac y su potencial uso en la biorremediación - 2016.*” 99. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2111>
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramirez, P., & Cocha, J. M. (2003). *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica*. 10(1), 67–77.
- Sánchez Castelblanco, E. M., Heredia Martín, J. P., Buitrago Morales, S. M., & Medina Rodríguez, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36–44. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- Shekhar Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00555-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00555-2)
- Shoobridge, D. (2005). Parque Nacional Huascarán. *PARKS WATCH - Perú*, 69.
- Tamariz Angeles, C., Olivera Gonzales, P., & Santillán Torres, M. (2018). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical assessment of wild medicinal plants from Cordillera Blanca (Ancash, Peru). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(3), 270–285.
- Toghueo, R. M. K., Zabalgoceazcoa, I., Vázquez de Aldana, B. R., & Boyom, F. F. (2017). Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants Terminalia catappa, Terminalia mantaly and Cananga odorata. *South African Journal of Botany*, 109, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.021>
- Ulloa Muñoz, R. (2016). *Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos endofíticos, asociados a Valeriana sp. y Gentianella weberbaueri Gil y su uso como promotores de crecimiento vegetal. (Tesis de*

pregrado) (Vol. 1). Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo. Huaraz, Perú.

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, 126413. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126413>

Vega Celedón, P., Martínez Canchignia, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *INCA*, 37, 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>

Vigueras Morales, Y. (2019). *Proteolytic enzymes: Generalities and the importance of the fungal aspartyl proteases*. 0–3. <https://doi.org/10.35429/H.2019.4.1.15>

Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>

Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753–771. <https://doi.org/10.1039/b609472b>

ANEXOS



ANEXO N° 01

MAPA DE UBICACIÓN DE LOS PUNTOS COLECTADOS



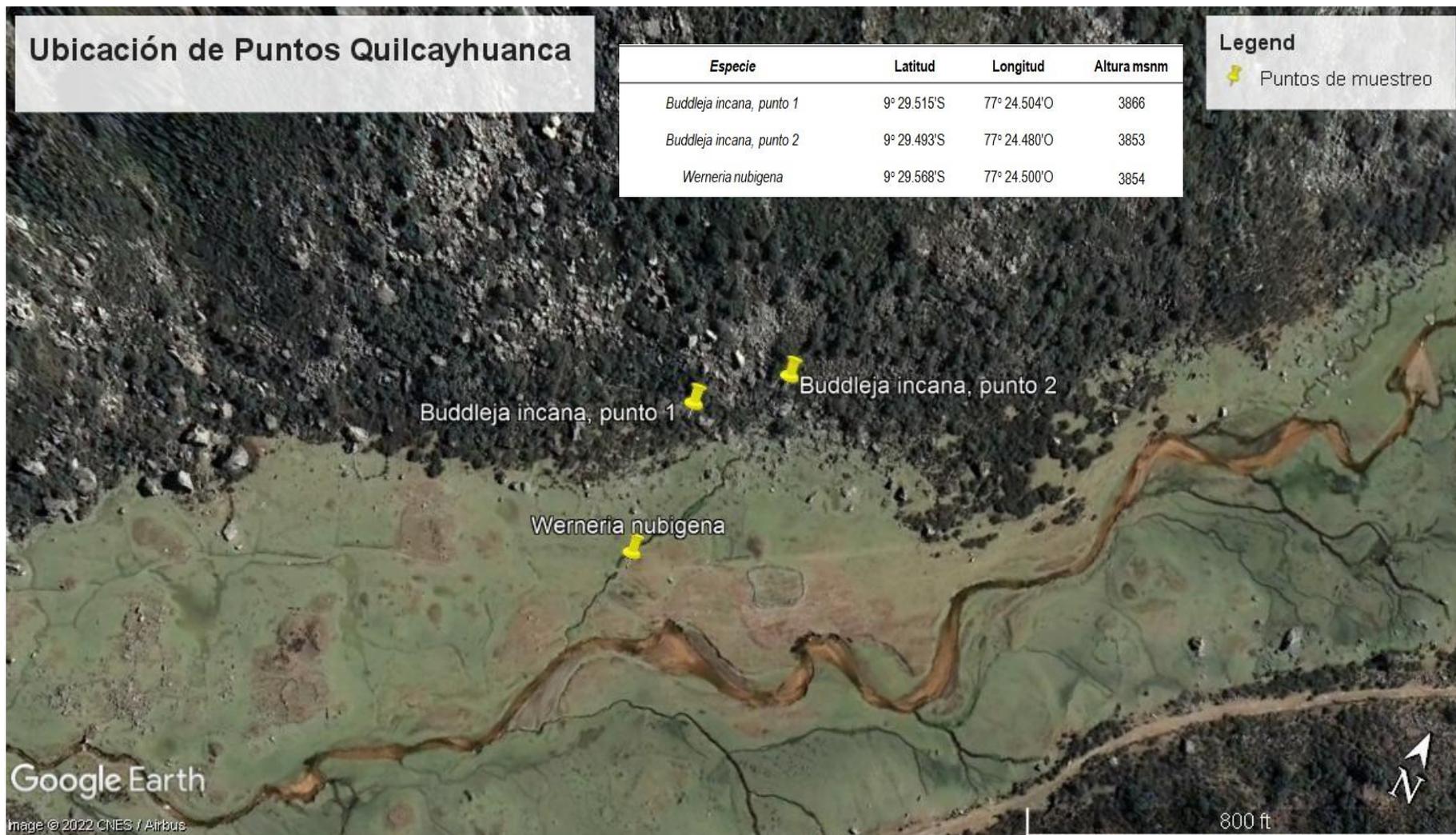


Figura 55. Puntos ubicados en la quebrada Quilcayhuanca

Ubicación de Puntos Punta Olímpica

Especie	Latitud	Longitud	Altura msnm
<i>Senecio calvus</i>	9° 7'43.48"	77°31'1.20"	4845
<i>Xenophyllum dactylophylla</i> , punto 1	9° 7'44.43"	77°31'1.16"	4858
<i>Xenophyllum dactylophylla</i> , punto 2	9° 7'47.32"	77°30'52.07"	4875
<i>Loricaria ferruginea</i>	9° 7'43.11"	77°31'1.67"	4842
<i>Perezia coerulescens</i>	9° 7'43.27"	77°30'59.22"	4814

Legend

 Puntos de muestreo

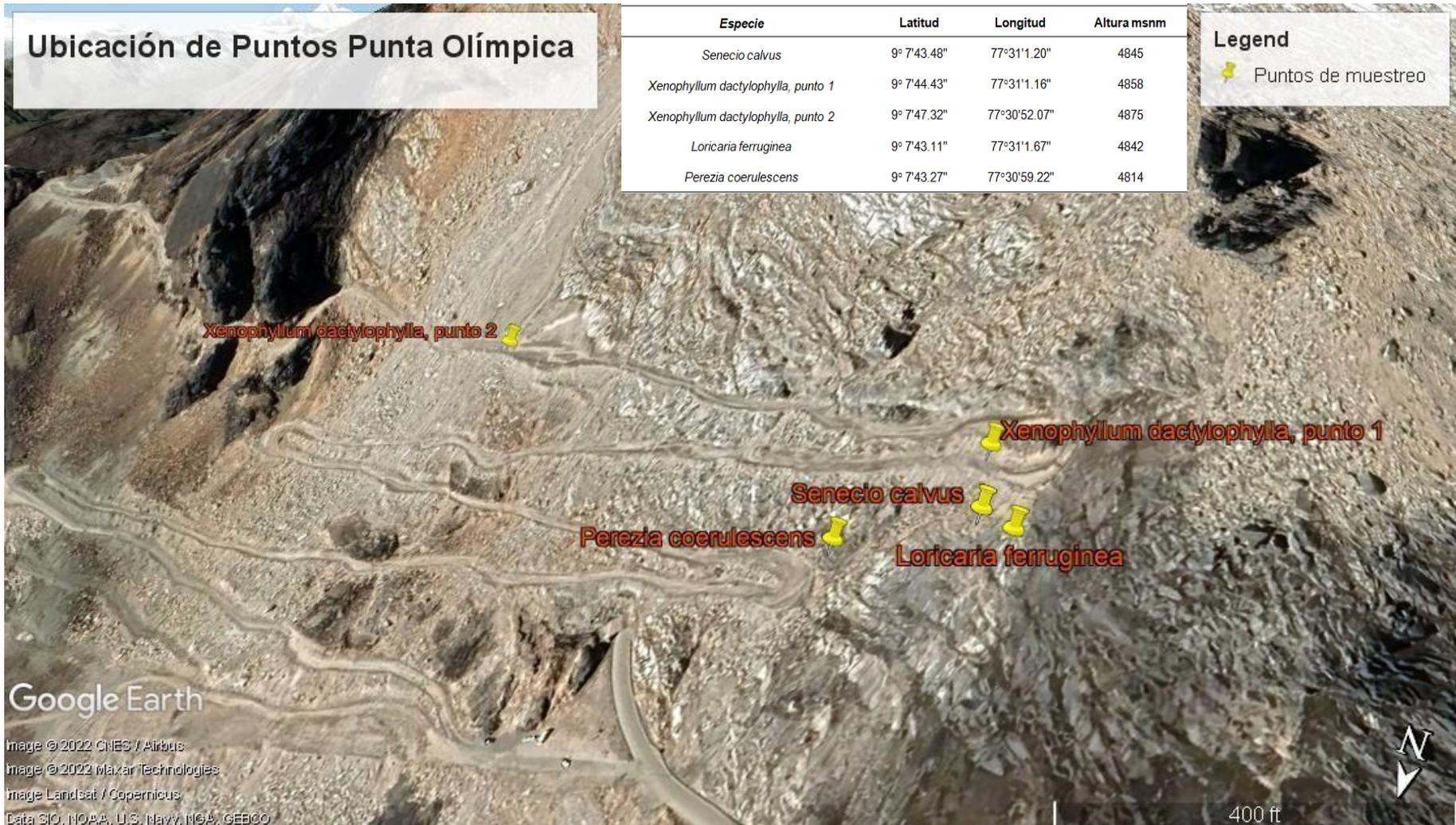


Figura 56. Puntos ubicados en la Punta Olímpica

ANEXO N° 02
CURVAS DE CALIBRACIÓN



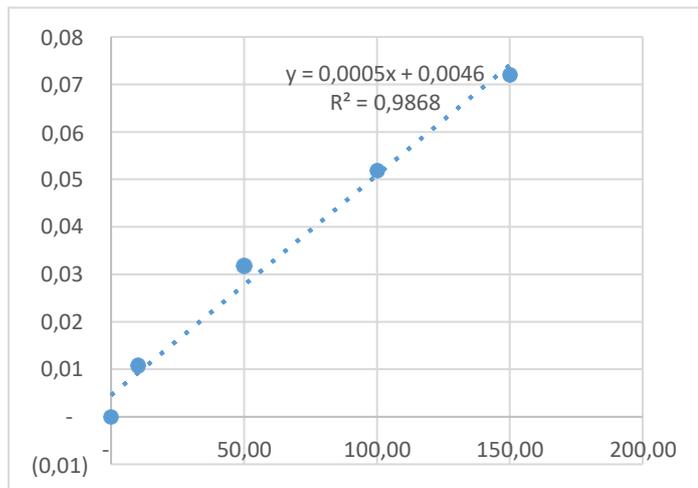


Figura 57. Curva de calibración de Acido Indol Acético (AIA)

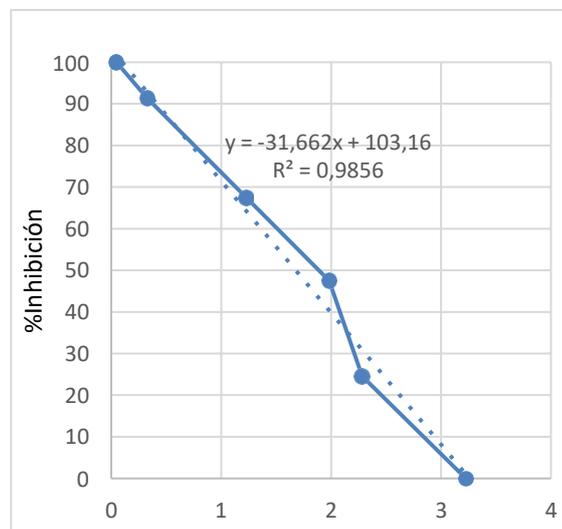


Figura 58. Curva de la calibración de la actividad antioxidante

ANEXO N° 03
PANEL FOTOGRAFICO





B

Figura 59. Fotografía de trabajo de campo y laboratorio. A: Recolección de las especies en punta olímpica, acompañada de la Dr. Tamariz, asesora de la investigación, B: Aislamiento de los hongos y bacterias endofíticas.



Figura 60. Prueba antimicrobiana de los hongos endofíticos aislados



Figura 61. Preparación de micelios para macerarlos - prueba antioxidantes (DPPH).



Figura 62. Preparación del espectrofotómetro para las pruebas.

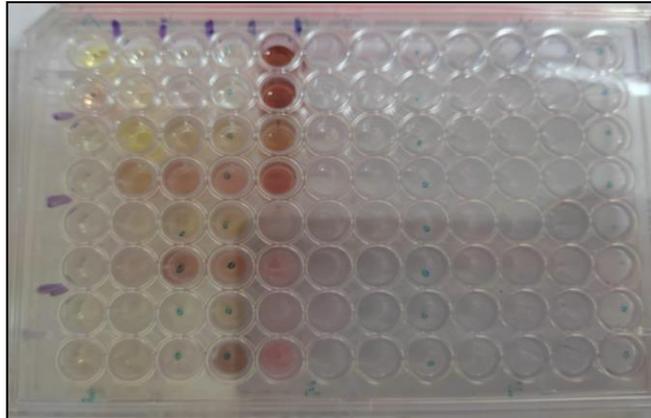


Figura 63. Fotografía de la primera prueba de descarte de AIA

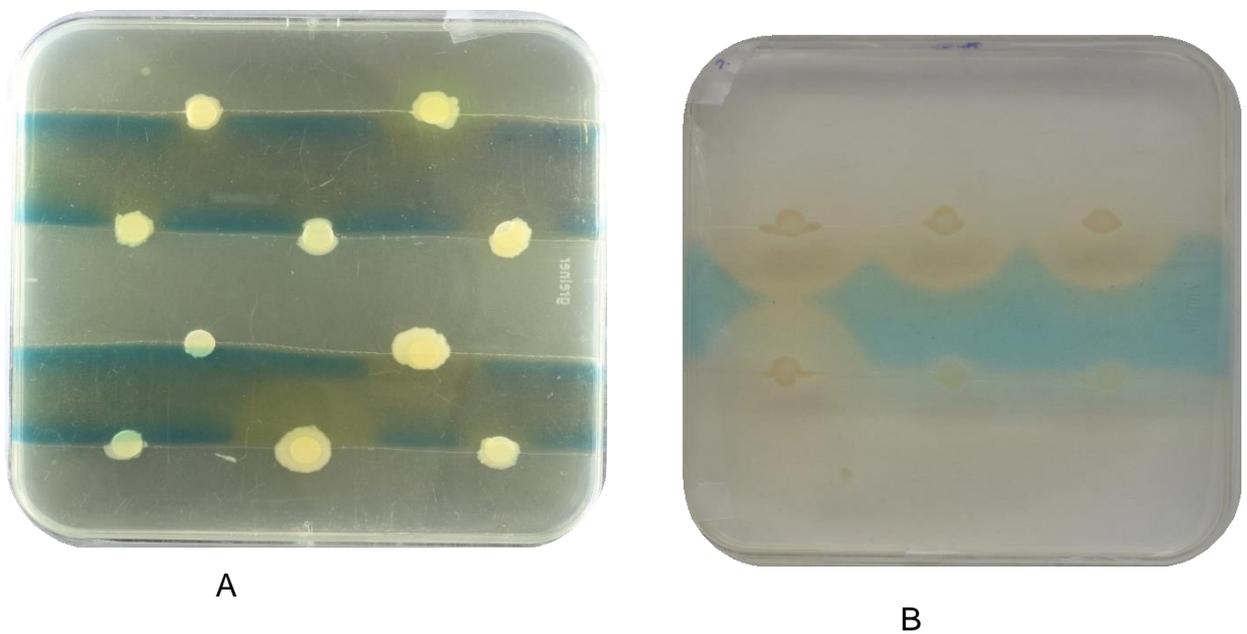


Figura 64. Fotografía representativa de los resultados de la actividad de producción de sideróforos de las bacterias endofíticas aisladas (A y B)



B

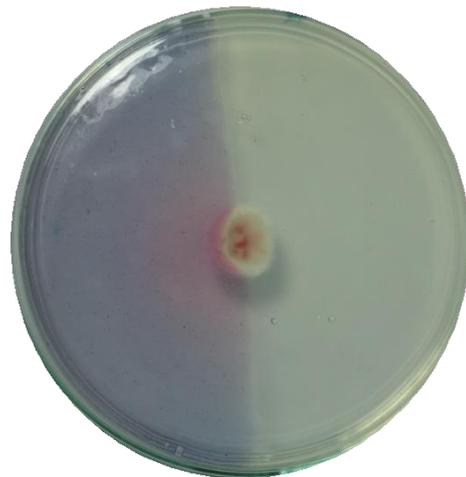
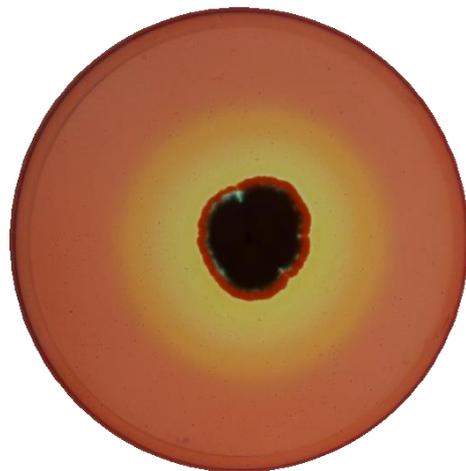


Figura 65. Fotografía representativa de los resultados de la actividad de producción de sideróforos de los hongos endofíticos aislados, A: HW48T y B: HW49



A



B

Figura 66. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad hidrolítica de carboximetil celulosa de los hongos endofíticos A: H17 Y B: HW40

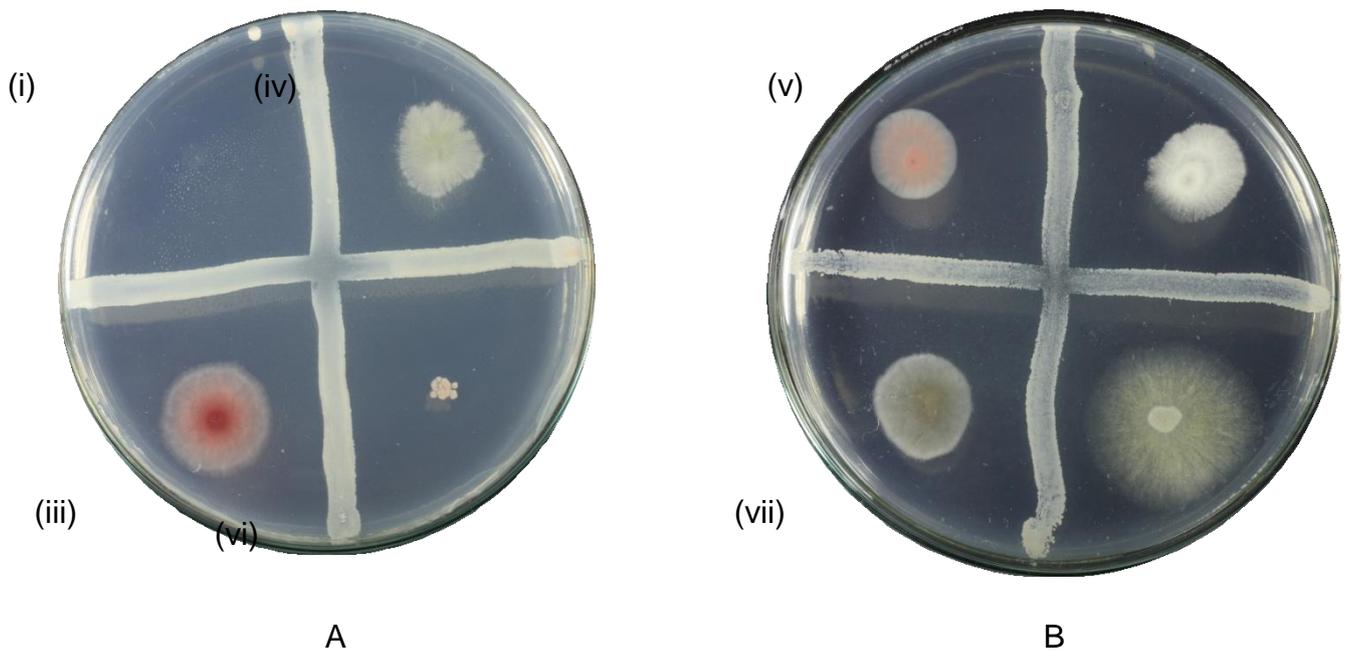


Figura 67. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad antagonística de la cepa BW53T bacterias endofíticas A: (i)Fus. geo (ii)Fus.H (iii)F.Tom (3) B: (iv)Fus 12 (v)Phy (vi)F.Tom (2) (vii)Asp.Dis

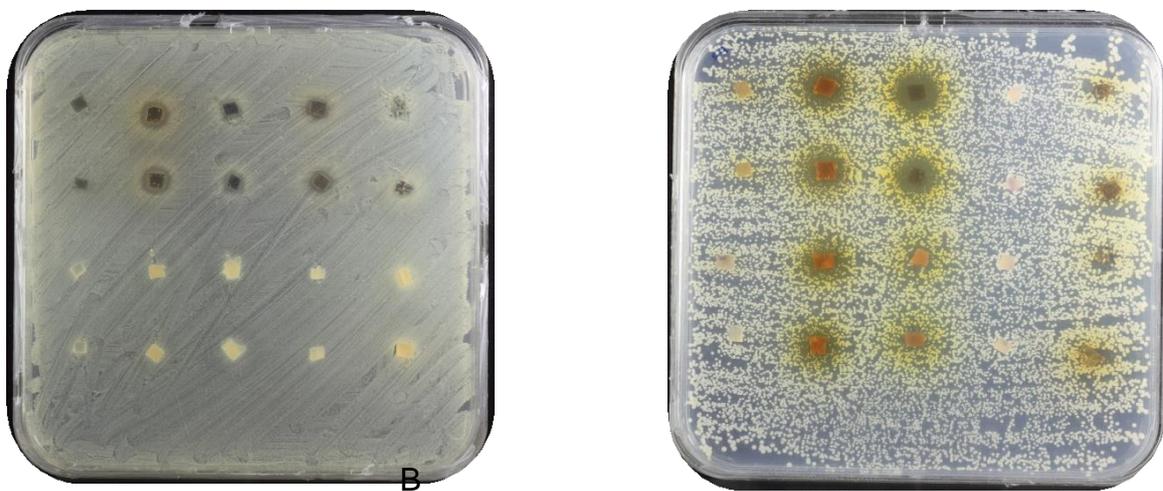


Figura 68. Fotografía representativa de los resultados de la Actividad antimicrobiana A: hongos endofíticos vs SEP13 Y B: hongos endofíticos vs CA

ANEXO N° 04

**COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS A TRAVES LA PRUEBA TUNKEY DE
LAS DIFERENTES PRUEBAS**



• SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	22	16.9475	0.77034	38.64	0.000
Error	23	0.4586	0.01994		
Total	45	17.4060			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.141200	97.37%	94.85%	89.46%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BW36H	2	1.4167	0.1179	(1.2101; 1.6232)
BW40T	2	2.000	0.000	(1.793; 2.207)
BW41T	2	1.6190	0.0673	(1.4125; 1.8256)
BW47T	2	1.375	0.177	(1.168; 1.582)
BW49Ta	2	1.625	0.177	(1.418; 1.832)
BW50T	2	1.5833	0.1179	(1.3768; 1.7899)
BW53T	2	2.429	0.000	(2.222; 2.635)
2B	2	2.700	0.141	(2.493; 2.907)
3B	2	2.458	0.295	(2.252; 2.665)
5B	2	2.250	0.000	(2.043; 2.457)
22B	2	3.000	0.000	(2.793; 3.207)
24B	2	3.600	0.000	(3.393; 3.807)



27B	2	1.500	0.000	(1.293; 1.707)
29B	2	2.000	0.000	(1.793; 2.207)
30B	2	2.667	0.000	(2.460; 2.873)
36B	2	2.333	0.000	(2.127; 2.540)
37B	2	1.500	0.236	(1.293; 1.707)
38B	2	2.000	0.000	(1.793; 2.207)
39B	2	2.125	0.177	(1.918; 2.332)
40B	2	3.042	0.412	(2.835; 3.248)
81B	2	1.500	0.000	(1.293; 1.707)
41B	2	1.500	0.000	(1.293; 1.707)
46B	2	1.500	0.000	(1.293; 1.707)

Desv.Est. agrupada = 0.141200

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
24B	2	3.600	A
40B	2	3.042	A B
22B	2	3.000	B C
2B	2	2.700	B C D
30B	2	2.667	B C D E
3B	2	2.458	C D E F
BW53T	2	2.429	C D E F
36B	2	2.333	D E F
5B	2	2.250	D E F
39B	2	2.125	E F G



38B	2	2.000	F G H
29B	2	2.000	F G H
BW40T	2	2.000	F G H
BW49Ta	2	1.625	G H I
BW41T	2	1.6190	G H I
BW50T	2	1.5833	G H I
46B	2	1.500	H I
41B	2	1.500	H I
81B	2	1.500	H I
37B	2	1.500	H I
27B	2	1.500	H I
BW36H	2	1.4167	I
BW47T	2	1.375	I

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

• PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS PARA HONGOS

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	8	6.637	0.8296	2.17	0.063
Error	27	10.308	0.3818		
Total	35	16.945			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.

S R-cuad. (ajustado) (pred)



0.617880 39.17% 21.14% 0.00%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
HW47	4	2.804	0.704	(2.170; 3.437)
HW48T	4	3.463	0.838	(2.829; 4.097)
HW49	4	3.358	0.540	(2.724; 3.992)
HW51a	4	3.500	0.408	(2.866; 4.134)
HW51b	4	2.500	0.430	(1.866; 3.134)
HE13	4	2.729	0.550	(2.095; 3.363)
HE14	4	2.333	0.000	(1.699; 2.967)
HE17	4	3.375	0.750	(2.741; 4.009)
HE28	4	3.375	0.854	(2.741; 4.009)

Desv.Est. agrupada = 0.617880

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
HW51a	4	3.500	A
HW48T	4	3.463	A
HE28	4	3.375	A
HE17	4	3.375	A
HW49	4	3.358	A
HW47	4	2.804	A
HE13	4	2.729	A
HW51b	4	2.500	A
HE14	4	2.333	A



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

• PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS PARA BACTERIAS

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	21	356.119	16.9581	65.04	0.000
Error	22	5.736	0.2607		
Total	43	361.855			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.510620	98.41%	96.90%	93.66%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BW36H	2	2.250	0.354	(1.501; 2.999)
BW49Ta	2	1.500	0.354	(0.751; 2.249)
BW50T	2	2.250	0.354	(1.501; 2.999)
BW52T	2	1.833	0.236	(1.085; 2.582)
5B	2	4.333	0.471	(3.585; 5.082)
22B	2	2.167	0.236	(1.418; 2.915)
24B	2	1.250	0.000	(0.501; 1.999)
27B	2	6.000	0.707	(5.251; 6.749)
29B	2	3.667	0.471	(2.918; 4.415)
30B	2	12.500	0.707	(11.751; 13.249)
36B	2	11.500	0.707	(10.751; 12.249)



37B	2	2.250	0.354	(1.501; 2.999)
38B	2	4.333	0.000	(3.585; 5.082)
39B	2	4.167	0.236	(3.418; 4.915)
40B	2	4.333	0.000	(3.585; 5.082)
41B	2	3.000	0.000	(2.251; 3.749)
42B	2	2.000	0.000	(1.251; 2.749)
44B	2	2.500	0.707	(1.751; 3.249)
43B	2	2.500	0.707	(1.751; 3.249)
46B	2	2.250	0.354	(1.501; 2.999)
51B	2	3.000	0.000	(2.251; 3.749)
53B	2	5.00	1.41	(4.25; 5.75)

Desv.Est. agrupada = 0.510620

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
30B	2	12.500	A
36B	2	11.500	A
27B	2	6.000	B
53B	2	5.00	B C
5B	2	4.333	B C D
40B	2	4.333	B C D
38B	2	4.333	B C D
39B	2	4.167	B C D E
29B	2	3.667	C D E F
51B	2	3.000	C D E F G



41B	2	3.000	C D E F G
43B	2	2.500	D E F G
44B	2	2.500	D E F G
46B	2	2.250	E F G
37B	2	2.250	E F G
BW50T	2	2.250	E F G
BW36H	2	2.250	E F G
22B	2	2.167	E F G
42B	2	2.000	F G
BW52T	2	1.833	F G
BW49Ta	2	1.500	G
24B	2	1.250	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- ### ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE CARBOXIMETIL CELULOSA PARA HONGOS

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	13	169.874	13.0672	20.92	0.000
Error	14	8.746	0.6247		
Total	27	178.619			

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.790380	95.10%	80.41%

Medias



Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
HW40	2	1.7418	0.0389	(0.5431; 2.9404)
HW51a	2	1.4643	0.0505	(0.2656; 2.6630)
HW51b	2	1.7841	0.0482	(0.5854; 2.9828)
HW53	2	1.600	0.000	(0.401; 2.799)
2H	2	2.571	0.000	(1.373; 3.770)
4H	2	6.333	0.000	(5.135; 7.532)
22H	2	1.13961	0.00459	(-0.05907; 2.33830)
39H	2	10.42	2.95	(9.22; 11.62)
84H	2	1.233	0.141	(0.035; 2.432)
HE14	2	1.8159	0.0427	(0.6172; 3.0146)
HE17	2	2.1611	0.0864	(0.9624; 3.3598)
HE13	2	2.1611	0.0864	(0.9624; 3.3598)
HE23	2	1.3709	0.0194	(0.1722; 2.5696)
HE28	2	2.771	0.147	(1.572; 3.970)

Desv.Est. agrupada = 0.790380

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
39H	2	10.42	A
4H	2	6.333	B
HE28	2	2.771	C
2H	2	2.571	C
HE13	2	2.1611	C
HE17	2	2.1611	C



HE14	2	1.8159	C
HW51b	2	1.7841	C
HW40	2	1.7418	C
HW53	2	1.600	C
HW51a	2	1.4643	C
HE23	2	1.3709	C
84H	2	1.233	C
22H	2	1.13961	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

• ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA PARA HONGOS

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	20	67.099	3.35494	45.42	0.000
Error	21	1.551	0.07386		
Total	41	68.650			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.271772	97.74%	95.59%	90.96%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
HW40	2	3.631	0.286	(3.231; 4.031)
HW47	2	1.2250	0.0354	(0.8254; 1.6246)
HW49	2	1.3467	0.0189	(0.9470; 1.7463)
HW51a	2	3.300	0.141	(2.900; 3.700)



HW51b	2	5.925	0.955	(5.525; 6.325)
HW53T	2	2.5000	0.0643	(2.1004; 2.8996)
HBi12H	2	1.5458	0.1120	(1.1462; 1.9455)
HBi21T	2	1.483	0.212	(1.084; 1.883)
2H	2	2.143	0.000	(1.743; 2.543)
4H	2	2.667	0.471	(2.267; 3.066)
22H	2	1.19722	0.00393	(0.79758; 1.59687)
39H	2	4.667	0.471	(4.267; 5.066)
84H	2	1.0817	0.0213	(0.6821; 1.4814)
HE13	2	1.5869	0.0892	(1.1873; 1.9865)
HE14	2	1.2896	0.0430	(0.8900; 1.6893)
HE17	2	1.4167	0.1179	(1.0170; 1.8163)
HE22	2	1.3452	0.0168	(0.9456; 1.7449)
HE23	2	1.04006	0.00227	(0.64042; 1.43971)
HE25	2	1.385	0.000	(0.985; 1.784)
HE28	2	1.5524	0.0269	(1.1527; 1.9520)
HE24	2	1.5500	0.0707	(1.1504; 1.9496)

Desv.Est. agrupada = 0.271772

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
HW51b	2	5.925	A
39H	2	4.667	B
HW40	2	3.631	B C
HW51a	2	3.300	C D



4H	2	2.667	C D E
HW53T	2	2.5000	D E F
2H	2	2.143	E F G
HE13	2	1.5869	E F G H
HE28	2	1.5524	F G H
HE24	2	1.5500	F G H
HBi12H	2	1.5458	F G H
HBi21T	2	1.483	F G H
HE17	2	1.4167	F G H
HE25	2	1.385	G H
HW49	2	1.3467	G H
HE22	2	1.3452	G H
HE14	2	1.2896	G H
HW47	2	1.2250	G H
22H	2	1.19722	G H
84H	2	1.0817	G H
HE23	2	1.04006	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA PARA BACTERIAS**

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	24	39.654	1.65224	26.48	0.000
Error	25	1.560	0.06239		
Total	49	41.213			



Resumen del modelo R-cuad. R-cuad.

	S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
	0.249777	96.22%	92.58%	84.86%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BW36H	2	2.1250	0.0589	(1.7612; 2.4888)
BW40T	2	2.490	0.564	(2.126; 2.854)
BW41T	2	2.5222	0.1100	(2.1585; 2.8860)
BW47T	2	1.800	0.283	(1.436; 2.164)
BW49Ta	2	1.417	0.354	(1.053; 1.780)
BW49Tb	2	2.453	0.145	(2.089; 2.817)
BW50T	2	2.133	0.189	(1.770; 2.497)
BW51T	2	2.595	0.572	(2.231; 2.959)
BW52T	2	2.2333	0.0471	(1.8696; 2.5971)
BW53T	2	2.539	0.338	(2.175; 2.903)
2B	2	2.9063	0.1326	(2.5425; 3.2700)
3B	2	2.6769	0.0641	(2.3131; 3.0407)
16B	2	2.0625	0.0884	(1.6987; 2.4263)
22B	2	2.625	0.530	(2.261; 2.989)
26B	2	2.3260	0.0889	(1.9623; 2.6898)
37B	2	3.143	0.000	(2.779; 3.507)
81B	2	3.429	0.000	(3.065; 3.792)
42B	2	4.000	0.000	(3.636; 4.364)
43B	2	4.000	0.000	(3.636; 4.364)
44B	2	3.250	0.000	(2.886; 3.614)



45B	2	3.571	0.000	(3.208; 3.935)
46B	2	3.800	0.000	(3.436; 4.164)
51B	2	5.750	0.354	(5.386; 6.114)
53B	2	3.667	0.000	(3.303; 4.030)
54B	2	3.105	0.276	(2.741; 3.468)

Desv.Est. agrupada = 0.249777

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
51B	2	5.750	A
43B	2	4.000	B
42B	2	4.000	B
46B	2	3.800	B C
53B	2	3.667	B C D
45B	2	3.571	B C D E
81B	2	3.429	B C D E F
44B	2	3.250	B C D E F G
37B	2	3.143	B C D E F G H
54B	2	3.105	B C D E F G H
2B	2	2.9063	C D E F G H I
3B	2	2.6769	D E F G H I J
22B	2	2.625	E F G H I J
BW51T	2	2.595	E F G H I J
BW53T	2	2.539	F G H I J
BW41T	2	2.5222	F G H I J



BW40T	2	2.490	F G H I J
BW49Tb	2	2.453	F G H I J
26B	2	2.3260	G H I J K
BW52T	2	2.2333	G H I J K
BW50T	2	2.133	H I J K
BW36H	2	2.1250	H I J K
16B	2	2.0625	I J K
BW47T	2	1.800	J K
BW49Ta	2	1.417	K

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

