



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON MENCIÓN EN:**

**BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS  
ASOCIADOS A LA RIZOSFERA Y FILOSFERA DE LOS  
GUAYACANES (*Tabebuia chrysantha* Y *Tabebuia billbergii*) Y  
EVALUACIÓN DE CEPAS AISLADAS EN EL PROCESO  
INICIAL DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS**

**AUTOR**

**Ing. LUIS XAVIER LLACSA SÁNCHEZ**

**TUMBES – PERU**

**2016**

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

Yo Luis Xavier Llacsá Sánchez declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

---

**Ing. Luis Xavier Llacsá Sánchez**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

**ESCUELA DE POSGRADO**

Tumbes - Perú

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los trece días del mes de junio del año dos mil dieciséis, a las 12.00 horas, en el Auditorio FCC Salud, se reunieron los miembros del Jurado designados con **Resolución Directoral N° 037-2016/UNT-EPG**, **Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ** - Presidente, **Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN** Secretario; **Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E** – vocal; y con **Resolución Directoral N° 57-2016/UNT-EPG-D** se fijó la fecha se sustentación y defensa de la tesis: **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZÓSFERA Y FILÓSFERA DE LOS GUAYACANES (TABEBUIA CHRYSANTHA Y TABEBUIA BILLBERGII) Y EVALUACION DE CEPAS AISLADAS EN EL PROCESO INICIAL DE DESARROLLO DE PLANTULAS**; presentada por el egresado del Programa de maestría en Biotecnología Molecular **LLACSA SÁNCHEZ, LUIS XAVIER**, asesorado por el Ph.D **VIRNA CEDEÑO ESCOBAR**


Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado por unanimidad, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12.30 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 13 de junio de 2016

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E**  
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor(1), sustentante (1), UI (2)

## RESPONSABLES

**Ing. Luis Xavier Llacsa Sánchez**

---

Ejecutor

**PhD Virna Cedeño Escobar**

---

Asesora

**JURADO DICTAMINADOR**

**Dr. Víctor Benjamín Carril Fernández**

---

Presidente

**Dr. Auberto Hidalgo Mogollón**

---

Secretario

**Dr. Eric Mialhe Matonnier**

---

Vocal

## CONTENIDO

RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.....	11
2.1 Antecedentes .....	11
2.2 Bases teórico-científicas .....	12
2.3 Definición de términos básicos.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Aislamiento e identificación molecular de bacterias .....	18
3.2 Análisis metagenómico .....	19
3.3 Ensayos de compatibilidad bacteriana .....	19
3.4 Pruebas de crecimiento en medio Rojo Congo y medio NFB .....	20
3.5 Desinfección de semillas.....	20
3.6 Inoculación de plántulas y evaluación de los efectos .....	20
3.7 Análisis de la colonización de raíces en microscopio confocal de barrido laser	21
4. RESULTADOS .....	22
4.1 Caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de la raíz, rizósfera y filósfera de los guayacanes basada en técnicas dependientes de cultivo microbiano .....	22
4.2 Caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de la rizósfera basada en técnicas independientes de cultivo microbiano (metagenómica).....	25
4.3 Ensayos de compatibilidad bacteriana .....	35
4.4 Crecimiento en medio Rojo Congo (RC) y medio para bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB).....	36

4.5	Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas .....	37
4.6	Observación de la colonización de hongos y bacterias en raíces de plántulas de <i>Tabebuia billbergii</i> , mediante microscopía confocal de barrido láser 41	
5.	DISCUSIÓN.....	42
6.	CONCLUSIONES .....	47
7.	RECOMENDACIONES.....	48
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
9.	ANEXOS.....	58
	DEDICATORIA.....	62
	AGRADECIMIENTOS .....	63

## RESUMEN.

El Perú es un país megadiverso con más de 73 millones de hectáreas de bosques, con 3.2 millones de ha de bosques secos en la Costa Norte, de los cuales 0.15 millones se pierden anualmente. A pesar de estar protegidos por la legislación peruana, árboles maderables como los “guayacanes” (*Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*) están particularmente afectados por una extracción descontrolada debida a su alto valor comercial relacionado con su dureza. Por otra parte, los programas de reforestación han sido deficientes, empíricos y, finalmente, ineficaces en la restauración de poblaciones de guayacán. Debido a la importancia de las interacciones planta - microorganismos en términos de salud y desarrollo de los árboles, la biotecnología forestal aplicada a la reforestación se ha enfocado en la caracterización del microbioma nativo de la filósfera y rizósfera de los árboles con algunas especies modelos, *Populus*, *Eucalyptus*, *Acacia*, *Prosopis* entre otros. La caracterización del microbioma nativo y la domesticación subsecuente de cepas microbianas benéficas para los árboles han sido posibles a través del empleo de tecnologías clásicas de microbiología dependientes del cultivo y de nuevas tecnologías de biología molecular independientes del cultivo de los microorganismos. En el presente estudio, cepas de bacterias y hongos han sido aisladas y caracterizadas a nivel molecular a partir de la rizosfera y filosfera de árboles de guayacán silvestres (*Tabebuia chrysantha* y *T. billbergii*) de la Región Tumbes al norte de Perú. Algunas de estas bacterias nativas han sido inoculadas en semillas silvestres y evaluadas funcionalmente como inoculantes microbianos basándose en su actividad promotora del crecimiento en el proceso inicial del desarrollo de plántulas de árboles nativos a nivel de laboratorio.

Palabras clave: *Endofitos, microorganismos promotores del crecimiento vegetal, metagenómica.*

## ABSTRACT

Peru is a diverse country with more than 73 million hectares of forests, including 3.2 million hectares of dry forests on the North Coast, from which 0.15 million hectares are lost annually. Because of the uncontrolled extraction of timber as "guayacanes" (*Tabebuia chrysantha* and *Tabebuia billbergii*), particularly affected by its high commercial value related to its hardness, despite being protected by Peruvian law. Moreover, reforestation programs have been deficient, empirical and ineffective in restoring populations of Guayacan. Forest biotechnology applied to reforestation has been focused on the characterization of native microbiome phyllosphere and rhizosphere of trees with some models species as *Populus*, *Eucalyptus*, *Acacia*, *Prosopis* among others, due to the importance of plant interactions - microorganisms in terms of health and development of trees. The characterization of native microbiome and subsequent domestication of beneficial microbial strains for the trees have been possible through the use of classical culture-dependent technologies and new culture-independent molecular biology technologies of microorganisms. In the present study, strains of bacteria and fungi have been isolated and characterized at the molecular level from the rhizosphere and phyllosphere of guayacan wild trees (*Tabebuia chrysantha* and *T. billbergii*) in Tumbes Region in northern Peru. Some of these native bacteria have been inoculated in wild seeds and functionally tested as microbial inoculants based on its growth promotion activity in the initial development process of native trees seedlings at laboratory level.

**Keywords:** *Endophytes, Plant Growth Promoting Microorganisms, metagenomics.*

## 1. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país megadiverso, con más de 73 millones de hectáreas de bosques, de los cuales alrededor de 3 millones corresponden a bosques secos de la Costa Norte. La deforestación afecta seriamente todos los bosques del País, siendo las pérdidas anuales estimadas en alrededor 150 000 ha. Los bosques secos de la Región Noroeste son altamente afectados por la extracción descontrolada de árboles maderables con subsecuente rarefacción y erosión genética de especies nativas (Che Piu y Menton 2013). Además, la recuperación natural de estas especies maderables se ve afectada por el sobrepastoreo de ganado vacuno y caprino.

Las especies maderables nativas conocidas como “guayacán” (*Tabebuia chrysantha* y *T. billbergii*) son particularmente afectadas, debido a su alto valor comercial relacionado con su dureza, a pesar de estar protegidas por la legislación peruana (More *et al.*, 2014). Los programas de reforestación han sido deficientes, empíricos y consecuentemente ineficaces en términos de restauración de la población de guayacán. En este contexto, ha sido considerado importante desarrollar un paquete de biotecnologías relacionadas a la optimización de la multiplicación de estas especies, preferentemente a partir de semillas silvestres que se colectan de manera fácil y masiva permitiendo mantener la diversidad genética.

En la región de Tumbes se deben desarrollar investigaciones prioritarias en biotecnología forestal para especies en peligro de extinción, como los guayacanes, que corresponderían al aislamiento, caracterización molecular e identificación funcional de microorganismos nativos promotores del crecimiento y desarrollo de plántulas a partir de semillas silvestres.

En el presente estudio bacterias y hongos han sido aislados y caracterizados a nivel molecular a partir de la rizosfera y filosfera de árboles de guayacán silvestres (*Tabebuia chrysantha* y *T. billbergii*) en la Región Tumbes al norte de Perú. Algunos de estos microorganismos nativos han sido inoculados posteriormente en semillas silvestres y evaluados funcionalmente como inoculantes microbianos basándose en su actividad de promoción del crecimiento en el proceso inicial del desarrollo de plántulas de árboles nativos a nivel de laboratorio.

## 2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

### 2.1 Antecedentes

Investigaciones recientes en biotecnología agrícola han estado enfocadas en la caracterización del microbioma de la filosfera y rizosfera, a través del empleo de nuevas tecnologías independientes del cultivo de microorganismos, como la metagenómica y la proteómica, mostrando la diversidad e importancia de las interacciones planta - microorganismos en términos de salud y desarrollo de la planta (Berlec, 2012; Berendsen, Pieterse y Bakker 2012; Meyer y Leveau 2012; Rastogi, Coaker y Leveau 2013; Schlaeppi y Bulgarelli 2015).

Las asociaciones planta - microorganismos están influenciadas por la naturaleza de los suelos así como por los exudados liberados por las raíces de la planta hospedera, las cuales modifican la estructura y función de la comunidad microbiana (Berlec, 2012). La composición de los exudados de las raíces depende del tipo de suelo, la disponibilidad de nutrientes, el genotipo de la planta y estado de crecimiento, ambiente biótico y estrés abiótico (Santi, Bogusz y Franche 2013)

En lo que concierne a árboles forestales, *Populus* es el árbol modelo de la biotecnología de plantas maderables por múltiples razones, posee una tasa de crecimiento rápido en climas templados, el tamaño pequeño de su genoma (450-550 Mbp), facilidad de transformación genética, puede ser propagado de forma vegetativa (Taylor, 2002). Con las modernas tecnologías de secuenciación de última generación se ha logrado estudiar diversos árboles como *Pinus*, *Eucalyptus*, *Acacia*, *Prosopis* entre otros, enfocándose en el análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas a la rizosfera y filosfera.

Varios microorganismos, asociados a la rizosfera y filosfera, son promotores del crecimiento pudiendo encontrarse en casi todos los nichos ecológicos en interrelación con la planta hospedera, sea de tipo endófito, si habitan dentro de los tejidos de la planta o de tipo epífita si se encuentran en las superficies de la misma, simbioses o patógenos (Hacquard y Schadt 2015) (Shakya *et al.*, 2013) (Bulgarelli *et al.*, 2013) (Vorholt, 2012) (Trabelsi y Mhamdi 2013).

Los organismos endófitos se caracterizan por no causar enfermedad o inducir la formación de estructuras simbióticas, su interacción con el huésped es la menos estudiada y menos comprendida, son importantes promotores del crecimiento y promueven la nutrición vegetal (Reinhold-Hurek y Hurek 2011) (Chauhan *et al.*, 2015) (Rodríguez *et al.*, 2009).

Numerosos hongos y bacterias promotores del crecimiento vegetal, asociados con especies importantes para la agricultura, han sido ampliamente investigados, en particular teniendo en cuenta procesos importantes tales como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos, resistencia a patógenos y factores abióticos, producción de sideróforos (Nasto *et al.*, 2014).

Schüßler, Krüger y Urgiles (2015) inocularon, a nivel de vivero, plántulas de *Cedrella montana*, *Heliocarpus americanus* y *Handroanthus chrysanthus* (sinónimo de *T. chrysantha*) con micorrizas arbusculares nativas (Glomeromycota) como *Rhizophagus sp*, *Diversispora sp*, *Claroideoglosum sp*, entre otras aisladas de los bosques de Loja en Ecuador por Urgiles *et al.* (2009).

## 2.2 Bases teórico-científicas

### Descripción de los árboles en estudio

*Tabebuia chrysantha* (Jacq.) G. Nicholson y *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl (Bignoniaceae), son dos especie arbóreas de los bosques tropicales estacionalmente secos (SDTF), endémico del bosque seco de la costa del Ecuador y Perú, en altitudes de 0 a 50 msnm. Se encuentra en el norte de Venezuela, en zonas adyacentes en Colombia, y en el sur oriente de Ecuador (Aguirre, 2012).

En el Perú se les encuentra en los departamentos de Piura y Tumbes (INRENA, 2002). Son árboles caducifolios de hasta 20 m de altura y de hasta 40 cm de diámetro, con fuste recto, escasamente ramificado, copa amplia, extendida e irregular, corteza fisurada pardo-oscuro. Hojas palmadas compuestas, opuestas, ápice agudo y bordes aserrados, de 3 a 5 foliolos. Flor tubular, 5 cm de longitud, con pedúnculo, cáliz de 5 sépalos café; corola de 5 pétalos amarillos, en inflorescencia racimosa. Fruto una cápsula cilíndrica pubescente (parecida a una vaina) de 15-30 cm de longitud, verde (tierna) y café (madura), contiene abundantes semillas aladas (INRENA, 2002). La destrucción de las poblaciones de *Tabebuia*

*chrysantha* y *Tabebuia billbergii* se debe a la explotación por su madera duradera y resistente al contacto con el suelo, para pilares de casas, pavimento de parquet, leña (FAO, 1987), junto con la construcción de cercos de camarones y granjas costeras (Anurag, 1996).

### **Propagación de especies forestales**

La propagación sexual y asexual es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria, asimismo se practica tanto en especies ornamentales y leñosas. El principal objetivo es multiplicar con eficacia una planta produciendo individuos con un fenotipo similar al del individuo parental. (García, Quintero y López 2004). La clave de la propagación vegetativa está en su empleo, primero por la elección de plantas madres elite segundo por el manejo de miles de individuos en un sustrato adecuado hasta su trasplante a tierra lo que permite una continua selección de individuos que da como resultado final una mayor calidad. Está estrechamente ligado a la producción de plantas libres de patógenos por lo que los materiales propagados son por lo general materiales sanos. Las plantas propagadas son en muchas ocasiones más vigorosas y se desarrollan más rápidamente incrementando así la productividad; (García, Quintero y López 2004).

### **Microorganismos promotores del crecimiento vegetal**

La importancia de los microorganismos de la rizósfera y filósfera deriva de su cantidad, diversidad y, sobre todo, de su gran espectro de actividades, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal. (Acuña *et al.*, 2006). La fuente de dichos beneficios en general es atribuible a las colonias bacterianas y actinomicetos, relacionados con la mineralización del sustrato orgánico y procesos metabólicos y fisiológicos en la rizósfera. Así las bacterias rizosféricas, conocidas como PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), desempeñan funciones importantes para la planta (solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y control biológico de patógenos), al facilitar la emergencia o el enraizamiento (Franco, 2008; Mayz, 2004); además, se conoce que bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrizógenos son los componentes más destacados entre los simbioses mutualistas. Los hongos de tipo micorriza arbusculares (VAM), una vez que colonizan la raíz desarrollan un micelio externo que la conecta con los variados

microhábitas del suelo, permitiendo una mayor disponibilidad de nutrientes (fósforo y nitrógeno fundamentalmente), protección frente a estreses bióticos y abióticos. (González, 2005; Sánchez *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2009). Las bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*, *Frankia* y de vida libre) efectúan su función en la rizósfera de las plantas a las cuales les incorporan altas cantidades de nitrógeno (Jiménez, 2007). Asimismo encontramos otros géneros de hongos que son conocidos como endófitos que cumplen funciones importantes para la salud y desarrollo de las plantas, estos algunas veces se comportan como patógenos pero en condiciones similares a las de nuestros bosques se ha identificado funciones benéficas en la asimilación de fosfatos y otros nutrientes, asimismo le confieren resistencia ante el ataque de patógenos y herbívoros (Sánchez *et al.*, 2013).

### **Técnicas independientes del cultivo de microorganismos**

La biotecnología forestal ha presenciado muchas nuevas invenciones y técnicas durante la última década y es probable que continúe a un ritmo aún más rápido en el futuro. Diferentes soluciones de hormonas han sido inoculadas a partes vegetativas de las plantas como las estacas, entre ellas tenemos el Ácido indol butírico para la inducción de raíces. (Soruce *et al.*, 2013)

Las biotecnologías modernas hacen uso de la metagenómica que usa técnicas modernas de secuenciación para el estudio de microorganismos directamente en su ambiente natural sin la necesidad de pasar por técnicas de aislamiento y cultivo en laboratorio. Esta tecnología se basa en la extracción, secuenciación y análisis de ADN microbiano extraído directamente de comunidades de microorganismos presentes en muestras de diversos ambientes permitiendo obtener así información no sólo de la estructura de la comunidad (riqueza de especies, diversidad y distribución) sino también de la función potencial de la comunidad. Hoy en día con la combinación de dos tecnologías de secuenciación de segunda generación como son 454-pirosecuenciación e Illumina-Solexa, han permitido secuenciar todo un metagenoma ambiental, así como también reorganizar genomas completos a partir de pequeños fragmentos de secuencia.(González *et al.*, 2012). De esta manera, se han identificado diferentes compuestos como antibióticos, actividades de lipasas, amilasas, nucleasas entre otras con interés biotecnológico a partir de

microorganismos caracterizados por metagenómica sin la necesidad de realizar el aislamiento y cultivo (Rondon *et al.*, 2000).

### 2.3 Definición de términos básicos.

Las siguientes definiciones fueron tomadas de (Kaushansky, 2001):

**ARN ribosómico 16S:** (o ARNr 16S) es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariontas. Los genes que codifican para los ARNr 16S y utilizan en la reconstrucción de filogenias, debido a las bajas tasas de evolución de esta región del gen. Carl Woese y George E. Fox fueron dos de las personas que fueron pioneros en el uso de ARNr 16S en las filogenias

**Desnaturalización:** Con respecto a los ácidos nucleicos, se refiere a la conversión de cadena doble al estado de una sola cadena, a menudo se consigue por variaciones de la temperatura o de las condiciones alcalinas. Esto también se llama fusión del ADN. Con respecto a las proteínas, se refiere a la interrupción de la estructura terciaria y secundaria, a menudo alcanzado por el calor, detergentes, agentes caotrópicos, y agentes reductores de sulfhidrilo.

**Hibridación:** La reacción mediante la cual se produce el emparejamiento de hebras complementarias de ácido nucleico. El ADN es generalmente de doble cadena y cuando se separan las hebras se volverán a hibridar bajo las condiciones apropiadas. Los híbridos pueden formarse entre el ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN. Se pueden formar entre una cadena corta y una larga cadena que contiene una región complementaria a la corta. Híbridos imperfectos también se forman, pero cuanto más imperfectos sean menos estable serán (y es menos probable que se formen).

**Iniciador, cebador o Primer:** Un pequeño oligonucleótido (de 6 a 50 nt de longitud) utilizado para la síntesis de ADN. Las ADN polimerasas sólo son capaces de extender una pre-existente hebra a lo largo de una plantilla; no son capaces de tomar un solo filamento desnudo y producir una copia complementaria de ella de novo. Por lo tanto, un cebador que se adhiere a la plantilla se utiliza para iniciar la replicación. Los iniciadores son necesarios para la secuenciación de ADN y PCR.

**ITS:** Espaciador transcrito interno, se refiere al ADN espaciador (ADN no codificante) situado entre el ARN ribosomal de subunidad pequeña (ARNr) y genes de ARNr de subunidad grande en el cromosoma o la región transcrita correspondiente en el transcrito precursor de ARNr policistrónico. En las bacterias y arqueas, ITS se encuentra entre los genes ARNr 16S y 23S. Por otro lado, hay dos ITSs en eucariotas; ITS1 se encuentra entre los genes 18S y 5.8S, mientras que ITS2 está entre 5.8S y 25S (en las plantas, o 28S en los animales).

**Kilobases (kb):** Unidad de la longitud de los fragmentos de ADN igual a 1.000 nucleótidos.

**Marcador de tamaño de peso molecular:** una pieza de ADN de tamaño conocido, o una mezcla de piezas con tamaño conocido, utilizado en geles de electroforesis para determinar el tamaño del ADN desconocido por comparación.

**Par de bases (pb):** Un par de nucleótidos complementarios dentro de una hebra dúplex de un ácido nucleico. Bajo las reglas de Watson-Crick, estos pares se componen de una pirimidina y purina: es decir, CG, AT (ADN) o AU (ARN). Sin embargo, pares de bases "no canónicos" (por ejemplo, GU) son comunes en la estructura secundaria del ARN.

**Reacción en cadena de la polimerasa:** Una técnica para la replicación de una pieza específica de ADN *in vitro*, incluso en presencia de un exceso de ADN no específico. Se añaden cebadores (que inician la copia de cada hebra) junto con nucleótidos y Taq polimerasa estable al calor. Por ciclo de temperatura, el ADN diana es repetitivamente desnaturalizado y copiado. Debido a que las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir posteriormente como plantillas adicionales para las mismas secuencias de los cebadores, las sucesivas rondas de hibridación del cebador, elongación hebra, y disociación producen amplificación rápida y altamente específica de la secuencia deseada. La PCR también se puede utilizar para detectar la existencia de la secuencia definida en una muestra de ADN. Una sola copia del ADN diana, incluso mezclado con otro ADN indeseable, puede amplificarse para obtener miles de millones de repeticiones. La PCR puede usarse para amplificar secuencias de ARN si se convierten primero a ADN a través de la transcripción inversa. Este procedimiento de dos fases se conoce como "RT-PCR".

**Secuenciación:** Determinación del orden de nucleótidos (secuencias de bases) en una molécula de ADN o ARN o el orden de los aminoácidos en una proteína.

**Secuencias complementarias:** secuencias de bases de ácido nucleico que pueden formar una estructura de doble hebra, haciendo coincidir pares de bases; la secuencia complementaria a G- T- A- C es C- A- T G.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Aislamiento e identificación molecular de bacterias

El muestreo se realizó de la Zona de Amortiguamiento del Parque Nacional Cerros de Amotape (PNCA) ubicado en el departamento de Tumbes, en el distrito de pampas de hospital, próximo a los caseríos de angostura y becerra. 200 g de suelo rizosférico fueron colectados a una profundidad de 10 a 15 cm; aproximadamente 25 hojas enteras fueron colectadas y trozos de raíces de 5 cm de largo por 0.5 cm de diámetro, cada material fue colocado en fundas plásticas, marcado y trasladado al laboratorio de microbiología de la empresa Incabiotec. A partir de las muestras de suelo obtenidas se colocaron 9 gránulos de suelo en placas con agar de tripticasa de soya y agar papa dextrosa con antibiótico (100 uL/mL de cloranfenicol) y agar cetrimide. Igualmente, cortes de 1cm<sup>2</sup> de hoja fueron sembrados, trozos de raíz de 1 cm fueron desinfectados y diseccionados de forma longitudinal y sembrados en placas del mismo agar, siendo incubadas a 28 °C hasta observar crecimiento luego de lo cual se aislaron los diferentes organismos hasta obtener cultivos puros.

La identificación molecular se realizó luego de la extracción de ADN de cada individuo, mediante la amplificación molecular del gen de ARNr16S de aproximadamente 1500 bp para bacterias (Wang *et al.*, 2011), empleando los primers 27 Forward AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG y 1492 Reverse GGYTACCTTGTTACGACTT. Para la amplificación del tramo entero de la región ITS1-5.8S-ITS2 (Internal transcribed spacer) de aproximadamente 750 bp para hongos (Wang *et al.*, 2011) se emplearon los primers ITS-1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS-4 TCCTCCGCTTATTGATATGC.

La amplificación fue realizada en un termociclador (Biometra), cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µL con los siguientes componentes: 2.5 µL de Taq Buffer (10 X), 0.5 µL de dNTP (10 mM), 0.6 µL de cada primer 27 F y 1492 R (15 pM), 2.5 de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.1 uL de Taq DNA polimerasa (5 U/µL) 1 µL de ADN para hongos y 2 µL para bacterias como plantilla.

El programa de amplificación fue el siguiente para hongos: desnaturalización inicial de 94°C por 6 minutos, seguido por 35 ciclos, un ciclo de desnaturalización 94°C por 30 segundos, hibridación 54°C por 45 segundos, elongación a 72°C por 45 segundos, y un paso de extensión final a 72°C por 4 minutos. Para bacterias: desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos, un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 45 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto, y un paso de extensión final a 72°C por 4 minutos.

El producto de la PCR fue migrado en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de Etidio (10 mg/mL) a una concentración final de 0.5 µg/mL, se depositó 10 µL de producto de amplificación con 2 µL de tampón de depósito. Las condiciones de migración fueron 80 V para la región ITS (Hongos) y 98 V para la región ARNr 16S (Bacterias) por 30 minutos en TAE 1X.

### **3.2 Análisis metagenómico**

Para el análisis metagenómico se pesaron 0.25 g de muestra del suelo de la rizosfera de *Tabebuia chrysantha* y *T. billbergii* y fueron procesadas empleando el Kit de extracción de ADN de suelo PowerSoil (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, California) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **3.3 Ensayos de compatibilidad bacteriana**

Se seleccionaron 9 de las 11 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de *T. chrysantha* y 7 de las 10 cepas de la rizosfera de *T. billbergii*, basándose en la toma de un género diferente. Se empleó el método de difusión en placa (Kumar *et al.*, 2015) para comprobar la compatibilidad bajo condiciones *in vitro*, 100 µL de una bacteria fueron extendidos en placas de medio TSA sobre los cuales se colocaron discos de papel filtro estéril conteniendo 10 µL de diferentes cultivos bacterianos, las placas se incubaron a 28°C por 48 horas.

### 3.4 Pruebas de crecimiento en medio Rojo Congo y medio NFB

Para determinar la capacidad de crecimiento bajo condiciones microaerófilas se empleó el medio semisólido NFB que es específico para bacterias fijadoras de nitrógeno (Gujral *et al.*, 2013) (Cassán *et al.*, 2015), 100  $\mu$ L de cultivo bacteriano fue inoculado en tubos de 1.5 mL con medio semisólido NFB e incubado a 30°C por 72 horas, luego con un asa cargada del cultivo crecido se transfirió a medio NFB fresco, el procedimiento se realizó una vez más, incubándose a 30°C por 72 horas en cada fase. Asimismo, fueron sembradas en caldo de cultivo Rojo Congo, incubadas por 48 horas a 30°C.

### 3.5 Desinfección de semillas.

La desinfección se realizó de acuerdo al protocolo de Ferrera (1993) con las siguientes modificaciones, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 65% agitando suavemente el tubo por un minuto, luego se enjuagaron dos veces con agua estéril por 3 minutos. Se adicionó hipoclorito de sodio al 0.5% agitando por 10 minutos, se realizó un enjuague con agua estéril durante 1 minuto, seguido de cuatro enjuagues de 3 minutos cada uno, 100  $\mu$ L del agua del tercer enjuague fue plaqueado en medio TSA para confirmar el éxito de la desinfección.

### 3.6 Inoculación de plántulas y evaluación de los efectos

Una colonia simple bacteriana fue crecida en caldo TSB a 28°C por 24 horas, las células fueron centrifugadas y el pellet obtenido resuspendido en Sulfato de Magnesio 10 mM ajustado a una densidad óptica de 1.8 a 600 nm (Poole *et al.*, 2001). Una alícuota de 1 ml de cultivo fue inoculado a cada semilla, las cuales fueron sembradas en sustrato que contenía 60% de Limo de río, 10% arena, 20% perlita y 10% de vermiculita, la evaluación se realizó a los 28 días después de la inoculación. En esta prueba se emplearon los consorcios del grupo 01 y 05 para *T. chrysantha* (Tabla 05) y el grupo 03 para *T. billbergii* (Tabla 03), además, se inoculó el consorcio de *Azotobacter tropicalis* + *Pseudomonas sp.*

### **3.7 Análisis de la colonización de raíces en microscopio confocal de barrido laser**

Para la observación de la colonización por bacterias se tomaron raíces de 0.5 cm de largo que fueron sumergidas en una solución de Acridine Orange a 1% de concentración final (Acridine Orange, stock 10 Mg/mL, luz de excitación de 431 nm y de emisión de 520 nm; marca Invitrogen) por un período de 30 minutos. 0.5 cm de muestras de raíces colonizadas por hongos fueron sumergidas en solución de Bromuro de Etidio (10 Mg/mL, luz de excitación de 524 nm y de emisión de 605 nm; marca Applichem), cada muestra fue colocada en una lámina y observada directamente en un microscopio confocal de barrido láser (Marca Olympus FV10i).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de la raíz, rizósfera y filósfera de los guayacanes basada en técnicas dependientes de cultivo microbiano

Se identificaron un total de 41 organismos asociados a *T. chrysantha* (31) y *T. billbergii* (21). La identificación molecular se realizó mediante el uso de iniciadores universales ITS1 e ITS4 para hongos y 27F y 1492R para bacterias.

En *T. chrysantha* se identificaron 8 géneros bacterianos, siendo el más abundante *Bacillus* (9 especies) con 6 especies asociadas a la filósfera, 2 a rizósfera y 1 a raíz, seguido de *Pseudomonas* con 1 especie de la rizosfera y 1 de filósfera, *Paenibacillus* (2 especies de la raíz) y con una especie en los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium* y *Lysinibacillus* (tabla 1). Se identificaron además 9 géneros de hongos, siendo el más abundante *Fusarium* (2 especies: 4 cepas asociadas a la rizósfera, *F. solani*; y una a raíz, *F. phaseoli*), seguido del género *Saksenaea* (3 cepas: 2 de rizósfera y 1 raíz); *Trichoderma* (2 cepas de la rizósfera, *Trichoderma harzianum*), 1 *Aspergillus* de la rizósfera, 1 *Latorua* de raíz y 1 *Penicillium* de raíz (tabla 4).

En la tabla 2 observamos que en *T. billbergii* se identificaron 7 géneros bacterianos, siendo el más abundante *Bacillus* (4 especies) todas en la filósfera, *Pseudomonas* (4 especies) 3 de rizósfera y 1 de filósfera, *Enterobacter* (2 especies de la rizósfera), *Klebsiella* (2 especies en rizósfera) y con una especie en los géneros *Azotobacter*, *Pantoea* y *Acinetobacter*. En cuanto a hongos lograron identificarse 4 géneros fúngicos, todos aislados de la filósfera, *Diaporthe* (2 especies) y con una sola especie *Colletotrichum*, *Podospora* y *Curvularia* (tabla 3).

**Tabla 1:** identificación molecular de bacterias de la filósfera y rizósfera de *Tabebuia chrysantha*

Cepa	Tamaño secuencia	Identificación más cercana en Genbank	% de identidad	Fuente
HC1-A	939	<i>Bacillus sp</i>	99	Filósfera
HC1-B	1495	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	100	Filósfera
HC-2-A	617	<i>Bacillus pumilus</i>	99	Filósfera
HC-2-B	1371	<i>Bacillus sp</i>	99	Filósfera
HC-3-A1	441	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	Filósfera
HC-3-B2	1513	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	Filósfera
HC-4	1466	<i>Bacillus subtilis</i>	99	Filósfera
RD-12B	1489	<i>Paenibacillus sp</i>	99	Raíz
RG-12	243	<i>Paenibacillus sp</i>	96	Raíz
RS12-A	1476	<i>Pseudomonas putida</i>	99	Rizósfera
RS12-B	1484	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	Rizósfera
RTC 6 A	747	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	Raíz
STC 6 B	449	<i>Serratia marcescens</i>	84	Rizósfera
TCS 1-E	1112	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	Rizósfera
TCS1-A	1490	<i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum</i>	99	Rizósfera
TCS1-B	780	<i>Exiguobacterium profundum</i>	97	Rizósfera
TCS1-C	1427	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	98	Rizósfera
TCS1-F	1266	<i>Bacillus cereus</i>	99	Rizósfera

**Tabla 2:** identificación molecular de bacterias de la filósfera y rizósfera de *Tabebuia billbergii*

Cepa	Tamaño secuencia	Identificación más cercana en Genbank	% de identidad	Fuente
HS	1504	<i>Bacillus firmus</i>	100	Filósfera
HS-15D	961	<i>Bacillus subtilis</i>	98	Filósfera
HS24-B	1463	<i>Bacillus sp</i>	99	Filósfera
HS24-C-1	1360	<i>Bacillus cereus</i>	100	Filósfera
HSTB-6 B1	724	<i>Pseudomonas sp</i>	99	Filósfera
STB-12 A1 C	622	<i>Enterobacter sp</i>	95	Rizósfera
STB-12 A1A1	605	<i>Enterobacter sp</i>	92	Rizósfera
STB-12 A2A	678	<i>Klebsiella variicola</i>	95	Rizósfera
STB-12 D	732	<i>Pseudomonas sp</i>	100	Rizósfera
STB-25 A1B1	728	<i>Pseudomonas sp</i>	100	Rizósfera
STB-25 A1B2	741	<i>Pseudomonas sp</i>	99	Rizósfera
STB-25 B1B	730	<i>Azotobacter tropicalis</i>	98	Rizósfera
STB-25 E1A	733	<i>Pantoea agglomerans</i>	96	Rizósfera
STB-25 E2A	741	<i>Acinetobacter pittii</i>	99	Rizósfera
STB-25 G1B	733	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	Rizósfera

**Tabla 3:** identificación molecular de hongos de la filósfera de *Tabebuia billbergii*

cepa	Tamaño secuencia	Identificación más cercana en genbank	% de identidad	Fuente
HD-6-2A	593	<i>Colletotrichum boninense</i>	99	Filósfera
HS-6-B	492	<i>Podospora austroamericana</i>	99	Filósfera
HD-15-1	555	<i>Diaporthe sp</i>	99	Filósfera
HS-15-B	517	<i>Curvularia lunata</i>	100	Filósfera
HD-22-1	495	<i>Diaporthe sp</i>	99	Filósfera

**Tabla 4:** identificación molecular de hongos de la rizósfera y raíz de *Tabebuia chrysantha*.

Cepa	Tamaño secuencia	Identificación más cercana en Genbank	% de identidad	Fuente
STC-6E Cetri	556	<i>Saksenaea vasiformis</i>	88%	Rizósfera
STC-1B Cetri	792	<i>Fusarium solani</i>	100%	Rizósfera
STC-6G1	577	<i>Fusarium solani</i>	99%	Rizósfera
STC-6DC	723	<i>Aspergillus aculeatus</i>	100%	Rizósfera
STC-6DA	684	<i>Saksenaea vasiformis</i>	90%	Rizósfera
RTC-6C1	736	<i>Latorua caligans</i>	99%	Raíz
STC-6B	613	<i>Fusarium solani</i>	99%	Rizósfera
STC-25 Cetri	682	<i>Trichoderma harzianum</i>	97%	Rizósfera
RTC-6-C2	882	<i>Penicillium rubidurum</i>	99%	Raíz
STC-6C	802	<i>Trichoderma harzianum</i>	96%	Rizósfera
RTC-6-A	711	<i>Fusarium phaseoli</i>	99%	Raíz
STC-6G	822	<i>Fusarium solani</i>	99%	Rizósfera
RS-12-A Cetri	663	<i>Saksenaea vasiformis</i>	92%	Raíz

#### 4.2 Caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de la rizósfera basada en técnicas independientes de cultivo microbiano (metagenómica)

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en la plataforma de análisis automatizado metagenomics RAST (Mg-RAST versión 3.6) (<http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Logout>) empleando la base de datos Greengenes para secuencias del gen ARNr16S para bacterias. Para hongos se empleó la base de datos SIVA LSU (base de datos de ARNr de la subunidad mayor del ribosoma para eucariotas). Para generar el árbol filogenético se empleó el máximo valor E-value de 1E-30, 90% de mínimo porcentaje de identidad y la mínima longitud de alineamiento de 20.

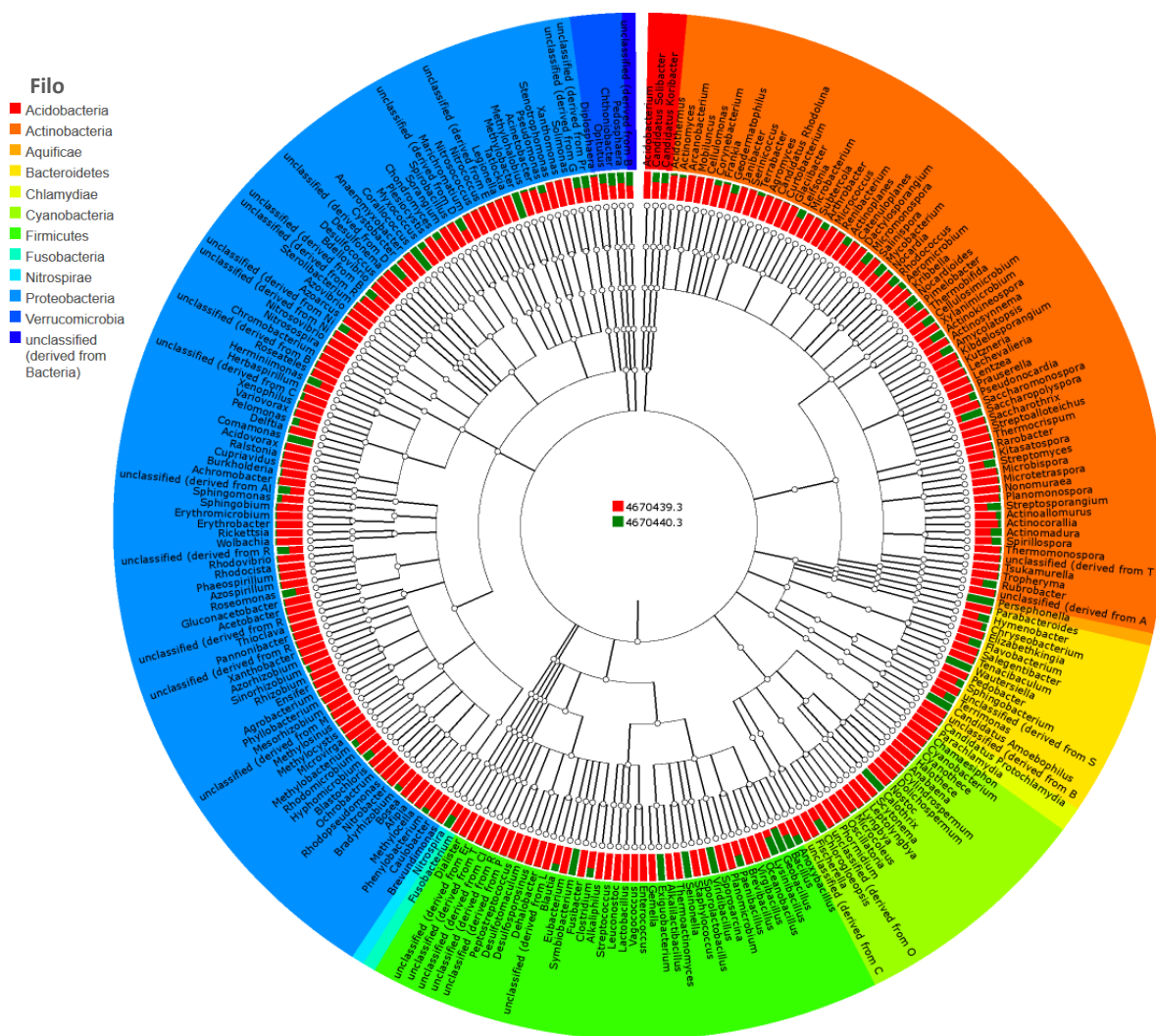
En la figura 1 se muestran 11 filos de bacterias asociadas a la rizósfera de las especies *T. chrysantha* (Rojo 4670439.3) y *T. billbergii* (verde 4670440.3) siendo los filos más representativos para *T. chrysantha*: *Proteobacteria* (18.61%), *Actinobacteria* (11.93%), *Verrucomicrobia* (6.62%) y *Firmicutes* (6.10%) y para *T. billbergii*: *Firmicutes* (19.17%), *Actinobacteria* (14.90%), *Proteobacteria* (8.94%) y *Verrucomicrobia* (6.17%).

La riqueza se evaluó basándose en la rarefacción obtenida a partir del número de secuencias y los OTUs definidos, elaborándose curvas de rarefacción para ambas muestras. La curva de rarefacción para el gen ARNr16S para bacterias, con 90% de similitud de nucleótidos mostró que existe menor diversidad de especies en la muestra de rizósfera de *T. billbergii* (A) respecto a *T. chrysantha* (B), esto se evidencia en la pendiente formada por la curva, la cual tiende a la derecha conforme se realizan las lecturas, así mismo se observa mayor número de especies mientras más lecturas son realizadas (Figura 2).

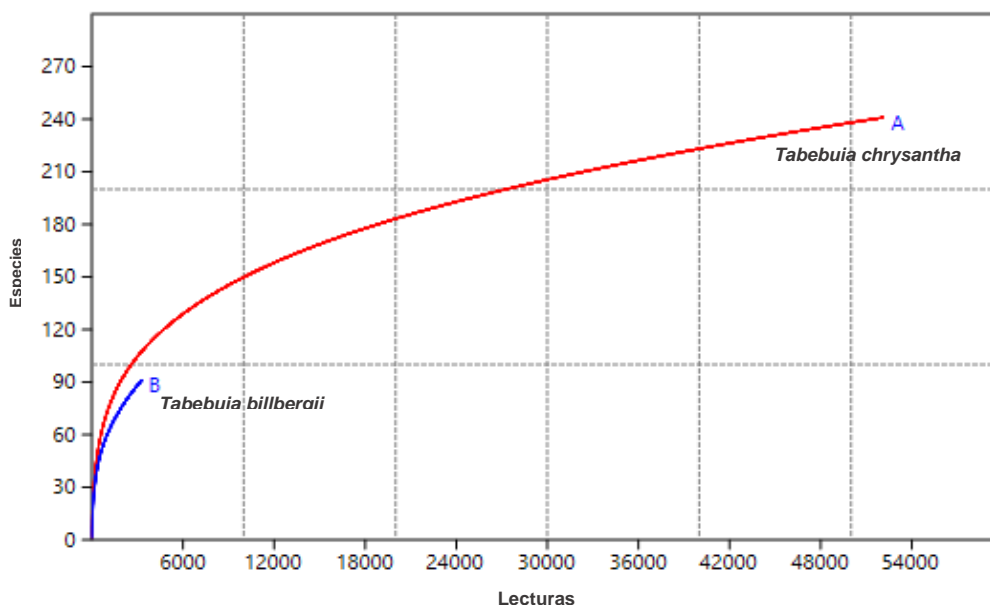
Asimismo, la riqueza y diversidad mediante el software PAST versión 3.11, nos indica que, existe mayor diversidad y riqueza en la rizósfera de *T. chrysantha*, según el índice de CHAO para riqueza y el Índice de Shannon para diversidad Alfa, respecto a la rizósfera de *T. billbergii*, la diversidad Beta (0.51) nos indica que ambas muestras comparten especies en común (Tabla 5).

**Tabla 5.** Estimación de la riqueza e Índices de diversidad en la rizósfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii* asociada al dominio bacteria.

Muestra	Riqueza		Diversidad	
	Observada	CHAO	Alfa	Beta
<i>T. chrysantha</i>	241	330.4	2.511	0.51
<i>T. billbergii</i>	91	143.8	2.348	



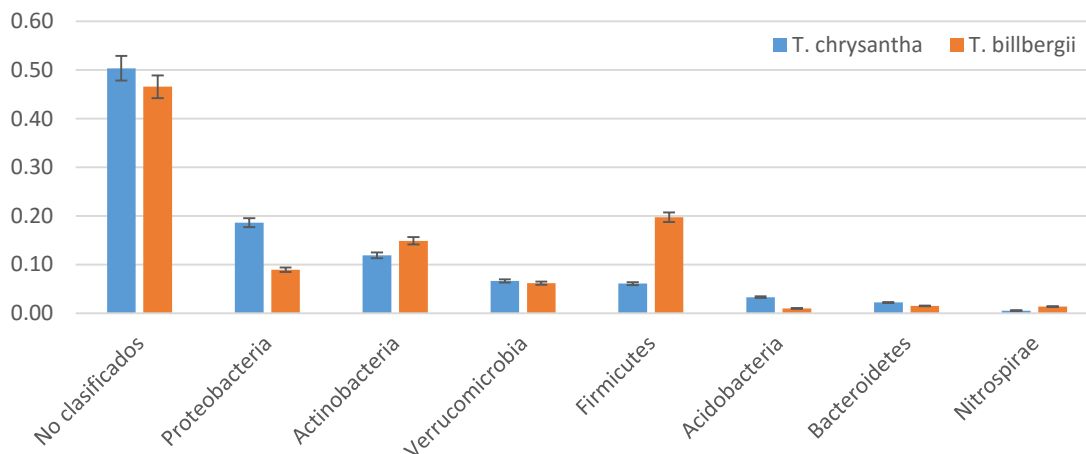
**Figura 1:** Árbol filogenético de los géneros de bacterias presentes en la rizosfera de *T. billbergii* (Barra Verde) y *T. chrysantha* (Barra roja). Las barras representan la presencia de determinados OTUs según la muestra, la abundancia relativa (AR) de los filós más representativos para *T. chrysantha* es 18.61% (Proteobacteria), 11.93% (Actinobacteria), 6.62% (Verrucomicrobia) y 6.10% (Firmicutes). Para *T. billbergii* observamos un 8.94% (Proteobacteria), 14.90% (Actinobacteria), 6.17% (Verrucomicrobia) y 19.17% (Firmicutes). Para generar el árbol se emplearon los parámetros siguientes: máximo valor E-value de  $1E-30$ , 90% de mínimo porcentaje de identidad y la mínima longitud de alineamiento de 20.



**Figura 2.** Curva de rarefacción del Dominio Bacteria. Diversidad observada en la muestra de rizosfera de *T. chrysantha* (A) y *T. billbergii* (B) en relación al número de especies identificadas, la tendencia de la pendiente hacia la derecha en A (*T. chrysantha*) indica una mayor diversidad y mayor número de especies conforme se realizan mayor número de lecturas, respecto de B (*T. billbergii*). (PAST versión 3.11)

El análisis taxonómico para bacterias nos muestra que el filo más abundante en la rizósfera de *T. chrysantha* es *Proteobacteria* (18.61%) y para *T. billbergii* es *Firmicutes* (19.76%) (Figura 3). A nivel de género, en *T. chrysantha* se identificaron 213 géneros asociados a la rizósfera, con una abundancia relativa mayor a 0.01 tenemos: *Chthoniobacter* (a.r.: 0.05), *Bacillus* (a.r.: 0.03), *Desulfosporosinus* (a.r.: 0.02), *Streptomyces* (a.r.: 0.02), *Candidatus* (a.r.: 0.02), entre otros géneros con a.r. de 0.01, en esta muestra se identificaron cuatro grupos del filo *Proteobacteria* con alta lectura, que solo llegaron a clasificarse a nivel de clase: *Alphaproteobacteria* (a.r.: 0.05), *Betaproteobacteria* (a.r.: 0.02), *Deltaproteobacteria* (a.r.: 0.02) y *Gammaproteobacteria* (a.r.: 0.05) (Figura 4).

En *T. billbergii* se identificaron 81 géneros asociados a la rizósfera, con una abundancia relativa mayor a 0.01 tenemos: *Lysinibacillus* (a.r.: 0.06), *Chthoniobacter* (a.r.: 0.05), *Rubrobacter* (a.r.: 0.05), *Amycolatopsis* (a.r.: 0.02), *Streptomyces* (a.r.: 0.02), *Bacillus* (a.r.: 0.12), y otros con a.r. de 0.01, al igual que en *T. chrysantha*, se identificaron cuatro grupos del filo *Proteobacteria*, que solo llegaron a clasificarse a nivel de clase: *Alphaproteobacteria* (a.r.: 0.01), *Betaproteobacteria* (a.r.: 0.01), *Deltaproteobacteria* (a.r.: 0.02) y *Gammaproteobacteria* (a.r.: 0.01) (Figura 5).



**Figura 3:** Abundancia relativa (a.r.) de los filos del dominio bacteria presentes en la rizosfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii*. Barras representan error estándar  $\pm 0.05$ . *T. chrysantha* está dominada por *Proteobacteria* (a.r.: 0.18) y *Actinobacteria* (a.r.: 0.11), mientras que *T. billbergii* por los filos *Firmicutes* (a.r.: 0.19) y *Actinobacteria* (a.r.: 0.14).

El dominio eucariota estuvo representado por tres filos pertenecientes a hongos asociados a la rizósfera de *T. chrysantha* (Rojo 4682769.3) y *T. billbergii* (verde 4682768.3): *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Glomeromycota* (Figura 5).

La riqueza se evaluó en base a la rarefacción obtenida a partir del número de secuencias y los OTUs definidos, elaborándose curvas de rarefacción para ambas muestras. La curva de rarefacción para la subunidad mayor del ribosoma (LSU por sus siglas en inglés) para eucariotas (hongos), con 90% de similitud de nucleótidos determinó que existe menor riqueza y diversidad de especies en la muestra de rizósfera de *T. chrysantha* (A) respecto a *T. billbergii* (B). Esto se evidencia en la longitud de la curva alcanzada por (B) con una mayor cantidad de especies a mayor número de lecturas, en comparación de A cuyo crecimiento se detiene en cierto número de lecturas (Figura 6).

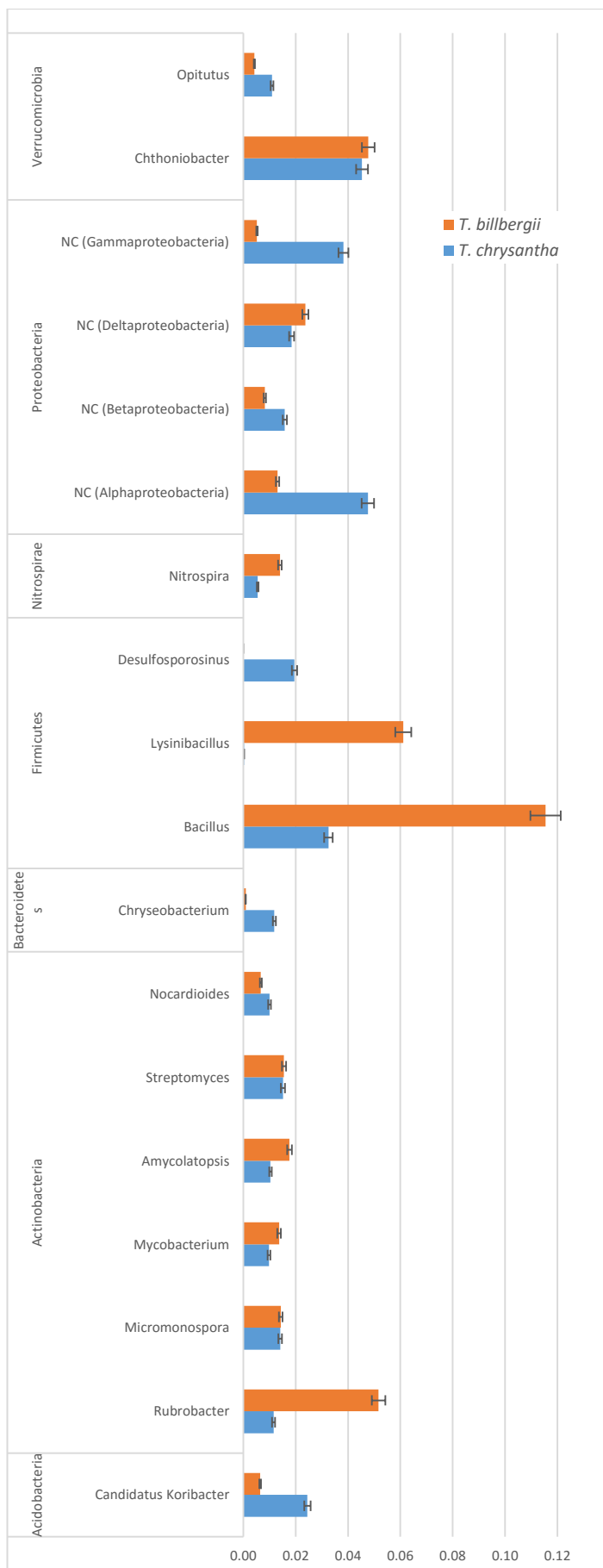
Según el índice de CHAO existe mayor riqueza en la rizósfera de *T. chrysantha*, al igual que el índice de Shannon para diversidad Alfa es mayor respecto a la rizósfera asociada a *T. billbergii*. La diversidad Beta (0.50) nos indica que ambas muestras comparten especies en común (Tabla 6).

**Tabla 6.** Estimación de la riqueza e Índices de diversidad en suelo de la rizosfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii* asociada al dominio eucariota (Hongos).

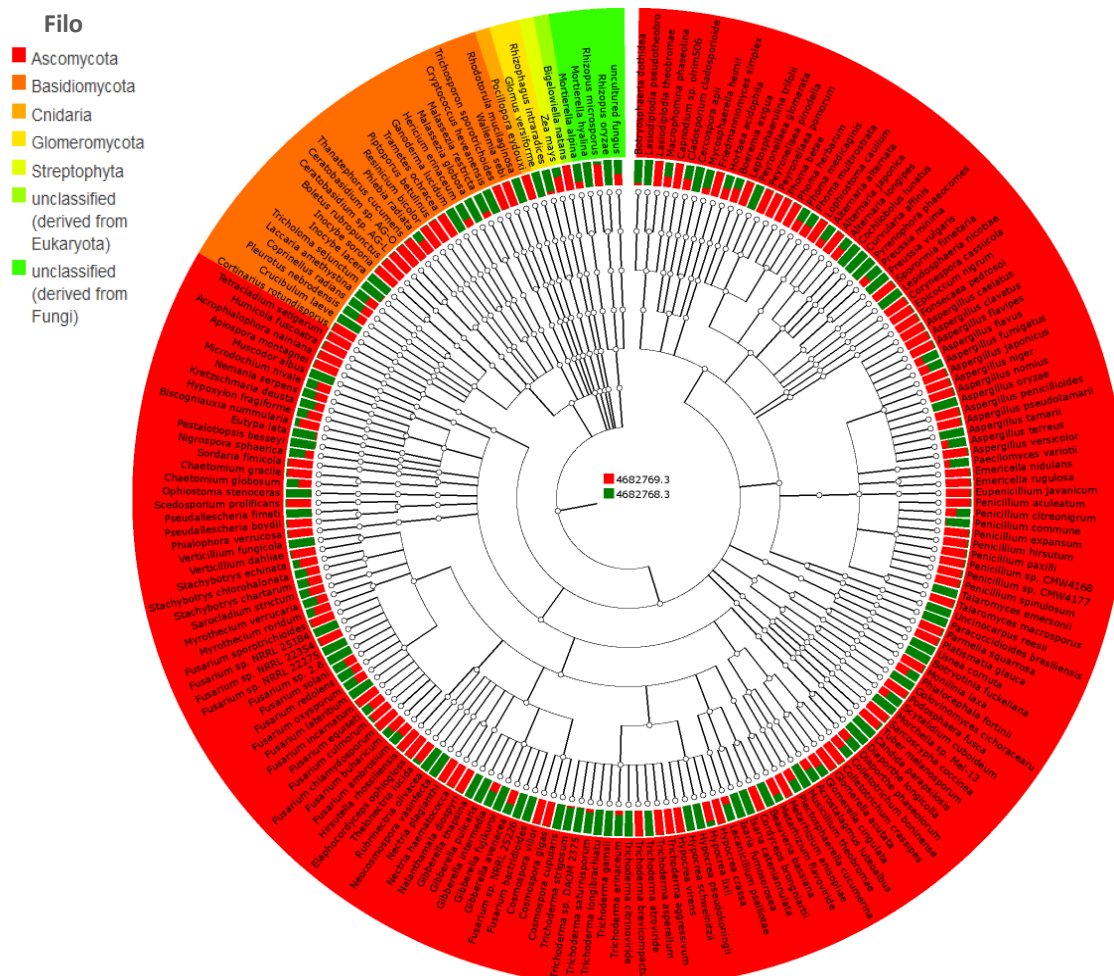
Muestra	Riqueza		Diversidad	
	Observada	CHAO	Alfa	Beta
<i>T. billbergii</i>	123	156.3	2.232	0.50
<i>T. chrysantha</i>	148	175	2.764	

El análisis taxonómico para eucariotas nos muestra que el filo más abundante en la rizósfera de *T. chrysantha* es *Ascomycota* (a.r.: 0.98) y una abundancia muy baja de *Basidiomycota* (0.84) y en *T. billbergii* los filios *Glomeromycota* (56.46%) y *Ascomycota* (39.72%) son los más abundantes (Figura 7). A nivel de género, en *T. chrysantha* se identificaron 90 géneros asociados a la rizosfera, con una abundancia relativa mayor a 0.05 tenemos: *Emericella* (a.r.: 0.18), *Thelonectria* (a.r.: 0.14), *Microdochium* (a.r.: 0.13), *Chaetomium* (a.r.: 0.12), *Penicillium* (a.r.: 0.09), y géneros con a.r. superior al 0.01: *Acrophialophora* (a.r.: 0.03), *Colletotrichum* (a.r.: 0.02), *Hortaea* (a.r.: 0.02), *Stachybotrys* (a.r.: 0.02), *Phoma* (a.r.: 0.01), *Myrothecium* (a.r.: 0.01), *Metarhizium* (a.r.: 0.01), *Aspergillus* (a.r.: 0.01) (Figura 8).

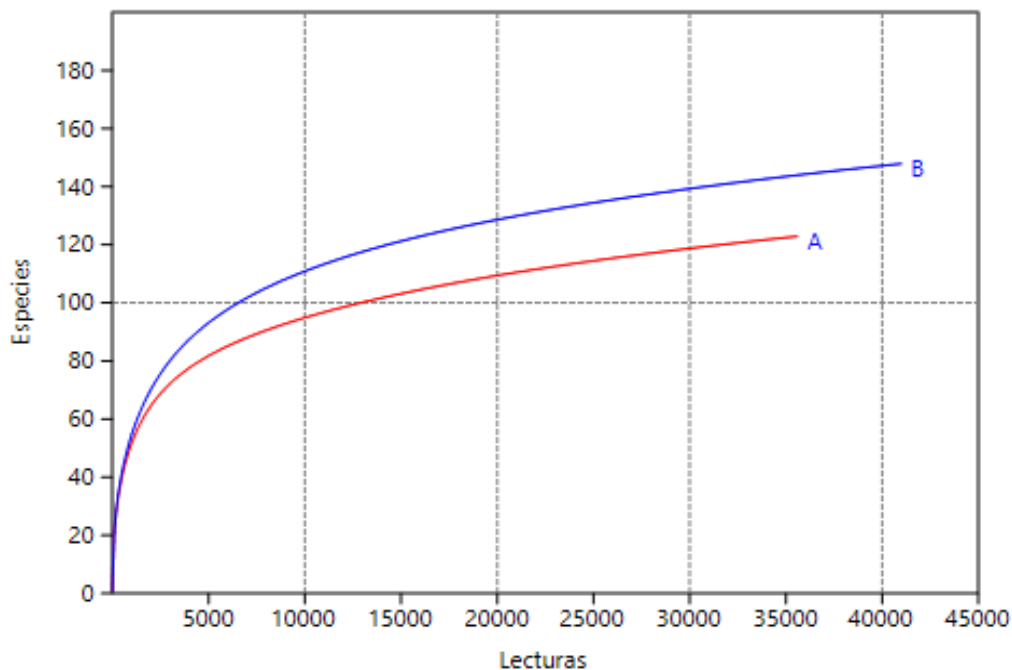
En *T. billbergii* se identificaron 79 géneros asociados a la rizósfera, con una abundancia relativa mayor a 0.05 se tienen: *Rhizophagus* (a.r.: 0.56) y *Fusarium* (a.r.: 0.08), los géneros con a.r. superior al 0.01: *Talaromyces* (a.r.: 0.04), *Lepidosphaeria* (a.r.: 0.03), *Peyronellaea* (a.r.: 0.03), *Morchella* (a.r.: 0.03), *Mortierella* (a.r.: 0.03), *Chaetomium* (a.r.: 0.02), *Hortaea* (a.r.: 0.02), *Mycosphaerella* (a.r.: 0.02), *Phoma* (a.r.: 0.02), *Microdochium* (a.r.: 0.02), *Trichoderma* (a.r.: 0.02), *Aspergillus* (a.r.: 0.01), *Scytalidium* (a.r.: 0.01). (Figura 8)



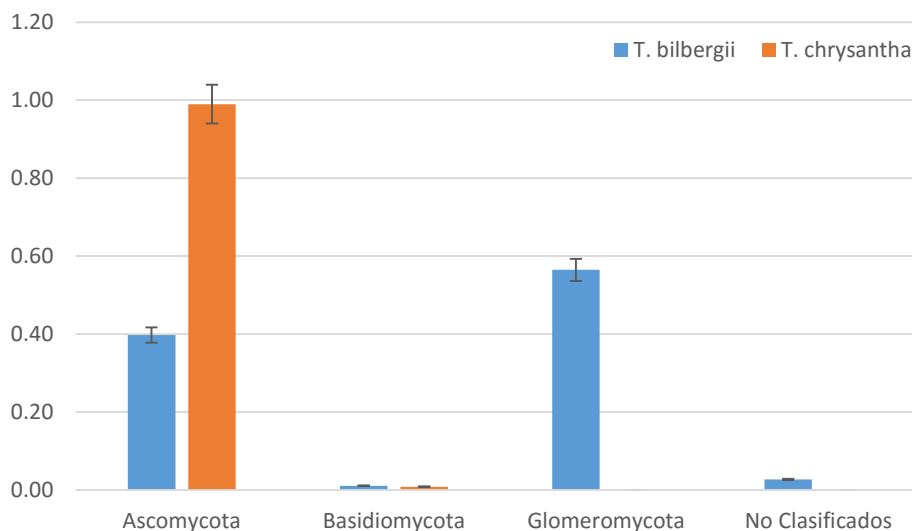
**Figura 4:** Abundancia relativa (a.r.) de los géneros mayores a 0.01 a.r. pertenecientes a los filos del dominio bacteria presentes en la rizósfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii*. Barras representan error estándar  $\pm 0.05$ .



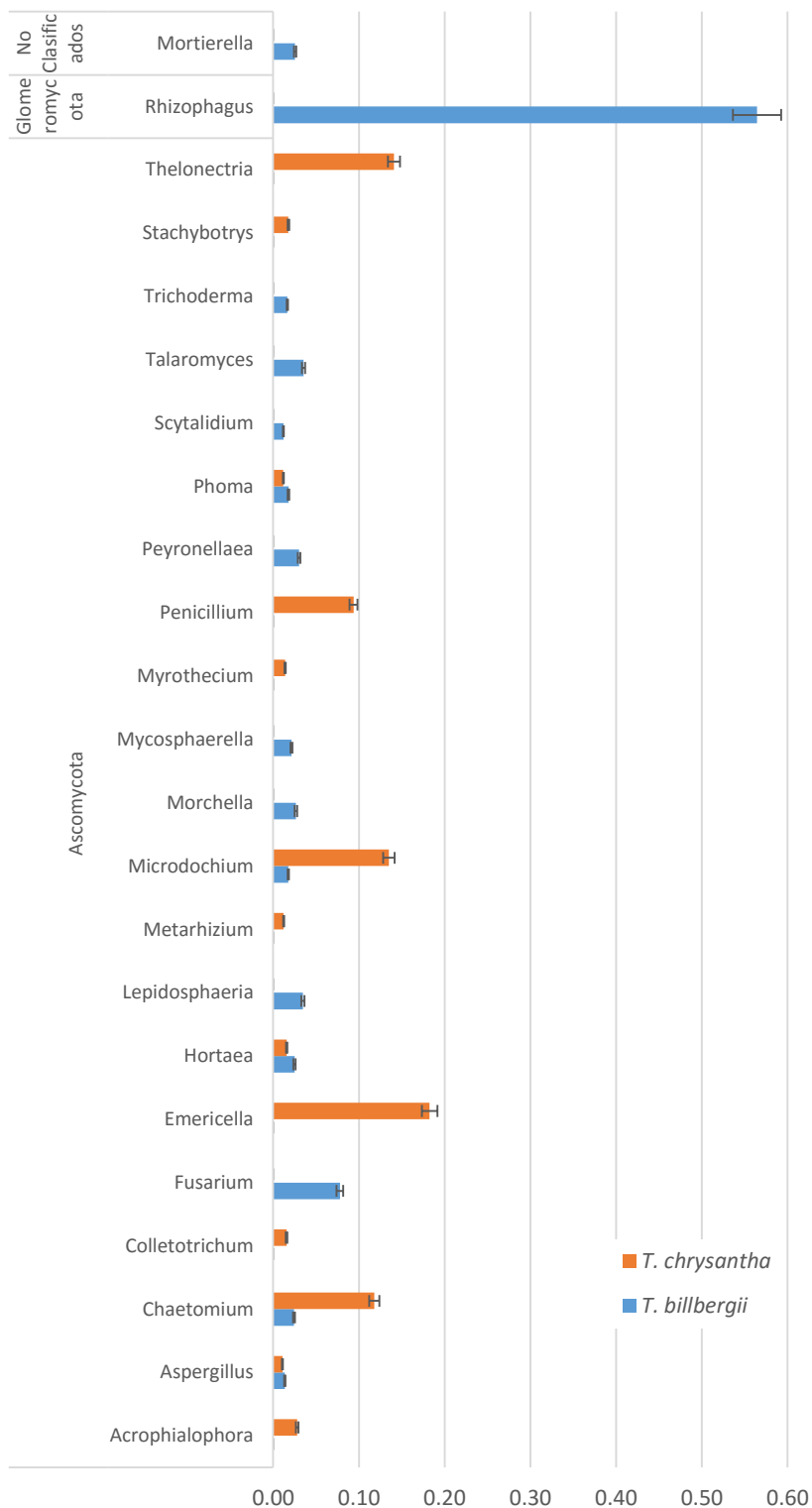
**Figura 5:** Árbol filogenético de los géneros de hongos presentes en la rizósfera de *T. billbergii* (barra Verde) y *T. chrysantha* (barra roja). Las barras representan la presencia de determinados OTUs según la muestra, para *T. chrysantha* se observa una abundancia relativa (a.r.) de 0.98 (*Ascomycota*), 0.009 (*Basidiomycota*) y 0.0001 (*Glomeromycota*), en *T. billbergii* observamos una a.r. de 0.39 (*Ascomycota*), 0.01 (*Basidiomycota*) y 0.56 (*Glomeromycota*). Para generar el árbol se emplearon los parámetros siguientes: máximo valor E-value de  $1E-30$ , 90% de mínimo porcentaje de identidad y la mínima longitud de alineamiento de 20.



**Figura 6.** Curva de rarefacción del Dominio eucariota (Hongos). Diversidad observada en la muestra de rizósfera de *T. chrysantha* (A) y *T. billbergii* (B) en relación al número de especies identificadas, la tendencia de crecimiento de la pendiente y orientación hacia la derecha en B (*T. chrysantha*) indica una mayor diversidad y mayor número de especies conforme se realizan mayor número de lecturas, respecto de A (*T. billbergii*). (PAST versión 3.11)



**Figura 7:** abundancia relativa (a.r.) de los filos del dominio Eucariota para hongos presentes en la rizósfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii*. *T. chrysantha* está dominada por representantes del filo *Ascomycota* (a.r.: 0.98), mientras que *T. billbergii* por los filos *Glomeromycota* (a.r.: 0.56) y *Ascomycota* (a.r.: 0.39). Barras representan error estándar  $\pm 0.05$ .



**Figura 8:** abundancia relativa (a.r.) de los géneros mayores a 0.01 a.r. pertenecientes a los filos del dominio Eucariota para hongos presentes en la rizósfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii*. Barras representan error estándar  $\pm 0.05$ .

### 4.3 Ensayos de compatibilidad bacteriana

Para *T. chrysantha* se seleccionaron 9 de las 11 cepas bacterianas aisladas de su rizósfera. Para *T. billbergii* se seleccionaron 7 de las 10 cepas de la rizósfera, el criterio de selección se basó en la toma de un género bacteriano diferente. La formación de consorcio se basó en la agrupación del máximo grupo de cepas compatibles, evitando aquellas antagonistas de cualquier integrante del consorcio, según los resultados de antagonismo.

Tras el ensayo de enfrentamiento se determinó que existe antagonismo en algunas de las cepas, en especial en las bacterias asociadas a la rizósfera de *T. chrysantha* como *Bacillus amyloliquefaciens* que era antagonista de casi todas las otras bacterias y solo era compatible con *Pseudomonas putida*, de allí la formación de un consorcio dual, sin embargo, esto no impidió poder formar consorcios compatibles (Figura 9).

En nuestro trabajo determinamos cinco agrupaciones de bacterias asociadas a la rizósfera de *T. chrysantha* (Tabla 7) y tres grandes grupos de bacterias a asociadas a la rizósfera de *T. billbergii* (Tabla 8).

**Tabla 7:** Consorcios de bacterias asociados a *T. chrysantha*

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i>	<i>E. profundum</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>L. fusiformis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	<i>Paenibacillus sp</i>
	<i>Paenibacillus sp</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	<i>P.putida</i>	<i>P. putida</i>
	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>		

**Tabla 8:** Consorcios de Bacterias asociados a *T. billbergii*

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>Klebsiella variicola</i>	<i>K. variicola</i>	<i>K. variicola</i>
<i>Enterobacter sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
<i>Pseudomonas sp (STB 12D)</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>P. agglomerans</i>
	<i>Pseudomonas sp (STB 25A)</i>	
<i>Pseudomonas sp (STB 25A)</i>		<i>Pseudomonas sp (STB 25A)</i>
<i>A. tropicalis</i>	<i>A. tropicalis</i>	<i>A. tropicalis</i>

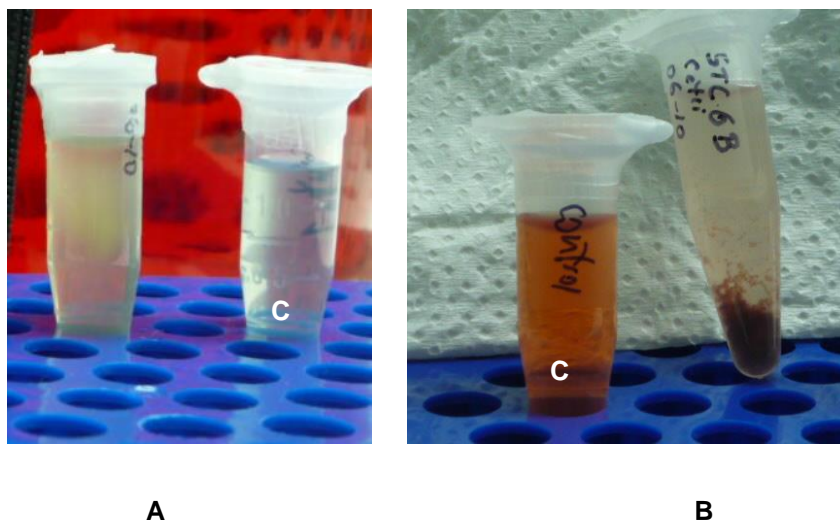
**Figura 9:** Placas de enfrentamiento de las bacterias de la rizósfera de *T. chrysantha* para determinar la compatibilidad y posterior formación de los consorcios microbianos.

#### 4.4 Crecimiento en medio Rojo Congo (RC) y medio para bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB)

Se seleccionaron nueve cepas aisladas de la rizósfera de *T. chrysantha* y siete de *T. billbergii*, el criterio de selección se basó en la toma de un género bacteriano diferente perteneciente a la rizósfera.

La capacidad de las cepas de crecer en condiciones microaerófilas fue ensayada. Una película delgada se observó bajo la superficie del medio semisólido a diferentes profundidades (Figura 10). Entre los organismos que fueron capaces de crecer en medio libre de nitrógeno, *Lysinibacillus fusiformis* y *Enterobacter cloacae*

fueron capaces de decolorar el medio NFB. Las cepas fueron crecidas, además, en medio RC para observar su comportamiento en un medio específico para bacterias fijadoras de nitrógeno. Se observó el crecimiento de todas las cepas evaluando la capacidad de algunas de decolorar el Rojo Congo, (Tabla 9).

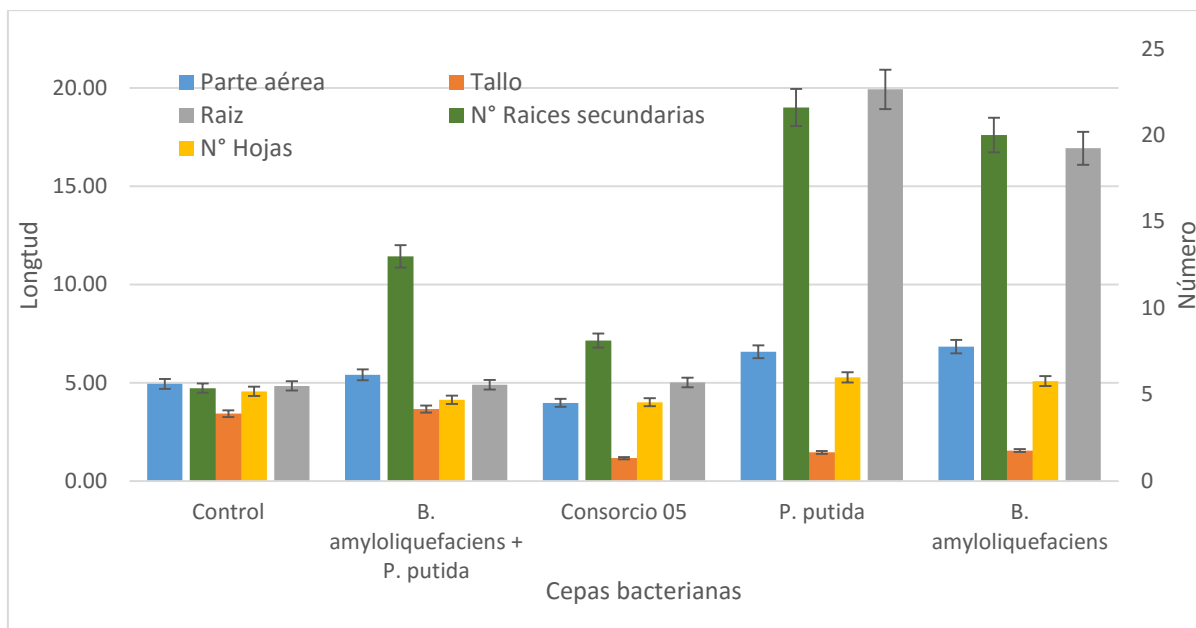


**Figura 10:** Crecimiento de *Serratia marcescens* en medios específicos. Izquierda: A, crecimiento en medio para Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (NFB) después de 72 horas de incubación. Nótese la película bajo la superficie, señalada con una flecha. Derecha: B, Crecimiento en medio Rojo Congo (RC) después de 48 horas de incubación; C: control.

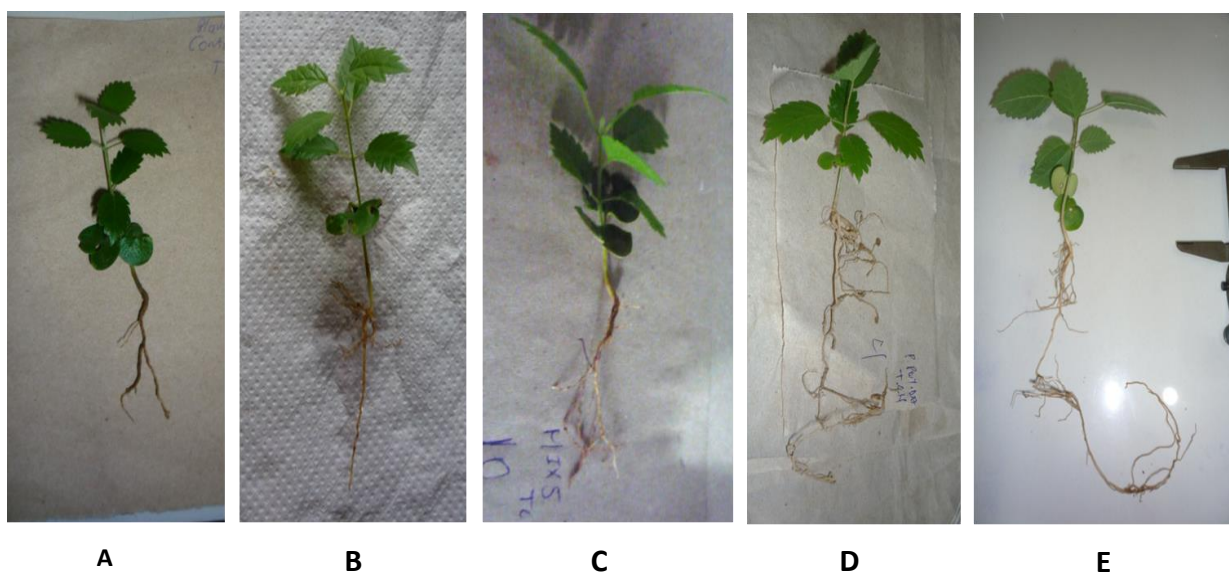
#### 4.5 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas

La experimentación consideró un grupo control y cuatro grupos experimentales inoculados en *T. chrysantha* y un control y siete grupos experimentales inoculados en *T. billbergii*. Se observó que las bacterias inoculadas promovieron el crecimiento de la raíz principal y raíces secundarias, longitud tallo y longitud total de *T. chrysantha* y *T. billbergii* en comparación con el grupo control, la evaluación se realizó a los 28 días posteriores a la inoculación.

En *T. chrysantha* la inoculación individual de *P. putida* y *B. amyloliquiefaciens* tuvo los mejores resultados en cuanto a una mayor longitud de raíces y parte aérea, así como la producción de raíces secundarias, a diferencia de cuando se inocularon en consorcio (Figura 11 y 12). Por el contrario, la longitud de tallo fue inferior, al igual que en consorcio 5.



**Figura 11:** Parámetros evaluados en *T. chrysantha* a los 28 días posterior a la inoculación, el consorcio 05 por *Serratia marcescens*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus sp* y *Pseudomonas putida*.



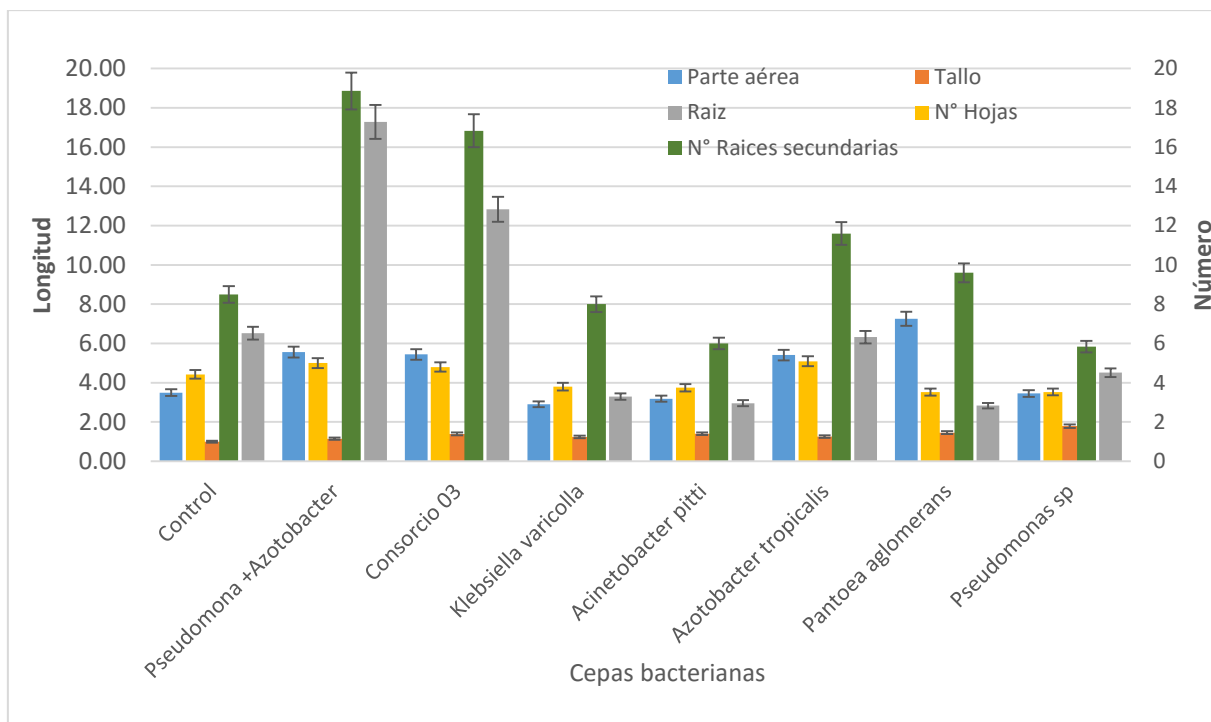
**Figura 12:** Plántulas de *T. chrysantha* evaluadas a los 28 días posterior a la inoculación. A) observamos el control con sulfato de magnesio 10 mM sin inoculo. B) *Pseudomonas putida* + *Bacillus amyloliquefaciens*. C) consorcio 05 que está formado por *Serratia marcescens*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus sp* y *Pseudomonas putida*. D) inoculación individual de *Pseudomonas putida*. E) inoculación individual de *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Tabla 9** crecimiento en condiciones microaerófilicas y en medio RC

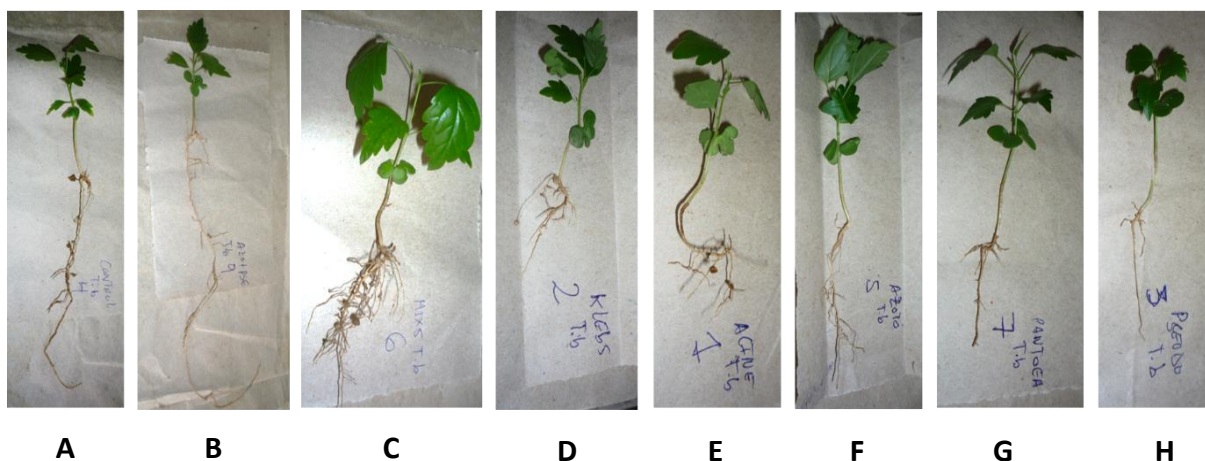
AISLADOS	NFB	Rojo Congo		
	profundidad mm	crecimiento	decoloración	sedimento
TCS 1 A ( <i>B. amyloliquefaciens</i> )	15	+	+	violeta
STC 6 B ( <i>Serratia marcescens</i> )	64	+	+	violeta
RD 12 B ( <i>Paenibacillus sp</i> )	48	+	+	violeta
RS 12 B ( <i>Enterobacter cloacae</i> )	5	+	+	violeta
RS 12 A ( <i>Pseudomonas putida</i> )	40	+	-	rojo
TCS 1 B ( <i>Exiguobacterium profundum</i> )	19	+	-	rojo
TCS 1 C ( <i>Lysinibacillus fusiformis</i> )	8	+	-	rojo
TCS 1 F ( <i>Bacillus cereus</i> )	18	+	+	violeta
TCS 1 E ( <i>Acinetobacter johnsonii</i> )	11	+	-	rojo
STB 12C ( <i>Klebsiella variicola</i> )	10	+	+	violeta
STB 12B ( <i>Enterobacter sp</i> )	37	+	+	violeta
STB 12D ( <i>Pseudomonas sp</i> )	15	+	-	rojo
STB 25A ( <i>Pseudomonas sp</i> )	16	+	-	rojo
STB 25C ( <i>Pantoea agglomerans</i> )	54	+	+	violeta
STB 25D ( <i>Acinetobacter pittii</i> )	41	+	-	rojo
STB 25E ( <i>Azotobacter tropicalis</i> )	12	+	-	rojo

+ = Crecimiento Positivo; - = Crecimiento Negativo; Rojo y Violeta= Coloración del cultivo bacteriano.

En *T. billbergii* la mayor longitud de raíz y mayor número de raíces secundarias fue alcanzado por el consorcio formado por *Pseudomonas sp* + *Azotobacter tropicalis*, seguido del consorcio 3, en ambos consorcios se obtuvo similar altura de parte aérea. La mayor longitud de parte aérea fue alcanzada por plántulas inoculadas con *Pantoea agglomerans*, pero con un bajo nivel de producción de raíces. (Figuras 13 y 14).



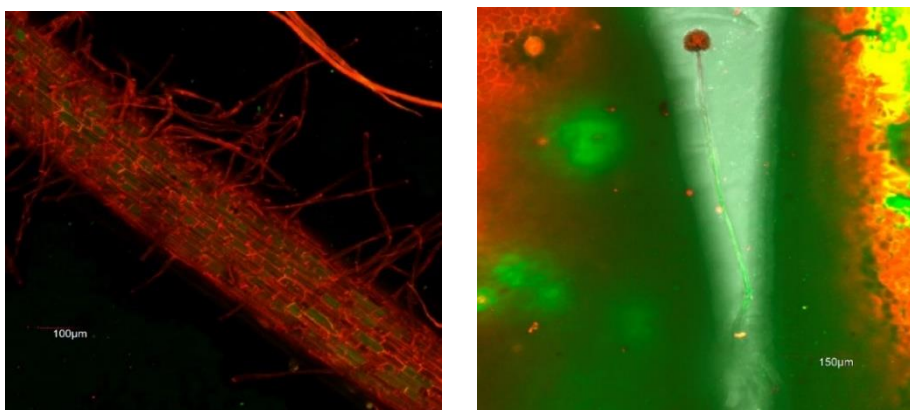
**Figura 13:** Diversos Parámetros evaluados en *T. billbergii* a los 28 días posterior a la inoculación, el consorcio 03 está formado por *Klebsiella variicola*, *Acinetobacter pittii*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas sp* y *Azotobacter tropicalis*



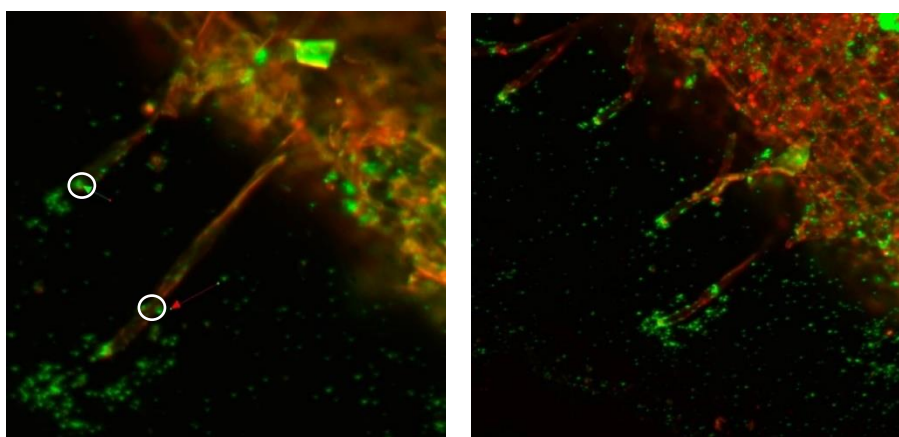
**Figura 14:** Plántulas de *T. billbergii* evaluadas a los 28 días posterior a la inoculación. A) observamos el control con sulfato de magnesio 10 mM sin inóculo. B) *Azotobacter tropicalis* + *Pseudomonas sp*. C) consorcio 03 que está formado por *Klebsiella variicola*, *Acinetobacter pittii*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas sp* y *Azotobacter tropicalis* D) Inoculación individual de *klebsiella variicola*. E) Inoculación individual de *Acinetobacter pittii*. F) Inoculación individual de *Azotobacter tropicalis*. G) Inoculación individual de *Pantoea agglomerans*. H) Inoculación individual de *Pseudomonas sp*.

#### 4.6 Observación de la colonización de hongos y bacterias en raíces de plántulas de *Tabebuia billbergii*, mediante microscopía confocal de barrido láser

*Aspergillus sp.* y *Pseudomonas sp.*, mostraron colonización de las raíces de las plántulas de *Tabebuia billbergii*, después de 28 días de inoculadas. Para el caso del hongo la colonización inicial se limita a la superficie (región epidérmica) de la raíz principal, extendiéndose posteriormente a los pelos radicales (Figura 15). En las muestras de raíces inoculadas con la bacteria *Pseudomonas sp.*, se puede observar que, la colonización se inicia en los pelos radicales de las raíces laterales y la región rizoplano de la plántula (Figura 16).



**Figura 15.** Microfotografía confocal de la colonización del hongo *Aspergillus sp* en la raíz principal de plántulas de *Tabebuia billbergii*, teñidas con Bromuro de Etidio, después de 28 días de inoculadas. A: colonización en la superficie epidérmica de la raíz principal. Barra: 100µm. B: Se muestran superposiciones de fluorescencia de luz (falso color verde). Barra: 150µm.



**Figura 16.** Microfotografía confocal de la colonización de *Pseudomonas sp* en los pelos radicales de las raíces laterales de plántulas de *Tabebuia billbergii*, teñidas con acridine orange, después de 28 días de inoculadas

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se identificaron 18 bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium*, *Lysinibacillus* y 13 hongos de los géneros *Fusarium*, *Saksenaea*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Latorua* y *Penicillium* asociados a la rizósfera y filósfera de *T. chrysantha*, así como 15 bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Pantoea* y *Acinetobacter* y 5 hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Podospora*, *Diaporthe*, *Curvularia* asociados a la rizósfera y filósfera de *T. billbergii* fueron identificados, Chauhan y colaboradores (2015) así como Gujral y colaboradores (2013). Identificaron en sus investigaciones estos géneros y especies de organismos endófitos, y mediante pruebas de inoculación en plántulas y encontraron importantes rasgos de promoción del crecimiento vegetal.

Las bacterias asociadas a la rizósfera de ambas especies arbóreas pertenecen a los fila Firmicutes y Proteobacteria, siendo los géneros comunes a ambas especies *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*. Asimismo los hongos asociados pertenecen a los fila Ascomycota y Zydomycota. Nuestros resultados coinciden con el reporte de Suman, Yadav y Verma (2016) quienes identificaron organismos endófitos que pertenecen a los filos Firmicutes y Proteobacteria como los mas abundantes, ellos tomaron muestras de raíz, hojas y suelo de la rizósfera de 17 cultivos agrícolas para su investigación.

En nuestro trabajo ambos tipos de organismos han sido identificados haciendo uso de herramientas moleculares tales como el análisis de la secuencia de espaciadores transcritos internos (ITS) en la identificación de hongos, lo cual fue empleado por Wang y colaboradores (2011). Así mismo se analizó la secuencia del gen ARNr16S para la identificación de bacterias (Naveed *et al.*, 2014).

El análisis metagenómico nos brinda un panorama de la estructura de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de cada especie arbórea en estudio durante el muestreo. *T. chrysantha* está dominada por representantes de los filos Proteobacteria y Actinobacteria, a nivel de género, los que presentan mayor abundancia relativa. Entre los géneros más abundantes tenemos *Chthoniobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*, estos resultados coinciden con los reportes de Acosta y colaboradores (2008) los cuales fueron identificados en suelos asociados a un sistema de rotación de cultivos de maíz, trigo y algodón. *T. billbergii* está dominada por representantes de los filos Firmicutes y Actinobacteria. A nivel de género, el que presenta mayor abundancia relativa es *Lysinibacillus* que incluye bacterias endofíticas promotoras del crecimiento, así como Kathiresan y colaboradores (2014) la reporta como productora de adenosine deaminase, asimismo Suman, Yadav y Verma (2016) y He y colaboradores (2014) reportan esta especie como solubilizadora de fosfatos.

*T. chrysantha* está dominada por representantes del filo Ascomycota. Entre los géneros con mayor abundancia relativa tenemos: *Emericella* un género con especies de microorganismos solubilizadores de fosfato según reportes de Sunder y colaboradores (2013), *Thelonectria*, es reportado como endófito asociado a raíces de manzano (M. Manicia *et al.*, 2013), *Microdochium*, ha sido catalogado como un hongo patógeno según reportes de Wen y colaboradores (2015). En *T. billbergii* la comunidad fúngica asociada a la rizósfera está dominada por los filos *Glomeromycota* y *Ascomycota*, siendo el género más abundante *Rhizophagus* que corresponde a una micorriza arbuscular que ha sido identificada estando asociada a la rizósfera de *T. chrysantha* en los bosques de Loja-ecuador según reportes de Schüßler, Krüger y Urgiles (2015). *Talaromyces* es un hongo endófito con la capacidad de causar la apoptosis celular, según reportes de Palem, Kuriakose y Jayabaskaran (2015).

La capacidad de los microorganismos de formar asociaciones sinérgicas es muy importante para poder interactuar en la naturaleza Muchos estudios reportan la inoculación individual y en consorcio de microorganismos nativos e introducidos, con efectos benéficos al hospedero objetivo a nivel de laboratorio (Zinniel *et al.*, 2002). Según reportes de Trabelsi y Mhamdi (2013) el efecto de monoinoculaciones

o consorcios de individuos introducidos puede alterar la estructura de las comunidades nativas presentes en el suelo, lo cual sería perjudicial. Igualmente, las comunidades nativas del suelo pueden competir con los microorganismos foráneos introducidos causando su desaparición y por ende pérdida del efecto benéfico.

En nuestro estudio se determinó la capacidad de asociación de los microorganismos, *Pseudomonas putida* y *Bacillus amyloliquefaciens* aislados de la rizósfera de *T. chrysantha*, como un consorcio de microorganismos compatibles. Kumar y colaboradores (2015) reportan la capacidad de asociación de estas dos cepas y realizan múltiples pruebas evaluando la producción de ácido indol acético, actividad ACC diaminasa, producción de sideróforos, resistencia a estrés por sequía en plántulas inoculadas y solubilización de fosfatos. Cabe destacar que muchos géneros de bacterias y hongos presentados en este estudio son reportados como microorganismos solubilizadores de fosfatos (Chatli, Beri y Sidhu, 2008). Otro consorcio estuvo integrado por dos cepas aislados de la rizósfera de *T. billbergii* que son *Azotobacter tropicalis* y *Pseudomonas sp* las cuales son compatibles. Kumar, Solanki y Sharma (2009) Inocularon las cepas de *Azotobacter* y *Pseudomonas* de manera individual y en consorcio en plántulas de *Withania somnifera* obteniendo muy buenos resultados.

El medio semisólido NFB es específico para bacterias que son capaces de crecer en condiciones microaerófilas y evaluar así su capacidad diazotrófica (Cassán *et al.*, 2015). Hossain y colaboradores (2015) reportan que se puede medir la capacidad de los microorganismos al observar la formación de una delgada película bajo la superficie del medio semisólido. En la presente investigación las cepas estudiadas formaron una película delgada en el medio semisólido. Gujral y colaboradores (2013) realizaron pruebas en *Serratia* y confirmaron la formación de la película y el movimiento de aerotaxis de las bacterias hacia la zona microaeróbica del medio semisólido NFB, igualmente reportan que la concentración de oxígeno juega un rol importante en la fisiología de los diazótrofos, además realizaron diversas pruebas de solubilización de fosfatos, producción de AIA, cianuro de hidrógeno, catalasa, colonización de raíces y promoción de crecimiento en plántulas de sorgo.

Andrade y colaboradores (2014) evaluaron la capacidad de cepas de los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* de crecer en el medio semisólido NFB, así mismo detectaron por análisis de PCR la presencia de la secuencia parcial del gen *nifH*, sus resultados muestran que aquellas cepas que son capaces de crecer en el medio NFB presentan la copia del gen, por el contrario, no todas las cepas que presentaban la copia del gen fueron capaces de crecer en el medio NFB. *Klebsiella* es una de las primeras cepas en las que se dilucidó la genética de la fijación de nitrógeno según reportes de Franche, Lindström y Elmerich (2009). Así como las cepas identificadas de los géneros *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Exiguobacterium* tienen la misma capacidad (Madhaiyan *et al.*, 2013) (Kumar, Prakash y Johri 2011) (Bal *et al.*, 2012) (Sharma y Roy 2015) (Reghuvaran, Jacob y Ravindranath 2012).

La capacidad de las bacterias de decolorar rojo congo ha sido reportada por diversos autores, Loncar y colaboradores (2014) reportan que la decoloración es debido a la acción de la actividad enzimática de Lacasas producidas por algunas cepas como *Bacillus amyloliquiefaciens*. Otros investigadores reportaron esta actividad en los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Jalandoni *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2014). La presencia de lacasas es importante pues es una enzima que interviene en la catálisis de muchos compuestos fenólicos tales como la lignina, de esta forma los microorganismos con esta capacidad contribuyen al reciclaje de la materia orgánica en los ecosistemas naturales (Feng *et al.*, 2015).

El mejor efecto de la inoculación se observa en una buena producción de raíces, sobre todo en plántulas inoculadas con las cepas *Pseudomonas putida* y *B. amyloliquiefaciens*, y el consorcio *Pseudomonas sp* + *Azotobacter tropicalis*. Son múltiples los trabajos que reportan la inoculación de estas cepas con beneficios positivos para la planta (Kumar, Solanki y Sharma 2009) (Naseri *et al.*, 2013) (Kumar *et al.*, 2015). La producción de raíces secundarias es muy importante porque determina la arquitectura de la planta, provee de anclaje, contribuye a la eficiencia en el uso de agua y facilita la extracción de micro y macronutrientes del suelo (Casimiro *et al.*, 2003).

Algunas rizobacterias Gram-negativas, como *Pseudomonas*, pueden conducir a la plasticidad del desarrollo en las raíces mediante la inhibición de la elongación de la

raíz primaria y promoviendo la formación de pelos radiculares y raíces laterales, modificando así la arquitectura de sistema radicular (Zamioudis *et al.*, 2013). Estos cambios morfológicos han sido atribuidos a la producción de auxinas bacterianas como el ácido indol acético (AIA). Sin embargo, existen mecanismos múltiples tales como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y actividad desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que junto con la biosíntesis de AIA, son responsables de promover el crecimiento (Spaepen y Vanderleyden 2013). *B. amyloliquiefaciens* es una cepa productora de auxinas, cuya estimulación promueve el crecimiento y ramificación radicular, conduciendo a un incremento en el área disponible para la colonización bacteriana (Talboys, *et al* 2014). Así mismo, en algunas cepas se ha detectado también la presencia del gen *nifH* que confiere la capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos (Andrade *et al* 2014).

La colonización del interior de la planta por bacterias, generalmente comienza con su establecimiento en la rizósfera. Después de la colonización de la rizósfera, las bacterias se adhieren a la superficie de la raíz (rizoplano). Un número de estudios mutacionales mostraron que la unión de células bacterianas a la raíz es un paso crucial para el establecimiento endofítico posterior (Gujral *et al.*, 2013).

Observaciones realizadas con imágenes de microscopía confocal en este estudio, muestran a *Aspergillus s.* y *Pseudomonas sp*, colonizando la superficie de la raíz de las plántulas de *T. billbergii.*, después de 28 días de inoculadas, mientras que, en las muestras de raíces inoculadas con la bacteria *Pseudomonas sp*, la colonización se inicia en los pelos radicales de las raíces laterales, extendiéndose luego a la raíz principal (Figuras 14 y 15). La superficie de la raíz y la rizósfera son importantes sumideros de carbono, por lo tanto, ricos en sustancias nutritivas que atraen a una gran diversidad de microorganismos, incluidos los fitopatógenos.

Observaciones de la raíz, después de la inoculación con bacterias etiquetadas con GFP en diferentes intervalos de tiempo muestran una fluorescencia significativa en la punta de la raíz y en la aparición de las raíces laterales, mencionando que estos son los sitios máximos de colonización (Gujral *et al.*, 2013).

## 6. CONCLUSIONES

Mediante el uso de técnicas moleculares ha sido posible la identificación de microorganismos asociados a la rizósfera y filósfera de especies forestales como *T. chrysantha* y *T. billbergii*, dos árboles maderables de los bosques estacionalmente secos de la región Tumbes que son extraídos de manera irracional por su preciada madera.

Los microorganismos aislados en diversos medios de cultivo corresponden a grupos de endófitos fúngicos y bacterianos importantes por contribuir a múltiples efectos benéficos para la planta en cuanto a salud y promoción del crecimiento vegetal.

Un análisis metagenómico, el cual es un enfoque independiente del cultivo de microorganismos, permitió conocer la estructura de la comunidad existente en la rizósfera de ambas especies.

Mediante la inoculación individual y de consorcios bacterianos en semillas desinfectadas de dichas especies arbóreas nativas fue posible optimizar el desarrollo radicular de plántulas a los 28 días posteriores a la inoculación respecto a controles.

## **7. RECOMENDACIONES.**

Se requiere ampliar las investigaciones, con el fin de caracterizar organismos eficientes que actúen en la promoción del crecimiento vegetal, como realizar pruebas de análisis en medios de cultivo específicos, determinación de la presencia de genes importantes en los organismos identificados, optimización de la eficiencia del consorcio microbiano formado antes de la inoculación, identificación de metabolitos producidos por microorganismos inmersos en el estímulo de crecimiento vegetal.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta Martinez, V. , S. Dowd, Y. Sun, y V. Allen. 2008. «Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use.» *Soil Biology & Biochemistry*, 2762–2770.
- Acuña, Oscar , y otros. 2006. *La Importancia de Los Microorganismos en la Calidad y Salud de Suelos Importance of Microorganisms For Soils Quality And Health*. Tesis, Costa Rica: Universidad de Costa Rica,.
- Aguirre Mendoza, Zhofre H. 2012. *Especies Forestales de los Bosque Secos del Ecuador. Guía Dendrológica para su Identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático*. Filandia. Quito, Ecuador: MAE/FAO,.
- Andrade, Leandro Fernandes , y otros. 2014. «Analysis of the Abilities of Endophytic Bacteria Associated with Banana Tree Roots to Promote Plant Growth.» *Journal of Microbiology*, 1-9.
- Anurag, A. Agrawal. 1996. "Seed germination of *Loxopterygium guasango*, a threatened tree of coastal Northwestern South America." *Tropical Ecology* 37, no. 2: 273-276.
- Bal, Amandeep , Richa Anand, Odile Berge, y Christopher P. Chanway. 2012. «Isolation and identification of diazotrophic bacteria from internal tissues of *Pinus contorta* and *Thuja plicata*.» *Canadian Journal Of Forest Research*, 807–813.
- Berendsen, Roeland L, Corne M.J. Pieterse, y Peter A.H.M. Bakker. 2012. «The rhizosphere microbiome and plant health.» *Trends in Plant Science*, 478-486.
- Berg, Gabriele , y Kornelia Smalla. 2009. «Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere.» *FEMS Microbiol Ecol*, 1–13.

- Berlec, Aleš. 2012. «Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics.» *Plant Science*, 96–102.
- Bulgarelli, Davide , Klaus Schlaeppi, Stijn Spaepen, Emiel Ver Loren van Themaat, y Paul Schulze-Lefert. 2013. «Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants.» *Plant Biology*, 807–838.
- Casimiro, Ilda , y otros. 2003. «Dissecting Arabidopsis lateral root development.» *TRENDS in Plant Science*, 165-171.
- Cassán, Fabricio Dario , y otros. 2015. «Protocol for the Quality Control of Azospirillum spp. Inoculants.» *Springer*, 487-499.
- Chatli , A S, V Beri , y B S Sidhu. 2008. «Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of Salix alba Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh.» *J Microbiol. Jun;48(2)*,: 267-273.
- Chauhan, Hemlata , D.J. Bagyaraja, G. Selvakumar, y S.P. Sundaram. 2015. «Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential.» *Applied Soil Ecology*,: 38–53.
- Che Piu, Hugo, y Mary Menton. 2013. *Contexto de REDD+ en Perú, Motores, actores e instituciones*. Indonesia: Documentos Ocasionales 90, CIFOR,.
- Egamberdieva, Dilfuza , Faina Kamilova, Shamil Validov, Laziza Gafurova, Zulfiya Kucharova, y Ben Lugtenberg. 2008. «High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan.» *Environmental Microbiology*, 1–9.
- FAO. 1987. "Conservación in situ en Perú: un Estudio de Caso." *Forest Genetic Resources Bulletin*,.

- Feng, Shuzhen , y otros. 2015. «Laccase activity is proportional to the abundance of bacterial laccase-like genes in soil from subtropical arable land.» *World J Microbiol Biotechnol*,: 1-7.
- Ferrera Cerrato, Ronald. 1993. *Manual de Agromicrobiología*. Mexico: Trillas,.
- Franche, Claudine , Kristina Lindström, y Claudine Elmerich. 2009. «Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants.» *Plant Soil*, 35–59.
- Franco Correa, Marcela. 2008. *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis Doctoral, Granada: Universidad de Granada,.
- García Garibay, Quintero Ramírez, y López Munguía. 2004. *Biotechnología Alimentaria*. Mexico: LIMUSA S.A.,.
- Gonzales , Adriana, Martha Cárdenas, y Silvia Restrepo. 2012. «Metagenómica: Revelación de comunidades microbianas.» *Apuntes científicos uniandinos*, 20-24.
- Gonzáles Gerrero, Manuel. 2005. *Estudio de los Mecanismos Implicados en la Homeostasis de Metales Pesados en el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares Glomus intraradices*. Tesis Doctoral, Granada: Universidad de Granada,.
- Gujral, Mandeep Singh, Parinita Agrawal, Madhukar Baburao Khetmalas, y Rachna Pandey. 2013. «Colonization and plant growth promotion of Sorghum seedlings by endorhizospheric *Serratia* sp.» *Acta Biologica Indica*, 343-352.
- Hacquard, Stephane , y Christopher W. Schadt. 2015. «Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the *Populus* microbiome.» *New Phytologist*, 1424–1430.

- He, Hui , Ting-Ting Qian, Wu-Jun Liu, Hong Jiang, y Han-Qing Yu. 2014. «Biological and chemical phosphorus solubilization from pyrolytical biochar in aqueous solution.» *Chemosphere*, 175–181.
- Hossain, Mozammel, Iffat Jahan, Salina Akter, Nazibur Rahman, y Badier Rahman. 2015. «Isolation and identification of Azospirillum isolates from different paddy fields of North Bengal.» *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 74-80.
- INRENA. 2002. *Manual Divulgativo de Especies Forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste*. Tumbes,.
- Jalandoni – Buan, Aileen C. , Anna Lynn A. Decena-Soliven, Ernelea P. Cao, Virginia L. Barraquio, y Wilfredo L. Barraquio. 2010. «Characterization and Identification of Congo Red Decolorizing Bacteria from Monocultures and Consortia.» *Philippine Journal of Science*, 71-78.
- Jiménez Avella, Diego Javier. 2007. *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA Ribosomal 16S*. Tesis, Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana,.
- Kathiresan, Kandasamy , Kandasamy Saravanakuma, Sunil Kumar Sahu, y Muthu Sivasankaran. 2014. «Adenosine deaminase production by an endophytic bacterium (Lysinibacillus sp.) from Avicennia marina.» *3 Biotech*, 235-239.
- Kaushansky, Kenneth. 2001. «Glossary of Molecular Biology Terminology.» *American Society of Hematology*, 522-841.
- Krüger, Manuela, Herbert Stockinger, Claudia Krüger, y Arthur Schüßler. 2009. «DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi.» *New Phytologist*, 212-223.
- Kumar, Ankit , Anil Prakash, y B.N. Johri. 2011. «Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem.» *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, 37-59.

- Kumar, Manoj , y otros. 2015. «Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.).» *Plant Signaling & Behavior*.
- Kumar, Vivek, Amar Singh Solanki, y Shivesh Sharma. 2009. «Yield and economics of *Withania somnifera* influenced by dual inoculation of *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas putida*.» *Turk J Biol*, 219-223.
- Leveau, Johan H. J., y Steven E. Lindow. 2001. «Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere.» *PNAS*, 3446–3453.
- Loncar, Nikola , Nikola Gligorijevi, Natasa Bozic, y Zoran Vujcic. 2014. «Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia.» *International Biodeterioration & Biodegradation*, 18-23.
- M. Manicia, L., y otros. 2013. «Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe.» *Applied Soil Ecology*, 207– 214.
- Madhaiyan, Munusamy, y otros. 2013. «Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species.» *Biotechnology for Biofuels*, 1-13.
- Mayz, Figueroa Juliana. 2004. «Fijación Biológica de Nitrógeno.» *Revista UDO Agrícola* 4, nº 1 1-20.
- Meyer, Katrin M, y Johan H. J. Leveau. 2012. «Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts.» *Oecologia*, 621–629.
- Michaela, Jaroslav Snajdr, y Petr Baldrian. 2015. «Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees.» *Soil Biology & Biochemistry*,: 1-13.

- More Cahuapaza, Alexander, Paolo Villegas Ogoña, y Mónica Alzamora Torres. 2014. *Piura, Áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad*. Lima: Naturaleza & Cultura Internacional - PROFONANPE.
- Naseri, Rahim , Sadegh Azadi, Mohammad Javad Rahimi, Abbas Maleki, y Amir Mirzaei. 2013. «Effects of inoculation with *Azotobacter Chroococcum* and *Pseudomonas putida* on yield and some of the important agronomic traits in barley (*Hordeum vulgar L.*)» *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 1602-1610.
- Nasto, Megan K. , Silvia Alvarez-Clare, Ylva Lekberg, Benjamin W. Sullivan, Alan R. Townsend, y Cory C. Cleveland. 2014. «Interactions among nitrogen fixation and soil phosphorus acquisition strategies in lowland tropical rain forests.» *Ecology Letters*, 1-8.
- Naveed, Muhammad, y otros. 2014. «Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing.» *Brazilian Journal of Microbiology*,: 985-993.
- Ng, I-Son , Tingting Chen, Rong Lin, Xia Zhang, Chao Ni, y Dongzhe Sun. 2014. «Decolorization of textile azo dye and Congo red by an isolated strain of the dissimilatory manganese-reducing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01.» *ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY*, 2297–2308.
- Palem, Padmini P. C, Gini C Kuriakose, y Chelliah Jayabaskaran. 2015. «An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*, Isolated from *Catharanthus roseus*, Produces Vincristine and Vinblastine, Which Induce Apoptotic Cell Death.» *plos one*, 1-22.
- Parsa, Soroush , Viviana Ortiz, y Fernando E. Vega. 2013. «Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control.» *Journal of Visualized Experiments*, 1-5.
- Poole, Elizabeth J. , Gary D. Bending, John M. Whipps, y David J. Read. 2001. «Bacteria associated with *Pinus sylvestris*–*Lactarius rufus*

ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro.» *New Phytologist*, 743–751.

- Rastogi, Gurdeep , Gitta L. Coaker, y Johan H.J. Leveau. 2013. «New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches.» *Federation of European Microbiological Societies*, 1-10.
- Reghuvaran, Abesh , Kala K. Jacob, y Anita Das Ravindranath. 2012. «Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from raw coir pith.» *African Journal of Biotechnology*, 7063-7071.
- Reinhold-Hurek, Barbara , y Thomas Hurek. 2011. «Living inside plants: bacterial endophytes.» *Plant Biology*, 435–443.
- Rodriguez, R. J. , J. F. White Jr, A. E. Arnold, y R. S. Redman. 2009. «Fungal endophytes: diversity and functional roles.» *New Phytologist*, 1-17.
- RONDON, MICHELLE R. , y otros. 2000. «Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2541–2547.
- Sánchez Frenandez, Rosa Elvira, y otros. 2013. «Hongos Endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos con Utilidad en Agricultura y Medicina.» *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 32-146.
- Santi, Carole , Didier Bogusz, y Claudine Franche. 2013. «Biological nitrogen fixation in non-legume plants.» *Annals of Botany*, 743–767.
- Schlaeppi, Klaus , y Davide Bulgarelli. 2015. «The Plant Microbiome at Work.» *Molecular Plant-microbe interactions*, 212-217.
- Schüßler, Arthur , Claudia Krüger, y Narcisa Urgiles. 2015. «Phylogenetically diverse AM fungi from Ecuador strongly improve seedling growth of native potential crop trees.» *Mycorrhiza*, 1-9.

- Shakya, Migun , y otros. 2013. «A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees.» *PLOS ONE*, 1-12.
- Sharma, Shilpa , y Shikha Roy. 2015. «Isolation and Identification of a novel Endophyte from a plant *Amaranthus spinosus*.» *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 785-798.
- Sorce , C, A Gioannelli, L Sebastiani, y T Anfodillo. 2013. «Hormonal Signals Involved in the Regulation of Cambial Activity, Xylogenesis and Vessel Patterning Intrees.» *Plant cell Rep.*: 885-898.
- Spaepen, Stijn , y Jos Vanderleyden. 2013. «Auxin and Plant-Microbe Interactions.» *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-14.
- Suman, Archana, Ajar Nath Yadav, y Priyanka Verma. 2016. «Endophytic Microbes in Crops: Diversity and Benefi cial Impact for Sustainable Agriculture.» *Division of Microbiology*.
- Sunder Bhattacharya, Satya , Soma Barman, Ranjan Ghosh, Raj Kumar Duary, Linee Goswami, y Narayan C Mandal. 2013. «Phosphate solubilizing ability of *Emericella nidulans* strain V1 isolated from vermicompost.» *Indian Journal of Experimental Biology*, 840-848.
- Talboys, Peter J , Darren W Owen, John R Healey, Paul JA Withers, y David L Jones. 2014. «Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivium*.» *BMC Plant Biology*, 1-9.
- Taylor, Gail. 2002. «*Populus*: Arabidopsis for Forestry. Do We Need a Model Tree.» *Annals of Botany*, 681-689.
- Trabelsi, Darine , y Ridha Mhamdi. 2013. «Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review.» *BioMed Research International*, 1-11.

- Urgiles, Narcisa , y otros. 2009. «Application of mycorrhizal roots improves growth of tropical tree seedlings in the nursery: a step towards reforestation with native species in the Andes of Ecuador.» *New Forests*, 229-239.
- Vorholt, Julia A. 2012. «Microbial life in the phyllosphere.» *Nature*, 828-840.
- Wang, Peng , y otros. 2011. «Diversity of Microorganisms Isolated from the Soil Sample surround *Chroogomphus rutilus* in the Beijing Region.» *International Journal of Biological Sciences*, 209-220.
- Wen, Zhaohui , Duan T, Christensen, M. , y Nan, Z. 2015. «*Microdochium tabacinum*, Confirmed as a Pathogen of Alfalfa in Gansu Province, China.» *Plant Disease*, 87-92.
- Zamioudis, Christos , Parthena Mastranesti, Pankaj Dhonukshe, Ikram Blilou, y Corné M.J. Pieterse. 2013. «Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria.» *Plant Physiology*, 304–318.
- Zinniel, Denise K, y otros. 2002. «Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2198–2208.

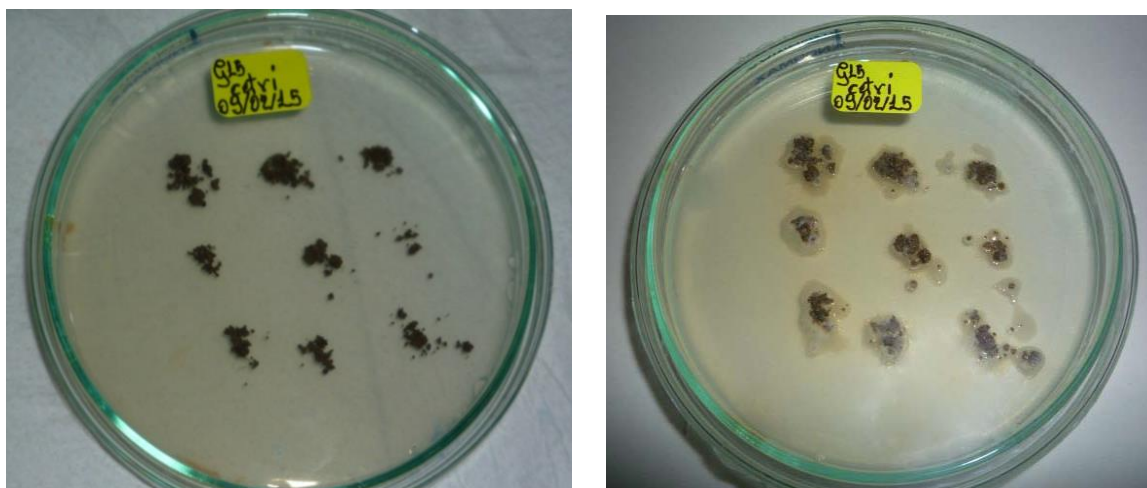
## 9. ANEXOS



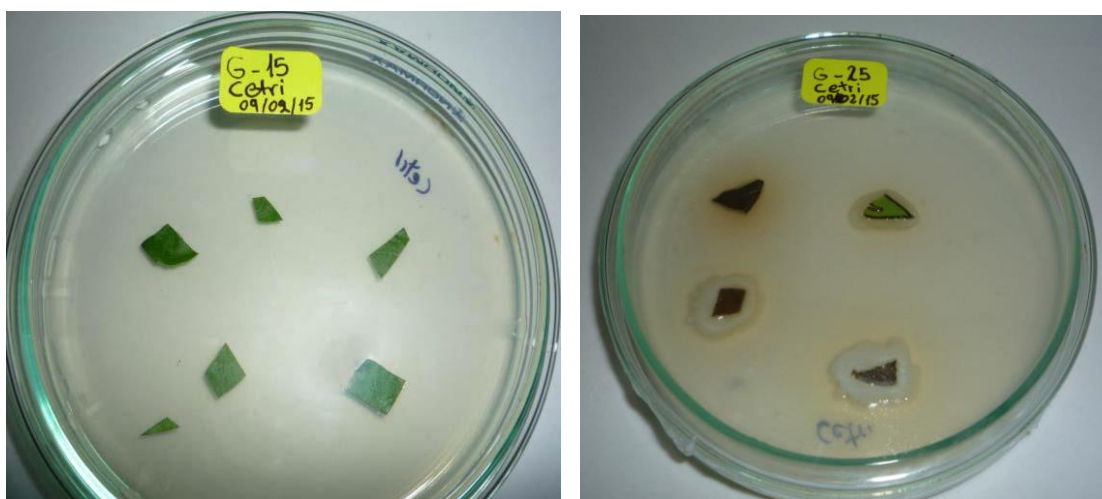
Arboles de *Tabebuia chrysantha* (izquierda) y *t. billbergii* (derecha), seleccionados para toma de muestras de rizósfera, raíz y filósfera. Sector el avispero, zona de amortiguamiento del parque nacional cerros de amotape.



Toma de muestras de rizósfera y raíz de *t. chrysantha* (izquierda), colección de hojas de *t. billbergii* (derecha). Sector angostura, zona de amortiguamiento del parque nacional cerros de amotape.



Siembra en gránulos de suelo de la rizosfera de árboles de *Tabebuia* e medio de cultivo TSA. Derecha, crecimiento de bacterias alrededor de los gránulos de suelo.



Siembra de hojas desinfectadas en medio de cultivo TSA, para aislamiento de microorganismos, derecha se observa el crecimiento de bacterias alrededor de las muestras de hojas.



Trozos de raíz desinfectados sembrados en medio de cultivo PDA, a la derecha se observa el crecimiento de hongos alrededor de las muestras de raíz



Selección y secado de Semillas de *t. chrysantha* (lado izquierda) y *t. billbergii* (lado derecha) para ser almacenadas para los trabajos de inoculación posteriores. Foto derecha, proceso de desinfección de semillas previo a inoculación con microorganismos.



Evaluación de Plántulas de *t. chrysantha* inoculadas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, izquierda planta control sin inoculo. Derecha, plántula inoculada con *Bacillus amyloliquefaciens*, véase la longitud y abundante producción de raíces secundarias de la plántula inoculada con la bacteria.



Kit power soil empleado para el Análisis metagenómico en suelo de la rizósfera de *t. chrysantha* y *t. billbergii*

## **DEDICATORIA**

*A mis padres María y Gabriel, por su infinita paciencia y amor, a quienes dedico cada logro mío, pues es el resultado de su esfuerzo de educarme y dedicarme cada día de su vida en mi preparación, a mis hermanas por alegrarme en los pocos momentos que compartimos.*

1 497.2, 64,55.3,5 95.695.93,1 45 95.2,8,91,1397.5.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a la Universidad Nacional de Tumbes por la oportunidad de participar en el programa de maestría en biotecnología molecular, bajo la dirección de los docentes Auberto Hidalgo y Enedia Vieyra, al equipo de concytec que con su esfuerzo hacen posible la investigación en el Perú mediante este tipo de programas.*

*Así mismo al equipo de la oficina de investigación, que nos apoyaron con todo lo necesario para poder ejecutar este proyecto bajo los fondos de canon de la Universidad Nacional de Tumbes.*

*Un especial agradecimiento al Dr Eric Mialhe, Dr. Virna Cedeño, Dr. Emmerik motte y Roxana Rodríguez, así como a todo el equipo de trabajo de Incabiotec por su apoyo y contribución con mi preparación.*

*Al Dr. Ramón García, Lic. Liliana Solís por su apoyo en el trabajo realizado durante la ejecución del proyecto.*

*Al equipo forestal de pasantes de ecuador Vladimir Lajones y Luis Rodríguez, a mi amigo y tesista David Villar, por su paciencia para ayudarme y aprender, y asimismo contribuyeron a la realización de muchos componentes de esta investigación.*

*A mis amigos por su apoyo constante cuando sentía que me faltaba fuerza, siempre estaban allí para darme ánimo.*