



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

**INFLUENCIA DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Cinchona*  
*officinalis*. LAMBAYEQUE – PERÚ. 2019.**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**PRESENTADA POR :**

Br. QUESQUÉN ESQUEN, NUVIA JAQUELINE

**ASESOR:**

Dr. CÉSAR ESTELA CAMPOS

**LAMBAYEQUE – PERU**

**2020**

**INFLUENCIA DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Cinchona  
officinalis*. LAMBAYEQUE – PERÚ. 2019.**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**PRESENTADA POR :**

Br. QUESQUÉN ESQUEN, NUVIA JAQUELINE

**APROBADA POR:**

Dr. Guillermo Delgado Paredes

**PRESIDENTE**

Dra. Olga Francia Arana

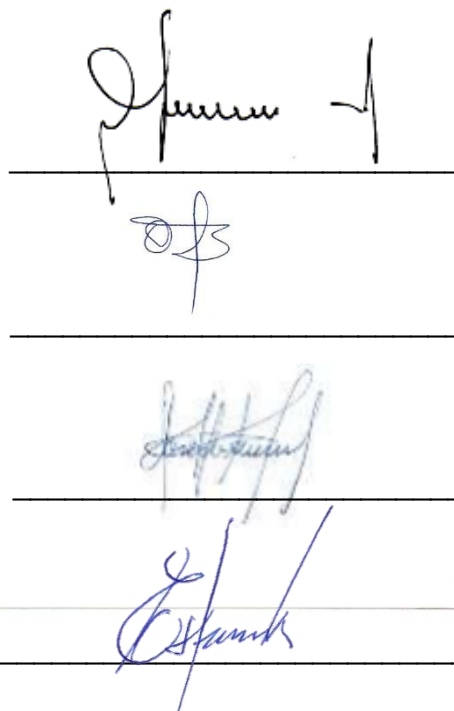
**SECRETARIA**

M.Sc. Josefa Ecurra Puicón

**VOCAL**

Dr. César Estela Campos

**PATROCINADOR**



LAMBAYEQUE, PERU

2020

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUCCIÓN .....	10
I. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
II. BASE TEÓRICA.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1 MATERIALES .....	24
3.1.2 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	25
3.2 Toma de muestra .....	26
3.3 Método para reconocer la viabilidad de semillas .....	26
3.4 Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) .....	27
3.5 Identificación del género bacteriano <i>Pseudomonas</i> .....	27
3.6 Selección de semillas para el crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>C. officinalis</i> .....	27
3.7 Selección de bacterias promotoras del crecimiento de <i>C. officinalis</i> .....	28
3.8 Evaluación del efecto de bacterias promotoras del crecimiento en la altura de plántulas de <i>C. officinalis</i> .....	29
3.9 Tratamiento estadístico.....	29
IV. RESULTADOS .....	30
4.1 Caracterización microscópica de bacterias aisladas del suelo de muestreo.....	30
4.2 Aislamiento y selección de cepas con capacidad promotora del crecimiento .....	31
vegetal PGPR <i>in vitro</i> .....	31
4.3 Determinación de material vegetal de <i>C. officinalis</i> .....	43
4.4 Inoculación de cepas a plantas aclimatadas de <i>C. officinalis</i> .....	47
4.5 Determinación de la mejor cepa PGPR en las plántulas de <i>C. officinalis</i> .....	47
4.6 Identificación de la cepa A21.....	53
V.DISUSIÓN.....	56
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII. RECOMENDACIONES.....	63
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
ANEXOS.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de 100 µg/ml de AIA y 44.5 mL de caldo nutritivo diluidos hasta 1 mL. .....	29
<b>Tabla 2.</b> Resultados de la absorbancia a 530 nm de la segunda cuantificación de las concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/mL.....	31
<b>Tabla 3.</b> Soluciones para curva patrón para cuantificación de AIA por las cepas bacterianas. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la absorbancia a 530 nm de la segunda cuantificación de las concentraciones.....	32
<b>Tabla 5.</b> Resultados del análisis de 29 cepas productoras de AIA .....	33
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis de las 34 cepas PGPR con capacidad solubilizadora de fosfato extraídas de suelo rizosférico de <i>C. officinalis</i> . ....	37
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis de 53 cepas pgpr en medio de Burk's y Jensen con capacidad fijadora de nitrógeno obtenidas de la rizosfera de <i>C. officinalis</i> . ....	40
<b>Tabla 8.</b> Adición de ácido giberélico (AG3) para la inducción de germinación de semillas de <i>C.</i> <i>officinalis</i> .....	44
<b>Tabla 9.</b> Concentración de AIB en el brotamiento y AIA en enraizamiento de plántulas de <i>C.</i> <i>officinalis</i> .....	45
<b>Tabla 10.</b> Altura de plántulas de <i>c. officinalis</i> en prueba de solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de AIA. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica de la región de colecta de <i>Cinchona officinalis</i> . <b>a.</b> Coordenadas del muestreo y <b>b.</b> Mapa indicando el área donde se colectaron las muestras vegetales.....	24
<b>Figura 2.</b> Selección de colonias bacterianas rizosféricas de <i>C. officinalis</i> , desarrolladas en agar nutritivo, destacando las colonias A17, A21, C2, C4 y C22.....	30
<b>Figura 3.</b> Selección y codificación de las cepas bacterianas en agar nutritivo, a partir del aislamiento de suelo rizosférico de <i>C. officinalis</i> . <b>a)</b> cepa A17; <b>b)</b> cepa A21 y C2 y <b>c)</b> cepa C4 y C22. ....	30
<b>Figura 4.</b> Curva estándar para cuantificación de AIA según concentraciones de 0-100 µg/ml.....	33
<b>Figura 5.</b> Coloración observada en la cuantificación de índoles producidos por las 29 cepas aisladas del suelo rizosférico de <i>C. officinalis</i> , destacando las cepas A21, A17, C2, C4 y C22 y el control, con los mayores valores de producción de AIA.....	35
<b>Figura 6.</b> Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas productoras de AIA (ug) y su biomasa (mg) de 29 cepas productoras de AIA.....	36
<b>Figura 7.</b> Siembra en botón de las cepas bacterianas, destacando a las mejores cepas A3, A4, A5, A21 y C2 con halos de solubilización de fosfato.....	39
<b>Figura 8.</b> Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas en escala de 0 a 4 de las 34 cepas según su capacidad solubilizadora de fosfatos durante los 7 días de incubación.....	39
<b>Figura 9.</b> <b>a)</b> Observación de las cepas A3, A4, A21, B8 y C2 con los mayores valores de fijación de nitrógeno en medio Jensen; <b>b)</b> cepas A3, A4, A21, B8 y C2 con los mayores valores de fijación de nitrógeno en medio Burk's.....	42
<b>Figura 10.</b> Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas fijadoras de nitrógeno en medio Burk's en escala de 0 a 3 y en medio Jensen en escala de 3 a 5 según su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico durante los 3 días de incubación.....	33
<b>Figura 11.</b> Observación microscópica (40x) del tamaño de las semillas de <i>C. officinalis</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> Observación de semillas de <i>C. officinalis</i> introducidas en medio de cultivo MS, resaltando los parámetros de desinfección y tiempo .....	44
<b>Figura 13.</b> Observación de los primeros plántulas germinados en medio MS a partir de las semillas <i>C. officinalis</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>C. officinalis</i> <b>a)</b> Crecimiento de plántulas de <i>C. officinalis</i> después de 30 días; <b>b)</b> Crecimiento de plántulas de <i>C. officinalis</i> después de haber sido sometidas a AIA y AIB .....	46
<b>Figura 15.</b> Observación de plántulas de <i>C. officinalis</i> durante de aclimatación.....	46
<b>Figura 16.</b> Inoculación de las mejores cepas teniendo en cuenta su capacidad productora de AIA, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato sobre plántulas de <i>C. officinalis</i> , resaltando a las cepas A17 y C14. ....	47
<b>Figura 17.</b> Medición de plántulas (cm) de <i>C. officinalis</i> inoculadas con la cepa A17 según el tipo de pruebas. <b>a)</b> Solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA.....	49
<b>Figura 18.</b> Medición de plántulas (cm) de <i>C. officinalis</i> inoculadas con la cepa A21 según el tipo de pruebas. <b>a)</b> Solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA .....	49
<b>Figura 19.</b> Medición de plántulas (cm) de <i>C. officinalis</i> inoculadas con la cepa C2 según el tipo de pruebas. <b>a)</b> Solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA.....	50

<b>Figura 20.</b> Medición de plántulas (cm) de <i>C. officinalis</i> inoculadas con la cepa C4 según el tipo de pruebas. <b>a)</b> Solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA .....	50
<b>Figura 21.</b> Medición de plántulas (cm) de <i>C. officinalis</i> inoculadas con la cepa C22, según el tipo de pruebas. <b>a)</b> Solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA....	51
<b>Figura 22.</b> Medición de plántulas (cm) del testigo de <i>C. officinalis</i> inoculadas con agua destilada, según el tipo de pruebas realizadas. <b>a)</b> solubilización de fosfato; <b>b)</b> Fijación de nitrógeno y <b>c)</b> Producción de AIA .....	51
<b>Figura 23.</b> Observación microscópica (100x) de bacilos con disposición de forma individual y en parejas, mediante tinción de Gram del género <i>Pseudomonas</i> .....	53
<b>Figura 24.</b> Crecimiento en medio agar Cetrimide para la identificación del género <i>Pseudomonas</i> , observándose el color amarillo verdoso característico .....	53
<b>Figura 25.</b> Prueba de oxidasa positiva lado derecho, para la cepa A21 en la identificación de <i>Pseudomonas</i> , al lado izquierdo cepa C2 como control .....	54
<b>Figura 26.</b> Pruebas para identificación de <i>Pseudomonas</i> con respecto a la cepa A21: <b>a)</b> Prueba de Citrato (+), <b>b)</b> LIA (-), <b>c)</b> TSI (k/k). .....	54
<b>Figura 27.</b> Agar gelatina, observándose una solución líquida considerándola como positiva (+), en la cepa A21 para la identificación de <i>Pseudomonas</i> .....	55
<b>Figura 28.</b> Prueba de hidrólisis del almidón (+), correspondiente a la cepa A21 para la identificación de <i>Pseudomonas</i> .....	55

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo de investigación, especialmente a mi asesor el Dr. César Estela Campos y coasesor el Mgs. Aling Figueroa por su paciencia y orientaciones brindadas desde la presentación del proyecto.

A Lic. Gabriel por su apoyo en la parte microbiológica de la tesis.

A mi asistente de campo, mi madre por acompañarme a los muestreos de material en Kañaris, por estar incondicionalmente a mi lado en mis momentos de quiebre y de triunfos.

A mi padre Raúl Quesquén, por su apoyo y enseñanzas.

A mis hermanos Jesús y Erwing, por su soporte moral, material y espiritual día a día.

A Edwin José, por su apoyo y tesón incondicional desde siempre. A ustedes, mi sincera gratitud y amor por estar siempre presentes en toda meta trazada y por su comprensión en todo momento.

## RESUMEN

En el suelo rizosférico de *Cinchona officinalis* “cinchona” se aisló *Pseudomonas sp.* para determinar su potencial como promotora de crecimiento en la aclimatación de plántulas *in vitro* de *C. officinalis*. A partir del muestreo de suelo *in situ* de la localidad de Cañarís (17M0693104 UTM 9333432) se aislaron cepas bacterianas en caldo nutritivo, después de 24 horas de incubación se realizó el aislamiento en medio sólido de agar nutritivo, utilizando el método de agotamiento y estría. Luego de un periodo de incubación de 24 horas, se procedió a la evaluación de 73 cepas, para la producción de ácido indol acético (AIA), solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno atmosférico. Para la prueba de germinación se utilizó 180 semillas con un 14.4% de germinación. De los cuales se emplearon 25 plántulas *in vitro* para la evaluación del efecto de las mejores cepas aisladas. Las semillas previa desinfección fueron cultivadas en medio MS suplementado, adicionándole AG<sub>3</sub> a 0.5 mg/L a temperatura de 23±2°C y un fotoperiodo de 16-8 horas luz-oscuridad. Después de 75 días se seleccionaron los ápices caulinares y segmentos nodales de las plántulas germinadas y se sembraron en medio de cultivo suplementado, sacarosa al 2%, agar 0.6 % y AG<sub>3</sub> a 0.5 mg/L. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.6±0.2 con NaOH 1N. Se sembró 5 explantes/ frasco, a temperatura de 23±2 °C y un fotoperiodo de 16-8 horas luz-oscuridad. Las hormonas empleadas en el brotamiento y enraizamiento *in vitro* de *C. officinalis* fueron AIA y AIB a una concentración de 1 y 2 mg/L respectivamente. A las cinco cepas (A17, A21, C2, C4 y C22) con los mayores valores de producción de ácido indol acético; a las cinco cepas (A3, A4, A21, B8 y C14) con los mayores valores de fijación de nitrógeno y finalmente a las cinco cepas (A3, A4, A5, A21 y C2) con los mayores valores de solubilización de fosfato se evaluó el efecto en el crecimiento de las plántulas *in vitro* de *C. officinalis*, resultando la cepa A21 con mayor índice de efectividad en longitud 31.3 cm .

Palabras clave: *C. officinalis* , *Pseudomonas sp* , bacterias promotoras de crecimiento, plántulas *in vitro* .

## ABSTRACT

In the rhizosphere soil of *Cinchona officinalis* "Cinchona" strains of *Pseudomonas sp.* to determine their potential as growth promoters in the acclimatization of *C. officinalis* seedlings in vitro. Bacterial strains were isolated in nutrient broth from the *in situ* soil sampling of the town of Cañaris 17M0693104 UTM 9333432, after 24 hours of incubation the isolation was carried out on solid nutrient agar medium, using the depletion and stria method. After a 24-hour incubation period, 73 strains were evaluated for indole acetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, and atmospheric nitrogen fixation. For the germination test, 180 seeds with 14.4% germination were used. Of which 25 *in vitro* seedlings were used to evaluate the effect of the best isolated strains. The seeds after disinfection were grown in supplemented MS medium, adding AG<sub>3</sub> at 0.5 mg / L at a temperature of  $23 \pm 2$  ° C and a photoperiod of 16-8 hours light-dark. After 75 days, the stem tips and nodal segments of the germinated seedlings were selected and sown in a supplemented culture medium, 2% sucrose, 0.6% agar and AG<sub>3</sub> at 0.5 mg / L. The pH of the culture media was adjusted to  $5.6 \pm 0.2$  with NaOH 1N. 5 explants / flask were seeded, at a temperature of  $23 \pm 2$  ° C and a photoperiod of 16-8 hours light-dark. The hormones used in the in vitro sprouting and rooting of *C. officinalis* were IAA and IBA (indole butyric acid) at a concentration of 1 and 2 mg / L respectively. The five strains (A17, A21, C2, C4 and C22) with the highest indole acetic acid production values; to the five strains (A3, A4, A21, B8 and C14) with the highest values of nitrogen fixation and finally to the five strains (A3, A4, A5, A21 and C2) with the highest values of phosphate solubilization was evaluated the effect on the growth of *C. officinalis* seedlings in vitro, resulting in the A21 strain with the highest effectiveness index in length 31.3 cm.

Key words: *C. officinalis*, *Pseudomonas sp.*, growth promoting bacteria, *in vitro* seedlings.

## INTRODUCCIÓN

En el suelo de diferentes especies silvestres o cultivadas se encuentra una gran diversidad microbiana, sobresaliendo dentro del grupo bacteriano, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR), por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Salvador et al.,2019;Siles et al.,2014) . Éstos son responsables de transformaciones biológicas y lo hacen aportando nitrógeno, fósforo y fitohormonas (Moreno et al., 2018; Flores et al.,2012; Vilchez,2017); Eleonora & Pineda,2014) que son de gran importancia para el crecimiento y establecimiento de comunidades vegetales (Narovis y Hernández,2007; Benavides y Hermida,2008;Campos,2018).

Por otra parte, *C. officinalis* conocida como cinchona ,quina, cascarilla ( Villar et al., 2018; Zevallos,1989 ) es una especie emblemática, con gran valor forestal y medicinal,con mayor contenido de quinina ,entre otros contenidos metabólicos como la quinidina,cinchonidina y cinchonina que actúan controlando el paludismo o malaria (Gonzáles,2016, Villar et al., 2018). Esta especie se encuentra distribuida en los bosques húmedos o montanos y en peligro de extinción,por amenazas de la actividad antropogénica y por la dificultad en su propagación (Zevallos,1989; Gonzáles,2016; Villar et al., 201;Mejia,2014).

La investigación consistió en muestrear suelo cercano a la rizósfera de las plantas de *C. officinalis* y coleccionar semillas de los árboles ubicados en el distrito de Cañaris, región Lambayeque. Se aisló cinco cepas seleccionadas por su eficiencia en el crecimiento en longitud de los plantines *in vitro* acondicionados en invernadero durante su evaluación de 30 días. Se aisló el género *Pseudomonas*, bacteria de importancia para el sector agrícola; como biofertilizante en diferentes cultivos, asegurando así las nuevas prácticas agrícolas dentro de una agricultura sostenible (Figueroa,2004 ;Narovis y Hernández ,2007; Flores et al.,2018).

Se utilizaron semillas de *C. officinalis*, siendo cultivadas en medio MS, utilizando la técnica de micropropagación clonal *in vitro* ( Lima et al.,2018; Ccaico,2017;Gonzáles,2016;Moreno,2016) ) que permitió obtener un banco de germoplasma con las mismas características genéticas y morfológicas de *C. officinalis*.

Por lo que se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es la influencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la altura de los plántulas aclimatados de *C. officinalis*?. La hipótesis planteada fue: Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de producir ácido indolacético, fijar nitrógeno y solubilizar fosfato estimulando el crecimiento en longitud durante la aclimatación de plántulas de *C. officinalis*.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar la influencia de bacterias promotoras del crecimiento de *C. officinalis*. Los objetivos específicos fueron: Seleccionar las cinco cepas con mayor producción de ácido indolacético; mayor producción de solubilización de fosfato y mayor fijación de nitrógeno; evaluar el índice de efectividad (%) de las cinco cepas promotoras del crecimiento vegetal en la altura de plántulas de *C. officinalis* ,a los 30 días; identificar el género bacteriano que resulte más eficiente en el crecimiento en longitud de *C. officinalis* y finalmente optimizar el proceso de aclimatación de *C. officinalis* en condiciones de invernadero.

## I. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

### A. A nivel de cultivo *in vitro*:

**Dávila & Marcelo (2019)**, identificaron especies de *Cinchona* con problemas de germinación y regeneración es por ello que resaltan la utilización de técnicas biotecnológicas como es el cultivo *in vitro* o micropropagación constituyendo una alternativa de reproducción viable. Además, recomiendan iniciar el cultivo con la selección de árboles en buen estado fitosanitario y el uso de semillas para la propagación de éstas especies forestales nativas; resaltando el uso de fuentes semilleras de *C. officinalis* teniendo en cuenta condiciones específicas para su crecimiento y desarrollo como es el contenido de humedad y el período de almacenamiento; las semillas de *C. officinalis* presentan humedad menor al 40%, siendo denominadas semillas ortodoxas y teniendo en cuenta el período de almacenamiento se encuentran dentro de las semillas recalcitrantes.

**Mejia (2014)**, enfatizó la característica ortodoxas de las semillas de *C. officinalis* es decir pierden humedad en el tiempo, además disminuye su porcentaje de viabilidad por cada tiempo de conservación, según corresponda la especie y según los factores externos de temperatura. Mostró en su investigación la disminución de viabilidad de las semillas de *C. officinalis* a partir del día 15, demostrando la viabilidad de 5% en un periodo de 32 meses y la germinación de 50% durante 20 meses; con esto llegó a demostrar que la germinación en laboratorio se debe realizar antes del día 26 de haber realizado el muestreo, observándose en sus resultados 27.2% de germinación. Además, señaló una temperatura óptima constante de 25°C o un intervalo de 30°C – 20°C con 8h/luz – 16h/oscuridad. Estos datos evidencian que la presencia de luz favorece la germinación debido a la acción reguladora del fitocromo.

**Espinosa y Ríos (2014)**, utilizaron medio nutricional Gamborg (B5) al 50%, agregándole 7g/L agar y 10g/L de sacarosa para cultivos de *C. officinalis* y *C. pubescens*. Ajustándolo a un pH de  $5.8 \pm 0.02$ , con una combinación de BAP 0.5 mg/L y ANA 0.1 mg/L, manteniendo en condiciones de 23°C con fotoperiodo de 12h/luz - 12h/oscuridad, observándose un mayor número de producción de brotes en el material micropropagado a diferencia del material proveniente de semilla.

**Moreno (2016)**, propagó *C. officinalis* de manera asexual por estacas y por acodos siendo necesario en su investigación el uso de fertilizantes químicos como Hormonagro 1 para estimular el crecimiento radicular y el enraizador H.V para la activación del crecimiento de sus raíces; sin embargo, no logró la estimulación, mientras que en la propagación de manera sexual utilizaron semillas maduras recolectadas previas a la dehiscencia del fruto, obteniendo una alta germinación (83.3%) en sustrato turba.

**González (2016)**, reportó el éxito de germinación *in vitro* a partir de semillas de *C. officinalis* en un 27% en 40 días, almacenadas bajo dos condiciones, el primero durante un periodo de tres meses y el segundo a bajas temperaturas; trabajó en la micropropagación a partir de los segmentos nodales, cultivándolos en dos tipos de medio, MS y Gamborg (B5); para el primer medio experimentó en tres diferentes concentraciones 25%, 50% y 100% con condiciones nutritivas de sales minerales, vitaminas y sacarosa y para el segundo en concentraciones de 2, 4 y 8% añadiéndole en ambos sacarosa, manitol y sorbitol como reguladores osmóticos ajustándolos a un pH de  $5.8 \pm 0.02$  en agar al 0.7% y con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a una temperatura promedio de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , observándose proliferación y formación de callos de manera satisfactoria en medio B5.

**Ccaico (2017)**, realizó ensayos en placa con semillas de *C. calisaya* y *C. krauseana* para conocer en qué condiciones se incrementaba la germinación y vigor de las plántulas, experimentando con nitrato de potasio y agua de coco, resultando una germinación de 82.7 y 17.3%, respectivamente; además, también trabajó inoculando 18 cepas bacterianas en inóculos de  $10^7$  UFC/mL durante 42 días, cada 2 semanas. Este experimento dió como resultado la pudrición de raíces y el necrosamiento de las hojas, atribuyéndose al pH diferencial entre el suelo natural con 5.5 y el pH de la solución hidropónica que utilizaron para el riego con de 6.5, evidenciándose así una alta mortandad de las plantas. Por lo tanto, 91% de las cepas evaluadas no presentaron efecto favorable en el porcentaje de germinación, respecto al control, por lo que no encontró diferencias significativas entre los tratamientos con bacterias y el control.

**Lima et al. (2018)**, estudiaron la propagación *in vitro* de *C. officinalis* a partir de semillas utilizando grupos de 30, utilizando MS suplementado con 1 mg/L de tiamina y 100 mg/L de m-inositol, sacarosa 2%, agar 6% añadiéndole AG<sub>3</sub>1 mg/L, ajustando a un pH de  $5.8 \pm 0.2$  con NaOH 1N, a temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, observándose resultados estables de germinación a partir de los 45 días de la siembra.

**Campos (2018)**, experimentó con plantas de vivero de *C. pubescens* pasando por un proceso de desinfección con alcohol 70% y una solución de hipoclorito de calcio 3% agregando tres gotas de detergente Tween 80, durante 5, 10, 15 y 20 minutos para luego sembrarlas en medio de cultivo de Campbell y Durzan con los reguladores de crecimiento BAP 0.5 mg/L y KIN 0.5 mg/L durante 30 días a un pH a  $5.8 \pm 0.2$ . Finalizando la etapa de inducción de brotes y enraizamiento con AIB 0.5 mg/L y ANA 0.5 mg/L y aclimatándolas en sustratos de turba y arena 60 y 40%, respectivamente.

#### **B. A nivel de bacterias PGPR:**

**Figuerola (2004)**, resaltó el uso de géneros bacterianos como Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas y Burkholderia actuando dentro del grupo de las PGPR de manera simbiótica con la planta hospedera, sintetizando compuestos carbonados suplidos por la planta y convertidos en nitrógeno asimilable para la plantas ( $\text{NH}_4^+$ ) en forma de iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) dando énfasis a los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico. Además, resaltó las asociaciones simbióticas entre las bacterias y la rizósferas de las plantas, describiendo a especies como *Methylobacterium mesophilicum* y *Pseudomonas syringae* como beneficiosas, absorbiendo compuestos nitrogenados degradados por éstas bacterias y siendo aprovechadas por las plantas, llegando a ser absorbidos desde la raíz hasta las hojas.

**Narovis y Hernández (2007)**, en su revisión descriptiva resaltó el uso de cepas nativas como inoculantes bacterianos benéficos aislados de la rizósfera de cultivos de arroz; entre el género bacteriano de gran importancia destaca *Herbaspirillum* como fijadores de nitrógeno atmosférico y *Pseudomonas* como responsables del crecimiento del cultivo en sus fases iniciales; el uso de éstos géneros no sólo asegura usarse como biofertilizantes si no también como controladores de patógenos en suelo interactuando con las plantas mediante diferentes mecanismos de acción, entre los que se destacan el biocontrol de patógenos, la producción de fitohormonas y la fijación biológica del nitrógeno.

**Benavides y Hermida (2008)**, aislaron diferentes especies de microorganismos del suelo nativo de los páramos bolivianos ya que éstos juegan un papel importante como reguladores del recurso hídrico, albergue de un gran número de especies animales y vegetales al igual de una riqueza paisajística, siendo un ambiente favorable para el crecimiento de microorganismos benéficos; por lo que decidió trabajar sus aislamientos de cepas bacterianas encontrando aproximadamente  $10^9$  células bacterianas por gramo de suelo, identificando poblaciones de bacterias Gram positivas como *Arthrobacter*, *Bacillus*, y *Micrococcus* y la población Gram negativa compuesta por *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, y *Nocardia*.

**Flores et al.,(2018)**, demostraron una relación directa entre la inoculación de fosfato asimilado y el incremento en número de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) producidas por planta al ser inoculados por *Bradyrhizobium* como una cepa solubilizadora de nitrógeno y *Agrobacterium* como una cepa solubilizadora de fosfato. Además, como biofertilizante en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de *Pseudomonas luteola* y *Aeromonas hydrophila*, evidenciaron la capacidad de estas cepas en el aumento de la radícula y vigor evidenciadas en la estabilidad y crecimiento de la planta estudiada; por lo que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son herramientas promotoras en el mejoramiento de varias especies vegetales del género *Cinchona*, teniendo en cuenta la concentración bacteriana en  $1 \times 10^8$  UFC.

**Suárez (2018)** utilizó *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces* sp. aislados a nivel de raíz de dos especies correspondientes a *C. capuli* y *C. lancifolia*, observó en invernadero después de su inoculación un aumento en altura promedio de  $0.27 \pm 0.14$  cm con la inoculación de *A. chroococcum*, además, observó un aumento de 1.63 cm en longitud con el tratamiento de *A. chroococcum* y *Streptomyces*. Además, las semillas inoculadas con *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces* se trabajaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC cada uno, resultando un aumento en longitud de la raíz y el peso seco de las plántulas en ambas especies, destacando el efecto que tienen las PGPRs sobre el desarrollo de las plántulas en condiciones de invernadero.

**Nina (2019)** trabajó con *Pseudomonas* y *Rhizobium* en forma individual y en asociación sobre semillas de *Chenopodium quinoa in vitro* (en placa) y la segunda sobre semillas sumergidas en caldo. No obtuvo diferencias significativas con la inoculación de *Pseudomonas* y *Rhizobium* tanto individual como en asociación; sin embargo, la imbibición directa de la semilla con el inóculo bacteriano de *Pseudomonas* de  $10^8$  UFC/mL resultó con 2.44 cm más en longitud de tallo; además, reportó a la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 como solubilizadora de fosfato tricálcico.

**Romero (2018)**, trabajó con cinco especies de *Pseudomonas* como *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. mendociana* y *P. putida* y un tratamiento químico, siendo inoculadas las cepas sobre las coronas de *Asparagus officinalis* (espárrago) durante su desarrollo vegetativo a nivel de invernadero. Registró en su estudio índices de efectividad de 73,47, 80,71 y 55,15% en altura de *A. officinalis* a 60 días. En longitud resultó *P. putida* cepa 33.8 con una altura de 18.33 cm a diferencia del testigo químico que alcanzó 10.52 cm, en tanto que con las demás especies no tuvo diferencia significativa.

### C. A nivel de asociación entre microorganismos y cultivos *in vitro*:

**Fernández et al., (2010)**, trabajaron con Micorrizas *in vitro* e *in vivo* sobre plántulas de *Solanum tuberosum* var. *Alfa*. En condiciones *in vitro* emplearon tres medios de cultivo MS (Murashige y Skoog), M (Medio mínimo) y N (Medio nuevo) siendo un mix de MS, M y vermiculita estéril y utilizando para la propagación clonal plántulas *in vitro* en estadio de enraizamiento con inoculaciones de esporas de tres especies de *Glomus*. Para su crecimiento fueron colocadas en frascos durante 35 días con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad a 20°C. A 35 días de evaluación se observó crecimiento resultando efectivo en medio M con un incremento de altura entre 47 y 54% en comparación con los dos medios trabajados que presentaron reducción en el crecimiento de las plantas.

**Alvarado et al., (2014)**, trabajaron con 5 cepas del género *Bacillus* formadoras de endosporas, inoculando *Bacillus* sp-CCIBP-W13, *B.subtilis*-CCIBP-M27, *Bacillus* sp.CCIBP Bv14, *B. pumilus*-CCIBP-C5 y *Bacillus* sp.CCIBP-Bv12, sobre raíces de minitubérculos de papa cv. Romano por inmersión en fase de enraizamiento durante 30 minutos por un periodo de 90 días. Posteriormente, realizaron evaluaciones en altura de planta resultando la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 con una media de 40.29 cm en comparación con las demás especies. Además, las variables largo, ancho, masa fresca y masa seca de los tubérculos fueron superiores en los tratamientos con las cepas CCIBP-C5, CCIBP-Bv12 y CCIBP-Bv14, en comparación con el control con fertilizante y sin fertilizante.

**Sánchez & Pérez (2018)**, trabajando con plántulas *in vitro* de *Dioscorea rotundata* determinaron las cepas bacterianas por sus características de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* mediante la producción de auxinas por el método colorimétrico de Salkowsky y solubilización de fósforo. Identificaron molecularmente a las especies *Enterobacter cloacae* DSC6, *Azotobacter vinelandii* DVS9, *A.vinelandii* DCR11, *Brevibacillus laterosporus* DSC19, *Bacillus subtilis* DSC82, *A. vinelandii* DSC72 y *P. denitrificans*. Se inocularon a nivel de invernadero en sustrato franco arcilloso y se observó un incremento en altura después de 60 días de evaluación resultando *Pseudomonas denitrificans* (DVS10) con una producción de AIA de 67,93 µg.ml<sup>-1</sup> y con solubilización

de fósforo de 21,92 ppm, a diferencia de las otras especies estudiadas. También se logró determinar que promovían mayor peso seco radicular la especie *Bacillus licheniformis* (DSC1); mientras que en peso seco la especie *Enterobacter cloacae* (DCB13) y finalmente en peso seco aéreo *B. licheniformis* (DSC1).

**Pérez *et al.*, (2015)**, trabajaron con tres ecotipos de mora (*Rubus glaucus*) mediante cultivos *in vitro* inoculados en forma individual y combinada con el hongo formador de micorriza arbuscular *Glomus* sp. (GEV02) y las Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal *Pseudomonas migulae* cepa Pf014 y *Bacillus amyloliquefaciens* cepa Bs006, aisladas de la litósfera de uchuva, inoculadas mediante aspersión de suspensiones a una concentración de  $1 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$  a los 15 y 30 días, después de la siembra, a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h de oscuridad durante 20 días. La variable de crecimiento en longitud con *Pseudomonas migulae* cepa Pf014 presentó los mayores valores de longitud foliar, mientras que con *Glomus* sp. (GEV02) en asociación con *P. migulae* cepa Pf014 se observó una mayor área foliar.

## II. BASE TEÓRICA

Las Cinchonas son especies forestales, conocidas como quina o cascarilla (Villar *et al.*, 2018) y se encuentran distribuidas por Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia. En nuestro país en los departamentos de Amazonas, Cajamarca, Piura, San Martín, Huánuco, Pasco, Junín, Madre de Dios, Puno y Lambayeque. Cada especie varía según el rango altitudinal yendo desde los 180 m.s.n.m. hasta los 3500 m.s.n.m (Zevallos, 1989).

Entre las especies, con mayor contenido de quinina se encuentra *C. officinalis* con 2.4 - 4%, concentrándose en mayor porcentaje en la corteza entre los 7 y 16 años de edad de la planta, al igual que la quinina se resaltan más componentes metabólicos como la quinidina, cinchonidina y cinconina que actúan contrarrestando el paludismo o malaria (González, 2016).

### **Distribución de la especie**

La especie *C. officinalis* se encuentra distribuida en un rango altitudinal de 1,000 a 3,150 m.s.n.m. y en rango longitudinal 04°18'00" - 14°15'30" (°S) Zevallos (1989), pertenece a bosques húmedos o montanos occidentales del norte, teniendo particularidad por los bosques nublados, con condiciones ambientales de altura, de poca accesibilidad y con asociación de diferentes especies (González, 2016), por lo que se ha convertido en una especie vulnerable; además, se suma la rápida expansión agrícola, ganadera y demográfica, resultando una especie de distribución baja y limitada (Villar *et al.* 2018). El estado actual indica que posee una extensión de presencia (EOO) de 11 166,6 km<sup>2</sup> y un área de ocupación (AOO) de 72 km<sup>2</sup> (Huamán *et al.* 2019).

## ***Cinchona officinalis***

El género *Cinchona*, perteneciente a la familia Rubiaceae, está conformado por 23 especies siendo *C. officinalis* la especie representante de la flora peruana, encontrándose como símbolo emblemático y figurando así en el blasón peruano; esta significancia se dió debido a que en 1638, época del Virreynato del Perú, la condesa de Chinchón, esposa del virrey, fuese curada del paludismo con una preparación de corteza, salvándola a ella y al resto del mundo del paludismo o malaria. Desde ese momento se consideró una planta salvadora de muchas vidas humanas y esto se debió al contenido del alcaloide quinina presente en la corteza (Zevallos,1989).

Su importancia se suma al aporte ambiental forestal actuando como mitigante de gases del efecto invernadero, al aspecto maderable por su calidad en la ebanistería, además, de su agregado comercial para la industria farmacéutica en la elaboración de aguas tónicas y en la industria coctelera para la preparación del *pisco sour* teniendo como insumo el amargo de angostura (Villar *et al.* 2018). Además, se ha logrado evidenciar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de la corteza frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 reportando inhibicion en concentración de 1000 µg/mL (Villalobos, 2019).

### **Clasificación botánica**

- **REINO** : Plantae
- **DIVISIÓN** : Magnoliophyta
- **CLASE** : Equisetosida
- **ORDEN**: Gentianales
- **FAMILIA** : Rubiaceae
- **SUBFAMILIA**: Cinchonoideae
- **GÉNERO** :Cinchona
- **ESPECIE** : *Cinchona officinalis* L.
- **NOMBRE COMÚN**: cascarilla roja (Tropicos. Org.)

## **Descripción de *Cinchona officinalis***

El árbol mide 11 a 15 metros de alto con fuste cilíndrico, de 30 a 40 cm de diámetro; ramificación simpodial con copa globosa irregular, bastante densa, la corteza externa de color marrón oscuro o marrón grisáceo; ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas de forma irregular; mientras que la corteza interna de color blanco arenoso que se oxida al contacto con el aire, tomando un color anaranjado rojizo. Las hojas son simples, opuestas y decusadas; 8 a 26.8 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho; con peciolo de 2 a 4.5 cm de longitud; ápice agudo, acuminado, obtuso o redondo; base obtusa; borde entero, ligeramente sinuado. Forma de la hoja elíptico-oblonga o elíptico-ovada, pinnatinervia recta-curva; haz glabro o ligeramente pubescente, envés con pubescencia escasa o abundante de tipo ceroso. Estípulas aovadas y caducas. Flores en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, ligeramente pubescentes. Flores hermafroditas, actinomorfas; cáliz gamosépalo de aproximadamente 4 mm de longitud, cilíndrico, con 5 lóbulos pequeños; corola blanco-roja, con pétalos fundidos, de 1.5 cm de largo, hipantio presente; los lóbulos de la corola reflexos; estambres adnatos a la corola en número de 5. Los frutos son de tipo cápsula elipsoidales a subglobosas, que varían entre 10 a 20 mm de largo por 6 a 10 mm de ancho, que se abren de manera acropétala y su endocarpo de tipo cartáceo a maderado con grosor de 0.3 a 0.4 mm. Las semillas tienen una medida entre 5.1 a 5.3 mm de largo por 2.3 a 2.9 mm de ancho con margen irregular dentado, con forma alada alcanzando los 15 m de distancia a la planta madre (Zevallos, 1989).

## **Técnica de propagación *in vitro***

El cultivo de tejidos es una técnica biotecnológica que permite la obtención de plantas libres de virus y otros agentes patógenos además del mejoramiento genético y la conservación del material germoplasmático. Permite propagar plantas de forma masiva, en cualquier época del año y en corto tiempo (Bhojwani & Dantu, 2013).

## **Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)**

El microbioma de las rizósferas de suelos nativos se ven altamente beneficiados debido al estar exento de deterioro químico o biológico. Destacando así, microorganismos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Salvador, 2019).

Por otro lado, en el suelo se encuentran diferentes tipos de microorganismos y entre la gran diversidad se tiene los denominados PGPR por sus siglas en ingles (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Son bacterias ubicadas en la rizosfera de las plantas que influyen tanto en el crecimiento como en la estabilidad de las plantas, poseyendo capacidades fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos minerales del suelo y productoras de ácido indol-3-acético (AIA) (Siles *et al.*, 2014).

Las PGPR tienen diferentes campos de acción siendo biofertilizantes, fitoestimuladores y biocontroladores; los biofertilizantes actúan aumentando la nutrición de la planta mediante solubilización de macronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, esenciales para la productividad de los cultivos y tan igual de importantes como los micro nutrientes como el boro, cobre, cloro, hierro, manganeso, molibdeno y zinc (Moreno *et al.*, 2018).

Las PGPR actúan como biocontroladores por la capacidad de sus sideróforos y antibióticos por eliminar fitopatógenos y como fitoestimuladores produciendo hormonas como AIA y enzimas. AIA es una auxina que actúa a nivel de raíz transportando gran cantidad de nitratos y fosfatos; por ejemplo *Pseudomonas* que tiene la capacidad de producir antibióticos, quitinasa, glucanasa, sideróforos, amoníaco, pigmentos fluorescentes, antifúngicos y en biorremediación de Pb (Benjumeda, 2017).

La forma de interacción de las PGPR es atravesando la corteza de la raíz hasta el sistema vascular de manera endofítica viviendo en tallos, hojas y raíz, de manera satisfactoria mediante interacción dinámica entre raíces y microorganismos. Esta zona está caracterizada por el aumento de gran biomasa microbiana incorporando nutrientes del suelo hacia el interior de la planta (Naravis & Hernández, 2007).

### **Capacidades promotoras del crecimiento vegetal**

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) nace como una biotecnología medioambiental para contrarrestar el uso de los agroquímicos, interactuando de manera directa en el crecimiento, desarrollo y establecimiento de la planta. Las PGPR

cumplen con las características de ser productoras de ácido indol acético, solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno atmosférico (Hernández & Torres., 2018).

### **Producción de AIA**

Auxina natural, que estimula la germinación de semillas , crecimiento radicular y vegetativo , la formación de pigmentos y metabolitos; el fundamento se basa cuando se realiza la prueba, la aparición del color rosa causada por la reacción oxidativa inducida por el ácido y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cl del  $\text{FeCl}_3$ , presente en el reactivo de Salkowski (Vilchez, 2017).

*Pseudomonas* es considerado el género más importante en el control biológico de enfermedades en plantas de vid; además de ser eficientes en la producción de ácido indolacético (Sasirekha *et al.*, 2012)

### **Solubilización de Fosfatos**

En el suelo encontramos diversidad de compuestos fosforados mayoritariamente no disponible para las plantas y cuando el fósforo inorgánico obtenido reacciona con elementos de calcio, fierro y aluminio del suelo se convierten en minerales de fosfatos y estos no se pueden absorber por las plantas, por lo que los microorganismos transforman sus formas orgánica e inorgánicas del fósforo y lo convierten en dihidrógeno de fosfato o fosfato de hidrógeno, ya soluble para las plantas (Bobadilla & Rincón, 2008). La concentración de fósforo en el suelo es baja por lo que se han estudiado bacterias que lo degradan en fósforo orgánico, solubilizados por las rizobacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium*, *Aerobacter*, *Achromobacter* y *Erwinia* (Eleonora & Pineda, 2014) .

### **Fijación de Nitrógeno**

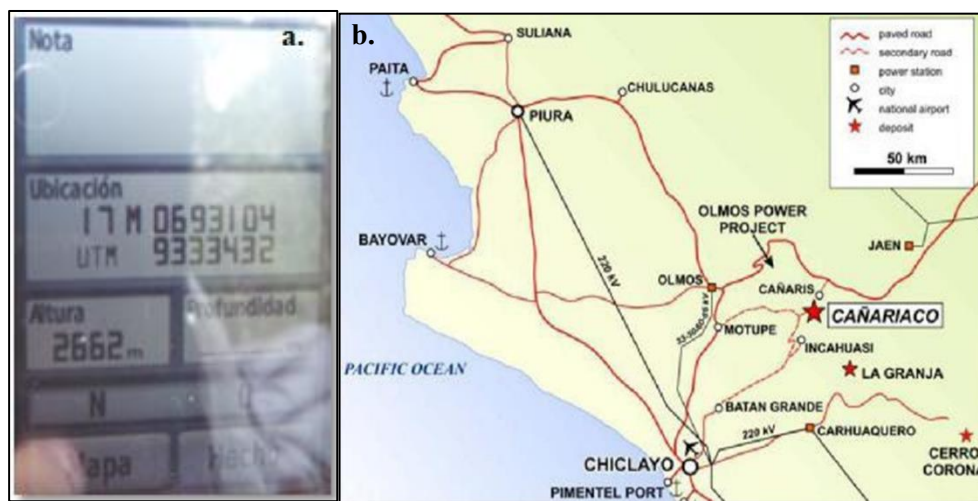
Los microorganismos como bacterias, permiten la fijación de nitrógeno atmosférico al suelo que son metabolizados en las biomasas bacterianas satisfaciendo sus necesidades y en simbiosis pasan el nitrógeno a las plantas y como resultado se evidencia en el aumento radicular y la mejor absorción de los nutrientes manteniendo un color verde foliar. Así tenemos al género *Azospirillum* (Colina *et al.* 2017). Entre las fijadoras de nitrógeno encontramos a las bacterias del género *Rhizobium* que forman una simbiosis con las raíces de las leguminosas capaz de llevar los procesos de fijación de nitrógeno (Flores *et al.*, 2012).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Ubicación del área de estudio

Para la recolección de raíces, suelo rizosférico y de muestras botánicas de *C. officinalis* fue de árboles procedentes del bosque montano o de neblina de la Región de Lambayeque, ubicado en la provincia de Lambayeque, distrito de Cañaris, con coordenadas de muestreo 17M0693104 UTM 9333432 (Datum WGS84), a una altura de 2662 metros sobre el nivel del mar (Figura 1).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de la región de colecta de *Cinchona officinalis*. **a.** Coordenadas del muestreo y **b.** Mapa indicando el área donde se colectaron las muestras vegetales.

##### 3.1.1.1 Lugar de ejecución del trabajo experimental

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque y en el Laboratorio de Investigación de Terra Perú Biotechnology durante los meses de Julio del 2018 a febrero del 2020.

### 3.1.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

En la etapa descriptiva de la investigación la población correspondió a las raíces y suelo rizosférico de plantas de *C. officinalis* que crecen en el bosque húmedo en el distrito de Cañaris, región Lambayeque y se investigaron 09 muestras probabilísticas de raíces y suelo rizosférico de plantas colectadas en junio del 2018, de los cuales se aislaron 73 cepas bacterianas (Anexo 2).

En la etapa explicativa de la investigación, con dos ensayos independientes, la población y muestra de estudio fueron 25 plántulas de *C. officinalis* obtenidas mediante la técnica de micropropagación e inoculados con las cinco mejores cepas productoras de ácido indol acético (AIA), fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato respectivamente.

#### 3.1.3 Material biológico

- Muestras botánicas de *C. officinalis* especialmente frutos y semillas procedentes del bosque montano de Cañaris – Lambayeque.
- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal propias de raíces y suelo rizosféricas de *C. officinalis*.
- Plantines obtenidos mediante la técnica de micropropagación.

#### 3.1.4 Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar (Biobase) para siembra de semillas de *C. officinalis* y bacterias promotoras del crecimiento.
- Microscopio óptico compuesto (Olympus) para la observación de las bacterias promotoras del crecimiento.
- Centrífuga (Fugelab) para la obtención de sedimento bacteriano.
- Regla Vernier digital (Ketotek) para la medición de semillas de *C. officinalis*.
- Estereoscopio para la observación morfológica de semillas de *C. officinalis*.
- GPS map 62s (Garmin) para la obtención de la ubicación del lugar de muestreo de *C. officinalis*.

#### 3.1.5 Medios de cultivo

- Agar papa sacarosa (PSA) para el aislamiento bacteriano.
- Medio Burk's y Jensen para la prueba de fijación de nitrógeno.
- Medio Pikoscaya para la prueba de solubilización de fosfato.

- Caldo nutritivo para la prueba de producción de ácido indolacético.
- Agar nutritivo para la conservación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento.

### **3.1.6 Reactivo**

- Reactivo de Salkowski para la prueba de producción de ácido indol-3acético (AIA).

## **3.2 Toma de muestra**

### **3.2.1 Recolección del material botánico para la identificación de la especie *C. officinalis*.**

La recolección del material botánico estuvo constituida por hojas, flores, tallos y frutos de los árboles seleccionados que permitieron su identificación. El mismo que fue colocado en prensas hasta su montaje, etiquetado e identificación.

### **3.2.2 Recolección de semillas para el crecimiento de *C. officinalis* a nivel experimental.**

Las semillas de *C. officinalis* fueron recolectadas teniendo en cuenta su tamaño, color y madurez fisiológica.

### **3.2.3 Toma de muestras de suelo con crecimiento de *C. officinalis*.**

Para la toma de muestra de suelo rizorférico se utilizó bolsas de polietileno de 25 x 10 cm donde se colocaron 50 gramos de tierra con raíces de *C. officinalis* para el aislamiento de las bacterias promotoras del crecimiento (Mejia, 2014).

## **3.3 Método para reconocer la viabilidad de semillas**

### **3.3.1 Prueba de flotabilidad**

Es un test cualitativo se reconocieron semillas viables y no viables a 24 y 48 horas en remojo con agua, fundamentado en aquellas semillas inviables flotantes en la superficie del recipiente debido a la muerte del embrión o cotiledón consumidos por insectos generando así una cámara de aire (Flores *et al.*, 2019).

### **3.4 Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento (PGPR)**

Para el aislamiento de las bacterias primero se procedió a preparar diluciones de la muestra con solución salina fisiológica:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ...,  $10^{-7}$ . De las cuatro últimas diluciones se procedió a sembrar 1 mL en placas de Petri mediante la técnica de extensión en superficie utilizando espátula de drigalsky. Estas placas de Petri fueron incubadas en ambiente de aerobiosis, a 35°C de 24 a 48 horas de incubación. Al cabo de ese tiempo se procedió a seleccionar las colonias bacterianas morfológicamente diferentes, las mismas que se mantuvieron en cepas (Anexo 02).

### **3.5 Identificación del género bacteriano *Pseudomonas*.**

La identificación fenotípica del género se realizó mediante la tinción de Gram y las pruebas de catalasa, oxidasa, fermentación de carbohidratos en agar hierro- triple azúcar, como fuente de carbono la utilización de citrato, descarboxilación de lisina, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, según Manual de Bergey's de bacteriología, (1992), mientras que para la identificación confirmativa del género *Pseudomonas* se utilizó agar Cetrimide, sembrando la mejor cepa promotora del crecimiento vegetal en el tamaño de las plántulas de *C. officinalis* codificada como A21, la siembra se realizó por técnica de agotamiento y estría; después de un periodo de 48 horas a una temperatura de 30°C, se observó una pigmentación fluorescente característico del género *Pseudomonas*.

### **3.6 Selección de semillas para el crecimiento *in vitro* de plántulas de *C. officinalis*.**

Las semillas recolectadas fueron desinfectadas en el laboratorio con alcohol etílico 70% seguido de NaOCl 3.75% durante 2.30 minutos al cabo de ese tiempo fueron enjuagadas con agua destilada esterilizada, luego se sometieron a embibición en agua destilada estéril por 24 horas. Posteriormente las semillas fueron cultivadas en medio de cultivo MS adicionándole la hormona AG3 0.5 mg/L, sembrando dos semillas por tubo de ensayo a temperatura de  $23 \pm 2$  °C y un fotoperiodo de 16-8 horas, luz – oscuridad. Pasado 75 días se seleccionaron los ápices caulinares y segmentos nodales de las plántulas

germinadas in vitro que fueron sembradas en medio de cultivo MS, sacarosa 2%, agar 0.6% y AG3 0.5 mg/L. El pH de los medios de cultivo se ajustó a  $5.6 \pm 0.2$  con NaOH 1N, sembrándose 5 explantes/frasco, a temperatura de  $23 \pm 2$  °C y fotoperiodo de 16-8 horas, luz – oscuridad.

Las auxinas usadas en el brotamiento y enraizamiento in vitro de *C. officinalis* fueron AIA (ácido indolacético) y AIB (ácido indolbutírico) 1,0 mg/L y 2,0 mg/L, respectivamente (Lima et al., 2018).

### **3.7 Selección de bacterias promotoras del crecimiento de *C. officinalis***

Para la selección de bacterias promotoras del crecimiento se sometieron a pruebas de fijación de nitrógeno, producción de ácido indolacético y solubilización de fosfato. Para la primera prueba se utilizó placas Petri con medio de cultivo selectivo sólido de Burk's y Jensen y después de tres días de incubación a 28°C se observaron las colonias fijadoras de nitrógeno. Para la segunda prueba de índoles producidos, para determinar la curva patrón se utilizó NaOH 5 mL y AIA 0.19 µg en 45 mL de caldo nutritivo e hicieron diluciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/mL; las concentraciones fueron obtenidas a partir de 100 µg/mL de AIA y 44.5 mL de caldo nutritivo diluidos hasta su volumen final de 1 mL (Tabla 1); al mismo tiempo se realizó la preparación del reactivo de Salkowski con 2 mL de FeCl<sub>3</sub> 0.5 M, 49 ml de H<sub>2</sub>O y 49 ml de ácido perclórico 70%; posteriormente, se colocaron en los tubos de eppendorf 1 ml del reactivo y 100 µl de sobrenadante de caldo bacteriano de 24 horas de crecimiento de cada cepa bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). El cultivo fue sometido a incubación de 5 días a 30°C al cabo de ese tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm hasta la obtención de una masa bacteriana sedimentada. Para la tercera prueba de las cepas bacterianas se sembraron en placas de Petri de agar Pikovskaya al que se le agregó el indicador azul de bromofenol 4%; después de 5 días de incubación a 30° C y en ambiente de aerobiosis se observó las colonias con halo de actividad frente al fosfato (Sharon et al., 2016).

**Tabla 1.** Concentraciones de 100 µg/mL de AIA y 44.5 mL de caldo nutritivo diluidos hasta 1 mL.

<b>Estandares (µg/mL)</b>	<b>AIA (mL)</b>	<b>Caldo nutrivo (mL)</b>
5	0.5	9.5
10	1	9
20	2	8
30	3	7
40	4	6
50	5	5
75	7.5	2.5
100	10	0

### **3.8 Evaluación del efecto de bacterias promotoras del crecimiento en la altura de plántulas de *C. officinalis***

Para la evaluación del efecto de las bacterias promotoras del crecimiento se utilizó 5 cepas con mayor producción de índoles producidos, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego se observó el crecimiento de las plantas a partir de los 30 días hasta los 60 días, comparando con el control. Los resultados fueron anotados en una ficha de evaluación y se obtuvo el índice de efectividad.

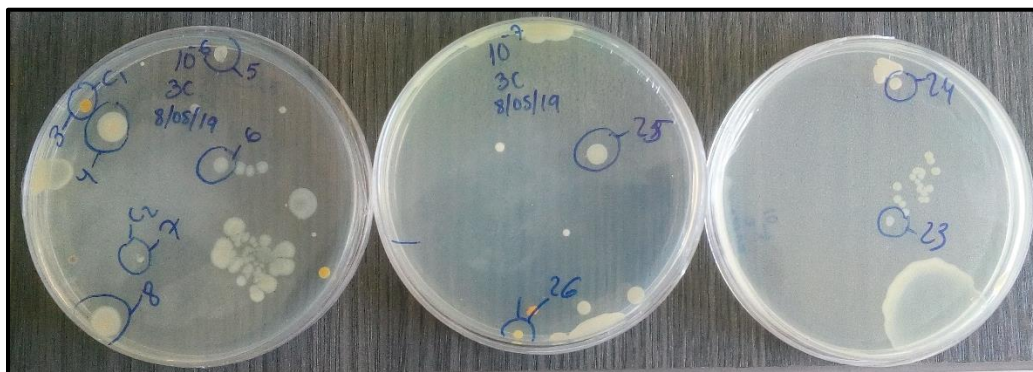
### **3.9 Tratamiento estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), estableciendo diferencias significativas a un nivel de significancia de  $p=0.05$  entre las cepas y las capacidades PGPR. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word, Excel versión 2013 y GraphPad Prism.

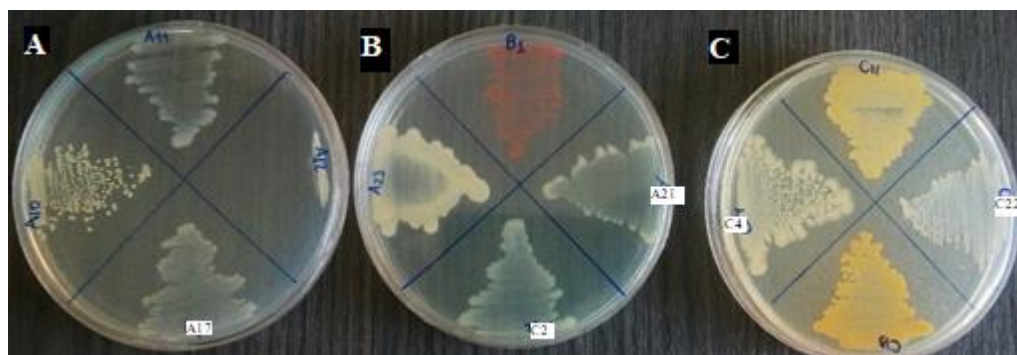
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización microscópica de bacterias aisladas del suelo de muestreo

En las muestras de suelo rizoférico de tres árboles de *C. officinalis* se aislaron colonias bacterianas cultivadas en medio agar nutritivo. Las colonias fueron seleccionadas según su morfología, caracterizadas por su color amarillo, blanco, rojo y crema, forma circular, borde entero e irregular y con elevación plana y convexa (Figura 2). Posteriormente, se aislaron cepas codificadas con las letras A (del A1 al A23), B (del B1 al B25), y C (del C1 al C26), tal como se observa en la Figura 3 la codificación literal de las cepas.



**Figura 2.** Selección de colonias bacterianas rizoféricas de *C. officinalis*, desarrolladas en agar nutritivo, destacando las colonias A17, A21, C2, C4 y C22.



**Figura 3.** Selección y codificación de las cepas bacterianas en agar nutritivo, a partir del aislamiento de suelo rizoférico de *C. officinalis*. **a)** cepa A17; **b)** cepa A21 y C2 y **c)** cepa C4 y C22.

## 4.2 Aislamiento y selección de cepas con capacidad promotora del crecimiento vegetal PGPR *in vitro*

### 4.2.1 Cepas productoras de ácido indol acético (AIA)

Se determinó una alta producción de AIA y produjeron cantidades de 35 µg/mL. Para la evaluación de la producción de AIA se realizó una curva patrón a partir de diferentes concentraciones, con una absorbancia de 530 nm. Los patrones fueron comprendidos en concentraciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/mL (Tabla 2), dentro de los valores reportados por Mantilla *et al.* (2007). Posteriormente, se transfirió 1 mL de cada solución a tubos de ensayo con 4 mL de reactivo incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos y leídos a una absorbancia de 530 nm (Tabla 3).

**Tabla 2.** Resultados de la absorbancia a 530 nm de la segunda cuantificación de las concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/mL.

Estándares (µg/mL)	Abs.1
0	0.125
5	0.289
10	0.473
20	0.686
30	1.012
40	1.210
50	1.403
75	1.678
100	1.748

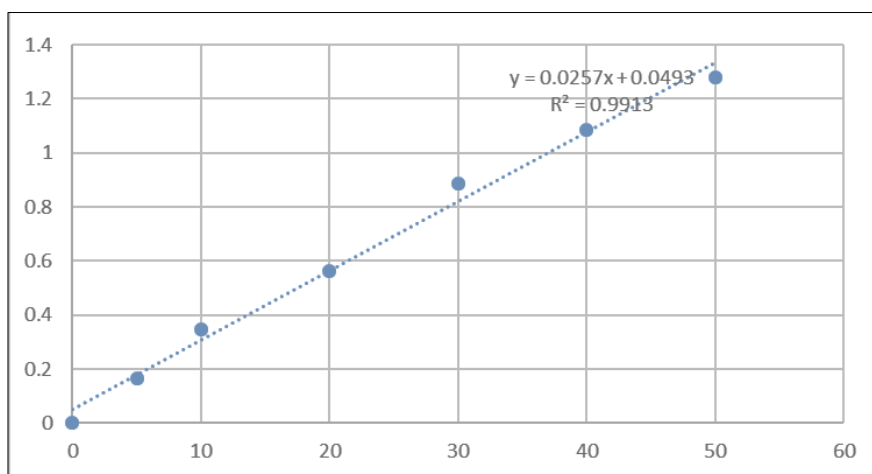
**Tabla 3.** Soluciones para curva patrón para cuantificación de AIA por las cepas bacterianas.

<b>Estandares (µg/mL)</b>	<b>AIA (mL)</b>	<b>Caldo nutritivo (mL)</b>
5	0.5	9.5
10	1	9
20	2	8
30	3	7
40	4	6
50	5	5
75	7.5	2.5
100	10	0

Con los resultados se construyó gráficamente la absorbancia entre la concentración, calculándose la ecuación de la recta y valor de  $r^2$  utilizando como control una solución pura de caldo nutritivo, determinándose un coeficiente ideal de correlación lineal mayor a 0.9 (Tabla 4 y Figura 4)

**Tabla 4.** Resultados de la absorbancia a 530 nm de la segunda cuantificación de las concentraciones

Estándares ug/mL	Abs.2
0	0
5	0.164
10	0.348
20	0.561
30	0.887
40	1.085
50	1.278



**Figura 4.** Curva estándar para cuantificación de AIA según concentraciones de 0-100 µg/mL.

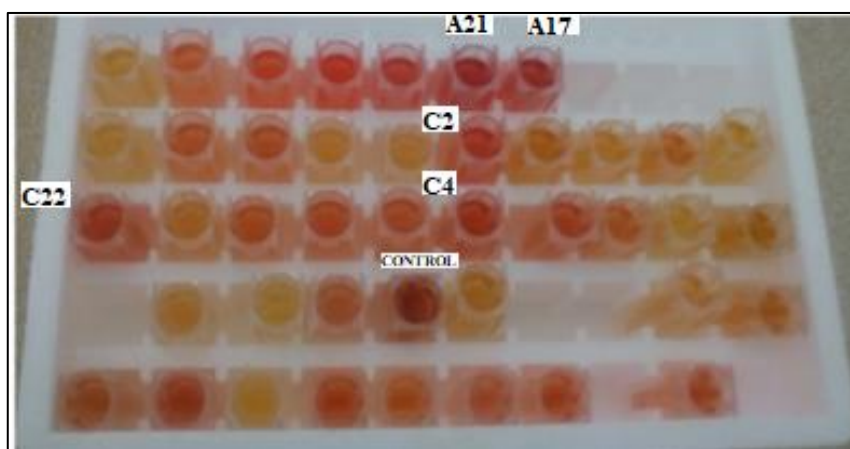
Para la determinación de la concentración de AIA se utilizaron 73 cepas, pero sólo 29 cepas tuvieron la capacidad de producir AIA. Para la evaluación de la capacidad productora de AIA se utilizó 1000 µL del reactivo y 100 uL de sobrenadante de cada cepa colocados en tubos eppendorf para la obtención de biomasa (Tabla 5, Figuras 5 y 6).

**Tabla 5.** Resultados del análisis de 29 cepas productoras de AIA

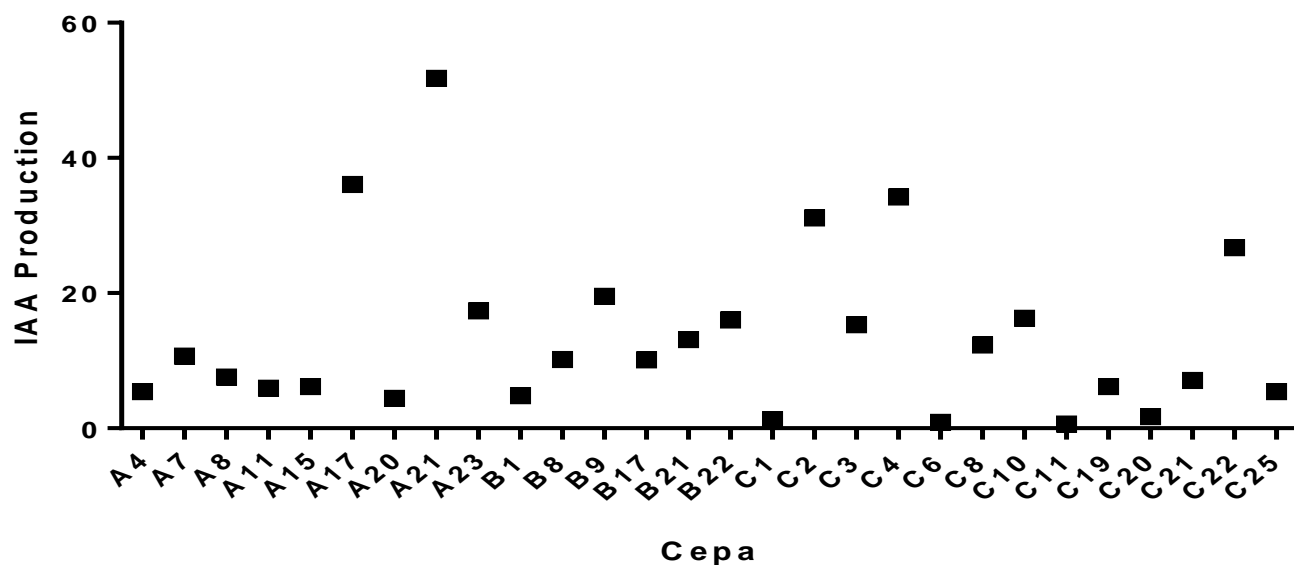
Acido indól acético			
CEPA	Abs.1	Abs.2	ug/mL
A1	0.150	0.025	-0.95
A2	-	-	-
A3	-	-	-
A4	0.314	0.189	5.44
A5	-	-	-
A6	-	-	-
A7	0.477	0.352	11.78
A8	0.272	0.147	3.80
A9	-	-	-
A10	-	-	-
A11	0.313	0.188	5.40
A12	-	-	-
A13	-	-	-
A14	-	-	-
A15	0.368	0.243	7.54
A16	-	-	-
A17	0.639	0.514	18.08
A18	-	-	-
A19	-	-	-

<b>A20</b>	0.335	0.210	6.25
<b>A21</b>	0.574	0.449	15.55
<b>A22</b>	-	-	-
<b>A23</b>	0.399	0.274	8.74
<b>B1</b>	0.236	0.111	2.40
<b>B2</b>	-	-	-
<b>B3</b>	-	-	-
<b>B4</b>	-	-	-
<b>B5</b>	-	-	-
<b>B6</b>	0.196	0.071	0.84
<b>B7</b>	0.167	0.042	-0.28
<b>B8</b>	0.489	0.364	12.25
<b>B9</b>	0.426	0.301	9.79
<b>B10</b>	-	-	-
<b>B11</b>	-	-	-
<b>B12</b>	-	-	-
<b>B13</b>	-	-	-
<b>B14</b>	-	-	-
<b>B15</b>	-	-	-
<b>B16</b>	-	-	-
<b>B17</b>	0.357	0.232	7.11
<b>B18</b>	-	-	-
<b>B19</b>	-	-	-
<b>B20</b>	-	-	-
<b>B21</b>	0.547	0.422	14.50
<b>B22</b>	0.298	0.173	4.81
<b>B23</b>	0.158	0.033	-0.63
<b>B24</b>	0.142	0.017	-1.26
<b>B25</b>	0.165	0.040	-0.36
<b>C1</b>	0.202	0.077	1.08
<b>C2</b>	1.135	1.010	37.38
<b>C3</b>	0.648	0.523	18.43
<b>C4</b>	0.702	0.577	20.53
<b>C5</b>	-	-	-
<b>C6</b>	0.233	0.108	2.28
<b>C7</b>	-	-	-
<b>C8</b>	0.428	0.303	9.87
<b>C10</b>	0.762	0.637	22.87
<b>C11</b>	0.189	0.064	0.57
<b>C12</b>	0.112	-	-
<b>C13</b>	-	-	-
<b>C14</b>	0.119	-	-
<b>C15</b>	-	-	-
<b>C16</b>	-	-	-

<b>C17</b>	-	-	-
<b>C18</b>	-	-	-
<b>C19</b>	0.27	0.145	3.72
<b>C20</b>	0.21	0.085	1.39
<b>C21</b>	0.266	0.141	3.57
<b>C22</b>	1.069	0.944	34.81
<b>C24</b>	-	-	-
<b>C23</b>	0.149	0.024	-0.98
<b>C25</b>	0.259	0.134	3.30
<b>C26</b>	-	-	-



**Figura 5.** Coloración observada en la cuantificación de índoles producidos por las 29 cepas aisladas del suelo rizosférico de *C. officinalis*, destacando las cepas A21, A17, C2, C4 y C22 y el control, con los mayores valores de producción de AIA.



**Figura 6.** Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas productoras de AIA (ug) y su biomasa (mg) de 29 cepas productoras de AIA.

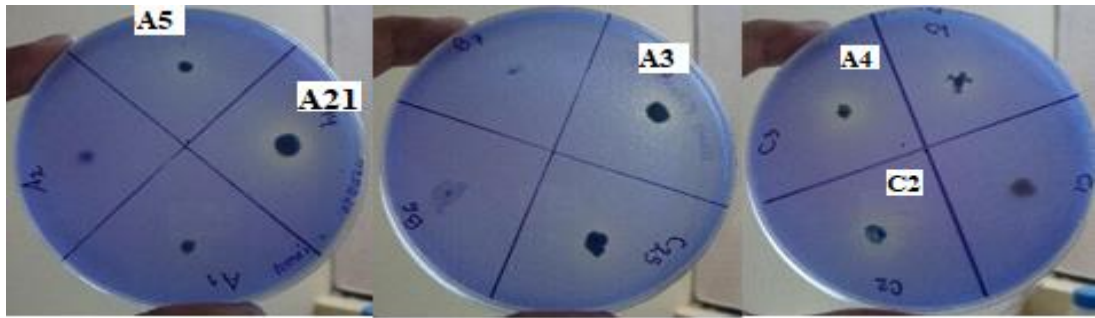
#### 4.2.1 Cepas solubilizadoras de fosfato

De las 73 cepas aisladas se examinó su capacidad cuantitativa para la solubilización de fosfato de calcio, pero solo 34 cepas mostraron capacidad solubilizadora de fosfato (Tabla 6, Figura 7). Se utilizó un método modificado para determinar la capacidad solubilizadora que implicó el uso de agar PVK (Pikovskayas Agar) con el colorante azul de bromofenol 4%. Se colocó un bucle bacteriano con crecimiento activo colocado en el centro de la placa de Petri e incubado a  $30^{\circ} \pm 1$  por 7 días. La zona solubilizadora de fosfato estuvo determinado restando el diámetro de la colonia bacteriana (Dc) y el diámetro del halo (Dh) (Thakur & Parikh, 2017).

**Tabla 6.** Resultados del análisis de las 34 cepas PGPR con capacidad solubilizadora de fosfato extraídas de suelo rizosférico de *C. officinalis*.

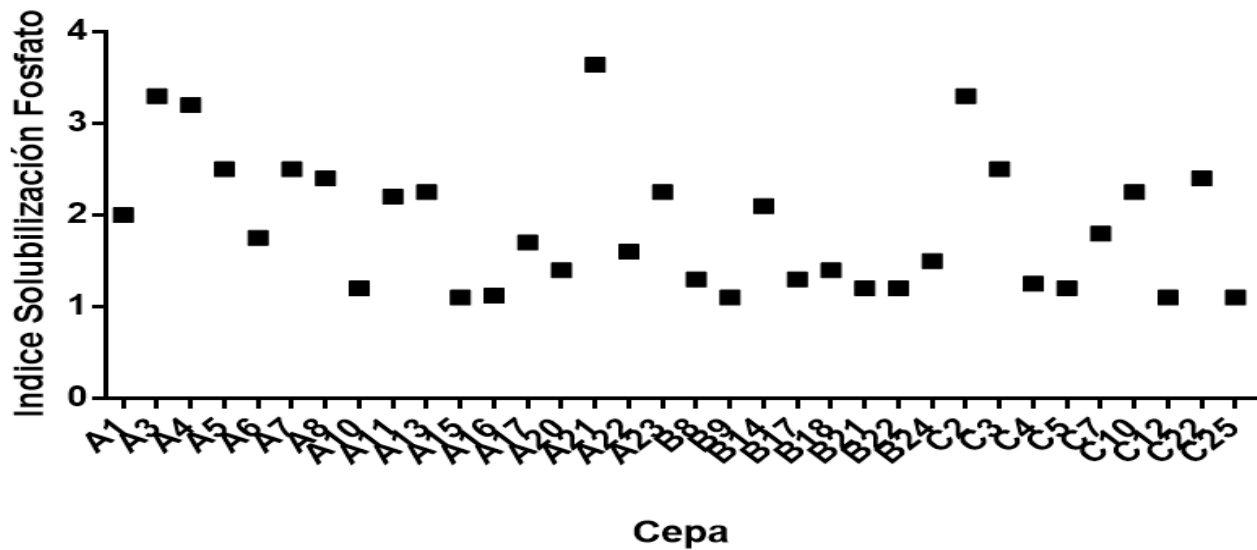
Solubilización de Fosfato				
CEPA	Dh	Dc	(Dh/Dc)	
A1	6	3	2	
A2	0	0	0	
A3	10	3	3.3	
A4	14.5	4.5	3.2	
A5	10	4	2.5	
A6	7	4	1.75	
A7	10	4	2.5	
A8	12	5	2.4	
A9	0	0	0	
A10	6	5	1.2	
A11	11	5	2.2	
A12	0	0	0	
A13	9	4	2.25	
A14	0	0	0	
A15	10	9	1.1	
A16	9	8	1.12	
A17	8.5	5	1.7	
A18	0	0	0	
A19	0	0	0	
A20	10	7	1.4	
A21	12	2	6	
A22	13	8	1.6	
A23	9	4	2.25	
B1	0	0	0	
B2	0	0	0	
B3	0	0	0	
B4	0	0	0	
B5	0	0	0	
B6	0	0	0	
B7	0	0	0	
B8	6.5	5	1.3	
B9	7	6	1.1	
B10	0	0	0	
B11	0	0	0	
B12	0	0	0	
B13	0	0	0	
B14	31	15	2.1	

<b>B15</b>	0	0	0
<b>B16</b>	0	0	0
<b>B17</b>	9.5	7	1.3
<b>B18</b>	7	5	1.4
<b>B19</b>	0	0	0
<b>B20</b>	0	0	0
<b>B21</b>	9	7	1.2
<b>B22</b>	6	5	1.2
<b>B23</b>	0	0	0
<b>B24</b>	11	7	1.5
<b>B25</b>	0	0	0
<b>C1</b>	0	0	0
<b>C2</b>	13.5	4	3.3
<b>C3</b>	15	6	2.5
<b>C4</b>	5	4	1.25
<b>C5</b>	6	5	1.2
<b>C6</b>	0	0	0
<b>C7</b>	9	5	1.8
<b>C8</b>	0	0	0
<b>C10</b>	9	4	2.25
<b>C11</b>	0	0	0
<b>C12</b>	7	6	1.1
<b>C13</b>	0	0	0
<b>C14</b>	0	0	0
<b>C15</b>	0	0	0
<b>C16</b>	0	0	0
<b>C17</b>	0	0	0
<b>C18</b>	0	0	0
<b>C19</b>	0	0	0
<b>C20</b>	0	0	0
<b>C21</b>	0	0	0
<b>C22</b>	12	5	2.4
<b>C24</b>	0	0	0
<b>C23</b>	0	0	0
<b>C25</b>	7	6	1.1
<b>C26</b>	0	0	0



**Figura 7.** Siembra en botón de las cepas bacterianas, destacando a las mejores cepas A3, A4, A5, A21 y C2 con halos de solubilización de fosfato.

De las cepas seleccionadas, los valores obtenidos se ingresaron a un diagrama según sus variaciones cualitativas de solubilización a una escala de 0 a 4 según el  $D_h/D_c$  con la finalidad de seleccionar las 5 mejores cepas que resulten con mayor escala de transformar el fósforo en fosfato insoluble (Figura 8).



**Figura 8.** Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas en escala de 0 a 4 de las 34 cepas según su capacidad solubilizadora de fosfatos durante los 7 días de incubación.

#### 4.2.2 Cepas fijadoras de nitrógeno

De las 73 cepas aisladas de la rizósfera de *C. officinalis* durante los meses de muestreo de Marzo a Julio del 2019 se examinó su capacidad cuantitativa fijadora de nitrógeno usando los medios selectivos sólido de Burk's y Jensen. Estos medios de cultivo contienen sales inorgánicas junto con una fuente de carbohidratos, pero carece de fuente de nitrógeno, por lo que las bacterias que crezcan son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y crecer cuando se cultiva en estos medios de cultivo sin nitrógeno. Se colocó una asada bacteriana por cada cepa sembrada en estría e incubada a 28°C por un periodo de 72 horas observándose las cepas fijadoras de nitrógeno (Mantilla *et al.*, 2007).

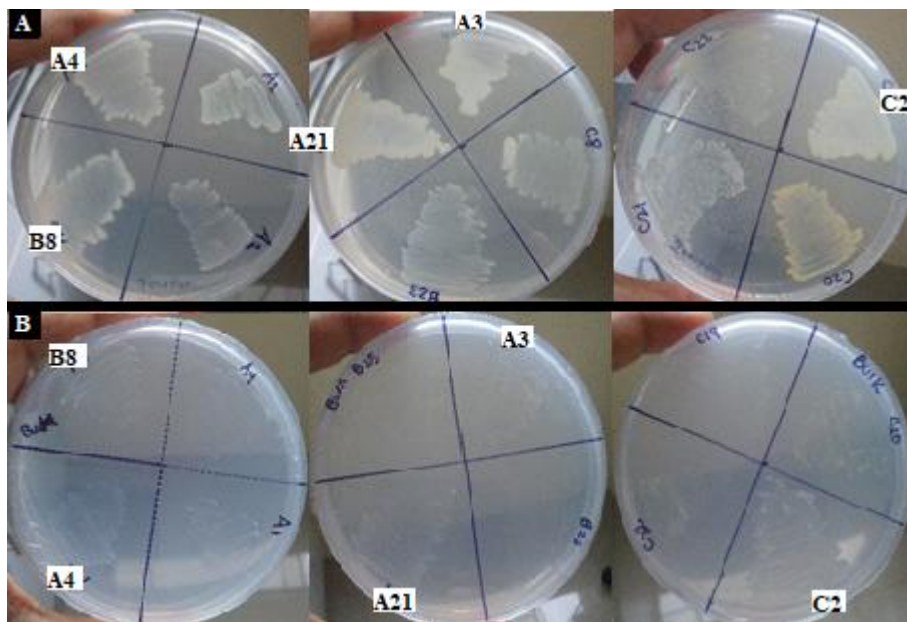
Los resultados nos indicaron que solo 53 cepas tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Tabla 7, Figura 9).

**Tabla 7.** Resultados del análisis de 53 cepas PGPR en medio de Burk's y Jensen con capacidad fijadora de nitrógeno obtenidas de la rizosfera de *C. officinalis*.

Fijación de Nitrógeno		
CEPA	BURK	JENSEN
A1	1	4
A2	2	3
A3	2	5
A4	2	5
A5	2	5
A6	2	5
A7	2	5
A8	2	5
A9	0	3
A10	1	4
A11	1	4
A12	2	3
A13	2	5
A14	0	3
A15	3	3
A16	2	3
A17	2	3
A18	0	3
A19	2	4
A20	1	4
A21	2	5

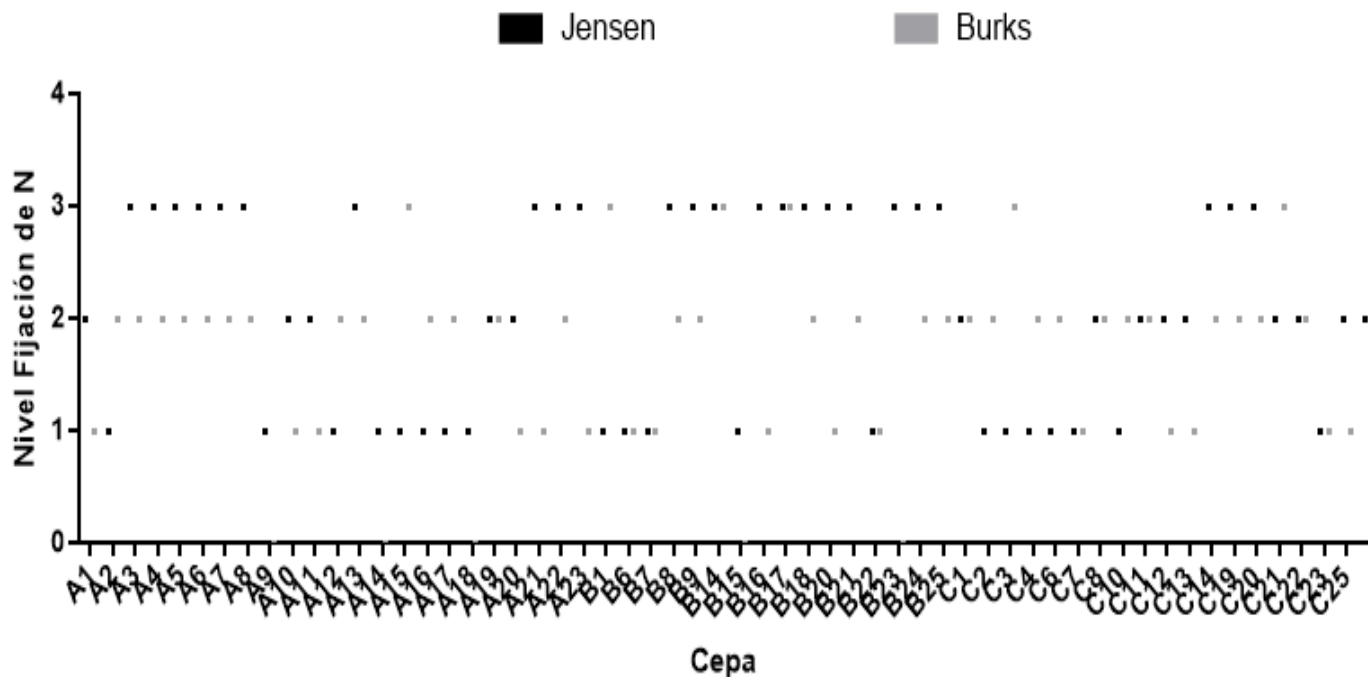
<b>A22</b>	2	5
<b>A23</b>	1	5
<b>B1</b>	3	3
<b>B2</b>	0	0
<b>B3</b>	0	0
<b>B4</b>	0	0
<b>B5</b>	0	0
<b>B6</b>	1	3
<b>B7</b>	1	3
<b>B8</b>	2	5
<b>B9</b>	2	5
<b>B10</b>	0	0
<b>B11</b>	0	0
<b>B12</b>	0	0
<b>B13</b>	0	0
<b>B14</b>	3	5
<b>B15</b>	0	3
<b>B16</b>	1	5
<b>B17</b>	3	5
<b>B18</b>	2	5
<b>B19</b>	0	0
<b>B20</b>	1	5
<b>B21</b>	2	5
<b>B22</b>	1	3
<b>B23</b>	0	5
<b>B24</b>	2	5
<b>B25</b>	2	5
<b>C1</b>	2	4
<b>C2</b>	2	3
<b>C3</b>	3	3
<b>C4</b>	2	3
<b>C5</b>	0	0
<b>C6</b>	2	3
<b>C7</b>	1	3
<b>C8</b>	2	4
<b>C10</b>	2	3
<b>C11</b>	2	4
<b>C12</b>	1	4
<b>C13</b>	1	4
<b>C14</b>	2	5
<b>C15</b>	0	0
<b>C16</b>	0	0
<b>C17</b>	0	0
<b>C18</b>	0	0

<b>C19</b>	2	5
<b>C20</b>	2	5
<b>C21</b>	3	4
<b>C22</b>	2	4
<b>C23</b>	0	0
<b>C24</b>	1	3
<b>C25</b>	1	4
<b>C26</b>	1	4



**Figura 9. A)** Observación de las cepas A3, A4, A21, B8 y C2 con los mayores valores de fijación de nitrógeno en medio Jensen; **B)** Cepas A3, A4, A21, B8 y C2 con los mayores valores de fijación de nitrógeno en medio Burk's.

De las cepas seleccionadas, los valores se ingresaron a un diagrama según sus variaciones cualitativas a una escala de 0 a 3 en medio de cultivo Burk's y a una escala de 3 a 5 en medio de cultivo Jensen, con la finalidad de seleccionar las 5 mejores cepas fijadoras de nitrógeno atmosférico (Figura 10).



**Figura 10.** Diagrama de identificación que muestra el patrón de cepas fijadoras de nitrógeno en medio Burk's en escala de 0 a 3 y en medio Jensen en escala de 3 a 5 según su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico durante los 3 días de incubación.

#### 4.3 Determinación de material vegetal de *C. officinalis*

##### 4.3.1 Germinación *in vitro*

Se sembraron 180 semillas en tubos de ensayo conteniendo de 01 a 03 semillas por cada tubo. Los resultados mostraron un 14.4% de germinación. Se observó el tamaño de 1.68 mm de ancho y 7.14 mm de largo de la semilla con testa de *C. officinalis* (Figura 11).



**Figura 11.** Observación microscópica (40x) del tamaño de las semillas de *C. officinalis*.

Se realizó la introducción de semillas de *C. officinalis* en los tubos de ensayo, estandarizando su desinfección al 1.5% de NaCl por un tiempo de 10 minutos (Figura 12).



**Figura 12.** Observación de semillas de *C. officinalis* introducidas en medio de cultivo MS, resaltando los parámetros de desinfección y tiempo.

Se observó la elongación de las plántulas germinadas *in vitro* de *C. officinalis* luego de 75 días de cultivo con AG<sub>3</sub> 0.5 mg/L (Tabla 8 y Figura 13).

**Tabla 8.** Adición de ácido giberélico (AG3) para la inducción de germinación de semillas de *C. officinalis*

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)	
UNIDADES EXPERIMENTALES	AG <sub>3</sub>
[ 01 - 180 ]	0.5

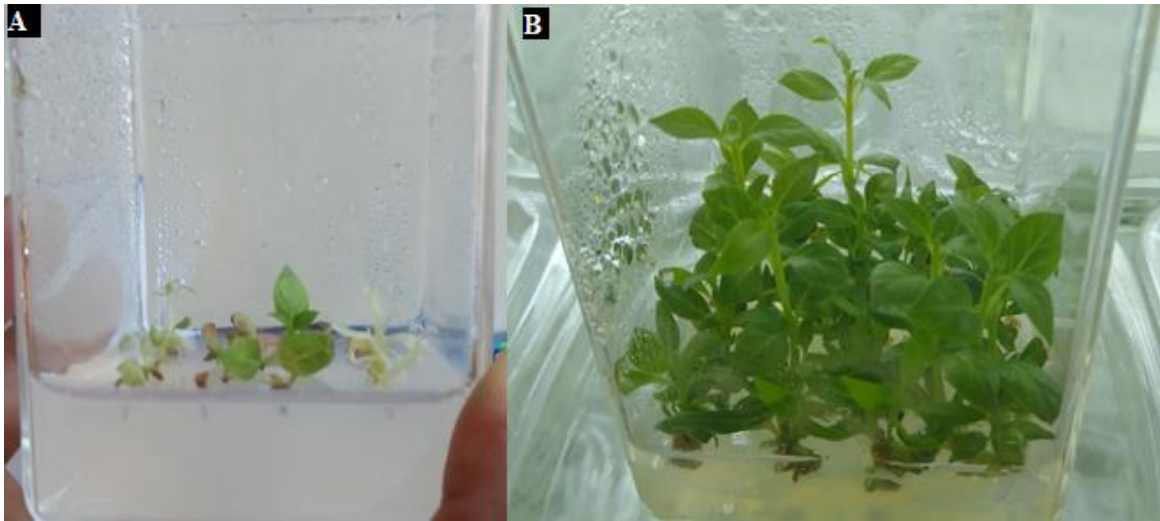


**Figura 13.** Observación de los primeros plantines germinados en medio MS a partir de las semillas *C. officinalis*.

Luego de 30 días de crecimiento, como se observa en la Figura 14a, se indujo múltiples brotes y enraizamiento con acción de las auxinas AIA 1.0 mg/L y AIB 2.0 mg/L para *C. officinalis* (Tabla 9), obteniéndose plantines con un tamaño de 5 mm provocando un aumento de explantes sin observarse fenolización del medio de cultivo (Figura 14b).

**Tabla 9.** Concentración de AIB en el brotamiento y AIA en enraizamiento de plántulas de *C. officinalis*.

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)		
UNIDADES EXPERIMENTALES	AIB	AUXINAS AIA
[ 01 - 25 ]	2,0	1,0



**Figura 14.** Crecimiento in vitro de *C. officinalis* a) Crecimiento de plantines de *C. officinalis* después de 30 días; b) Crecimiento de plantines de *C. officinalis* después de haber sido sometidas a AIA y AIB.

En el proceso de aclimatación, los plantines *in vitro* fueron seleccionados a partir del tamaño de 5.3 cm, aproximadamente, por consiguiente, fueron colocados en un ambiente de humedad lográndose una aclimatación exitosa de la especie (Figura 15).



**Figura 15.** Observación de plántulas de *C. officinalis* durante de aclimatación.

#### 4.4 Inoculación de cepas a plantas aclimatadas de *C. officinalis*

Se eligieron las cinco mejores cepas que cumplieron con la capacidad de producción de AIA (A17, A21, C2, C4 y C22) , fijación de nitrógeno (A3, A4, A21, B8 y C14 C22) y solubilización de fosfato (A3, A4, A5, A21 y C2), escogiéndolas cuantitativamente según las pruebas realizadas tal como se indicó anteriormente, siendo inoculadas a las plántulas al momento de su aclimatación en sustrato de turba (Figura 16).



**Figura 16.** Inoculación de las mejores cepas teniendo en cuenta su capacidad productora de AIA, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato sobre plantines de *C. officinalis*, resaltando a las cepas A17 y A21.

#### 4.5 Determinación de la mejor cepa PGPR en las plántulas de *C. officinalis*

La altura de las plántulas fue expresada en centímetros (cm), tomando las mediciones desde el término de la raíz hasta la yema terminal (Tabla 10).

Los resultados de la cepa A17 con capacidad solubilizadora de fosfato fue 14.9 cm de longitud, mientras que para la capacidad fijadora de nitrógeno resultó 14.7 cm de longitud y finalmente con capacidad productora de AIA alcanzó 15. 2 cm de longitud (Figura 17).

Asimismo, para la cepa A21 con capacidad solubilizadora de fosfato fue 32.8 cm de longitud, mientras que para la capacidad fijadora de nitrógeno resultó 36.2 cm de longitud y finalmente con capacidad productora de AIA alcanzó 31.3 cm de longitud (Figura 18)

Por otro lado, la cepa C2 con capacidad solubilizadora de fosfato fue 22.0 cm de longitud, mientras que para la capacidad fijadora de nitrógeno resultó 19.5 cm de longitud y finalmente con capacidad productora de AIA alcanzó 25.2 cm de longitud (Figura. 19)

Para la cepa C4 con capacidad solubilizadora de fosfato fue 21.0 cm de longitud, mientras que para la capacidad fijadora de nitrógeno resultó 18.4 cm de longitud y finalmente con capacidad productora de AIA alcanzó 20.1 cm de longitud (Figura 20).

Al igual para la cepa C22 con capacidad solubilizadora de fosfato fue 29.0 cm de longitud, mientras que para la capacidad fijadora de nitrógeno resultó 31.2 cm de longitud y finalmente con capacidad productora de AIA alcanzó 33.3 cm de longitud (Figura 21).

Para el testigo resultó 24.3 cm, 18.1 cm y 16.3 cm de longitud para las características solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de AIA respectivamente (Figura 22).

Finalmente, las cepas A3, A4, B8 y C14 con mayor fijación de nitrógeno y las cepas A3, A4 y A5 con mayor solubilización de fosfato resultaron inocuas para los plántulas de *C. officinalis*.

**Tabla 10.** Altura de plántulas de *C. officinalis* en prueba de solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de AIA.

	CEPAS	ALTURA DE PLÁNTULA (cm)		
		SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO (A)	FIJACIÓN DE NITRÓGENO(B)	PRODUCCIÓN DE AIA(C)
<b>5 mejores cepas</b> productoras de ácido indol acético	A17	14.9	14.7	15.2
	A21	32.8	36.2	31.3
	C2	22	19.5	25.2
	C4	21	18.4	20.1
	C22	29	31.2	33.3
<b>5 mejores cepas</b> fijadoras de nitrógeno	A3	-	0	-
	A4	-	0	-
	A21	32.8	36.2	31.3
	B8	-	0	-
	C14	-	0	-
<b>5 mejores cepas</b> solubilizadoras de fosfato	A3	0	-	-
	A4	0	-	-
	A5	0	-	-
	A21	32.8	36.2	31.3
	C2	22	19.5	25.2
	TESTIGO	24.3	18.1	16.3



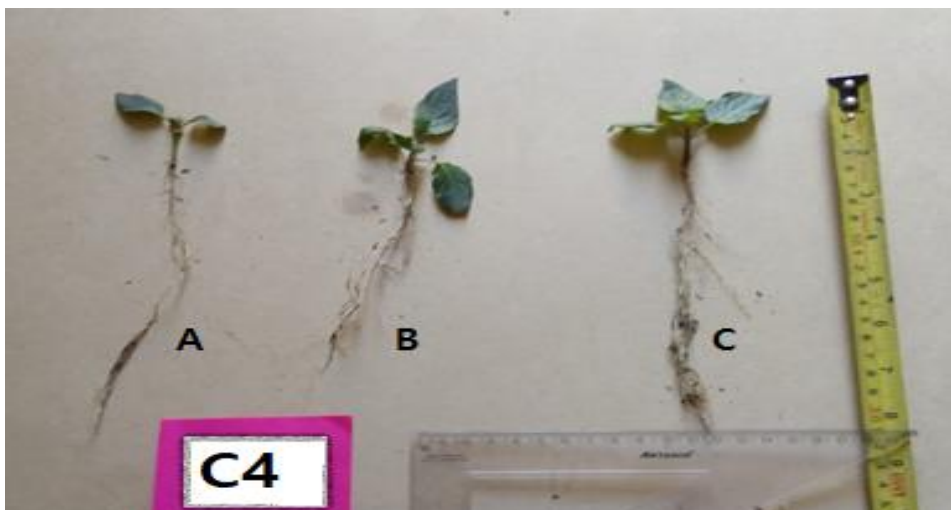
**Figura 17.** Medición de plántulas (cm) de *C. officinalis* inoculadas con la cepa A17 según el tipo de pruebas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.



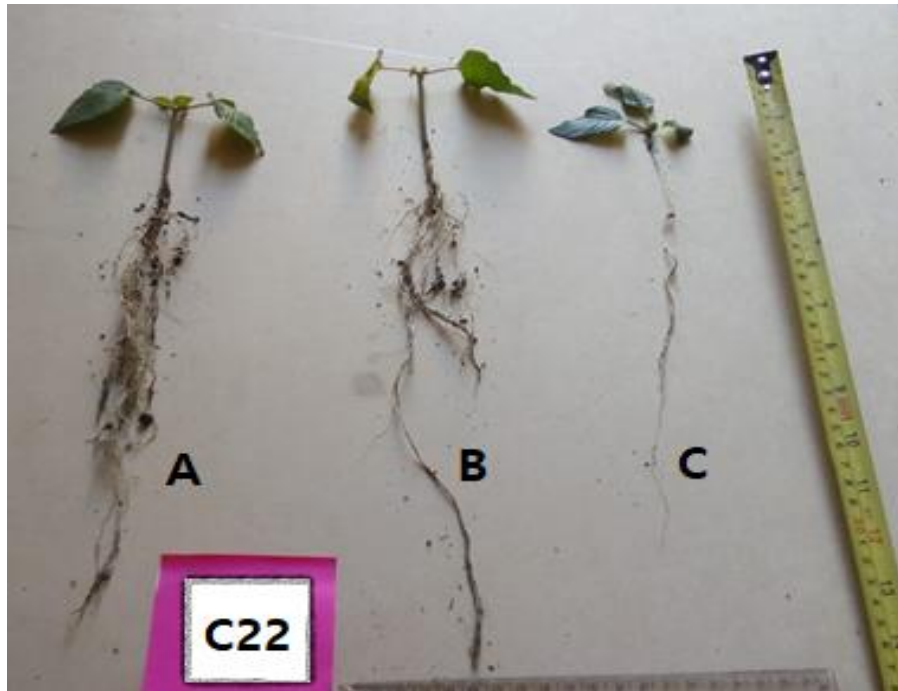
**Figura 18.** Medición de plántulas (cm) de *C. officinalis* inoculadas con la cepa A21 según el tipo de pruebas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.



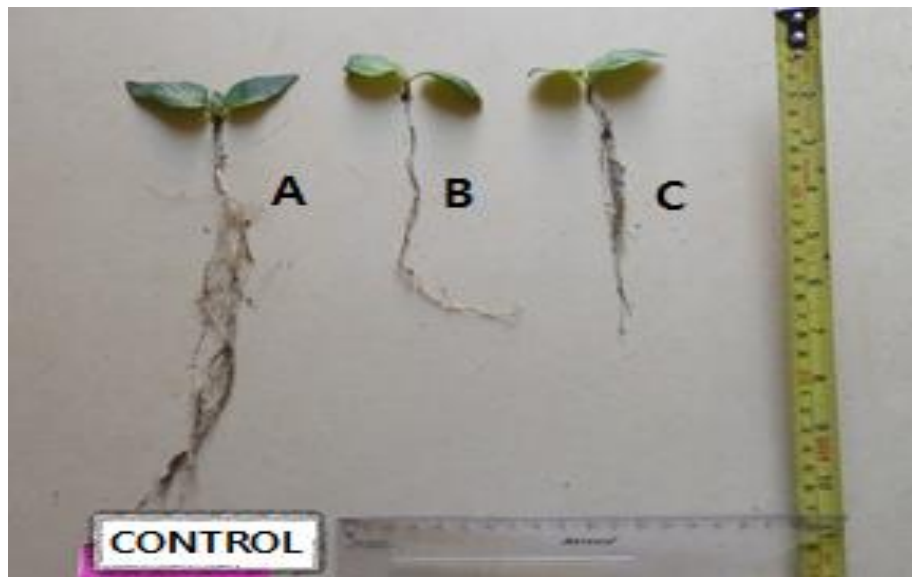
**Figura 19.** Medición de plántulas (cm) de *C. officinalis* inoculadas con la cepa C2 según el tipo de pruebas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.



**Figura 20.** Medición de plántulas (cm) de *C. officinalis* inoculadas con la cepa C4 según el tipo de pruebas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.



**Figura 21.** Medición de plántulas (cm) de *C. officinalis* inoculadas con la cepa C22, según el tipo de pruebas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.



**Figura 22.** Medición de plántulas (cm) del testigo de *C. officinalis* inoculadas con agua destilada, según el tipo de pruebas realizadas. a) solubilización de fosfato; b) fijación de nitrógeno y c) producción de AIA.

Respecto a las cepas que promovieron el crecimiento en altura a los plantines de *C. officinalis*, la cepa A21 superó tanto al testigo como a las cepas A17, C2, C4 y C22 (Tabla 10). Tanto las cepas y el testigo fueron regados con agua potable declorada; mientras que para el riego diario con agua destilada todos los días o dependiendo del requerimiento hídrico de las plántulas.

Con los valores de altura de las plántulas de *C. officinalis* obtenido por las cepas A17, A21, C2, C4 y C22 se calculó el índice de efectividad (%) según Romero (2017).

$$\text{IEI (\%)} = \frac{\text{tratamiento con inoculación} - \text{control sin inoculación}}{\text{control sin inoculación}} \times 100$$

Al determinar el índice de efectividad (%) de cepas PGPR en la altura de *C. officinalis* a los 30 días de evaluación; se obtuvieron para las cepas A17, A21, C2, C4 y C22 porcentajes de efectividad de 22.89, 72.63, 14.80, 2.40 y 60.9% respectivamente. Este resultado permitió separar la cepa A21 para su identificación a nivel de género.

Por otro lado, al realizar la prueba de análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo se observó que sí existe diferencia significativa entre las cepas A17, A21, C2, C4 y C22 sobre el tamaño de las plántulas de *C. officinalis*, en su proceso de aclimatación con un 95% de nivel de confianza (Anexo 03).

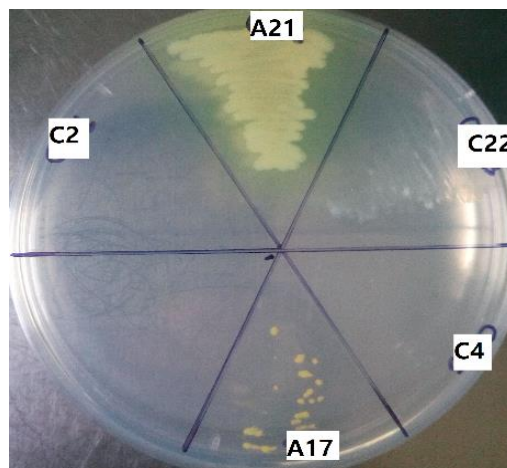
Para el caso de comparación de cepas A17, A21, C2, C4 y C22 sobre el control, se obtuvo un valor estadístico con una probabilidad de  $P = 0.5449$ , lo que permitió evidenciar estadísticamente que es la misma con o sin la aplicación de las rizobacterias, no sufriendo una alteración ni positiva ni negativa como resequedad o mortandad de plántulas (Anexo 04).

#### 4.6 Identificación de la cepa A21

De las 5 cepas seleccionadas (A21, A22, C2, C4 y C22), fue la cepa A21 la mejor cepa promotora del crecimiento vegetal en relación al tamaño de las plántulas de *C. officinalis* y utilizando pruebas bioquímicas según Manual de Bergey's de bacteriología (1992), se determinó en la investigación al género *Pseudomonas* (Figuras 23 al 28).



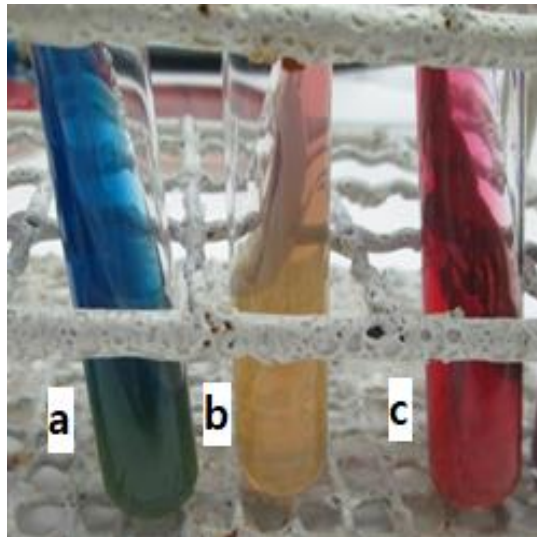
**Figura 23.** Obsevación microscópica (100x) de bacilos con disposición de forma individual y en parejas, mediante Tinción de Gram del género *Pseudomonas*.



**Figura 24.** Crecimiento en medio agar Cetrimide para la identificación del género *Pseudomonas*, observándose el color amarillo verdoso característico.



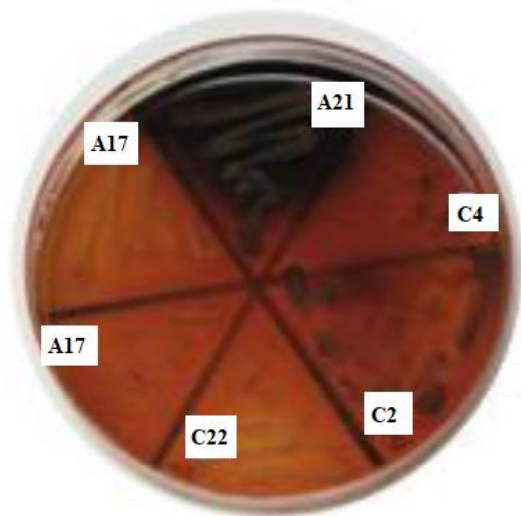
**Figura 25.** Prueba de oxidasa positiva lado derecho, para la cepa A21 en la identificación de *Pseudomonas*, al lado izquierdo cepa C2 como control.



**Figura 26.** Pruebas para identificación de *Pseudomonas* con respecto a la cepa A21: a) Prueba de citrato (+), b) LIA (-), c) TSI (K/K).



**Figura 27.** Agar gelatina, observándose una solución líquida considerándola como positiva (+), en la cepa A21 para la identificación de *Pseudomonas*.



**Figura 28.** Prueba de hidrólisis del almidón (+), correspondiente a la cepa A21 para la identificación de *Pseudomonas*.

## V. DISCUSION

*C. officinalis* conocida como quina o cascarilla es una especie de gran importancia forestal y medicinal (Zevallos, 1989), con preferencia por los bosques nublados, de poca accesibilidad y se encuentra en asociación con diferentes especies vegetales (González, 2016), sin embargo, la expansión agrícola, ganadera y demográfica. Ante esta situación de peligro, se debe tener en cuenta la presencia de semillas pequeñas y ortodoxas, dando como resultado escasez de plantas en campo, sin embargo, investigaciones asociadas a su revaloración ha permitido dar pie a metodologías de propagación biotecnológicas como la propagación *in vitro* junto al uso de microorganismos benéficos, dando resultados favorables.

Diferentes trabajos de investigación se vienen desarrollando, Mejía (2014) al observar la problemática de viabilidad y humedad de la semilla trabajó introduciendo semillas en medio MS y agua destilada, arrojando mayores porcentajes de germinación con agua destilada; en la presente investigación al introducir semillas en medio MS se obtuvo una germinación del 14.4%, siendo previamente embebidas en agua destilada estéril por 24 horas, permitiendo restablecer sus funciones metabólicas con un mayor contenido de agua; esto nos confirma la característica de que las semillas de *C. officinalis* presentan un epispermo grueso dificultando la salida del embrión.

Tras observarse problemas de germinación de *C. officinalis*, Moreno (2016) revaloró la especie, realizando la técnica de propagación asexual por estacas y por acodos, haciendo uso de agroquímicos enraizantes, pese a lo cual, no logró asegurar el establecimiento de la planta en suelo con la aplicación de enraizantes, sin embargo, cuando introdujo semillas en sustrato turba, obtuvo un porcentaje mayor al 80% de germinación, éste último aporte sirvió para seleccionar el sustrato de los plántulas en su etapa de aclimatación el cual resultó eficaz en su totalidad para el establecimiento de *C. officinalis* en suelo. Villar et al., (2018) recomienda la recolección de frutos entre los meses de mayo a junio, tomando estos resultados se realizó la colecta de semillas en el mes de junio, arrojando un porcentaje de 14% de germinación en medio MS; ésta diferencia de según Moreno (2016) se debe a dos distintas formas de propagación de las semillas, la primera que recibe un riego diario en

invernadero y la segunda que se mantiene en un medio semisólido de agar, esto nos brinda un indicativo de disponibilidad de agua cuando se cultive semillas de *C. officinalis* en medio agar el cual puede mejorar el porcentaje de germinación.

Con el propósito de encontrar técnicas biotecnológicas se empezó a evidenciar trabajos usando la propagación clonal in vitro, tal es así que De la Torre et al. (2006), sugirió el uso de esta técnica para el aseguramiento de las especies forestales de Cinchonas, empezando a utilizarse el cultivo por micropropagación como González (2016), que empezó a reportar exitosamente germinaciones in vitro a partir de semillas de *C. officinalis* al igual que Lima et al. (2018).

En el estudio de Gonzáles (2016) se reportó una germinación del 27% en 45 días en medio Gamborg (B5) conteniendo el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) o vitamina B5 como el regulador de crecimiento, a diferencia Lima et al. (2018) utilizaron medio MS suplementado reportando una germinación del 74.4% añadiéndole AG3 como regulador de crecimiento a una concentración 1.0 mg/L. Un porcentaje alto a diferencia de la investigación realizada que también se utilizó AG3 a 0.5 mg / L, debido a que cuando se hicieron previos ensayos con la concentración recomendada por Lima et al. (2018) se registró una germinación nula; estandarizando concentraciones propias de la investigación.

Espinosa y Ríos (2014) también usaron medio Gamborg B5 al 50% añadiéndole BAP 0.5 mg/L y ANA 0.1 mg/L, obteniendo un valor promedio de 5 brotes por plantin y un crecimiento promedio de 5.06 mm. En la investigación, también se observó brotación por plantin prosperado, pero un crecimiento lento usando AIA 1 mg / L y AIB 2.0 mg / L, habiendo relación directa entre el uso de AIA e AIB después de haber llegado al punto de germinación esperado con el crecimiento de las plántulas en el medio de cultivo.

Si bien es cierto Campos (2018) utilizó para su investigación plantas de vivero de *C. pubescens* que luego introdujo en medio Campbell y Durzan; medios distintos usados por los anteriores autores, lo que sí concuerdan es con el uso de AIB 0.5 mg/L y de enraizamiento ANA 0.5 mg/L a concentraciones menores de 1.0 mg/L obteniendo una exitosa brotación y enraizamiento, resultados que concuerdan con la investigación, pero varían en el uso de los reguladores usando para el crecimiento el AIA 1mg/L a una concentración de 0.5 mg/L mayor, mientras que para el enraizamiento el AIB 2,0 mg/L a una concentración de 1.0 mg/L mayor para la especie *C. officinalis* estudiada obteniéndose

datos de ensayo y error cuando se trabajen con hormonas siendo necesario hacer pruebas para observar si existe inhibición o estimulación de plántulas cultivadas. A pesar de que la viabilidad de las semillas es del 14.4% del total, se pudo contar con suficientes muestras de plantines que se utilizaron como base de datos para el estudio y revaloración de la especie de *C. officinalis*.

Para la germinación in vitro de semillas, Lima (2016) usó AG3 1,0 mg/L mientras que para el ensayo de multiplicación in vitro de explantes utilizó ANA y BAP 0,2 y 2,0 mg/l respectivamente, logrando 4,73 brotes desarrollados, en la investigación con el uso de AG3 0,5 mg/L lográndose 14.4% de germinación mientras que, con AIA y AIB 1,0 y 2,0 mg/l se contabilizó de 2 a 4 brotes por plantín; por lo que se hace notar la importancia del uso de AIA como inductoras de brotes y AIB como enraizante.

Por otra parte, en el microbioma de la rizósfera de suelos nativos, se encuentran microorganismos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR por sus siglas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Salvador et al.(2019) y son aisladas de diferentes ambientes (Sathya et al., 2017) ,como lo demostraron Tolba et al.(2019) en la rizósfera de *Salicornia europaea* L. y *Cucumis sativus* L.; Narovia y Hernández (2007) en cultivo de arroz ; Aly et al.( 2012) en la rizósfera de algodón cultivado en suelos salinos y también en suelos de páramos bolivianos ( Benavides y Hernández (2008).

Los géneros microbianos como *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia* entre otros constituyen parte de la comunidad microbiana de los suelos nativos y en cultivo (Figueroa (2004); Benavides y Hernández (2008); Sathya et al. (2017).

Las PGPR forman asociaciones simbióticas benéficas con la rizósfera de las plantas y poseen capacidades fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, minerales del suelo y productoras de Ácido Indol Acético (AIA) (Siles et al., 2014).

Existen diferentes trabajos realizados al respecto, tal como lo indica Figueroa (2004) con *Methylobacterium mesophilicum* y *Pseudomonas syringae* que promueven la absorción de compuestos nitrogenados degradados por estas bacterias y asimilados por las plantas. Las PGPR influyen en el crecimiento y estabilidad de las plantas por las capacidades indicadas anteriormente.

Las *Pseudomonas* constituyen un género que se emplea en las inoculaciones de varios cultivos, tales como *Pseudomonas stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. mendociana* y *P. putida* fueron inoculadas por Romero (2018) sobre las coronas de *Asparagus officinalis* L ( espárrago), registrando índices de efectividad de 73.47% con *P. putida* a los 60 días de instalado el ensayo. También midió la altura de plántulas logrando un crecimiento de 18.33 cm a diferencia de las inoculaciones con el testigo químico que llegó a 10.52 cm. Teniendo relación directa el crecimiento en longitud con las inoculaciones de cualquier especie correspondiente al género bacteriano de *Pseudomonas*, siendo este género aislado e identificado en la presente investigación y que se demostró que la cepa A 21 del género *Pseudomonas* como la cepa más sobresaliente en el crecimiento de *C. officinalis*.

El potencial de *Pseudomonas* y otros como *Bacillus*, es como biofertilizantes, tal como lo sugiere Alvarado et al., (2014); Moreno et al., (2018) por brindar mayor estabilidad a los mini tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* cv. Romano) durante los 90 días de evaluación, igual comportamiento se pudo observar en la presente investigación con *Pseudomonas* y que a pesar de ser géneros diferentes mostraron la misma característica de brindar mayor beneficio a las plántulas de *C. officinalis* durante el crecimiento en invernadero. Generalmente la forma de interacción de las PGPR entre ellas *Pseudomonas* es atravesando la corteza de la raíz hasta el sistema vascular de manera endofítica, viviendo en tallos, hojas y raíz, lo que origina una gran biomasa microbiana y expansión del sistema radicular que le permite incorporar nutrientes del suelo hacia el interior de la planta (Narovia y Hernandez, 2007).

Las *Pseudomonas* también tienen la capacidad de producir antibióticos, quitinasa, glucanasa, sideróforos, amoniacos, pigmentos fluorescentes, antifúngicos y en fitorremediación de Pb (Benjumeda, 2017).

Diferentes especies de este género bacteriano ha sido estudiado por sus cualidades tal como lo evidencia Sánchez y Pérez (2018) que trabajó con inoculaciones de *Pseudomonas denitrificans* observándose un incremento en altura de planta después de 60 días de evaluación arrojando valores de AIA de 67,93  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , que difieren con los resultados obtenidos con AIA 31.3  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  , sin embargo estos valores se refieren a una especie diferente a la estudiada.

En el proceso de aislar cepas que produzcan ácido indolacético, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno a la vez, siendo inoculadas en plántulas de *C. officinalis*, se obtuvo un resultado favorable entre la interacción de la bacteria y la planta, la cepa A21 correspondiente al género *Pseudomonas* sobre la altura de *C. officinalis*.

En la investigación se trabajó con 73 cepas aisladas de los árboles de la rizósfera de *C. officinalis* de la región Lambayeque, 29 de ellas tuvieron la capacidad de producir AIA, y 5 de las mismas se evaluaron en condiciones de invernadero en plantas de *C. officinalis* ex vitro, resultando *Pseudomonas* como la mejor cepa que promovió mayor altura a las plántulas estudiadas. Resultados similares evidenció Flores et al.,(2012), en su trabajo con semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) siendo inoculadas con *Pseudomonas luteola* y *Aeromonas hydrophila* a la vez, obteniéndose una mayor longitud en la radícula de la semilla inoculada además de dar vigorosidad a las plántulas de frijol; por lo que se demuestra que hay géneros como *Pseudomonas* que incrementan la longitud de las plantas. A diferencia de los resultados con la investigación, Suárez (2018), identificó cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Streptomyces* aisladas de la rizósfera de *C. capuli* L. Andersson y *C. lancifolia* Mutis reportando un incremento del 23.3% de longitud de las raíces y en la altura de las plantas, un porcentaje menor arrojó la investigación reportándose un incremento del 13.5% en la altura de *C. officinalis* con respecto al testigo.

El resultado de Suárez resultó mayor al ser inoculaciones directamente en semillas, ya que según Mejia (2014), las rápidas acciones ante la pérdida de humedad de las semillas, influyen directamente en la viabilidad y germinación. En su investigación trabajó con la inoculación de *Pseudomonas* y *Rhizobium* en placa, teniendo tres tratamientos, siendo T1 *Pseudomonas* y *Rhizobium* sobre semillas de *Chenopodium quinoa* Willd, mientras que T2 sólo *Rhizobium* y T3 sólo *Pseudomonas* con inoculaciones sobre las semillas de quinua, sin diferencia significativa entre los tratamientos, en paralelo hizo una inoculación directa entre las semillas y *Pseudomonas* arrojando un resultado favorable tanto en la germinación y crecimiento, resultados que coinciden con la investigación con respecto a la característica de producción de indoles de las PGPR, ya que resultó con un índice de AIA 37.38 ug/mL correspondiente a la cepa C2, esta característica permite el crecimiento en longitud a la planta, parámetro a tener en cuenta para la obtención de la mejor cepa.

También un problema importante en el campo es la baja concentración de fósforo orgánico disponible para las plantas, por lo que se han realizado estudios de las rizobacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Yarrowia*, entre otros (Eleonora & Pineda, 2014; Bobadilla & Rincón, 2008). En el presente trabajo, de las 73 cepas aisladas se encontraron 34 cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato y que permitieron una mayor altura de planta, la cepa A 21 del género *Pseudomonas* obtuvo el mayor valor de altura de planta.

Otro elemento importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas es el nitrógeno. El agricultor utiliza grandes cantidades de urea para suplir deficiencias de este elemento. La capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico que se han encontrado en géneros como *Rhizobium* que forman simbiosis con las raíces de leguminosas (Flores et al., 2012). En la investigación realizada de las 73 cepas aisladas, 53 cepas tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, siendo la cepa A21 del género *Pseudomonas* que obtuvo mayor altura de planta procedentes de la rizósfera de *C. officinalis*. Estos resultados nos indican de que las PGPR cumplen con las características de ser productoras de AIA, solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno atmosférico (Hernández & Torres 2018).

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones establecidas para el aislamiento de las cepas de la rizósfera de *C. officinalis* y la inoculación de las cepas seleccionadas a plántulas *in vitro* de *C. officinalis* se concluye lo siguiente:

- Las cepas con mayor producción de AIA fueron A17, A21, C2, C4 y C22 con valores de 18.08, 15.55, 37.38, 20.53 y 34.81 ug/mL respectivamente, logrando un mejor crecimiento en longitud de las plántulas de *C. officinalis*.
- La cepa A21 alcanzó la mayor altura de plántulas de *C. officinalis* para las características: solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de AIA con valores de 32.8, 36.2 y 31.3 cm superando al Testigo para las mismas características que obtuvo valores de 24.3, 18.1 y 16.3 cm respectivamente.
- Las cepas A3, A4, A5 y C2 que alcanzaron la mayor capacidad solubilizadora de fosfato y las cepas A3, A4, B8 y C14 con mayor fijación de nitrógeno resultaron inocuas para las plántulas de *C. officinalis*.
- La cepa A 21 fue identificada en el género *Pseudomonas* y obtuvo el 72.63% de índice de efectividad. Las cepas A17, C2, C4 y C22 obtuvieron índice de efectividad menores con valores de 22.89, 14.80, 2.40 y 60.9% respectivamente.
- Los plantines inoculados con las cepas A17, A21, C2, C4 y C22 no presentaron inocuidad en el invernadero, mientras que las A3, A4, B8 y C14 con mayor fijación de nitrógeno y las cepas A3, A4 y A5 con mayor solubilización de fosfato tuvieron mortandad de plantas.
- La optimización del proceso de aclimatación de *C. officinalis* se logró iniciar con la germinación y el crecimiento *in vitro*, seguido con el establecimiento de las plántulas en condiciones de invernadero.

## VI. RECOMENDACIONES

- Emplear la cepa A21 de *Pseudomonas sp.* por presentar mayor índice de efectividad, mayor producción de ácido indol acético (AIA), solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno lo que permitió un mayor crecimiento de las plántulas *in vitro* de *Cinchona officinalis* en condiciones de invernadero.
- Utilizar las cepas A17, A21, C2, C4 y C22 como consorcios bacterianos para evaluar el mejor crecimiento radicular de las plantas de *C. officinalis*.
- Utilizar como material vegetativo, brotes jóvenes de *C. officinalis* en lugar de semillas de *C. officinalis* para disminuir el tiempo de crecimiento de las plántulas *in vitro*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aly, M., El-Sabbagh, S., El-Shouny, W. y Ebrahim, M. (2003). Physiological response of *Zea mays* to NaCl stress with respect to *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces niveus*. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 6 (24), 2073-2080.
- Alvarado Capó, Y., Cruz Martín, M., Mena, E., Acosta Suárez, M., Roque, B., Pichardo, T., García Aguila, L., Jiménez Terry, F., Hurtado, O., Veitía, N., Padrón, L., & Leiva-Mora, M. (2015). Efecto de *Bacillus* spp. sobre el crecimiento y rendimiento agrícola de plantas in vitro de papa cv. 'Romano' en casa de cultivo. *Bioteconología Vegetal*, Vol. 15, No. 2, 115 – 122. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/18/889>
- Benavides, G., & Hermida, A. (2008). *Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz verde y Guasca (Cundinamarca)*. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/8610>
- Benjumeda, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal : Mecanismos y aplicaciones*. Recuperado de: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%D1OZ,%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture : An Introductory Text*. Recuperado de: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bobadilla, C., & Rincón, S. (2008). *Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza*. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8433/tesis130.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Campos, O. (2018). *Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagación de la Cinchona pubescens vahl “cascarilla.”*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Jaén, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/55>
- Ccaico, S. (2017). *Condiciones que incrementan la germinación de semillas y el vigor de plantines de Cinchona krauseana L . Andersson y C . calisaya Wedd . ( Rubiaceae )* . Tesis de pregrado no publicado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Perú.
- Colina, E., Santana, D., Castro, C., Cadena, D., Sotomayor, A., & Galazar, E. (2017). *Microorganismos fijadores de nitrógeno y su acción complementaria a la fertilización química en el cultivos de Coffea arabica L .*, No 13(3), 211–222. Recuperado de: <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v13n3p211>
- Dávila, L., & Marcelo, F. (2019). *Identificación y selección de árboles semilleros de Cinchona officinalis L. (quina) en el distrito de Querocoto, Chota – Cajamarca*. Tesis de pregrado. <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/3467>
- Eleonora, M., & Pineda, B. (2014). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth*. *Corpoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria*, No 15, 101–113. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>

- Espinosa, C., & Ríos, G. (2014). *Patrones de crecimiento de Cinchona officinalis in vitro y ex vitro; respuestas de plántulas micropropagadas y de semillas*. Revista Ecuatoriana de Medicina Y Ciencias Biológicas, Vol. 35, Nº. 1-2, 2014, págs. 73-82. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6537271>
- Fernández, K., Fernández, F., & Olalde, R. R. V. (2010). *Micorrización in vitro e in vivo de plántulas de papa ( Solanum tuberosum var . Alfa )*. Cultivos tropicales, Vol.31, No.2. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000200004&lng=es&tlng=es).
- Figuerola, J. (2004). *Fijación biológica de nitrógeno*. Revista UDO Agrícola 4(1), 1–20. Recuperado de: [Dialnet-FijacionBiologicaDeNitrogeno-2221548.pdf](http://dialnet-FijacionBiologicaDeNitrogeno-2221548.pdf)
- Flores, A., Contreras, J., & Humberto, M. (2012). *Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género Azotobacter*. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, Vol 4, No. 8. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/274638164>
- Flores, A., Ferrufino, L., & López, V. (2019). *Viabilidad de semillas de guayacán (Guaiacum sanctum L., Zygophyllaceae) posterior a dos tratamientos pregerminativos*. Portal De La Ciencia, (16), 25-37. Recuperado de <https://doi.org/10.5377/pc.v0i16.8093>
- González, R. A. (2016). *Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, España. Recuperado de: [http://oa.upm.es/39541/1/ROSA\\_ENITH\\_ARMIJOS\\_GONZALEZ.pdf](http://oa.upm.es/39541/1/ROSA_ENITH_ARMIJOS_GONZALEZ.pdf)
- Hernández, E. J., & Torres, M. (2018). *Caracterización in vitro de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en chile*. Revista mexicana ciencias agrícolas Vol.9, n.3, pp.525-537. Recuperado de: <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.335>.
- Huamán, L., Alb, J., & Chilquillo, E. (2019). *Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la quina ( Cinchona officinalis) en el norte de Perú*. Scielo Perú, vol.18 no.2. Recuperado de: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i2.1333>
- Villar, M. Marcelo, F. Baselly, Juan (2018). *Estudio silvicultural de la quina Cinchona officinalis L.* Recuperado de: <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/inia/887>. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Recuperado de: <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/inia/887>
- Lima, N., Moreno (2016). *Procesos biotecnológicos para la propagación in vitro de Cinchona officinalis L., a partir de diferentes fuentes del material vegetal*. Tesis de pregrado publicada. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Lima, N., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., Darlin, G., Yaguana, M., & Valarezo, C. (2018). *Propagación in vitro de Cinchona officinalis L a partir de semillas*. Revista Scielo, vol.20, no.2, 1–24. Recuperado de <https://doi.org/10.18271/ria.2018.361>
- Mantilla, L., Anaya, V., Zumaqué, O., Eliécer, L., (2007). *Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos . Córdoba , Colombia*. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 9, núm. 2, pp. 6-14. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690202>
- Mejia, F. (2014). *Factores que influyen en la germinación de semillas de 6 especies del género Cinchina( Rubiaceae) en el Perú*. Tesis de pregrado no publicado. Universidad Mayor de San

Marcos, Perú.

- Moreno, Alejandro;García,Verónica;Reyes, J., & Vásquez, Jesús;Cano, P. (2018). *Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal : una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable*. Revista Colombiana Biotecnológica. Vol XX , No 1, 68–83. Recuperado de <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno, J. (2016). *Propagación in vivo de Cinchona officinalis L. A partir de material vegetal sexual y asexual, con fines de conservación de la especie*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Jaén, Perú. Recuperado de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/10270>
- Narovis, Y., & Hernández, A. (2007). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.) perspectivas de su uso en Cuba*. Cultivos Tropicales, vol. 28, núm. 2, pp. 29-38. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193217731004.pdf>
- Nina, T. (2019). *Efecto de la inoculación de bacterias PGPR Pseudomonas sp. y Rhizobium sp. en el cultivo de la quinua ( Chenopodium quinoa Willd .)* Tesis pregrado. Universidad Nacional de Altiplano de Puno, Perú. Recuperado de: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/12305/Nina\\_Larico\\_Tania\\_Pilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/12305/Nina_Larico_Tania_Pilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Pérez, U., Ramírez, M., Zapata, Y., & Córdoba, J. (2015). *Efecto de la inoculación simple y combinada con hongos formadores de micorriza Arbuscular ( HFMA ) y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal ( BPCV ) en plántulas micropropagadas de mora ( Rubus glaucus L .)* Corpoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria, Vol 16, No 1, pp 95–103. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v16n1/v16n1a09.pdf>
- Romero, K. (2017). *Especies de Pseudomonas aisladas de rizoplano y rizósfera de Asparagus officinalis L . y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas*. Tesis de pregrado no publicada. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Salvador, M., Soto, J., Quevedo, J., & Giler, L. (2019). *Obtención de consorcios microbianos benéficos y su incidencia en la población microbiana nativa de la rizósfera de plantas de fresa ( Fragaria sp.)*. Polo del conocimiento,Vol. 4, No 11. Recuperado de: <https://doi.org/10.23857/pc.v4i11.1179>
- Sánchez, D., & Pérez, J. (2018). *Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de Dioscorea rotundata in vitro*. Agronomía Costarricense, Vol 42, No 2, pp 75–91. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/326027077>.
- Sasirekha, B., Shivakumar, S., & Sullia, S. B. (2012). *Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid ( IAA ) production by Pseudomonas aeruginosa and demonstration of enhanced plant growth promotion*. Revista Scielo, Vol12, No 4, pp 863–873. Recuperado de : <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012005000038>.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R. y Gopalakrishnan, S. (2017). *Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes*. 3 *Biotech*, 7, 1 - 10. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0736->
- Sharon, J. A., Hathwaik, L. T., Glenn, G. M., Imam, S. H., & Lee, C. C. (2016). *Isolation of*

*efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth*. Revista Scielo vol.16, n.2, pp.525-536. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000043>

- Siles Carvajal, A., & Manyani, H. (2014). *Búsqueda de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) y evaluación de sus potencialidades en condiciones de cultivo*. Biosai: Revista de los másteres de biotecnología sanitaria y biotecnología ambiental, industrial y alimentaria, Vol, No 3. Recuperado de <https://www.upo.es/revistas/index.php/biosaia/article/view/925>.
- Suárez Torres, J. A. (2018). *Caracterización de las semillas de Cinchona capuli L. Andersson y C. lancifolia Mutis y el efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la germinación y la formación de plántulas*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos <https://hdl.handle.net/20.500.12672/8440>.
- Thakur, A., & Parikh, S. (2017). *Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria associated with groundnut rhizosphere*. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR) Vol. 6, No 5. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/313443450>
- Tolba, S., Ibrahim, M., Amer, E. y Ahmed, D. (2019). First insights into salt tolerance improvement of Stevia by plant growth-promoting *Streptomyces* species. *Archives of Microbiology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01696-y>
- De la Torre L, P. Muriel, H. Balslev (2006). *Etnobotánica en los Andes del Ecuador L. Botánica Económica de los Andes Centrales*. Ecuador. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/228584502>
- Vilchez, G. (2017). *Capacidad antogonista y promotora del crecimiento vegetal de rizobacterias aisladas del cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. Tesis de pregrado no publicada. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú. Recuperado de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2681/P34-V5-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villalobos Jiménez, C. A. (2019). *Efecto antibacteriano in vitro de los extractos etanólicos de Cinchona officinalis (cascarilla) y Solanum nigrum (hierba mora) sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923*, 0–2. Universidad César Vallejo, Piura, Perú. Recuperado de: <https://doi.org/10.23857/pc.v4i11.1179>
- Villar Cabeza, M. A.; Marcelo Bazán, F. E.; Baselly Villanueva, J. R. (2018). *Estudio silvicultural Cinchona officinalis L*. INIA Estación Experimental Agraria Baños del Inca - Cajamarca. Recuperado de: <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/887>
- Zevallos, P. A. (1989). *Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Perú*. Recuperado de: <https://doi.org/10.14814/phy2.13284>

## ANEXOS

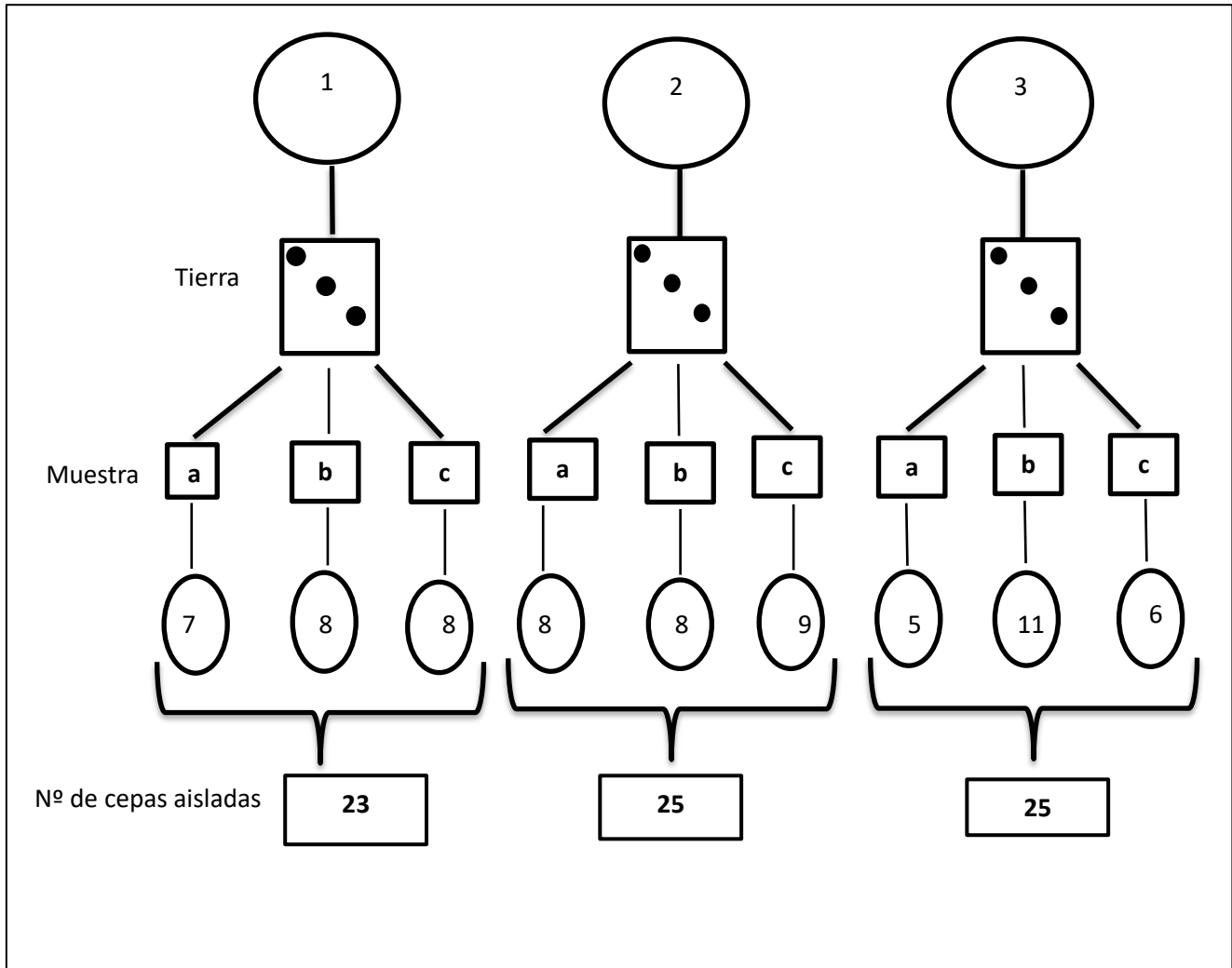
### ANEXO 01

Se observa el diseño experimental de tipo factorial 5 x 3; usados para las pruebas de análisis de varianza ANOVA.

CEPAS	CAPACIDADES			Repeticiones experimentales para evaluar el efecto en la altura de plantas de <i>Cinchona officinalis</i> .
	Solubilizadora de fosfato	Fijación de nitrógeno	Productora de ácido indolacético	
A17	✓	✓	✓	03
A21	✓	✓	✓	03
C2	✓	✓	✓	03
C4	✓	✓	✓	03
C22	✓	✓	✓	03
CONTROL	-	-	-	03
TOTAL	18			

## ANEXO 02

Diagrama del número de cepas bacterianas aisladas de muestras de tierra de cultivo con crecimiento de 3 árboles de *Cinchona officinalis* utilizadas en la inoculación del material vegetal.



### ANEXO 03

ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
A17	3	44.8	14.93333333	0.063333333
A21	3	100.3	33.43333333	6.303333333
C2	3	66.7	22.23333333	8.163333333
C4	3	59.5	19.83333333	1.743333333
C22	3	93.5	31.16666667	4.623333333
CONTROL	3	58.7	19.56666667	17.61333333
Solubilizadoras de fosfato	6	144	24	39.668
Fijación de N	6	138.1	23.01666667	73.55766667
Productoras AIA	6	141.4	23.56666667	58.40666667

## ANEXO 04

Análisis de varianza entre las 5 cepas PGPR en la altura de *C. officinalis* a los 30 días

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
CEPAS	784.056111	5	156.811222	21.161	5.03617E-05	3.3258345	<b>SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CEPAS</b>
CAPACIDADES	2.91444444	2	1.45722222	0.1966	0.824586586	4.102821	
Error	74.10555556	10	7.41055556				
Total	861.076111	17					



Órgano floral y hojas de *C. officinalis*

## ANEXO 05

Composición química de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) utilizado en el cultivo *in vitro* de *C. officinalis*.

Solución Madre N°	Constituyentes químicos	Concentración (mg/L)	Volumen de la Solución Madre/Litro Medio Basal* (ml)
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,0
	KNO <sub>3</sub>	1900	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	
2	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	1,0
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
3	KI	0,83	1,0
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,0	3,0
5	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	5,0
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	
6	Tiamina.HCl	0,4	1,0
7	Mio-Inositol	100	12,5

Fuente: Guía de estudio para el cultivo de meristemas de yuca (Roca, 1980) del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali - Colombia.

## ANEXO 06

Composición química de medio Jensen para las pruebas de fijación de nitrógeno.

<b>Constituyentes químicos</b>	<b>Concentración(g/L)</b>
CaHPO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl <sub>3</sub>	0,1 g
Agar	15,0 g
Elementos trazas	1 ml

Composición química de medio Burk's para las pruebas de fijación de nitrógeno

<b>Constituyentes químicos</b>	<b>Concentración(g/L)</b>
Sacarosa	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16
CaSO <sub>4</sub>	0,05
NaCl	0,2
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	0,2
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0029
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.027
MOPS	1,42

Composición química de agar de Pikovskaya para las pruebas solubilización de fosfato

<b>Constituyentes químicos</b>	<b>Concentración(g/L)</b>
Extracto de levadura	0,500
Dextrosa	10,000
Fosfato de calcio	5,000
Sulfato de amonio	0,500
Cloruro de potasio	0,200
Sulfato de magnesio	0,100
Sulfato de manganeso	0,0001
Sulfato ferroso	0,0001
Agar	15,000



### ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 011-2021-FCCBB-UI

Siendo las 10:00 horas del día 18 de agosto de 2021, se reunieron vía plataforma virtual meet: [meet.google.com/iji-ioko-nzw](https://meet.google.com/iji-ioko-nzw), los Miembros de Jurado evaluador de la tesis titulada **"Influencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la aclimatación de plántulas de *Cinchona officinalis*. Lambayeque – Perú. 2019"**, designados por Resolución N°047-2019-FCCBB/D de fecha 12 de febrero de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes: Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes -Presidente, Dra. Olga Victoria Francia Arana -Secretaria, MSc. Josefa Ecurra Puicón -Vocal, Dr. César Estela Campos- Asesor.

Que según Resolución N°128-2021-VIRTUAL-ACP-FCCBB/D, de fecha 14 de agosto de 2021, se autoriza la **SUSTENTACIÓN Virtual** de la Tesis titulada: **"Influencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la aclimatación de plántulas de *Cinchona officinalis*. Lambayeque-Perú. 2019"**, a cargo de la Bachiller **NUVIA JAQUELINE QUESQUÉN ESQUEN**, el día 18 de agosto del presente año, a horas 10:00 a.m., mediante la plataforma virtual Google Meet.

La Tesis fue presentada y sustentada por la Bachiller Nuvia Jaqueline Quesquén Esquen y tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (18) (MUY BUENO) en la escala vigesimal.

Por lo que queda APTA para obtener el título profesional de Licenciada en Biología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 11:40 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes  
Presidente

Dra. Olga Victoria Francia Arana  
Secretaria

MSc. Josefa Ecurra Puicón  
Vocal

Dr. César Estela Campos  
Asesor

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE  
ORIGINALIDAD DE TESIS**

Yo, CESAR ESTELA CAMPOS, Asesor de tesis de la estudiante NUVIA JAQUELINE QUESQUEN ESQUEN.

Dejo constancia:

Que, la Tesis Titulada: "Influencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la aclimatación de plántulas de *Cinchona officinalis* .Lambayeque-Perúu.2019.". luego de la revisión del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 11% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. Según lo observado y entender la tesis en este informe parcial (resultados) cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 6 de Enero del 2021



---

Dr. CESAR ESTELA CAMPOS  
DNI :16575898

# INFLUENCIA DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Cinchona officinalis*. LAMBAYEQUE – PERÚ. 2019

## INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[repositorio.unc.edu.pe](https://repositorio.unc.edu.pe)

Fuente de Internet

2%

2

[repositorio.lamolina.edu.pe](https://repositorio.lamolina.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

3

[repositorio.unj.edu.pe](https://repositorio.unj.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

4

[cybertesis.unmsm.edu.pe](https://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

5

ANTONIO GARCIA PITARCH. "Nuevos variantes somaclonales en Ficus Benjamina, Ficus lyrata, Ficus Elástica, Syngonium y Spathiphyllum.", Universitat Politècnica de Valencia, 1999

Publicación

1%

6

Submitted to The American School of The Hague

<1%

7	<b>Submitted to Saint Stephen's College</b> Trabajo del estudiante	<1 %
8	<b>www.readylicious.com</b> Fuente de Internet	<1 %
9	<b>estudogeral.sib.uc.pt</b> Fuente de Internet	<1 %
10	<b>documentop.com</b> Fuente de Internet	<1 %
11	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<1 %
12	<b>repositorio.ucv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<1 %
13	<b>dspace.ucuenca.edu.ec</b> Fuente de Internet	<1 %
14	<b>Submitted to 94839</b> Trabajo del estudiante	<1 %
15	<b>Submitted to Northcentral</b> Trabajo del estudiante	<1 %
16	<b>www.pb-itms.org</b> Fuente de Internet	<1 %
17	<b>archive.org</b> Fuente de Internet	<1 %

18 Francisco David Moreno-Valencia, Miguel Ángel Plascencia-Espinosa, Jesús Muñoz-Rojas. "Aislamiento y selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para su aplicación en especies forestales", Mexican Journal of Biotechnology, 2018  
Publicación

---

19 Submitted to Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Trabajo del estudiante

---

20 Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León  
Trabajo del estudiante

---

21 Chun-Hui Hsiao. "Solution of variational problems via Haar orthonormal wavelet direct method", International Journal of Computer Mathematics, 7/1/2004  
Publicación

---

22 [repositorio.minagri.gob.pe](http://repositorio.minagri.gob.pe)  
Fuente de Internet

---

23 Guilherme Grodzki Oliveira Figueiredo, Valeria Rosa Lopes, Ricardo Cancio Fendrich, Vivian Jaskiw Szilagyi-Zecchin. "Chapter 1 Interaction Between Beneficial Bacteria and Sugarcane", Springer Science and Business Media LLC, 2017  
Publicación



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Nuvia Jaqueline Quesquen Esquen
Título del ejercicio:	Tesis de pregrado
Título de la entrega:	INFLUENCIA DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO...
Nombre del archivo:	TURNITIN_-NUVIA.docx
Tamaño del archivo:	8.71M
Total páginas:	52
Total de palabras:	9,972
Total de caracteres:	50,111
Fecha de entrega:	24-may-2021 08:41 a.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega...	1593151072

### INTRODUCCIÓN

En el suelo encontramos una gran diversidad microbiana, sobresaliendo dentro del grupo las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Estas son responsables de regulaciones biológicas y bioquímicas esenciales, tales como la fijación de nitrógeno y la síntesis de hormonas y fitohormonas en las plantas, importantes para el crecimiento y establecimiento de comunidades vegetales. La investigación comenzó en mostrar cómo interactúan la biología de las plantas de *C. officinale* mediante bacterias promotoras del crecimiento de cultivo del Instituto Calicut, según Lambregts. Se persigue además las otras mejores especies, identificándose en plantas a la que afecta un mayor crecimiento en longitud a las plantas in vitro y en condiciones de invernadero durante un período de 30 días. Obteniendo en plantas y *Proteobacteria* y bacterias *Impatiens* en el suelo agrícola ya que pueden ser usadas como biofertilizantes en diferentes cultivos, mejorando así las nuevas prácticas agrícolas dentro de una agricultura sostenible.

Esperando poder obtener mejores resultados con cultivos de *C. officinale* que fueron introducidos en suelo que mediante la técnica biotecnológica de micropropagación clonal in vitro, permitiendo mejorar un banco de genotipos de la planta nativa y otros cultivos provenientes de plantas con las mismas características genéticas y morfológicas.

Entre estas bacterias promotoras del crecimiento, son propias de nuestra región Lambregts, obtenidas de suelo nativo del distrito de Calicut, formando parte del grupo de bacterias hidróticas.

Por lo que se plantea el siguiente problema ¿Cuál es la influencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la colonización de plantas de *C. officinale*?

El objetivo general fue: Determinar la influencia de bacterias promotoras del crecimiento de *C. officinale*. Los objetivos específicos fueron seleccionar las 3 cepas con mayor producción de ácido indolacético con mayor producción de solubilizantes de fosfatos y promover el crecimiento de nitrógeno solo en cultivos de plantas de *C. officinale* y de las cepas promotoras del crecimiento vegetales in vitro de plantas de *C. officinale* en 30 días, identificar algunas bacterias que resulten más eficientes en el crecimiento en longitud de *C. officinale* y finalmente optimizar el proceso de colonización de *C. officinale* en condiciones de invernadero. La hipótesis planteada fue: Las bacterias promotoras del