

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

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“EFECTO DE MICROORGANISMOS ENDOFITOS DE PLANTAS  
ALTOANDINAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE  
SEMILLAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS DE  
TEMPERATURA”**

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

**AUTOR:**

**Bach. GEORDANO LUDWIG MIRANDA ZAMORA**

**ASESOR:**

**Dr. PERCY EDUARDO OLIVERA GONZALES**

**Huaraz-Ancash-Perú**

**2019**



FORMATO DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS Y TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN,  
PARA OPTAR GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES EN EL  
REPOSITORIO INSTITUCIONAL DIGITAL - UNASAM

Conforme al Reglamento del Repositorio Nacional de Trabajos de Investigación – RENATI.  
Resolución del Consejo Directivo de SUNEDU N° 033-2016-SUNEDU/CD

**1. Datos del Autor:**

Apellidos y Nombres: MIRANDA ZAMORA, Geordano Ludwig

Código de alumno: 101.0103.373 Teléfono: 959176720

Correo electrónico: [ludwig\\_tierra@hotmail.com](mailto:ludwig_tierra@hotmail.com) DNI: 72962620

**2. Modalidad de trabajo de investigación:**

- Trabajo de investigación                       Trabajo académico  
 Trabajo de suficiencia profesional               Tesis

**3. Título profesional o grado académico:**

- Bachiller                       Título                       Segunda especialidad  
 Licenciado                       Magister                       Doctor

**4. Título del trabajo de investigación:**

EFFECTO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE PLANTAS ALTOANDINAS SOBRE  
LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS  
DE TEMPERATURA

**5. Facultad de:** Ciencias Agrarias

**6. Escuela, Carrera o Programa:** Agronomía

**7. Asesor:**

Apellidos y Nombres: OLIVERA GONZALES, Percy Eduardo      Teléfono: 945122293

Correo electrónico: [olivgon2002@gmail.com](mailto:olivgon2002@gmail.com) DNI: 31651043

A través de este medio autorizo a la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, publicar el trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Institucional Digital, Repositorio Nacional Digital de Acceso Libre (ALICIA) y el Registro Nacional de Trabajos de Investigación (RENATI).

Asimismo, por la presente dejo constancia que los documentos entregados a la UNASAM, versión impresa y digital, son las versiones finales del trabajo sustentado y aprobado por el jurado y son de autoría del suscrito en estricto respeto de la legislación en materia de propiedad intelectual.

Firma:  .....

D.N.I.: 72962620

FECHA: 

24	/	02	/	2020
----	---	----	---	------



UNIVERSIDAD NACIONAL  
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO  
"Una Nueva Universidad para el Desarrollo"

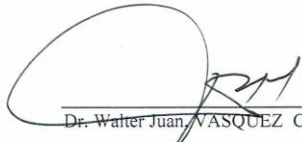
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CIUDAD UNIVERSITARIA DE SHANCAYÁN TELEFAX 043 426 588 - HUARAZ - ANCASH - PERÚ

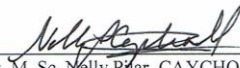


ACTA DE CONFORMIDAD DE TESIS

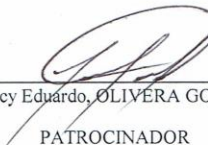
Los miembros del Jurado, luego de evaluar la tesis denominadas: "EFECTO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE PLANTAS ALTOANDINAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS DE TEMPERATURA", presentada por el Bachiller en Ciencias Agronomía Geordano Ludwig, MIRANDA ZAMORA, y sustentada el día 27 de Noviembre del 2019, por Resolución Decanatural N°490-2019-UNASAM-FCA, la declaramos **CONFORME**.

Huaraz 27 de Noviembre del 2019

  
Dr. Walter Juan, VASQUEZ CRUZ  
PRÉSIDENTE

  
Ing. M. Sc. Yelly Pizar, CAYCHO MEDRANO  
SECRETARIA

\_\_\_\_\_  
Ing. Eusebio, REYES HUAMAN  
VOCAL

  
Dr. Percy Eduardo, OLIVÉRA GONZALES  
PATROCINADOR



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado de Tesis que suscriben, reunidos para escuchar y evaluar la sustentación de Tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Agronomía **Geordano Ludwig, MIRANDA ZAMORA**, denominada: "EFECTO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE PLANTAS ALTOANDINAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS DE TEMPERATURA". Escuchada la sustentación y las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, la declaremos:

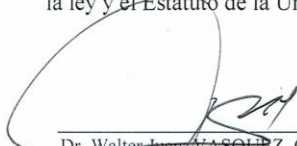
..... APROBADO CON DISTINCIÓN .....

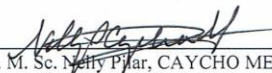
CON EL CALIFICATIVO (\*)

..... DIECISIETE (17) .....

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 27 de Noviembre del 2019

  
Dr. Walter Juan VASQUEZ CRUZ  
PRESIDENTE

  
Ing. M. Sc. Nelly Pilar, CAYCHO MEDRANO  
SECRETARIA

\_\_\_\_\_  
Ing. Eusebio, REYES HUAMAN  
VOCAL

  
Dr. Percy Eduardo, OLIVERA GONZALES  
PATROCINADOR

(\*) De acuerdo con el reglamento de tesis, estas deben ser calificadas con términos de: **APROBADO CON EXCELENCIA** (19 – 20), **APROBADO CON DISTINCIÓN** (17 – 18), **APROBADO** (14 – 16), **DESAPROBADO** (00 – 13).

***¡A mi Familia!***

*Por ser mi soporte en el  
recorrido de este camino tan  
complejo, pero a la vez tan  
hermoso que es la vida.*

## **AGRADECIMIENTO**

- ❖ A mi Familia, por ser ese gran motor que me impulsa a continuar cumpliendo mis objetivos, y sobre todo agradecerles por tener que soportar a mi persona.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Agrarias, me albergaste en tus aulas, me diste grandes catedráticos, compañeros y unos excelentes amigos. Gracias a ti di un primer gran paso, para llegar a ser, aquel profesional que pueda aportar a la educación de nuestros pueblos.
- ❖ Al Dr. Percy Olivera Gonzales, agradecerle por su paciencia hacia mi persona en el desarrollo y asesoramiento del trabajo de investigación, por ser guía y colaborador durante todo el periodo de tiempo que demando el proyecto de investigación,
- ❖ A la Dra. Carmen Tamariz, muchas gracias por todas las enseñanzas brindadas durante mi permanencia en el Laboratorio de Biología.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio de Biología, por el apoyo que me brindaron en la realización de la tesis, y por ser una gran compañía para mi persona.
- ❖ A la Dirección General de Investigación de la UNASAM, por el apoyo económico brindado para la realización del proyecto de investigación.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo Principal.....	2
Objetivos específicos.....	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.....	3
2.2. Fitohormonas.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Lugar de ejecución .....	9
3.2. Época de ejecución.....	9
3.3. Materiales.....	9
3.4. Métodos.....	11
3.5. Procedimiento .....	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
4.1. Determinación de la producción de ácido indol acético (AIA) .....	17
4.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de solubilización de fosfato de calcio. ....	22
4.3. Prueba de detección de Sideróforos en bacterias endófitas. ....	23
4.4. Prueba de inoculación de bacterias en semillas <i>in vitro</i> .....	23
4.5. Prueba de crecimiento de semillas inoculadas con bacterias endófitas ex vitro.....	28
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. RECOMENDACIONES .....	52
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	53
VIII. ANEXO .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de concentración de AIA .....	13
Tabla 2. Valores de Absorbancia de AIA de 8 repeticiones por concentración.....	17
Tabla 3 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas a las 24 y 48h. ....	18
Tabla 4. Prueba de comparación de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas, en ambientes con distintas temperaturas (6, 10, 15, 20 y 25°C). Evaluado a las 24horas. ....	19
Tabla 5. Prueba de comparación de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas, en ambientes con distintas temperaturas (6, 10, 15, 20 y 25°C). Evaluado a las 48h.....	20
Tabla 6 Análisis de varianza ANOVA de dos factores aplicado a la evaluación del diámetro del halo de solubilización de fosfato en bacterias .....	22
Tabla 7 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 3 días, en semillas de maíz.....	24
Tabla 8 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 3 días, en semillas de maíz.....	24
Tabla 9 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20 y 15°C, a los 6 días, en semillas de maíz.....	25
Tabla 10 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 6 días, en semillas de maíz.....	26
Tabla 11 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 15°C, a los 6 días, en semillas de maíz.....	26
Tabla 12 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la alfalfa a 15°C .....	28
Tabla 13 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento de la alfalfa a 15°C.....	28
Tabla 14 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la alfalfa a 20°C.....	29
Tabla 15 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento de la alfalfa a 20°C.....	30
Tabla 16 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del trigo a 15°C.....	31



Tabla 17 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del trigo a 15°C.....	31
Tabla 18 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del trigo a 20°C.....	32
Tabla 19 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del trigo a 20°C.....	32
Tabla 20 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del maíz a 15°C.....	33
Tabla 21 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del maíz a 15°C.....	33
Tabla 22 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del maíz a 20°C.....	34
Tabla 23 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del maíz a 20°C.....	34
Tabla 24 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa a 15 y 20°C.....	35
Tabla 25 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa a 15°C.....	35
Tabla 26 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo 15 y 20°C.....	36
Tabla 27 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo a 20°C.....	37
Tabla 28 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 15 y 20°C.....	38
Tabla 29 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 20°C.....	38
Tabla 30 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa de la alfalfa a 15 y 20°C.....	39
Tabla 31 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la alfalfa a 20°C.....	39
Tabla 34 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la alfalfa a 20°C.....	41
Tabla 35 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 15 y 20°C.....	42

Tabla 36 Comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 15°C .....	42
Tabla 37 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 20°C .....	42
Tabla 38 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 15 y 20°C.....	44
Tabla 39 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 15°C.....	44
Tabla 40 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 20°C.....	44
Tabla 41 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca del tallo del trigo a 15°C.....	45
Tabla 42 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca del tallo del trigo a 15°C .....	45
Tabla 43 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 15°C .....	46
Tabla 44 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 15°C.....	47
Tabla 45 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 20°C.....	47
Tabla 46 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 15 y 20°C .....	48
Tabla 47 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 15°C.....	48
Tabla 48 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 20°C.....	49
Tabla 49 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 15°C .....	58
Tabla 50 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo a 15°C.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Diagrama general del proyecto de Tesis. ....	12
Fig. 2. Curva de calibración del AIA con el reactivo de Salkowsky a base de ácido perclórico. .....	18
Fig. 3: Producción de AIA por bacterias endófitas evaluado a las 24 horas. ....	20
Fig. 4. Producción de AIA por bacterias endófitas evaluado a las 48 horas. ....	21
Fig. 5 Índice de solubilización de fosfato por bacterias endófitas.....	22
Fig. 6 Porcentaje de germinación a distintas temperaturas, evaluado a los 6 días. ....	23
Fig. 7 Porcentaje de germinación en semillas de maíz evaluado a los 3 días. ....	24
Fig. 8 Porcentaje de germinación del Maíz a los 6 días. ....	25
Fig. 9 Porcentaje de germinación en semillas de Alfalfa a los 3 días. ....	27
Fig. 10 Porcentaje de germinación en semillas de Corehuajay evaluado a los 18 días.....	27
Fig. 11 Longitud del tallo de la alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C. ....	29
Fig. 12 Longitud del tallo de la alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C. ....	30
Fig. 13 Longitud del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C.....	31
Fig. 14 Evaluación del crecimiento del trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C. .....	32
Fig. 15 Evaluación del crecimiento del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C. .....	33
Fig. 16 Evaluación del crecimiento del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C. .....	34
Fig. 17 Evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa inoculada con cepas bacterianas a 15 y 20 ° C.....	36
Fig. 18 Evaluación de la longitud de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.....	37
Fig. 19 Evaluación de la longitud de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.....	38
Fig. 20 Evaluación de la biomasa fresca de las plantitas de alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	40
Fig. 21 Evaluación de la biomasa seca de las plantitas de alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	41

Fig. 22 Evaluación de la biomasa fresca de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	43
Fig. 23 Evaluación de la biomasa fresca del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	43
Fig. 24 Evaluación de la biomasa seca de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	45
Fig. 25 Evaluación de la biomasa seca del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	46
Fig. 26 Evaluación de la biomasa fresca de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	47
Fig. 27 Evaluación de la biomasa fresca del área vegetativa del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	48
Fig. 28 Evaluación de la biomasa seca de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	49
Fig. 29 Evaluación de la biomasa seca del área vegetativa del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C. ....	50
Fig. 30 Germinación de semillas de maíz in vitro. ....	55
Fig. 31 Plantas de maíz a temperaturas de 20 y 15°C ....	56
Fig. 32 Plantas de trigo a 20 y 15°C ....	57
Fig. 33 Plantitas de alfalfa ....	58

## RESUMEN

Se evaluaron 27 cepas bacterianas endófitas provenientes de plantas alto andinas, para seleccionar aquellas productoras de Ácido Indol Acético (AIA) a condiciones de bajas temperaturas y evaluar su potencial en la agricultura. Las cepas seleccionadas fueron evaluadas en su capacidad de promover la germinación *in vitro* a 6, 10, 15, 20 y 25°C y crecimiento *ex vitro* de las semillas de *Medicago sativa* “alfalfa”, *Zea mays* “maíz”, *Triticum sp.* “trigo” y *Valeriana henricii* “corehuajay” a 15 y 20 °C. Se consideraron controles sin inoculantes y se evaluó el porcentaje de germinación, tamaño de raíz y parte aérea, y peso. Mediante el ensayo colorimétrico para AIA se encontró que cuatro cepas bacterianas producían AIA a 10, 15, 20 y 25°C a 24 h; mientras que a 6°C produjeron a 48 h. Se seleccionaron las cepas bacterianas endofíticas VT24B y CPc2B para la pruebas de germinación y crecimiento. A condiciones de 15 y 20°C las semillas de maíz inoculadas con las cepas CPc2B y VT24B mostraron mayor porcentaje de germinación y crecimiento de la radícula a los 3-6 días; mientras que en alfalfa y trigo no se encontraron diferencias, pero las semillas de “corehuajay” inoculadas mostraron menor porcentaje de germinación. En las pruebas de crecimiento a 20°C, ambas cepas CPc2B y VT24B promovieron el desarrollo del tallo y la biomasa seca de alfalfa inoculada. En el caso del trigo se encontró que a 15°C las plantas inoculadas con VT24B obtuvieron mayor biomasa seca del tallo, masa fresca y seca de la raíz; mientras que a 20°C las plantas inoculadas con CPc2B tuvieron mayor crecimiento radicular, plantas con VT24B y CPc2B registraron mayor masa fresca, y con VT24B biomasa seca de raíz. El maíz, a 15°C inoculado con CPc2B mostró mayor biomasa seca de raíz; a 20°C las plantas inoculadas con VT24B y CPc2B mostraron mayor longitud radicular, biomasa fresca y seca con respecto al testigo. Los resultados obtenidos muestran que los microorganismos endofíticos evaluados VT24B y CPc2B promueven la germinación, enraizamiento y crecimiento precoz de algunas semillas de interés agrícola, por lo tanto mayores estudios a nivel genético y de campo podrían desarrollarse para su utilización en la agricultura.

**PALABRAS CLAVES:** bacterias endófitas, plantas alto-andinas, producción de AIA, estrés térmico, promoción de crecimiento vegetal

## ABSTRACT

Twenty seven endophytic bacterial strains from high Andean plants were evaluated to select which that produced Indole Acid Acid (AIA) at low temperature conditions and assess their potential in agriculture. The selected strains were evaluated in their ability to promote *in vitro* seed germination at 6, 10, 15, 20 and 25 °C and *ex vitro* growth of the *Medicago sativa* "alfalfa", *Zea mays* "corn", *Triticum sp.* "wheat" and *Valeriana henricii* "corehuajay" at 15 and 20 °C. It was considered controls without inoculants and the germination percentage, root size and aerial part, and weight were evaluated. According to AIA colorimetry test, it was found that four bacterial strains produced AIA at 10, 15, 20 and 25 °C at 24 h; while at 6 °C produced at 48 h. Endophytic bacterial strains VT24B and CPc2B were selected for germination and growth assays. At conditions of 15 and 20 °C, corn seeds inoculated with strains CPc2B and VT24B showed a higher percentage of germination and growth of the radicle at 3-6 days; while with alfalfa and wheat seeds do not found differences, but the inoculated "corehuajay" seeds showed a lower percentage of germination. In growth bioassays at 20 °C, both strains CPc2B and VT24B promoted the higher stem development and dry biomass in inoculated alfalfa. In the case of wheat, it was found that at 15 °C the all species plants inoculated with VT24B yielded greater dry stem biomass, fresh and dried root mass. At 20 °C, all plants inoculated with CPc2B had higher root growth, plants with VT24B and CPc2B recorded greater fresh mass, and with VT24B gained dried root biomass. About corn, at 15 °C and inoculated with CPc2B showed greater dry root biomass; at 20 °C the plants inoculated with VT24B and CPc2B showed greater root length, fresh and dry biomass with respect to the control. The results obtained show that endophytic bacteria strains evaluated VT24B and CPc2B promote the germination, rooting and early growth of some seeds of agricultural interest, therefore further studies at the genetic and field level could be developed for use in agriculture.

**KEY WORDS:** endophytic bacteria, high-Andean plants, AIA production, thermal stress, plant growth promotion

## I.INTRODUCCIÓN

Un gran problema en nuestra zona agrícola son las pérdidas de producción de los cultivos ocasionado por las heladas, fenómeno que ocasiona la quemadura del follaje de las plantas pudiendo llegar a ocasionar la muerte de esta, esto demanda el uso de tecnologías que ayuden al cultivo a poseer o ganar algún tipo de resistencia a estreses de temperaturas bajas, una tecnología que puede ayudar a contribuir en el amortiguamiento de los daños ocasionados en las plantas por este fenómeno abiótico es el uso de microorganismos endófitos inoculados en los cultivos, además que las condiciones actuales demandan una agricultura más amigable con el ambiente.

El presente trabajo de investigación trata sobre las potencialidades que los microorganismos endófitos poseen para el mejoramiento de la agricultura en nuestra región. Estos microorganismos se caracterizan por vivir dentro de su hospedero y formar una relación simbiótica con este. Los PGPM (microorganismos promotores de crecimiento vegetal) promueven el crecimiento y aumento en el rendimiento de las plantas, suprimen a distintos patógenos, pueden ayudar a eliminar algunos contaminantes, solubilizar el fosfato o contribuir con el nitrógeno asimilable a las plantas (Chaves, 2007; Rosenblueth, 2006), estos organismos se pueden localizar en raíces, tallos, hojas u otras partes de la planta.

La investigación en este tema tuvo el afán de conocer cómo se comportan los microorganismos extraídos o aislados de plantas alto andinas cuando son inoculadas en especies de plantas que generalmente se cultivan (alfalfa, maíz y trigo), fue una investigación que tuvo un interés más académico. Asimismo interesa dar a conocer que se tienen cepas de microorganismos endófitos con características deseables para la agricultura y la necesidad de continuar estudiándolas a nivel de campo.

## **Objetivo Principal**

Evaluar el efecto de los microorganismos endófitos sobre la germinación y crecimiento en cuatro especies de plantas bajo condiciones de estrés de temperatura.

## **Objetivos específicos**

- Seleccionar microorganismos endófitos de plantas alto andinas productores de AIA en temperaturas de estrés.
- Evaluar el porcentaje de germinación de las cuatro especies de semillas inoculadas con los microorganismos en temperaturas de 6, 10, 15 y 20°C.
- Evaluar el crecimiento de las plantas tratadas con los microorganismos endófitos bajo condiciones de dos temperaturas (15 y 20 ° C).
- Determinar la correlación de los microorganismos endófitos con las cuatro especies de plantas.



## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal**

Son organismos que pueden formar una asociación simbiótica con alguna especie de planta. Los microorganismos asociados con las raíces son los que generalmente tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad; estos son reconocidos como PGPM por sus siglas en inglés (Plant growth promoting microorganisms) (Rosas et al., 2006).

#### **2.1.1. Microorganismos endófitos**

Según Sanchez (2013), La palabra endófito se deriva de los prefijos endo (dentro) y phyton (vegetal), organismos que viven dentro de las plantas. El término engloba tanto a hongos, bacterias, algas e insectos que no ocasionan daño aparente a la planta (Bravo, 2011).

La colonización de estos microorganismos en plantas es muy frecuente, es así, que se han aislado de hepáticas, musgos, helechos y numerosas angiospermas y gimnospermas (Inbio.ac.cr., 2017).

Estos microorganismos pueden penetrar a sus hospederos por sus estomas, áreas de emergencia de raíces laterales, heridas y por la pared celular ya que pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar esta estructura de la planta (Perez et al., 2009).

Los endófitos desempeñan una función importante en el desarrollo de las plantas huésped común, e incluso pueden llegar a ser útiles en otras especies de plantas (Mohanty, Dubey, & Kollah, 2016), ya que promueven el crecimiento y aumento en el rendimiento de estas, suprimen a distintos patógenos, pueden ayudar a eliminar algunos contaminantes, solubilizar el fósforo o contribuir con el nitrógeno asimilable a las plantas (Chaves, 2007; Rosenblueth, 2006).

### 2.1.2. Mecanismos de acción de los endófitos

Los efectos de las bacterias promotoras de crecimiento no son bien comprendidos hasta el momento, sin embargo se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluyen efectos directos e indirectos.

- El efecto directo consiste en el aumento en la movilización de nutrientes solubles, un mejoramiento en la absorción de la planta, el aumento en la fijación de N<sub>2</sub> y la producción de fitohormonas como: Auxinas, Giberilinas y citoquinina (Ahmad et al., 2005).
- Los efectos indirectos incluye la producción de sideroforos, antibióticos contra hongos, bacterias y virus, mejorar el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa; los cuales inducen resistencia sistémica a la planta (Igual, Valverde, Cervantes, & Vel, 2001).

### 2.1.3. Biosíntesis de auxinas por bacterias

Muchos microorganismos cuyos ciclos de vida incluyen el crecimiento en plantas han evolucionado para sintetizar AIA y otras fitohormonas como una forma de manipular a sus huéspedes (Hobbie, 1997).

El triptófano se ha identificado como un precursor principal de las vías de biosíntesis de AIA en bacterias, es así, que cinco de las seis vías para la biosíntesis de auxinas en bacterias depende del triptófano como precursor del AIA (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007). Las bacterias con mayor frecuencia sintetizan AIA a través de los intermedios indol-3-acetamida e indol-3-piruvato. El gen *iaaM* (de *Agrobacterium tumefaciens*) codifica la monooxigenasa de triptófano, que convierte el triptófano en indol-3-acetamida (IAM). El IAM puede ser convertido, por el producto del *Ag. tumefaciens* *iaaH* gen o por hidrolasas de plantas endógenas en AIA (Hobbie, 1997).

La propiedad de producir hormonas se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de diferentes géneros de bacterias entre las que se destacan: *Azotobacter vinelandii*, *A. paspali*, *A. chroococcum*, *Acetobacter* y *Herbaspirillum*, producen AIA, giberilinas y citoquininas en medios libres de nitrógeno; *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. mutants* sintetizan grandes cantidades de AIA (16 ug/ml) en medios de cultivo (Ahmad et al., 2005; Mok & Mok, 2001). Anwar (2000), presenta las siguientes especies bacterianas como productoras de AIA,

giberilinas y citoquininas son: *Azospirillum paspali*, *Azotobacter spp.*, *Acinetobacters sp.*, *Aerobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Arthrobacter spp.*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium spp.* (Mantilla, 2007).

Experimentos llevados a cabo con estas bacterias muestran un marcado efecto estimulador sobre las plantas aumentando la altura, largo del tallo y el aumento en la biomasa. (Chaves, 2007 y Dibut, 2004).

#### **2.1.4. Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos**

En ambientes naturales, la rizósfera de diferentes especies de plantas es afectada por los PGPM, incluidos los MSF; estos últimos microorganismos movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez et al., 2007).

Las bacterias son los microorganismos predominantes que solubilizan fosfato mineral en los suelos, si se comparan con los hongos y los actinomicetos (Kucey, 1983; Guang- Can et al., 2008). Por otra parte, la mayoría de los microorganismos solubilizadores pueden solubilizar complejos de fosfato de calcio y sólo algunos pueden solubilizar fosfato de aluminio o hierro (Banik y Day, 1983; Gyaneshwar et al., 2002).

Las BSF (Bacterias Solubilizadoras de Fosfato) pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo por medio de la solubilización de fosfato inorgánico de diferentes compuestos como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas (Patiño, 2010). Existen varios géneros bacterianos reconocidos como solubilizadores, entre estas se encuentran: *Rahnella*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* entre otros (Beltrán P., 2014). La habilidad solubilizadora de algunas bacterias puede perderse; al respecto, Muleta (2013) indica que la mayoría de los aislamientos gram positivos y algunos gram negativos pueden perder su capacidad de solubilizar fosfatos tras repetidos subcultivos. Pero esta situación no se ha observado en hongos solubilizadores que en general, exhiben mayor habilidad solubilizadora tanto

en medio líquido como sólido (Banik y Day, 1983; Kucey, 1983; Gyaneshwar et al., 2002).

#### **2.1.5. Bacterias productoras de Sideróforos**

Los sideróforos microbianos son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para así poder secuestrar el hierro de su entorno. Los sideróforos son generados en respuesta a la baja disponibilidad de hierro en el ambiente y su afinidad por este elemento es tal que permite su captación tanto a partir de compuestos presentes en el medio ambiente como a partir de proteínas del organismo hospedero como transferrina o ferritina.(Drechsel & Jung, 1998).

Son moléculas de bajo peso molecular de 0.5 a 1.0 kDa, solubles en soluciones acuosas a pH neutro (Dybas *et al.*, 1995) que son sintetizados por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos), particularmente gramíneas y que actúan como agentes quelantes específicos de  $Fe^{3+}$ .

Recientemente se ha comprobado que *Streptomyces scabies*, una bacteria patógena de plantas que causa serios daños a patatas y otros tubérculos, produce un sideróforo de tipo hidroxamato denominado scabichelina (Kodani et al., 2013).

#### **2.2. Fitohormonas**

Las fitohormonas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan en bajas concentraciones, interviniendo en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo, caída de hojas, entre otros (Salisbury, 1994).

Las hormonas son factores estimulantes del desarrollo, pero este es uno de sus efectos y no su acción fundamental. En realidad las moléculas directamente reguladoras de los procesos de desarrollo son las enzimas involucradas en el proceso. Las hormonas son mensajeras, cuyo papel es actuar como intermediario entre el estímulo, por ejemplo: la luz o la temperatura y la respuesta de la planta, por ejemplo: germinación, floración, etc. (Loredo et al., 2004 citado por Mantilla, 2007).

Existen 7 clases de reguladores de crecimiento vegetal entre los cuales se encuentran las auxinas, giberilinas, citoquininas, brasinosteroides, ácido abscísico, etileno y ácido

jasmónico, las cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Kende and Zeevaart, 1997).

### **2.2.1. Las Auxinas**

Compuesto que estimula la elongación de la planta. Su estructura básica, se compone de un grupo indol.

Para que una sustancia exhiba acción auxínica debe tener un radical ácido, un anillo aromático y de uno a cuatro carbonos entre el carboxilo y el anillo (Rojas y Ramirez, 1987)

La principal auxina natural es el ácido indol-3acético (IAA; IUPAC: ácido indol-3-il-acético), un ácido débil con un pKa de 4.75 (Hobbie, 1997) compuesto que estimula la elongación de la planta.

Se distinguen dos auxinas, el AIA que realiza una acción directa sobre la elongación es decir su acción principal radica en el crecimiento de la planta y en favorecer la maduración del fruto. Y la auxina AIB que se encarga del proceso de enraizamiento. Las auxinas se sintetizan principalmente en el ápice del tallo, yemas, ramas jóvenes y en general en los meristemas (Somers et al., 2005).

Raisman (2006) nos dice que la auxina tiene fuerte polaridad exhibida en el transporte a través de la planta. El transporte se realiza alejándose en forma basipetala, desde el punto apical de la planta hacia su base. Esto reprime los brotes axilares manteniendo la dominancia apical, y Aguirre (2006) complementa diciendo que esta misma auxina retarda la caída de hojas, flores y frutos jóvenes (Mantilla C., 2007).

Las auxinas se localizan principalmente en el citoplasma y los cloroplastos en las células vegetales (Hobbie, 1997).

### **2.2.2. Biosíntesis de auxinas por plantas**

Las auxinas son producidas en las plantas a partir del catabolismo del triptófano en AIA. El triptófano está compuesto por un grupo indol y está universalmente presente en los tejidos vegetales, ya sea en forma libre o incorporada. Hay tres rutas principales de síntesis de auxinas dependientes del triptófano (Taiz & Zeiger, 2002).

La ruta de la tripatamina (TAM). La descarboxilación del triptófano a triptamina, produce una serie de reacciones enzimáticas que originan indol 3-acetaldeído (IAAld), el cual es oxidado por la IAA deshidrogenasa convirtiéndolo en ácido 3-indol acético.

La ruta de síntesis del 3-piruvato (IPA), está estrechamente relacionada con la ruta TAM, ya que su precursor es el TAM el cual es convertido a indol 3 piruvato por la acción enzimática de la Trp aminotransferasa, el cual es descarboxilado para formar IAAld, que es convertido en ácido 3-indol acético. A partir del 3-acetonitrilo (IAN) se origina la ruta de IAN, en la cual el triptófano es inicialmente convertido a indol 3 acetaldoina (IAOx) y posteriormente a IAN, para finalmente ser convertido en ácido 3-indol acético (Taiz & Zeiger, 2002).

## III.MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Lugar de ejecución

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

### 3.2. Época de ejecución

Se realizó del 04/2017 al 11/2019.

### 3.3. Materiales

#### Material biológico

- Semillas de *Valeriana henricii* (corehuajay)
- Semillas de *Medicago sativa* (alfalfa)
- Semillas de *Zea mays* (maíz)
- Semillas de *Triticum sp.* (trigo)
- Microorganismos endófitos

#### Medios de cultivo

- Agar agua
- Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- Caldo Tripticasa de Soya (TSB)
- Medio salino
- Sustrato (arena)

#### Reactivos y soluciones

- Solución NBRIP
- Solución nutritiva de Fahraeus
- Solución Agar Cas (Chrome azurol)
- Agua destilada estéril
- Etanol 96°
- Peptona, glucosa y Extracto de levadura

- Phytigel SIGMA
- L-Triptófano
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)
- Reactivo Salkowsky ( $\text{HClO}_4 + \text{FeCl}_3$ )
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Fosfato tricálcico)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnesio heptahidratado)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Dicloruro de magnesio exahidratado)
- $\text{NaHPO}_4$
- $\text{KCl}$  (Cloruro de potasio)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sulfato de amonio)
- $\text{CaCl}_2$  (Dicloruro de calcio)
- $\text{NaCl}$  (Dicloruro de sodio)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fosfato de potasio monobásico)
- Citrato férrico
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Ácido bórico)
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sulfato de manganeso tetrahidratado)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sulfato de zinc heptahidratado)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Sulfato de cobre pentahidratado)
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Molibdato de sodio dihidratado)
- $\text{HgCl}_2$  (Dicloruro de mercurio)
- $\text{HCl}$ ,  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$
- Lejía

#### **Materiales de laboratorio y otros**

- Placas Petri
- Matrices Erlenmeyer
- Beakers
- Gradillas
- Tubos para microcentrifuga de plástico
- Pinza y bisturí
- Tubos de ensayo
- Guardapolvo, Mascarilla, guantes, toca



- Micro tubos
- Micropipetas
- Pipetas
- Vasos de plástico
- Fuentes de plástico

### **Equipos**

- Balanza analítica
- Autoclave
- Fitotron
- Refrigerador
- pH metro
- Agitador magnético
- Destilador de agua
- Cámara de flujo laminar
- Espectrofotómetro
- Cámara fotográfica
- Computadora

## **3.4. Métodos**

### **3.4.1. Tipo de estudio**

Se trata de una investigación aplicada de nivel experimental de naturaleza cuantitativa, según la captación de la información es prospectiva y según la población es longitudinal.

### **3.4.2. Procesamiento estadístico**

Se trabajó con el Diseño completamente al Azar (DCA), el número de tratamientos y repeticiones estuvo en función al tipo ensayo realizado.

Para el procesamiento de datos se aplicó el análisis de varianza ANOVA de un factor, de clasificación unidireccional con efectos paramétricos, además se usó la prueba de comparación de medias de Duncan ( $\rho = 0,05$ ).

### 3.5. Procedimiento

#### 3.5.1. Diagrama general de la tesis

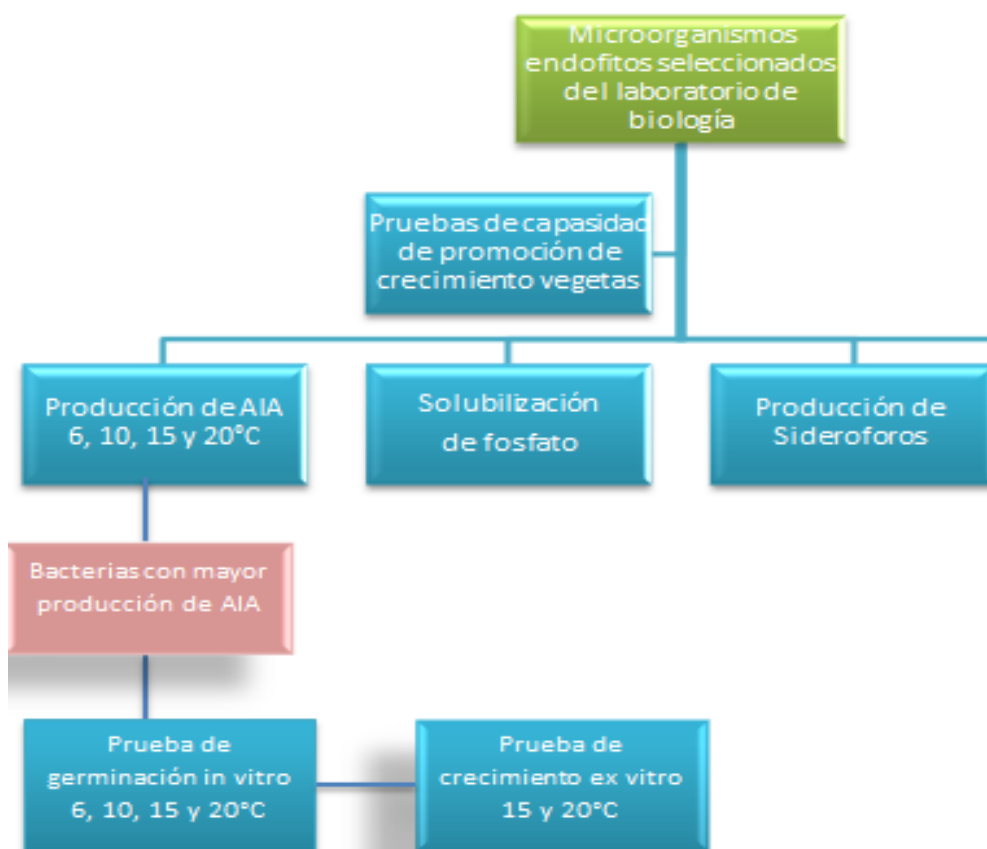


Fig. 1: Diagrama general del proyecto de Tesis.

#### 3.5.2. Selección de cepas de Bacterias Endofíticas

Se tomaron 27 cepas de Bacterias ya aisladas y conservadas en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias – Área investigación (actualmente Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash). Las cuales fueron calificadas en base a la producción de Ácido Indol Acético (AIA), requisito para ser seleccionadas en la investigación.

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

##### 3.5.3.1. Curva patrón del ácido indol acético (AIA)

La curva patrón se diseñó a partir de la preparación de diferentes concentraciones de ácido indol acético. En principio se sometió a la reacción de Salkowski y se determinó su absorbancia a 530 nm.

**Tabla 1. Patrones de concentración de AIA**

<b>Concentraciones (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
0
2
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40

Elaboración propia

Las concentraciones mostradas en la tabla 1, fueron diluidas en agua destilada hasta un volumen final de 1ml.

Una vez preparado los patrones y el reactivo de Salkowski, se procedió a combinar 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los patrones con 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Salkowski dentro de una microplaca, luego se dejó reposar durante 20 minutos, transcurrido dicho periodo de tiempo se leyeron los resultados y se registraron los valores de absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro, y con los resultados se construyó una gráfica cruzando la absorbancia con las concentraciones, sobre la cual se calculó la ecuación de la recta y el valor de  $r^2$  mediante el uso de la hoja de cálculo Excel. Se calculó el promedio de las cuatro repeticiones y se calculó la regresión lineal determinando la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal, el cual debe de ser mayor de 0.9 ya que se considera así una correlación ideal entre los datos (Mesa 1999, citado por Mantilla 2007).

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

La prueba de AIA, se llevó a cabo con cepas jóvenes de bacterias, se refiere a cepas sembradas 24 horas antes, en tubos de ensayo de 15x2,5

conteniendo 4 ml de TSA, luego se prepararon suspensiones de 0.08 a 0.1 de densidad óptica.

Las colonias bacterianas fueron sembradas en tubos de ensayo de 15 x 2.5 conteniendo 4 ml de medio salino suplementado con 2 mg/ml de L-Tryptophano, incubadas a 6, 10, 15, 20 y 25°C durante 24 y 48 horas. Los tubos conteniendo las células bacterianas se centrifugaron a 1300 rpm durante 2 minutos luego se separaron del sobrenadante. La mezcla se realizó en microplacas, 100 µl del sobrenadante con 100 µl de reactivo Salkowsky (10 ml 35% HClO<sub>4</sub> + 200 µl FeCl<sub>3</sub>) (Loper & Schroth, 1986) y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se leyeron las absorbancias a 530 nm en un espectrofotómetro solo a las cepas que mostraron coloración. A partir de la absorbancia y la ecuación de la recta de la curva de calibración, se determinó la concentración de AIA producida por las cepas. Las mediciones de producción de AIA se realizaron a las 24 y 48 horas.

#### **3.5.4. Actividad de solubilización de fosfato de calcio**

En la prueba de la solubilización de fosfato con bacterias se usó el medio NBRIP con Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como fuente de fósforo insoluble, con un pH de 7. Para lo cual se preparó inóculos jóvenes con 0,08 a 0,1 de densidad óptica a 620nm, los cuales fueron embebidos en discos de papel filtro estéril y sembrado en placas de Petri (Nautiyal, 1999 citado por Ulloa, 2016). Como control se usaron discos de papel filtro con agua destilada estéril, todos los tratamientos fueron incubados durante 72 horas a 24°C.

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

$$IPS = A/B$$

Dónde:

IPS: Índice de fósforo soluble

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

B: Diámetro de la colonia

### 3.5.5. Prueba de detección de Sideróforos en microorganismos endófitos

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 realizaron dos replicas por cepa. Las placas fueron incubadas por 72 horas a 24 °C (Ulloa, 2016).

### 3.5.6. Pruebas de inoculación de semillas *in vitro*

En el experimento se utilizaron como inóculo las cepas bacterianas CPc2B Y VT24B, ambas productoras de AIA.

Para la instalación del ensayo se realizó los siguientes procedimientos:

- **Desinfección.-** Las semillas se desinfectaron superficialmente con HgCl<sub>2</sub> al 0.1% durante 10 minutos y posteriormente fueron enjuagados con agua destilada estéril cinco veces, cada enjuague constó de un minuto.
- **Preparado del inóculo.-** Para la inoculación se usaron cepas bacterianas jóvenes, de las cuales se prepararon suspensiones bacterianas de 0.08 a 0.1 de densidad óptica a 620 nm.

Luego se procedió a sumergir las semillas en los inóculos preparados durante un periodo de 30 minutos. En las Placas de Petri que contenían agar agua, se colocaron 20 semillas ya inoculadas con dos replicas por tratamiento, para el caso del testigo las semillas solo fueron sumergidas en agua destilada estéril por 30 minutos, finalmente las placas se incubaron en oscuridad a temperaturas de: 6, 10, 15 y 20°C.

Todas las actividades antes de la incubación se desarrollaron en una cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia.

### 3.5.7. Pruebas de crecimiento *ex vitro*

Para estas pruebas de inoculación en semillas, sólo se trabajó con las cepas bacterianas CPc2B y VT24B ambas productoras de AIA, y se emplearon dos ambientes, con temperaturas de 15 y 20°C. en esta prueba se trabajó con las semillas de maíz, trigo y alfalfa.

En esta ensayo se siguió la misma metodología de desinfección de semillas que en la prueba *in vitro*.

El sustrato empleado que albergó a las semillas fue arena, la cual fue lavada y posteriormente esterilizada en autoclave, luego este se depositó en vasos de plásticos estériles, donde se sembraron dos semillas por cada recipiente; y se pusieron a crecer a 15 y 20°C de temperatura con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

## IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

#### 4.1.1. Curva patrón del ácido indol acético (AIA)

El color de reacción con el reactivo de Salkowsky puede variar según el compuesto detectado, caracterizándose al AIA, por generar un color fucsia en reacción con dicho reactivo. La tonalidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de AIA (Bric et al., 1991).

En la tabla 2, se muestran los datos obtenidos de la lectura de absorbancia a 530 nm, obtenidas a partir de las concentraciones establecidas en los patrones de concentración de AIA como rangos reportados por Somers et al., 2005.

Tabla 2. Valores de Absorbancia de AIA de 8 repeticiones por concentración.

Concentraciones (µg/ml)	Absorbancia 530nm (promedio)	DESVIACIÓN
0	0	0
2	0.044	0.0018
4	0.097	0.0145
8	0.197	0.0100
12	0.245	0.0140
16	0.311	0.0105
20	0.370	0.0093
24	0.421	0.0162
28	0.468	0.0041
32	0.507	0.0231
36	0.515	0.0312
40	0.539	0.0165

Con dichos datos se realizó la curva de calibración, estos fueron analizados mediante regresión lineal, y se obtuvo una ecuación de la recta equivalente a  $y = 0.0137x + 0.056$ , con un valor de  $R^2 = 0.9577$  (Fig. 2). Es así que, el valor  $R^2 > 0,9$  muestra una dispersión homogénea de los valores sobre la recta, aceptando así el uso de la ecuación obtenida como un patrón de referencia válido para el cálculo de las concentraciones de AIA producidas por las bacterias endófitas.

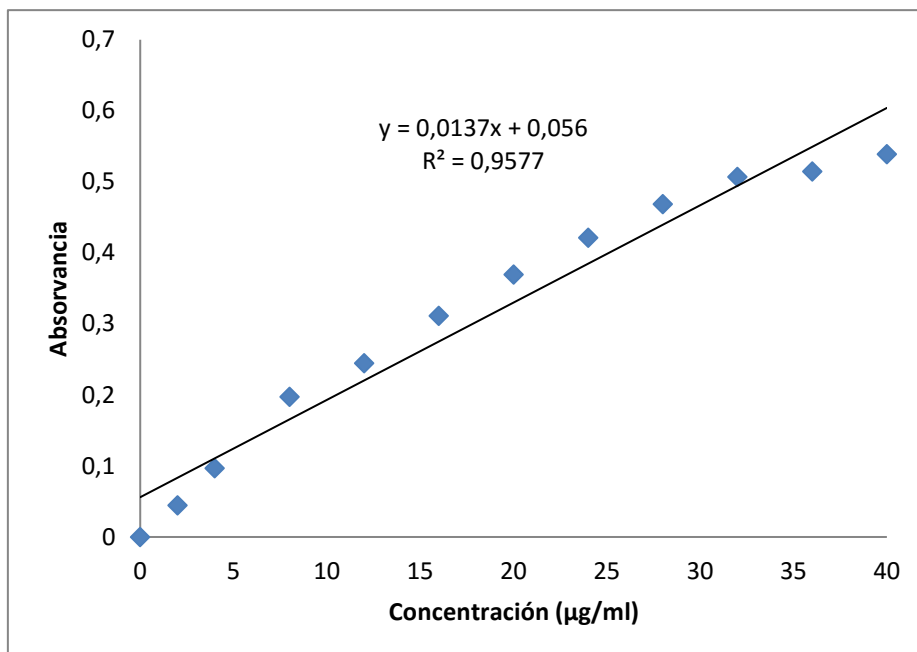


Fig. 2. Curva de calibración del AIA con el reactivo de Salkowsky a base de ácido perclórico.

#### 4.1.2. Producción de ácido indol acético (AIA)

La prueba de AIA realizado por el método de colorimetría fue evaluada a las 24 y 48h, en ambas lecturas se obtuvo como resultado, que del total de bacterias sometidas a dicha prueba sólo cuatro de ellas originaron el cambio de coloración del medio a un color púrpura. A dichas bacterias se les sometió a la lectura de absorbancia.

El análisis de varianza ANOVA (tabla 3), mostró diferencias estadísticas significativas a las 24 y 48 horas.

Tabla 3 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas a las 24 y 48h.

	<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>
AIA 24h	<b>TRATAMIENTO</b>	19	1.017	0.054	581.15 *
	<b>ERROR</b>	60	0.006	0	
	<b>EXPERIMENTAL</b>				
	<b>TOTAL</b>	79	1.022		
AIA 48h	<b>TRATAMIENTO</b>	19	0.451	0.024	1094.70 *
	<b>ERROR</b>	60	0.001	0	
	<b>EXPERIMENTAL</b>				
	<b>TOTAL</b>	79	0.452		

La evaluación hecha a las 24 horas (Fig. 3) y analizado con la prueba de comparación de Duncan (tabla 4) muestra que:

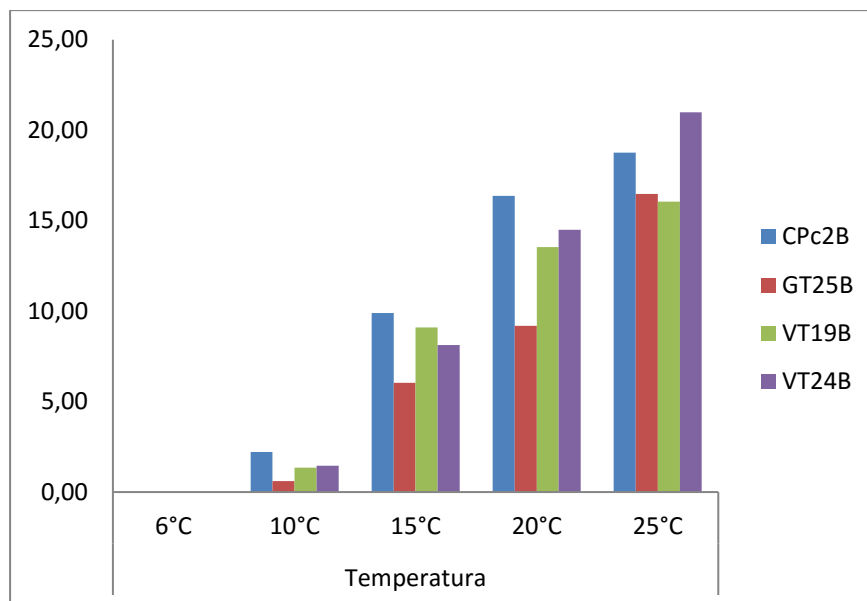


**Tabla 4. Prueba de comparación de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas, en ambientes con distintas temperaturas (6, 10, 15, 20 y 25°C). Evaluado a las 24horas.**

TRATAMIENTO		Temperatura (°C)				
		06	10	15	20	25
CPc2B	4	0.00	0.08 c	0.19 f	0.28 i	0.31 j
GT25B	4	0.00	0.05 b	0.13 d	0.18 f	0.28 i
VT19B	4	0.00	0.06 bc	0.18 f	0.24 g	0.27 i
VT24B	4	0.00	0.07 bc	0.16 e	0.25 h	0.35 k

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

- A 6°C las bacterias en estudio no produjeron AIA.
- A 10°C la prueba de Duncan indica que existen diferencias significativas entre la cepa CPc2B (2.22ug/ml), y las cepas *Rouxilla sp.* (VT24B), *Rahnella sp* (VT19B), *Rahnella sp* (GT25B) con valores de 1.45, 1.34, y 0.61 ug/ml respectivamente.
- A temperaturas de 15°C se mostró como mejor productor a la CPc2B con 9.89 ug/ml, seguidas de la VT19B, VT24B y GT25B con concentraciones de 9.10, 8.12 y 6.04 ug/ml respectivamente.
- A 20°C se tuvo el siguiente orden de valores de AIA; de mayor a menor: CPc2B (16.37ug/ml), VT24B (14.50ug/ml), VT19B (13.54ug/ml) y GT25B (9.19ug/ml)
- y a la temperatura de 25°C se dio el siguiente orden: VT24B (20.98ug/ml), CPc2B (18.76ug/ml), GT25B (16.48ug/ml) y VT19B (16.06ug/ml).



**Fig. 3:** Producción de AIA por bacterias endófitas evaluado a las 24 horas.

La comparación de medias de Duncan (tabla 5) hecha a la producción de AIA a las 48 horas (Fig.4) arrojaron los siguientes resultados.

**Tabla 5.** Prueba de comparación de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la producción de AIA por cepas bacterianas, en ambientes con distintas temperaturas (6, 10, 15, 20 y 25°C). Evaluado a las 48h.

TRATAMIENTO	N	Temperatura (°C)				
		06	10	15	20	25
GT25B	4	0.050 a	0.081 c	0.170 f	0.185 h	0.229 l
VT19B	4	0.058 b	0.103 d	0.178 g	0.206 ij	0.211 j
VT24B	4	0.060 b	0.102 d	0.203 i	0.234 lm	0.316 ñ
CPc2B	4	0.063 b	0.126 e	0.220 k	0.233 lm	0.236 n

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

- Temperatura de 06°C.- las cuatro bacterias mostraron una mínima producción de AIA, entre estas la que obtuvo mayor concentración fue la cepa CPc2B (1.27ug/ml), seguidas de VT24B (1.03ug/ml), VT19B (0.89ug/ml) y GT25B (0.35ug/ml).
- Temperatura de 10°C.- Se observó un incremento en las concentraciones de AIA con respecto a la evaluación hecha a las 24h. estos valores son: CPc2B (5.68ug/ml), VT19B (4.03ug/ml), VT24B (3.98ug/ml), y GT25B (2.55ug/ml).
- Temperatura de 15°C.- A esta temperatura también se produjo un incremento de AIA en comparación con la primera evaluación. Las

concentraciones son las siguientes: CPc2B (12.23ug/ml), VT24B (11.04ug/ml), VT19B (9.28ug/ml) y GT25B (8.77ug/ml).

- Temperatura de 20°C.- Las cepas mostraron un descenso en la concentración de AIA en comparación a la primera evaluación; dando los valores que siguen: VT24B (13.24ug/ml), CPc2B (13.15ug/ml), VT19B (11.25ug/ml); con excepción de la GT25B que produjo 9.80ug/ml.
- Temperatura de 25°C.- En este tratamiento también se observó el mismo comportamiento dado a temperatura de 20°C, leyéndose los resultados siguientes: VT24B (18.92ug/ml), CPc2B (13.36ug/ml), GT25B (12.84ug/ml) y VT19B (11.62ug/ml).

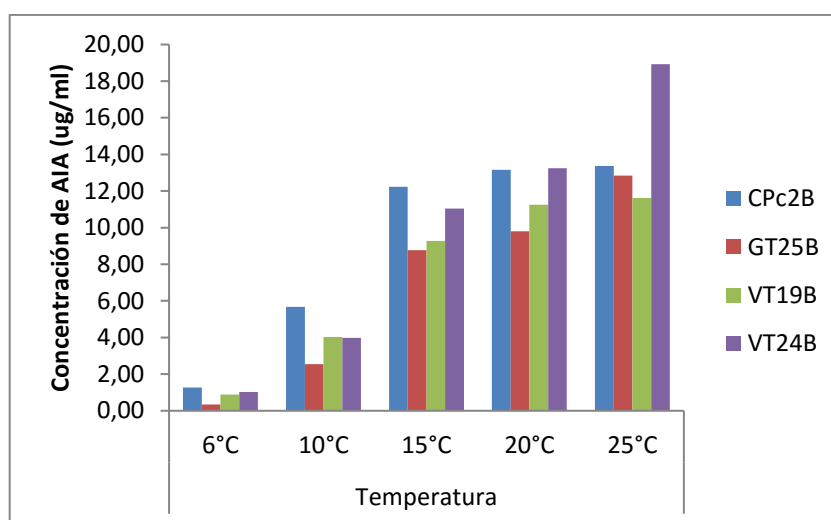


Fig. 4. Producción de AIA por bacterias endófitas evaluado a las 48 horas.

A condiciones de 25°C e incubados por 48 horas, según los resultados de Ulloa (2016) reporta como productoras de AIA a *Rouxiella aff chamberiensis* VT24B la cual produjo 43,051  $\mu\text{g/ml}$ , al igual que las cepas VT19B y GT25B (genotipos de *Rahnella* sp.) aunque, estas dos últimas cepas produjeron AIA en concentraciones más bajas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación.

La ausencia y poca producción de AIA a temperaturas de 6, 10 y 15°C probablemente se debió al retraso en la multiplicación de las bacterias por estar en condiciones de estrés de temperatura, es así que, Calvo (2010), encontró que, sus cepas incubadas a 4°C iniciaron su multiplicación recién al décimo día, a los 10°C comenzaron su multiplicación al tercer día, a los 15°C mostraron respuesta al segundo día, y a los 20°C su multiplicación

inició a las 24 horas; esto explicaría del porque las cepas bacterianas incubadas a 6°C mostraron producción de AIA recién al segundo día, también explicaría la diferencia de niveles de concentración de AIA que existe entre las cepas puestas a diferentes temperaturas.

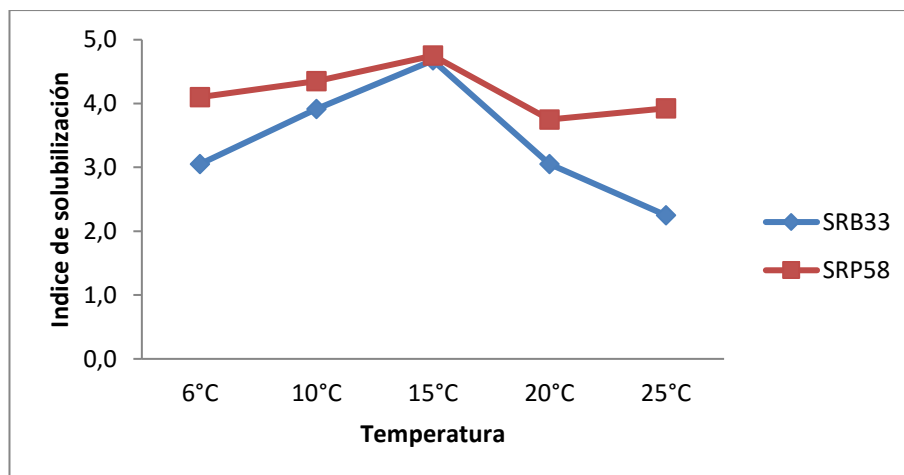
#### 4.2. Evaluación *in vitro* de la actividad de solubilización de fosfato de calcio.

Las evaluaciones realizadas, determinaron que sólo las cepas bacterianas SRB33 Y SRP58 tuvieron actividad solubilizadora de fosfato de calcio. El análisis de varianza ANOVA (tabla 6) determinó que existen diferencias significativas entre las cepas solubilizadoras de fosfato.

**Tabla 6** Análisis de varianza ANOVA de dos factores aplicado a la evaluación del diámetro del halo de solubilización de fosfato en bacterias

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Gl	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Cepas	1.65890625	4	0.41473	22.75396	0.00005	3.47805
Temperatura	0.775195313	1	0.77520	42.53108	0.00007	4.96460
Interacción	0.37359375	4	0.09340	5.12430	0.01653	3.47805
Dentro del grupo	0.182265625	10	0.01823			
Total	2.989960938	19				

La cepa bacteriana SRP58 es el endófito que produjo el mejor índice de solubilización en comparación a la cepa SRB33 como se puede apreciar en la Fig.5



**Fig. 5** Índice de solubilización de fosfato por bacterias endófitas.

El mejor nivel de solubilización de fosfato se dio a 15°C, esta evaluación se realizó a los 7 días. Mujahid et al. (2015) en su estudio hecho encontró que la solubilización de fosfato aumentaba a temperatura de 25 °C, y observó que a temperaturas mayores, aunque el crecimiento bacteriano aumentaba, la zona del halo disminuía, es decir la solubilización de fosfato era menor.

Kundu et al. (2010), puso a prueba la capacidad de solubizar fosfato de la cepa 1P a temperaturas de 4, 15 y 30°C, obteniendo los mejores resultados a 15 y 30°C; lo cual coincide con los resultados de esta investigación.

#### 4.3. Prueba de detección de Sideróforos en bacterias endófitas.

La prueba de sideróforos aplicada a las cepas bacterianas estudiadas en el presente trabajo de investigación, no produjeron respuestas positivas en las condiciones evaluadas.

#### 4.4. Prueba de inoculación de bacterias en semillas *in vitro*

##### 1. Porcentaje de germinación en trigo

No se muestran diferencias significativas entre las semillas inoculas y el testigo. El porcentaje de germinación del trigo fluctuó entre 62.5% y 80% como se puede apreciar en la fig.6.

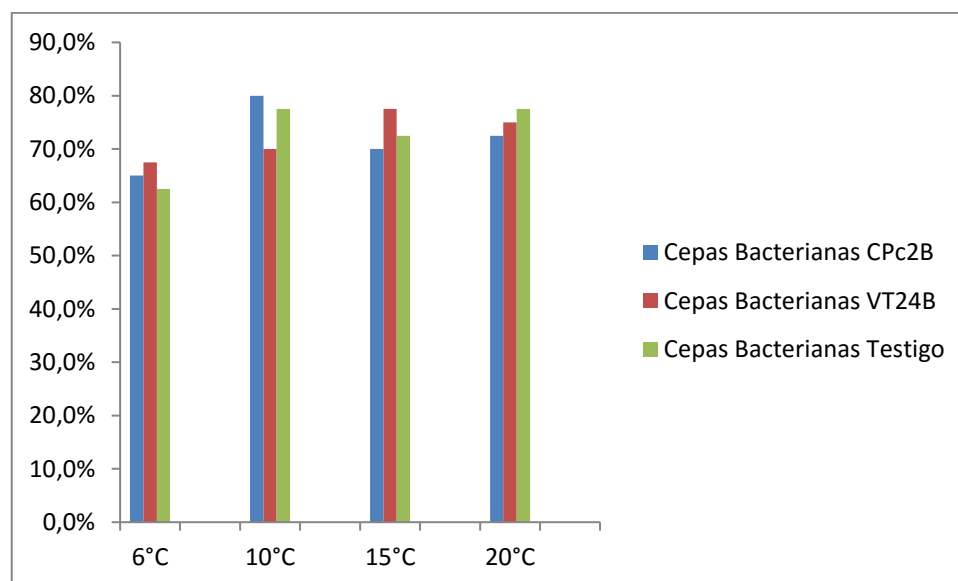


Fig. 6 Porcentaje de germinación a distintas temperaturas, evaluado a los 6 días.

El poder germinativo del trigo tiende a ser alto, casi siempre tiende a bordear un 100%. La germinación obtenida en este estudio tubo un promedio de 75%, esto pudo deberse al tratamiento de desinfección con di cloruro de mercurio, Velázquez (2009) encontró que la germinación de las semillas de trigo fue afectada por la desinfección con 5% de hipoclorito sodio, con germinación de 86-94% y disminuyó aún más al cuando se aumentó al 6% el desinfectante, obteniendo 68-84% de germinación.

## 2. Porcentaje de germinación en maíz

La evaluación realizada a los tres días (fig.7), mostró que, a temperaturas de 15 y 20°C hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las semillas de maíz inoculadas con las bacterias en comparación con las semillas testigo.

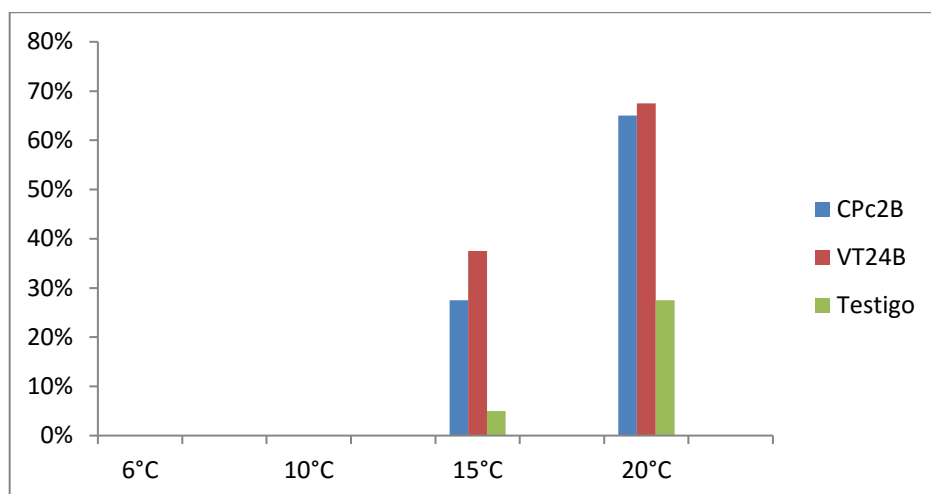


Fig. 7 Porcentaje de germinación en semillas de maíz evaluado a los 3 días.

El análisis de varianza ANOVA (tabla 7) mostró diferencias significativas estadísticas a 20°C en el tamaño de las radículas de las semillas de maíz.

Tabla 7 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 3 días, en semillas de maíz.

FV	GL	SC	CM	F
<b>TRATAMIENTO</b>	2	4.519	2.260	3.840 *
<b>ERROR EXP.</b>	61	35.897	0.588	
<b>TOTAL</b>	63	40.416		

La comparación de Duncan (tabla 8) muestra diferencias entre las cepas CPc2B (7.3mm), VT24B (7.0mm) comparadas con el testigo (3.3mm).

Tabla 8 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 3 días, en semillas de maíz.

TRATAMIENTO	PROMEDIO
Testigo	3.3
CPc2B	7.3
VT24B	7.0

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

A temperatura de 15°C ANOVA no arrojó diferencias significativas, aun así, las semillas inoculadas obtuvieron los mejores valores, VT24B (2.3mm), CPc2B (1.9mm) y el testigo (1.4mm).

A los 6 días (fig.8) el margen de diferencia en el porcentaje de germinación se vio reducido.

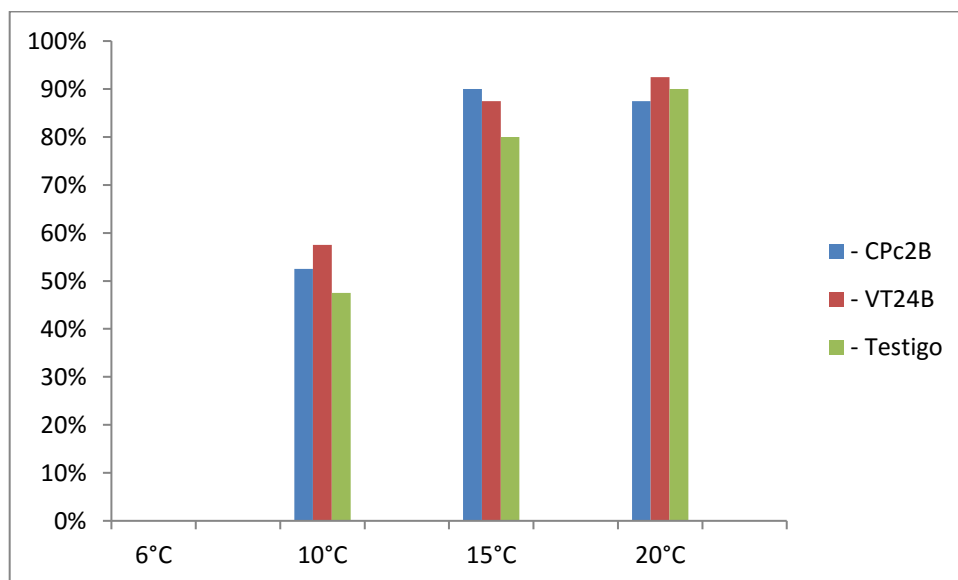


Fig. 8 Porcentaje de germinación del Maíz a los 6 días.

Aun así mismo, ANOVA (tabla 9) mostró diferencias estadísticas significativas a 20 y 15°C en el tamaño de las radículas de las semillas inoculadas.

Tabla 9 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20 y 15°C, a los 6 días, en semillas de maíz.

	FV	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
20°C	Entre grupos	37.915	2	18.957	31.556*
	Dentro de grupos	61.878	103	0.601	
	Total	99.793	105		
15°C	Entre grupos	13.062	2	6.531	13.386*
	Dentro de grupos	48.787	100	0.488	
	Total	61.849	102		

La prueba de comparación de medias de Duncan (tabla 10) hecha al tratamiento de 20°C muestra como resultado que la cepa CPc2B

(13.7mm), VT24B (11.3mm) en comparación a las semillas no inoculadas (4.3mm) tienen diferencias estadísticas significativas.

**Tabla 10 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 20°C, a los 6 días, en semillas de maíz.**

Tratamiento	Promedio de crecimiento radicular cm
Testigo	2.33 c
VT24B	3.43 b
CPc2B	3.72 a

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

A 15°C Duncan (tabla 11) indica diferencias significativas entre semillas inoculadas con CPc2B (10.2mm) comparadas con los tratamientos VT24B (6.3mm) y el testigo (5.3mm), entre estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias significativas.

**Tabla 11 Comparación de Duncan, aplicado a la evaluación del crecimiento de la radícula a 15°C, a los 6 días, en semillas de maíz.**

Tratamiento	Promedio
testigo	2.41 b
VT24B	2.63 b
CPc2B	3.25 a

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

Por lo que se puede decir que, en el cultivo de maíz las bacterias usadas promovieron significativamente el crecimiento temprano de la radícula del maíz, efecto que se le atribuye a la producción de metabolitos secundarios (AIA) producidos por las bacterias VT24B y CPc2B.

### 3. Porcentaje de germinación en Alfalfa

En la evaluación de la alfalfa (fig.9) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en temperaturas de 6 y 10°C.



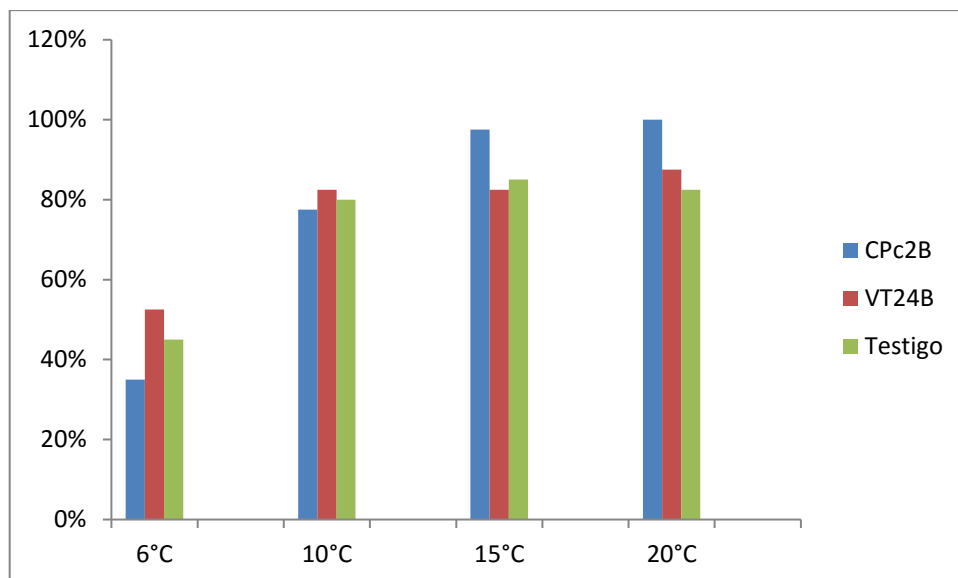


Fig. 9 Porcentaje de germinación en semillas de Alfalfa a los 3 días.

Se pudo observar que a temperaturas de 15 y 20°C las semillas inoculadas con la cepa CpC2B tuvo los mejores porcentajes de germinación en comparación al de las semillas con las cepas VT24B y el testigo.

#### 4. Porcentaje de germinación en Corehuajay

En la evaluación a las semillas de “corehuajay” (fig.10) se observó que estas semillas tuvieron un bajo porcentaje de germinación, siendo aún menor en semillas inoculadas en contraste con el testigo. Por tanto en las semillas de “corehuajay” las cepas bacterianas no favorecieron su desarrollo.

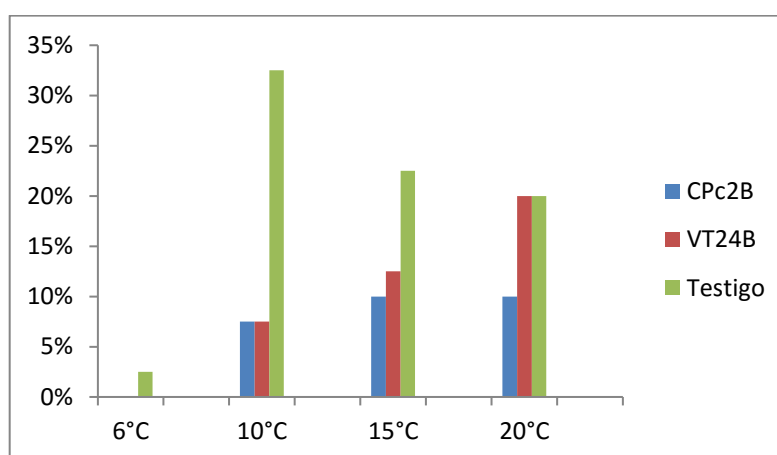


Fig. 10 Porcentaje de germinación en semillas de Corehuajay evaluado a los 18 días.

El efecto del microorganismo depende de: la especie vegetal, concentración del inoculante, y condiciones de crecimiento (Belimov, 2007), es así que las concentración del inoculante,

pueden estimular o inhibir la germinación en trigo (Alen’kina & Nikitina, 2015)

#### 4.5. Prueba de crecimiento de semillas inoculadas con bacterias endófitas ex vitro

##### 4.5.1. Efecto de la inoculación de endófitos en el crecimiento del Alfalfa, trigo y maíz.

###### 1. Crecimiento del cultivo de alfalfa

- El análisis de varianza ANOVA (tabla 12) muestra diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 12** Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la alfalfa a 15°C

FV	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	106.468	14	7.605	8.179 *
Dentro de grupos	107.857	116	0.930	
Total	214.325	130		

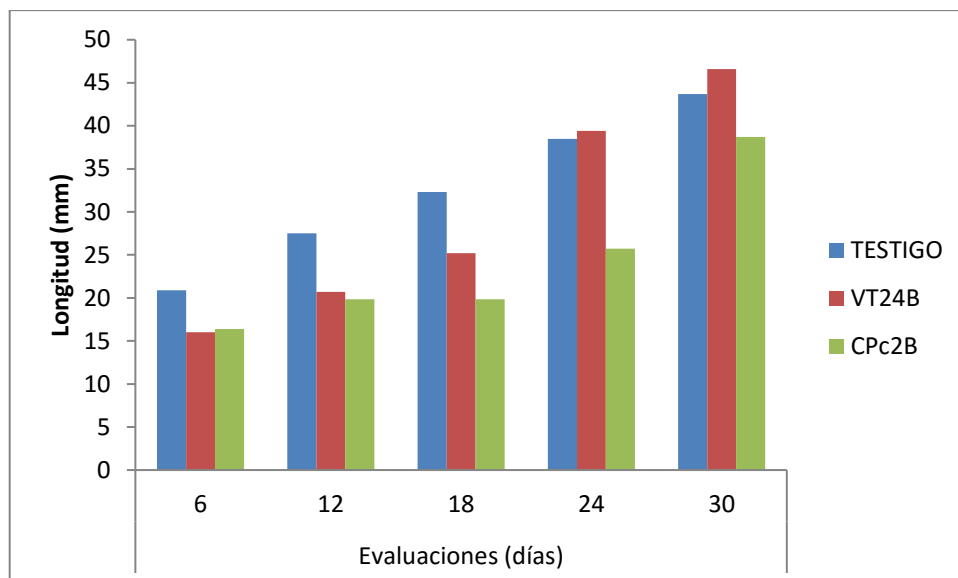
La prueba de Duncan (tabla 13), indica diferencias significativas entre el testigo y la cepa CPc2B evaluado a los 18 días (3era evaluación).

**Tabla 13** Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento de la alfalfa a 15°C

Tratamiento	Evaluaciones				
	1era	2da	3era	4ta	5ta
VT24B	4.0519 a	4.5534 ab	5.0200 abc	6.2581 def	6.8095 f
CPc2B	4.1060 a	4.4669 ab	4.4822 ab	5.0830 abc	6.2146 def
Testigo	4.6351 a	5.2630 bcd	5.7088 cde	6.2314 def	6.6470 ef

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La prueba de comparación de Duncan (tabla 13) también mostró diferencias significativas en el día 24 (cuarta evaluación), entre el testigo y CPc2B, así mismo hubo diferencias estadísticas significativas entre VT24B y CPc2B.



**Fig. 11 Longitud del tallo de la alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C.**

Se aprecia en la fig. 11. El crecimiento progresivo de las semillas del testigo desde su primera evaluación hasta la quinta, las semillas de alfalfa inoculadas con la cepa VT24B tienen un disparo en el crecimiento a partir del día 18 (3era evaluación) al día 30 (5ta evaluación), de forma semejante se comportaron las semillas embebidas con el inóculo CPc2B mostrando un crecimiento acelerado a partir del día 24 (4ta evaluación).

- El análisis de varianza ANOVA (tabla 14) realizado al crecimiento de la alfalfa a temperatura de 20°C demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

**Tabla 14 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento de la alfalfa a 20°C**

FV	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	36775.18	14	2626.798	40.856 *
Dentro de grupos	12730.31	198	64.295	
Total	49505.49	212		

**Tabla 15 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento de la alfalfa a 20°C**

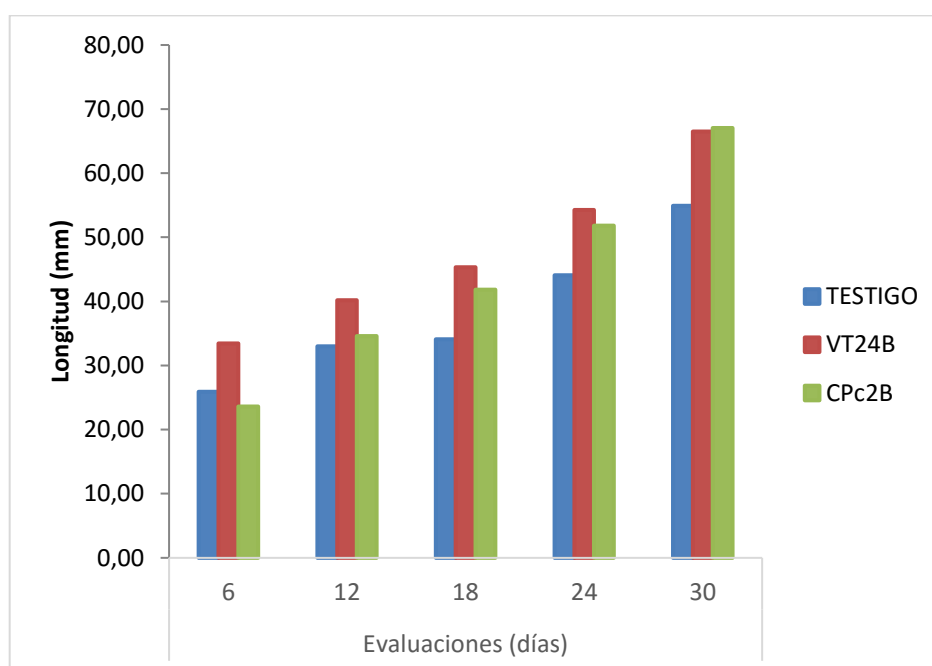
TRATAMIENTO	Evaluación				
	1era	2da	3era	4ta	5ta
<b>VT24B</b>	33.47 b	40.19 cd	45.31 d	54.25 e	66.50 f
<b>CPc2B</b>	23.59 a	34.59 bc	41.82 d	51.82 e	67.06 f
<b>Testigo</b>	25.89 a	34.10 bc	33.00 b	44.10 d	54.90 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La prueba de comparación de Duncan a 20°C (tabla 15) encontró que: A los 6 días después de la siembra (1ra evaluación) hay diferencias significativas entre la cepa VT24B y los otros dos tratamientos.

En la tercera evaluación (día 16) existen diferencias significativas entre la VT24B y el testigo, de la misma forma hay significancia entre CPc2B y el testigo.

En los días 24 y 30 (4ta y 5ta evaluación), la comparación de Duncan muestra que también hay diferencias significativas entre las dos cepas bacterianas contra el testigo.



**Fig. 12 Longitud del tallo de la alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C.**

Las semillas inoculadas tuvieron un mejor comportamiento en el crecimiento a 20°C en comparación a las semillas no inoculadas, lo que difiere al tratamiento llevado a cabo a 15°C, en donde el testigo fue uno de los que tuvo uno de los mejores crecimientos.

## 2. Longitud del tallo de Trigo

- En la fig. 13 se muestra el crecimiento de las semillas de trigo las cuales fueron inoculadas con las cepas bacterianas CPc2B y VT24B, y comparadas con el crecimiento de semillas sin inoculo (testigo).

A temperatura de 15°C el análisis de varianza ANOVA (tabla 16) indican diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 16 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del trigo a 15°C**

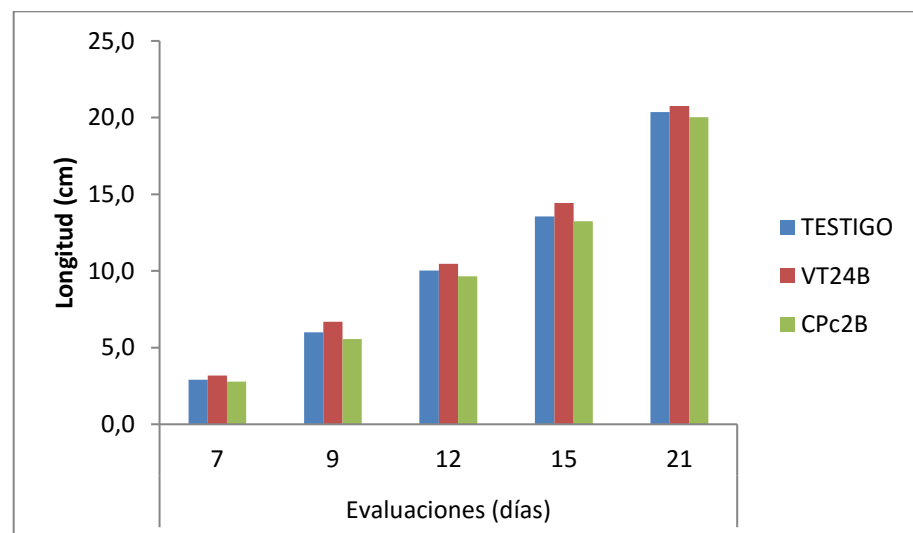
FV	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	157.928	14	11.281	68.849 *
Dentro de grupos	30.147	184	0.164	
Total	188.076	198		

**Tabla 17 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del trigo a 15°C**

Tratamientos	Evaluación				
	1	2	3	4	5
<b>CPc2B</b>	1.9325 a	2.4992 b	3.2498 c	3.7636 d	4.5732 e
<b>Testigo</b>	1.9438 a	2.5972 b	3.3020 c	3.8018 d	4.6060 e
<b>VT24B</b>	2.0002 a	2.7218 b	3.3635 c	3.9118 d	4.6524 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La comparación de Duncan (tabla 17) indica que solo hay diferencias significativas entre las fechas de evaluación.



**Fig. 13 Longitud del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C.**

**Tabla 18 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del trigo a 20°C**

FV	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	156.310	14	11.165	46.546*
Dentro de grupos	59.968	250	0.240	
Total	216.278	264		

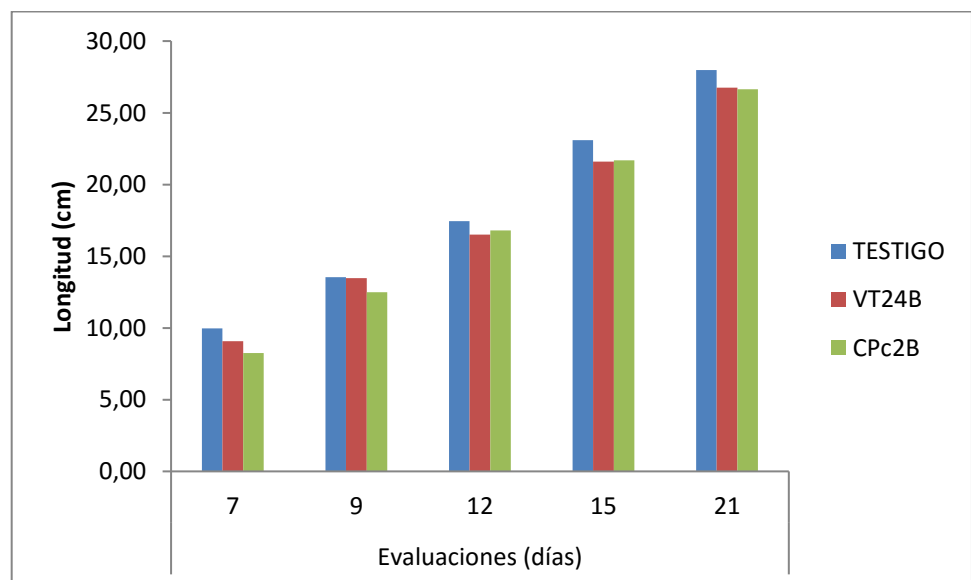
- A 20 °C el análisis de varianza ANOVA (tabla18) mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

La comparación de Duncan (tabla 19) indica que hay diferencias significativas entre las fechas de evaluación (fig.14).

**Tabla 19 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del trigo a 20°C**

tratamientos	Evaluación				
	1	2	3	4	5
CPc2B	2.9634 a	3.6287 b	4.1949 c	4.7480 d	5.2429 e
VT24B	3.1270 a	3.7811 b	4.1725 c	4.7457 d	5.2562 e
Testigo	3.2652 a	3.7531 b	4.2662 c	4.8945 d	5.3582 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 14 Evaluación del crecimiento del trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C.**

Las semillas puestas a crecer a temperatura de 20°C mostraron un mejor crecimiento que las que crecieron a 15°C. En tanto no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, es decir

entre las semillas con los inóculos bacterianos (cepas VT24B y CPc2B) y las semillas sin bacteria (tratamiento testigo).

### 3. Crecimiento del cultivo de maíz

- A temperatura de 15°C, según el ANOVA (tabla 20) existen diferencias significativas.

**Tabla 20 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del maíz a 15°C**

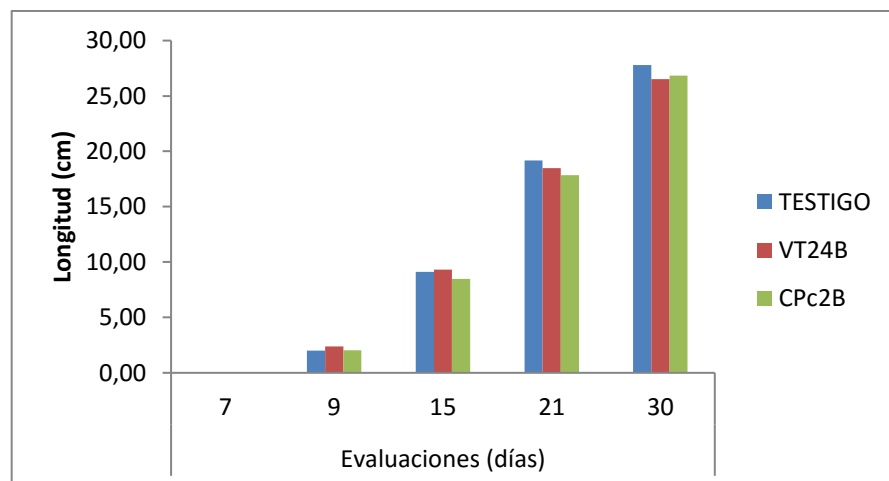
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	714.667	14	51.048	443.296*
Dentro de grupos	30.055	261	0.115	
Total	744.722	275		

La comparación de Duncan (tabla 21) indica diferencias significativas entre las fechas de evaluación (fig.15).

**Tabla 21 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del maíz a 15°C**

Tratamiento	Evaluación				
	1	2	3	4	5
Testigo	1.0000 a	1.7250 b	3.1644 c	4.4804 d	5.3527 e
VT24B	1.0000 a	1.8281 b	3.1883 c	4.3935 d	5.2189 e
CPc2B	1.0000 a	1.7239 b	3.0472 c	4.3215 d	5.2604 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 15 Evaluación del crecimiento del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 °C.**

- A condiciones de 20°C (fig. 16), el análisis de varianza ANOVA (tabla 22) mostró diferencias significativas.

**Tabla 22 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación del crecimiento del maíz a 20°C**

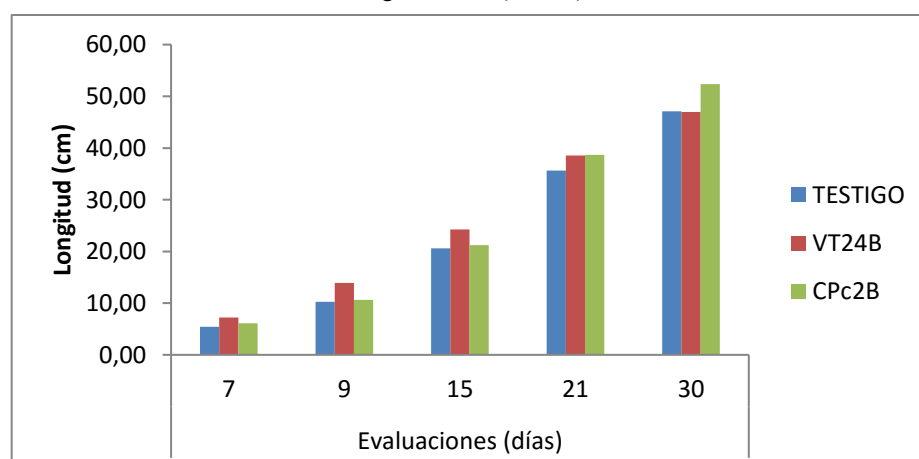
FV	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Entre grupos	736.210	14	52.586	144.436*
Dentro de grupos	97.574	268	0.364	
Total	833.784	282		

La comparación de Duncan (tabla 23) tuvo como resultado que en la segunda evaluación (9 días después de la siembra) existen diferencias significativas entre VT24B (13.94cm) contra CPc2B (10.65cm) y el Testigo (10.28cm).

**Tabla 23 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado al crecimiento del maíz a 20°C**

Tratamiento	Evaluación				
	1	2	3	4	5
Testigo	2.4628 a	3.2919 b	4.5916 d	6.0253 e	6.9254 f
CPc2B	2.6095 a	3.3464 b	4.6521 d	6.2695 e	7.2918 f
VT24B	2.8205 a	3.9189 c	4.9907 d	6.2713 e	6.9048 f

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 16 Evaluación del crecimiento del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 20 °C.**

Al igual que en los cultivos anteriores, el crecimiento del maíz fue mejor a 20°C que ha temperaturas de 15°C.



#### 4.5.2. Efecto de la inoculación de endófitos en la longitud de la Raíz

##### 1. Longitud de la raíz de Alfalfa a 15 y 20°C

El análisis de varianza ANOVA (tabla 24) muestra diferencias significativas a temperatura de 15°C, mientras que a condiciones de 20°C este análisis indica diferencias no significativas.

**Tabla 24** Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa a 15 y 20°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
15°C	Entre grupos	23.770	2	11.885	3.493*
	Dentro de grupos	81.656	24	3.402	
	Total	105.427	26		
20°C	Entre grupos	12.335	2	6.167	2.044*
	Dentro de grupos	120.689	40	3.017	
	Total	133.023	42		

La comparación de medias de Duncan (tabla 25) revela que hay significancia entre la cepa VT24B y CPc2B a condiciones de 15°C (fig.17).

**Tabla 25** Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa a 15°C

TRATAMIENTO	Promedio
CPc2B	7.15 b
Testigo	7.53 b
VT24B	9.29 a

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

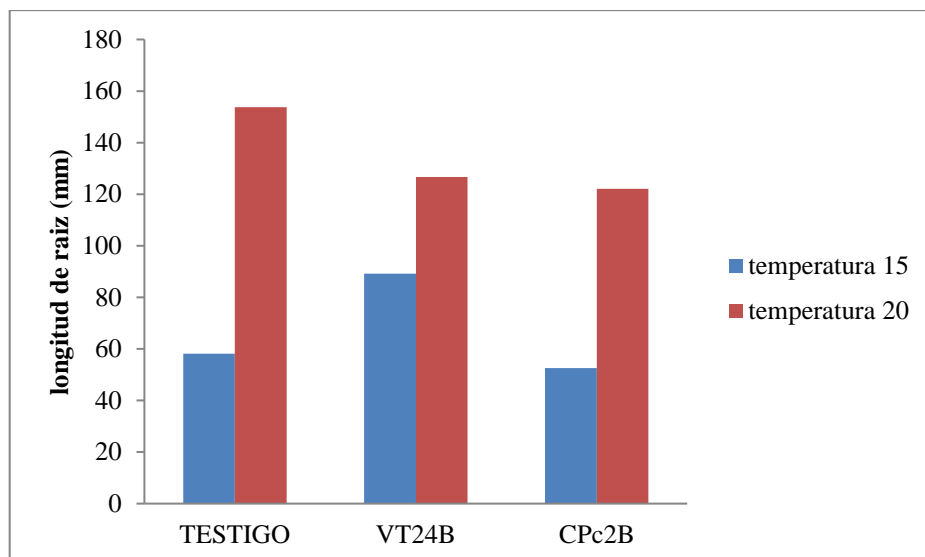


Fig. 17 Evaluación de la longitud de la raíz de la alfalfa inoculada con cepas bacterianas a 15 y 20 ° C.

El crecimiento de las raíces fue mejor a temperaturas de 20°C en comparación de las raíces crecidas en un ambiente de 15°C

## 2. Longitud de la raíz de Trigo a 15 y 20°C

A condiciones de 15°C el análisis de ANOVA (tabla 26) no encontró diferencias significativas entre CPc2B (15.92cm), VT24B (14.62cm) y el Testigo (17.53cm); mientras que a 20°C el análisis hecho con ANOVA (tabla 26) mostro diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 26 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo 15 y 20°C

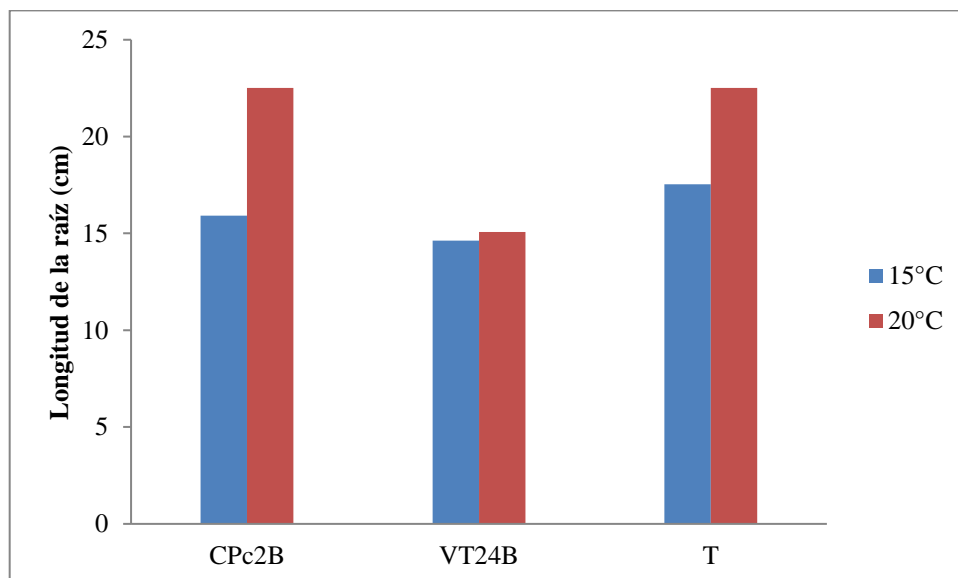
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
15°C	Entre grupos	0.877	2	0.44	0.86*
	Dentro de grupos	27.104	53	0.51	
	Total	27.981	55		
20°C	Entre grupos	8.874	2	4.44	9.06*
	Dentro de grupos	24.975	51	0.49	
	Total	33.849	53		

Es así que, la comparación de medias de Duncan (tabla 27) indicó que entre la cepa CPc2B (22.52cm) y VT24B (15.08cm) existen diferencias significativas, también existen diferencias entre el testigo (22.51cm) y VT24B (15.08cm), mientras que entre CPc2B y el testigo no hubo diferencia significativa.

**Tabla 27 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo a 20°C**

tratamiento	Promedio
VT24B	3.98
Testigo	4.79
CPc2B	4.88

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 18 Evaluación de la longitud de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.**

La longitud de las raíces del trigo inoculado con CPc2B, tuvo mejor crecimiento a 20°C, al igual que las semillas testigo; mientras tanto las raíces de las semillas inoculadas con la cepa bacteriana VT24B, no mostró diferencias en su tamaño en ambos ambientes.

### **3. Longitud de la raíz de Maíz a 15 y 20°C**

El maíz puesto a crecer a 15°C analizado con ANOVA (tabla 28) muestra que no existen diferencias significativas en la longitud de las raíces de maíz de los tratamientos VT24B (17.39cm), CPc2B (16.98cm) y el testigo (16.76cm).

**Tabla 28 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 15 y 20°C**

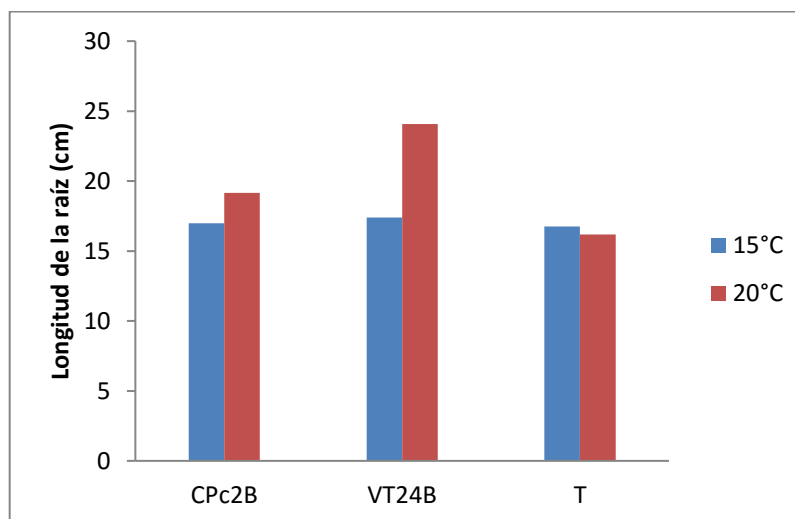
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
15°C	Entre grupos	4.889	2	2.445	0.186
	Dentro de grupos	750.668	57	13.170	
	Total	755.557	59		
20°C	Entre grupos	10.779	2	5.390	13.571
	Dentro de grupos	22.637	57	0.397	
	Total	33.416	59		

El análisis ANOVA (tabla 28) realizado para la temperatura de 20°C nos muestra diferencias significativas. La comparación de Duncan (tabla 29) nos dice que hay diferencias significativas entre VT24B (24.07cm) y CPc2B (19.16cm), también VT24B (24.07cm) difiere significativamente del testigo (16.18cm), así mismo, CPc2B se diferencia significativamente del testigo.

**Tabla 29 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 20°C**

Tratamiento	Promedio
Testigo	3.9408
CPc2B	4.38
VT24B	4.97

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 19 Evaluación de la longitud de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.**

### 4.5.3. Biomasa fresca y seca de los cultivo

#### 1. Alfalfa

- Biomasa fresca.- A 15°C el análisis ANOVA (tabla 30) no muestra diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que a los 20°C el análisis ANOVA (tabla 30) registró diferencias significativas.

**Tabla 30** Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa de la alfalfa a 15 y 20°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
FRESCO- 15°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.13
	Dentro de grupos	0.035	24	0.001	
	Total	0.036	26		
Humedo- 20°C	Entre grupos	0.250	2	0.125	225.06*
	Dentro de grupos	0.022	40	0.001	
	Total	0.272	42		

La comparación de Duncan (tabla 31) indicó diferencias significativas entre la cepa CPc2B contra VT24B y el testigo.

**Tabla 31** Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la alfalfa a 20°C

TRATAMIENTO	Promedio
Testigo	1.0098
VT24B	1.0140
CPc2B	1.67
Sig.	0.647

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

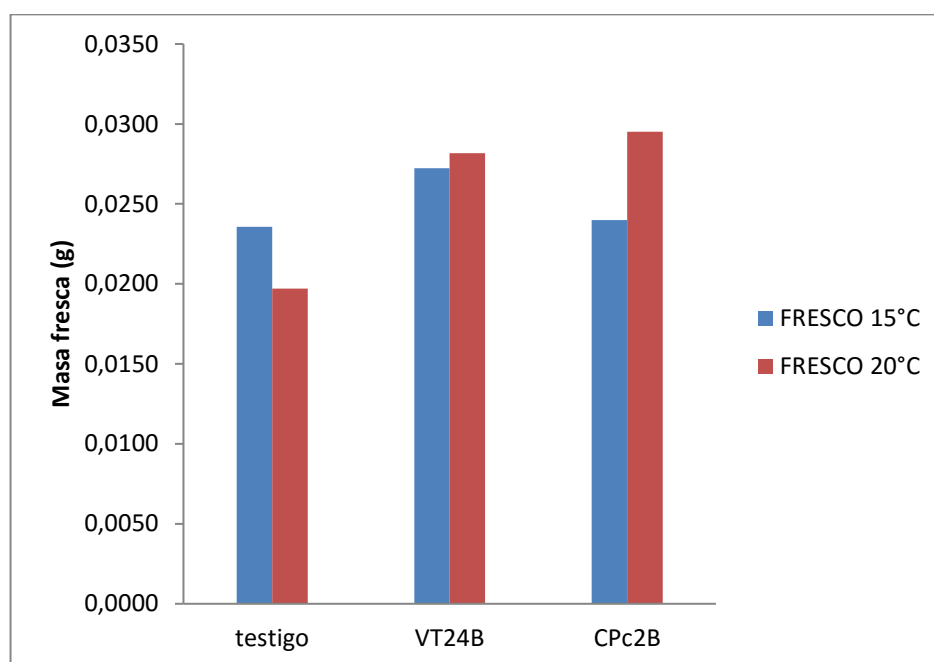


Fig. 20 Evaluación de la biomasa fresca de las plantitas de alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

- Biomasa seca.- la alfalfa a temperatura de 15 °C, según el análisis de varianza ANOVA (tabla 32) no muestra diferencias significativas.

Tabla 32 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa de la alfalfa a 15 y 20°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
SECO-15°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	2.319
	Dentro de grupos	0.000	24	0.000	
	Total	0.000	26		
Seco-20°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	3.308*
	Dentro de grupos	0.000	40	0.000	
	Total	0.000	42		

Aun así, la comparación de Duncan (tabla 33) encontró diferencias entre CPc2B y el testigo.

**Tabla 33 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la alfalfa a 15°C**

TRATAMIENTO	Promedio
Testigo	1.00
VT24B	1.00
CPc2B	1.00

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

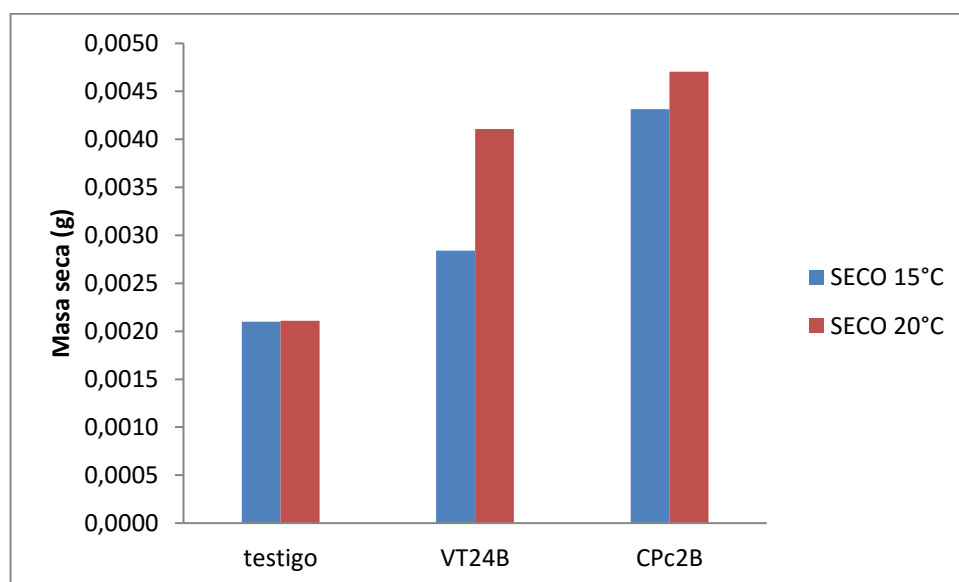
A condición de 20°C ANOVA (tabla 32) encontró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos,

**Tabla 32 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la alfalfa a 20°C**

TRATAMIENTO	Promedio
Testigo	1.00
VT24B	1.00
CPc2B	1.00

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La comparación de Duncan (tabla 34) considera que la cepa CPc2B difiere del testigo, igualmente VT24B muestra diferencias significativas ante el testigo.



**Fig. 21 Evaluación de la biomasa seca de las plantitas de alfalfa, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.**

## 2. Trigo

- Biomasa fresca de la raíz.- El análisis de varianza ANOVA (tabla 35) muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C en la evaluación de masa fresca de la raíz de trigo.

**Tabla 33 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 15 y 20°C**

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Raíz-15°C	Entre grupos	0.002	2	0.001	4.403*
	Dentro de grupos	0.011	53	0.000	
	Total	0.013	55		
Raíz-20°C	Entre grupos	0.012	2	0.006	17.573*
	Dentro de grupos	0.017	53	0.000	
	Total	0.029	55		

La comparación de Duncan (tabla 36) indica diferencias significativas a 15°C entre VT24B (0.094gr), y CPc2B (0.068gr), lo mismo que entre VT24B (0.094gr), y el testigo (0.069gr).

**Tabla 34 Comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 15°C**

tratamiento	Promedio
CPc2B	1.03
Testigo	1.03
VT24B	1.05

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La comparación de Duncan (tabla 37) indica diferencias significativas a 20°C entre VT24B (0.111gr) y el testigo (0.048gr), lo mismo que entre CPc2B (0.113gr), testigo (0.048gr), no hubo diferencias significativas entre VT24B Y CPc2B.

**Tabla 35 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del trigo a 20°C**

tratamiento	Promedio
Testigo	1.03
VT24B	1.05
CPc2B	1.06

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



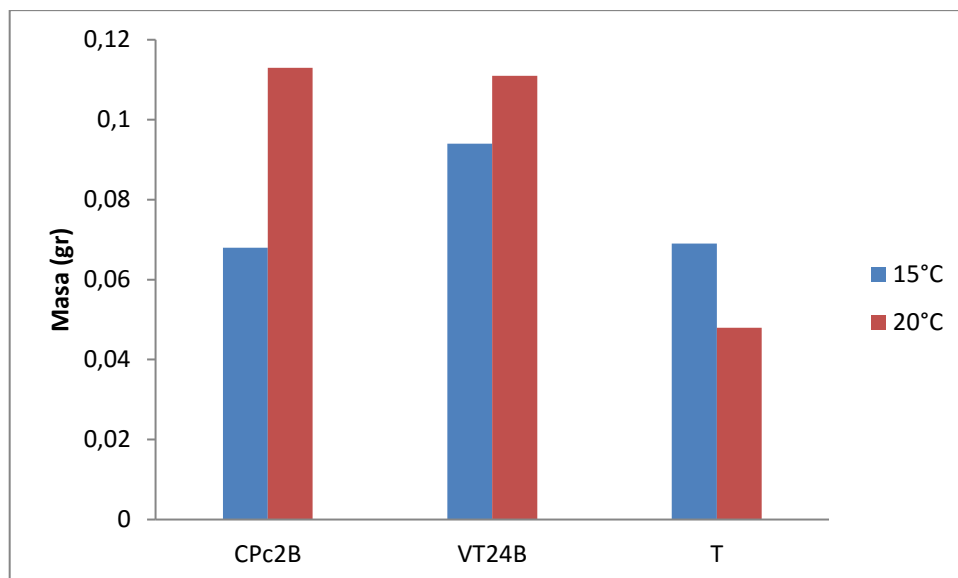


Fig. 22 Evaluación de la biomasa fresca de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

- Biomasa fresca del tallo.- El análisis de varianza ANOVA mostró diferencias no significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C en la evaluación de masa fresca del tallo de trigo.

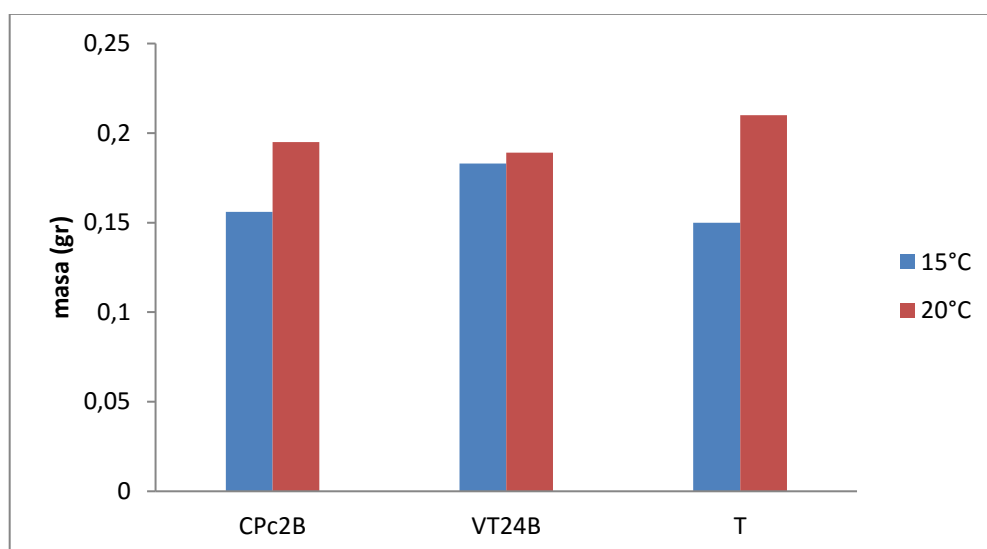


Fig. 23 Evaluación de la biomasa fresca del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

- Biomasa seca de la raíz.- El análisis de varianza ANOVA (tabla 38) muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C en la evaluación de masa seca de la raíz de trigo.

**Tabla 36 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 15 y 20°C**

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Raíz- 15°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	10.42*
	Dentro de grupos	0.000	53	0.000	
	Total	0.000	55		
Raíz- 20°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	3.38*
	Dentro de grupos	0.001	53	0.000	
	Total	0.001	55		

La comparación de Duncan (tabla 39) indica diferencias significativas a 15°C entre VT24B (0.0145gr), y CPc2B (0.0074gr), lo mismo que entre VT24B (0.0145gr), y el testigo (0.0108gr).

**Tabla 37 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 15°C**

tratamiento	Promedio
CPc2B	1.003
Testigo	1.005
VT24B	1.007

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La comparación de Duncan (tabla 40) muestra diferencias significativas a 20°C entre VT24B (0.0277gr), y CPc2B (0.0218gr), no hubo diferencias significativas entre VT24B y testigo.

**Tabla 38 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del trigo a 20°C**

tratamiento	Promedio
CPc2B	1.01
Testigo	1.01
VT24B	1.02

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

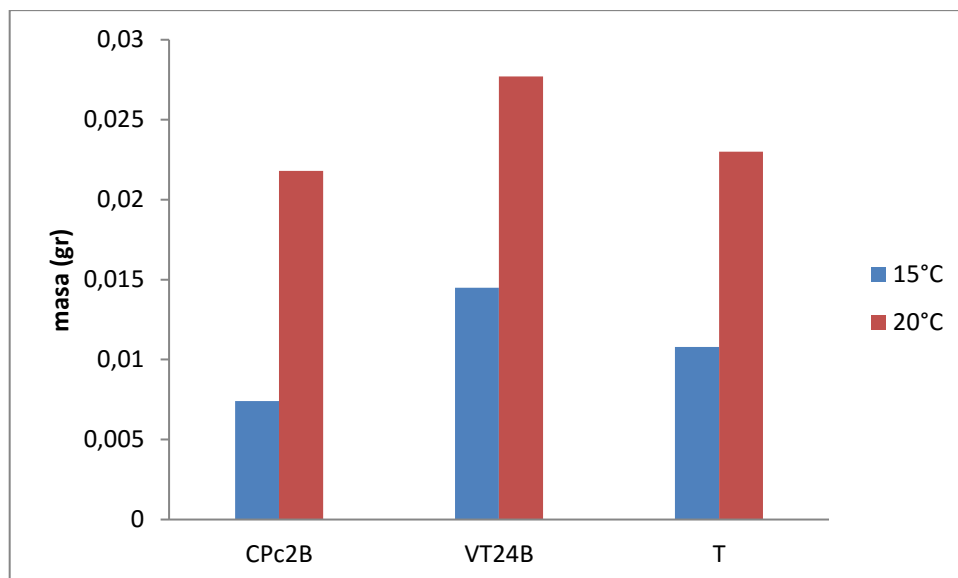


Fig. 24 Evaluación de la biomasa seca de la raíz de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

- Biomasa seca del tallo.- El análisis de varianza ANOVA (tabla 41) muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 °C, mientras que no se obtuvo diferencias significativas a 20°C en la evaluación de masa seca del tallo de trigo.

Tabla 39 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca del tallo del trigo a 15°C

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Tallo-15°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	5.366*
	Dentro de grupos	0.001	53	0.000	
	Total	0.001	55		
Tallo-20°C	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.283*
	Dentro de grupos	0.001	53	0.000	
	Total	0.001	55		

La comparación de Duncan (tabla 42) indica diferencias significativas a 15°C entre VT24B (.0287gr), CpC2B (.0213gr), lo mismo que entre VT24B (.0287gr), testigo (.0228gr).

Tabla 40 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca del tallo del trigo a 15°C

tratamiento	Promedio
CpC2B	1.01
Testigo	1.01
VT24B	1.02

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

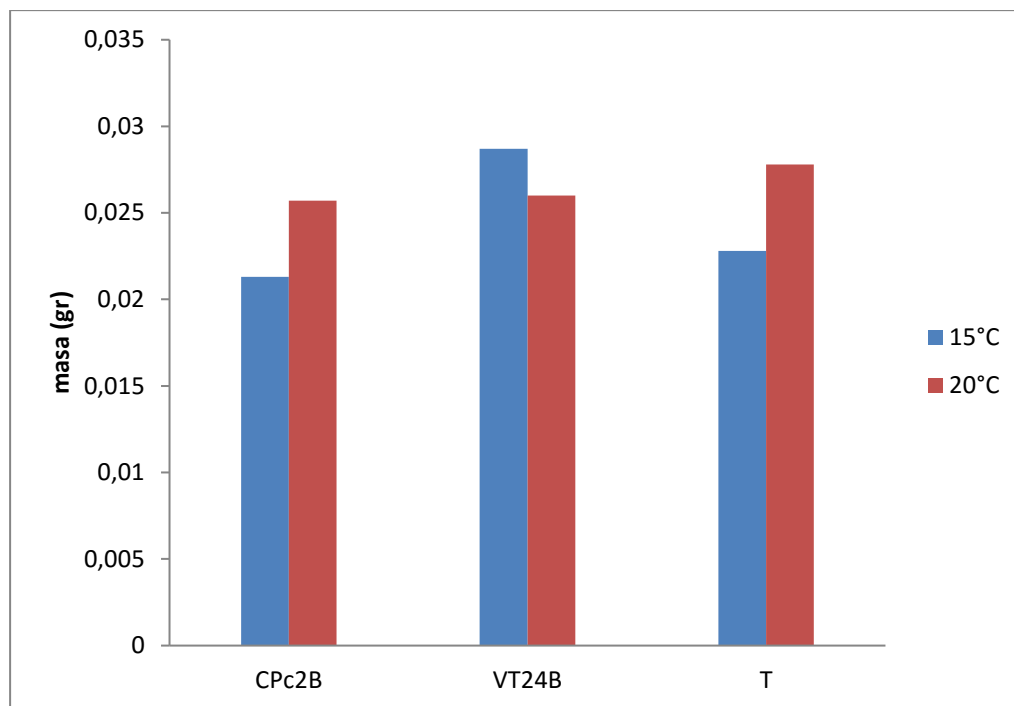


Fig. 25 Evaluación de la biomasa seca del tallo de trigo, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

### 3. Maíz

- Biomasa fresca de la raíz.- El análisis de varianza ANOVA (tabla 43) muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C en la evaluación de masa fresca de la raíz de maíz.

Tabla 41 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 15°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Raíz-15°C	Entre grupos	0.209	2	0.105	3.635*
	Dentro de grupos	1.641	57	0.029	
	Total	1.850	59		
Raíz-20°C	Entre grupos	4.935	2	2.468	4.086*
	Dentro de grupos	34.422	57	0.604	
	Total	39.357	59		

La comparación de Duncan (tabla 44) indica diferencias significativas a 15°C entre CpC2B (.4.56gr) y VT24B (3.91gr), no existe diferencias entre CpC2B, y testigo (4.18gr), lo mismo que, entre VT24B y testigo.

**Tabla 42 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 15°C**

TRATAMIENTOS	Promedio
VT24B	2.20835
Testigo	2.26999
CPc2B	2.35251

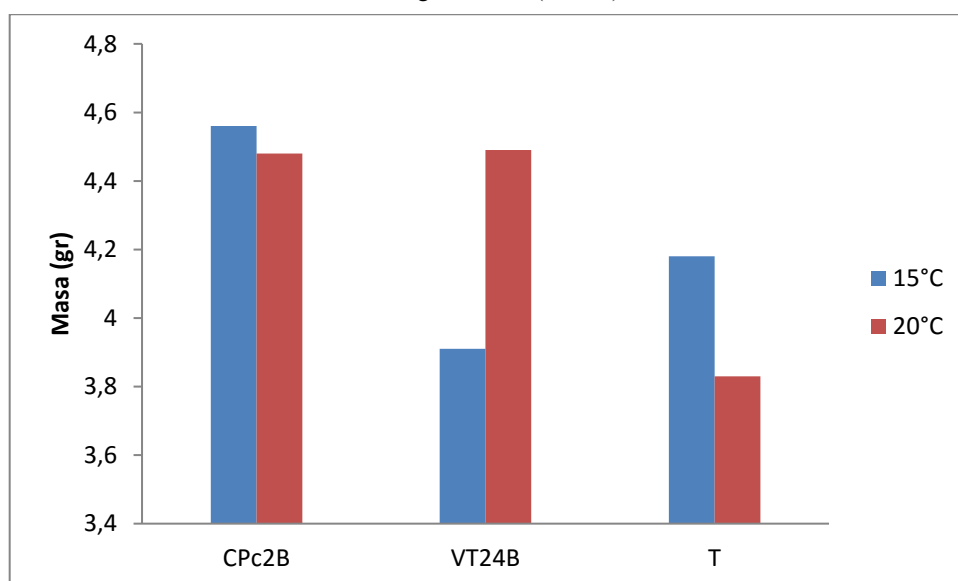
Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

La comparación de Duncan (tabla 45) indica diferencias significativas a 20°C entre VT24B (4.49gr) y el testigo (3.84gr), lo mismo que entre CPc2B (4.48gr) y el testigo (3.84gr), no hubo diferencias significativas entre VT24B y CPc2B.

**Tabla 43 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa fresca de la raíz del maíz a 20°C**

Tratamiento	Promedio
Testigo	3.8740
CPc2B	4.4750
VT24B	4.4895

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 26 Evaluación de la biomasa fresca de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.**

- Biomasa fresca del área vegetativa.- El análisis de varianza ANOVA no muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C en la evaluación de la masa fresca del maíz.

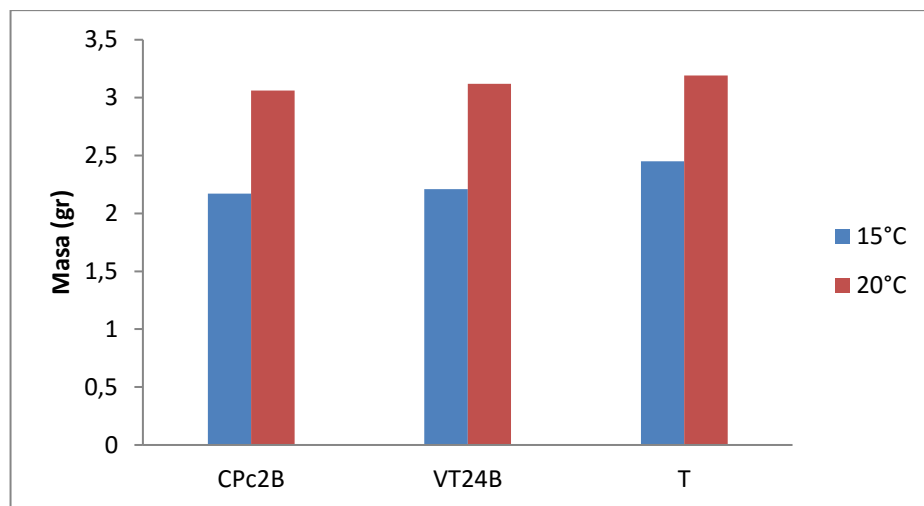


Fig. 27 Evaluación de la biomasa fresca del área vegetativa del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

- Biomasa seca de la raíz.- El análisis de varianza ANOVA (tabla 46) muestra diferencias no significativas en condiciones de 15°C, mientras que a 20°C hay diferencias significativas en la evaluación de masa seca de la raíz del maíz.

Tabla 44 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 15 y 20°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Raíz-15°C	Entre grupos	0.014	2	0.007	2.887
	Dentro de grupos	0.137	57	0.002	
	Total	0.151	59		
Raíz-20°C	Entre grupos	0.299	2	0.150	7.122*
	Dentro de grupos	1.198	57	0.021	
	Total	1.498	59		

La prueba de comparación de medias de Duncan (tabla 47) indica diferencias significativas a 15°C entre CPc2B (.3503gr) y el testigo (.2797gr).

Tabla 45 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 15°C

TRATAMIENTOS	Promedio
Testigo	1.12414
VT24B	1.13799
CPc2B	1.16101

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

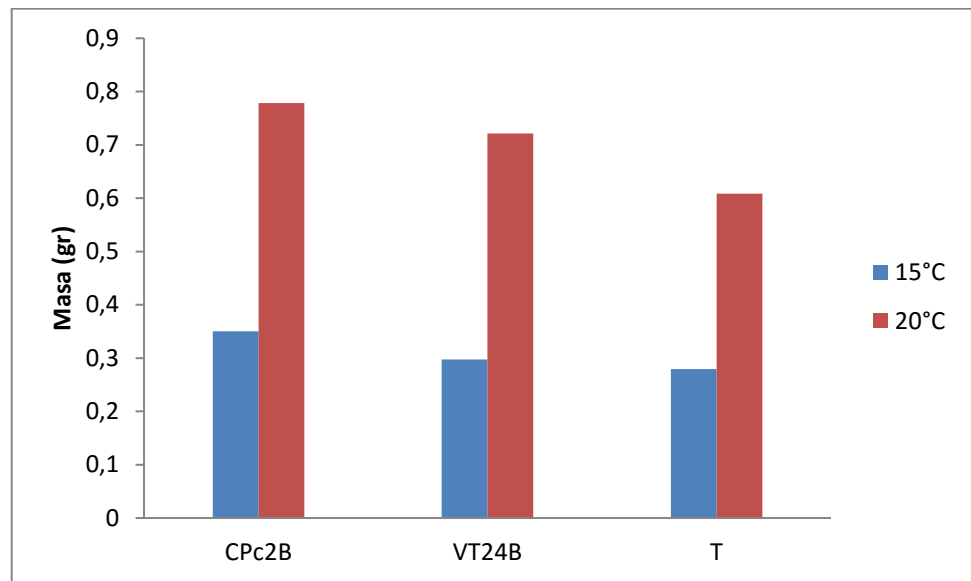
La comparación de medias de Duncan (tabla 48) indica diferencias significativas a 20°C, entre VT24B (.7215gr) y el testigo (.6085gr), lo

mismo que entre CPc2B (.7785gr) y el testigo (.6085gr), no hubo diferencias significativas entre VT24B Y CPc2B

**Tabla 46 Prueba de comparación de medias de DUNCAN, aplicado a la evaluación de la biomasa seca de la raíz del maíz a 20°C**

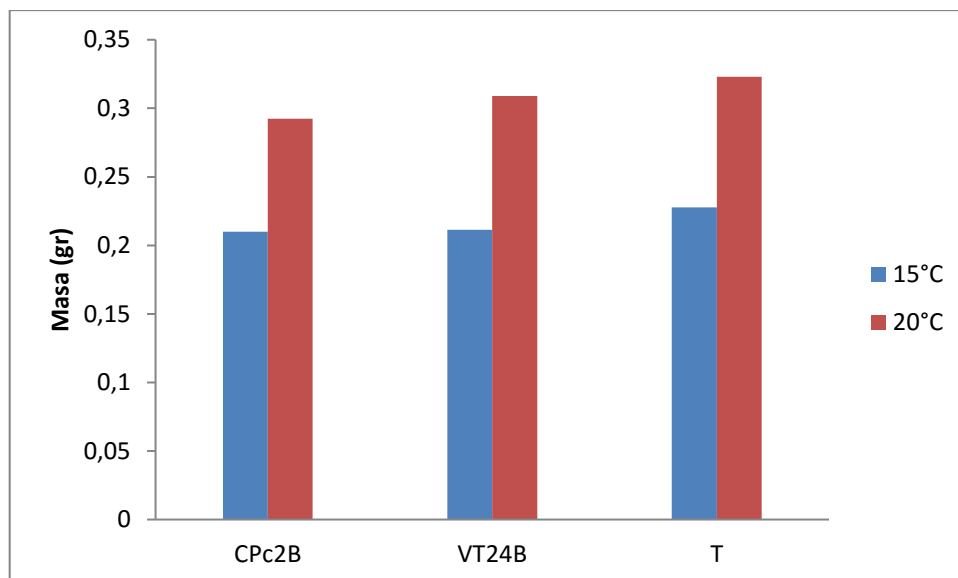
Tratamiento	Promedio
Testigo	0.6085
VT24B	0.7215
CPc2B	0.7785

Columnas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )



**Fig. 28 Evaluación de la biomasa seca de la raíz de maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.**

- Biomasa seca del área vegetativa.- El análisis de varianza ANOVA no muestra diferencias significativas en condiciones de temperatura de 15 y 20°C, en la evaluación de la biomasa seca del maíz.



**Fig. 29** Evaluación de la biomasa seca del área vegetativa del maíz, inoculado con dos cepas bacterianas a 15 y 20 °C.

Es conocido que organismos benéficos, introducidos a la rizosfera, son afectados por distintos factores tanto bióticos como abióticos. Dentro de los factores abióticos se encuentran la temperatura del suelo, el pH de este mismo, la disponibilidad de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, el contenido de agua, el tipo de suelo; y entre los bióticos se incluye predación por nematos y protozoos, actividad de bacteriófagos, competencia microbiana por recursos e interacciones directas como inhibición de la actividad por producción de antibióticos y sinergismo o incremento de nutrientes disponibles (Strigul y Kravchenko, 2005).



## V.CONCLUSIONES

- De un total de 27 cepas bacterianas endófitas que fueron sometidas a la prueba de colorimetría, se seleccionaron 4 cepas las cuales fueron capaces de producir AIA, estas son: VT19B, VT24B, GT25B y CPc2B.
- Las bacterias estudiadas tienen un mejor comportamiento a temperaturas superiores de 15°C, por lo que se concluye que a temperaturas de estrés, su uso no propicia la promoción del crecimiento vegetal.
- En la prueba in vitro de inoculación de semillas de “trigo”, las cepas bacterianas no mostraron actividad de promoción de crecimiento visible, mientras que en las semillas de “maíz” con inóculos (cepa VT24B y CPc2B) se observó el aceleramiento de la germinación y crecimiento de la radícula comparado con el testigo, esto se produjo a temperaturas de 15 y 20°C., en el cultivo de “alfalfa” se pudo visualizar que las semillas inoculadas con la cepa CPc2B obtuvieron un mejor porcentaje de germinación en comparación a los otros dos tratamientos. Las cepas bacterianas VT24B y la CPc2B no son adecuadas como promotores de crecimiento vegetal inoculadas en semillas de corehuajay ya que, los resultados mostraron porcentaje de germinación más bajos que el tratamiento testigo.
- En cuanto a las pruebas realizadas ex vitro: El crecimiento de las plantas de alfalfa se vio mejorada al ser inoculadas con las cepas bacterianas endófitas, en un ambiente con temperatura de 20 °C, el desarrollo radicular también se vio favorecido, ya que se obtuvo mayor biomasa. La inoculación de las cepas endófitas en plantas de trigo favoreció el desarrollo radicular al aumentar el nivel de biomasa en estas a temperaturas de 15 y 20 °C. Las plantas de maíz inoculadas con la cepa CPc2B ganaron mayor desarrollo radicular pues tuvieron mayor longitud y biomasa fresca en comparación al testigo, en temperatura de 20°C, así mismo las plantas con el inóculo VT24B también fueron favorecidas ya que tuvieron un mejor crecimiento vegetativo y radicular, adicionado al aumento en la biomasa de las raíces.

## **VI.RECOMENDACIONES**

- Recomendamos realizar pruebas de inoculación en diferentes sustratos, debido a que en el estudio hecho se usó como único sustrato a la arena, la cual pudo haber limitado el desarrollo de las plantas y por ende el comportamiento de las bacterias.
- Es necesario realizar pruebas a nivel de campo, ya que, es esencial conocer la capacidad de adaptación de estas bacterias endófitas a ambientes reales.
- Realizar estudios más profundos con las cepas solubilizadoras de fosfato SRB33 y la SRP58, ya que su aplicación a nivel agronómico podría ser de gran utilidad.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan, *29*, 29–34.
- Alen'kina, S. A., & Nikitina, V. E. (2015). Effect of azospirillum lectins on the activity of proteolytic enzymes and their inhibitors in wheat seedling roots. *Microbiology*, *84*(5), 630–635. <https://doi.org/10.1134/S0026261715050021>
- ALVARADO, R. D. P. U. (2016). “ *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS, ASOCIADOS A Valeriana sp. Y Gentianella weberbaueri Gil Y SU USO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.*”
- Beltrán P., M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth, *15*, 101–113.
- Calvo, P. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de Bacillus spp . AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA ( Solanum tuberosum ) PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF Bacillus spp . STRAINS FROM POTATO ( Solanum tuberosum ) RHIZOSPHERE, *9*(1).
- Chaves Méndez, N. (2007). *UTILIZACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS ENDOFÍTICOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO BARRENADOR Radopholus similis (Cobb) Thorn.*
- Dibut, B.; Martínez, R.; Ortega, Marisel; Ríos, Yoania; Fey, L. (2004). PRESENCIA Y USO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS EN PLANTAS COMO PERSPECTIVA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN VEGETAL Cultivos Tropicales, vol. 25, núm. 2, 2004, pp. 13-17 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba Disponible.
- Drechsel, H., & Jung, G. (1998). Peptide Siderophores, *181*, 147–181.
- HOBBIE, L. J. (1997). Encyclopedia of Hormones. Copyright 2003, Elsevier Science (USA). All rights reserved., (1993), 186–197.
- Igual, J., Valverde, A., Cervantes, E., & Vel, E. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture : use of updated molecular techniques in their study Review

- article Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture : use of updated molecular techniques in their study.
- Kende, H., & Zeevaart, J. A. D. (1997). The Five “Classical” Plant Hormone, 9(July).
- Kodani, S., Bicz, J., Song, L., Deeth, R. J., Ohnishi-kameyama, M., Yoshida, M., ... Challis, G. L. (2013). Biomolecular Chemistry, 4686–4694. <https://doi.org/10.1039/c3ob40536b>
- Kundu, G. S. S., Joshi, P., Nazim, S., & Gupta, A. D. G. H. S. (2010). Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P ( MTCC 8707 ) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas, (March), 50–56. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0024-y>
- Mantilla Cardenas, M. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (, 1–127.
- Mohanty, S. R., Dubey, G., & Kollah, B. (2016). Endophytes of *Jatropha curcas* promote growth of maize. *Rhizosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.11.001>
- PEREZ, C. ALEXANDER Dr, ROJAS, S. JOHANNA M.Sc. VALE, M. H. D. (2009). Rev. Colombiana cienc. Anim. 1(2).2009 REVISIÓN BIOLOGIA Y PERSPECTIVA DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A PLANTAS, 1(2), 286–301.
- Sánchez-fernández, R. E., Sánchez-ortiz, B. L., Sandoval-espinosa, Y. K. M., Ulloa-benítez, Á., Armendáriz-guillén, B., Claudia, M., & Martha, G. (2013). ongos endófitos : fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina, 16(2), 132–146.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., & Vanderleyden, J. (2005). *Azospirillum brasilense* Produces the Auxin-Like Phenylacetic Acid by Using the Key Enzyme for Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis, 71(4), 1803–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1803>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, (August), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3rd ed).
- Velázquez Barrón, M. D. L. Á. (2009). Germinación de la semilla de cuatro variedades de trigo (*Triticum spp . L .*). in vitro.
- Rojas, G. M., & Ramírez, H. (1991). *Control hormonal del desarrollo de las plantas: Fisiología, tecnología, experimentación*. México: Limusa. Noriega

## VIII.ANEXO

ANEXO 1. Fotografías de la germinación del maíz

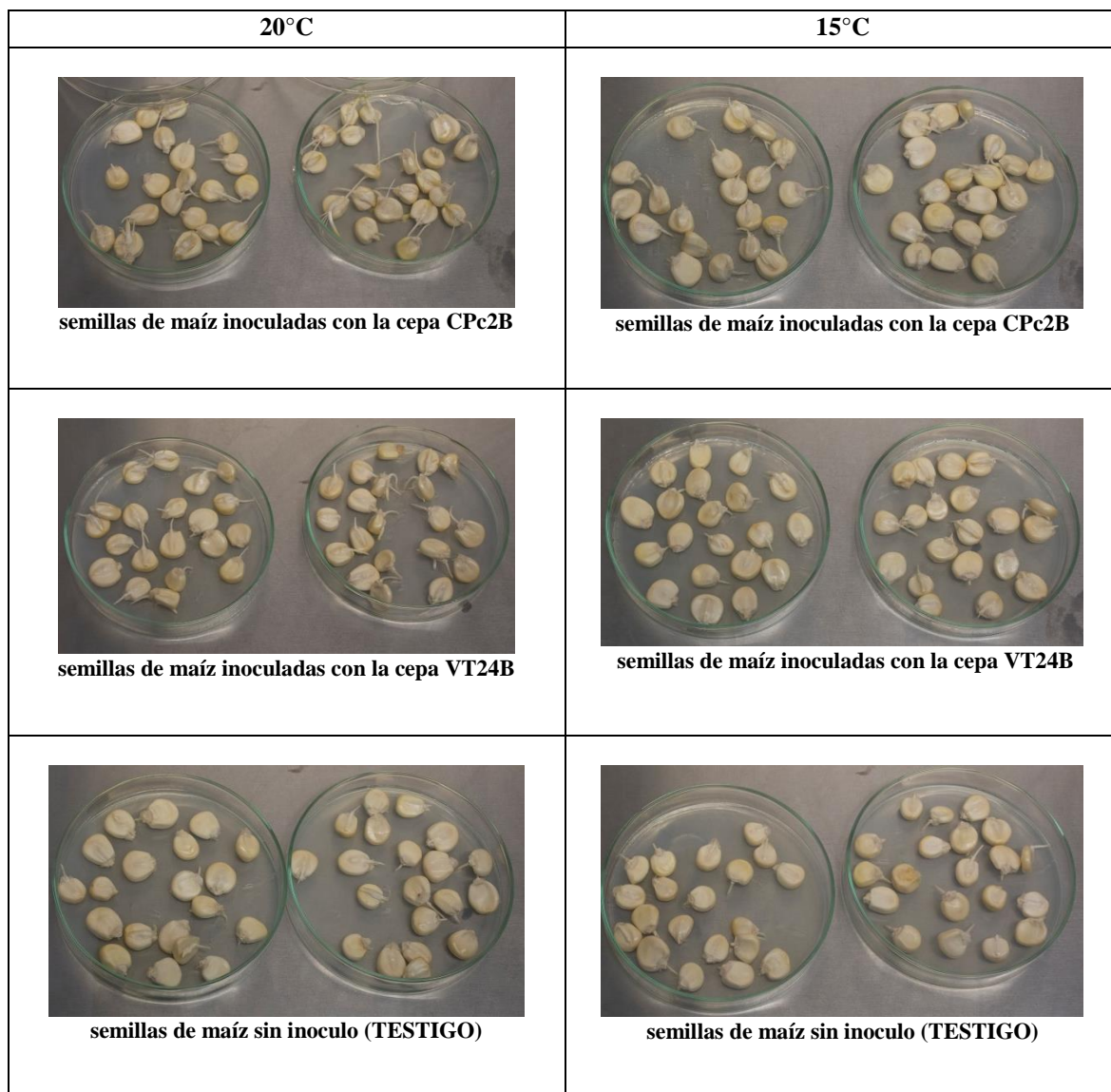


Fig. 30 Germinación de semillas de maíz in vitro.

ANEXO 2. Fotografías de las plantas de los tres cultivos (Maíz, trigo y alfalfa) usados como hospederos de las cepas bacterianas CPc2B y VT24B



Fig. 31 Plantas de maíz a temperaturas de 20 y 15°C




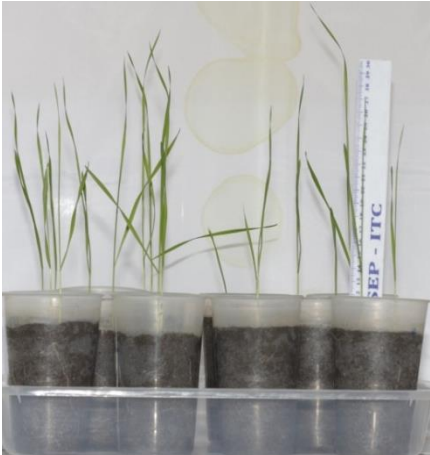

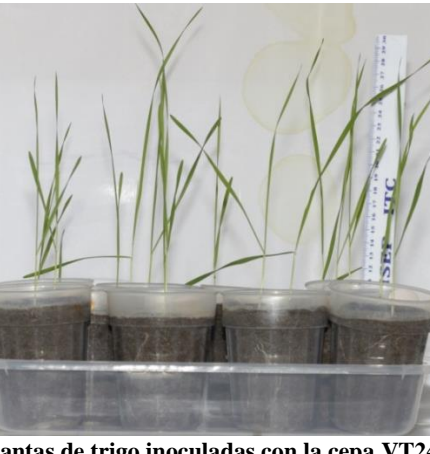

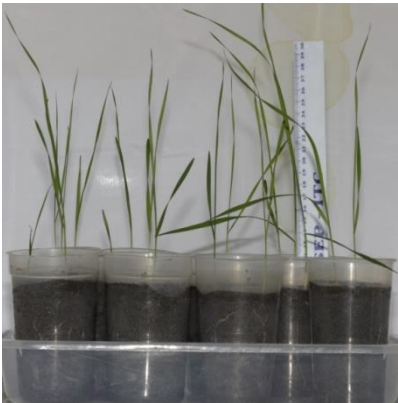
20°C	15°C
 <p data-bbox="300 734 778 768">Plantas de trigo inoculadas con la cepa CPc2B</p>	 <p data-bbox="887 716 1366 750">Plantas de trigo inoculadas con la cepa CPc2B</p>
 <p data-bbox="300 1328 778 1361">Plantas de trigo inoculadas con la cepa VT24B</p>	 <p data-bbox="887 1288 1366 1321">Plantas de trigo inoculadas con la cepa VT24B</p>
 <p data-bbox="352 1892 724 1926">Plantas de trigo sin inóculo (testigo)</p>	 <p data-bbox="938 1874 1315 1908">Plantas de trigo sin inóculo (testigo)</p>

Fig. 32 Plantas de trigo a 20 y 15°C



Fig. 33 Plantitas de alfalfa

**ANEXO 3.** Análisis estadísticos aplicados a las diferentes pruebas de promoción de crecimiento vegetal.

Tabla 47 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del maíz a 15°C

<b>ANOVA largo raíz de maíz 15°C</b>					
datos reales					
<b>FV</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	4.889	2	2.445	0.186	0.831
Dentro de grupos	750.668	57	13.170		
<b>Total</b>	<b>755.557</b>	<b>59</b>			

Tabla 48 Análisis de varianza ANOVA, aplicado a la evaluación de la longitud de la raíz del trigo a 15°C

<b>ANOVA-Largo raíz trigo 15°C</b>					
datos correguidos					
<b>FV</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	0.877	2	0.438	0.857	0.430
Dentro de grupos	27.104	53	0.511		
<b>Total</b>	<b>27.981</b>	<b>55</b>			