



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN MANEJO FORESTAL SOSTENIBLE

Proyecto de investigación y desarrollo
previa la obtención del Grado
Académico de Magíster en Manejo
Forestal Sostenible.

TEMA

**MICROORGANISMOS EFICIENTES DE ESPECIES FORESTALES DE
LA PROVINCIA DE LOS RIOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO
DE *Citrus reshni* (MANDARINA CLEOPATRA).**

Autora

Ing. Nadia Carolina Aldaz Borja

Asesor

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Ecuador

Año 2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN MANEJO FORESTAL SOSTENIBLE

Proyecto de investigación y desarrollo
previa la obtención del Grado
Académico de Magíster en Manejo
Forestal Sostenible.

TEMA

**MICROORGANISMOS EFICIENTES DE ESPECIES FORESTALES DE
LA PROVINCIA DE LOS RIOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO
DE *Citrus reshni* (MANDARINA CLEOPATRA).**

Autora

Ing. Nadia Carolina Aldaz Borja

Asesor

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Ecuador

Año 2019

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. **Hayron Fabricio Canchignia Martínez**, en calidad de Director de Proyecto de Investigación, previa la obtención del grado académico de Magíster en Manejo Forestal Sostenible.

CERTIFICA

Que la Ing. Nadia Carolina Aldaz Borja autora de tesis titulada: “MICROORGANISMOS EFICIENTES DE ESPECIES FORESTALES DE LA PROVINCIA DE LOS RIOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE *Citrus × reshni* (MANDARINA CLEOPATRA)”, ha sido revisada en todo sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

Atentamente;


Ing. Hayron Canchignia Martínez PhD.

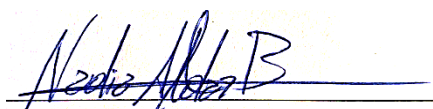
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Nadia Carolina Aldaz Borja**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Atentamente;



Ing. Nadia Carolina Aldaz Borja

Autora

DEDICATORIA

A Dios, por las fuerzas y determinación en mi vida para realizar mis metas y objetivos propuestos.

A mi madre Lic. María Borja, por darme las fuerzas y valentía en mi vida, motivándose cada día a superarme personal y profesionalmente.

A mis hermanas Jimena Aldaz y Jessica Borja, que han sido un pilar de apoyo fundamental para lograr mi objetivo.

A mis hijos Jhoan, Jhoany y Nicolás, por ser mi principal motivación para lograr ser lo que soy ahora.

A mi compañero y amigo Edgar Quintana que sin esperar nada a cambio ha compartido conmigo tristezas, frustraciones, alegrías y logros, por su apoyo para poder lograr mis objetivos.

Nadia Carolina Aldaz Borja

AGRADECIMIENTOS

Como autora de la presente investigación quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A mi Director del Proyecto de Investigación Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su enseñanza, apoyo y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A mi padre William Aldaz y abuela Clara Vega por ser las personas que me han apoyado para concluir mi vida profesional.

A mis amigos y compañeros que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

A los docentes de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, que forjaron mis conocimientos, enseñanzas y por apoyo para la culminación de este trabajo de investigación.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjo mis conocimientos.

Nadia Carolina Aldaz Borja

PRÓLOGO

La diversidad de microorganismo que colonizan la rizósfera, es en muchas ocasiones poco estudiados con fines de aprovechamiento y su consiguiente aplicación en diferentes áreas o procesos del ciclo de producción ya sea de especies forestales o agrícolas. En el caso de la mandarina Cleopatra por ser muy apreciada por sus características productivas y de resistencia, merece la exploración de dichos organismos rizosféricos para potenciar su desarrollo, siendo esto un factor preponderante a nivel de plántulas, porque de su desarrollo inicial depende su éxito en campo abierto.

Las rizobacterias del género *Bacillus* y *Rhizobium* coexisten en hábitat de *Inga edulis* y *Samanea saman*, es por ello que la presente investigación apuntó hacia el aislamiento exitoso de cepas de dichos géneros para luego combinarlos en tratamientos de aplicación tanto en semillas como en plántulas de mandarina Cleopatra, para de este modo cuantificar su influencia en indicadores de crecimiento y desarrollo de plántulas. De este modo se ofrece una alternativa para potenciar la interacción benéfica planta-microorganismo a fin de potenciar la germinación y desarrollo de semillas inoculadas y proveer un tratamiento de aplicación en plántulas, aprovechando así dichas bacterias que comúnmente pasan desapercibidas, ya que se recurre convencionalmente a la aplicación de fertilización química en especies agrícolas, y a aprovechar la madera de especies forestales.

Por otro lado, los cítricos se han llegado a considerar como frutas universales, teniendo diferentes usos tanto para consumo directo e indirecto, a la vez que en cualquiera de las variantes de su consumo traen consigo múltiples beneficios para sus consumidores, es por ello que no se puede dejar de lado la adopción de técnicas de manejo y nutrición de dichos cultivos, para de esta manera contribuir significativamente al aseguramiento de la sostenibilidad de los mismos.



Ing. Jaime Morante Carriel PhD.
INVESTIGADOR BIOTECNOLOGÍA

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de microorganismos eficientes desde Rizosfera de especies empleó la técnica de inmersión de las muestras en baño María a 85 grados centígrados por 10 minutos y luego inoculadas en medio King B sólido, para el caso de Rizobacterias del género *Rhizobium* medio de cultivo YMA. Una vez aislados dichos microorganismos de cada una de las especies forestales se procedió a la caracterización morfológica y bioquímica de cada una de las rizobacterias aisladas. Los microorganismos eficientes aislados a partir de dichas especies fueron inoculados y evaluados en pruebas individuales y consorcios de los mismos sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas a nivel de vivero de mandarina cleopatra (*Citrus × reshni*), especie de gran interés por ser usada como portainjerto o patrón debido a sus ventajas entre las cuales se destacan: mayor desarrollo radical, vigor y resistencia a enfermedades y sobre la cual se injertan una gran variedad de especies cítricas de interés comercial en la zona. Esto posibilita la determinación de microorganismos eficientes más promisorios para su aplicación en el desarrollo de este tipo de plantas, así como la especie forestal que presenta los microorganismos eficientes más efectivos.

Palabras clave:

Microorganismos eficientes, especies forestales, *Bacillus*, *Rhizobium*, mandarina cleopatra, inoculación.

ABSTRACT

Isolation of efficient microorganisms from Rizosfera of forest species present in the Quevedo area such as Saman (*Samanea saman*), Pechiche (*Vitex cymosa*) y Guabo (*Inga edulis*) with emphasis on rhizobacteria of the genus *Bacillus* and *Rhizobium*. For the isolation of bacteria of the *Bacillus* genus the immersion technique of the samples in a water bath at 85 degrees centigrade in triplicate will be used, in the case of rhizobacteria of the genus *Rhizobium* YMA medium. Once these microorganisms are isolated from each of the forest species, the morphological characterization will be carried out, as well as the respective biochemical tests depending on the possible species to be characterized. The efficient microorganisms isolated from these species will be inoculated and evaluated in individual tests and consortiums on the seed germination and development of seedlings at nursery level Cleopatra mandarin (*Citrus × reshni*), a species of great interest to be used as rootstock or pattern due to its advantages such as: greater radical development and resistance to diseases and on which are grafted a variety of citrus species of commercial interest in the area. This will allow the determination of efficient microorganisms more promising for their application in the development of this type of plants as well as the forest species that presents the most effective efficient microorganisms.

Keywords: Efficient microorganisms, forest species, *Bacillus*, *Rhizobium*, cleopatra mandarin, inoculation.

TABLA DE CONTENIDO

Portada	i
Copia de portada	iii
Certificación de Culminación del Proyecto de Investigación.....	iv
Declaración de autoría y cesión de derechos	v
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos	vii
Prólogo	viii
Resumen.....	ix
Abstract	x
Tabla de contenido.....	xi
Índice de tablas	xvi
Índice de gráficos.....	xvi
Índice de anexos.....	xviii
Introducción	1
CAPÍTULO I. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.1. Ubicación y contextualización de la problemática	5
1.2. Situación actual de la problemática	6
1.3. Problema de investigación.....	8
1.3.1. Problema general	8
1.3.2. Problemas derivados.....	8
1.4. Delimitación del problema	8
1.5. Objetivos.....	9
1.5.1. Objetivo general	9
1.5.2. Objetivos específicos.....	9
1.6. Justificación	10

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Fundamentación conceptual	13
2.1.1. Mandarina Cleopatra (<i>Citrus reshni</i>).....	13
2.1.2. Interacción de microorganismos con especies forestales	13
2.1.3. Especie forestal.....	14
2.1.4. Especies forestales leguminosas	14
2.1.4.1. Samán (<i>Samanea saman</i>).....	14
2.1.4.2. Guabo (<i>Inga edulis</i>).....	15
2.1.5. Microorganismos eficientes.....	16
2.1.6. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's)	17
2.1.7. Producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal	17
2.1.8. <i>Bacillus sp</i>	18
2.1.8.1. Mecanismos de Acción.....	18
2.1.9. <i>Rhizobium sp</i>	19
2.1.9.1. <i>Rhizobium</i> en especies forestales.....	19
2.2. Fundamentación teórica.....	20
2.2.1. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de <i>Eucalyptus nitens</i>	20
2.2.2. Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de <i>Anacardium Excelsum</i>	21
2.2.3. Rol de los microorganismos activos, aislados de la rizósfera y filósfera en la propagación de las especies forestales <i>Tabebuia chrysantha</i> y <i>Tabebuia billbergii</i> , con fines de conservación y explotación comercial	22
2.2.4. Promoción del crecimiento en especies forestales para su adaptación y reforestación	23
2.3. Fundamentación legal	24
2.3.1. Constitución Política del Ecuador	24

2.3.2.	Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad	25
2.3.3.	Decisión 486 del régimen común sobre propiedad industrial	27
2.3.4.	Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura	28
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		29
3.1.	Tipo de investigación.....	30
3.1.1.	Experimental	30
3.2.	Métodos de investigación	30
3.2.1.	Inductivo	30
3.2.2.	Deductivo	30
3.2.3.	Analítico.....	30
3.3.	Construcción metodológica del objeto de investigación	31
3.3.1.	Muestra.....	31
3.3.2.	Técnicas de investigación	31
3.3.2.1.	Observación científica	31
3.3.3.	Instrumentos de investigación.....	31
3.3.3.1.	Ficha de campo	31
3.3.3.2.	Ficha de monitoreo	32
3.3.3.3.	Material virtual	32
3.4.	Recolección de la información	32
3.4.1.	Fuentes primarias	32
3.4.2.	Fuentes secundarias.....	32
3.5.	Procesamiento y análisis de la información.....	33
3.6.	Diseño de la investigación	33
3.6.1.	Diseño para evaluación de inoculación de semillas de <i>Citrus reshni</i> por los microorganismos aislados	33

3.6.2. Diseño para la evaluación del desarrollo de plántulas de <i>Citrus reshni</i> inoculadas con los aislados individuales y en consorcio	34
3.7. Manejo del experimento	35
3.7.1. Muestreo.....	35
3.7.2. Aislamiento de bacterias del género <i>Bacillus</i>	35
3.7.3. Identificación del género <i>Bacillus sp.</i>	36
3.7.4. Aislamiento de bacterias del género <i>Rhizobium</i>	36
3.7.5. Desinfección de semillas.....	37
3.7.6. Inoculación en semillas.....	37
3.7.7. Inoculación en plantas.....	38
3.8. Variables evaluadas	38
3.8.1. Altura de la planta	39
3.8.2. Peso radicular	39
3.8.3. Peso fresco foliar.....	39
3.8.4. Peso del tallo	39
3.8.5. Longitud radicular.....	39
3.8.6. Número de hojas	40
3.9. Recursos humanos y materiales.....	40
3.9.1. Material de Laboratorio	40
3.9.2. Reactivos de Laboratorio	41
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Resultados.....	43
4.1.1. Identificación de bacterias del género <i>Bacillus</i> y <i>Rhizobium</i> de especies forestales	43
4.1.1.1. Caracterización morfo química de <i>Bacillus</i>	43
4.1.1.2. Caracterización morfo química de <i>Rhizobium</i>	46

4.1.2. Evaluación del desarrollo de semillas de <i>Citrus reshni</i> inoculadas con consorcios bacterianos (<i>Bacillus</i> spp. + <i>Rhizobium</i> spp.)	49
4.1.2.1. Altura de planta	49
4.1.2.2. Peso foliar	50
4.1.2.3. Peso radicular	51
4.1.2.4. Peso del tallo.....	52
4.1.3. Evaluación del desarrollo de plántulas de <i>Citrus reshni</i> inoculadas con consorcios bacterianos (<i>Bacillus</i> spp. + <i>Rhizobium</i> spp.)	53
4.1.3.1. Altura de planta	53
4.1.3.2. Peso foliar	54
4.1.3.3. Peso radicular	55
4.1.3.4. Peso del tallo.....	56
4.1.3.5. Longitud radicular	57
4.1.3.6. Numero de hojas	58
4.2. Discusión	59
4.2.1. Mecanismos de acción de rizobacterias	59
4.2.2. Solubilización de fosfato.....	60
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
5.1. Conclusiones.....	62
5.2. Recomendaciones	62
Referencias Bibliográficas	63
ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Esquema del análisis de varianza utilizado en el primer ensayo.....	34
Tabla 2.	Esquema del análisis de varianza utilizado en el segundo ensayo	34
Tabla 3.	Cepas de <i>Bacillus</i> y <i>Rhizobium</i> obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales	43
Tabla 4.	Caracteres morfológicos y bioquímicos de cepas de <i>Bacillus</i> obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales.....	44
Tabla 5.	Caracteres morfológicos y bioquímicos de cepas de <i>Rhizobium</i> obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en la altura de plántulas de <i>Citrus reshni</i> a los 25 días después de la primera inoculación en semillas Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	50
Gráfico 2.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en el peso de hojas de de <i>Citrus reshni</i> a los 25 días después de la primera inoculación en semillas Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	51
Gráfico 3.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en peso radicular de plántulas de <i>Citrus reshni</i> a los 25 días después de la primera inoculación en semillas. Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	52
Gráfico 4.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en peso del tallo de plántulas de <i>Citrus reshni</i> a los 25 días después de la primera inoculación en semillas. Las barras de error	

	indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	53
Gráfico 5.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en la altura de plántulas de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	54
Gráfico 6.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en el peso foliar de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).	55
Gráfico 7.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en el peso radicular de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).....	56
Gráfico 8.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en el peso del tallo de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).	57
Gráfico 9.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en longitud radicular de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante.	58
Gráfico 10.	Efecto de los consorcios aislados bacterianos de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp. en número de hojas de <i>Citrus reshni</i> a los 45 días después de trasplante.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica de los cantones que consideró el ensayo Palenque, Mocache, Quevedo y Valencia.	6
Figura 2.	Caracteres morfológicos coloniales de cepas de <i>Bacillus</i> corresponden a la evaluación de las cepas a las 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) BCA1, B) BCM6, C) BGJ2, D) BGL7, E) BGR9, F) BGU1, G) BG-3, H) BSA16.	45
Figura 3.	Tinción Gram. Células bacterianas de <i>Bacillus</i> a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) BCA1, B) BCM6, C) BGJ2, D) BGL7, E) BGR9, F) BGU1, G) BG-3, H) BSA16.....	45
Figura 4.	Prueba de catalasa en células bacterianas de <i>Bacillus</i> a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido.	46
Figura 5.	Caracteres morfológicos coloniales de cepas de <i>Rhizobium</i> . Corresponden. a la evaluación de las cepas a las 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo congo. A) RIZ-4, B) RIZ-9, C) RIZ-18, D) RIZ-3, E) RIZ6, F) RIZ11, G) RIZ12, H) RIZ15.....	48
Figura 6.	Tinción Gram. Células bacterianas de <i>Rhizobium</i> a 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo Congo. A) RIZ-4, B) RIZ-9, C) RIZ-18, D) RIZ-3, E) RIZ6, F) RIZ11, G) RIZ12, H) RIZ15.....	48
Figura 7.	Prueba de catalasa. Células bacterianas de <i>Rhizobium</i> a 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo Congo.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Certificado URKUND del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.	68
Anexo 2.	Foto galería de árboles forestales.....	69
Anexo 3.	Foto galería de trabajo en Laboratorio de Biotecnología.....	70
Anexo 4.	Foto galería de trabajo en vivero	71

INTRODUCCIÓN

Las especies forestales dispone de muchos beneficios para el hombre y el ambiente, por ejemplo, la fijación del anhídrido carbónico y producción de oxígeno en el proceso fotosintético de las plantas, ayudan a mantener el agua limpia, se los utiliza como cortinas rompe vientos para la conservación de suelo, reduce la temperatura del suelo, sirven como refugio para la fauna silvestre, entre otras.

Además de embellecer el paisaje y ser aprovechada su madera, también proporciona otros beneficios los cuales no han sido explotados en su totalidad; por ejemplo, los árboles interactúan con especies de microorganismos con un enorme potencial para su uso en el área forestal y agrícola. Ya es conocido el efecto de una amplia variedad de microorganismos sobre la germinación de semillas, el crecimiento vigoroso de plantas, el antagonismo hacia diversidad de patógenos entre otros, sin embargo, son escasas las investigaciones que estudien la interacción de microorganismos eficientes aislados desde rizosfera de especies forestales y su aplicación en el campo frutícola, específicamente en la citricultura.

Especies forestales pertenecientes a la familia Fabaceae tienen una característica especial debido a la capacidad que tienen las plantas pertenecientes a esta familia de fijar Nitrógeno atmosférico mediante la asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*, entre ellas se encuentran especies como Saman (*Samanea saman*) y Guabo (*Inga edulis*). Investigaciones acerca del aislamiento de cepas de estos microorganismos desde estas especies para su evaluación en el desarrollo de cítricos es limitado.

Mediante el desarrollo de esta investigación se aisló microorganismos del género *Bacillus* y *Rhizobium* presentes en rizosfera de Samán (*Samanea saman*) y Guabo (*Inga edulis*). Y que efecto genera la aplicación en semillas pregerminadas y plántulas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni*) especie de gran importancia en la zona por su uso como portainjertos de una gran variedad de especies cítricas. El aporte de esta investigación permitirá abrir líneas de investigaciones enfocadas al uso de

microorganismos provenientes de especies forestales y su aplicación en el campo forestal.

La presente investigación se presenta en seis capítulos debidamente estructurados, ordenados de tal manera que facilite la comprensión del lector, y a la vez provea información relevante y de referencia sobre el tema de estudio.

En el capítulo I se realiza una “MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN”, partiendo del acordamiento del problema de estudio, así como de los problemas derivados de este, en base a los cuales se delimitaron los objetivos e hipótesis tanto generales como específicos, con la debida argumentación que justifica la realización del presente estudio, así como su importancia.

El capítulo II consta de una MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN, la misma que se dividió en tres marcos: conceptual, referencial y legal. El primero expone todas las conceptualizaciones importantes y afines al tema de estudio para facilitar la familiarización y entendimiento el mismo, mientras que el marco referencial expone teorías y resultados de trabajos afines al presente Proyecto de Investigación. Finalmente, el marco legal, presenta la base legal en la que se asienta el presente estudio.

En el capítulo III, denominado METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN, se dan a conocer todos los procedimientos, técnicas y métodos que se utilizaron tanto para la caracterización, identificación e inoculación de las bacterias de interés en semillas, así como en plántulas de mandarina.

Los resultados obtenidos a través del proceso investigativo plasmado en el presente documento se presentan en el capítulo IV. A la vez se realiza una discusión con investigaciones afines que dan relevancia a los resultados obtenidos y permiten la construcción de teorías y respuestas alrededor del problema de estudio.

Dentro del capítulo V se plantearon conclusiones y recomendaciones en base a los resultados obtenidos de los ensayos realizados en la presente investigación, teniendo en consideración los objetivos propuestos.

Adicionalmente se dan a conocer las diferentes referencias bibliográficas de las que se extrajo información para el presente documento. Finalmente se adjunta un apartado de anexos que dan realce y complementan la investigación realizada.

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Ubicación y contextualización de la problemática

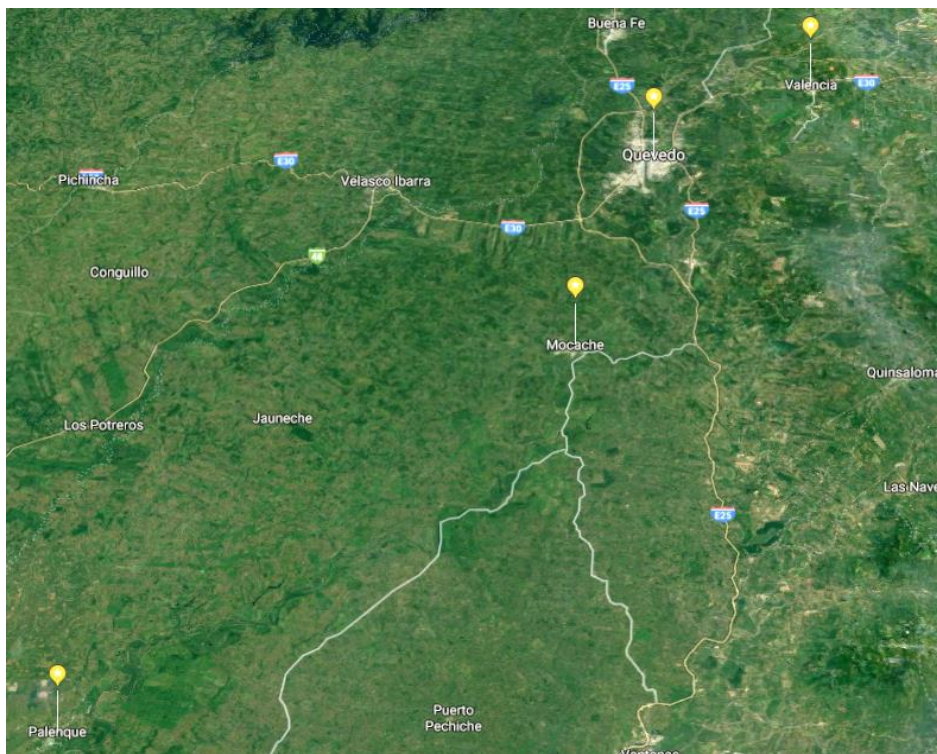
En el Ecuador debido a la diversidad climática, así como florística que existe, se han descubierto un sinnúmero de especies forestales, las mismas que han sido aprovechadas tradicionalmente, mediante la explotación y aprovechamiento de su madera. Sin embargo, no se ha dado mucho énfasis en la microbiota del suelo en el que éstas se desarrollan, dejando de lado que ésta se puede aprovechar para diferentes fines tanto fitosanitarios como estimuladores del desarrollo vegetal. La provincia de Los Ríos se caracteriza por ser propiamente agrícola, en la que las actividades del sector primario dinamizan la economía de la misma, generando fuentes de trabajo ya sea de manera directa o indirecta. En esta provincia también se cuenta con una diversidad tanto de cultivos como de especies forestales, siendo estas últimas albergadoras de un amplio rango de microorganismos que se pueden aprovechar para diferentes fines agrícolas y forestales.

La investigación se desarrolló en Quevedo cantón de la provincia de Los Ríos- Ecuador. Su cabecera cantonal es la ciudad de Quevedo. Su población es de 139.790 habitantes y tiene una superficie de 303 km². Su actividad económica principal es el comercio, la ganadería y la agricultura.

El sitio escogido para la conducción del ensayo fue el laboratorio de Microbiología del Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicada en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud

Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm. Se escogieron cuatros cantones para la extracción de muestras rizosféricas de las especies forestales en estudio: Palenque, Mocache, Quevedo y Valencia

Figura 1. Ubicación geográfica de los cantones que consideró el ensayo Palenque, Mocache, Quevedo y Valencia.



1.2. Situación actual de la problemática

La eliminación masiva de árboles debido al crecimiento de los cultivos agrícolas y el crecimiento de la ganadería contribuye al calentamiento global del planeta por la acumulación en la atmosfera de gases de efecto invernadero. El dióxido de carbono es el gas que mayor incidencia tiene en la producción de este efecto nocivo y son los árboles y las plantas quienes sirven como un remedio natural para bajar los niveles de contaminación atmosférica mediante la fijación del mismo.

Muchas de estas especies forestales pueden fijar entre 0.5 y 5 kg N/año gracias a los microorganismos presentes en la rizosfera de dichos árboles entre otros beneficios como solubilización del fósforo, descomposición de la materia orgánica, producción de reguladores de crecimiento y metabolitos secundarios que suelen ser antagonistas a muchas enfermedades fungosas y bacterianas además de nemátodos fitoparásitos, por ende los problemas asociados a la deforestación no solo tiene que ver con el impacto que este causa al medio ambiente que es sin duda el más grave, sino también con que no hay estudios suficientes de aislamiento, caracterización y posteriores pruebas de estos microorganismos que están presentes en la rizósfera de especies forestales como entre ellas se destacan el Saman (*Samanea saman*) y Guabo (*Inga edulis*) especies forestales con capacidad para asociarse con microorganismos benéficos con usos potenciales en el campo agronómico y forestal y de los cuales hay información deficiente y pocos reportes de su uso en el campo agronómico y forestal.

La mandarina Cleopatra actualmente es uno de la porta injertos más usados en la provincia de los Ríos ya que induce vigor y las especies injertadas sobre ella da fruta de mucha calidad con buen calibre además de atribuírsele tolerancia a todas las virosis conocidas. Esta variedad de mandarina es ampliamente utilizada por injertadores de la provincia como patrón por su aptitud a sequías. Además, su porte pequeño que no supera los 5.0 m, facilita la recolección de frutos, así como diferentes labores agronómicas, siendo un factor importante al momento de su selección como material de siembra.

1.3. Problema de investigación

1.3.1. Problema general

¿Qué efecto produce la aplicación de microorganismos eficientes aislados de la rizósfera *Samanea saman* e *Inga edulis* provenientes de cuatro localidades de la provincia de Los Ríos en el desarrollo de semillas y plántulas de *Citrus × reshni*?

1.3.2. Problemas derivados

- ¿Cómo se realizarán los aislamientos por microorganismo y por especie forestal?
- ¿Qué tipo de árbol presentará la mayor cantidad de microorganismos eficientes?
- ¿Cómo se realizarán las inoculaciones en las semillas y plántulas de mandarina cleopatra (*Citrus × reshni*)?

1.4. Delimitación del problema

- **Campo:** Ciencias forestales
- **Área:** Biología del suelo
- **Línea de investigación:** Desarrollo de soluciones tecnológicas para la gestión de residuos y promoción de energías alternativas.
- **Aspecto:** reforestación y preservación
- **Tiempo:** 6 meses.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Aislar microorganismos eficientes de la rizósfera *Samanea saman* e *Inga edulis* provenientes de cuatro localidades de la provincia de Los Ríos en el desarrollo de semillas y plántulas de *Citrus reshni*.

1.5.2. Objetivos específicos

- Identificar microorganismos eficientes de los géneros *Bacillus* y *Rhizobium* asociados a la rizósfera de *Samanea saman* e *Inga edulis*
- Evaluar el desarrollo de semillas de *Citrus reshni* inoculadas en respuesta a la inoculación con consorcios bacterianos.
- Determinar el efecto de la inoculación con consorcios bacterianos sobre el desarrollo de plántulas de *Citrus reshni*.

1.6. Justificación

La siembra de árboles tanto frutales como maderables es gran beneficio para el medio ambiente y causa un impacto económico en las familias en el transcurso de los años.

La falta de estudios acerca de la biodiversidad presente en la rizosfera de un gran número de especies forestales, limita la explotación de microorganismos benéficos que pueden ser usados en especies forestales y agrícolas.

Es conocido el efecto de una gran variedad de microorganismos que favorecen la germinación de semillas de diversas especies, crecimiento de plántulas, antagonismo a ciertos fitopatógenos por producción de antibióticos, producción de reguladores de crecimiento entre otras, pero dichos microorganismos en su mayoría son aislados de especies agrícolas y utilizados en cultivos desde donde originalmente fueron aislados.

Son muy pocos los reportes del uso de biocontroladores o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aislados desde especies forestales y aplicados en cultivos agrícolas o frutícolas, cabe mencionar que las condiciones en sistemas de explotación forestal son mucho más estables debido a que gracias al tamaño de los árboles estos captan más dióxido de carbono y liberan más oxígeno, aportan una mayor cantidad de biomasa y las condiciones micro climáticas presentes propician a una mayor densidad microbiana.

La sanidad de especies de árboles frutales sembrados debajo o en derredor de especies forestales esta intrínsecamente ligada a la diversidad microbiana asociada a una gran

variedad de especies forestales, sobre todo de leguminosas como la Guaba y Samán las cuales poseen la capacidad de captar nitrógeno atmosférico y volverlo asimilable para las plantas, extrae nutrientes desde el subsuelo y lo pone disposición de plantas con menor tamaño.

Por ende, lo que se pretende con la elaboración de este proyecto es evaluar el efecto de microorganismos aislados desde especies forestales aplicados en la germinación y desarrollo de una especie frutal y corroborar los efectos de los mismos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentación conceptual

2.1.1. Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*)

La mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*) es una planta cítrica muy utilizada en agricultura como portainjerto, actualmente recomendado para naranjas y mandarinas en general. También se puede injertar con limoneros, aunque para estos últimos es más recomendable hacerlos sobre el limón Volkameriano (Vélez, Álvarez, & Alvarado, 2012).

La mandarina Cleopatra es un portainjerto resistente a la caliza del suelo, tolerante tristeza y exocortis; su tolerancia a la psorosis y cachexia/xiloporosis ha sido cuestionada y susceptible a gomosis en áreas con alto índice de inóculo. Este patrón induce a un crecimiento lento en los primeros años. Induce buena productividad y excelente calidad de los frutos, aunque estos suelen ser algo más pequeños que con otros patrones (Chabbal *et al.*, 2015).

2.1.2. Interacción de microorganismos con especies forestales

Entre las diferentes especies forestales que pueden ser utilizadas en la recuperación de áreas degradadas, las leguminosas capaces de formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico (Allen & Allen, 1981). Las especies fijadoras de nitrógeno pueden producir un significativo aumento en la fertilidad del suelo, cuando están inoculadas con cepas efectivas de *Rhizobia* o *Frankia*, a través de su producción

de hojarasca rica de nitrógeno y el rápido ciclo de raíces finas y de nódulos (Berhard-Reversat, 1986).

2.1.3. Especie forestal

Se considera como especie forestal a una planta perenne (aquella que vive más de dos años), de tronco leñoso y elevado (referido a las diferentes alturas que alcanzan los árboles dependiendo de la especie y el sitio), que se ramifica a mayor o menor altura del suelo, que es fuente de materia prima para los diferentes tipos de industria forestal como aserraderos, fábricas de tableros, de chapas, de fósforos, de celulosa, de aceites esenciales, de resinas y taninos (Moya, 2004).

Especie arbórea, arbustiva, de matorral o herbácea que no es característica de forma exclusiva del cultivo agrícola maderables y leñosos, incluida la biomasa forestal, los de corcho, pastos, caza, frutos, hongos, plantas aromáticas y medicinales, productos apícolas y los demás productos y servicios con valor de mercado característicos de los montes (Grijpma, 1969).

2.1.4. Especies forestales leguminosas

2.1.4.1. Samán (*Samanea saman*)

Árbol grande, de copa umbeliforme, ramifica a poca altura, formando una copa ancha o extendida en forma de paraguas. De hasta 55 cm de diámetro. La corteza de color gris negruzca, áspera, fisurada, con hendiduras horizontales, desprendible, internamente

blanco - rosada y fibrosa, de sabor amargo. Sus hojas son compuestas, alternas, bipinnadas de 2 a 6 pares de pinnas, con 2 a 8 pares de hojuelas, sésiles, con has verde lustroso y envés pálido y velloso. Las hojas se cierran durante la noche. Presenta inflorescencias dispuestas en cabezuelas terminales, de 5 cm de diámetro. Cuando están florecen a un color rosado son muy vistosas junto a las hojas nuevas, exponiéndose el árbol a un aspecto elegante (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2014).

Produce frutos secos, indehiscentes, tipo vaina, aplanado pero grueso, de 10 a 20 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho; de color café castaño, de forma recta a curvadas, con pulpa interna pegajosa, muy dulce y comestible. Las semillas son de testa dura, brillantes, color café castaño, oblongas, de 5 a 8 mm de longitud y envueltas por una pulpa dulce (Castellón & Reyes, 2007).

2.1.4.2. Guabo (*Inga edulis*)

Es conocido comúnmente como inga cipo, pacay, paca, catetajo, guamo o guama. Es una especie de rápido crecimiento ampliamente utilizada como sombrío de frutales por los múltiples beneficios que brinda a su productividad. Además, presenta una floración masiva que atrae a una gran variedad de visitantes florales como artrópodos y aves (Marín-Gómez, 2006).

Es un árbol siempre verde de veloz crecimiento, alto hasta cerca 25 m con copa expandida más bien aplastada y tronco, a menudo retorcido, de cerca 30 cm de diámetro, con corteza grisácea. Las inflorescencias, con densos racimos, tienen flores blancas tubulares con estambres salientes. Las hojas son alternas, paripinnadas, con

raquis alados, largas 10-25 cm con 4-6 parejas de hojitas ovadas con ápice acuminado, sésiles, de color verde intenso brillante superiormente, pubescentes inferiormente, de dimensiones crecientes, las terminales largas hasta cerca 16 cm y anchas 8 cm. Entre las parejas de hojas están presentes glándulas nectaríferas. Los frutos son vainas cilíndricas, profundamente estriadas, larga hasta más de 1m, de 3-5 cm de diámetro, conteniendo numerosas semillas negruzcas de 3,5 x 1,2 cm circundados por un arillo algodonoso de sabor dulce (Sousa, 1993).

2.1.5. Microorganismos eficientes

Los microorganismos eficientes, como inoculante microbiano, restablecen el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la producción de los cultivos y su protección; además conserva los recursos naturales, generando una agricultura sostenible (Moya, 2012).

Entre los beneficios se aprecian: Efectos en las condiciones físicas del suelo: mejora la estructura y agregación de las partículas del suelo, reduce su compactación, incrementa los espacios porosos y mejora la infiltración del agua. De esta manera se disminuye la frecuencia de riego, tornando los suelos capaces de absorber 24 veces más las aguas lluvias, evitando la erosión, por el arrastre de las partículas. Efectos en la microbiología del suelo: suprime o controla las poblaciones de microorganismos patógenos que se desarrollan en el suelo por competencia. Incrementa la biodiversidad microbiana, generando las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen (Moya, 2012).

2.1.6. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's)

En la rizosfera encontramos una gran cantidad de microorganismos que cumplen varias funciones para beneficio de las plantas, entre ellas encontramos las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's) las cuales actúan por mecanismos ya sean directos: proporcionándole a la planta de forma solubles de elementos como fósforo y hierro o indirectos mediante la inhibición de microorganismos patógenos mediante la competencia por nutrientes o espacio en la raíz, producción de antibióticos, reducción del hierro disponible por sideróforos, síntesis de enzimas líticas o por la inducción la inducción de respuestas de defensa en la planta (Van Loon, 2007). Entre los beneficios que aportan las bacterias tenemos el crecimiento vegetal, incremento en la germinación de la semilla, un aumento en la proliferación del sistema radical, aumento en el contenido de clorofila, magnesio, nitrógeno, proteína y actividad hidráulica de la planta, disminución en la senescencia de las hojas o un mayor rendimiento (Lucy, Reed, & Glick, 2004).

2.1.7. Producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal

Las sustancias promotoras del crecimiento vegetal, son de carácter orgánico que activan varias respuestas en la célula vegetal, a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico. De acuerdo a varias clasificaciones se encuentran distribuidas en cinco grupos principales: auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquinas. Son capaces de contribuir al desarrollo y regulación de muchos parámetros fisiológicos, además incrementan la

resistencia de las plantas a diversos factores ambientales, ya que pueden inducir o suprimir la expresión de una amplia gama de genes (Tsavkelova *et al.*, 2006).

2.1.8. *Bacillus sp*

El género *Bacillus*, tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambientes como el suelo (Aslim, Saglam, & Beyatli, 2002), los ecosistemas de agua dulce (Deb, Mandal, & Kumar, 2005), y marinos y los marinos (Miranda, Martins, & Clementino, 2008). Pertenecen al grupo de gram positivo, poseen endosporas que le proporciona resistencia a la desecación y al calor, además estas bacterias se destacan como control biológico de microorganismos fitopatógenos, la participación en la nutrición mineral y la fijación biológica de nitrógeno, es por ello que es un candidato ideal para formular productos estables y su utilización en la biotecnología agrícola (Haiyan *et al.*, 2006).

2.1.8.1. Mecanismos de Acción

Los *Bacillus sp.* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántula (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Además, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas anti fúngicas. Así mismo, existen cepas bacterianas capaces de sintetizar sustancias contra otras bacterias, los antibióticos (Whipps, 2001).

2.1.9. *Rhizobium* sp.

El género *Rhizobium* tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, infectando principalmente a las leguminosas. Sin embargo, no es el único que tiene esa capacidad, también están *BradiRhizobium*, *SinoRhizobium*, *ArzhoRhizobium* y otros (Martínez *et al.*, 2005).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, resulta una interacción muy específica entre la bacteria y la planta. La formación del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos participantes de la interacción; sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizados por los genes de nodulación del microsimbionte (genes nod), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide (Hernández, Cubillos, & Milian, 2012).

2.1.9.1. *Rhizobium* en especies forestales

De entre las diferentes especies forestales que pueden ser utilizadas en la recuperación de áreas degradadas, las leguminosas capaces de formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico despiertan gran interés. Fueron descritas asociaciones con organismos fijadores en cerca de 650 especies de árboles y se cree que millares de otras especies puedan también asociarse a hongos micorrízicos, y promueven un aprovechamiento aún mejor macro y micronutrientes (Corona *et al.*, 2015).

Las especies fijadoras de nitrógeno pueden producir un significativo aumento en la fertilidad del suelo, cuando están inoculadas con cepas efectivas de Rhizobia, a través de su producción de hojarasca rica en nitrógeno y el rápido ciclo de raíces finas y de nódulos gran parte de las especies leguminosas arbóreas presentan elevada producción de biomasa con un significativo aporte de hojas al suelo (Hernández, Cubillos, & Milian, 2012).).

2.2. Fundamentación teórica

2.2.1. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*

Angulo *et al.* (2014), aislaron bacterias rizosféricas y endófitas a partir de rizósfera y tejidos de raíz de árboles de *Eucalyptus nitens* con el objetivo de evaluar su capacidad de promover el crecimiento en plántulas de la misma especie en condiciones de invernadero. Estos autores concluyeron que los aislamientos que incrementaron el crecimiento de las plántulas fueron identificados y caracterizados por su capacidad de producir ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfato y expresar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Los 105 aislamientos obtenidos fueron morfológicamente diferentes y solo 15 promovieron significativamente el crecimiento de plántulas de *E. nitens*. Los máximos incrementos observados fueron en el peso seco aéreo (142 %) y de la raíz (135 %); también aumentaron la altura de las plantas (50 %) y el largo de raíces (45 %) de las mismas.

Las rizobacterias aisladas por Angulo *et al.* (2014) pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*. Los aislados identificados como *A. phenanthrenivorans* 21 y *B. cereus* 113 incrementaron la emergencia de *E. nitens* a los 12 días en un valor promedio de 3.15 veces con relación al control. *R. aquatilis* aislado 78 presentó la mayor producción de AIA ($97.5 \pm 2.87 \mu\text{g/ml}$) en presencia de triptófano y el mayor índice de solubilización de fósforo (2.4). *B. amyloliquefaciens* aislado 60 fue positivo para la actividad ACC desaminasa. Los resultados obtenidos indican el potencial de las rizobacterias estudiadas como promotoras de emergencia y crecimiento de plántulas de *E. nitens* y su posible uso como inoculantes, ya que presentan más de un mecanismo de acción asociado a la promoción del crecimiento.

2.2.2. Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium Excelsum*

Barreto *et al.* (2007), aislaron y evaluaron el efecto de la inoculación de biopreparados con base en RPCV exclusivos de *Anacardium excelsum*, una especie arbórea nativa de bosques secos de Centro y Suramérica, presente en una reserva forestal localizada en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia). Inicialmente se aislaron 8 morfotipos microbianos rizosféricos en agar suelo, seleccionando microorganismos exclusivos en esta especie arbórea: *Pseudomonas fluorecens*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus licheniformis*, estas fueron aplicadas para conocer el efecto en la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.

Los resultados obtenidos por Barreto *et al.* (2007) en relación al porcentaje de germinación muestran que los biopreparados a base de estas bacterias nativas promovieron eficazmente el crecimiento de semillas, el efecto promotor fue superior al tratamiento control; en cuanto al ensayo de estimulación del crecimiento las bacterias, presentaron óptimos resultados en la aceleración del crecimiento. Lo que sugiere la potencialidad de estos en procesos de reforestación.

2.2.3. Rol de los microorganismos activos, aislados de la rizósfera y filósfera en la propagación de las especies forestales *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*, con fines de conservación y explotación comercial

García (2016), caracterizó molecularmente bacterias y hongos aislados de la rizósfera y filósfera de plantas jóvenes de las especies forestales nativas, *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii* en la Región Tumbes y evaluar su capacidad para promover el crecimiento de plántulas, a partir de la inoculación en semillas de estas especies. La caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de la rizósfera se realizó por microbiología molecular y Metagenómica, las secuencias obtenidas fueron analizadas en la plataforma de análisis automatizado Metagenomics RAST (Mg-RAST versión 3.6). Se realizaron pruebas de compatibilidad con 9 de las 11 cepas bacterianas, aisladas de la rizósfera de *T. chrysantha* y 7 de las 10 cepas de la rizósfera de *T. billbergii*, las mismas que se utilizaron en ensayos de promoción del crecimiento. Se realizaron observaciones de la colonización de hongos y bacterias en raíces de plántulas, mediante microscopía con focal de barrido laser. Mediante microbiología molecular, se

identificaron un total de 51 microorganismos, asociados a la filósfera y rizósfera de *Tabebuia chrysantha* (31) y *Tabebuia billbergii* (20); en tanto que, por Metagenoma se caracterizaron 11 filum de bacterias y tres de hongos asociados a la rizósfera de estas especies forestales. A nivel de género en la rizósfera de *T. chrysantha* y *T. billbergii* se identificaron 90 y 79 géneros, respectivamente.

En los ensayos de compatibilidad de García (2016), se determinaron cinco agrupaciones (consorcios) de bacterias asociadas a la rizósfera de *Tabebuia chrysantha* grandes grupos de bacterias asociadas a la rizósfera de *Tabebuia billbergii*. Los resultados mostraron que, después de 28 días posteriores a la inoculación de semillas, todas las cepas bacterianas en general, fueron capaces de estimular el crecimiento de la raíz principal, raíces secundarias, longitud del tallo y longitud total de la parte aérea de las plántulas en las dos especies forestales, en referencia con el grupo control. *Aspergillus* sp. y *Pseudomonas* sp, mostraron colonización de las raíces de las plántulas de *Tabebuia billbergii*

2.2.4. Promoción del crecimiento en especies forestales para su adaptación y reforestación

Sánchez, Hernández, & Colli (2017), evaluaron la capacidad de promoción de crecimiento de consorcios bacterianos (MSVC1 y MSVC2) generados por la confrontación de 86 aislados provenientes del Área Natural Protegida (ANP) Las Palomas, del estado de Guanajuato, se inocularon en especies forestales de Bosque Tropical Caducifolio. Así mismo se determinaron actividades de síntesis de ácido

indolacético (AIA) y Solubilización de fosfatos de las cuales se obtuvieron resultados positivos para las dos pruebas. Los consorcios fueron evaluados por separado en bioensayos a nivel invernadero en las especies *Lysiloma microphyllum* (Palo Prieto) y *Albizia occidentalis* (Palo Blanco), en un diseño comparativo plantas con tratamiento con consorcio y plantas control sin inóculo, teniendo dos grupos de plantas, en el primer grupo se aplicó los dos consorcios y control, y en el grupo dos solo la aplicación de un consorcio y su control.

De acuerdo a la confrontación realizada por Sánchez, Hernández, & Colli (2017), se lograron generar 2 consorcios bacterianos cada uno de ellos conformados por 3 aislados que presentaron compatibilidad. Así mismo los 6 aislados que conforman los dos consorcios dieron un resultado positivo a la producción de auxinas, ácido indolacético (AIA), y son potenciales a la solubilización de fosfatos, características importantes que favorecen la nutrición y desarrollo de la planta. En el estudio, la especie *Albizia occidentalis* fue la que presentó mayor diferencias en cuanto a variables medidas.

2.3. Fundamentación legal

2.3.1. Constitución Política del Ecuador

La Constitución de la República del Ecuador publicada en el Registro Oficial No. 449 del 20 de octubre de 2008, considera los recursos naturales como parte del Estado, en el Título VII del régimen del buen vivir, capítulo segundo biodiversidad y recursos naturales, sección cuarta referida a recursos naturales, indica que:

Artículo 408.- Son de propiedad inalienable, imprescriptible e inembargable del Estado los recursos naturales no renovables y, en general, los productos del subsuelo, yacimientos minerales y de hidrocarburos, sustancias cuya naturaleza sea distinta de la del suelo, incluso los que se encuentren en las áreas cubiertas por las aguas del mar territorial y las zonas marítimas; así como la biodiversidad y su patrimonio genético y el espectro radioeléctrico. Estos bienes sólo podrán ser explotados en estricto cumplimiento de los principios ambientales establecidos en la Constitución.

- El Estado participará en los beneficios del aprovechamiento de estos recursos, en un monto que no será inferior a los de la empresa que los explota.
- El Estado garantizará que los mecanismos de producción, consumo y uso de los recursos naturales y la energía preserven y recuperen los ciclos naturales y permitan condiciones de vida con dignidad.

2.3.2. Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad

Título II Régimen Institucional

Capítulo II de las competencias y responsabilidades de otras instituciones

Artículo 11.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería será el competente del efectivo manejo y control de la biodiversidad agrícola y pecuaria, en especial la conservación in situ y ex situ de las especies y variedades cultivadas y promoverá programas orientados

a incentivar la agricultura sustentable y a mejorar los métodos de producción y conservación de estas especies y variedades.

Título IV del uso sustentable de la biodiversidad y sus funciones

Capítulo IV de la biodiversidad agrícola y pecuaria

Artículo 71.- El Estado reconoce los Derechos de los Agricultores basados en su contribución a la conservación, mejora y diversificación de los recursos fitogenéticos. El Ministerio de Agricultura y Ganadería, y otros organismos vinculados, desarrollarán, promoverán y apoyarán estrategias de producción en las que participen directamente los agricultores y los centros de investigación agropecuaria. Estas estrategias buscarán la recuperación de variedades locales domesticadas o cultivadas, su propagación ex situ, su caracterización y evaluación, el mejoramiento genético y producción de semillas a partir de dichas variedades, y la difusión de los resultados a fin de generar nuevas estrategias de producción.

Artículo 73.- El Estado, a través del Ministerio de Agricultura y Ganadería y otros organismos vinculados con la conservación y uso sustentable de la biodiversidad agrícola, promoverá y creará incentivos para la producción y utilización de las variedades tradicionales, con el fin de apoyar la seguridad alimentaria y reducir las causas de erosión genética.

Capítulo VII de la bioseguridad

Artículo 85.- Los Principios de Precaución y de Consentimiento Fundamentado Previo de la presente Ley se aplicarán como mecanismos obligatorios en todo lo concerniente a las actividades de manipulación, utilización, liberación, transferencia y comercialización de organismos vivos modificados. Los sectores en los que se utilice o se planeé utilizar la tecnología del ADN recombinante y técnicas moleculares, como en la medicina e industria farmacéutica, agricultura (cultivos y pastos), ganadería y avicultura, productos veterinarios incluyendo vacunas, acuicultura y piscicultura, industria alimenticia, microorganismos de uso variado para bioremediación y biofertilización, deberán sujetarse a los principios mencionados. El Reglamento Nacional de Bioseguridad definirá el mecanismo mediante el cual se aplicarán tales principios en materia de bioseguridad.

Capítulo VIII del desarrollo y transferencia de biotecnología

Artículo 89.- El Estado regulará, fomentará y controlará la capacitación, investigación y desarrollo de la biotecnología en el país de conformidad con las normas establecidas en esta Ley. Así mismo, velará por la protección de los derechos de propiedad intelectual de los productos de la biotecnología obtenidos en el país.

2.3.3. Decisión 486 del régimen común sobre propiedad industrial

De acuerdo a la Comisión de la Comunidad Andina (1993):

Título II de las patentes de invención

Capítulo I De los requisitos de patentabilidad

Artículo 15 (literal b). - No se considerarán invenciones: el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural

2.3.4. Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura

En noviembre de 2001 la Conferencia de la FAO (Resolución 3/2001) adoptó el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Este Tratado jurídicamente vinculante abarca todos los recursos fitogenéticos importantes para la alimentación y la agricultura, y está en consonancia con el Convenio sobre la Diversidad Biológica. El Tratado entró en vigor el 29 de junio de 2004.

Artículo 6 (literal b).- Utilización sostenible de los recursos fitogenéticos: La utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura puede incluir las medidas siguientes: fortalecimiento de la investigación que promueva y conserve la diversidad biológica, aumentando en la mayor medida posible la variación intraespecífica e interespecífica en beneficio de los agricultores, especialmente de los que generan y utilizan sus propias variedades y aplican principios ecológicos para mantener la fertilidad del suelo y luchar contra las enfermedades, las malas hierbas y las plagas.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. Experimental

El proyecto de investigación fue de tipo experimental, ya que se condujo un ensayo en el cual se inició con el aislamiento de bacterias *Bacillus sp.* y *Rizhobium sp.* obtenidas en diferentes localidades de la provincia de Los Ríos y caracterización a nivel morfológico, para posteriormente evaluar su efecto al ser inoculadas en las semillas y plántulas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni*).

3.2. Métodos de investigación

3.2.1. Inductivo

Se utilizó en el aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos seleccionados, así como en la delimitación de las variables de respuesta.

3.2.2. Deductivo

Permitió evaluar la respuesta de las semillas y plántulas a la inoculación de microorganismos eficientes.

3.2.3. Analítico

Este método se utilizó en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos a lo largo del proceso de investigación.

3.3. Construcción metodológica del objeto de investigación

3.3.1. Muestra

Se escogieron como sitios de muestreos, cuatro cantones de la provincia de Los Ríos: Mocache, Palenque, Quevedo y Valencia, teniendo en consideración que estos cantones cuentan con plantaciones forestales de *Inga edulis* y *Samanea saman*.

3.3.2. Técnicas de investigación

3.3.2.1. Observación científica

Se usó durante todo el proceso de la investigación, realizando un diagnóstico de los procesos para conocer la realidad mediante la percepción directa de los objetos y fenómenos.

3.3.3. Instrumentos de investigación

3.3.3.1. Ficha de campo

En la misma se alcanzó toda la información relativa al análisis de datos en las zonas de muestreo: tipo de especie forestal, altura de planta, edad.

3.3.3.2. Ficha de monitoreo

Se utilizó en el registro de la información del monitoreo de los procesos de la investigación donde se evaluó: número de muestras, peso de las muestras, transporte y tiempo de almacenamiento de muestras, y aspectos relativos al monitoreo del suelo.

3.3.3.3. Material virtual

Se hizo uso de plataformas virtuales para el procesamiento de los datos y obtención de resultados.

3.4. Recolección de la información

3.4.1. Fuentes primarias

Las fuentes primarias de la presente investigación fueron los hechos y datos obtenidos a través de la observación directa en el aislamiento, caracterización, inoculación y evaluación de la respuesta de los microorganismos eficientes en la semilla y plántulas de mandarina Cleopatra.

3.4.2. Fuentes secundarias

Se hizo uso de libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de

instituciones públicas o privadas, patentes, normas técnicas para que optimizar los recursos de la investigación y tratar en lo posible reducir los riesgos dentro del área de trabajo.

3.5. Procesamiento y análisis de la información

La información se procesó en el programa estadístico InfoStat cada tratamiento evaluado fue sometido a las pruebas de ANAVA y pruebas de rango múltiple de DUNCAN.

3.6. Diseño de la investigación

3.6.1. Diseño para evaluación de inoculación de semillas de *Citrus reshni* por los microorganismos aislados

Se seleccionaron rizobacterias de tal forma que haya una selección final de 8 cepas de *Rhizobium* correspondientes a *Inga edulis* y 8 cepas de *Bacillus* correspondientes a *Samanea saman*. De los aislamientos obtenidos los cuales se obtuvo un total de 16 bacterias, se constituyeron 9 tratamientos constituidos por la combinación de 1 cepa de *Rhizobium* + 1 cepa de *Bacillus* más un control constituido por semillas sin inoculante.

Se empleó un diseño completamente al azar DCA con 4 repeticiones. Todas las variables fueron sometidas al análisis de varianza y se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

Tabla 1. Esquema del análisis de varianza utilizado en el primer ensayo

Fuentes de variación	Grados de libertad
Error	28
Tratamientos	8
Total	35

Elaboración: Autora

3.6.2. Diseño para la evaluación del desarrollo de plántulas de *Citrus reshni* inoculadas con los aislados individuales y en consorcio

De los 16 aislamientos obtenidos, se constituyó 9 tratamientos constituidos por la combinación de 1 cepa de *Rhizobium* + 1 cepa de *Bacillus* inoculadas en plantas de Mandarina (*Citrus × reshni*) más un control constituido por plantas sin inoculante. Se empleó un diseño completamente al azar DCA con 4 repeticiones. Todas las variables fueron sometidas a la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Esquema del análisis de varianza utilizado en el segundo ensayo

Fuentes de variación	Grados de libertad
Error	28
Tratamientos	8
Total	35

Elaboración: Autora

3.7. Manejo del experimento

3.7.1. Muestreo

Se realizó la recolección de las muestras en diferentes zonas donde estaban presentes las especies forestales objeto de este estudio. Se tomaron 10 sub-muestras consistentes en suelo rizosférico de 10 árboles de cada una de las especies en estudio Samán (*Samanea saman*) y Guabo (*Inga edulis*), estas 10 submuestras fueron homogenizadas, luego alrededor de 100 gramos fueron empaquetado en fundas ziploc y trasladadas al laboratorio para el proceso de aislamiento de los microorganismos de interés.

3.7.2. Aislamiento de bacterias del género *Bacillus*

Se preparó una suspensión del suelo rizosférico en agua destilada (1g/100ml), se sometió a calor a temperatura de 80 °C durante 10 minutos. Posteriormente se realizó una siembra por dilución en placas a la dilución 10^{-3} conteniendo King B sólido (King, Ward, & Raney, 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K_2HPO_4 , 1.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1.5; agar, 15; agua destilada (pH 7.2)].

La incubación se realizó en condiciones de aerobiosis para garantizar que las especies esporulantes anaerobias queden eliminadas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas, luego de esto se procederá a la resiembra en un medio de King B sólido para posteriormente ser almacenadas a -4°C.

3.7.3. Identificación del género *Bacillus* sp.

La identificación de las UFC del género *Bacillus* sp. se realizó mediante la técnica de coloración de Gram y la prueba de la catalasa. Se procedió a la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada.

Los bacilos Gram positivos aerobios y catalasa positivos, se clasificaron como pertenecientes al género *Bacillus* sp. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras de suelo rizosférico de los árboles sometidos a este estudio.

3.7.4. Aislamiento de bacterias del género *Rhizobium*

La metodología utilizada para el aislamiento de las cepas a partir de diluciones de suelo rizosférico se ajustó a lo descrito por Vincent (1970). El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de la bacteria es el medio levadura manitol agar (LMA) y se incubó a 28°C durante 2 días. Se seleccionó aquellas colonias con características culturales semejantes a los rizobios, a través de la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada.

Además de usar como indicativo las colonias que no absorbieran el colorante rojo congo. Adicional a esto se realizó pases sucesivos de ellas en LMA hasta obtener un

cultivo puro. Posteriormente se conservaron las muestras usando la técnica de agar profundo a 4°C. La pureza de los cultivos, así como sus características tintoriales y la morfología de las células, se determinarán mediante la tinción de Gram (Sosa *et al.*, 2004).

El estudio de las características culturales de las cepas (forma y tamaño de las colonias, color y textura) y de la tasa de crecimiento, se realizó mediante la siembra de cada uno de los aislados en medio LMA a pH 6,8 y se incubó 2 días a 28°C. Después se observó mediante un microscopio estereoscópico.

3.7.5. Desinfección de semillas

Las semillas de *Citrus reshni* fueron sometidas a una solución de 0.15g de Benomil en 250ml de agua estéril, más 10ml de pbs mantenidas por agitación por 20 minutos, luego se agregó hipoclorito de sodio (NaCl) al 2% por 10 min y etanol al 70% por 5 segundos, por último, se realizó cuatro enjuagues consecutivos con agua estéril.

3.7.6. Inoculación en semillas

A las semillas se les retiró la cascara, se las mantuvo a cámara húmeda con papel humedecido con agua estéril para acelerar el proceso de germinación en una incubación a una temperatura de 28°C. Se monitoreó hasta la emisión de la radícula para posterior a esto inocular las semillas por las combinaciones de las Rizobacterias correspondientes a los tratamientos antes descritos.

Las rizobacterias fueron incubadas en medio King B líquido para el género *Bacillus* y medio YEM para *Rhizobium* esto se incubó en un shaker Benchmark incushaker® a 150 rpm en agitación constante a 26 °C por 24 horas. La inoculación se realizó con una solución del 15% de la bacteria en 25ml de agua estéril y cada semilla recibirá 500_{ul} de esta solución. Se realizó inoculaciones 1 vez cada 5 días durante 20 días, después de 5 días se ejecutó la toma de datos.

3.7.7. Inoculación en plantas

Semillas sanas de mandarina cleopatra se seleccionaron y sometieron a un proceso de pre germinación durante tres semanas, luego las plantas se trasladaron a macetas con 3.3 kg de sustrato estéril en proporción (2/1) de suelo franco arcilloso más turba (Novarbo seedling, black C1B). 10 días después del trasplante se inició la inoculación con una solución de 3.75 ml de cada una de la bacteria en 25ml de agua estéril aplicado directamente a la zona rizosférica.

Se realizó 1 inoculación por cada 7 días durante 45 días, finalmente 5 días después de las inoculaciones se realizó las respectivas evaluaciones.

3.8. Variables evaluadas

En el ensayo de inoculación de semillas pre germinadas se evaluó las siguientes variables a los 25 días a partir de la primera inoculación:

3.8.1. Altura de la planta

Para el efecto, se cortó el punto de inserción del cotiledón hasta la yema terminal, y se utilizó una regla (cm).

3.8.2. Peso radicular

Se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se usó una balanza electrónica para determinar el peso radicular en gramos.

3.8.3. Peso fresco foliar

Se tomó como referencia hojas completamente verdes y se pesó en una balanza electrónica.

3.8.4. Peso del tallo

Se lo realizó mediante el uso de una balanza electrónica.

3.8.5. Longitud radicular

Para el efecto, se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se utilizó una regla (cm).

3.8.6. Número de hojas

Se contabilizó el número de hojas por planta manualmente, y se determinó el promedio por cada unidad experimental.

3.9. Recursos humanos y materiales

3.9.1. Material de Laboratorio

- Agitador
- Autoclave
- Balanza
- Baño María
- Guantes quirúrgicos
- Incubadora
- Juego de micro-pipetas (1000 µl, 200 µl, 20 µl y 2 µl)
- Microondas
- Placas Petri desechables (100 unidades)
- Puntas amarillas (200 µl) (2 paquetes)
- Puntas azules (1000 µl) (1 paquetes)
- Refrigeradora
- Tubos eppendorf 1,5 ml (1 paquetes)

3.9.2. Reactivos de Laboratorio

- Agar
- Cloruro de sodio NaCl
- Congo rojo
- Extracto de levadura
- Fosfato de potasio K_2HPO_4
- Glicerol
- Manitol
- PBS (buffer fosfato salino)
- PDA
- Peptona
- Sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación de bacterias del género *Bacillus* y *Rhizobium* de especies forestales

Los aislados bacterianos provienen de muestras de suelo rizosférico y nódulos de *S. saman* (Samán) e *I. edulis* (Guabo), recuperando 8 cepas de *Bacillus* spp (BCA1, BCM16, BGJ2, BGL7, BGR9, BGU1, BG-3, BSA16), 8 cepas de *Rhizobium* spp (RIZ-4, RIZ-9, RIZ-18, RIZ-3, RIZ6, RIZ11, RIZ12, RIZ15), en la tabla 3 se muestran el origen de las cepas obtenidas.

Tabla 3. Cepas de *Bacillus* y *Rhizobium* obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales

Provincia	Cantón	Especie forestal	Cantidad bacterias	Cepas
Los Ríos	Quevedo	<i>S. saman</i>	4	BCA1, BCM16 RIZ-4, RIZ-9
	Mocache	<i>I. edulis</i>	4	BGJ2, BGL7 RIZ-18, RIZ-3
	Palenque	<i>I. edulis</i>	4	BGR9, BGU1 RIZ6, RIZ11
	Valencia	<i>S. saman</i>	4	BG-3, BSA16 RIZ12, RIZ15

Elaboración: Autora

4.1.1.1. Caracterización morfo química de *Bacillus*

Las 8 cepas de bacterias aisladas fueron caracterizadas morfológicamente de acuerdo a las características del género *Bacillus*. Las cepas fueron evaluadas de acuerdo a la

forma, elevación y margen de las colonias que formaban en medio King B sólido después de 48 horas incubadas a 28°C. En la tabla 3 se muestran las morfologías de las bacterias caracterizadas como *Bacillus* y los resultados a las pruebas bioquímicas.

Se observa que una característica común en todas las colonias de *Bacillus* es su forma circular y color crema, la apariencia de los márgenes de las colonias varía entre ondulada y entera; las elevaciones de las colonias fueron mayoritariamente elevada y convexa, la consistencia suele ser seca, pero también se presentan colonias cremosas y ligosas (Figura 2). La gran mayoría presentó una superficie opaca, y la consistencia y tamaño es variable; similares a los resultados reportados por Calvo y Zúñiga (2010)

Tabla 4. Caracteres morfológicos y bioquímicos de cepas de *Bacillus* obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales

Cepa	Forma			Elevación			Margen			Tinción GRAM		Catalasa	
	C	F	G	P	Co	El	E	O	L	P	N	P	N
BCA1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
BCM16	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
BGJ2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
BGL7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BGR9	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BGU1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
BG-3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
BSA16	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0

Forma: Circular (C), Filamentosa (F), Granular (G). **Elevación:** Plana (P), Convexa (CO), Elevada (EL). **Margen:** Entera (E), Ondulada (O), Lobulada (L). **Tinción Gram y Catalasa:** Positivo (P), Negativo (N).

Elaboración: Autora

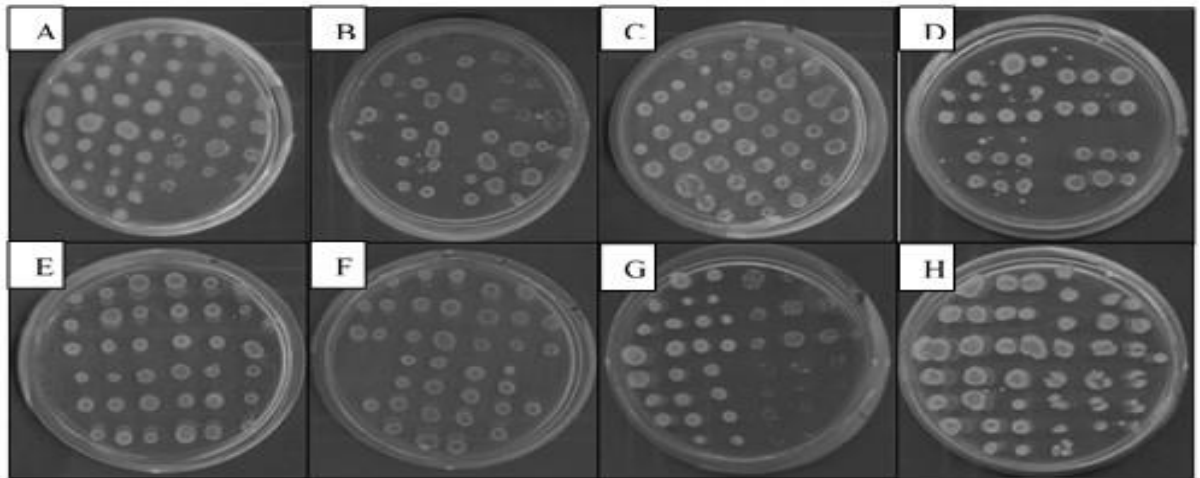


Figura 2. Caracteres morfológicos coloniales de cepas de *Bacillus* corresponden a la evaluación de las cepas a las 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) BCA1, B) BCM6, C) BGJ2, D) BGL7, E) BGR9, F) BGU1, G) BG-3, H) BSA16.

Para la identificación bioquímica se realizaron las pruebas de tinción de Gram que permite diferenciar a los *Bacillus* como Gram positivos al poseer una pared celular más gruesa, formada por un gran número de capas de peptidoglicano, lo cual hace que las bacterias sean observadas con una coloración violácea. En la Figura 3 se indican los resultados de esta prueba.

Elaboración: Autora

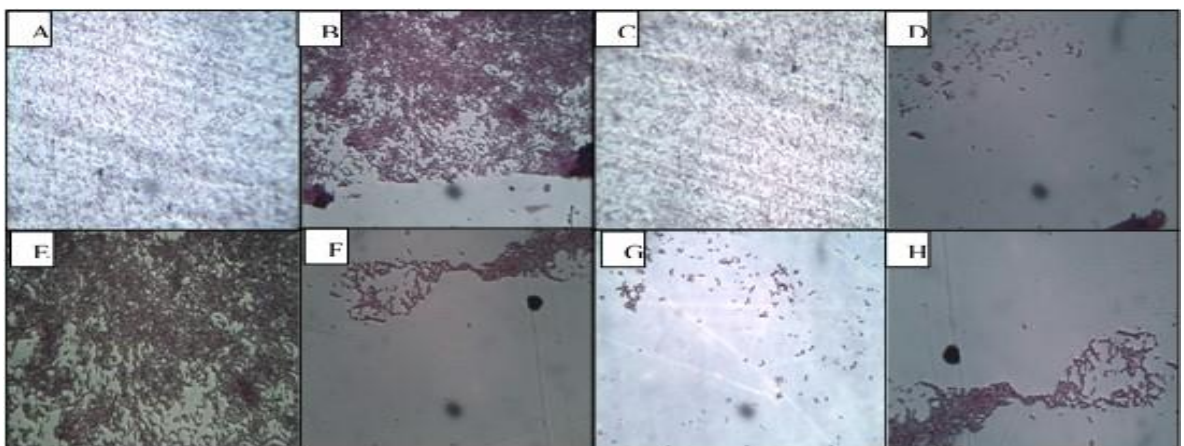


Figura 3. Tinción Gram. Células bacterianas de *Bacillus* a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido. A) BCA1, B) BCM6, C) BGJ2, D) BGL7, E) BGR9, F) BGU1, G) BG-3, H) BSA16.

La prueba de catalasa se aplicó para verificar si las cepas aisladas generaban esta enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias y se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno es un indicativo que la prueba es positiva, esto se demuestra en la Figura 4.

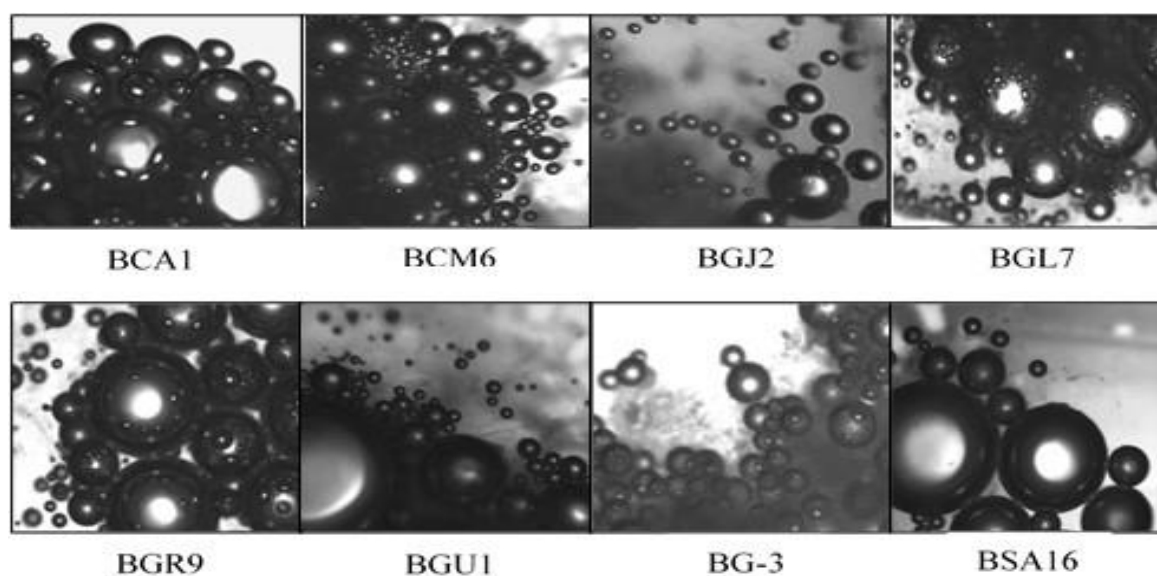


Figura 4. Prueba de catalasa en células bacterianas de *Bacillus* a 48 horas de crecimiento en medio King B sólido.

4.1.1.2. Caracterización morfo química de *Rhizobium*

Las 8 cepas de bacterias aisladas fueron caracterizadas morfológicamente de acuerdo a las características del género *Rhizobium*. Las cepas fueron evaluadas de acuerdo a la forma, elevación y margen de las colonias que formaban en medio LAM (Levadura manitol agar) + Rojo Congo después de 10 días de incubación a 28°C. En la tabla 4 se muestran las morfologías de las bacterias caracterizadas como *Rhizobium* y los resultados a las pruebas bioquímicas realizadas.

Tabla 5. Caracteres morfológicos y bioquímicos de cepas de *Rhizobium* obtenidas de las muestras de suelo rizosférico y nódulos de especies forestales

Cepa	Forma			Elevación			Margen			Tinción gram		Catalasa	
	C	F	G	Pl	Co	El	E	O	L	P	N	P	N
RIZ-4	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
RIZ-9	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
RIZ-18	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
RIZ-3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
RIZ6	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
RIZ11	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
RIZ12	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
RIZ15	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0

Forma: Circular (C), Filamentosa (F), Granular (G). **Elevación:** Plana (P), Convexa (CO), Elevada (EL). **Margen:** Entera (E), Ondulada (O), Lobulada (L). **Tinción Gram y Catalasa:** Positivo (P), Negativo (N).

Elaboración: Autora

Para la selección de las colonias típicas de este grupo de bacterias, un elemento esencial fue la falta de absorción del colorante rojo congo. Por lo general, las colonias de rizobios se observan blancas o ligeramente rosadas, debido a que no absorben este colorante como lo indica (Sosa *et al.*, 2004).

Las colonias observadas fueron de forma circular y filamentosa en su mayoría con márgenes enteros y ondulados con elevación convexa y plana, siendo la consistencia gelatinosa y de color blanco en medio LAM, pero tornándose roja a los 10 días de cultivo, la morfología de las colonias se muestra en la Figura 5.

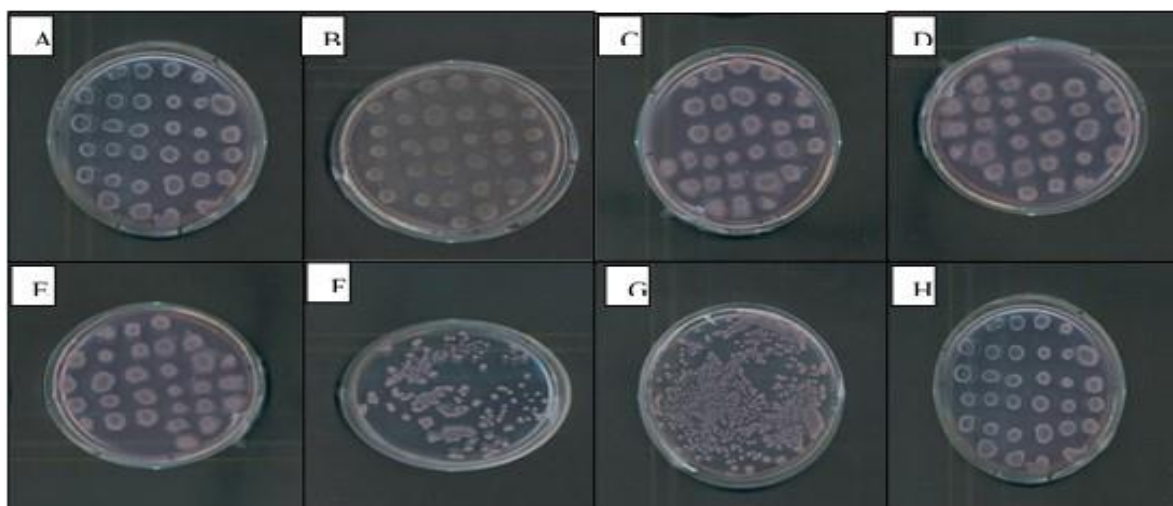


Figura 5. Caracteres morfológicos coloniales de cepas de *Rhizobium*. corresponden a la evaluación de las cepas a las 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo congo. A) RIZ-4, B) RIZ-9, C) RIZ-18, D) RIZ-3, E) RIZ6, F) RIZ11, G) RIZ12, H) RIZ15.

Para la identificación bioquímica se realizaron las pruebas de tinción de Gram que permite diferenciar a los *Rhizobium* como Gram negativos al poseer una fina capa de peptidoglicano, esto hace que se tornen de una coloración rosácea (Figura 6).

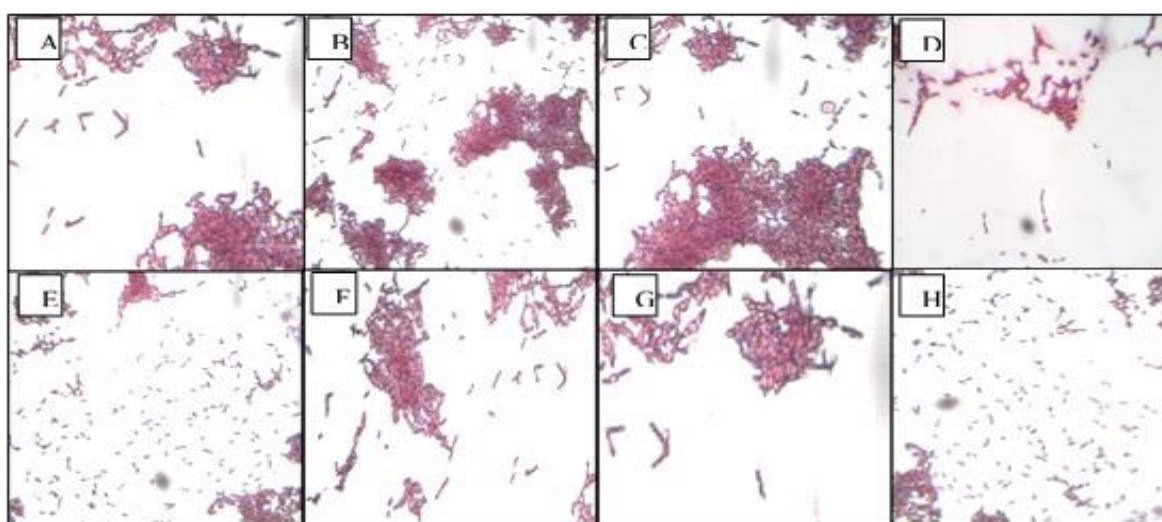


Figura 6. Tinción Gram. Células bacterianas de *Rhizobium* a 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo Congo. A) RIZ-4, B) RIZ-9, C) RIZ-18, D) RIZ-3, E) RIZ6, F) RIZ11, G) RIZ12, H) RIZ15

La prueba de catalasa se aplicó a este grupo de cepas. En la figura 7 se demuestra el resultado positivo para la producción de la enzima catalasa.

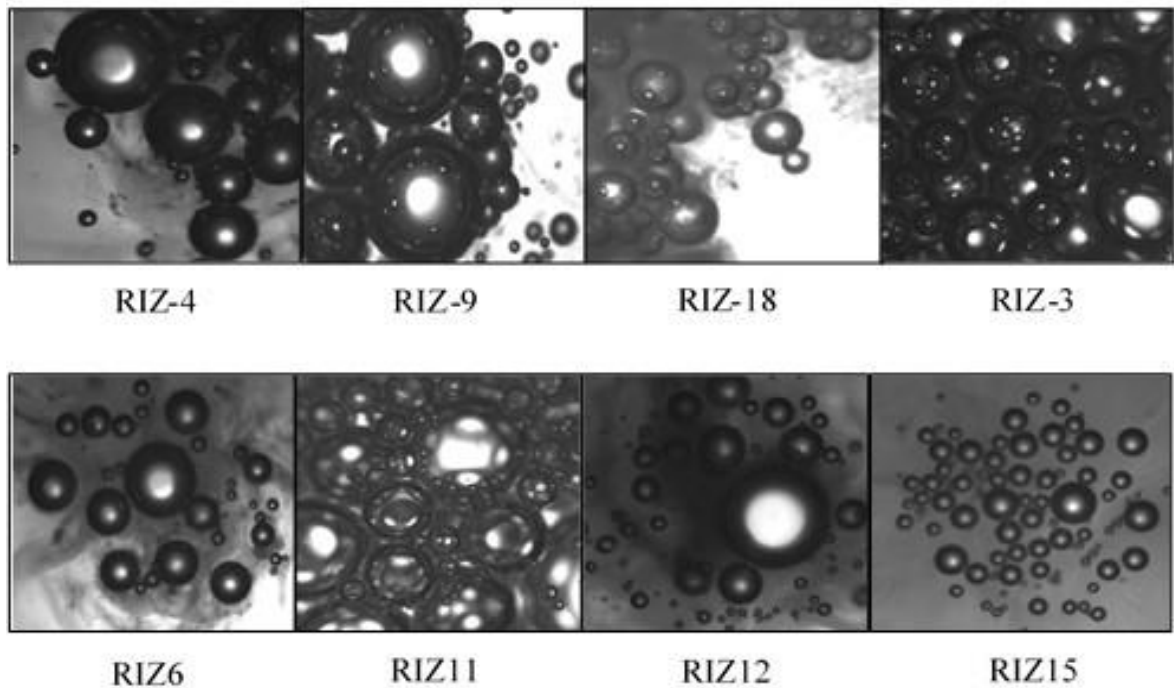


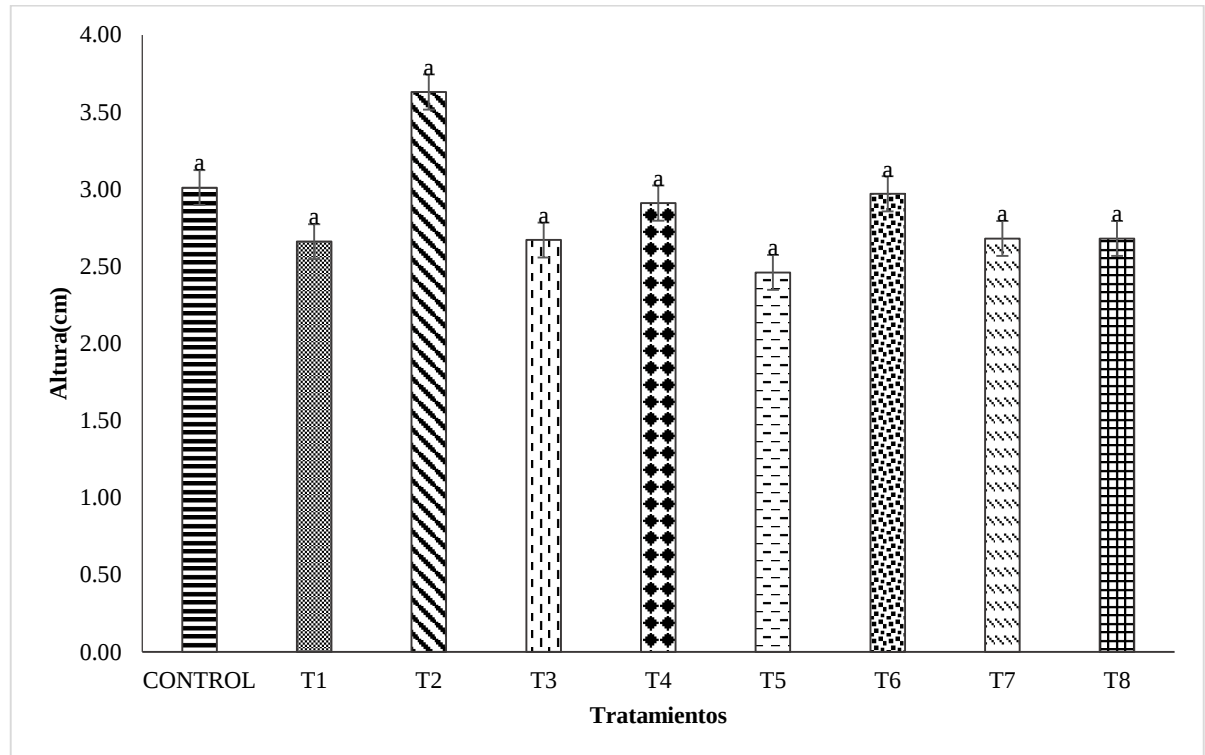
Figura 7. Prueba de catalasa. Células bacterianas de *Rhizobium* a 72 horas de crecimiento en medio LMA + Rojo Congo.

4.1.2. Evaluación del desarrollo de semillas de *Citrus reshni* inoculadas con consorcios bacterianos (*Bacillus* spp. + *Rhizobium* spp.)

4.1.2.1. Altura de planta

Se midió la altura de las plántulas de mandarina después de 25 días de la primera inoculación en semillas. No se encontraron diferencias estadísticas en los tratamientos, las alturas oscilaron entre 2,66cm a 3,63cm.

Gráfico 1. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en la altura de plántulas de *Citrus reshni* a los 25 días después de la primera inoculación en semillas Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

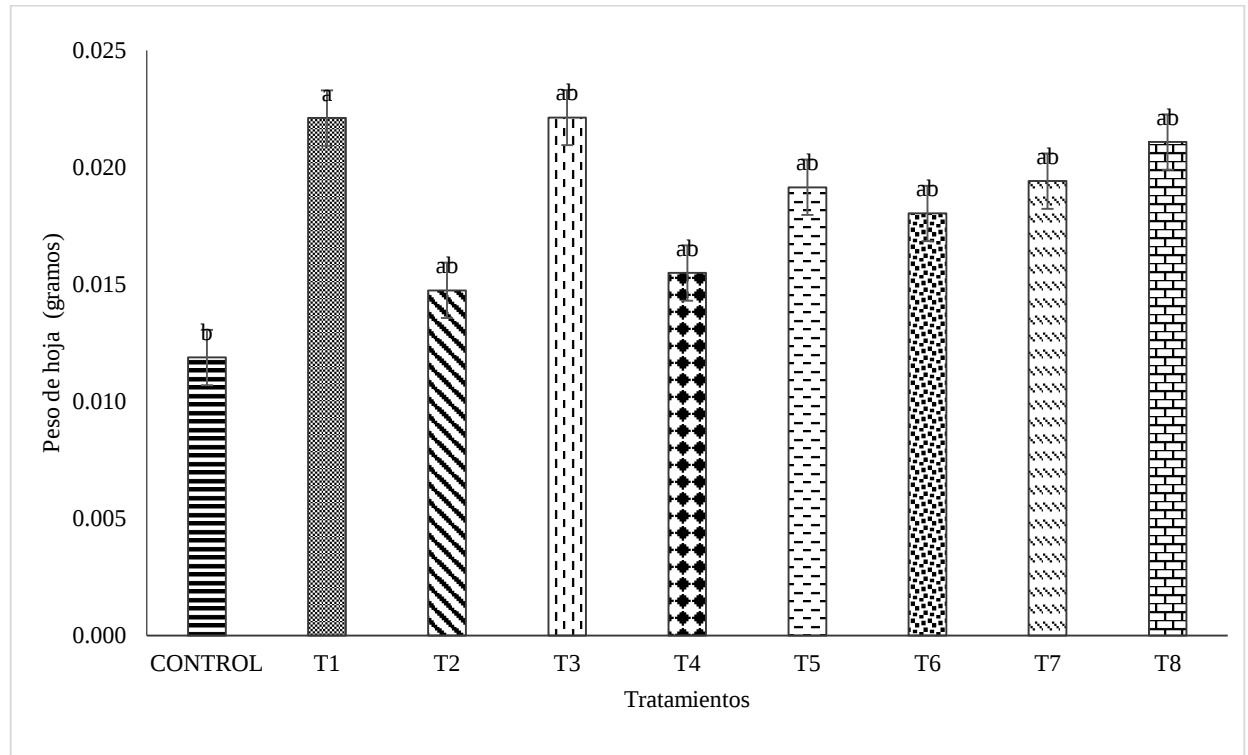


Elaboración: Autora

4.1.2.2. Peso foliar

El peso foliar de las plántulas de mandarinas inoculadas con los consorcios bacterianos desde semilla fue superior en T1 (BCA1, RIZ-4) con un promedio de 0.0221 g de peso, el grafico 2 indica que existen diferencias significativas, el T1 es el que tiene mayor promedio con relación a los demás tratamientos. El control fue el de menor promedio.

Gráfico 2. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en el peso de hojas de de *Citrus reshni* a los 25 días después de la primera inoculación en semillas Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

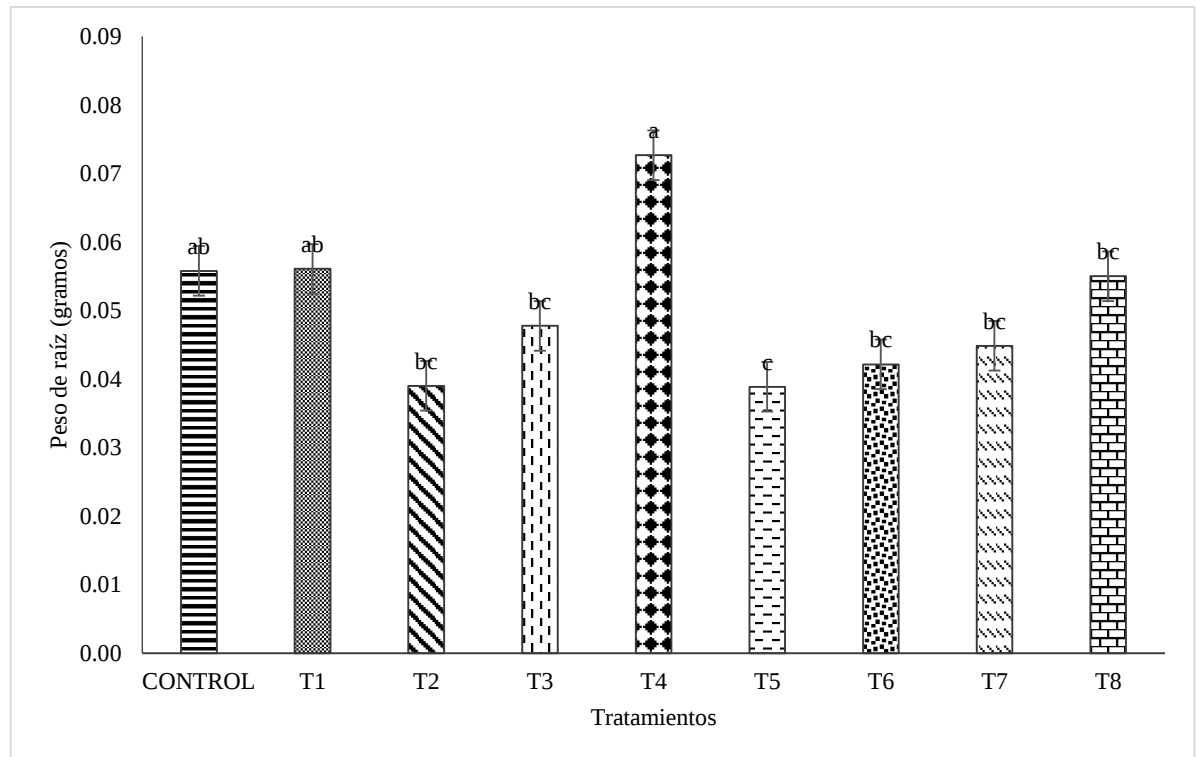


Elaboración: Autora

4.1.2.3. Peso radicular

El peso radicular de las plántulas de mandarinas inoculadas con los consorcios bacterianos desde semilla fue superior en T4 (BGL7, RIZ 15) con un promedio de 0.0727 g de peso, el T5 (BGR9, RIZ 14) tuvo el menor peso radicular con un valor de 0.0389g, muy por debajo del control.

Gráfico 3. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en peso radicular de plántulas de *Citrus reshni* a los 25 días después de la primera inoculación en semillas. Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

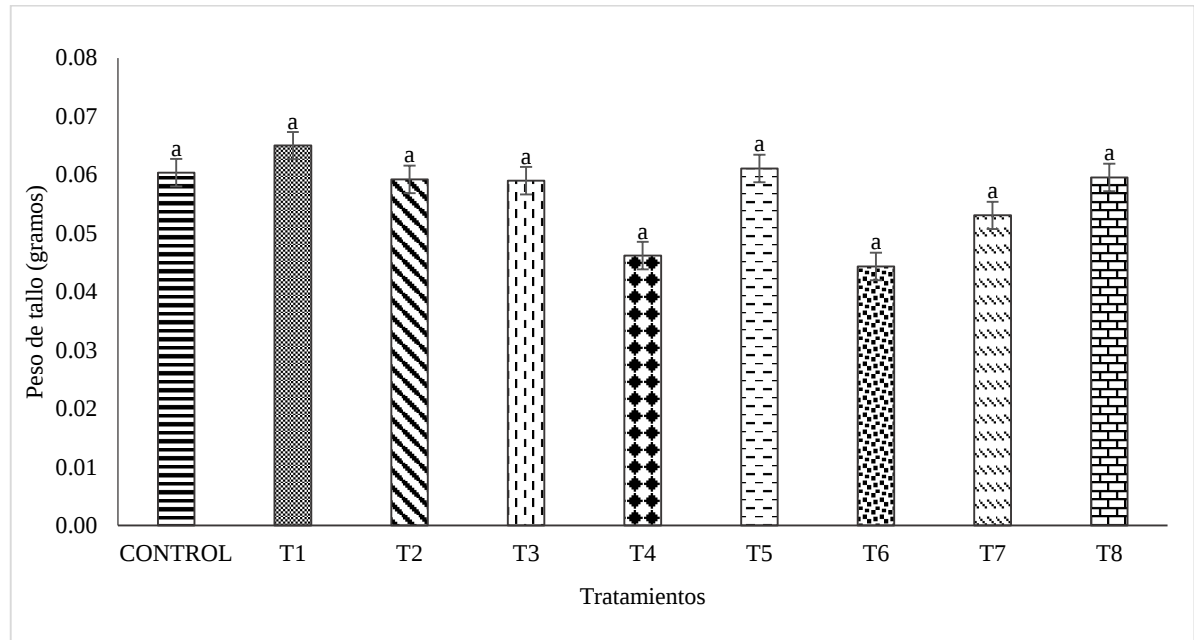


Elaboración: Autora

4.1.2.4. Peso del tallo

No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos, pero si diferencias matemáticas, siendo T1 (BAC1, RIZ6) superior a los demás con un peso de 0.0650 g, y el T4(BGL7, RIZ 15) registró el menor promedio con 0.0462, muy por debajo del control.

Gráfico 4. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en peso del tallo de plántulas de *Citrus reshni* a los 25 días después de la primera inoculación en semillas. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).



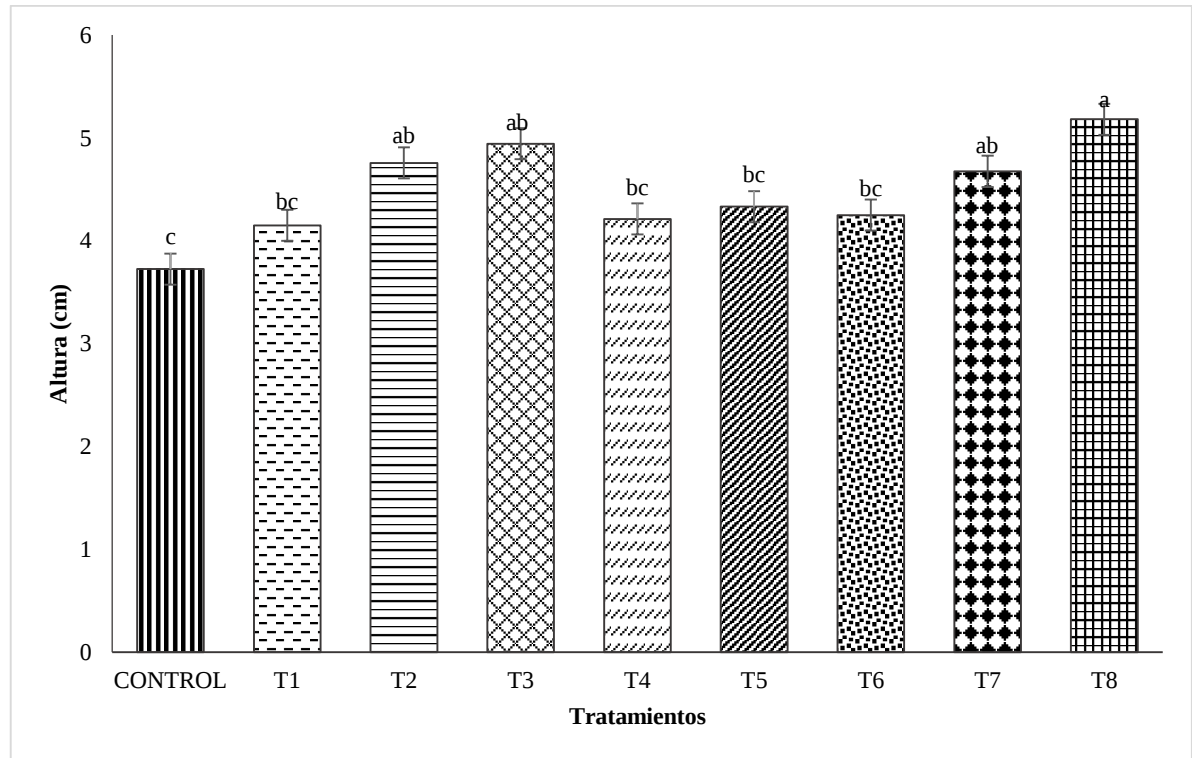
Elaboración: Autora

4.1.3. Evaluación del desarrollo de plántulas de *Citrus reshni* inoculadas con consorcios bacterianos (*Bacillus spp.* + *Rhizobium spp.*)

4.1.3.1. Altura de planta

El tratamiento 8 (BSA16, RIZ20) presentó un promedio de 5.18 cm, siendo el de mayor altura en las plántulas, seguido de los tratamientos T3 (BGJ2, RIZ12), T2 (BCM6, RIZ11) y T7 (BG-3, RIZ18) con promedios de 4.98, 4.76 y 4.68 cm respectivamente. La menor altura se registró en el tratamiento control, que obtuvo un promedio de 3.73 cm.

Gráfico 5. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en la altura de plántulas de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

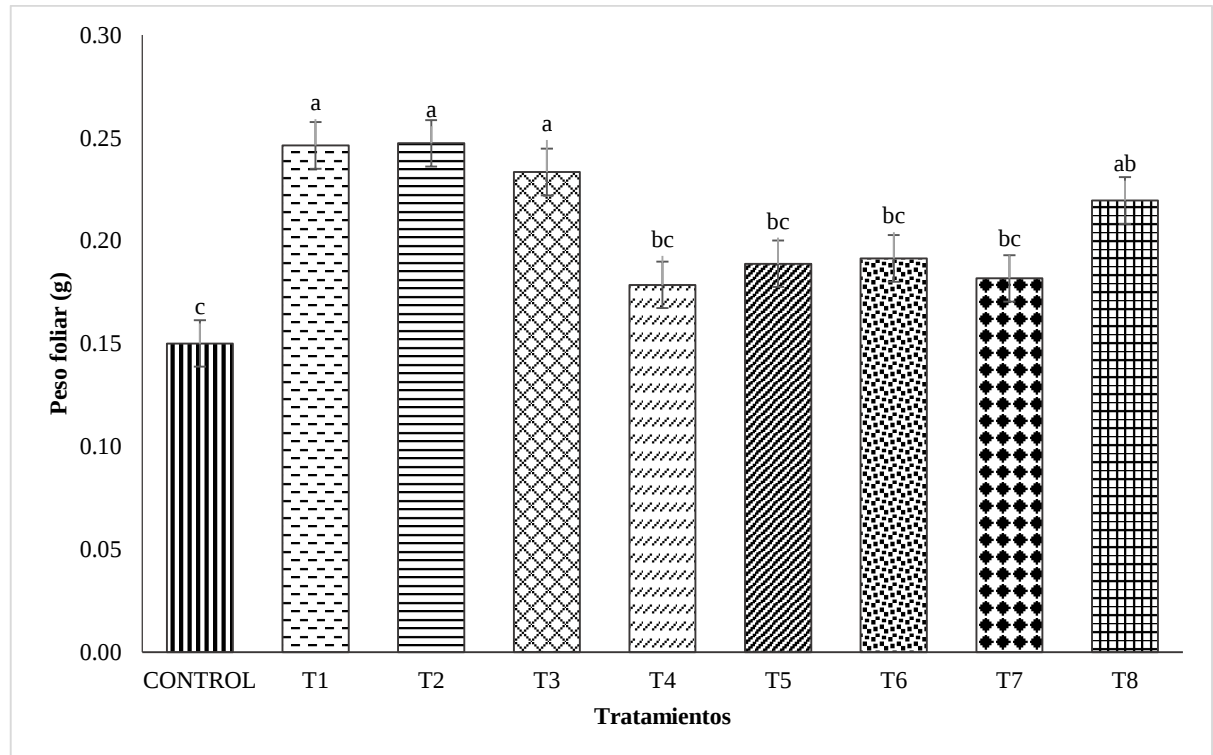


Elaboración: Autora

4.1.3.2. Peso foliar

El peso foliar de las plántulas de mandarinas inoculadas con los consorcios bacterianos fue superior frente al control, siendo el T2 (BCM6, RIZ11) el mejor con un promedio de 0.2474 g de peso, seguido por los tratamientos T1(BCA1, RIZ-4) y T3(BGJ2, RIZ12) con promedios de 0.2464 y 0.2335 g respectivamente. El control mostró un promedio de 0.1501 g, inferior a los demás tratamientos.

Gráfico 6. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en el peso foliar de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

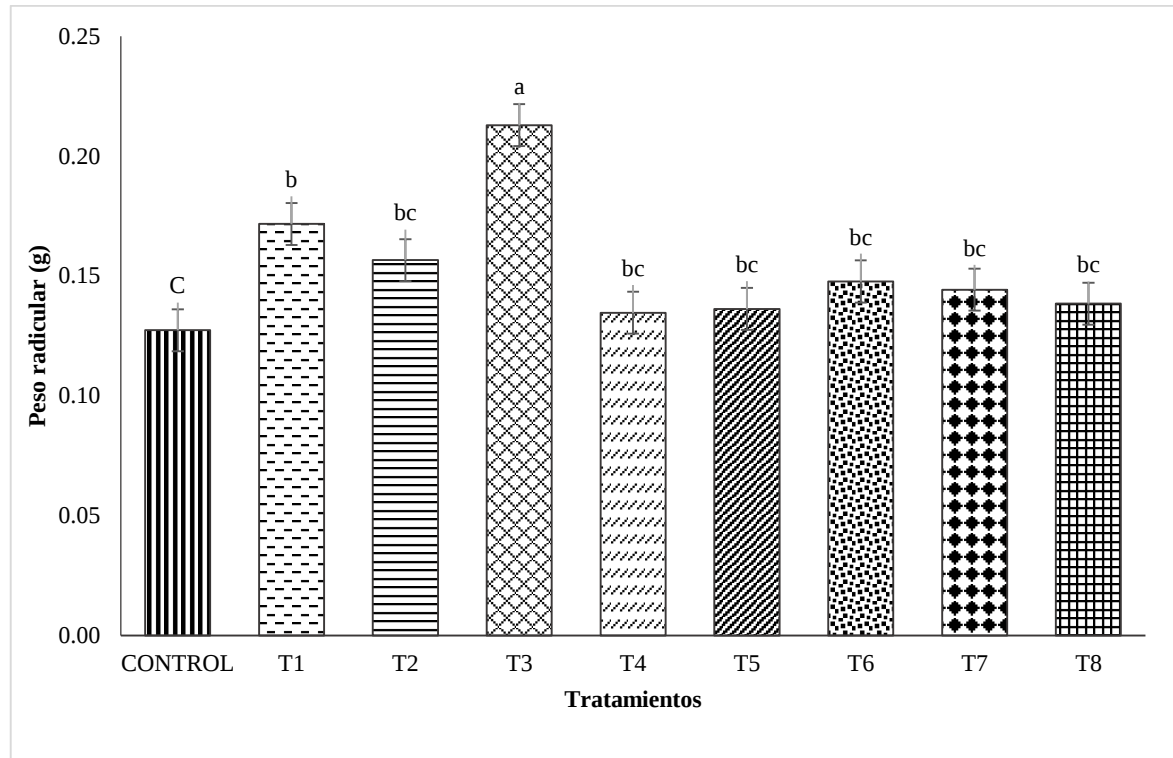


Elaboración: Autora

4.1.3.3. Peso radicular

El peso radicular de las plántulas de mandarinas inoculadas con los consorcios bacterianos fue superior frente al control, siendo el T3 (BGJ2, RIZ12) el mejor con un promedio de 0.2129 g de peso, seguido por T1(BCA1, RIZ-4) con 0.1716 g. El control mostró un promedio de 0.1273 g, inferior a los demás tratamientos.

Gráfico 7. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en el peso radicular de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

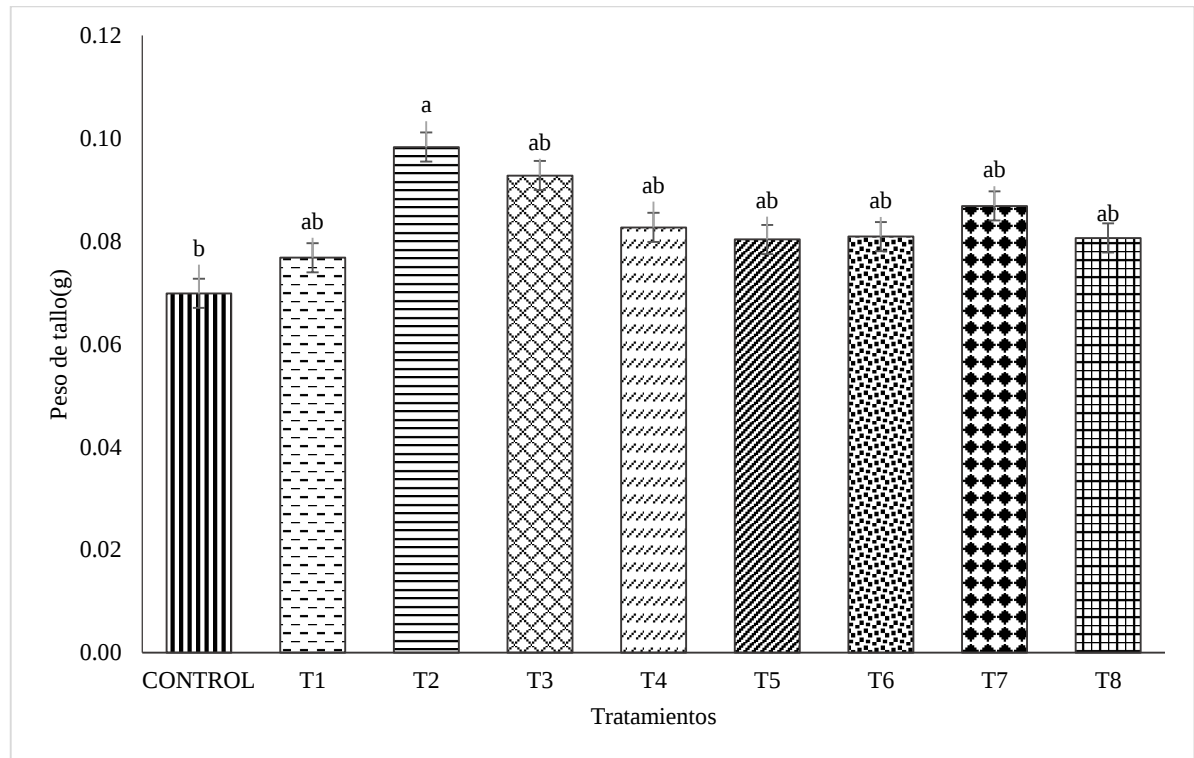


Elaboración: Autora

4.1.3.4. Peso del tallo

El peso del tallo de las plántulas de mandarinas inoculadas con los consorcios bacterianos fue superior frente al control, siendo T2 (BCM6, RIZ11) el mejor con un promedio de 0.0983 g de peso, estadísticamente igual a los demás tratamientos. El control obtuvo 0.0699 g peso, siendo inferior a todos los tratamientos.

Gráfico 8. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en el peso del tallo de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Duncan).

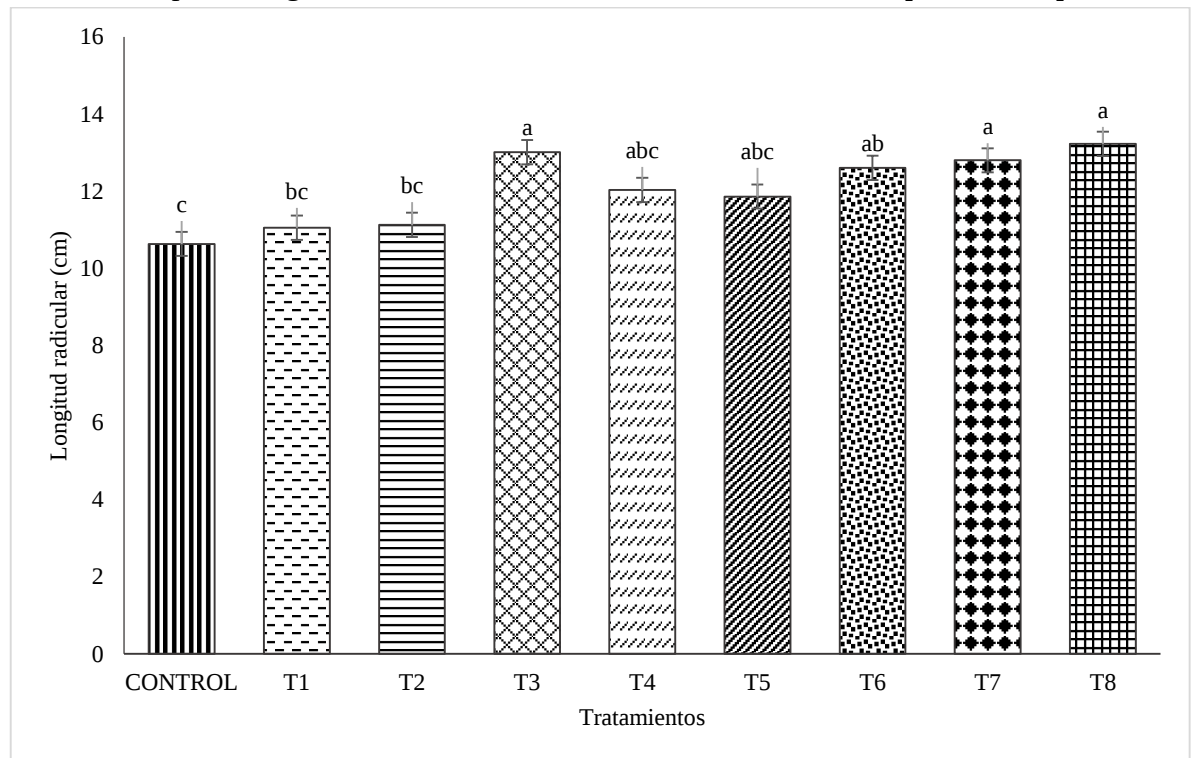


Elaboración: Autora

4.1.3.5. Longitud radicular

La longitud radicular de las plántulas fue alta en T8(BSA16, RIZ20), T3 (BGJ2, RIZ12) y T7(BG-3, RIZ18), estadísticamente iguales con promedios de 13.22, 13.01 y 12.8 cm respectivamente. El tratamiento control obtuvo 10.63 cm, encontrándose muy por debajo de todos los tratamientos.

Gráfico 9. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en longitud radicular de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante.

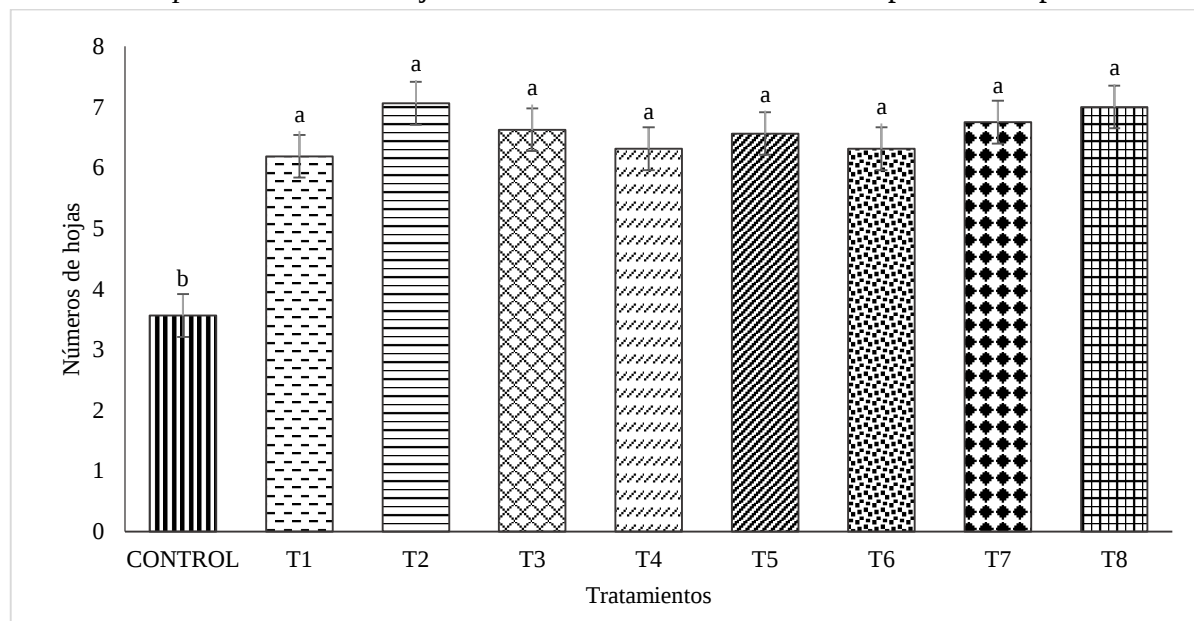


Elaboración: Autora

4.1.3.6. Numero de hojas

En número de hojas los tratamientos con consorcios bacterianos fueron superiores al control e iguales estadísticamente entre ellos, matemáticamente el tratamiento T2(BCM6, RIZ11) y T8(BSA16, RIZ20) tuvieron un promedio de 7 hojas. El control estuvo muy por debajo de todos los tratamientos con un promedio de 3.5 hojas.

Gráfico 10. Efecto de los consorcios aislados bacterianos de *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* en número de hojas de *Citrus reshni* a los 45 días después de trasplante.



Elaboración: Autora

4.2. Discusión

4.2.1. Mecanismos de acción de Rizobacterias

En el estudio se coincide con Lugtenberg y Kamilova (2009) para quienes el género *Bacillus* tiene la capacidad de liberar indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántula. Por otra parte, *Rhizobium sp.* posee una enzima denominada nitrogenasa capaz de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4) facilitando a la planta en asimilar el nutriente, mejorando el crecimiento de ésta Annan (2012), esto coincide con los resultados de esta investigación, en la cual se encontró un mayor crecimiento en el

tratamiento 8(Bsa16-Riz20) con un promedio de 5.18 cm a diferencia del control que obtuvo una media de 3.73 en altura de plántulas.

En el resultado de peso radicular, el que obtuvo mejores rendimientos fue el tratamiento 3 (Bgj2-Riz12) con promedios de (0.2129g), en oposición con el control de (0.1273g). En longitud radicular el tratamiento 8(Bgj2-Riz12) con (13.2250cm) y T3 (Bsa16-Riz20) con (13.0125cm) con promedios superiores al control (0.1273g). Contribuyendo que la presencia de las bacterias *Bacillus* tiene efectos de promoción del crecimiento a través de vías o mecanismos independientes de rutas que involucran auxinas o etileno. López (2009), considera que dichas rutas son las principales para promover el desarrollo vegetal en diversas especies. Se ha demostrado que a través de la ruta de señalización de citocininas, tiene un efecto promotor del desarrollo, además estas bacterias realizan la acumulación de biomasa.

4.2.2. Solubilización de fosfato

Según Sperber (1958), Goldstein (1986) y Rodríguez (1999) las bacterias de género *Bacillus sp.* y *Rhizobium sp.* tienen la capacidad de solubilizar fosfato, por medio del metabolito ácido 2-cetoglucónico, concordando con los efectos que tuvieron las plántulas de mandarina (*Citrus reshni*), de manera que al solubilizar el fósforo permite la absorción de nutrientes y un mejor desempeño en la fotosíntesis de la planta, teniendo que los tratamientos T2 (BCA1-RIZ11), T1(BCA1-RIZ4) y T3 (BGJ2-RIZ12), dando mejores rendimientos con los promedios de 0.2474g, 0.2464g, 0.2335 superior al control de 0.1501.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- De las especies forestales se logró aislar y caracterizar 8 cepas del género *Bacillus* sp. y 8 cepas de *Rhizobium* sp, los cuales tienen la capacidad de solubilizar fósforo, proporcionando un mayor peso y crecimiento de hojas en las plantas.
- La fijación de nitrógeno de las rizobacterias les permite un mejor desarrollo y crecimiento a las raíces de la planta.
- La inoculación combinada de rizobacterias de género *Bacillus* y *Rhizobium* tienen la capacidad de solubilizar fósforo, potenciando el crecimiento de las plántulas, emisión foliar, desarrollo de hojas que aportan a un mayor peso del follaje, así como el de la raíz y tallo.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar las rizobacterias seleccionadas en este estudio, para realizar ensayos frente a hongos que perjudiquen a especies forestales.
- Usar los aislados bacterianos obtenidos en especies forestales para observar su efecto en el crecimiento.
- Realizar más pruebas bioquímicas para especificar la especie de cada una de las *Rhizobium* y *Bacillus* que se aislaron.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, O., & Allen, E. (1981). The Leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press. London-United Kingdom. 812 p.
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F., & Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología 46(4): 338-347.
- Aslim, B., Saglam, N., & Beyatli, Y. (2002). Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. Turkish Journal of Biology 26: 41-48.
- Barreto, D., Valero, N., Muñoz, A., & Peralta, A. (2007). Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. Zonas Áridas 11(1): 240-250.
- Berhard-Reversat, F. (1986). Soil nitrogen mineralization under a Eucalyptus plantation and a natural Acacia forest in Senegal'. Forest Ecology and Management 23(2): 233-244.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecología Aplicada 9(1): 31-39.
- Castellón, R., & Reyes, B. (2007). Preferencias del ganado ovino por frutos de especies leñosas forrajeras, germinación y viabilidad de las semillas para establecimiento de especies forestales en el bosque seco de la Estación Experimental “El Limón”, II semestre 2016. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Managua-Nicaragua. 43 p.

- Chabbal, M., Giménez, L., Garavello, M., Alayón, P., Rodríguez, V., & Mazza, S. (2015). Caracterización de naranjo Valencia Late sobre diferentes portainjertos en "Entre Ríos", Argentina. *Cultivos Tropicales* 36(4): 94-99.
- Corona, A., Munive, J., Cuellar, A., Corona, M., Salinas, F., Chávez, L., & Bermúdez, K. (2015). Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos de plantas de *Lupinus montanus*. CONACYT. Morelos-México. 1p.
- Deb, M., Mandal, S., & Kumar, N. (2005). Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish *Labeo rohita*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2005(3): 280–286.
- García, R. (2016). Rol de los microorganismos activos, aislados de la rizósfera y filósfera en la propagación de las especies forestales *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*, con fines de conservación y explotación comercial. Universidad Nacional de Tumbes. Tumbes-Perú.
- Grijpma, P. (1969). *Eucalyptus deglupta* Bl. a promising forest species for humid tropical areas of Latin America. *Turrialba* 18(4): 409-415.
- Haiyan, Z., Zhongde, L., Changrong, W., & Zhangcheng, Z. (2006). Effects of intercropping with persimmon on the rhizosphere environment of tea. *Frontiers of Biology in China* 1(4): 407-410.
- Hernández, J., Cubillos, J., & Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical* 2(2): 51-62.
- King, E., Ward, M., & Raney, D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44(2): 301-307.

- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1): 1-25.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:541-56.
- Marín-Gómez, O. (2006). Composición, actividad de forrajeo y “polinización” de las aves e insectos que visitan el guamo *Inga edulis* Martius (Fabales: Mimosaceae) en dos agroecosistemas del Quindío. Universidad del Quindío. Quindío-Colombia. 112 p.
- Martínez, M., Castañeda, H., Moreno, J., Ruíz, M., & Álvarez, C. (2005). Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus silvestres* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Scientia-CUCBA* 7(2):175-181.
- Miranda, C., Martins, O., & Clementino, M. (2008). Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93(3): 297-304.
- Moya, J. (2012). ¿Cómo hacer microorganismos eficientes? . Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Heredia-Costa Rica. 1 p.
- Moya, R. (2004). Wood of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New Forest* 28: 299–307.
- Rojas-Rodríguez, F., & Torres-Córdoba, G. (2014). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. Cenízaro (*Samanea saman* (Jacq) Merril.)). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica)* 11(27): 70-72.
- Sánchez, M., Hernández, V., & Colli, J. (2017). Promoción del crecimiento en especies forestales para su adaptación y reforestación. *Jóvenes en la Ciencia* 3(1): 314-318.

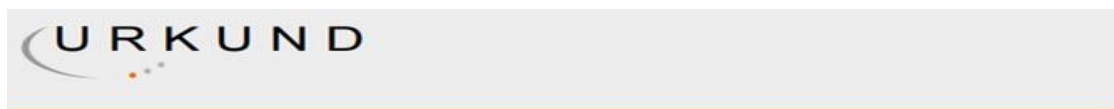
- Sosa, A., Elías, A., García, O., & Sarmiento, M. (2004). Isolation and partial phenotype characterization of rhizobia strains that nodulate creeping legumes. *Cuban Journal of Agricultural Science* 38(2):189-193.
- Sousa, M. (1993). El género *Inga* (Leguminosae: Mimosoideae) del sur de México y Centroamérica, estudio previo para la flora Mesoamericana. *Annals of Missouri Botanical Garden* 80: 223-269.
- Tsavkelova, E., Yu, S., Cherdyntseva, T., & Netrusov, A. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42(2): 117–126.
- Van Loon, L. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119(3): 243-254.
- Vélez, J., Álvarez, J., & Alvarado, O. (2012). El estrés hídrico en cítricos (*Citrus spp.*): una revisión. *ORINOQUIA* 16 (2): 32-39.
- Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52(1): 487–511.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado URKUND del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, Dr. **Hayron Fabricio Canchignia Martínez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “**MICROORGANISMOS EFICIENTES DE ESPECIES FORESTALES DE LA PROVINCIA DE LOS RIOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE *Citrus reshni* (MANDARINA CLEOPATRA)**”, previo a la obtención del grado académico de Magister en Manejo Forestal Sostenible, perteneciente a la Ing. **Nadia Carolina Aldaz Borja**, CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 6 %.



Urkund Analysis Result

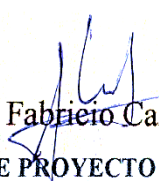
Analysed Document:	TESIS ALDAZ (Final).docx (D53977698)
Submitted:	6/19/2019 3:51:00 PM
Submitted By:	hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance:	6 %

Sources included in the report:

Tesis ALDAZ urkund.docx (D53977349)
<https://www.pag.org.mx/index.php/PAG/article/view/659>
<http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/90483f65125-f90b-4b5a-8653-f00bca2b0f4b>

Instances where selected sources appear:

16


Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Anexo 2. Foto galería de árboles forestales

Foto1. Árboles de Samán (*Samanea saman*)



Foto 3. Diversidad florística bosque tropical Ecuador



Anexo 3. Foto galería de trabajo en Laboratorio de Biotecnología

Foto 4: Cámara de flujo laminar donde se desarrollo el aislamiento de bacterias



Foto 5: Preparación de bacterias para la inoculación



Anexo 4. Foto galería de trabajo en vivero

Foto 6:Inoculaciones de bacterias a plantulas



Foto 7: Distribución de los tratamientos en plántulas de mandarina (*Citrus reshni*).

