UNIVERSIDAD NACIONAL "SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO"

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS, ASOCIADOS A *Valeriana sp.* Y *Gentianella weberbaueri* Gil Y SU USO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

Bach. ROCIO DEL PILAR ULLOA ALVARADO

HUARAZ - ANCASH - PERÚ

Abril - 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA - SHANCAYÁN
TELEFAX - 043 426 588 - 106
HUARAZ - PERÚ

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado de Tesis que suscriben, reunidos para escuchar y evaluar la sustentación de Tesis presentada por la Bachiller en Ciencias Agronomía, **ROCIO DEL PILAR ULLOA ALVARADO,** denominada: **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS, ASOCIADOS A** *Valeriana sp.* **Y** *Gentianella weberbaueri* Gil **Y SU USO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL".** Escuchada la sustentación y las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, la declaramos: APROBADA

CON EL CALIFICATIVO (*) SOBRESALIENTE

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

Huaraz, 22 de Abril del 2016.

M. Sc. MENDOZA VILCAHUMÁN HUGO
PRESIDENTE

Ing. M. Sc. NELLY PILAR CAYCHO MEDRANO
SECRETARIO

Dr. ESPINOZA MONTESINOS FRANCISCO
VOCAL

Ing. EUSEBIO REYES HUAMÁN
PATROCINADOR

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
CO - PATROCINADOR

(*) De acuerdo con el Reglamento de Tesis, ésta debe ser calificada con términos de: SOBRESALIENTE, MUY BUENO, BUENO Y REGULAR.

UNIVERSIDAD NACIONAL
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA - SHANCAYÁN
TELEFAX - 043 426 588 - 106
HUARAZ - PERÚ

ACTA DE CONFORMIDAD DE TESIS

Los miembros de Jurado de Tesis que suscriben, nombrados por Resolución N°035-2014-UNASAM-FCAD, se reunieron para revisar el informe de Tesis, presentado por la Bachiller en Ciencias Agronomía **ROCIO DEL PILAR ULLOA ALVARADO,** denominada: **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS, ASOCIADOS A** *Valeriana sp.* **Y** *Gentianella weberbaueri* Gil **Y SU USO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL"** y sustentada el día 22 de Abril del 2016, por Resolución Decanatural N° 143-2016-UNASAM-FCA/D, lo declaramos CONFORME.

En consecuencia queda en condiciones de ser publicada.

Huaraz, 22 de Abril del 2016.

M. Sc. MENDOZA VILCAHUMÁN HUGO
PRESIDENTE

Ing. M. Sc. NELLY PILAR CAYCHO MEDRANO
SECRETARIO

Dr. ESPINOZA MONTESINOS FRANCISCO
VOCAL

Ing. EUSEBIO REYES HUAMÁN
PATROCINADOR

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
CO - PATROCINADOR

¡A mis Padres y hermanos!
Porque juntos logramos cumplir
un objetivo más en nuestra meta.
Porque el resultado de lo que somos,
es a tu gran esfuerzo y confianza!...

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Carmen Del Rosario Tamariz Angeles, Mil veces agradecido por su persona, durante la realización de nuestro proyecto de tesis, Ud. ha sido mi mano derecha y quien me ha guiado en el complicado proceso, sin embargo gracias a su ayuda esto se ha vuelto más fácil. El resultado de la tesis ha sido espectacular y una gran parte de ese excelente trabajo se lo debo a Ud. ¡Que Dios lá bendiga!

Al Ing. Eusebio Reyes Huamán por su paciencia, consejos y guía en el proyecto de tesis.

Al Dr. Percy Olivera Gonzales por su intervención durante el proceso de la investigación.

A mis Padres: Joaquín Ulloa y Eva Alvarado, que gracias a su afán de verme profesional, he recibido todo el apoyo suficiente para emprender una carrera profesional.

A mis hermanos: Gabby Ulloa y Jesús Ulloa, que son el motivo de mi superación, por quienes le estoy luchando y lo seguiré haciendo por siempre.

A Franco Silva y familia, de quienes he recibido incondicionalmente su apoyo en todos los aspectos. Al cual estoy muy agradecida con Dios por poner en mí camino a tan grande persona.

A mis compañeros de laboratorio, Jhonny, Alberto, y Soledad, por su apoyo en la realización de algunas pruebas.

Al personal del laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias – UNASAM.

A mis jurados de tesis, por sus correcciones antes y después de la ejecución de tesis.

La presente tesis se realizó gracias al proyecto de investigación "Caracterización fitoquímica, biológica y molecular de plantas medicinales alto-andinas peruanas con potencial en la industria farmacológica" y a la subvención para tesis de pregrado otorgado por la Dirección General de Investigación de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS v

LISTA DE FIGURAS vii

RESUMEN x

ABSTRACT xii

I. INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVO GENERAL 2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2

HIPÓTESIS 2

II. MARCO TEÓRICO 3

2.1. Antecedentes de la investigación. 3

2.2. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal 4

2.3. Microorganismos endófitos promotoras de crecimiento vegetal 7

2.4. Caracterización molecular de microorganismos 8

2.5. Definición de términos básicos 9

III. MATERIALES Y MÉTODOS 10

3.1. Área de estudio 10

3.2. Materiales 10

3.3. Equipos 12

3.4. Métodos 13

3.5. Procedimiento y parámetros a evaluar 14

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 26

4.1. Aislamiento de microorganismos endófitos 26

4.2. Caracterización taxonómica de los microrganismos 26

4.3. Caracterización morfológica de hongos 30

4.4. Caracterización molecular de hongos 30

4.5. Evaluación *in vitro* de actividad de solubilización de fosfato de calcio 33

4.6. Determinación de la producción de ácido indol acético (AIA) 34

4.7. Evaluación de actividad celulolítica 36

4.8. Actividad antagónica de las cepas de microorganismos frente a *Fusarium oxysporium.* 38

4.9. Producción de sideróforos 40

4.10. Prueba de inoculación *in vitro* en Trigo. 42

V. CONCLUSIONES 49

VI. RECOMENDACIONES 50

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

ANEXO 61

ANEXO 1. Mapa de ubicación de puntos de colecta de muestras. 62

ANEXO 2. Medios y soluciones utilizados en diferentes pruebas 63

ANEXO 3. Fotografías de los métodos aplicados en la parte experimental 65

ANEXO 4. Fotografías de las evaluaciones cualitativas de las diferentes pruebas aplicadas en promotores de crecimiento vegetal 67

ANEXO 5. Análisis estadísticos aplicados a las diferentes pruebas de promoción de crecimiento vegetal 78

ANEXO 6. Pruebas de comparación de Duncan de las diferentes pruebas. 81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias endófitas aisladas de plantas de interés agrícola y su función dentro de la planta 3

Cuadro 2. Puntos de colección de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil 15

Cuadro 3: Número de cepas aisladas por muestra 26

Cuadro 4: Reporte de los resultados de las pruebas bioquímicas 26

Cuadro 5. Código, identificación taxonómica de bacterias endófitos aislados 27

Cuadro 6. Código, identificación morfológica de hongos endófitos aislados 30

Cuadro 7: Soluciones de medios utilizados en la caracterización morfológica de hongos. 63

Cuadro 8: Composición del medio NBRIP modificado 63

Cuadro 9: Composición de la solución nutritiva Fahraeus 64

Cuadro 10: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de solubilización de fosfato en bacterias 78

Cuadro 11: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de la actividad celulolitica de hongos endófitos 78

Cuadro 12: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo del F. Oxysporium en la actividad antagónica 78

Cuadro 13: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de coloración por la producción de sideroforos de hongos endófitos 78

Cuadro 14: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 48 horas. Inoculadas con bacterias endófitas. 79

Cuadro 15: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 72 horas. Inoculadas con bacterias endófitas. 79

Cuadro 16: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo de trigo, después de 5 días de trasplantadas al solución Farhaeus inoculas con bacterias endófitas. 79

Cuadro 17: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo y biomasa del trigo, a 10 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas 79

Cuadro 18: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 48 horas. Inoculadas con hongos endófitas. 79

Cuadro 19: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 72 horas. Inoculadas con hongos endófitas 80

Cuadro 20: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo de trigo, a 5 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas 80
Cuadro 21: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo y biomasa del trigo, a 10 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas 80
Cuadro 22: Prueba de Duncan en la formación de halo de solubilización de fosfato de bacterias endófitas 81
Cuadro 23: Prueba de Duncan en la formación de halo de actividad celulolitica de hongos endófitas 81
Cuadro 24: Prueba de Duncan en la formación de halo de crecimiento de colonia de F. oysporium en la actividad antagónica con bacterias endófitas 81
Cuadro 25: Prueba de Duncan en la formación de halo de coloración por la producción de sideroforos con hongos endófitas 82
Cuadro 26: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 48 horas inoculadas con bacteria 82
Cuadro 27: Prueba de Duncan en la longitud de raíz de trigo después de 72 horas, inoculadas con bacteria 82
Cuadro 28: Prueba de Duncan en la longitud de tallo de trigo después de 5 días de trasplantado, inoculadas con bacteria endófitas 83
Cuadro 29: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 10 días de trasplantado, inoculadas con bacteria endófitas 83
Cuadro 30: Prueba de Duncan en la biomasa de trigo después de 10 días de trasplantada inoculadas con bacterias endófitas 83
Cuadro 31: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 48 horas inoculadas con hongos endófitos 84
Cuadro 32: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 72 horas inoculadas con hongos endófitos 84
Cuadro 33: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 5 días de trasplantadas, inoculadas con hongos endófitos 84
Cuadro 34: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 10 días de trasplantadas, inoculadas con hongos endófitos 85
Cuadro 35: Prueba de Duncan en la biomasa total de trigo a 10 días de ser trasplantada. Inoculadas con hongos endófitos 85

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Diagrama general del proyecto de tesis a seguir. 14

Fig. 2. Árbol filogenético de la secuencia 16S ADNr, de las cepas bacterianas aisladas de *Gentianella weberbaueri* Gil y *Valeriana sp.* y sus respectivas especies relacionadas del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 28

Fig. 3. Árbol filogenético de la secuencia 16S ADNr, de las cepa VT28B aislado de Veleriana sp. y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 29

Fig. 4. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas VT22H y VT25H aislados de Valeriana sp. y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 31

Fig. 5. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas VT22H y VT25H aislados de *Valeriana sp.* y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). 32

Fig. 6. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas GT28H aislados de Gentianella weberbaueri Gil y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). 32

Fig. 7: Corresponde formación el halo por cepas de (A), Rahnella sp. GT24B; Pseudomonas trivialis VT20B (B) y negativo (C) 33

Fig. 8. Curva de calibración del ácido indol-3-acetico (AIA) 35

Fig. 9. Concentraciones de AIA, producidos por bacterias endófitas 35

Fig. 10: Índice de degradación de CMC con cepas de hongos endófitos 37

Fig. 11: Índice de inhibición de F. oxysporium. 39

Fig. 12: Índice de inhibición del crecimiento de Fusarium oxysporium 40

Fig. 13: Índice de formación de halo de producción de Sideroforos de hongos endófitos. 41

Fig. 14. Porcentaje de germinación de trigo inoculado. 42

Fig. 15: Índice de elongación de raíz de trigo inoculada con cepas de bacteria a 48 y 72 horas. Los valores corresponden al promedio de 20 repeticiones. 43

Fig. 16: Índice de elongación de raíz de trigo inoculada con cepas de hongo endófitos a 48 y 72 horas 44

Fig. 17: Índice de elongación de tallo de 5 y 10 días del trasplante, inoculadas con bacterias endófitas 46

Fig. 18: Índice de biomasa de la planta de Trigo, inoculadas con bacterias endófitas..... 46
Fig. 19: Índice de elongación del tallo de trigo a 5 días, inoculadas con hongos endófitos 47
Fig. 20: Índice de biomasa de la planta entera de Trigo, inoculadas con hongos endófitas. 48
Fig. 21: Actividad antagónica de bacterias; A: Siembra de bacterias en estrías sobre PDA, B: Inoculación de F. oxysporium en discos..... 65
Fig. 22: Caracterización morfológica: Siembra de hongos endófitos sobre medio CYA, MEA y YES..... 65
Fig. 23. Producción de Sideroforos: Siembra de hongos endófitos sobre medio nutritivo y agar azurol. 66
Fig. 24. Inoculación de cepas bacteriana: A, Cuantificación del inoculo, B, Siembra de trigo, después de la inoculación, sobre agar agua 66
Fig. 25. Prueba de cuantificación de AIA: A, adición de Triptofano al medio nutritivo (PDB/7); B, inoculación de cepa de hongo al medio suplementado con triptófano..... 66
Fig. 26: Corresponde a macrofotografías tomados en tres medios de cultivos microcultivo de hongos de Pyrenochaeta gentianicola GT20H..... 67
Fig. 27: Las macrofotografías corresponden a la cepa Pyrenochaeta gentianicola GT23H. 68
Fig. 28: Corresponde a la macrofotografías de Pyrenochaeta sp GT24H, desarrolladas en diferentes medios de cultivo. 69
Fig. 29: Corresponde a la Cepa *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H. 70
Fig. 30: Corresponde a la Cepa clasificado como hongo endófito VT22H. 71
Fig. 31: Corresponde a la Cepa identificado como Cryptococcus watticus VT25H,..... 72
Fig. 32. Pruebas bioquímicas de bacterias endófitas: A, prueba de LIA, B, prueba de citrato y C, prueba de rojo de metilo. 73
Fig. 33: Las cepas que resultaron positivas a esta prueba fueron: VT19B, VT24B, VT25B, VT34B Y GT25B, correspondientes a la especie: Rahnella sp, Rouxiella aff. Chamberiensis, Rahnella inusitata, Rahnella sp. respectivamente..... 73
Fig. 34: Prueba de Siderofos de hongos endófitos: la coloración purpura indica la presencia de este compuesto, D: Hongo endófito VT22H, F: Pyrenochaeta gentianicola GT23H, G: Pyrenochaeta sp. GT24H y H: Scleroconidioma sphagnicola GT28H, muestras esta capacidad. 74

Fig. 35. Evaluación de la actividad celulolítica: Formación del halo alrededor y debajo de las colonias de hongos endófitos. 75
Fig. 36. Inoculación de bacterias endófitas: Evaluación de longitud de raíz, después de 48 horas de siembra. 76
Fig. 37. Evaluaciones de trigo. 77

RESUMEN

Se colectaron dos plantas altoandinas: *Gentianella weberbaueri* Gil y *Valeriana sp* de la Quebrada de Churup, Huaraz – Perú a 4 500 msnm. Se aislaron los microorganismos a partir tejidos internos de la raíz y hojas de las plantas desinfectadas superficialmente.

Se aislaron, ocho bacterias y seis hongos endófitos, de los cuales solo trece fueron identificados. La identificación taxonómica molecular de las bacterias, fue mediante el análisis del 16S ADNr; y para el caso de hongos del ITS molecularmente. Todos los microorganismos endófitos, fueron sometidos a diferentes pruebas a fin de evaluar su efecto en la promoción de crecimiento vegetativo.

La evaluación de su actividad biológica de las bacterias endófitas aisladas, mostró que la cepa *Rahnella inusitata* VT25B produjo 61,5 µg/ml de Ácido Indol-3-acetico (AIA), siendo una de las mejores cepas de esta prueba, además se demostró que tiene un índice de antagonismo de 28%. Así mismo la cepa *Rahnella sp* VT34B produjo 45,1 µg/ml de AIA e inhibió el crecimiento de *F. oxysporium* en 68%. Mientras que *Rouxilla aff. chamberiensis* VT24B solo dio positivo en la prueba de AIA produciendo 43,1 µg/ml. De acuerdo a los resultados obtenidos la mejor cepa en inhibir el crecimiento del patógeno *F. oxysporium*, responsable de múltiples enfermedades, le corresponde a la cepa *Rahnella sp.* GT24B, aislado de *Gentianella weberbaueri* Gil, inhibiendo su crecimiento al 100%, además, esta cepa tiene la capacidad de solubilizar fosfato de calcio, obteniendo el índice máximo con 3,43 de IPS, seguido de *Pseudomonas trivialis* VT20B con 3,04 de IPS. Cabe recalcar que todas las cepas bacterias endófitas no mostraron actividad celulolítica (CMC) ni producción de sideróforos.

Por el contrario los hongos endófitos mostraron actividad en: Identificación de producción de sideróforos, considerándose al hongo endófito VT22H como la mejor cepa, formando un halo de coloración de 34 mm de diámetro, seguido de *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H con 25,75 mm, esta misma cepa tiene la capacidad de degradar celulosa, en cuya prueba mostró un índice de 1,99 de formación de halo alrededor y debajo de la colonia, seguida por *Cryptococcus watticus* VT25H con índice de 1,82.

En la prueba de inoculación en semillas de trigo, no hubo diferencias significativas entre los controles y las plantas inoculadas.

Estos resultados demuestran que los microorganismos endófitos aislados de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil poseen una gran capacidad de promover el crecimiento vegetativo y podrían ser útiles para el proceso de inoculantes microbianos aplicados en la agrobiotecnología.

PALABRAS CLAVES: *Valeriana sp.*, *Gentianella weberbaueri* Gil, identificación taxonómica molecular, microorganismos endófitos, promoción de crecimiento vegetativo.

ABSTRACT

Two altoandinas plants were collected: *Gentianella weberbaueri* Gil and *Valeriana sp* Quebrada de Churup, Huaraz - Peru 4 500 msnm. Microorganisms were isolated from the internal tissues of roots and leaves of plants disinfected surface.

Were isolated, eight bacteria and six fungi endófitos, of which only thirteen were identified. The molecular taxonomic identification of bacteria, was by 16S rDNA analysis; and in the case of molecularly ITS fungi. All microorganisms were subjected to various tests to assess their effect on the promotion of vegetative growth.

The evaluation of biological activity of endophytic bacteria isolated showed that the strain *Rahnella inusitata* VT25B produced 61,5 µg/ml of indole-3-acetic acid (IAA), being is one of the best strain of this test, also demonstrated having an index of antagonism of 28%. Likewise the strain *Rahnella sp* VT34B, produced 45.1 µg/ml IAA and inhibited the growth of *F. oxysporium* to 68%. While *Rouxilla aff. chamberiensis* VT24B only gave positive test AIA producing 43,1 µg/ml. According to the results the best strain to inhibit growth of the pathogen F. oxysporium, responsible for multiple diseases, it is up to the strain *Rahnella sp.* GT24B, isolated from *Gentianella weberbaueri* Gil, inhibiting their growth by 100%, in addition, this strain has the ability to solubilize calcium phosphate, obtaining the maximum rate to 3,43 IPS, followed by *Pseudomonas trivialis* VT20B with IPS of 3,04. It should be noted that all bacteria strains endophytes showed cellulolytic activity (CMC) or siderophore production.

Conversely endophytes showed activity in: Identification of siderophore production, considering endophyte fungus VT22H as the best strain, forming a halo of color 34mm diameter followed *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H with 25,75 mm, the same strain has the ability to degrade cellulose, whose test showed an index of 1,99 halo formation around and under the colony, followed by *Cryptococcus watticus* VT25H with index of 1,82.

In the inoculation test wheat seeds, there were no significant differences between controls and inoculated plants.

These results demonstrate that endophytes microorganisms isolated from Valeriana sp. Gentianella weberbaueri and Gil have a great capacity to promote vegetative growth and may be useful for the process of microbial inoculants used in agricultural biotechnology.

KEY WORDS: *Valeriana sp, Gentianella weberbaueri* Gil, molecular taxonomic identification, endophyte microorganisms, promotion of vegetative growth.

I. INTRODUCIÓN

Actualmente la gran mayoría de cultivos agrícolas dependen de los fertilizantes químicos sintetizados, los cuales proporcionan nutrientes asimilables por las plantas, buscando optimizar los procesos de producción. El uso indiscriminado de fertilizantes químicos, ocasiona contaminación de cuerpos de agua y suelos, sumando al incremento de los costos de producción y el impacto negativo en la salud humana. Es así que ha surgido el interés por el empleo de inoculantes microbianos promotoras de crecimiento vegetal, estas pueden ser rizosféricas, diazotrofas, endófitos, etc.

Los microorganismos endófitos son los aislados de tejidos vegetales desinfectados superficialmente y extraídos del interior de la planta (Hallman *et al.,* 1997; Schulz & Boyle, 2006), que colonizan espacios intercelulares, intracelulares y vasculares en tejidos de plantas sin expresar signos de patogenicidad o proporcionar algún beneficio. (Wang *et al.*, 2006). Considerando que los microorganismos endófitos se encuentran en contacto íntimo con las plantas, estos podrían brindar beneficios más directos hacia su hospedero, además confieren un poder adaptativo a especies vegetales frente a condiciones adversas que generen estrés ya sea de tipo biótico y abiótico.

Frente a ellô, el Perú puede ser fuente de una alta diversidad de poblaciones de microorganismos endófitas, debido a los diferentes ecosistemas que posee y a la riqueza de especies vegetales, como es el caso de plantas altoandinas que viven frente a condiciones adversas de baja de disponibilidad de nutrientes y habitan en zonas frías, de las cuales aún se desconoce su uso potencial.

Es así que en nuestro grupo de trabajo, han causado gran interés sobre el estudio de los microorganismos endófitos promotoras de crecimiento vegetal, aislados de dos plantas: *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil recolectadas de una zona altoandina de la región de Ancash.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar molecularmente los microorganismos endofíticos asociados a *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil y su uso como promotores de crecimiento vegetal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extraer microorganismos endofíticos a partir de hojas y raíces de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil.
- ✓ Identificar molecularmente a través de marcadores moleculares, para bacterias a través de la región 16S rDNA y de hongo del ITS.
- ✓ Clasificar taxonómicamente los microorganismos endófitos asociados a *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil, que mostraron actividad promotora de crecimiento vegetal.
- ✓ Evaluar el efecto de la inoculación de microorganismos endófitos promotores de crecimiento vegetal, sobre la germinación y crecimiento en plantas de trigo *Triticum aestivum* ssp. *Aestivum* cultivar Centenario, modelo de rápido crecimiento; en condiciones de *in vitro*.

HIPÓTESIS

Los microorganismos endofíticos aislados de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil, influencian en el crecimiento vegetativo de la planta.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación.

La aplicación de inoculantes microbianos promotoras de crecimiento vegetal, ha constituido una alternativa ecológica que permite la obtención de mayores rendimientos y la conservación del medio ambiente. Actualmente existe un gran interés por el estudio de microorganismos endófitos, ya que estas se asocian a una gran cantidad de plantas; hasta la fecha se han aislado más de 10 000 microorganismos endófitos de plantas herbáceas y árboles (Martínez *et al.,* 2010).

Estudios indican que los microorganismos endófitas ejercen control biológico sobre fitopatógenos (Sessitch *et al.,* 2002), promueven el crecimiento en las plantas hospederas (Tsavkelova *et al.,* 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Hurek & ReinholdHurek, 2003), solubilización de fosfato (Hameeda *et al.*, 2008) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Berg *et al.,* 2005). En el cuadro 1. Se muestran algunos cultivos de los cuales se han aislado bacterias endófitas y su posible función dentro de la plantas (Muñoz & Caballero 2003).

Cuadro 1. Bacterias endófitas aisladas de plantas de interés agrícola y su función dentro de la planta.

PLANTA	REFERENCIA	BACTERIAS ENDOF.	ORIGEN	FUNCION
Arroz	Chantreuli *et al.,* 2000	- *Bradyrhizobium japonicum* - *Rhizobium leguminosarum* - *Serratia marcescens*	Filipinas Brasil México	PGPB
Maíz	Rosenblueth *et al.,* 2006 Araújo *et al.*, 2001	- *Burkholderia sp.* - *Enterobacter sp.* - *Klebsiella sp.* - *Bacillus megaterium*	México Brasil	Fitorremediación promueve resistencia al tolueno
Papa	Azevedo *et al.,* 2008 Sturtz 1995	- *Sinorhizobium meliloti* - *Pseudomonas sp.*	Brasil Austria	PGPB Protección contra patógenos
Cítricos	Araújo *et al.,* 2001	- *Curtobacterium flacumfaciens* - *Enterobacter cloacae* - *Bacillus sp.* - *Nocardia sp*	Brasil	Resistencia a infecciones de patógenos
Caña	Jiménez- Salgado *et al.,* 1997	- *Gluconobacter diazotrophicus* - *Herbaspirillum sp*	México	Fijación de nitrógeno Crecimiento de la planta

Lo anterior demostró que un gran número de géneros y especies bacterianas se pueden encontrar en diferentes plantas brindando un beneficio a su hospedero, siendo importante para las actividades agrícolas del Perú y del mundo.

2.2. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

En los últimos años se han descrito una gran diversidad de microorganismos que aportan múltiples beneficios al crecimiento de las plantas. Entre los mecanismos reportados como formas de promoción del crecimiento se encuentran los siguientes:

1. **Fijación biológica de N_2** (FBN). El nitrógeno es el principal elemento nutricional esencial para el desarrollo y productividad de los cultivos, siendo el fósforo el segundo elemento de importancia para el crecimiento de las plantas (Vessey, 2003; Khan *et al.*, 2007). Así mismos la fijación biológica del nitrógeno atmosférico por bacterias diazotróficas, es el segundo proceso más importante después de la fotosíntesis que se realiza en la naturaleza (Silvia *et al.,* 1998). En la ausencia de fertilizantes nitrogenados o residuos de animales, la dinámica de los agroecosistemas depende completamente de un grupo de microorganismos que tienen la habilidad para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, a través de la síntesis de un complejo enzimático denominado nitrogenasa. Este nitrógeno orgánico es convertido a diferentes formas químicas, las cuales pueden ser utilizadas por las plantas y por los mismos microorganismos para suplir total o parcialmente sus requerimientos de síntesis de proteínas y otros compuestos orgánicos (Geisseler *et al.*, 2010).
2. **Producción de fitohormonas.** Los microorganismos fitoestimulantes poseen la habilidad de alterar la estructura y morfología de las raíces y promover el desarrollo y crecimiento de las plantas gracias a la producción de fitohormonas (Kloepper, *et al.,* 2007). Las fitohormonas son compuestos de diferente naturaleza química, producidas por plantas y microorganismos (particularmente bacterias) que al actuar como moléculas son capaces de regular los eventos fisiológicos de las plantas en concentraciones extremadamente bajas (Javid, *et al.,* 2011). Dentro de este tipo de compuestos, las auxinas, giberelinas, citoquininas y el etileno han sido ampliamente

estudiados en relación al desarrollo de las plantas (Glick, 2012). Las auxinas y el ácido giberélico (representante de las giberelinas) han sido descritos como inductores de la elongación de las células de la raíz y de procesos de diferenciación en células vegetales. Ambos tipos de compuestos están involucrados en el incremento de la longitud y número de raíces y pelos radiculares (Glick, 2012).

Las auxinas son compuestos derivados del triptófano, que regulan un amplio repertorio de procesos asociados al desarrollo de las plantas (Spaepen & Vanderleyden, 2010), sin embargo el rol que cumplen en los microorganismos ha sido menos investigado. Se ha propuesto que esta clase de moléculas, particularmente el Ácido 3-Indol Acético (AIA), funciona como una molécula señal en algunos microorganismos teniendo en cuenta que estas moléculas generan cambios en la expresión genética bacteriana (Spaepen, *et al.*, 2007).

3. **Solubilización de fosfato.** El fosforo es uno de los nutrientes esenciales más importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus etapas fisiológicas, además de formar parte de biomoléculas vitales para la planta, pero es a la vez el elemento que se encuentra en menor disposición, debido a que la forma soluble de fósforo presente en los fertilizantes químicos, a menudo es precipitado después de la aplicación y convirtiéndose en formas insolubles, y no disponibles para las plantas (Días *et al.*, 2008). Es posible que las bacterias endófitos incrementen la capacidad de las plantas para absorber los nutrientes del suelo, mediante la solubilización de los fosfatos (Li *et al.*, 2007) inorgánicos insolubles como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y fosfato de roca (Goldstein, 1986), dejando una fuente disponible para los vegetales.
4. **Biocontrol de fitopatógenos,** es otro mecanismo por el que las bacterias promueven el crecimiento vegetal. Los mecanismos indirectos son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes patógenos que interfieren con el desarrollo de la planta. Fitopatógenos como hongos y bacterias son neutralizados por diversos mecanismos, como competencia por espacio o nutrientes, o también producción de metabolitos antibióticos,

secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los patógenos (Reyes *et al.,* 2008).

- Actividad celulolitica

  Las celulosas han sido implicadas en los mecanismos de entrada de los microorganismos a los tejidos internos de las plantas. (Hallman *et al.*, 1997), han propuesto que las enzimas celulíticas producidas por microorganismos endófitos contribuyen a los procesos de infección en las plantas (Bekri *et al.*, 1999). Es de suponer que en el proceso de colonización microbiana al penetrar y dañar los tejidos de las plantas, la misma active sus genes de defensa para protegerse de los endófitos. De hecho varios estudios demuestran que cuando las plantas son inoculadas con PGPRs aumentan su resistencia, provocando cambios fisicoquímicos (Anderson & Guerra, 1985; Zdor & Anderson, 1992). Por otro lado, (Verma *et al.*, 2001) indican que las enzimas hidrolíticas podrían ser producidas por los endófitos solo durante las etapas tempranas de la invasión y no mientras residen en los tejidos de las plantas.

- Sideroforos

  Existe una hipótesis que explica el papel de los sideróforos en el biocontrol de patógenos. Plantea que las rizobacterias suprimen la enfermedad, convirtiendo al hierro III en un factor limitante mediante el secuestro de este, inhibiendo de este modo el crecimiento de patógenos en la rizosfera privando, por lo tanto, a los patógenos de este micronutriente vital. (Schroth, & Hancock, 1982). Cuando el sideróforo se acopla con el hierro, este último se hace inaccesible para los microorganismos patógenos que no posean los receptores proteicos específicos para reconocer al complejo y que, además, no tengan mecanismos propios tan efectivos de adquisición de hierro (Ardon, *et al.*, 1998). La producción de sideróforos puede ser detectada por diversos métodos, uno de ellos es por medio del CAS (Cromo Azurol S), desarrollado por Schwyn y Neilands (Klumpp *et al.,* 2005). El ensayo CAS se basa en la gran capacidad que tienen los sideróforos de secuestrar el hierro, en este caso, acomplejado débilmente con un agente colorante, que permite observar la producción de sideróforos a simple vista.

Los microorganismos pueden beneficiar el crecimiento de las plantas mediante la combinación de varios de los mecanismos mencionados (Dobbelaere *et al.*, 2003).

2.3. Microorganismos endófitos promotoras de crecimiento vegetal

La palabra endófito deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta. En 1866, Barry fue el primero en utilizar este término, al referirse a hongos vivientes dentro de los tejidos de una planta (Petrini, 1986). Hoy en día el término endófito se refiere a los microorganismos aislados de tejidos vegetales desinfectados superficialmente o extraídos del interior de la planta (Hallman *et al.* 1997; Schulz & Boyle, 2006), que colonizan espacios intercelulares, intracelulares y vasculares en tejidos de plantas sin expresar patogenicidad o proporcionar algún beneficio. (Wang *et al.* 2006). El mecanismo de colonización de estos microorganismos hacia su hospedero, Reinhold - Hurek & Hurek, 1998, citado por Pérez, *et al.* 2009, consideran la hipótesis de que se originaron de semillas, de la rizosfera, de filoplano o de material utilizado para la propagación vegetativa (La penetración a la planta puede ocurrir por los estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, siendo que estas endófitas puede producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (Mccully, 2002, citado por Pérez, *et al.* 2009.)

Varios estudios confirman que las plantas hospedan diversas comunidades endófitas (Idris *et al.,* 2004; Krechel *et al.*, 2004, Berg *et al.*, 2005) y que casi todas las bacterias endófitas derivan de la rizósfera (Sesstch *et al.*, 2002, Hardoim *et al.,* 2008). Las bacterias endófitas son encontradas en raíces, tallos, hojas y semillas, aunque en muchas plantas la mayor concentración de endófitos se encuentran en las raíces (Santi *et al.*, 2013).

En la rizósfera existe una gran diversidad de bacterias, lo cual ocasiona que en este ambiente exista una competencia fuerte por los nutrientes y en consecuencia que su disponibilidad sea limitada, con base a eso se ha considerado que las bacterias endófitas pueden tener algunas ventajas competitivas sobre bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de los nutrientes es mayor en el interior de

la planta y el número de microorganismos endófitos es menor que los rizosféricos y patógenos (James, 2000; Muñoz & Caballero, 2003).

Considerando que los microorganismos endófitos se encuentran en contacto íntimo con las plantas, estos podrían brindar beneficios más directos hacia su hospedero, considerando que mejoran el crecimiento de las plantas que puede ser por mecanismos directos e indirectos. Directamente es posible que incremente la capacidad de las plantas de absorber los nutrientes del suelo, mediante el incremento y desarrollo de raíces, ayudando a la solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de sideróforos quelantes de hierro, producción de fitohormonas de crecimiento de la planta, producción de enzimas celulolíticas. Mecanismos indirectos incluyen la inhibición de los microorganismos que tienen un efecto negativo en la planta (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

2.4. Caracterización molecular de microorganismos

La caracterización molecular de una especie, se refiere al estudio específico que permite la identificación y diferenciación entre especies, mediante el uso de marcadores moleculares, los cuales pueden ser a nivel del DNA, RNA o proteíco, además su importancia permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los microrganismos, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de los microrganismos (Rodicio & Mendoza, 2003).

Así mismo, Orberá, (2004), menciona que la técnica estándar para la identificación bacteriana o fúngica es la secuenciación de regiones de DNA, con la suficiente variabilidad como para discriminar entre una especie y otra, además los segmentos más comúnmente amplificados y posteriormente secuenciados se encuentran los genes ribosomales (16S en procariotas y 18S en eucariotas).

Para el caso de los hongos, se requiere la secuenciación de los genes ribosomales (ADNr) y de sus espacios internos transcritos, ITS (Internal Transcribed Spacer) u otras regiones variables dentro de los genes conservados, es así que se usa la

región ITS del ADN ribosomal, que de acuerdo a la electroforesis de los productos del PCR, los fragmentos amplificados concuerdan con el tamaño de la región ITS1 – ITS2, lo cual es frecuentemente necesario para la identificación taxonómica precisa.

2.5. Definiciones de términos básicos

- **Caracterización molecular:** Permite la identificación del microorganismo a través del estudio se su ADN, la identificación molecular basada en su ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, el ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo y permite conocer las características de los microorganismos (Veterinaria, 2002).

- **ARNr 16S:** Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nt, codificado con el gen r r s, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio y Mendoza, 2004).

- **PCR:** La reacción en cadena de polimerasa o PCR, permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN. El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar (Pérez de Castro, 2011).

- **ANÁLISIS FILOGENÉTICO:** Es una clasificación científica de las especies basada únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva entre distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación (filogénesis) desde el origen de la vida en la Tierra hasta la actualidad (López & Pérez, 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La preparación del material y los ensayos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Biología, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo".

3.2. Materiales

3.2.1. Material biológico

A. Material vegetal

- *Valeriana sp.* (Hoja y raíz)
- *Gentianella weberbaueri* Gil (Hoja y raíz)
- Semillas de trigo *Triticum aestivum* ssp. *Aestivum* Cultivar Centenario

B. Microorganismos

- Cepa de *Fusarium oxysporium.*

3.2.2. Medios de cultivos

- Agar sabouraud (AS)
- Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- Papa dextrosa agar (PDA)
- Czapek dox agar (ACZ)
- Agar czapek extracto de levadura (CYA)
- Extracto de malta agar (MEA)
- Levadura Sacarosa Extracto de agar (YES)
- Carboximetil Celulosa (CMC)
- Agar Malta (AM)
- Caldo Sabouraud (CS)
- Caldo Tripticasa de Soya (TSB)
- Potato dextrose broth (PDB)

3.2.3. Reactivos y soluciones

- Solución NBRIP
- Solución nutritiva de Fahraeus (1 957)
- Solución Agar Cas (Chrome azurol)
- Glicerol
- Agua destilada estéril
- Etanol 96°
- Peptona, glucosa y Extracto de levadura
- Agar Agar, Phytagel SIGMA
- L-Triptófano
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)
- Reactivo Salkowsky ($HClO_4$ + $FeCl_3$)
- $Ca_3(PO_4)_2$ (Fosfato tricálcico)
- $MgSO_4.7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado)
- $MgCl_2.6H_2O$ (Dicloruro de magnesio exahidratado)
- $NaHPO_4$
- KCl (Cloruro de potasio)
- $(NH_4)_2SO_4$ (Sulfato de amonio)
- TRIPTON x-100 0,01%
- $CaCl_2$ (Dicloruro de calcio)
- $NaCl_2$ (Dicloruro de sodio)
- KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico)
- Citrato férrico
- H_3BO_3 (Ácido bórico)
- $MnSO_4.4H_2O$ (Sulfato de manganeso tetrahidratado)
- $ZnSO_4.7H_2O$ (Sulfato de zinc heptahidratado)
- $CuSO_4.5H_2O$ (Sulfato de cobre pentahidratado)
- $NaMoO_4.2H_2O$ (Molibdato se sodio dihidratado)
- $HgCl_2$ (Dicloruro de mercurio)
- Modificador de pH: HCl, NaOH o KOH
- Tween 20
- Lejía, jabón líquido

3.2.4. Material de vidrio, de laboratorio y otros

- Placa Petri 100x15, 60x15 mm – DURAN GROUP
- Matraces Erlenmeyeres 300, 500 y 1000 mL – ISOLAB
- Probeta 50, 100, 500 y 1000 mL – BOROSIL GERMANY y FORTUNA
- Pipeta 5 y 10 mL – BOECO GERMANY
- Beakers 120, 250 y 500 mL – SCHOTT DURAN
- Tubos de ensayo 160x16 mm
- Viales de 10 mL, Tips de 100 – 1000 µL, 1 – 10 ml
- Tubos para microcentrifuga de plástico 1,5 mL
- Embudos de vidrio, Micropipeta – OXIPET
- Timer, Gradillas, Barra de agitación
- Frascos de vidrio 200 mL, Envase de vidrio 250 mL
- Gotero de plástico, Papel filtro, Morteros
- Sacabocado de bronce N° 2, pinzas y tijeras
- Parafilm, Pisceta, tampones de algodón
- Papel aluminio, bond, craft, cola, bolsa polietileno 10x15
- Guardapolvo blanco, gorro, guantes y mascarilla

3.3. Equipos

- Balanza analítica PW214 - AEADAM® y OHRUS
- Cámara de flujo laminar - LOGIC LABCONCO
- Autoclave PB – PHOENIX LUTERCO Y TELSTAR V 30/70
- Microcentrifuga – SPECTRAFUGE 16 M
- Multiuso rotador – THERMO SCIENTIFIC
- Destilador de agua
- Vortex mixer – LABNET INTERNATIONAL
- Microornda – LG
- Estufa a 24 y 28 °C - TDI y UNCUCELL MMM GROUP
- Agitador magnético – IKA® C-MAG HS 7 y HS 4
- pH metro y pH ise benchtop – THERMO SCIENTIFIC
- Estufa – MEMMERT

- Freezer quick reference – 86 C° - THERMO SCIENTIFIC
- Espectrofotómetro
- Refrigerador – INDURAMA, LG LIFE'S GOOD
- Congelador – ELECTROLUX
- Cámara fotográfica - SONY 18.2 MP
- Computadora

3.4. Métodos

3.4.1. Tipo de estudio

Se trata de una investigación aplicativa de nivel descriptivo, según la captación de la información es prospectivo y según la población es longitudinal.

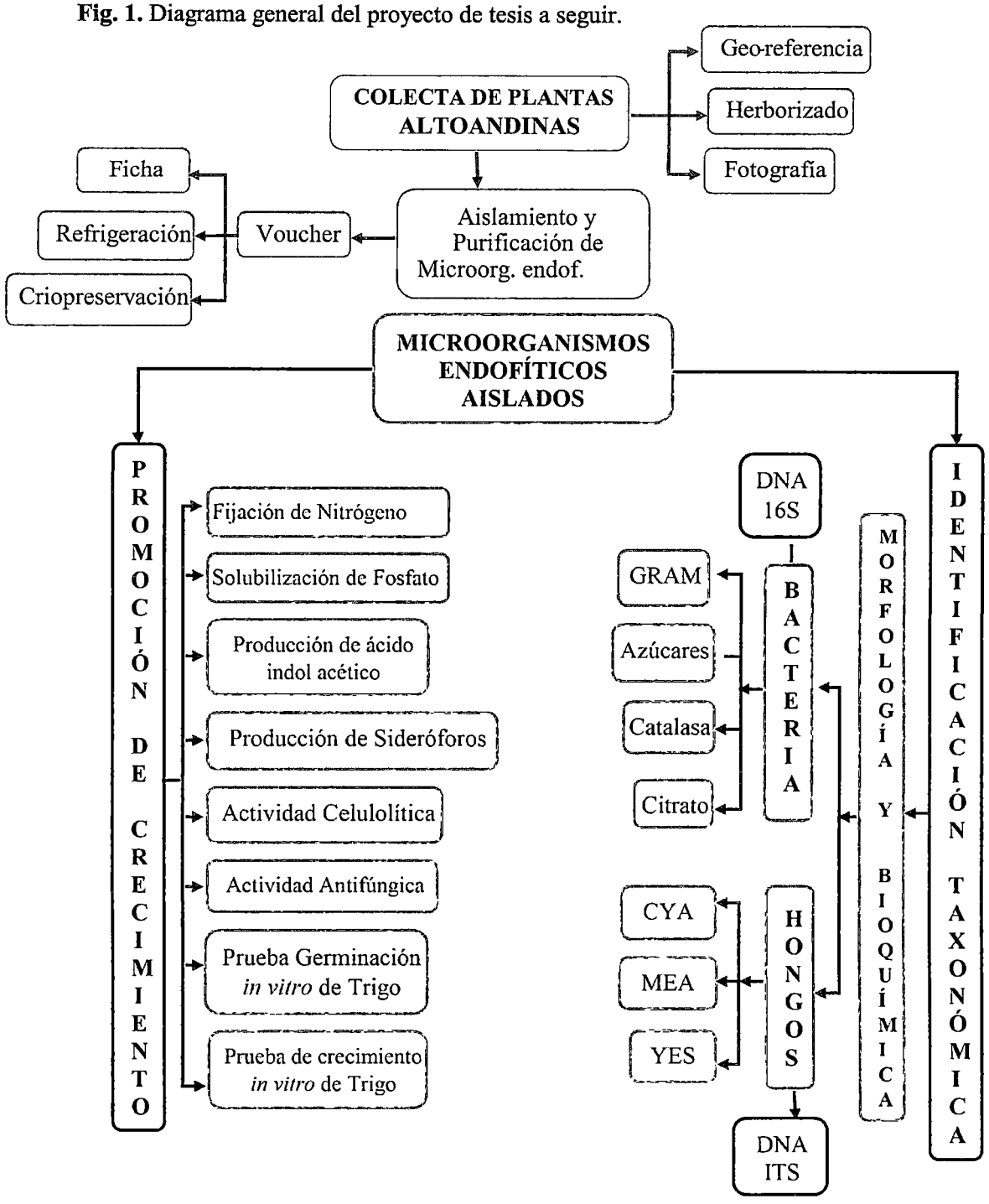
3.4.2. Procesamiento estadístico

Se aplicó el análisis de varianza ANOVA de un factor, de clasificación unidireccional con efectos paramétricos, además se realizó la prueba de comparación de medias de Duncan (ρ = 0,05), los tratamiento y repeticiones dependen del tipo de pruebas realizadas.

3.5. Procedimiento y parámetros a evaluar

3.5.1. Diagrama general del trabajo

Fig. 1. Diagrama general del proyecto de tesis a seguir.



3.5.2. Colecta de muestras.

Las muestras fueron colectadas a la altura de la Quebrada de Churup-Huaraz, en los siguientes puntos de muestreo:

Cuadro 2. Puntos de colección de *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* Gil

Puntos Muestreo	ESTE	NORTE	ESPECIE	ALTITUD (m.s.n.m.)
1	-9,476193	-77,424225	*Valeriana sp*	4695 m
2	-9,477544	-77,424934	*Gentianella weberbaueri*	4624 m
3	-9,477670	-77,425070	*Gentianella weberbaueri*	4662 m
4	-9,477983	-77,425400	*Gentianella weberbaueri*	4645 m
5	-9,478728	-77,426210	*Gentianella weberbaueri*	4608 m
6	-9,480086	-77,427160	*Gentianella weberbaueri*	4530 m
7	-9,480005	-77,427120	*Gentianella weberbaueri*	4531 m

El tipo de muestreo empleado fue no probabilístico e intencional, donde las muestras representativas fueron plantas que no mostraron signos de enfermedad. Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel kraft que fueron previamente esterilizados, posteriormente fueron mantenidas en conservadoras a 4°C.

3.5.3. Aislamiento de microorganismos endófitos

a. Limpieza, selección, desinfección y siembra.

Las plantas fueron lavadas bajo el agua corriente y con jabón líquido a fin de eliminar impurezas, posteriormente se seleccionaron 4 hojas y una raíz por planta, estas fueron seccionadas en fragmentos de 1 a 2 cm.

Los fragmentos de hoja y tallos se desinfectaron por inmersión en agitación manual por 10 minutos con solución $HgCl_2$ al 0,1% más 6 gotas de Tween 20, seguido de 3 lavados por 5 minutos con agua destilada estéril.

Los fragmentos desinfectados fueron sumergido por 60 segundos en 3 ml de Caldo Sabouraud (CS) para descartar falsos positivos

de endofíticos, posteriormente fueron retirados a una placa Petri y seccionados en 2 partes iguales, una fue usada para aislar hongos y otro para aislar bacterias.

Para el aislamiento de hongos de usó Agar Sabouraud (AS) suplementado con los antibióticos streptomicina 50ul/ml y tetraciclina 50ul/ml; y para bacterias el medio Agar Tripticasa de Soya Agar (TSA) suplementado con Flunoconazol al 100 ul/ml.

Los fragmentos sembrados en TSA, AS y CS en el que fueron sumergidos los fragmentos, se incubaron por 10 días a 24°C.

b. Aislamiento de microorganismos endófitos

El aislamiento de las cepas se hizo mediante observación morfológica por diferenciación de: color y aspecto. Las colonias diferentes fueron picadas y sembradas por estrías en placas con AS en el caso de hongos y de bacterias en TSA. Esta operación se realizó hasta obtener las cepas puras. Finalmente fueron sembradas por duplicados en tubos inclinados en medio nutritivo e incubadas a 24°C durante 24 horas para bacterias y de 5 a 7 días para hongos y posteriormente almacenados a 4°C para su posterior evaluación *in vitro* en diferentes pruebas.

3.5.4. Caracterización morfológica.

a. Bacterias

Las bacterias se cultivaron en TSB incubadas a 24°C durante 24 horas se realizó pruebas bioquímicas de las cepas.

b. Hongos

Se prepararon suspensiones de esporas en una solución de agar semisólido: 0,05% de agar, 30% de glicerol y 0,05% de Tween80 (según Pitt ,1979).

Se inoculó 0,5 µl de la suspensión en placas Petri de 100 mm con Agar Czapek autolisado de levadura (CYA), Agar extracto de malta (MEA) y Agar extracto de levadura sacarosa (YES). Las placas de YES y MEA, fueron conservadas a 24°C y CYA a 30°C durante 7 días.

Se utilizaron otros medios alternativos como: Agar Sabouraud (AS) y Agar papa dextrosa (PDA), incubadas a 24°C por 7 días.

3.5.5. Caracterización molecular de los microorganismos

3.5.5.1. Extracción de ADN, amplificación y secuencimiento de ITS del ADNr de hongos.

Los hongos se cultivaron en 15 ml de CS, se incubó por 5 a 7 días a temperatura ambiente y rotación orbital de 130 rpm. Se recuperó el micelio por centrifugación a 13400 rpm por 2 minutos en microtubos de 2 ml.

El pellet contenido el micelio fue utilizado para la extracción del ADN, utilizando el Kit AxyPrep Multisource Genomic Miniprep (Axigen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La amplificación mediante PCR y el secuenciamiento se realizó en el Canadian Center DNA Barcoding (CCBD), donde se amplificó la región ITS del ADN ribosomal. Se utilizó los primers ITS5 e ITS4 y el protocolo descrito por CCBD. La amplificación se verificó mediante electroforesis de ADN revelado con bromuro de etidio.

3.5.5.2. Análisis de secuencias e identificación taxonómica

La limpieza y el análisis de secuenciamiento se realizó mediante el programa Codon Code. Las secuencias consenso obtenidas, fueron utilizadas para la determinación taxonómica mediante BLASTN del NCBI (The National Center for Biotechnology Information U. S. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Según Rossello-Mora & Amman (2001) nos sugiere que para la asignación taxonómica al nivel de especie, con base a la comparación de secuencias de este gen, se debe guardar una similitud mayor al 97,5% mientras que para la identificación a nivel de género se requiere del 85% hasta 95% con la mejor secuencia relacionada.

El análisis filogenético usando secuencias obtenidas del Genbank y las obtenidas en el trabajo se realizó con los programas de Neighbor-Joinnig con 1000 y Kimura 2-parámetros.

3.5.5.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del 16S ADNr de bacterias.

Para la extracción se utilizó 1 ml de cultivo fresco en medio TSB incubadas a 24 °C durante 24 horas, se centrifugó en microtubos de 1,5 ml a 1300 rpm por 2 minutos. El ADN genómico contenido en el pellet se extrajo con el Kit AxyPrep Bacterial Genomic Miniprep (Axigen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La amplificación mediante PCR se realizó mediante la metodología descrita por Tamariz *et al.*, (2014). Se utilizaron los primers 24f y 1492r. La amplificación fue confirmada mediante electroforesis de ADN rebelado con bromuro de etidio.

El secuenciaiento se realizó en la empresa Macrogen Korea Inc. Utilizando los primers 518F y 800R.

3.5.5.4. Análisis de secuencias e identificación taxonómica.

Se realizó utilizando el mismo protocolo descrito para hongos, teniendo en consideración el gen 16S ADNr.

3.5.6. Evaluación *in vitro* de actividad de solubilización de fosfato de calcio.

La evaluación cualitativa de la solubilización de fosfato de los aislados, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nautiyal, (1999).

a. En bacterias

En la evaluación de la solubilización con bacterias se usó el medio NBRIP con Ca_3PO_4 como fuente de fosforo insoluble a pH 7. Se prepararon inóculos jóvenes con 0,08 de densidad óptica a 620 nm, los cuales fueron embebidos en papel filtro estéril y sembradas en placas de Petri. Como control se usó discos de papel filtro con agua destilada estéril, se incubaron durante 72 horas a 24°C hasta la aparición de halos alrededor de la colonia.

b. En hongos

En caso de hongo, al medio NBRIP se suplementó con Tripton X-100 al 0.1%. Se usaron discos de 5 mm de diámetro del micelio del hongo y se sembraron con 4 réplicas por placa. Las placas fueron incubas en oscuridad a 24°C durante 72 horas.

La capacidad de solubilizar fosfato de calcio, para ambos casos, se determinó por el diámetro de formación del halo transparente alrededor y debajo de la colonia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IPS = \frac{A}{B}$$

Dónde:

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

B: Diámetro de la colonia (Kumar & Narula, 1999)

3.5.7. Producción de ácido indol acético (AIA).

a. En bacterias

La prueba se realizó utilizando una modificación del método descrito por (Bent et al 2001, Montañez, 2012).

Las colonias bacterianas fueron sembradas en tubos de ensayo de 15 x 2.5 contenido 4 ml de TSB suplementado con 2 mg/ml de L-Tryptophan, 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 (10 ml 35% $HClO_4$ + 200 µl FeCl3) (Loper & Schroth, 1986) y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente.

b. En hongo

La prueba se determinó utilizando una modificación del método de Gordon & Weber (1951). Se inocularon 5 mm de diámetro del micelio de hongo fresco en 4 ml de 1/7 Potato dextrose broth (PDB) suplementado con 2 mg/ml de L-tryptophan y se incubaron durante 7 días a 30°C. Después de la incubación se extrajo 1 ml del caldo en un microtubo y se centrifugó por 2 minutos a 1300 rpm, posteriormente se separó el sobrenadante y se mezcló en 100 µl del sobrenadante con 100 µl de reactivo Salkowski en una microplaca, finalmente se dejó incubar por 20 minutos.

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; dado que dentro de este rango se encuentran los valores promedio de producción de AIA reportados (Anwar, 2000; Ahmad *et al.,* 2005).

3.5.8. Evaluación de actividad celulolítica.

Se usó la metodología descrita por Gutiérrez (2013).

a. En bacteria

La prueba fue evaluada en placas con medio de cultivo 0,6% TSB, 0,1% de carboximetilcelulosa (CMC), 1,5% de Agar agar. En cada placa se sembraron 3 réplicas de discos de papel filtro embebido con cultivos frescos y puros bacterianos, crecidas en medio TSB y un control (discos de papel embebido con agua destilada estéril).

b. En hongo

La capacidad de los hongos aislados de hidrolizar celulosa fue evaluada en placas con medio de cultivo modificado, con PDB (20% de papa, 0.5% glucosa), 0,1% de carboximetilcelulosa (CMC), 1,5% de Agar agar. Se extrajeron discos de micelio de hongos sembrados en AS y se inocularon sobre el medio CMC con 3 réplicas por placa y un control con agar agua.

Las placas fueron incubadas a 24°C durante 4 días. El revelado de los halos se hizo agregando una solución de Rojo Congo al 0.1% por 10 minutos en rotación orbital a 120 rpm y se lavó 3 veces con NaCl al 1M por 10 minutos.

La capacidad de degradar celulosa de las cepas fue estudiada por la formación de halos de degradación de estos compuestos en medio de cultivo sólido. La actividad hidrolítica de cada sustrato se

expresó como el diámetro del halo de degradación siguiendo la siguiente fórmula:

$$Indice\ Ac.Celulolitica = \frac{A}{B}$$

Dónde:

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

B: Diámetro de la colonia

3.5.9. Actividad antagónica de las cepas de microorganismos frente a *Fusarium oxysporium.*

Se usaron inóculos frescos del patógeno *F. oxysporium* sembrados en medio de cultivo PDA, luego se prepararon discos de 5 mm de diámetro del micelio.

Para la actividad antagónica se utilizó el medio de cultivo AS en placas de 100x15 mm.

a. Antagonismo: Bacteria endofiticos - *Fusarium oxysporium.*

Se prepararon cultivos jóvenes bacterianos en TSA, luego se prepararon suspensiones de 0,08 de densidad óptica en solución salina al 0.8%. Las suspensiones fueron sembradas con hisopos estériles en estrías cubriendo toda la superficie de la placa.

Sobre las placas inoculadas con bacteria se sembraron 4 discos del micelio de hongo, se utilizó como control el crecimiento aislado de *F. oxysporium* en una placa.

Para obtener el índice de antagonismo se midió diámetro de crecimiento del hongo en presencia del antagonista y sin la bacteria, luego se sacó la relación entre en porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula (Idris *et al.,* 2007):

$$\% \, Inh. Halo = \frac{A}{B}$$

Dónde:

A: Promedio del diámetro de la colonia de control - diámetro de la colonia del antagonista.

B: Promedio del diámetro de la colonia de control

b. Antagonismo: Hongos endófitos - *Fusarium oxysporium.*

Se inoculó un disco micelial del hongo endófito fresco a un extremo de la placas Petri de contenido AS, después de 3 días se inoculó un disco de *F. oxysporium.* Las placas fueron conservadas por 9 días a 24°C.

La actividad antagónica de los aislados se determinó a través de mediciones del diámetro de crecimiento del *F. oxysporium* crecidas en placas controles menos el diámetro de la colonia del hongo en presencia del antagonista. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición.

3.5.10. Prueba de detección de Sideróforos en microorganismos endófitos.

La prueba cualitativa se realizó de acuerdo al método aplicado por Schwyn & Neilands (1987) con algunas modificaciones. En ambos microorganismos se usó la solución reveladora CAS que indica la producción de este metabolito mediante un cambio de coloración en el medio, de azul a naranja.

a. En bacterias

Se usaron dos medios de cultivos en la misma placa, una mitad de Agar CAS (Solución reveladora) y en la otra con TSA (medio nutritivo), la siembra se realizó en estrías en medio de los dos

Agares con inóculos frescos de bacteria. Se realizó dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas por 72 horas a 24 °C.

b. En hongos

En una misma placa se usaron el Agar CAS (Solución reveladora) y en la otra con AS (medio nutritivo), se inoculó en medio de la placa con un disco micelial de 7 días, se realizó dos replicas por cepa.

Las placas fueron incubadas por 7 días a 24 °C.

3.5.11. Prueba de inoculación *in vitro* en Trigo.

Se usó la metodología aplicada por Montañez *et al.,* (2012)

a. Efecto de la inoculación en semillas para su elongación de raíz.

Las semillas de trigo se esterilizaron superficialmente con 0.1% de $HgCl_2$ durante 10 minutos, seguido de 5 lavados con agua destilada estéril por 5 minutos.

Inmediatamente después de esterilizar las semillas se sumergieron 20 semillas en 2 ml del inóculo bacteriano a las concentraciones finales de 10^6 CFU/ml (cultivos puros de cepas bacterianas cultivados en TSB, diluidas en solución salina al 0.8%), durante 30 minutos en condiciones estériles.

En caso de hongos, las cepas se diluyeron en Agua destilada estéril con 0.1% de Tween 20 y se realizó el recuento en Cámara de Neubauer, obteniendo cantidades muy bajas a nulas de esporas, encontrando solo micelio de los hongos, por lo que las semillas fueron inoculadas con micelio durante 40 minutos.

En ambos cosas, diez semillas inoculadas se transfirieron asépticamente a placas de agar agua con dos replicadas por tratamiento. Para su germinación, las placas de ambas cepas fueron incubadas en oscuridad a una temperatura de 24°C durante 72 horas.

Se evaluó la elongación de la radícula a 48 horas y a 72 horas. Los datos obtenidos para los diferentes tratamientos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) comparando las medias de los tratamientos mediante la prueba de Duncan ($\rho \leq 0.05$). Estos análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 21.

b. Efecto de la inoculación *in vitro* en plantas.

Las semillas germinadas previamente inoculadas, se transfirieron asépticamente a tubos de vidrio 20x2.5 cm con 10 ml de solución Farheus-N libre modificado (ANEXO N° 02), se mantuvo a temperatura constante de 20 ± 2°C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, la densidad de flujo de fotones emitidos por lámparas fluorescentes fue de 1300 lux.

Se evaluó la longitud del tallo a los 5 días de trasplantado. Las raíces y los brotes de las plantas fueron cosechadas después de 10 días y las variables ecofisiológicas a evaluar fueron: Longitud del tallo y raíz, biomasa seca de la planta.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Aislamiento de microorganismos endófitos

En total se obtuvieron 14 microorganismos entre hongos y bacterias, provenientes de tejidos de las plantas: *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri Gil.* El cuadro 3, presenta el resumen de los microorganismos encontrados por muestra. De los 14 microorganismos aislados se han identificado 6 hongos filamentosos y 8 bacterias.

Cuadro 3: Número de cepas aisladas por muestra

Microorganismos	Número de cepas aisladas			
	Valeriana sp.		*Gentianella weberbaueri* Gil	
	Hojas	Raíz	Hoja	Raíz
Hongos filamentosos	-	2	-	4
Bacterias	-	6	-	2
Total	**-**	**8**	**-**	**6**

Las bacterias endófitas son encontradas en raíces, tallos, hojas y semillas, aunque en muchas plantas la mayor concentración de endófitos se encuentra en las raíces (Santi *et al.*, 2013), esto explicaría el resultado del aislamiento de los microorganismos solo de raíces.

4.2. Caracterización taxonómica de los microrganismos

4.2.1. Caracterización morfológica de bacterias

Se aislaron un total de 8 bacterias, en el cuadro 4, muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

Cuadro 4: Reporte de los resultados de las pruebas bioquímicas

Código	**Catalasa**	**Rojo De Metilo**				**Indol**	**Citrato**	**LIA**	**Urea**	**Gelatina**
		Gluc.	**Fruct.**	**Sac.**	**Lac.**					
VT19B	+	-	-	-	-	-	+	A/A	-	-
VT20B	+	+	+	+	+	-	+	K/K	-	+
VT24B	+++	-	-	-	-	-	+	K/A	-	+
VT25B	++	-	-	-	-	-	-	K/A	-	-
VT28B	+	+	-	+	+	-	-	K/K	-	+
VT34B	+++	-	-	-	-	-	+	A/A	-	-
GT24B	+	+	+	+	+	-	+	A/A	-	+
GT25B	+	-	-	-	-	-	-	K/A	-	-

4.2.2. Caracterización molecular de bacterias

Se realizó la identificación molecular mediante el análisis del gen 16S de DNA. De acuerdo a la electroforesis de los productos de PCR, los fragmentos amplificados concuerdan con el tamaño del gen 16S rDNA (Woese, 1987). Todas las secuencias ensambladas fueron editadas a un tamaño de 1573 bp que corresponde al rango de tamaño completo del gen 16S en el análisis BlastN se obtuvo porcentajes de identidad entre 97 – 100% con algunas cepas del GenBank.

En el análisis de alineamiento múltiple y filogenético se ha logrado identificar a nivel de género: 4 cepas de *Rahnella sp.* y *Serratia sp.*

Cuadro 5. Código, identificación taxonómica de bacterias endófitos aislados

Código	Identificación taxonómica
GT24B	*Rahnella sp*
GT25B	*Rahnella sp*
VT19B	*Rahnella sp*
VT20B	*Pseudomonas trivialis*
VT24B	*Rouxilla aff. chamberiensis*
VT25B	*Rahnella inusitata*
VT28B	*Serratia sp.*
VT34B	*Rahnella sp*

En este sentido, diversas cepas de *Rahnella sp* han sido aislados y caracterizados molecularmente debido a su capacidad de promover el crecimiento vegetativo de las plantas, evidenciando interesantes habilidades para el desarrollo de las plantas (ÉL H *et al.,* 2013).

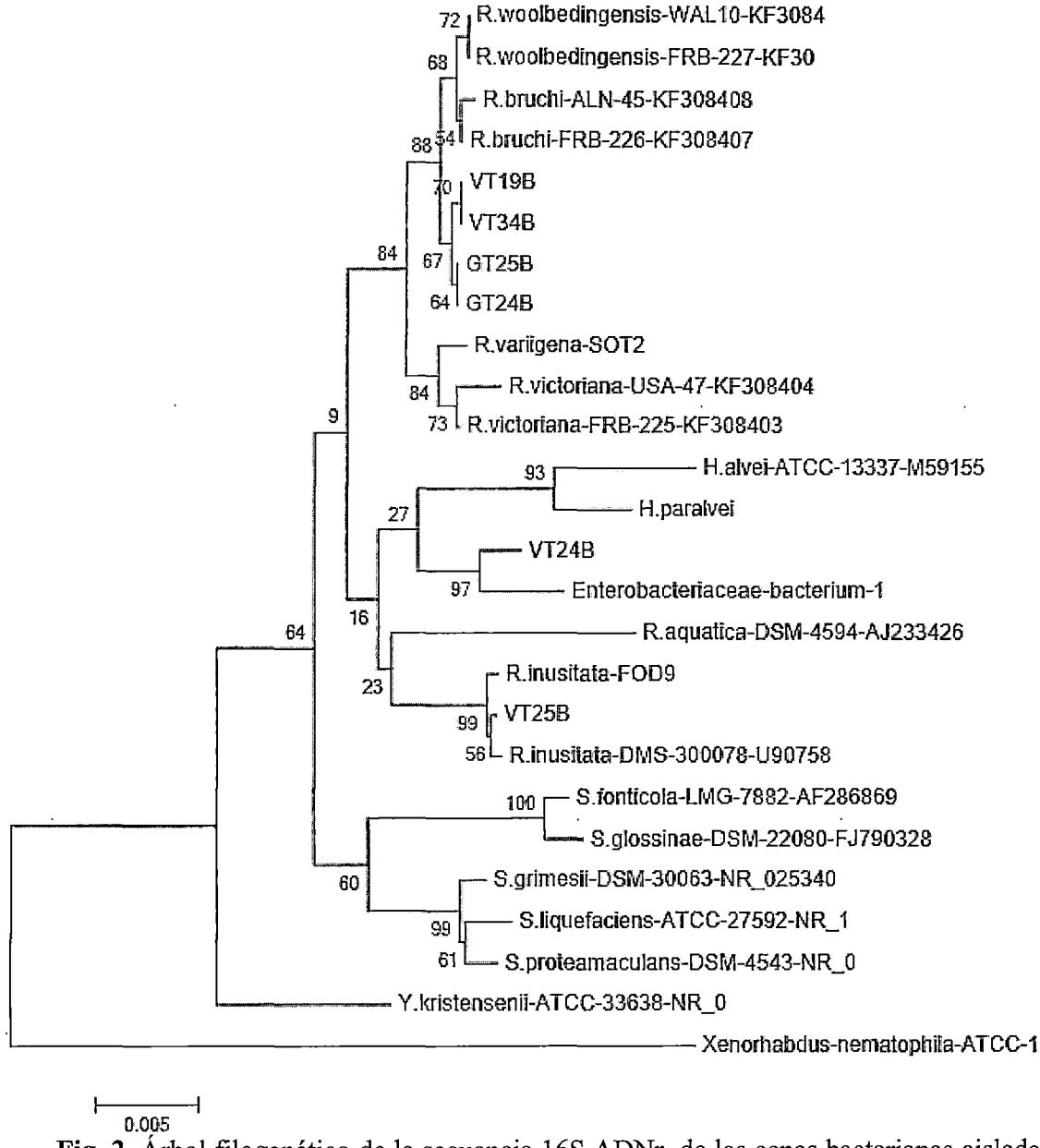


Fig. 2. Árbol filogenético de la secuencia 16S ADNr, de las cepas bacterianas aisladas de *Gentianella weberbaueri* Gil y *Valeriana sp.* y sus respectivas especies relacionadas del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

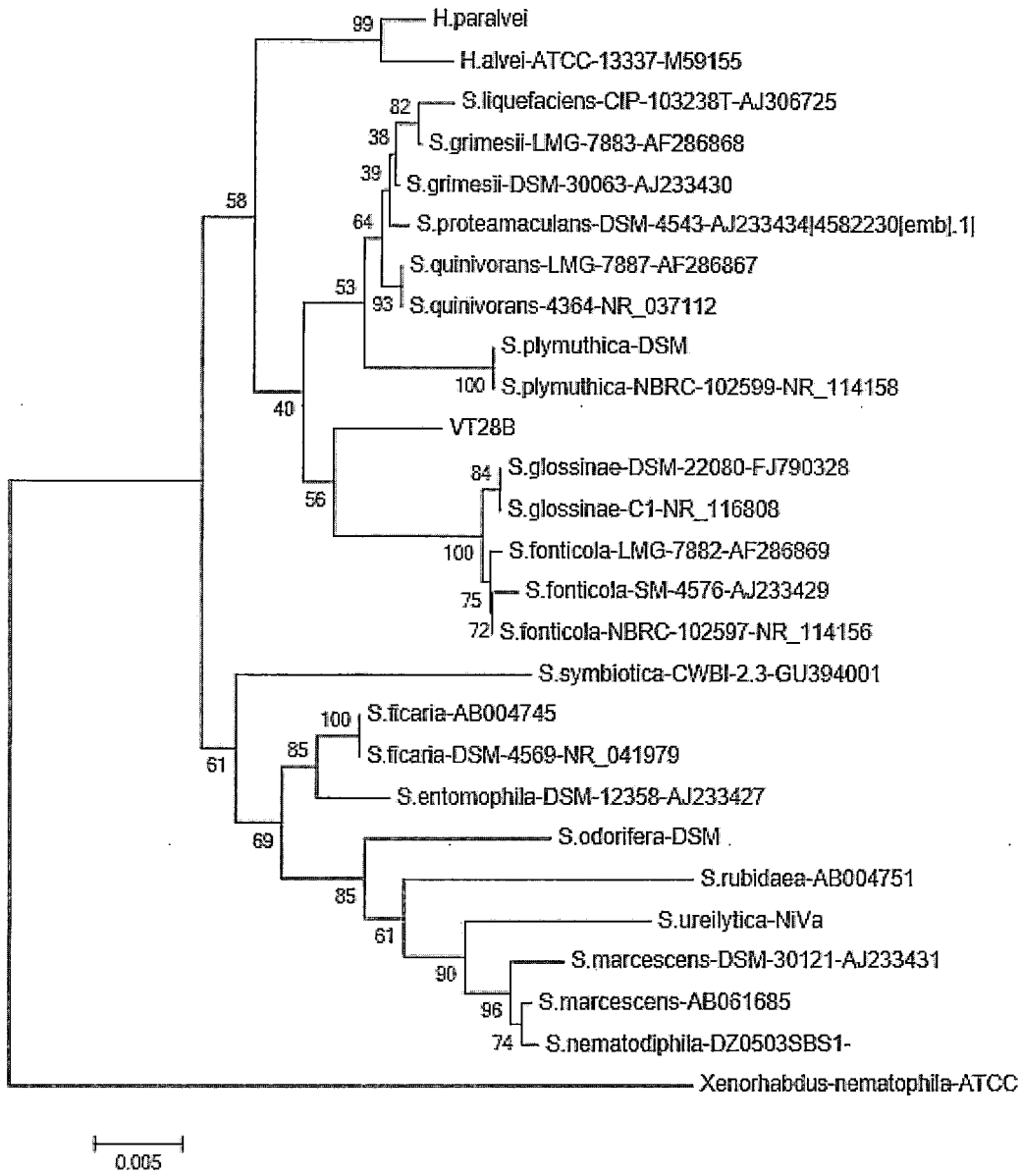


Fig. 3. Árbol filogenético de la secuencia 16S ADNr, de las cepa VT28B aislado de *Veleriana sp.* y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

4.3. Caracterización morfológica de hongos

De las 6 cepas aisladas a las que se realizó microcultivo, se lograron identificar a nivel de género.

Cuadro 6. Código, identificación morfológica de hongos endófitos aislados

Código	Identificación taxonómica
GT20H	*Pyrenochaeta sp.*
GT23H	*Pyrenochaeta sp.*
GT24H	*Pyrenochaeta sp.*
GT28H	*Scleroconidioma sp.*
VT22H	Hongo endófito
VT25H	*Cryptococcus sp.*

4.4. Caracterización molecular de hongos

Se realizó la identificación taxonómica molecular usando la región del ITS del ADN ribosomal. De acuerdo a la electroforesis de los productos del PCR, los fragmentos amplificados concuerdan con el tamaño de la región ITS1-ITS2. Todas las secuencias fueron editadas a un tamaño de 590 bp que corresponde al rango del tamaño completo de la región ITS. En el análisis BlastN se obtuvo porcentajes de identidad entre 98 – 100% con algunas cepas del GenBank.

El análisis de alineamiento múltiple y filogenético muestra que la cepa VT22H no alinea con ninguna cepa del GenBank. (Ver Fig. 4).

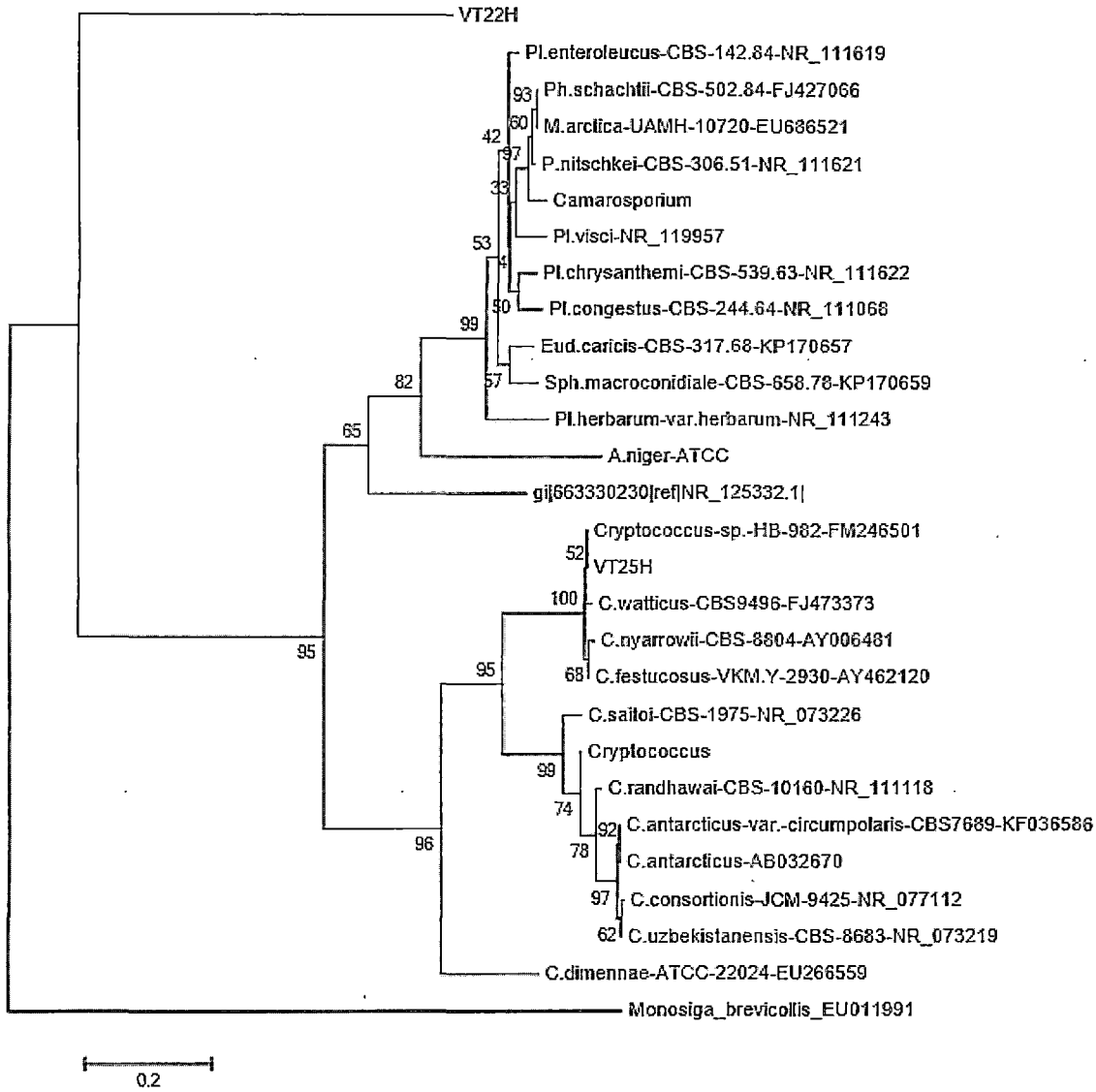


Fig. 4. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas VT22H y VT25H aislados de *Valeriana sp.* y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

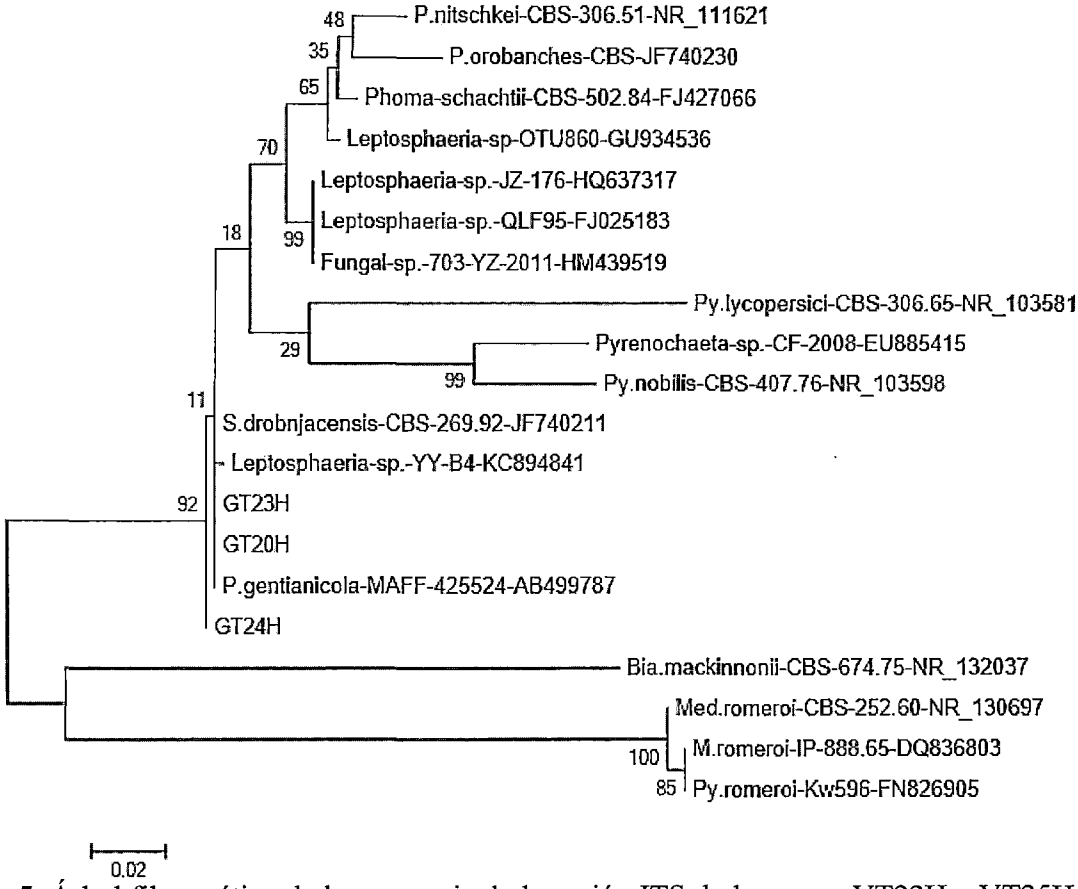


Fig. 5. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas VT22H y VT25H aislados de *Valeriana sp.* y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

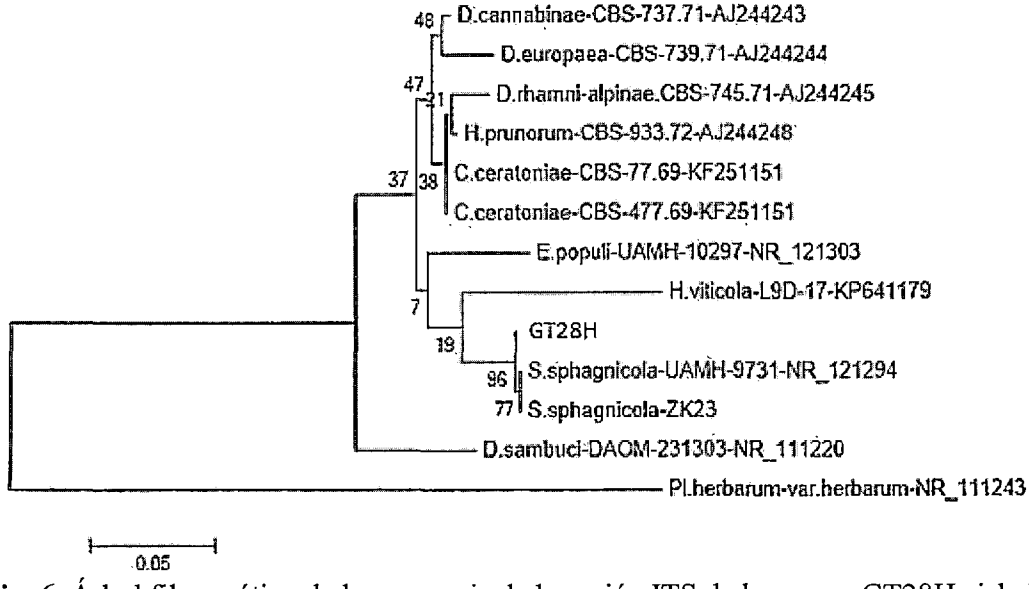


Fig. 6. Árbol filogenético de la secuencia de la región ITS de las cepas GT28H aislados de *Gentianella weberbaueri* Gil y su respectiva especie relacionada del NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.5. Evaluación *in vitro* de actividad de solubilización de fosfato de calcio.

a. En bacterias

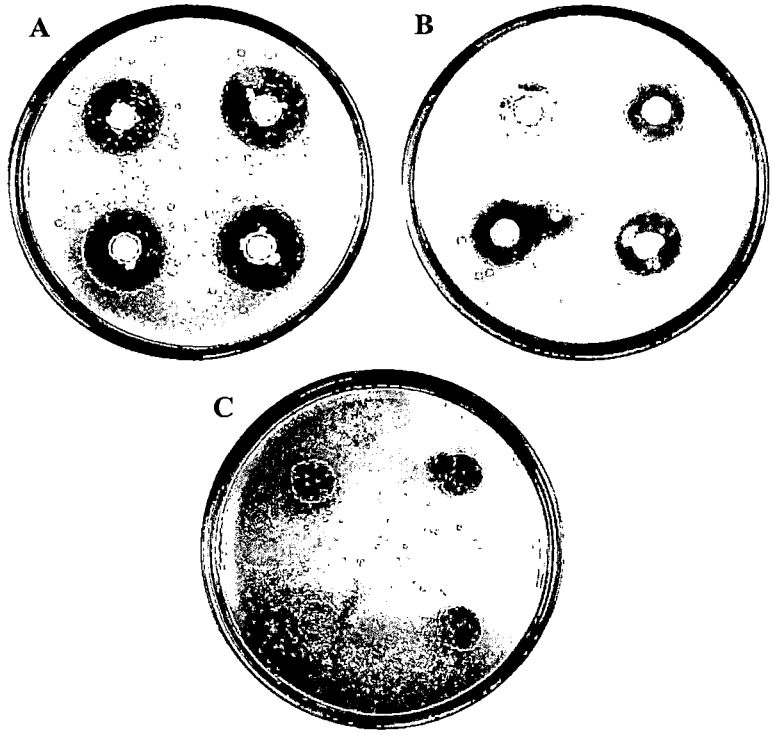


Fig. 7: Corresponde formación el halo por cepas de (A), *Rahnella sp.* GT24B; *Pseudomonas trivialis* VT20B (B) y negativo (C)

Solo 2 cepas fueron capaces de solubilizar el fosfato de calcio *in vitro*, *Pseudomonas trivialis* VT20B y *Rahnella sp.* GT24B, esta ultimas obteniendo mayor capacidad de solubilización con un IPS de 3,43 seguido de *Pseudomonas trivialis* VT20B con 3,04.

En este sentido Montañez, *et al.*, (2012) reportó a *Rahnella sp* como el mejor PSI llegando hasta 4,9. Así mismo, Gulati *et al,* (2007), reporta a *Pseudomonas trivialis* BIHB 745 (MTCC 5336, NCBI GenBank DQ536516 adhesión) aislado de los indios Transhimalayas, como un solubilizante de fosfato con alto tolerancia al estrés abiótico, alto porcentaje de solubilización de fosfato; la cepa también posee los atributos de indol-3-acético (IAA) de producción, 1-aminocyclopropane-1carboxylate (ACC) deaminasa actividad, y la producción de sideróforos

(Gulati, *et al.,* 2015) además fue empleado como promotores de crecimiento vegetal para los estudios actuales.

Como se sabe los suelos contienen una cantidad suficiente de fósforo total, pero su disponibilidad para las plantas es muy bajo y, como tal, es a menudo un factor limitante para el crecimiento de las plantas. Las bacterias que tienen la capacidad de solubilizar el fósforo son elementales en los ecosistemas agrícolas (Rodríguez & Fraga, 1999), Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer & Schinner, 1992).

b. En hongos

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

4.6. Determinación de la producción de ácido indol acético (AIA)

La producción de IAA se ha implicado en prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta (Teale *et al*, 2006; Woodward & Bartel, 2005). También se encontró que no sólo las plantas sino también microorganismos incluyendo bacterias y hongos son capaces de sintetizar AIA (Arshad & Frankenberger, 1991, Costacurta & Vanderleyden, 1995).

Es de importancia recalcar que cinco cepas produjeron la reacción visible a través del cambio de color a púrpura (Ver Fig. 33). Dato que fue utilizado para descartar algunas cepas y realizar la cuantificación de AIA, a través de la lectura de absorbancias.

De acuerdo a los datos obtenidos de la lectura de absorbancia a 530 nm, de las concentraciones establecidas en los patrones de AIA, se realizó la curva de calibración, estas fueron analizadas mediante regresión lineal utilizando el programa Microsoft Excel 2013 (Fig. 8). Se considera que el valor $r^2 > 0,9$ muestra

una dispersión homogénea de los valores sobre a recta, aceptando así el uso de la ecuación obtenida como un patrón de referencia para el cálculo de las concentraciones de AIA producidas por bacterias endófitas aislados de *Gentianella weberbaueri* Gil y *Valeriana sp* se interpolaron en dicha gráfica para cuantificar la concentración de la fitohormona, producida por aislados.

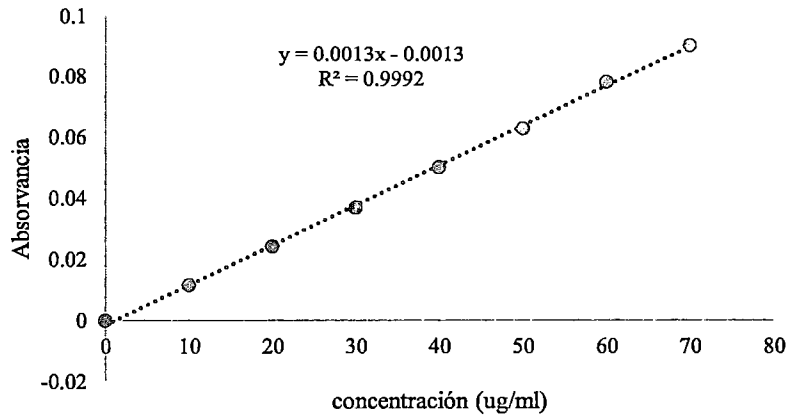


Fig. 8. Curva de calibración del ácido indol-3-acetico (AIA)

En este estudio, se detectó la producción de IAA en cultivos modificados con triptófano en todas las cepas probadas, y la cantidad producida dependía de aislados bacterianos.

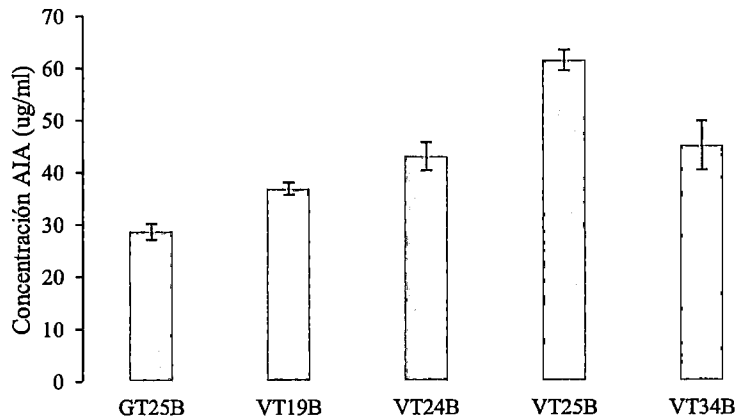


Fig. 9. Concentraciones de AIA, producidos por bacterias endófitas

Respecto a las 5 cepas, producen AIA en un rango de 28,692 a 61,513 µg/ml, este último valor correspondió a la cepa a *Rahnella inusitata* VT25B que tiene la

mayor producción de AIA; seguido por las bacterias *Ranhella sp* VT34B y *Rouxiella aff chamberiensis* VT24B con 45,103 y 43,051 µg/ml respetivamente. Las cepas VT19B y GT25B también corresponden a genotipos de *Rahnella sp.* Produjeron AIA, pero en concentraciones más bajas.

Los resultados obtenidos concuerdan con los datos descritos por Montañez *et al.*, (2012), el cual aisló cinco genotipos diferente de *Ranhella sp.* que mostraron concentraciones diferentes de ácido indol-3-acético (AIA) que va desde 49,2 hasta 437,8 µg/ml. Que posiblemente estos genotipos pertenezcan a especies diferentes.

En tanto *Rouxiella aff chamberiensis* VT24B, es el único miembro del género *Rouxiella,* descrito hasta ahora y no se han reportado como microorganismos endófitos ni bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Siendo primera vez el aislamiento de plantas y de acuerdo a los resultados obtenidos a diferentes pruebas de PGBP, se considera como bacteria endófita promotora de crecimiento vegetal.

4.7. Evaluación de actividad celulolítica

a. Bacteria endófitas

Pruebas realizadas con cepas de bacterias endófitas aislados resultaron negativas, no habiendo ninguna cepa con capacidad de degradar CMC.

b. Hongos endófitos

En la fig. 10 se muestran el índice de degradación de CMC producidas por las cepas estudiadas de hongos endófitos.

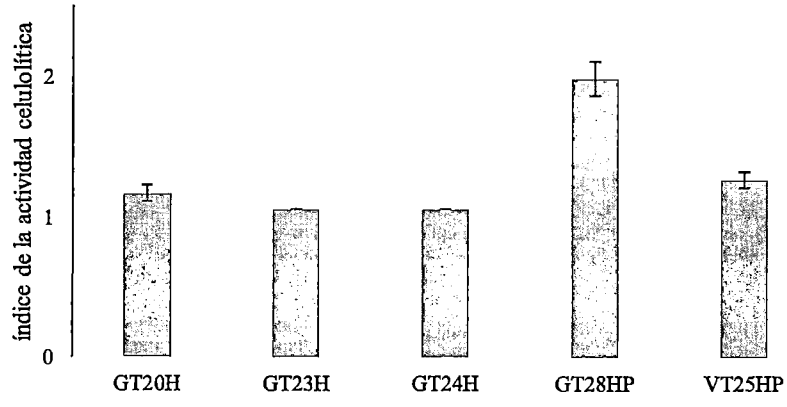


Fig. 10: Índice de degradación de CMC con cepas de hongos endófitos
Los valores corresponden al promedio de 3 repeticiones.

De acuerdo al Análisis de varianza ANOVA se mostró que existen diferencias estadísticas significativas y según la pruebas de Duncan (ρ = 0,05) indica que no existe diferencias significativas entre las cepas *Pyrenochaeta gentianicola* GT23H, *Pyrenochaeta sp.* GT24H, *Pyrenochaeta gentianicola* GT20H, y *Cryptococcus watticus* VT25H, pero existe diferencia significativa con *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H con las demás cepas. Mostrándose esta última como el mejor índice de degradación de CMC.

No se han encontrado reportes del género *Pyrenochaeta* como hongo endófitas, por lo contrario está asociada con plantas enfermas, causando la pudrición rosado en papa y cebolla. (Watanabe & Imamura, 1995)

El género *Cryptococcus* perteneciente a la familia Basidiomycetes, ha sido reportado como especies nuevas aislados de suelo, nieve y material orgánico de las colonias Vestvold, en la Antárdida considerado como levadura psicrófilo (Guffogg, *et al.,* 2004).

Las celulosas han sido implicadas en los mecanismos de entrada de los microorganismos a los tejidos internos de las plantas. (Hallman *et al.,* 1997), han propuesto que las enzimas celulíticas producidas por microorganismos endófitos contribuyen a los procesos de infección en las plantas (Bekri *et al.*, 1999). Es de suponer que en el proceso de

colonización microbiana al penetrar y dañar los tejidos de las plantas, la misma active sus genes de defensa para protegerse de los endófitos. De hecho varios estudios demuestran que cuando las plantas son inoculadas con PGPRs aumentan su resistencia, provocando cambios fisicoquímicos (Anderson & Guerra, 1985; Zdor & Anderson, 1992). Por otro lado, Verma *et al.,* (2001) indican que las enzimas hidrolíticas podrían ser producidas por los endófitos solo durante las etapas tempranas de la invasión y no mientras residen en los tejidos de las plantas.

Sería muy interesante determinar si esta actividad hidrolítica se expresa durante la interacción planta-hongo-bacteria o solo se expresa *in vitro*, así como determinar si efectivamente esta capacidad está implicada en el proceso de colonización vegetal.

4.8. Actividad antagónica de las cepas de microorganismos frente a *Fusarium oxysporium.*

Fusarium sp. es un hongo causante de enfermedades vasculares en muchos vegetales y flores, plantas ornamentales y cultivos en campo. La especie más representativa y conocida es *F. oxysporium*, que está a su vez compuesta por numerosas formas especiales, morfológicamente similares pero con marcada especificidad de huésped (Ortoneda *et al.*, 2004).

a. Bacteria endófitos - *Fusarium oysporium.*

Los resultados de los índices de inhibición del hongo *F. oxysporium* se muestran en la fig. 11:

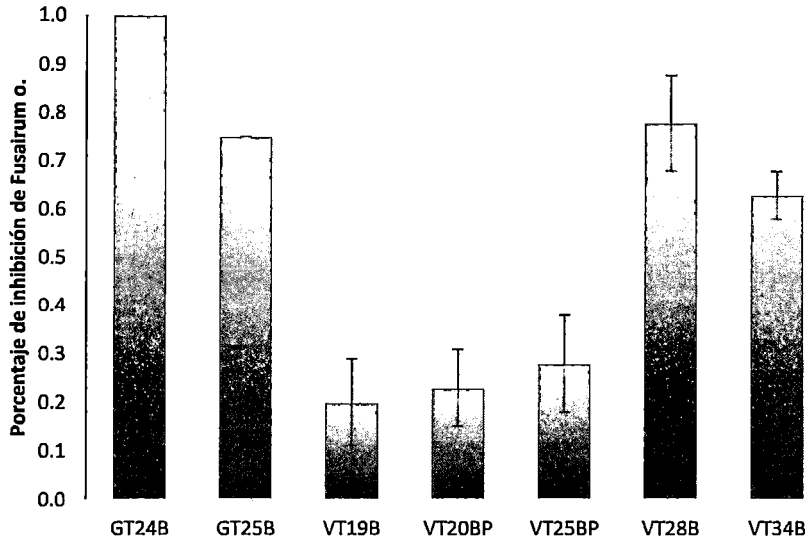


Fig. 11: Índice de inhibición de *F. oxysporium.*
Los valores corresponden al promedio de 4 repeticiones

Según el Análisis de varianza ANOVA se determinó que existe diferencias significativas entre las cepas. La prueba de Duncan ($\rho = 0,05$) indica que no existe diferencia significativa entre las cepas VT19B, VT20BP y VT25BP con índice de inhibición de 20%, 22,5% y 27,5% respectivamente; además, se observa que *Rahnella sp* VT34B con 62,5% es estadísticamente significativo; por otro lado se observa que no hay diferencia significativas entre *Rahnella sp* GT25B con 75% y *Serratia sp* VT28B con 77,5%, pero la cepa *Ranhella sp* GT24B con 100% es estadísticamente significativa con los demás cepas.

No se han reportado géneros de *Ranhella* como antagonistas, pero todos los genotipos aislados han mostrado gran capacidad de inhibir el crecimiento *Fusarium oxysporium*, siendo el mejor antagonista, la cepa GT24B, además se ha demostrado que tiene gran capacidad de solubiliación de fosfato.

Se ha demostrado que *Serratia sp.* inhibe el crecimiento del *F. oxysporium* en un 77,5%, además se ha reportado que inhibe el crecimiento de *Phytophthora infestans*. (Sánchez, *et al.*, 1998), considerado PGPB (Kloepper, 1983)

b. Hongos endófitos – *Fusarium oxysporium*

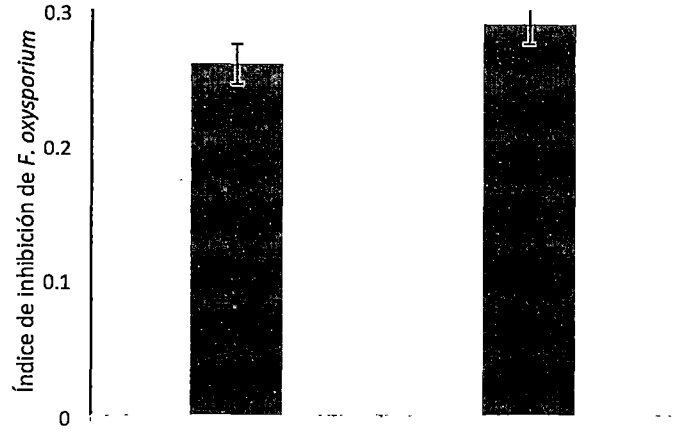


Fig. 12: Índice de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporium*

Según el Análisis de varianza ANOVA y pruebas de Duncan ($\rho = 0,05$) se determinó que existen diferencias significativas de los índices de inhibición de cepas de *F. oxysporium*, donde se registraron que la cepas hongo endófito VT22H y *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H siendo capaces de inhibir el crecimiento del hongo en un 29% y 26% respectivamente.

4.9. Producción de Sideroforos

a. Bacteria

Pruebas realizadas con bacterias resultaron negativas, no habiendo ninguna cepa con capacidad de producir sideroforos.

b. Hongo

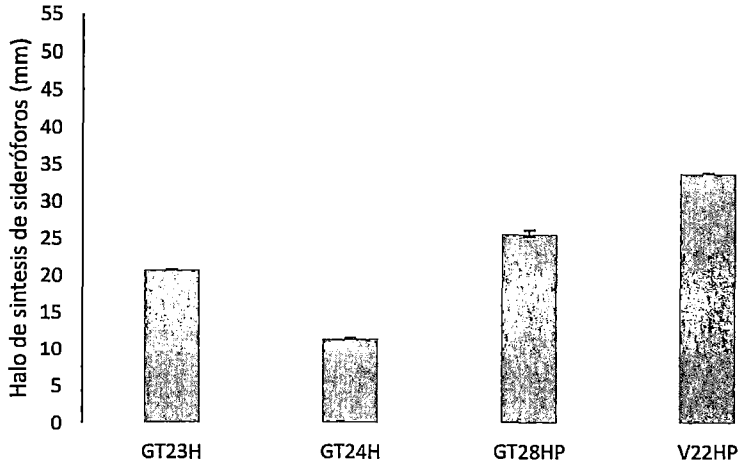


Fig. 13: Índice de formación de halo de producción de Sideroforos de hongos endófitos.

Según el análisis de varianza ANOVA se observa que existe diferencias estadísticas del diámetro de formación del halo. En la prueba de comparación de Duncan ($\rho = 0,05$) indica que no existe significancia entre las cepas *Pyrenochaeta gentianicola* GT24H y *Pyrenochaeta sp* GT23H, pero si existen diferencias significativas entre las cepas *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H y hongo endófito VT22HP con promedios de 25,75 y 34 mm respectivamente.

Como se mencionó anteriormente los géneros *Pyrenochoeta*, no se encuentran registros referidos a endófitos promotoras de crecimiento vegetal, pero a través de diferentes pruebas realizados en presente trabajo se han demostrado que tienen la capacidad de hidrolizar CMC, producir AIA y sideróforos.

Scleroconidioma sphagnicola ha sido reportado como hongo saprofito, fue aislado por primera vez de desechos leñosos abeto en Suecia, su estudio sobre colonizadores hongos transportados por el aire reveló una alta frecuencia de *S. sphagnicola* colonizar secciones recién cortado del ápice de tallos (Vasiliauskas, *et al.*, 2005). Koukol & Kovarova, (2007), menciona que la cepa *S. sphagnicola* NK08, aislada de abeto y las agujas de pino de basura en el Parque Nacional de Šumava transformó fósforo

orgánico de agujas en difosfatos y causaron disminución insignificante en la relación C: N de la hojarasca. Con respecto a la relación que guardan con los saprófitos, se ha especulado que podrían ser los endófitos los primeros en comenzar la descomposición de los tejidos vegetales cuando comienza la senescencia de la planta, esto significaría que son saprófitos latentes (Sieber, 2007)

4.10. Prueba de inoculación *in vitro* en Trigo.

4.10.1. Efecto de la inoculación en semillas para su elongación de raíz.

a. Porcentaje de germinación de trigo inoculado con cepas microbianas endófitas.

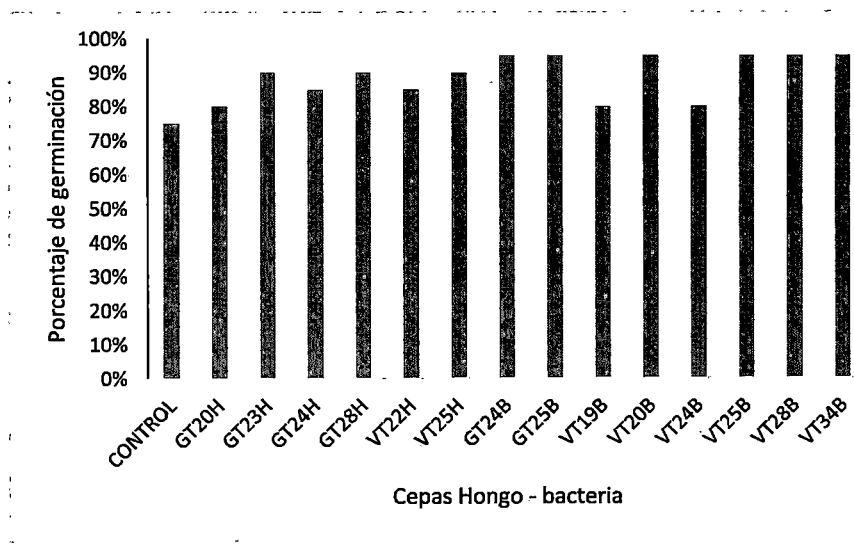


Fig. 14. Porcentaje de germinación de trigo inoculado.

b. Inoculadas con cepas de bacterias endófitos

El crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes. Muchos autores han reportado la capacidad de las PGPRs de potenciar estos cambios morfológicos en los sistemas radiculares de los cultivos (Kapulnik *et al.*, 1985; Bashan *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2008).

Este ensayo consistió en determinar si las cepas de bacterias endófitos eran capaces de producir efectos promotores de crecimiento vegetal en los primeros estadios de desarrollo de la planta.

En la fig. 15 se muestran índice de elongación de raíz de trigo inoculadas con cepas de bacteria evaluadas a 48 y 72 horas.

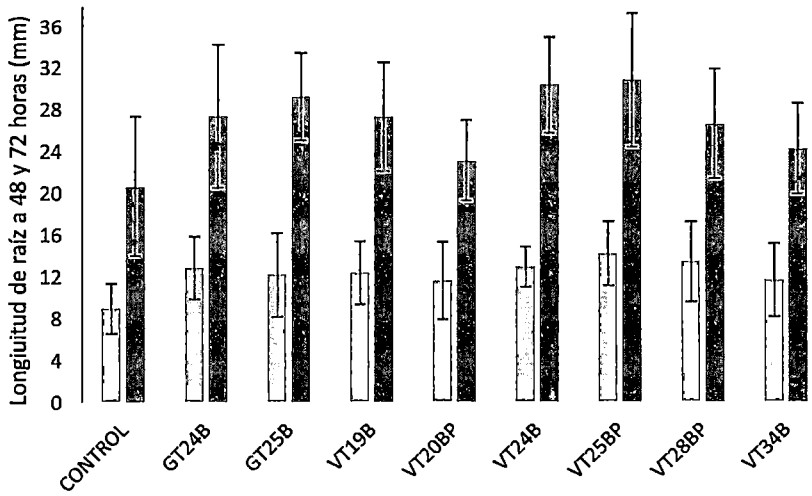


Fig. 15: Índice de elongación de raíz de trigo inoculada con cepas de bacteria a 48 y 72 horas. Los valores corresponden al promedio de 20 repeticiones.

Según el Análisis de varianza ANOVA a 48 y 72 horas demuestra que no existe diferencias significativas entre las cepas.

La prueba de comparación de Duncan ($\rho = 0,05$) a 48 horas indica que existe diferencia significativa entre el CONTROL y las demás cepas; pero no existen diferencias significativas entre las cepas bacterianas endófitas evaluadas.

A 72 horas la prueba de Duncan ($\rho = 0,05$) muestran que no existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas CONTROL, VT20BP, VT34B; así mismo no existe significancia entre las cepas VT20BP, VT34B y VT28BP; de la misma forma entre las cepas VT34B, VT28B, VT19B y GT24B; así mismas entre las cepas VT34B, VT28B, VT19B, GT24B y VT24B; y como también no

existen significancias entre las cepas VT19B, GT24B, VT24B y VT25B.

c. Inoculadas con cepas de hongos endófitos

En la fig. 16 se muestran el índice de elongación de raíz de trigo inoculadas con cepas de hongo endófitos evaluados a 48 y 72 horas.

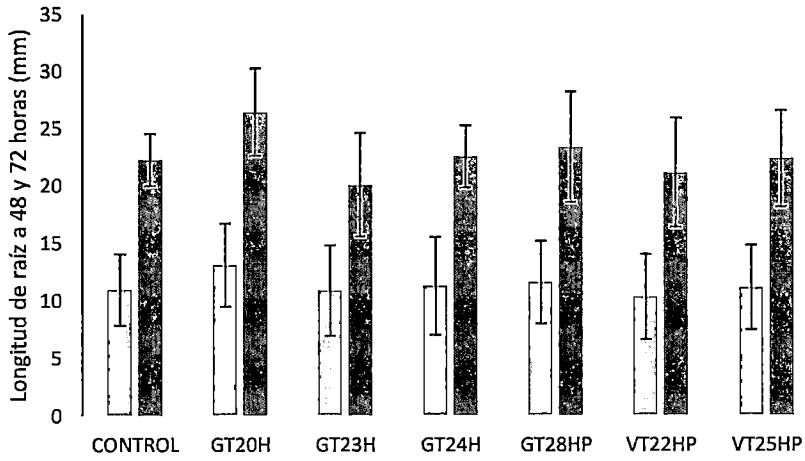


Fig. 16: Índice de elongación de raíz de trigo inoculada con cepas de hongo endófitos a 48 y 72 horas

Según el Análisis de varianza ANOVA y la prueba de Duncan (ρ = 0,05) evaluadas a 48 horas, demuestran que no existe significancia entre las cepas VT22HP, GT23H, CONTROL, VT25HP, GT24H, GT28HP Y GT20H.

Según el Análisis de Varianza ANOVA (ρ = 0,05) a 72 horas indica que no existe diferencias estadísticas significativas en las longitudes de raíces; pero según la prueba de Duncan (α = 0,05) no existe diferencia significativas entre las cepas GT23H, VT22HP, CONTROL, VT25HP, GT24H y GT28HP, así mismo no existe significancia entre las cepas CONTROL, VT25HP, GT24H, GT28HP, de la misma forma no hay significancia entre las cepas GT28HP y GT20H.

La elongación de la radícula podría atribuirse a la producción de algún metabolito bacteriano como el ácido indol acético (AIA). En las condiciones ensayadas, la inoculación no provocó en ninguno un crecimiento significativo en la longitud de la radícula en relación a las semillas no inoculadas. A pesar de que las cepas en estudio poseen la capacidad de producir AIA (Fig. 9), puede ser que no lo estén expresando en estas condiciones, o que en vez de provocar el crecimiento de la raíz principal provoquen un aumento de raíces laterales y adventicias, lo cual debería ser determinado en otro tipo de ensayos. Xie *et al.*, (1996).

Indican que la producción de AIA por las bacterias en bajas cantidades promueve la elongación de la raíz principal, mientras que cantidades altas de AIA provocan el aumento de la formación de raíces laterales y adventicias pero inhiben el crecimiento de la raíz principal. En las condiciones del presente ensayo en la inoculación en semillas de trigo, pudieron haber producido altas concentraciones de AIA, además ninguna cepa de hongos endófitos mostraron capacidad de producción de AIA, lo cual podrían explicar el efecto inhibitorio observado sobre las raíces principales del trigo para ambos casos.

Además estos resultados sugieren que, el efecto de la inoculación en la elongación de las raíces, dependen del genotipo del microorganismo, pero también el genotipo vegetal. Aunque, para verificar, deberían realizarse más repeticiones de los ensayos.

4.10.2. Efecto de la inoculación *in vitro* de bacterias endófitos en plantas de trigo

a. Longitud del tallo de trigo evaluado de 5 y 10 días, después del trasplante

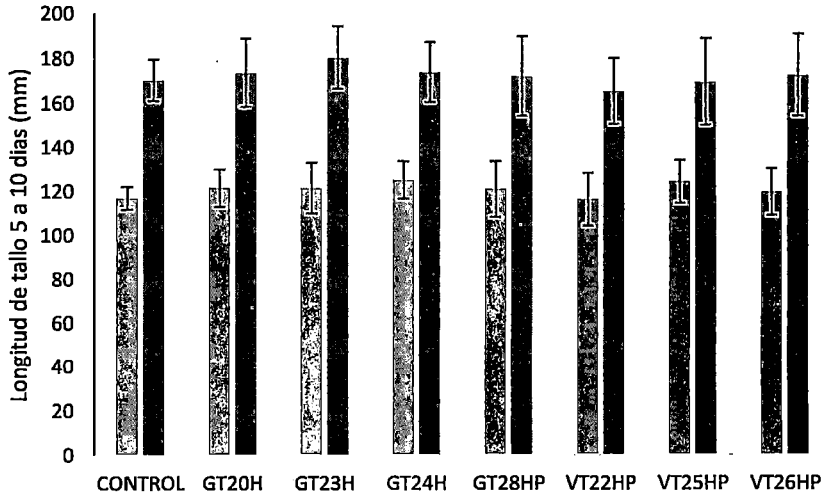


Fig. 17: Índice de elongación de tallo de 5 y 10 días del trasplante, inoculadas con bacterias endófitas.

Según el Análisis de varianza ANOVA ($\rho = 0,05$) indica que no existe diferencias significativas entre la longitud de tallo. En la prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$) demuestra que no existe diferencia significativas entre las cepas evaluados en ambas fechas.

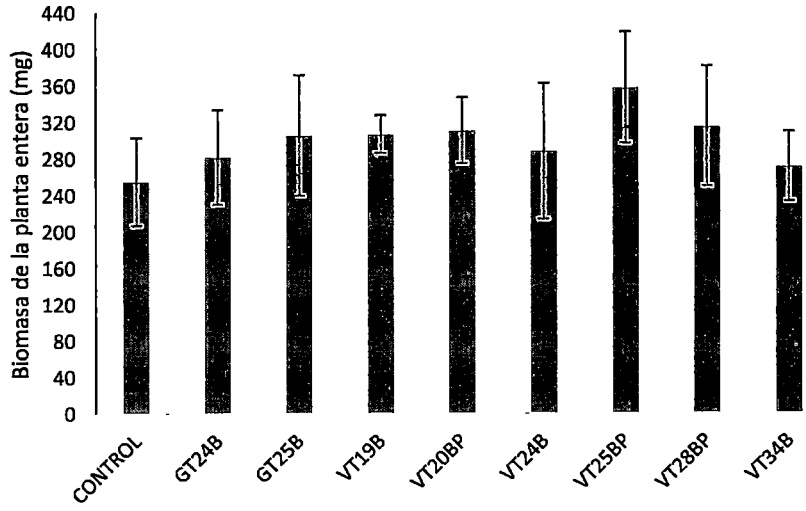


Fig. 18: Índice de biomasa de la planta de Trigo, inoculadas con bacterias endófitas.

Según el Análisis de varianza ANOVA ($\rho = 0,05$) indica que no existen diferencias significativas entre la longitud de tallo. En la prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$) se demuestra que no existen diferencias

estadísticas significativas entre las cepas CONTROL, VT34B, GT24B, VT24B, GT25B, VT19B, VT20BP y VT28BP, así mismas no existe significancias entre las cepas GT25B, VT19B, VT20BP, VT28BP y VT25BP.

4.10.3. Efecto de la inoculación in vitro de hongos endófitos en plantas de trigo.

a. Longitud del tallo de trigo evaluado después de 5 días de trasplante.

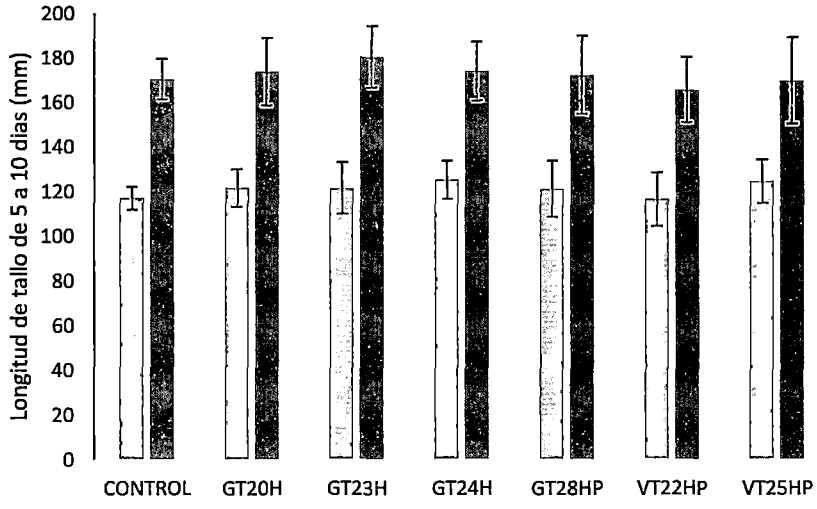


Fig. 19: Índice de elongación del tallo de trigo a 5 días, inoculadas con hongos endófitos

Según el Análisis de varianza ANOVA (ρ = 0,05) y la prueba de comparación de Duncan (α = 0,05), indican que no existe diferencias estadísticas significativas entre la longitud del tallo, evaluados a 5 y 10 días.

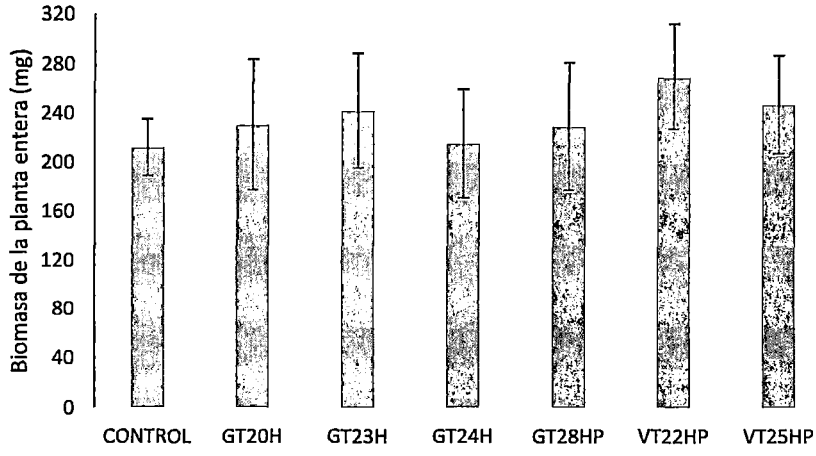


Fig. 20: Índice de biomasa de la planta entera de Trigo, inoculadas con hongos endófitas.

Según el Análisis de varianza ANOVA indica que no existe diferencias estadísticas significativas entre la longitud del tallo. La prueba de comparación de Duncan (ρ = 0,05) muestra que no existe diferencia significativas entre las tratamientos CONTROL, GT24H, GT28HP, GT20H, GT23H y VT25HP, así mismo no se encuentra significancia entre los tratamientos GT28HP, GT20H, GT23H, VT25HP y VT22HP.

De acuerdo al análisis de ANOVA y DUNCAN (ρ = 0,05), muestran que no existen diferencias estadísticas significativas, en todas las pruebas realizas de inoculación en trigo, posiblemente se deba a que solo se inoculó en semillas de trigo, las mismas que fueron trasplantadas a medio de Fåhræus, sin la reinoculaación, por lo pudo haber sido un factor en los resultados de la respuesta mínima a la inoculación, así como explica Cankar *et al.*, (2005), que no se conoce si los microorganismos pueden desarrollarse en sincronía con la planta y colonizar tejidos aéreos o radicales, por lo que ha planteado en muchas ocasiones la reinoculación de estos microorganismos después del desarrollo vegetal. Otro factor probablemente puede ser a la especificidad de los microorganismos sobre su hospedero; al respecto, en un estudio realizado con cuatro genotipos de maíz, se observó que dos de ellos respondieron favorablemente a la inoculación con *Azospirillum* y también mostraron respuesta favorable a la aplicación de 100 kg ha-1 de N; los otros dos

presentaron una respuesta mínima a la inoculación y a la fertilización nitrogenada (García de Salamone *et al.,* 1996). Sin embargo la información acerca de la existencia de especificidad entre el hospedero y los inoculantes microbianos es aún incipiente (Smith & Goodman, 1999).

En este sentido se sugiere realizar pruebas posteriores en la reinoculación de estos microorganismos, para ver el efecto de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*, ya que se demostrado en diferentes pruebas su capacidad de promover el crecimiento vegetal.

V. CONCLUSIONES

- Se aisló un total de 14 cepas de microorganismos endófitas a partir de *Valeriana sp* y *Gentianella weberbaueri* Gil. Colectadas en la Quebrada Churup-Huaraz.
- Se encontraron 6 hongos endófitos, de los cuales 3 cepas pertenecen al género *Pyrenochaeta*, 1 cepa a *Cryptoccocus*, 1 *Scleroconidioma* y 1 cepa no identificada.
- Se identificaron 8 cepas de bacterias endófitas, siendo el género predominante *Rahnella sp*, con 5 genotipos, *Pseudomonas* con 1, *Rauxiella sp.* con 1 y 1 *Serratia sp.*
- De los 8 bacterias endófitas: 7 mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporium* en un rango de índice de 15 a 100%. Siendo los mayores índices para las cepas *Rahnella sp.* GT24B con 100% y *Serratia sp.* VT28B con 77,5%.
- Solo dos cepas bacterianas solubilizaron fosfato de calcio con PSI de 3,43 seguido por 3,04 pertenecientes a las cepas *Pseudomonas trivialis* VT20B y *Rahnella sp* GT24B respectivamente.
- 5 cepas bacterianas mostraron capacidad de producir ácido indol-3-acetico (AIA), estas son 3 genotipos de *Ranhella sp*, 1 de *Rauxiella aff. chamberiensis* y 1 de *Ranhella inusitata*, esta última obteniendo mayor concentración de AIA con 61,5 µg/ml.
- De los 6 hongos endófitos, 5 cepas demostraron su capacidad en hidrolizar celulosa, los mayores índices son: para las cepas *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H con 1.99, seguido de *Cryptococcus watticus* VT25H con 1,82.
- En las cepas de hongos endófitos la mayor concentración de sideroforos evaluados se determinó al hongo endófito VT22H con 34 mm de diámetro del halo de coloración, seguido de *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H con 25,75 mm y *Pyrenochaeta gentianicola* GT23H con 20,75.
- En las pruebas de inoculación en trigo, no se mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al control, en todas las evaluaciones en lo que concierne, longitud de raíz a 48 y 72 horas, longitud de planta y biomasa a 10 días.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con los estudios de los microorganismos endófitos caracterizados, que fueron registrados como los mejores cepa, obtenidos de las diferentes pruebas de promoción de crecimiento vegetal.

- Seguir insistiendo con los diferentes procedimientos para caracterizar molecularmente las cepas que no se lograron identificar, ya que se obtuvo buenos resultados.

- Realizar más pruebas de inoculación de microorganismos endófitos, en diferentes hospedantes y su reinoculación en el crecimiento de la planta.

- Aislar y caracterizar molecularmente otros microorganismos endófitos promotoras de crecimiento vegetal, a partir de plantas altoandias de nuestra región, para optimizar su uso en la agrobiotecnología.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, A. & Guerra, D. 1985. Responses of bean to root colonization with Pseudomonns putida in a hydroponic system. Phytopathology. 75: 992-995.

Anwar, G. 2000. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. pp. 9-25;32-44.

Ardon, O., Weizman, H., Libman, J., Shanzer, A., Chen, I. & Hadar, Y. 1998. Iron uptake in Ustilago maydis: tracking the iron path. Journal of Bacteriology, vol. 180,p. 2021-2026

Arshad, M. & Frankenberger, J. 1991. Microbial production of plant hormones. In D. L. Keister, and P. B. Cregan (Eds), The Rhizosphere and plant growth (pp 327-334). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Bashan, Y., Holguin, G. & de-Bashan, L. 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50: 521-577

Bekri, M, Desair, J., Keijers, V., Proost, P., Leeuwen, M., Vanderleyden, J. & Broek, V. 1999. Azospirillum irakense produces a novel type pectate lyase. J. Bacteriol. 181: 2440-2447.

Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C., Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47, 793-800.

Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora A, Ulrich, A. & Hallmann. J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 5:215-229.

Cankar, K., Kraigher, H., Rabnikar, M. & Rupnik, M., 2005. Bacterial endophytes from sedes of Norway spruce (Picea abies L. Karst) Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier

Chanway, C. 1998. Bacterial endophytic: ecological and practical implications. Sydowia 50:149-170.

Costacurta, A., & Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit. Rev. Microbiol., 21, 1-18.

Días, A., Costa, F., Andreote, F., Lacava, P., Texeira, M., Araújo, W. 2008. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World J. Microbiol Biotechnol 25:189195.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003. Plan Growth Promoting Effects of Diazothophs in the Rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciencs (22) 107-149.

Él H, Ye Z, Yang D, Yan J, Xiao L, Zhong T, Yuan M, Cai X, Colmillo Z & Jing Y. 2013. Caracterizacion de Rahnella sp endófito. JN6 de Polygonum pubescens y su potencial para promover el crecimiento y la absorción de Cd, Pb, Zn por Brassica napus.

Fähraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen Microbiol. 16, 374-381.

García de Salamone, I., Döbereiner, J., Urquiaga, S. & Boddey, R. 1996. Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the 15N isotope dilution technique. Biol. Fert. Soil 23: 249-256.

Geisseler, D., Horwath, W., Joergensen, R. & Ludwi, B. 2010. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: A review. Soil Biol. Biochem. 42:2058-2067.

Glick B. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica 1-15.

Goldstein A. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am. J. Altern. Agri. 1: 51-7.

Gordon S, Weber R. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol.; 26(1):192–195.

Guffogg, S., S-Hall, T., Holloway, P. & Watson, K. 2004. Un miembro de psicrotolerantes novela de las levaduras hymenomycetous de la Antártida: Cryptococcus sp watticus. noviembre. 54 (Pt 1): 275-7.

Gulati, A., Rahi, P. & Vyas, P. 2007. Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalaya. 56:73–79.

Gulati, A., Kumar, M., Vyas, P., Rahi, P., Thakur, R., Thakur, N. & Kumar, A. 2015. Complete Genome Sequence of the Rhizobacterium Pseudomonas trivialis Strain IHBB745 with Multiple Plant Growth-Promoting Activities and Tolerance to Desiccation and Alkalinity.

Gutierrez, P. 2013. Efecto de la inoculación con bacteria diazótrofas en plantas de maíz (Zea mary L.) de distintas variedades. UDELAR. Montevideo. Uruguay.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. & Kloepper J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol. 43: 895-914.

Hameeda, B., Harini, M., Rupela, O., Wani, S. & Gopal, R. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiol. Res. 163:234-242.

Hardoim P, Overbeek L., Elsas J. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 16: 463-471

Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. 2003. Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. J. Biotechnol. 106:169-178.

Idris H, Labuschagne N. & Korsten L. 2007. Screening rizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. Biological control; 40 (1): 97-106.

Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W. & Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator Thlaspi goesingense. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2667-2677.

Illmer, P & Schinner, E. 1992: Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol. Bioehem. 24, 389-395.

James E. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. 65: 197-209.

Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F, Sanavy SAMM & Allahdadi I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants Australian Journal of Crop Science 5: 726-734.

Kapulnik, Y., Okon, Y., Henis, Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by Azospirillum inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.

Khan, M., Zaidi. A., & Wani. P. 2007. Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. Agron. Sustain. Dev. 27:29-43.

Kloepper, J. W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of Erwinia carotovora on potato roots and daughter tubers. Phytopathology 73:217-219.

Klumpp, C., Burger, A., Mislin, L. & Abdallah, A. 2005. From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 15, p. 1721-1724

Koukol, O. & Kovářová, M. 2007. Autecology of Scleroconidioma sphagnicola particularly in Šumava National Park (Czech Republic). 59(1): 111–123.

Krechel A., Ditz M., Ulrich A., Faupel A., Hallmann J., Berg G. 2004. Bacterial life inside and outside potato roots and leaves. Bulletin OILB/SROP 27: 157- 163.

Kumar, V. & Narula N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected byAzotobacter chroococcum Biol. Fertil. Soil, 28, pp. 301–305

Li J., Wang E., Chen W. & Chen W. 2008. Genetic diversity and potential promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. Soil Biol Biochem 40:238 – 246.

Loper, E & Schroth, M. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76. 386-389.

López, E., Pérez, G. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. Evolución y Filogenia, 45-47

Lugtenberg, B. & Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541-556

Martínez, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10(3): 293-319.

Montañez, A., Rodríguez, A., Barlocco, C., Beracochea, M. & Sicardi, M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (Zea mays L.) and their inoculation effects in vitro. Universidad la República. Elsevier. Montevideo. Uruguay.

Muñoz J., Caballero J. 2003. Population dynamics of Gluconacetobacter diazotrophicus in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. Microb. Ecol. 46: 454-464.

Nautiyal, C., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265-270.

Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol 21: 15-19

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M., Mayayo, E., Di Pietro, A. (2004). Fusarium oxysporum as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect. Immun. 72: 1760-1766.

Pérez de Castro. 2011. Reacción de cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Poitecnica de Valencia. España.

Pérez, A., Rojas, J. & Vale, H. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. Colombia.

Petrini, O. 1986. Los hongos endófitos de las hojas del árbol.

Pitt JI. 1979. The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press, London, UK. 634 p.

Reyes, I. Alvares, L. El-Ayuobi H. & Valery A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro vol 20(1). Páginas 37- 48.

Rodicio, M. & Mendoza, M. 2004. Identidicación de bacterias mediante secuenciamiento del ARNr 16S: Fundamento metodología y aplicaciones en microbiología clínica.

Rodríguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17: 319-339.

Rossello-Mora R. & Amann, R. 2001. Th especies concept for prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 25, 39-67.

Salkowski, E. 1889. Ueber die Bildung von fluchtigen Fettsauren bei der ammoniakalischen Harnggahrung. Zeitschrift fur Physiologische Chemie 13: 264-274.

Santi, C., Bogusz D., Franche C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann. Bot. 111: 743-767.

Schroth, N. & Hancock, G. 1982. Disease-suppressive soil and root colonizing bacteria. Science, vol. 216, p. 1376-1381

Schwyn, B. & Neilands, J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem, 160, 47-56.

Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U. & Wilhelm E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytic in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol. 39:23-32

Shulz B., Boyle C. 2006. What are endophytes? Microbial root endophytes. BerlinHeidelberg. Soil Biology Vol. 9:1-13.

Sieber, T. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. Fungal Biology Reviews 21: 75–89.

Silvia, D., Fuhrmann, H., & Zuberer, D. 1998. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall. New Jersey, USA.

Smith, K. & Goodman, R. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 473-491

Spaepen S & Vanderleyden J. 2010. Auxin and Plant-Microbe interactions Cold Spring Harb Perspect Biol 1-13.

Spaepen S, Verse´es W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J & Vanderleyden J. 2007. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of Azospirillum brasilense. Journal of Bacteriology 189: 7626-7633.

Sturz, A., Christie, B. & Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. Crit. Rev. Plant Sci. 19: 1-30.

Teale W., Paponov, I. & Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 7:847-859.

Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S. & Netrusov. A. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol. Res. 162:6976.

Vasiliauskas R., Lygis V., Larsson K.-H. & Stenlid J. 2005. Airborne fungal colonization of coarse woody debris in North Temperate Picea abies forest: impact of season and local spatial scale. – Mycol. Res. 109: 487–496.

Verma, S., Ladha, J., Tripathi, A. 2001. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J. Biotechnol. 91: 127-141

Vessey, J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255:571-586.

Veterinaria. Centro de vigilancia sanitaria. 2002. Detección y caracterización molecular de los microorganismos. Madrid. España.

Wang, T.; Tan, Y.; Guo, W.; Rodríguez, R.; Boll, G.; Martínez, E. 2006. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree Conzattia multiflora grown in Mexico. Archives of microbiology, 186(4): 251-259.

Watanabe, T. & Imamura, S. 1995. Pudrición de la raíz rosada, un nombre revisada de pudrición de la raíz de genciana marrón, y el hongo causante, Pyrenochaeta gentianicola sp. noviembre. y P. terrestris en Japón. Mycoscience. 36 (4): 439-445.

Woese, C. 1987. Bacterial evolution. Microbial Rev. 51: 221-227

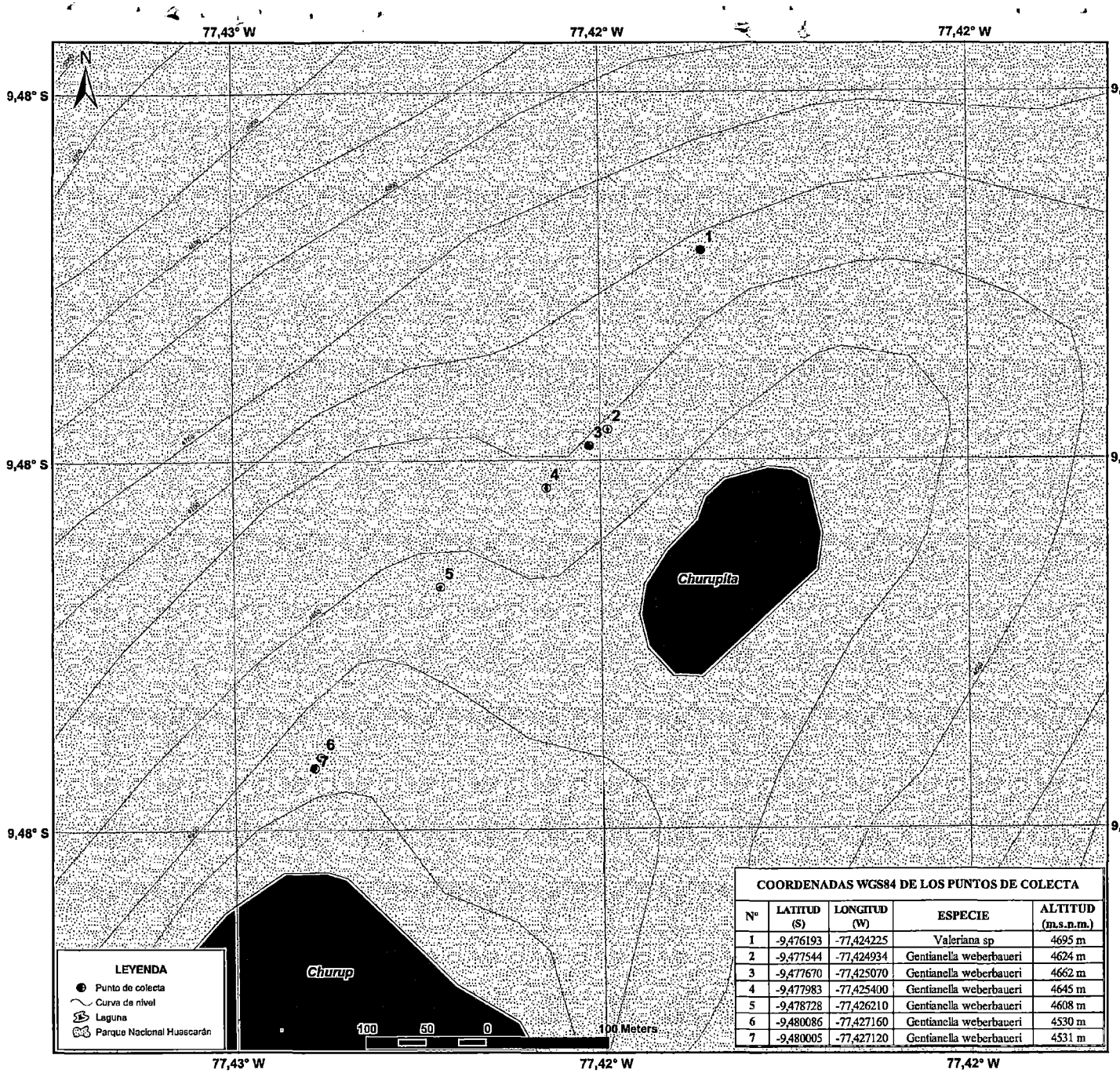
Woodward A. & Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and inter-action. Ann. Bot. 95:707-735.

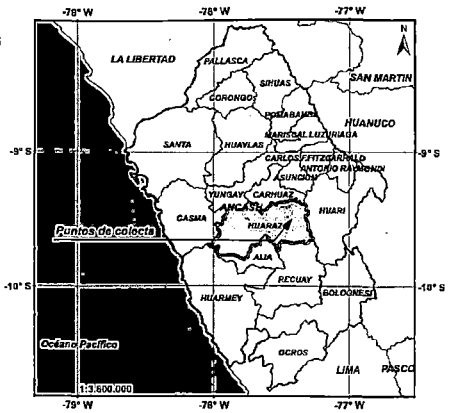
Xie H., Pasternak J. and Glick R. 1996. Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR 12-2 that over produce indole acetic acid. Curr. Microbiol. 32: 67 – 71

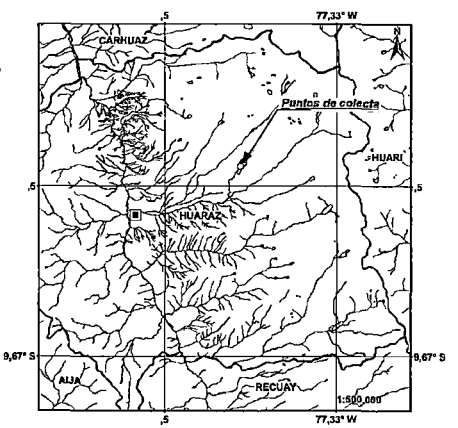
Zdor R., & Anderson A. 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. Plant Soil 140: 99-107.

ANEXO

ANEXO 1. Mapa de ubicación de puntos de colecta de muestras.







COORDENADAS WGS84 DE LOS PUNTOS DE COLECTA

Nº	LATITUD (S)	LONGITUD (W)	ESPECIE	ALTITUD (m.s.n.m.)
1	-9,476193	-77,424225	Valeriana sp	4695 m
2	-9,477544	-77,424934	Gentianella weberbaueri	4624 m
3	-9,477670	-77,425070	Gentianella weberbaueri	4662 m
4	-9,477983	-77,425400	Gentianella weberbaueri	4645 m
5	-9,478728	-77,426210	Gentianella weberbaueri	4608 m
6	-9,480086	-77,427160	Gentianella weberbaueri	4530 m
7	-9,480005	-77,427120	Gentianella weberbaueri	4531 m

UNIVERSIDAD NACIONAL "SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO"
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TEMA DE TESIS: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS, ASOCIADOS A *Valeriana sp.* Y *Gentianella weberbaueri Gil* Y SU USO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL"

MAPA: PUNTOS DE COLECTA DE *Valeriana sp.* Y *Gentianella weberbaueri Gil*

DPTO: ANCASH **PROVINCIA:** HUARAZ **DISTRITO:** INDEPENDENCIA

DATUM: WGS84 **FECHA:** SETIEMBRE 2015 **MAPA Nº:** 1

ESCALA: 1:3.000

ELABORADO POR: ULLOA ALVARADO ROCIO DEL PILAR

BASE CARTOGRÁFICA: IGN/ MINEDU/ TRABAJO DE CAMPO

ANEXO 2. Medios y Soluciones utilizados en diferentes pruebas

Cuadro 7: Soluciones de medios utilizados en la caracterización morfológica de hongos.

Agar autolisado de levadura Czapek (CYA, Pitt 1979)	
Czapek concentrado	1%
Sacarosa	3%
Extracto de levadura	0,5%
K_2HPO_4	0,1%
Solución de elementos traza stock (ml)	0,1%
Agar	1,5%
pH	6,2
Agar extracto de malta (MEA, Samson et al. 2010)	
Extracto de malta	5%
Solución de elementos traza stock (ml)	0.1%
pH	5,4
Sucrose yeast extract agar (YES, Frisvad 1981)	
Extracto de levadura	2%
Sacarosa	15%
$MgSO_4.7H_2O$	0,05%
Solución de elementos traza stock (ml)	0.1%
pH	6,5
Solución de elementos traza stock	
$CuSO_4.5H_2O$	0,5 %
$ZnSO_4.7H_2O$	0,1 %

Cuadro 8: Composición del medio NBRIP modificado

MEDIO NBRIP		
Reactivos	**Hongo**	**Bacteria**
Glucosa	1%	1%
$Ca_3(PO_4)_2$	0,5%	0,5%
$MgCl_2.6H_2O$	0,5%	0,5%
$MgSO_4.7H_2O$	0,025%	0,025%
KCl	0,02%	0,02%
$(NH_4)_2SO_4$	0,01%	0,01%
Agar Agar	1,5%	1,5%
Tripton x-100 (ml)	0,01%	-
pH	7	7

Cuadro 9: Composición de la solución nutritiva Fahraeus

SOLUCIÓN NUTRITIVA DE FAHRAEUS (1957)	
$CaCl_2$	0,01 %
$MgSO_4.7H_2O$	0,012 %
KH_2PO_4	0,01 %
$NaHPO_4$	0,01 %
Citrato férrico	0,0005 %
Solución stock (ml)	0,1%
Solución stock	
H_3BO_3	2,086 %
$MnSO_4.4H_2O$	2,003 %
$ZnSO_4.7H_2O$	0,022 %
$CuSO_4.5H_2O$	0,008 %
$NaMoO_4.2H_2O$	0,014 %
pH	7

ANEXO 3. Fotografías de los métodos aplicados en la parte experimental

Fig. 21: Actividad antagónica de bacterias; A: Siembra de bacterias en estrías sobre PDA, B: Inoculación de *F. oxysporium* en discos

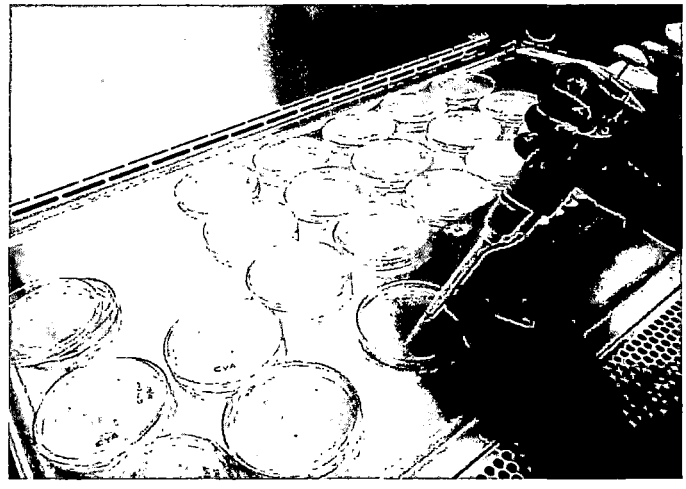


Fig. 22: Caracterización morfológica: Siembra de hongos endófitos sobre medio CYA, MEA y YES.

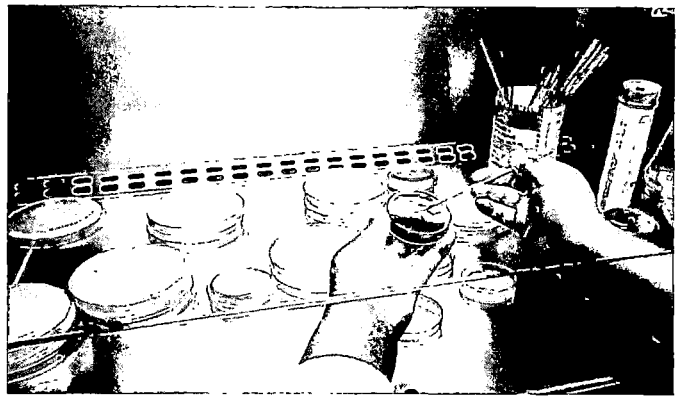


Fig. 23. Producción de Sideroforos: Siembra de hongos endófitos sobre medio nutritivo y agar azurol.

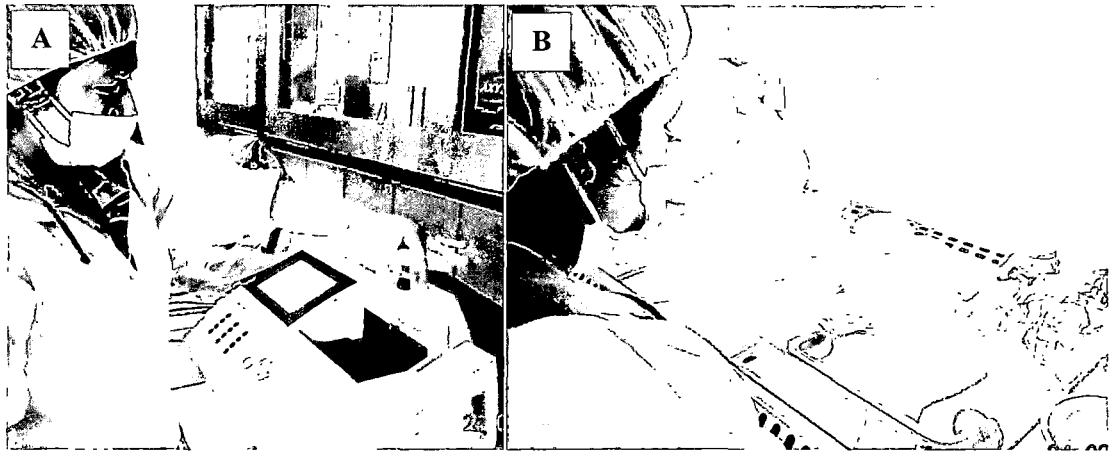


Fig. 24. Inoculación de cepas bacteriana: A, Cuantificación del inoculo, B, Siembra de trigo, después de la inoculación, sobre agar agua

Fig. 25. Prueba de cuantificación de AIA: A, adición de Triptofano al medio nutritivo (PDB/7); B, inoculación de cepa de hongo al medio suplementado con triptófano.

ANEXO 4. Fotografías de las evaluaciones cualitativas de las diferentes pruebas aplicadas en promotores de crecimiento vegetal

A. Caracterización morfológica de Hongos

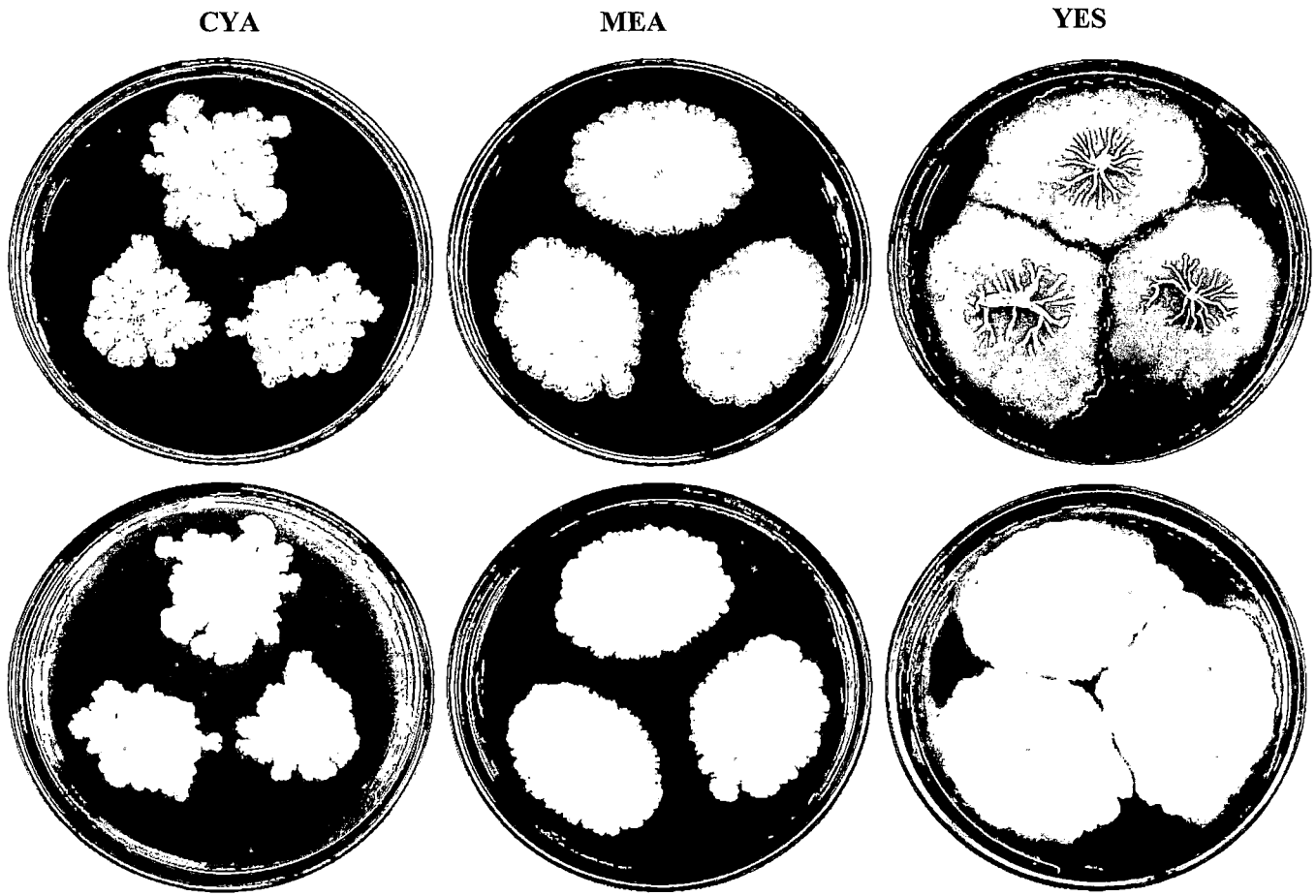


Fig. 26: Corresponde a macrofotografías tomados en tres medios de cultivos microcultivo de hongos de *Pyrenochaeta gentianicola* GT20H.

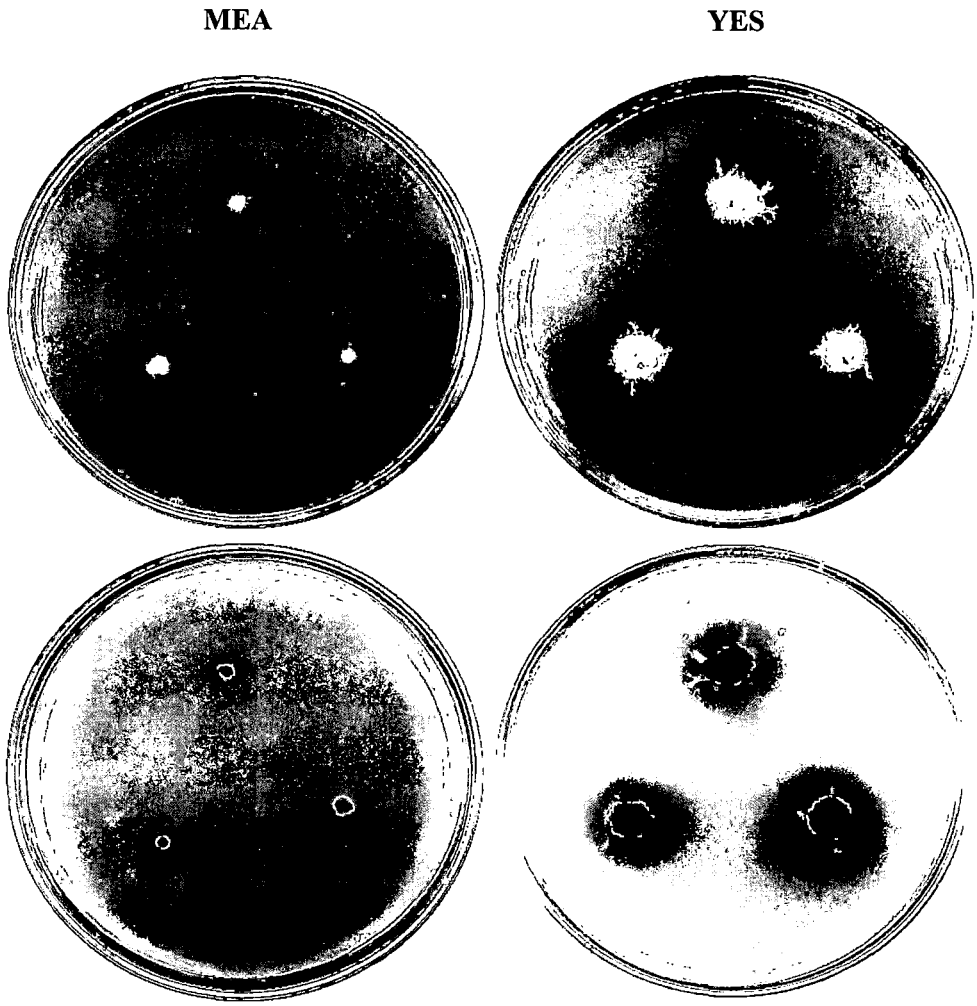


Fig. 27: Las macrofotografías corresponden a la cepa *Pyrenochaeta gentianicola* GT23H.

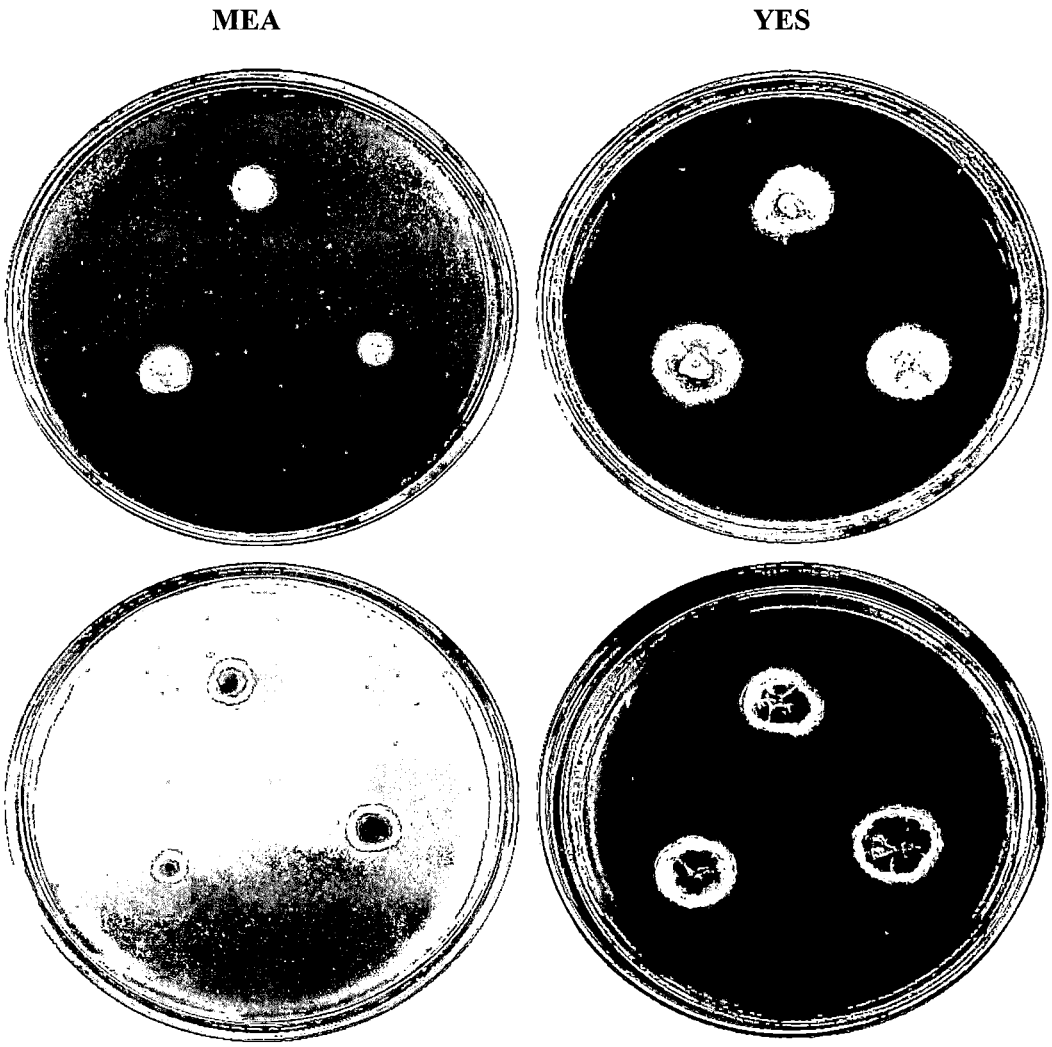


Fig. 28: Corresponde a la macrofotografías de *Pyrenochaeta sp* GT24H, desarrolladas en diferentes medios de cultivo.

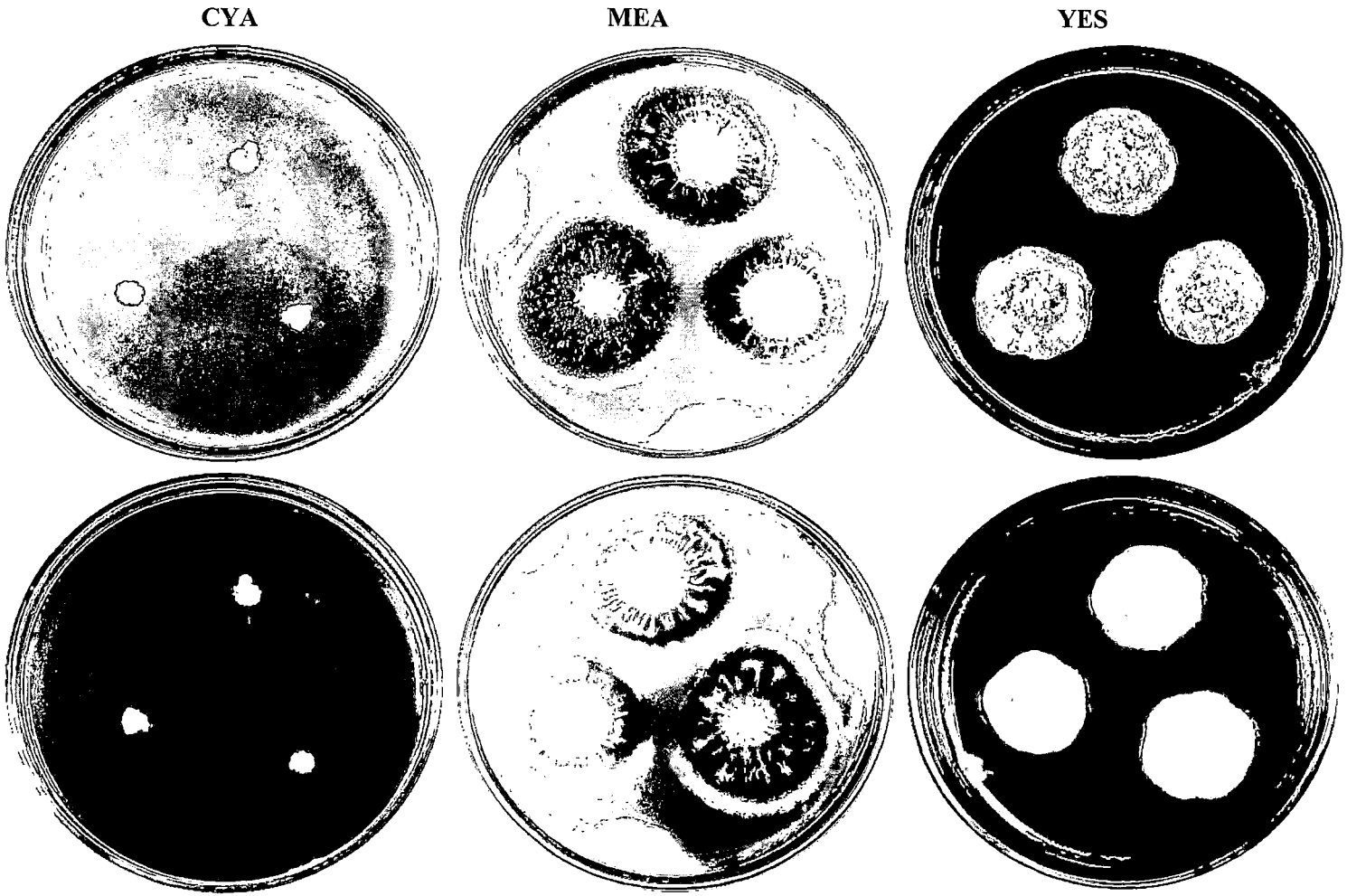


Fig. 29: Corresponde a la Cepa *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H.

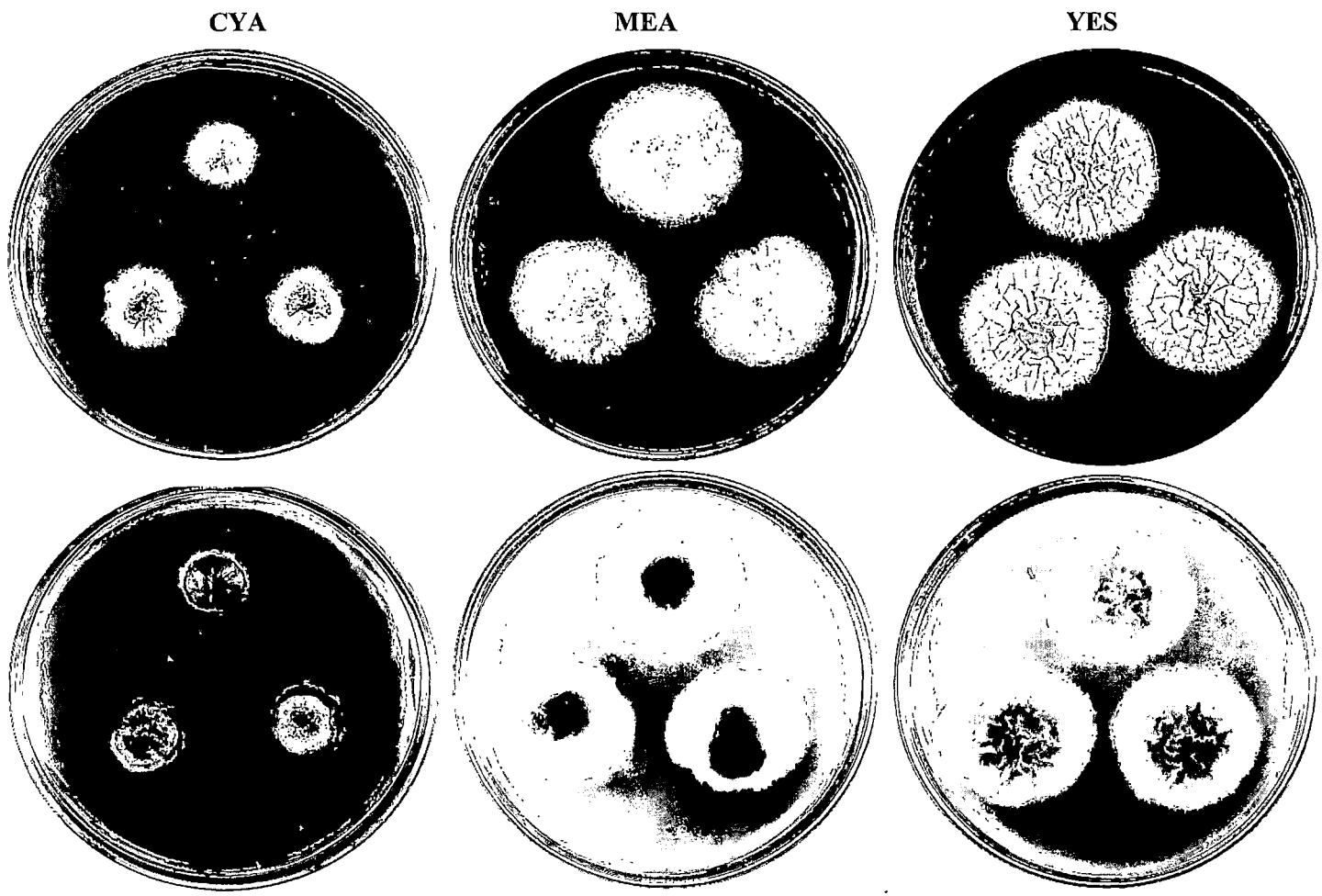


Fig. 30: Corresponde a la Cepa clasificado como hongo endófito VT22H.

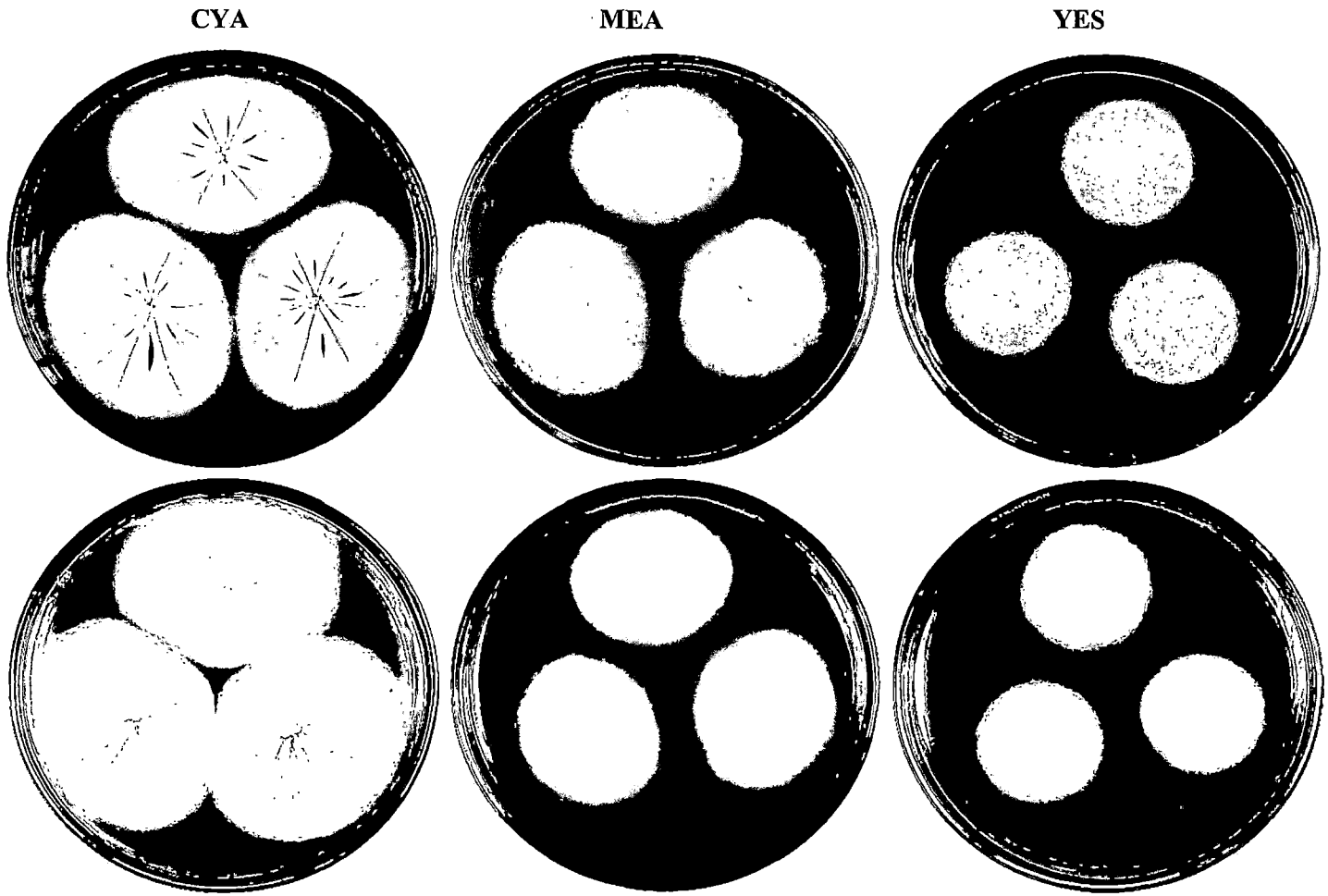


Fig. 31: Corresponde a la Cepa identificado como *Cryptococcus watticus* VT25H,.

B. Pruebas bioquímicas de bacterias endófitas aisladas

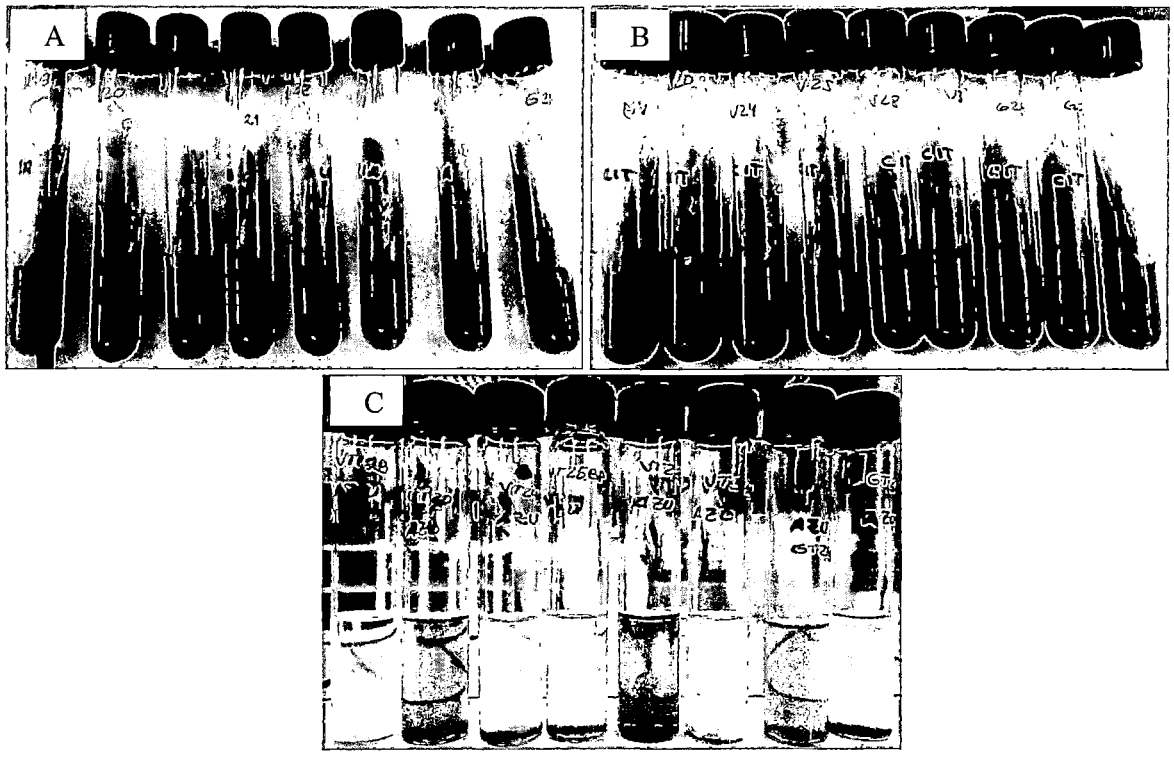


Fig. 32. Pruebas bioquímicas de bacterias endófitas: A, prueba de LIA, B, prueba de citrato y C, prueba de rojo de metilo.

C. Evaluación de las pruebas cualitativas de producción de ácido indol acético (AIA).

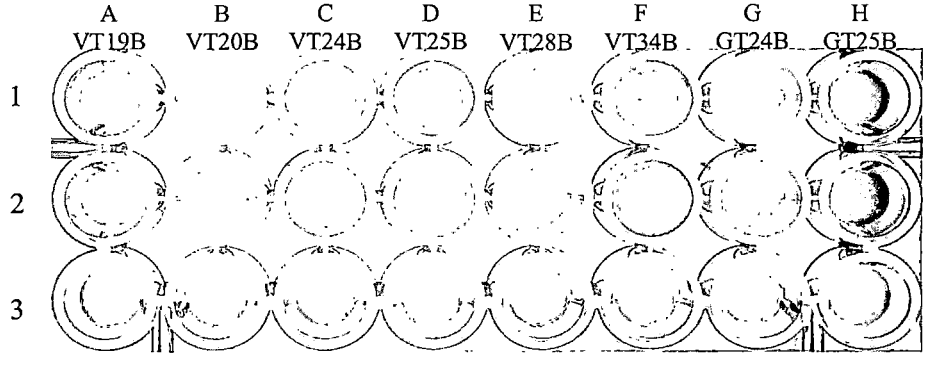


Fig. 33: Las cepas que resultaron positivas a esta prueba fueron: VT19B, VT24B, VT25B, VT34B Y GT25B, correspondientes a la especie: *Rahnella sp, Rouxiella aff. Chamberiensis, Rahnella inusitata, Rahnella sp.* respectivamente.

D. Evaluación cualitativa de producción de sideróforos.

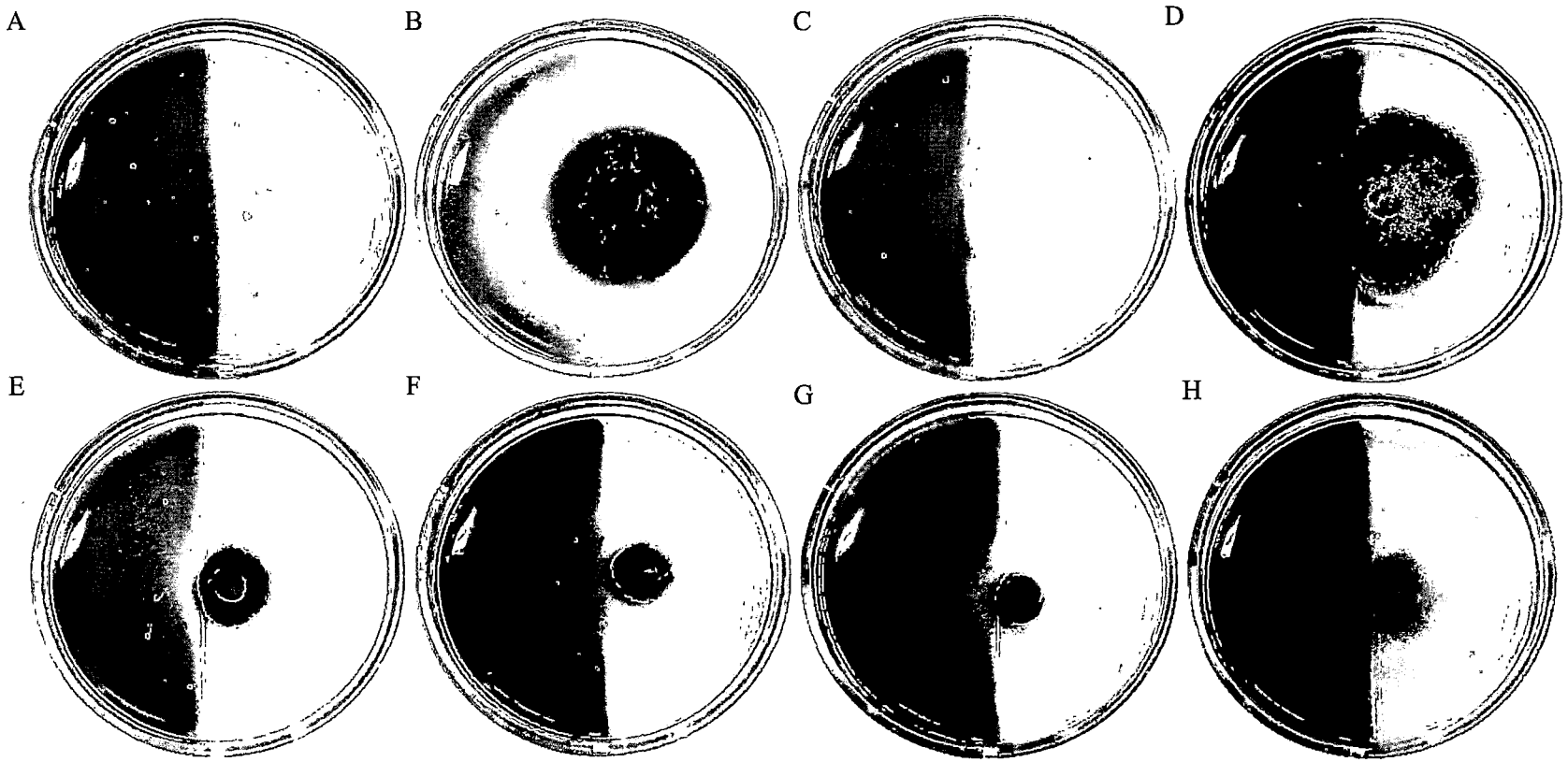


Fig. 34: Prueba de Siderofos de hongos endófitos: la coloración purpura indica la presencia de este compuesto, D: Hongo endófito VT22H, F: *Pyrenochaeta gentianicola* GT23H, G: *Pyrenochaeta sp.* GT24H y H: *Scleroconidioma sphagnicola* GT28H, muestras esta capacidad.

E. Evaluación de la actividad celulolítica

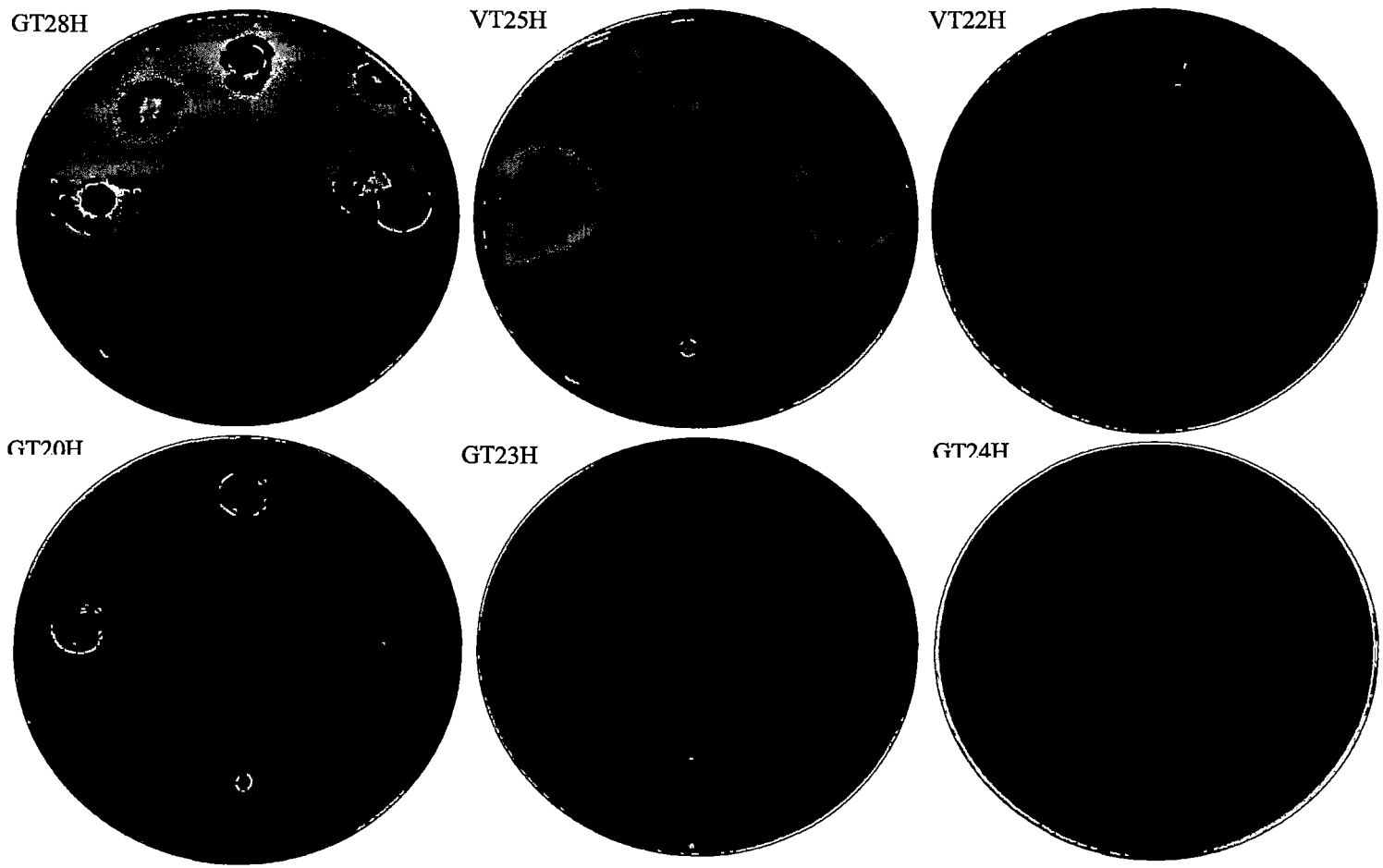


Fig. 35. Evaluación de la actividad celulolítica: Formación del halo alrededor y debajo de las colonias de hongos endófitos.

Fig. 36. Inoculación de bacterias endófitas: Evaluación de longitud de raíz, después de 48 horas de siembra.

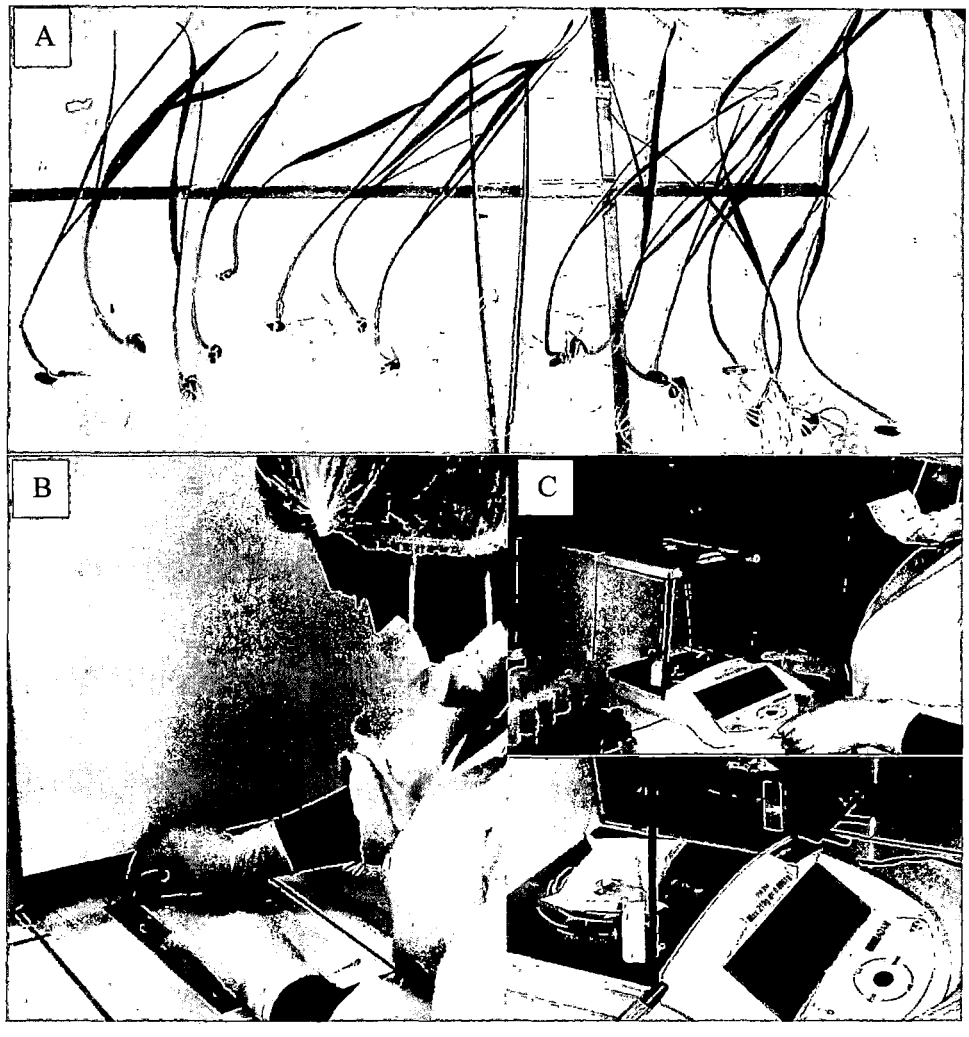


Fig. 37. Evaluaciones de trigo.

ANEXO 5. Análisis estadísticos aplicados a las diferentes pruebas de promoción de crecimiento vegetal

Cuadro 10: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de solubilización de fosfato en bacterias

ANOVA de un factor					
DIAM. HALO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7,351	2	3,675	2371,274	,000
Intra-grupos	,014	9	,002		
Total	7,365	11			

Cuadro 11: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de la actividad celulolitica de hongos endófitos

ANOVA de un factor					
DIAM. HALO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	11,30	7,00	1,61	377,60	,000
Intra-grupos	0,07	16,00	0,00		
Total	11,37	23,00			

Cuadro 12: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo del F. Oxysporium en la actividad antagónica

ANOVA de un factor					
DIAM. HALO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,375	7	,482	90,748	,000
Intra-grupos	,128	24	,005		
Total	3,502	31			

Cuadro 13: Análisis de varianza ANOVA de un factor del diámetro del halo de coloración por la producción de sideroforos de hongos endófitos

ANOVA de un factor					
DIAM. HALO COLOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4420,700	4	1105,175	45,763	,000
Intra-grupos	362,250	15	24,150		

Total	4782,950	19			

Cuadro 14: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 48 horas. Inoculadas con bacterias endófitas.

ANOVA de un factor					
LOG. RAIZ 48H BAC					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	295,506	8	36,938	3,489	,001
Intra-grupos	1630,359	154	10,587		
Total	1925,865	162			

Cuadro 15: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 72 horas. Inoculadas con bacterias endófitas.

ANOVA de un factor					
LOG. RAIZ 72H BAC					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1741,140	8	217,642	7,408	,000
Intra-grupos	4642,094	158	29,380		
Total	6383,234	166			

Cuadro 16: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo de trigo, después de 5 días de trasplantadas al solución Farhaeus inoculas con bacterias endófitas

ANOVA de un factor					
LONG. RAÍZ 5D BAC					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2762,603	8	345,325	2,573	,019
Intra-grupos	7247,714	54	134,217		
Total	10010,317	62			

Cuadro 17: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo y biomasa del trigo, a 10 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LONG. TALLO 10D BAC	Inter-grupos	3083,746	8	385,468	2,340	,031
	Intra-grupos	8896,571	54	164,751		
	Total	11980,317	62			
BIOMASA	Inter-grupos	49466,422	8	6183,303	2,112	,050

Cuadro 18: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 48 horas. Inoculadas con hongos endófitas.

LONG. RAIZ 48H HONGO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	120.143	7	17.163	1.221	.296
Intragrupos	1799.592	128	14.059		
Total	1919.735	135			

Cuadro 19: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de raíz de trigo, después de 72 horas. Inoculadas con hongos endófitas

LONG. RAIZ 48H HONGO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	549.955	7	78.565	3.080	.005
Intragrupos	3342.016	131	25.512		
Total	3891.971	138			

Cuadro 20: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo de trigo, a 5 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas

EVALHONGO5					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	701.400	7	100.200	.980	.452
Intra-grupos	7358.400	72	102.200		
Total	8059.800	79			

Cuadro 21: Análisis de varianza ANOVA de un factor de la longitud de tallo y biomasa del trigo, a 10 días de trasplantadas inoculas con bacterias endófitas

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LONG. TALLO 10D	Inter-grupos	1275.600	7	182.229	.746	.634
	Intra-grupos	17595.600	72	244.383		
	Total	18871.200	79			
BIOMASA	Inter-grupos	25511.370	7	3644.481	1.766	.107
	Intra-grupos	148579.049	72	2063.598		
	Total	174090.419	79			

ANEXO 6. Pruebas de comparación de Duncan de las diferentes pruebas.

Cuadro 22: Prueba de Duncan en la formación de halo de solubilización de fosfato de bacterias endófitas

Duncan[a]				
CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
CONTROL	4	0,000		
VT20BP	4		1,503	
GT24B	4			1,783
Sig.		1,000	1,000	1,000

Cuadro 23: Prueba de Duncan en la formación de halo de actividad celulolitica de hongos endófitas

Duncan[a]						
CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0,05				
		1	2	3	4	5
CONTROL	3	0,000				
VT22HP	3	0,000				
GT23H	3		1,070			
GT24H	3		1,070			
GT20H	3		1,177	1,177		
VT25HP	3			1,283		
GT28HP	3					2,000
Sig.		,286	,148	1,000	1,000	1,000

Cuadro 24: Prueba de Duncan en la formación de halo de crecimiento de colonia de *F. oysporium* en la actividad antagónica con bacterias endófitas

Duncan[a]						
CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0,05				
		1	2	3	4	5
GH10B	4	,025				
VT19B	4		,200			
VT20BP	4		,225			
VT25BP	4		,275			
VT34B	4			,625		
GT25B	4				,750	
VT28B	4				,775	
GT24B	4					1,000
Sig.		1,000	,181	1,000	,632	1,000

Cuadro 25: Prueba de Duncan en la formación de halo de coloración por la producción de sideroforos con hongos endófitas

Duncan[a]				
CEPAS	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
GT24H	4	9,250		
GT23H	4	16,250		
GT28HP	4		25,750	
V22HP	4			34,000
Sig.		,062	1,000	1,000

Cuadro 26: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 48 horas inoculadas con bacteria

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05	
			1	2
Duncan[a,b]	CONTROL	17	9,000	
	VT34B	19		11,579
	VT20BP	19		11,947
	GT25B	19		12,158
	VT19B	16		12,438
	GT24B	19		12,737
	VT24B	16		13,000
	VT28BP	19		13,579
	VT25BP	19		14,000
	Sig.		1,000	,057

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,014.

Cuadro 27: Prueba de Duncan en la longitud de raíz de trigo después de 72 horas, inoculadas con bacteria

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05				
			1	2	3	4	5
Duncan[a,b]	CONTROL	19	20,684				
	VT20BP	19	23,158	23,158			
	VT34B	19	24,316	24,316	24,316		
	VT28BP	19		26,684	26,684	26,684	
	VT19B	17			27,353	27,353	27,353
	GT24B	20			27,400	27,400	27,400
	GT25B	19				29,263	29,263
	VT24B	16				30,438	30,438
	VT25BP	19					30,947
	Sig.		,055	,063	,117	,061	,074

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,476.

Cuadro 28: *Prueba* de Duncan en la longitud de tallo de trigo después de 5 días de trasplantado, inoculadas con bacteria endófitas

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05	
			1	2
Duncan[a]	VT20BP	7	100,571	
	CONTROL	7	105,000	
	VT19B	7	108,571	108,571
	VT34B	7	108,714	108,714
	VT24B	7	110,286	110,286
	GT25B	7	113,286	113,286
	GT24B	7		119,286
	VT25BP	7		119,857
	VT28BP	7		120,571
	Sig.		,076	,099

Cuadro 29: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 10 días de trasplantado, inoculadas con bacteria endófitas

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05		
			1	2	3
Duncan[a]	VT34B	7	156,714		
	VT24B	7	164,143	164,143	
	CONTROL	7	167,286	167,286	167,286
	VT19B	7	167,429	167,429	167,429
	GT24B	7	170,000	170,000	170,000
	VT25BP	7	170,571	170,571	170,571
	VT20BP	7	172,000	172,000	172,000
	GT25B	7		177,571	177,571
	VT28BP	7			182,429
	Sig.		,057	,096	,060

Cuadro 30: Prueba de Duncan en la biomasa de trigo después de 10 días de trasplantada inoculadas con bacterias endófitas

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05	
			1	2
Duncan[a]	CONTROL	7	255,100	
	VT34B	7	271,029	
	GT24B	7	281,743	
	VT24B	7	288,000	
	GT25B	7	305,429	305,429
	VT19B	7	306,929	306,929
	VT20BP	7	310,800	310,800
	VT28BP	7	315,100	315,100
	VT25BP	7		357,614
	Sig.		,080	,113

Cuadro 31: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 48 horas inoculadas con hongos endófitos

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0,05
			1
Duncan[a,b]	VT22HP	17	10,353
	GT23H	18	10,889
	CONTROL	15	10,933
	VT25HP	18	11,167
	GT24H	17	11,294
	GT28HP	18	11,611
	VT26HP	17	13,059
	GT20H	16	13,125
	Sig.		,068

Cuadro 32: Prueba de Duncan en la longitud de la raíz de trigo después de 72 horas inoculadas con hongos endófitos

Duncan a,b				
CEPA	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
GT23H	18	20,111		
VT22HP	17	21,176		
CONTROL	15	22,267	22,267	
VT25HP	18	22,389	22,389	
GT24H	19	22,579	22,579	
GT28HP	18	23,389	23,389	23,389
GT20H	17			26,412
Sig.		,098	,076	,098

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 17,300.

Cuadro 33: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 5 días de trasplantadas, inoculadas con hongos endófitos

CEPAS		N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
Duncan[a]	VT22HP	10	116,500
	CONTROL	10	116,900
	VT26HP	10	120,000
	GT28HP	10	121,200
	GT23H	10	121,500
	GT20H	10	121,600
	VT25HP	10	124,600
	GT24H	10	125,300
	Sig.		,101

Cuadro 34: Prueba de Duncan en la longitud del tallo de trigo después de 10 días de trasplantadas, inoculadas con hongos endófitos

Duncan[a]		
Cepas	N	Subconjunto para alfa = 0,05
		1
VT22H	10	165,600
VT25H	10	169,900
CONTROL	10	170,200
GT28H	10	172,300
GT20H	10	173,700
GT24H	10	174,000
GT23H	10	180,500
Sig.		,072

Cuadro 35: Prueba de Duncan en la biomasa total de trigo a 10 días de ser trasplantada. Inoculadas con hongos endófitos.

Duncan[a]			
cepas	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
CONTROL	10	211,950	
GT24H	10	215,630	
GT28H	10	229,810	229,810
GT20H	10	230,780	230,780
GT23H	10	242,320	242,320
VT25HP	10	247,810	247,810
VT22HP	10		270,340
Sig.		,133	,078