



Evaluación de un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas

Yépez Calderón, Pedro José

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

14 de septiembre de 2020



Document Information

Analyzed document	Tesis_Pedro-Jose Yopez_Urkund.docx (D79022341)
Submitted	9/12/2020 11:28:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/20454/1/T-ESPE-039277.pdf Fetched: 7/22/2020 8:10:08 PM	1
SA	borrador Ñacato Suintaxi Carolina y Valencia Gordón María.docx Document borrador Ñacato Suintaxi Carolina y Valencia Gordón María.docx (D20852580)	1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / tesis_salazar_belen.txt Document tesis_salazar_belen.txt (D52966771) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com	4
W	URL: https://www.cio.mx/archivos/avances_de_la_ciencia_en_Mexico_2018/Capitulo_1.pdf Fetched: 7/2/2020 11:56:09 PM	1

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISER

Proceso de gestión de
datos de clientes
en un sistema de
gestión de información
de clientes de
empresas de
información
MBA: 2010-01-01-01-01
Alma
Koch
Kaiser

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C.C. 1708880792



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Evaluación de un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas**" fue realizado por el señor **Yépez Calderón, Pedro José**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de septiembre de 2020

ALMA ROSEL KOCH KAISER	ALMA ROSAL KOCH KAISER CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE SANGOLQI, ECUADOR TEL: 078 252 1120-000
---------------------------------	--

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C.C. 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Yépez Calderón, Pedro José**, con cédula de ciudadanía n° **1720160942**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 14 de septiembre de 2020

Firma:

Yépez Calderón, Pedro José

C.C. 1720160942



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Yépez Calderón, Pedro José**, con cédula de ciudadanía n° **1720160942**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación "**Evaluación de un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de septiembre de 2020

Firma:

Yépez Calderón, Pedro José

C.C. 1720160942

Dedicatoria

A mis padres José y Margarita

A mis hermanas María Sol y Lorena

A los que están en este mundo y a los que ya no, pero siempre estarán en el
mío

Pedro José Yépez Calderón

Agradecimientos

José y Margarita, mis pilares de vida, les doy las gracias por su apoyo. Por tener siempre el consejo apropiado y el abrazo en el momento indicado. Por tenerme paciencia y salvarme de ahogarme en un vaso de agua. María Sol y Lorena, el tesoro en mi vida, gracias por apoyarme, cuidarme, aguantarme y más que todo por estar siempre ahí ayudándome a levantar. Rescato de todos ustedes cada conversación, cada beso, gesto de cariño y ayuda, que no solo me dieron a mí, más bien que intentan repartir al mundo.

A mis abuelitos, tíos y primos, que me dieron el apoyo y buenos deseos para terminar esta etapa de mi vida. Marcelo, Gladys, Sebas y Daniel es un lujo tenerlos semana a semana siendo parte fundamental en mi familia y que vieran como voy culminando mi meta.

A Berenice, por ser mi complemento, por motivarme y librarme de miedos, principalmente por ser mi Cariño.

A Alma Koch, por ser un ejemplo de ser humano, profesional y docente. Fue un lujo poder trabajar con usted y poder aprender mucho más; al Doc. Andrés Izquierdo por darme la confianza y permitirme realizar mi tesis en su laboratorio.

A mis amigos Giuliette, Richi, Angy, Taty, Sophi, Gaby, Sari e Isra por compartir momentos inolvidables en esta vida. Por disfrutar, sufrir y principalmente resistir todo lo que conlleva estudiar en la ESPE para seguir apoyándonos.

Gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por darme la oportunidad de aprender, equivocarme y levantarme para llegar a ser un profesional. Gracias a todos mis amigos, compañeros y profesores que pude conocer en este período.

Les doy las gracias a todos, porque aportaron una parte para hacer de mi un mejor ser humano y ahora un profesional.

Pedro José Yépez Calderón

Índice de Contenido

Resultado Urkund	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido.....	9
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo 1: Introducción	16
Formulación del Problema	16
Justificación del Problema	17
Objetivos de Investigación.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Marco Teórico	20

	10
Rosa.....	20
Inoculación microbiana.....	25
Trichoderma	26
Bacillus.....	28
Hipótesis.....	29
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	30
Revisión bibliográfica.....	30
Zona de estudio.....	30
Metodología	31
Toma de muestra de suelo.....	31
Aislamiento de Trichoderma sp.....	32
Aislamiento de Bacillus sp.	32
Caracterización macroscópica y microscópica.....	33
Pruebas de compatibilidad	34
Caracterización molecular por secuenciación	34
Preparación del sustrato	38
Preparación del consorcio	38
Tratamientos en el sustrato.....	39
Distribución de semillas por tratamiento	39

	11
Siembra y control de germinación de las semillas.....	40
Análisis de datos	42
Capítulo 3: Resultados.....	44
Aislamiento	44
Caracterización morfológica	44
Pruebas de sinergismo <i>Trichoderma</i> vs <i>Bacillus</i>	47
Caracterización molecular.....	48
Extracción de DNA.....	48
Amplificación e identificación de fragmentos de DNA.....	49
Análisis de datos de germinación	50
Porcentaje de germinación	50
Tiempo de germinación	56
Capítulo 4: Discusión.....	59
Capítulo 5: Conclusiones	63
Capítulo 6: Recomendaciones	64
Capítulo 7: Bibliografía	65
Capítulo 8: Anexos	75

Índice de Tablas

Tabla 1	Cebadores para la amplificación de fragmentos ITS y 16S.....	36
Tabla 2	Condiciones de temperatura y tiempos para la PCR de ITS	37
Tabla 3	Condiciones de temperatura y tiempos para la PCR de 16S	37
Tabla 4	Concentración y pureza de muestras de DNA de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.....	49
Tabla 5	Germinación según códigos de semillas y tratamiento sí o no.....	53
Tabla 6	Germinación según código de semilla y tratamiento (resumen)	54
Tabla 7	Germinación según código de semillas y tratamiento (desagregado) ..	55
Tabla 8	Días promedio de germinación según tratamiento	57
Tabla 9	Días promedio de germinación según código	57

Índice de Figuras

Figura 1	Morfología del akenio de rosa.....	22
Figura 2	Muestreo de suelo	31
Figura 3	Representación esquemática de cultivo dual	34
Figura 4	Distribución de tratamientos por código de rosa	40
Figura 5	Distribución de sustrato según tratamiento.....	41
Figura 6	Registro de germinación	42
Figura 7	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. en medio PDA en caja Petri.....	45
Figura 8	Estructura microscópica de <i>Trichoderma</i> sp.....	45
Figura 9	Cultivos de <i>Bacillus</i> sp. en Agar de nutriente en caja Petri y tubo pico de flauta de aislado	46
Figura 10	Valoración microscópica de los aislamientos de <i>Bacillus</i>	47
Figura 11	Pruebas de sinergismo en medio PDA	48
Figura 12	Patrones de bandas amplificadas por PCR	50
Figura 13	Germinación por código de semilla.	51
Figura 14	Germinación según tratamiento.....	51
Figura 15	Germinación por código de semilla	52
Figura 16	Distribución del tiempo transcurrido para germinación.....	56

Resumen

La hibridación de rosas permite el desarrollo de nuevas variedades de colores, olores o formas. Tiene problemas con el bajo porcentaje de germinación y variación en el nivel de latencia entre especie, variedad y lote de semillas. Se debe a la presencia de latencia endógena y exógena dependiente de la genética, geocalización y factores ambientales. Se puede usar tratamientos post cosecha como la escarificación, la estratificación por temperatura e inoculación microbiana para mejorar la germinación. En este estudio se aislaron cepas nativas del género *Trichoderma* y *Bacillus* del suelo de la florícola “Conectiflor” Tabacundo, Pichincha, Ecuador. Se utilizaron aislados con identificación morfológica y molecular como *Trichoderma asperellum* y *Bacillus licheniformis* por el mayor sinergismo en los cultivos duales, para formar el consorcio microbiano. El estudio contó con 620 semillas en total, de 25 códigos. Se dividieron en tres tratamientos aplicados al sustrato (*Trichoderma*; *Bacillus*; *Trichoderma* + *Bacillus*) y un control. Se distribuyó equilibradamente por código y aleatoriamente para la ubicación espacial. El tiempo de observación fue de 167 días que incluyó tres periodos: crecimiento de microorganismos, estratificación en frío y germinación. Germinaron 14 semillas de cinco códigos. Para las semillas de los cinco códigos, la germinación por tratamiento tuvo mayores valores para la aplicación del consorcio (9.5%) que para *Trichoderma* sola (4,6%), *Bacillus* (4.7%) y el control (3.2%). El código H429 con el consorcio microbiano tuvo mayor germinación (25%) que el control (8%). El tiempo de germinación fue menor con tratamiento con *Trichoderma*, con una media de 64 días, 75 con consorcio y 92 para control. Los porcentajes de germinación fueron mayores cuando se realizó inoculación microbiana y el tiempo de germinación fue menor en las semillas en las que participó *Trichoderma*. Todas las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$).

Palabras claves

- ROSA
- GERMINACIÓN
- MICROORGANISMOS
- TRICHODERMA
- BACILLUS

Abstract

Roses hybridization allows for the development of new varieties of colors, aromas and shapes. However, this technique presents some issues like low germination percentages and variation in latency levels between species, varieties and seeds lots. This is due to the presence of endogen and exogen latency and it depends on genetics, geolocalization and environmental factors. Several post-harvest treatments are applied to improve the germination, such as, scarification, temperature stratification, and microbial inoculation. In this study, native strains of *Trichoderma* and *Bacillus* were isolated from soil samples used in “Conectiflor”, a flower business located in Tabacundo, Pichincha – Ecuador. The native strains were *Trichoderma asperellum* and *Bacillus licheniformis*, identified through morphological and molecular methods using internal transcribed spacers (ITS) for *Trichoderma* and 16rRNA for *Bacillus*. Then, an artificial microbial consortium was formed due to synergism as in the dual test. In the assay, 620 seeds from 25 codes were divided into three treatments applied in the substrate (*Trichoderma*; *Bacillus*; consortia: *Trichoderma* + *Bacillus*) and one negative control. Distribution was equitable for codes and randomized for spatial ubication. The observation time was 167 days, including three periods: microorganisms growing, low-temperature stratification and germination. In total, 14 seeds from five codes germinated. For these codes, 9.5% were from consortia treatment, 4.7% from *Bacillus*, 4.6% from *Trichoderma*, and 3.2% from control. Among all the different seed codes, H429 (with microbial consortia) had the greatest germination rate (25%) than control (8%). Germination time was shorter in seeds subject to the *Trichoderma* treatment (mean of 64 days), while the mean for the seeds treated with the consortium was 75 days, and for control, 92 days. These differences were not statistically significant ($p>0.05$). Finally, germination percentages were higher when microbial inoculation was performed and germination time was shorter when *Trichoderma* was used.

KEYWORDS:

- ROSE
- GERMINATION
- MICROORGANISMS
- TRICHODERMA
- BACILLUS

Capítulo 1: Introducción

Formulación del Problema

Las rosas son económicamente importantes en la industria ornamental, cosmética, perfumería y también actualmente en la investigación farmacéutica (Fougère-Danezan et al., 2015). Son las plantas ornamentales más populares a nivel mundial debido a la diversidad de rasgos en el mercado (Byrne et al., 2019). La variedad de colores, fragancias, número de pétalos, calidad de los tallos, tamaño de las flores y durabilidad son características por las cuales son adquiridas y apreciadas por sus consumidores (Leus et al., 2018).

La hibridación de rosas se realiza con el objetivo de conseguir nuevas variedades de colores, olores o formas de las flores para innovar en el mercado (Caser et al., 2014). El proceso de hibridación se dificulta por el bajo porcentaje de germinación debido a la presencia de latencia endógena y exógena en las semillas de rosa, que causa una baja y desigual tasa germinativa (Anderson & Byrne, 2007; Zlesak, 2008).

Por tener valor económico, el conocimiento del manejo, selección y el tratamiento post cosecha de las semillas, es generalmente un secreto comercial (Gudin, 2017). Las investigaciones sobre eliminación de latencia y estimulación de la brotación en semillas se encuentran influenciados entre otros factores por la geolocalización, ambiente y genética (Zlesak, 2008).

El grado de latencia y la proporción del poder germinativo varían entre especie, cultivares y lotes de semillas. Los tratamientos post cosecha aplicados, como el

hormonal, la escarificación, la estratificación o inoculación microbiana tienen que ser eficaces y eficientes (Meyer, 2008). En las investigaciones que aplican consorcios microbianos para promover la germinación de semillas de rosas por lo regular no reportan los microorganismos utilizados. La aplicación de bioinsumos comerciales generalmente aumenta el porcentaje de brotación y habitualmente son constituidos por microorganismos del género *Trichoderma*, *Bacillus* o *Klebsiella* (Luca Pipino et al., 2011).

Justificación del Problema

El Ecuador, desde 1990, registra un importante incremento en la exportación de flores. Actualmente es el tercer país de mayor producción de flores a nivel mundial. Según el reporte anual de 2019, se exportaron 158.3 mil toneladas, alcanzando los USD 874 millones de recaudación. El 74 % de la exportación de flores corresponde a rosas. Ecuador cultiva principalmente rosas de flores grandes y son comercializadas en las floristerías de todo el mundo, principalmente en Estados Unidos, la Unión Europea (U.E.) y Rusia (Leus et al., 2018; Expoflores, 2020).

Las rosas son el cultivo de flores más importante en el mundo. Su hibridación permite el desarrollo de rasgos innovadores positivos (Leus et al., 2018). Se realiza este proceso para satisfacer las preferencias de los consumidores, obteniendo variedad de colores, fragancias, formas y características que puedan renovar el mercado y la industria (Arzate Fernández et al., 2011; Shivakumar et al., 2019).

En el proceso de hibridación de rosas, la germinación de las semillas tiene complicaciones. La heterogénea y baja tasa de germinación, conjuntamente con el

tiempo del proceso, son obstáculos en el cruce (Caser et al., 2014). Todo esto debido a la presencia de latencia endógena y exógena en las semillas de rosa, además de la variación del nivel de latencia entre especie, variedad y lote de semillas (Nadeem et al., 2013).

La dormancia en los aquenios de rosa pueden durar de meses hasta años, la genética, las condiciones ambientales, los procesos y tiempos de recolección son factores que influyen en los niveles de latencia (Zlesak, 2008; Arzate Fernández et al., 2011).

Pese a las diferentes metodologías aplicadas para aumentar la germinación, aún no se puede seguir un protocolo estándar (Conev & Sandhu, 2015). La variación de brotación por especie y metodología dificulta seleccionar un tratamiento ideal para todos los genotipos de rosas (Anderson & Byrne, 2007). Además, las investigaciones realizadas para el manejo, selección y el tratamiento post cosecha de las semillas son generalmente un secreto comercial (Gudin, 2017). Por ello los tratamientos aplicados para la eliminación de latencia como la estimulación de la germinación tienen que ser realizados por cada florícola, debido a la poca información reportada, la variación del nivel de latencia y respuesta a los protocolos aplicados (De Vries & Dubois, 2015).

En la actualidad los protocolos post cosecha se basan en estratificación y escarificación para propagar la germinación (Arzate Fernández et al., 2011). Para algunas especies la combinación de diferentes tratamientos puede aumentar la brotación (Z. Zhou & Bao, 2011). La estratificación post cosecha aplicada por la florícola puede ser potenciada conjuntamente con la inoculación microbiana para aumentar la

tasa de germinación, controlar la uniformidad o disminuir el tiempo (Meyer, 2008). Las investigaciones reportan que la inoculación de bioinsumos comerciales o aislamientos nativos de microorganismos del género *Trichoderma*, *Bacillus* o *Klebsiella* incrementan el poder germinativo (Luca Pipino et al., 2011). La aplicación de microorganismos tiene que ser evaluada en las semillas de rosas híbridas de la florícola y, de ese modo, lograr la maximización del protocolo de brotación (Leus et al., 2018).

Objetivos de Investigación

Objetivo General

Evaluar un consorcio microbiano en la germinación de semillas de rosas híbridas.

Objetivos Específicos

- Aislar *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. de muestras de suelo de la florícola “Conectiflor”.
- Identificar morfológica y molecularmente *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. de los aislados obtenidos del suelo de la florícola “Conectiflor”.
- Seleccionar *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. con interacción sinérgica.
- Elaborar un consorcio microbiano con *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. con sinergismo.
- Analizar la influencia del consorcio microbiano en el porcentaje de germinación.

Marco Teórico

Rosa

La rosa lidera el mercado de flores ornamentales a nivel mundial, posee cultivos fundamentalmente en Europa, América y África, y se comercializa alrededor de todo el mundo (Leus et al., 2018). Ornamentalmente se las puede usar como rosas de jardín, de macetas o cortadas (Byrne et al., 2019). Asimismo, por sus características se utiliza en la industria de cosméticos, perfumes, bebidas y medicinas (Uggla et al., 2005).

Los tres principales países productores de flores a nivel mundial son Holanda, Colombia y Ecuador. La exportación de flores en Ecuador ocupa el cuarto lugar entre las no petroleras, después del banano, camarón y atún. Sus principales importadores son Estados Unidos, Unión Europea y Rusia donde el 75% de las exportaciones de flores corresponde a rosas (Expoflores, 2020).

Las rosas de exportación se encuentran bajo estrictos criterios de selección. Además de los rasgos ornamentales como el color y el número de pétalos, es importante la dureza del tallo, su producción por metro cuadrado, la resistencia a las enfermedades y la vida útil de florero (Vukosavljev et al., 2013; Byrne et al., 2019).

Clasificación botánica

El género *Rosa* pertenece a la familia Rosaceae, constituida por alrededor de 100 géneros y más de 3000 especies; alrededor de 90 especies presentan importancia

económica y nutricional. Entre éstas se encuentran especies como manzana, pera, durazno, fresa y mora entre otras (Leus et al., 2018; Byrne et al., 2019).

Según Yong (2004) la clasificación botánica es:

Reino	Plantae
Subreino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Tribu	Roseae
Género	<i>Rosa</i>

El género contiene cuatro subgéneros: *Hesperhodos*, *Hulthemia*, *Platyrhodon* y *Rosa* (*Eurosa*). Aproximadamente el 95% de todas las especies pertenecen al subgénero *Rosa* (Arzate Fernández et al., 2011).

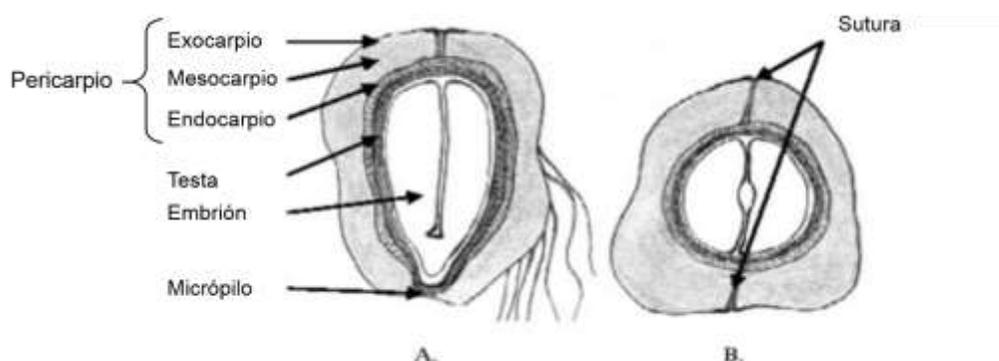
Morfología

La rosa es una planta arbustiva, perenne, semi-leñosa y normalmente presenta aguijones. Las hojas son compuestas pinnadas, caducas, constituidas por tres, cinco o siete folíolos, presentan formas ovaladas con márgenes dentados. Las flores son completas generalmente solitarias o en inflorescencias, constituidas por un receptáculo carnoso, cáliz con cinco sépalos y corola con cinco pétalos o múltiplos de cinco (Younis et al., 2007; Arzate Fernández et al., 2011; Leus et al., 2018).

El fruto también denominado escaramujo es un pseudocarpo o fruto falso, constituido por una pared carnosa y en su interior contiene varios aquenios (Uggla et al., 2005; Shivakumar et al., 2019).

El aquenio (Figura 1) conformado por un pericarpio leñoso y duro constituido por tres capas: exocarpio, mesocarpio y endocarpio. En la parte interna del endocarpio existe una membrana denominada testa que protege al embrión (Ueda, 2003; Shivakumar et al., 2019).

Figura 1
Morfología del aquenio de rosa.



Nota: (A.) vista longitudinal y (B.) vista transversal Fuente: (Zlesak, 2008).

Hibridación

La hibridación se realiza para aumentar la diversidad de rosas. El mercado se tiene que adaptar a la aceptabilidad por parte de los consumidores en la variación de gustos como colores, tamaños y formas (Vainstein, 2002). Empleando un sistema de

producción más especializado, se pueden desarrollar nuevos cultivos e incursionar en el mercado de rosas con rasgos innovadores (Leus et al., 2018).

Generalmente la hibridación entre la mayoría de las especies de rosas es posible, pero puede presentar descomposición híbrida si se realiza de forma rutinaria (L. Pipino et al., 2013). El aborto temprano de embriones, la baja tasa de germinación de las semillas, la deficiencia en el crecimiento o en los colores, son problemas que se relacionan fuertemente con la descomposición híbrida (Canli & Kazaz, 2009).

Germinación y latencia

Los embriones del género *Rosa* se caracterizan por presentar dificultades en la brotación. La germinación de semillas híbridas es clave en el proceso y presenta obstáculos necesarios de superar por la industria para promover uniformes y altas tasas de brotación por código para su selección (L. Pipino et al., 2013; Zlesak, 2008).

La variación de la germinación y los niveles de latencia de la semilla se definen por el genotipo, temperaturas durante el desarrollo de la semilla, nivel de maduración en la cosecha, tiempo de extracción de la semilla y el tratamiento post cosecha aplicado (Zlesak, 2008; Alp et al., 2009; Canli & Kazaz, 2009; Leus et al., 2018; Luca Pipino et al., 2011). Por ello, los niveles de latencia varían entre especies, lotes de semillas y los factores ambientales en los cuales se desarrolla el embrión y la planta madre (De Vries & Dubois, 2015; Meyer, 2008; Nadeem et al., 2013).

La semilla de rosa presenta latencia física generada por el pericarpio que cumple con el objetivo de proteger al embrión pero también limita el intercambio

gaseoso, la penetración de agua y la expansión del embrión (Kazaz et al., 2010; Zlesak, 2008). Conjuntamente presenta latencia fisiológica por el ácido abscísico que es un inhibidor de crecimiento y se encuentra distribuido en el pericarpio y testa dentro del aquenio (Caser et al., 2014; Zlesak, 2008).

Los factores ambientales más importantes que controlan el momento de la germinación son la temperatura, la luz y la humedad del suelo. La temperatura es el factor predominante como indicador del cambio estacional y generador de una respuesta en la semilla para inducir la germinación. La humedad y luz son factores con menor importancia como indicadores del cambio estacional y tienen una menor influencia en los niveles de latencia de la semilla (Baskin & Baskin, 1988; Z. Q. Zhou et al., 2008).

Con el objetivo de superar la dormancia de la semilla y debilitar el pericarpio para disminuir los niveles de latencia, los cultivadores de rosas establecen estándares y protocolos para la recolección y germinación (Meyer, 2008; L. Pipino et al., 2013) basados en la región en la que se ubica el cultivo y apropiados para cada clima de la zona (Ueda, 2003).

Para mejorar la tasa de germinación existen diferentes tratamientos post cosecha que pueden ser aplicados a las semillas como: estratificación, administración de hormonas vegetales exógenas o de enzimas maceradoras, escarificación o inoculación microbiana. Algunos de estos tratamientos logran ser solo eficaces para rosas y otros para múltiples cultivos (De Vries & Dubois, 2015).

Inoculación microbiana

Microorganismos beneficiosos para las plantas potencian la germinación, el crecimiento y desarrollo. Entre ellos están bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) y hongos endo y ectomicorrícicos (Figueiredo et al., 2016). Los microorganismos benéficos presentan una asociación simbiótica con la planta, aumentando la disponibilidad de macro y micro nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu), producen reguladores de crecimiento y protegen a la planta huésped contra plagas y patógenos (Zakeel & Safeena, 2019).

Un consorcio microbiano es el conjunto de diferentes especies de microorganismos que actúan como una asociación pero pueden presentar diferentes modos de acción para el beneficio de la planta huésped (Nakkeeran et al., 2018). La aplicación de un consorcio microbiano es principalmente potencializar el crecimiento, la biodisponibilidad de nutrientes o mejorar la eficacia del biocontrol mediante las asociaciones establecidas y la ocupación de diferentes nichos en la zona de la raíz (Sarma et al., 2015).

La inoculación microbiana a semillas, o al sustrato de siembra, promueve la germinación mediante estratificación. Los aislamientos nativos del suelo o bioinsumos comerciales son utilizados para aumentar la tasa de germinación de semillas. Las investigaciones reportan que microorganismos del género *Trichoderma*, *Bacillus* o *Klebsiella* aumentan el porcentaje de germinación de semillas de rosas (L. Pipino et al., 2013; Luca Pipino et al., 2011).

Trichoderma

El género *Trichoderma* está constituido por hongos biotróficos y saprotróficos que se encuentran en el suelo, la rizosfera, madera muerta y corteza (Atanasova, 2014). El género tiene aplicaciones en la industria textil, alimenticia, producción de combustibles, biorremediación y principalmente como agente de control biológico (Sharma & Gothwal, 2017). Por ser un bioagente multifuncional, un 60 % de los biopesticidas y biofertilizantes utilizan a *Trichoderma* como base (Sharma et al., 2020; Swain & Mukherjee, 2020).

El género pertenece a hongos deuteromicetes u imperfectos. Su clasificación taxonómica según Swain & Mukherjee (2020) es:

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae;
Género	<i>Trichoderma</i>

El género *Trichoderma* presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides con reproducción asexualmente por conidios. Se caracterizan por tener conidióforos hialinos ramificados con fiálides simples o en grupos; los conidios tienen un tamaño de 3 a 5 μm de diámetro; principalmente unicelulares, ovalados; y hialinos o de color verde. Sus hifas son de 5 a 10 μm de ancho y su pared está constituida de quitina y glucano (Atanasova, 2014; Martínez et al., 2015).

Algunas cepas de *Trichoderma* aumentan la disponibilidad y absorción de macro y micro nutrientes mediante la solubilización, quelación, descomposición o producción de sideróforos (Sharma et al., 2020). Compiten por espacio en la rizosfera mediante microparasitismo, antibiosis o generación de metabolitos secundarios e inanición por competición y escasez de suplementos (Swain & Mukherjee, 2020).

La actividad endofítica induce resistencia sistémica y permite el desarrollo de un sistema de raíces robusto, que promueve el crecimiento de las plantas y mejora su rendimiento (Swain & Mukherjee, 2020). Es utilizado como agente de control biológico microbiano y considerado generalista por tener diferentes mecanismos de acción frente a una gran variedad de patógenos como: *Botritis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* (Al-Ani, 2019; Monti et al., 2020). En la industria existen formulaciones comerciales como BIO-PROT, BIO-FUNG, o ECOFERTIL constituidas por cepas como *T. harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. aureoviride* que son biofertilizantes promotores de crecimiento y control biológico de enfermedades de plantas (Atanasova, 2014; Chakraborty et al., 2020; Salwan et al., 2019)

Trichoderma es utilizado en el tratamiento de semillas para mejorar la germinación mediante la producción de fitohormonas o escarificación mecánica. La aplicación acorta los tiempos de germinación y aumenta el porcentaje de brotación, conjuntamente mejora la morfología y la fisiología de la planta (Swain & Mukherjee, 2020).

Bacillus

El género *Bacillus* es uno de los principales entre las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Está constituido por bacterias Gram positivas formadoras de endosporas para persistir en condiciones adversas (Chalivendra & Ham, 2019; Rahman & Moccaldi, 2019).

Su clasificación taxonómica según Skerman et al. (1980) es:

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>

El género es importante en la industria alimentaria, farmacéutica, ambiental y agrícola (Sansinenea, 2019). En los cultivos se aplican algunas especies pertenecientes a *Bacillus* que tiene la capacidad de secretar antibióticos, sideróforos y enzimas hidrolíticas para modificar su entorno de manera beneficiosa y establecer una relación simbiótica con la planta huésped (Chalivendra & Ham, 2019; Habig et al., 2015). Son capaces de producir metabolitos estimulantes para el crecimiento y desarrollo de plantas conjuntamente con la prevención de infecciones patógenas (Rani et al., 2019; Sansinenea, 2019).

La colonización de las raíces por *Bacillus* induce resistencia sistémica y aumenta la disponibilidad y absorción de nutrientes. Se encuentra directamente relacionado con

la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno y presenta una sinergia con hongos micorrícicos arbusculares (Habig et al., 2015; Hashem et al., 2019).

El bioprinting de semillas con especies del género *Bacillus* permite realizar la colonización temprana de las raíces, aumentar la disponibilidad de nutrientes y dar protección contra patógenos (Rahman & Moccaldi, 2019). El principal agente activo en la agricultura es *B. subtilis* conjuntamente con otras especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* que también se comercializan como biofertilizantes (Albayrak, 2019).

Hipótesis

La inoculación de un consorcio microbiano aumenta el porcentaje de germinación de semillas de rosas híbridas.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Revisión bibliográfica

Para la revisión bibliográfica se utilizaron las bases Springer link, Researchgate, PubMed, del NCBI y Google Scholar. Primero se estudió el estado del arte sobre la germinación de semillas de rosas híbridas e inoculación microbiana para tratar la latencia de las semillas de rosas o de otras plantas. Se buscó información para el aislamiento e identificación de *Trichoderma* y *Bacillus*, mediante fichas macro y microscópicas, conjuntamente con las secuencias de los primers que se usaron en la PCR para la identificación mediante técnicas moleculares. También se investigaron metodologías para la aplicación del consorcio microbiano a las semillas.

Zona de estudio

El muestreo del suelo se realizó en la florícola “Conectiflor” en Tabacundo, cantón Pedro Moncayo, provincia de Pichincha, Ecuador a 0°02'56"N y 78°12'10"O.

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT), Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en Sangolquí, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador a 0°18'53"S y 78°26'36" O.

El crecimiento de las plantas se realizó en Quito, parroquia Jipijapa, cantón Quito, provincia de Pichincha, Ecuador a 0°10'01"S y 78°28'13" O.

Metodología

Toma de muestra de suelo

El muestreo de suelo se realizó como lo describen Acurio & España (2017). Con una pala se tomaron 10 submuestras de suelo de 10 – 20 cm de profundidad (Figura 2). Se depositó en un recipiente plástico y se mezcló para obtener una muestra compuesta. Se colocaron 500 g de suelo en fundas plásticas debidamente rotuladas y se transportaron manteniendo la cadena de frío hasta llegar al laboratorio de Microbiología Ambiental para ser procesadas.

Figura 2

Muestreo de suelo



Nota: (A) Invernadero “Conectiflor” en Tabacundo, (B) Sub muestra de suelo.

Aislamiento de *Trichoderma* sp.

El aislamiento de *Trichoderma* se realizó siguiendo el protocolo de Moya y sus colaboradores (2014) y utilizando el medio especial de *Trichoderma* (TSM) descrito por Gams & Bissett (1998), detallado en el anexo 1.

Se llevó a cabo una dilución de 10 g de suelo en 90 mL de suero fisiológico, se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se inoculó 0,2 mL de cada dilución en cajas Petri con medio TSM y se sembró por extensión. Se incubó a 25°C durante 5 d, en oscuridad.

Aislamiento de *Bacillus* sp.

El aislamiento de *Bacillus* se realizó según el método de Astorga y colaboradores (2014). Se mezcló 1 g de suelo en 9 mL de caldo peptona. Se colocó en baño maría a 65°C durante 30 min. Seguidamente se incubó a 25°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo diluciones seriadas hasta 10^{-6} y se inoculó 0,2 mL de las diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en cajas Petri con agar nutriente. Se sembró por extensión y se incubó a 25°C durante 24 h.

Selección de colonias

- ***Trichoderma***

Se resembraron las colonias obtenidas en el medio TSM en medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 25 °C durante cinco días a oscuridad.

- ***Bacillus***

Se resembraron las colonias obtenidas en el medio agar nutriente, se realizó un estriado e incubó a 25 °C durante 24 h.

Caracterización macroscópica y microscópica

- ***Trichoderma***

Se analizaron macroscópicamente los aislamientos en las cajas Petri con medio de cultivo PDA observando coloración, forma y tamaño. Conjuntamente la caracterización microscópica se realizó mediante tinción de hifas con azul de lactofenol de los medios de cultivo de PDA.

Se colocó una gota de azul de lactofenol sobre portaobjetos y se cortó un pedazo de cinta adhesiva transparente. Con el lado adhesivo se tocó el borde del micelio y se puso en contacto con la gota en el portaobjeto. Se observó mediante el microscopio Olympus a 10X, 40X y 100X (Siddiquee, 2017).

- ***Bacillus.***

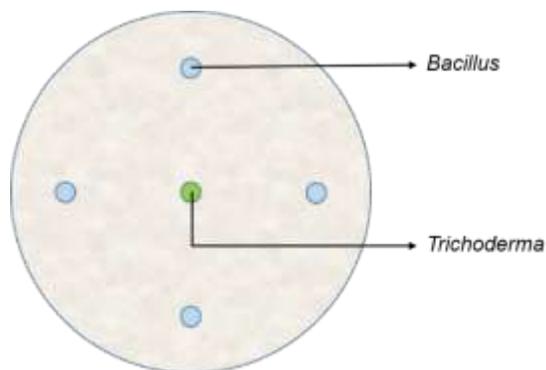
Se analizaron macroscópicamente los aislamientos en las cajas Petri con medio de cultivo agar nutriente observando forma y textura. La caracterización microscópica se procedió mediante tinción Gram y la visualización mediante el microscopio Olympus a 100X (Astorga et al., 2014).

Pruebas de compatibilidad

Se realizaron cultivos duales del aislado de *Trichoderma* y los aislados obtenidos de *Bacillus* para comprobar que no existe inhibición. Se colocó un disco de 5 mm de diámetro del micelio de *Trichoderma* en el centro de una caja Petri con PDA. Se perforó cuatro orificios distribuidos en los extremos de los puntos cardinales (Figura 3), tomando como centro el disco de micelio. Sobre cada orificio, se inoculó 0,5 µL de la bacteria previamente incubada en caldo Luria-Bertani (LB) durante 24 h. Se hicieron tres repeticiones de cada cultivo dual. Se seleccionó la bacteria con mayor sinergismo presentado con el hongo (Astorga et al., 2014).

Figura 3

Representación esquemática de cultivo dual



Caracterización molecular por secuenciación

Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA siguiendo el protocolo descrito por Siddiquee (2017) para *Trichoderma*. Se utilizó un cultivo de ocho días de crecimiento en medio

PDB incubado a 25°C en oscuridad. Se concentró la biomasa de todo el medio de cultivo utilizando la microcentrífuga Spectrafuge 24D, por 3 min a 13300 rpm en dos microtubos junto a tres perlas de ebullición. Se colocó 1 mL de buffer de extracción (140 mM sorbitol, 220 mM Tris HCl pH=8,0; 22 mM EDTA, 800 mM NaCl; 0,8 % (p/v) CTAB, 1% sarkosyl y 0,2% β -mercaptoetanol) y se agitó con vortex a intensidad 8 durante 2 min. Se agregó 400 μ L de cloroformo:isoamilalcohol en proporción 24:1 y se agitó con vortex durante 2 min; se incubó a 50°C durante 30 min con 300 rpm en el termobloque.

Luego de enfriado el tubo, se centrifugó por 10 min a 13300 rpm y se recolectó el sobrenadante en un nuevo microtubo. Se añadió el mismo volumen de isopropanol del sobrenadante recolectado, se mezcló suavemente y se almacenó a – 20°C durante 2 h.

Finalizado el periodo de refrigeración, se centrifugó por 5 min a 13300 rpm, se descartó el sobrenadante y se realizó dos lavados del pellet con etanol al 70% filtrado. Terminados los lavados se invirtió el microtubo dentro de la cámara de flujo laminar durante 30 min y se resuspendió el pellet en 50 μ L de agua ultra pura.

Para *Bacillus*, se extrajo DNA siguiendo el protocolo descrito por Jarrín (2010) utilizando un cultivo de 24 h de crecimiento en medio LB incubado a 37°C. El procedimiento se realizó igual al proceso mencionado anteriormente, únicamente cambiando la constitución del buffer de extracción (140 mM sorbitol, 220 mM Tris HCl pH=8,0; 22 mM EDTA, 800 mM NaCl; 0,8 % (p/v) CTAB y 1% sarkosyl).

Para la determinación de calidad y cuantificación de DNA se midió la relación de absorbancia (A260/A280) utilizando Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer de

ThermoFisher y considerando los ratios entre 1.8 a 2.0 como DNA de buena calidad (Siddiquee, 2017).

Amplificación de fragmentos mediante PCR

La amplificación de la region ITS (Internal Transcribed Spacer) en *Trichoderma* se realizó utilizando los primers ITS1 e ITS4 y para *Bacillus* se amplificó una sección del gen 16S rRNA utilizando los primers 27F y 1492R. Sus secuencias se encuentran en la tabla 1 (Jangir et al., 2018; Siddiquee, 2017).

Tabla 1

Cebadores para la amplificación de fragmentos ITS y 16S.

Microorganismo	Nombre	Secuencia 5' – 3'	Tamaño del fragmento, pb	Cita
<i>Trichoderma</i>	ITS	ITS1 5'- TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3'	650	(Siddiquee, 2017; Silva, 2018)
		ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3'		
<i>Bacillus</i>	16S	27F 5'- AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'	1500	(Jangir et al., 2018; Silva, 2018)
		1492R 5'- AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3'		

Las PCRs se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µL con 8 µL de agua ultra pura, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X de Promega, 1,5 µL a una

concentración de 10 μM de cada cebador y 1,5 μL con una concentración de 50 ng/mL de ADN genómico. Las condiciones de la reacción se detallan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2

Condiciones de temperatura y tiempos para la PCR de ITS

Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Objetivo
1x	94°C	3 min	Desnaturalización inicial
35x	94°C	30 s	Desnaturalización
	54°C	30 s	Alineamiento
	72°C	1 min	Extensión
1x	72°C	10 min	Extensión final

Fuente: (Silva, 2018)

Tabla 3

Condiciones de temperatura y tiempos para la PCR de 16S

Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Objetivo
1x	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
35x	94°C	1 min	Desnaturalización
	55°C	1 min	Alineamiento
	72°C	2 min	Extensión
1x	72°C	7 min	Extensión final

Fuente: (Silva, 2018)

Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar el fragmento amplificado por la PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se preparó con 1 g de agarosa grado molecular en 100 mL de tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó durante 45 min a 120 V y 300 mA. Se utilizó un marcador molecular de 100 bp DNA Ladder y se observó en el equipo E-Gel™ Imager Camera Hood Kit de ThermoFisher.

Secuenciación Sanger y análisis bioinformático

Los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Korea) mediante tecnología Sanger. Las secuencias fueron analizadas en el programa FinchTV y en la base de datos Blast.

Preparación del sustrato

Las semillas entregadas por la florícola “Conectiflor” fueron previamente desinfectadas por la empresa, con Vitavax en concentración comercial al 100%, durante 24 h. A ello siguió un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 3% durante 2 h. Las semillas fueron guardadas en mallas, rotuladas y con 1 mL de peróxido de hidrógeno, en fundas herméticas sellables y almacenadas durante 90 d a 4°C en oscuridad. El sustrato especial Stender suministrado, fue previamente desinfectado por la florícola “Conectiflor” con “Phyton” de Ecuaquímica, 72 h antes.

Preparación del consorcio

Se realizó la inoculación del aislado de la cepa de *Trichoderma* seleccionada en medio PDB y se incubó durante 8 d a 25°C. Se filtró con una gasa estéril y se realizó conteo de esporas en cámara de Neubauer.

Se realizó la inoculación del aislado de la cepa de *Bacillus* seleccionada en medio LB y se incubó durante 24 h a 37 °C y con agitación a 70 rpm. Posteriormente se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-9} . Se sembró 0,2 mL de las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} en diferentes cajas Petri con medio agar nutriente y se luego se realizó una

siembra por extensión. Cada una de las diluciones se sembró en dos cajas Petri. Se incubó a 25°C durante 24 h y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Tratamientos en el sustrato

El sustrato especial Stender, suministrado y previamente desinfectado con “Phyton” de Ecuaquímica, 72 h antes, por la florícola “Conectiflor”, se dividió en cuatro porciones de un kilogramo. Cada porción fue colocada en un funda, en la que se aplicó uno de los cuatro tratamientos y se homogenizó.

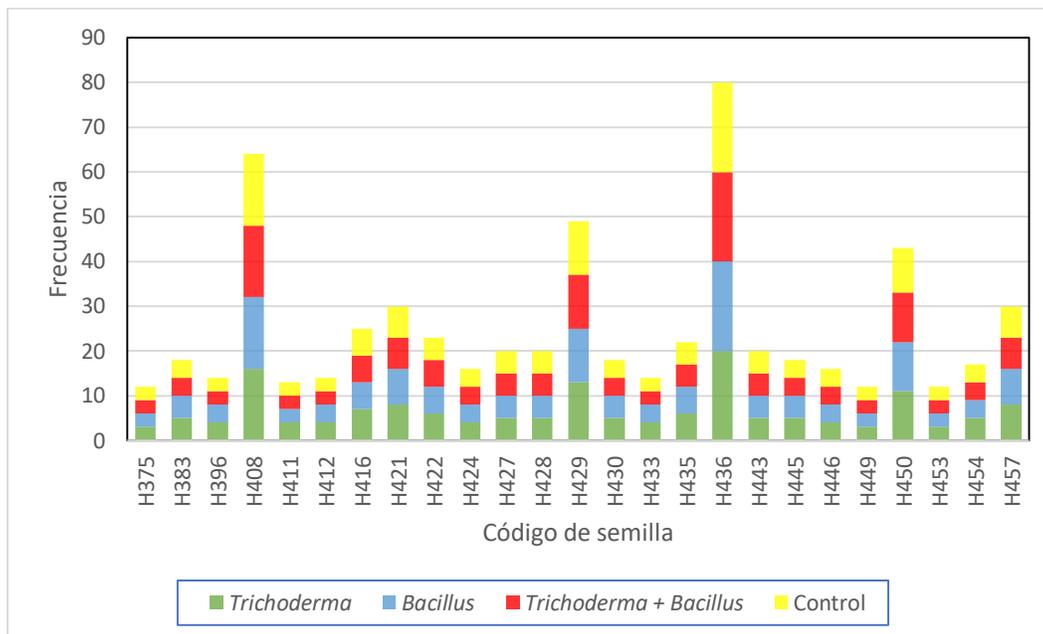
- **Tratamiento 1.-** Se aplicó 100 mL de suspensión de esporas del aislado de *Trichoderma* sp. a una concentración de $1,4 \times 10^5$ esporas/mL.
- **Tratamiento 2.-** Se aplicó 100 mL de suspensión de UFC del aislado de *Bacillus* sp. a una concentración de 6×10^7 UFC/mL.
- **Tratamiento 3.-** Se aplicó 50 mL de suspensión de esporas del aislado de *Trichoderma* sp. a una concentración de $1,4 \times 10^5$ esporas/mL y 50 mL de suspensión de UFC de *Bacillus* sp. a una concentración de 6×10^7 UFC/mL.
- **Control.-** Se aplicó 100 mL de agua destilada autoclavada.

Distribución de semillas por tratamiento

El proyecto contó con 620 semillas en total, de 25 códigos de rosas. Cada código tuvo como mínimo 12 semillas que se dividieron en tres tratamientos y un control, como se observa en la Figura 4 y se detalla en el anexo 2.

Figura 4

Distribución de tratamientos por código de rosa



La distribución espacial se realizó aleatoriamente, asignando un número randómico a la semilla de cada código con su respectivo tratamiento. Este número, entre el 1 y 620, sin posibilidad de repetición, se organizó en una matriz de 31 filas por 20 columnas. La colocación se realizó en cuatro bandejas plásticas, tres de 10 filas por 20 columnas y una cuarta bandeja de 1 fila por 20 columnas, como está descrito en el anexo 3.

Siembra y control de germinación de las semillas

Cada pocillo de la bandeja de plástico se etiquetó, se colocó el sustrato con el tratamiento respectivo y se sembró la semilla del código correspondiente (Figura 5)

Figura 5

Distribución de sustrato según tratamiento



La recolección de datos se realizó durante las tres fases de observación: la primera fue un periodo de crecimiento y desarrollo de los microorganismos que duró 20 días, fue a temperatura ambiente con promedio de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad del 83% y con fotoperíodos de 12/12; la segunda fase, de estratificación en frío, en la cual se sometieron a un promedio de temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 73% de humedad, con oscuridad completa las 24 h durante 44 d; y la tercera fase, de crecimiento, con un promedio de temperatura ambiente de $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 52% de humedad, con fotoperíodos de 12/12, durante 104 d.

La recolección de los datos se realizó diariamente entre las 7:00 y las 10:00. Se registró la temperatura y humedad de ese momento, además de la máxima y mínima,

en el transcurso de las últimas 24 h. De igual manera, se verificó y registró la germinación de una semilla o la muerte de una planta (Figura 6).

Figura 6

Registro de germinación



Análisis de datos

Para el procesamiento y análisis de datos, se utilizó el paquete SPSS v 21.0. Para la comparación de porcentajes de germinación, se utilizó Fisher (por números pequeños y solamente en comparaciones de 2x2) y se determinó 0.05 como corte para nivel de significación.

Para la comparación de los promedios de días de germinación se utilizó t para diferencia de promedios en dos comparaciones y para más comparaciones se utilizó Anova.

En la comparación anterior cuando se tomó en cuenta la interacción de los factores tipo de semilla y tipo de tratamiento se utilizó Anova factorial.

Capítulo 3: Resultados

Aislamiento

De la muestra compuesta de suelo recolectado de la florícola “Conectiflor” en Tabacundo, provincia de Pichincha, en medio de cultivo TSM, mediante diluciones seriadas después de siete días a 25°C, se aislaron cinco colonias de hongos. En medio agar nutriente, mediante diluciones seriadas después de 24 h a 25°C, se aislaron un total de 15 colonias de bacterias.

Caracterización morfológica

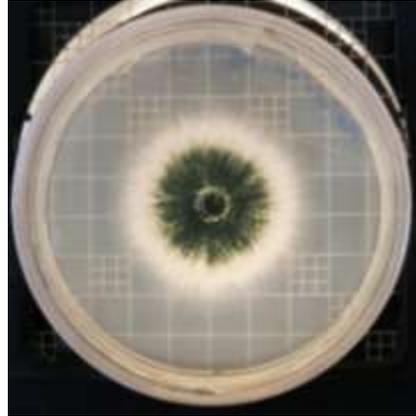
Trichoderma

De los cinco cultivos de hongos aislados en medio PDA, solo uno presentó características morfológicas macro y microscópicas acordes con *Trichoderma*.

Se observó a nivel macro la formación de anillos concéntricos alrededor de la zona del inóculo, con una alta concentración de conidios de color blanco en el borde y de color verde en el centro (Figura 7).

Figura 7

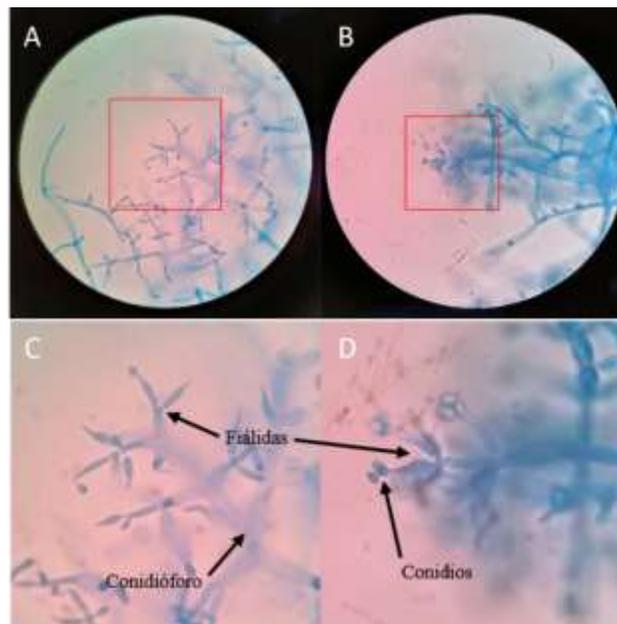
Crecimiento de Trichoderma sp. en medio PDA en caja Petri.



A nivel microscópico, tiñendo con azul de lactofenol, se observaron conidióforos muy ramificados, las fiálidas entre dos y tres, originadas de las puntas de las ramas primarias, secundarias y terciarias (Figura 8).

Figura 8

Estructura microscópica de Trichoderma sp.



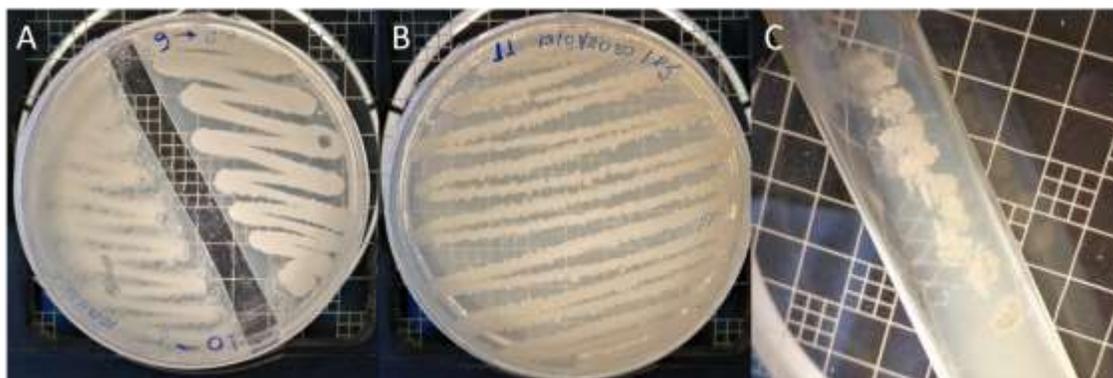
Nota: (A, B) Observación 100X, (C, D) Identificación estructuras de Trichoderma sp.

Bacillus

De los 15 cultivos de *Bacillus* aislados en medio agar nutriente, se observó en los estriados la morfología macroscópica de cada una. Se advirtieron aislados, con forma circular, filamentosa e irregular; con bordes enteros, filamentosos y ondulados; texturas lisas y rugosas. La figura 9 presenta algunos de los aislados.

Figura 9

Cultivos de Bacillus sp. en agar de nutriente en caja Petri y tubo pico de flauta de aislado

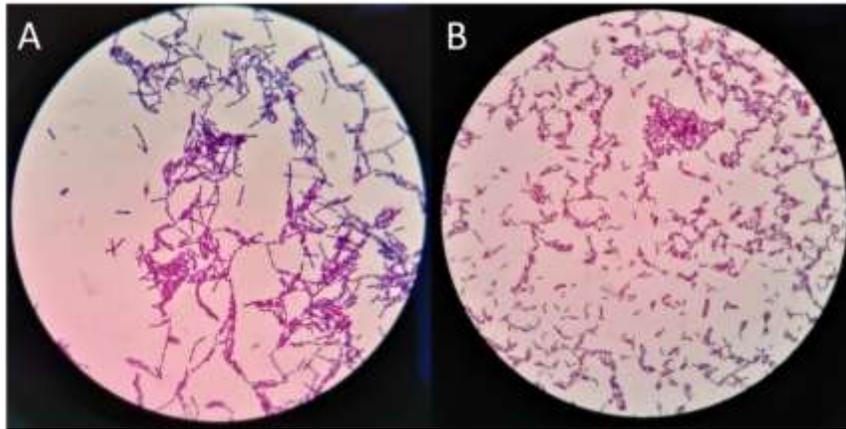


Nota: (A) B9 y B10, (B) B11, (C) B16.

A nivel microscópico, con tinción Gram, se observó bacilos Gram positivos con presencia y ausencia de endoesporas (Figura 10).

Figura 10

Valoración microscópica de los aislamientos de Bacillus



Nota: Tinción Gram 100X. (A) B3, (B) B15.

Pruebas de sinergismo *Trichoderma* vs *Bacillus*

Las pruebas de sinergismo se realizaron mediante la técnica de cultivos duales. De los 15 aislamientos bacterianos, cinco presentaron sinergismo con el hongo. La mejor combinación en desarrollo y sinergismo con el hongo fue la bacteria con el código B16 (Figura 11).

Figura 11

Pruebas de sinergismo en medio PDA



Nota: Trichoderma sp. vs Bacillus sp. (A) Aislamiento H4 vs B16, 72 horas de crecimiento, (B) Aislamiento H4 vs B16, 120 horas de crecimiento.

Caracterización molecular

Extracción de DNA

La extracción de DNA con CTAB reportó los valores descritos en la tabla 4, tanto de concentración como de calidad mediante la absorbancia 260/280.

Tabla 4

Concentración y pureza de muestras de DNA de Bacillus sp. y Trichoderma sp.

Muestras	Concentración ng/μL	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
<i>Trichoderma</i> sp. (M1)	2579	2,024	1,596
<i>Trichoderma</i> sp. (M1_R)	919,1	2,253	1,813
<i>Trichoderma</i> sp. (M2)	1306	1,749	1,391
<i>Trichoderma</i> sp. (M2_R)	1383	2,081	1,612
<i>Bacillus</i> sp. (M3)	99,08	2,202	1,206
<i>Bacillus</i> sp. (M3_R)	94,29	2,216	2,179

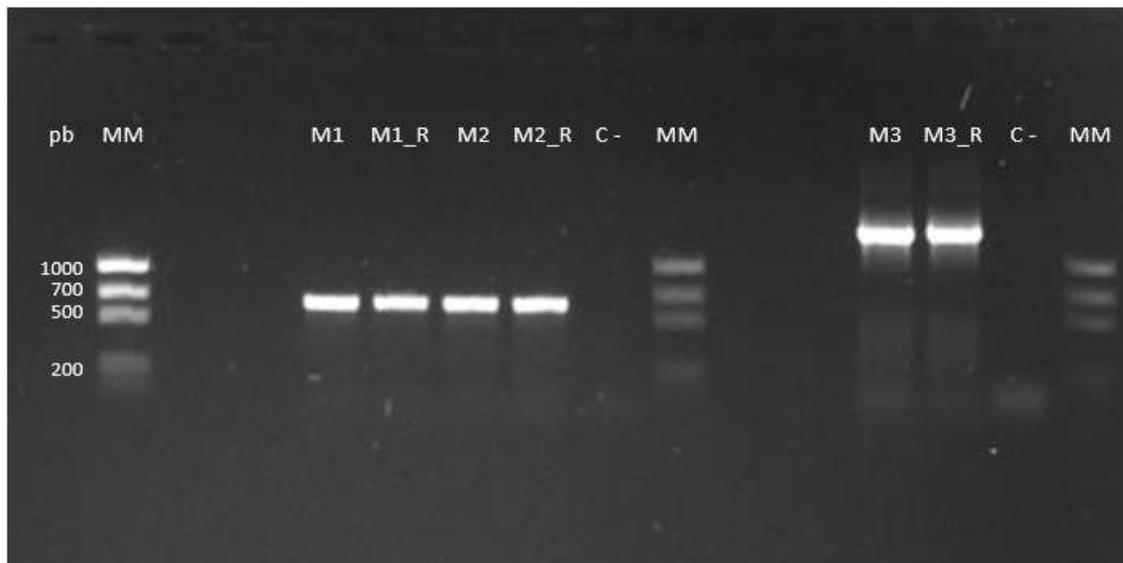
Amplificación e identificación de fragmentos de DNA

La observación de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 1% reveló una banda de 650 pb aproximadamente, de la región ITS en *Trichoderma* sp. y una banda de 1500 pb aproximadamente, del 16S rRNA para *Bacillus* sp. (Figura 12).

En el análisis de las secuencias de nucleótidos para la muestra del hongo, se obtuvo un 98,29% de identidad con *Trichoderma asperellum* y de la bacteria un 99,39% de identidad para *Bacillus licheniformis*.

Figura 12

Patrones de bandas amplificadas por PCR

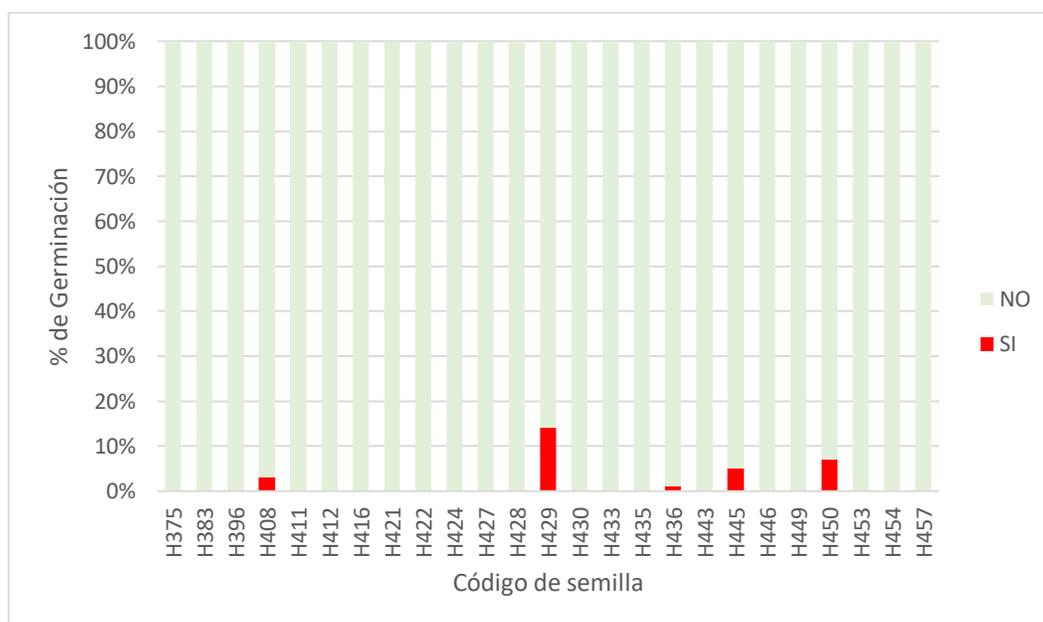
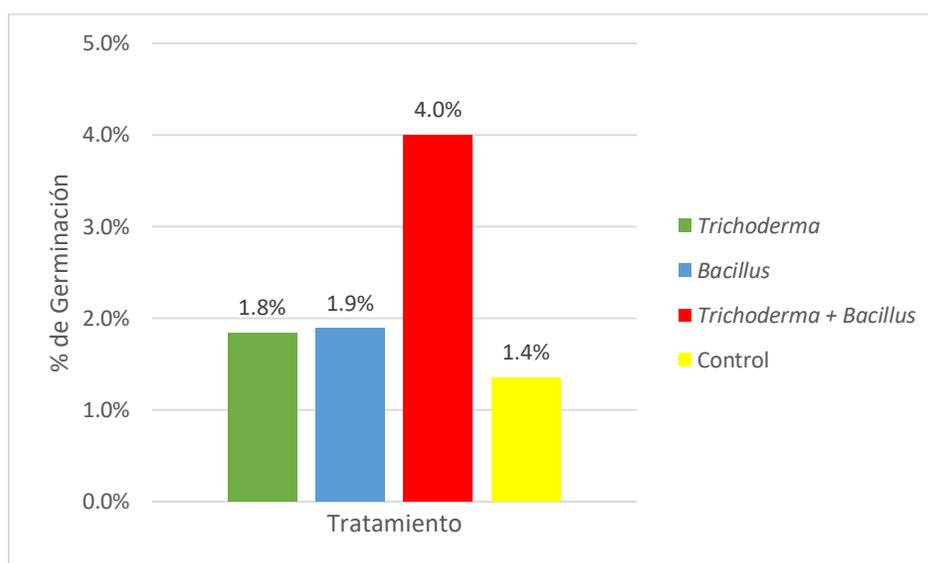


Nota: Aislados de *Trichoderma asperellum* (M1, M2) con primers ITS1/ITS4 peso molecular aproximado 650 pb y *Bacillus licheniformis* (M3) con primers 27F/1492R peso molecular aproximado 1500 pb. Se realizaron dos repeticiones por cada muestra.

Análisis de datos de germinación

Porcentaje de germinación

Se sembraron 620 semillas de 25 códigos diferentes. Germinaron 14 semillas lo que representa el 2.3% (Figuras 13 y 14). Estas semillas germinadas pertenecían a solamente cinco códigos. No germinaron semillas de 20 códigos.

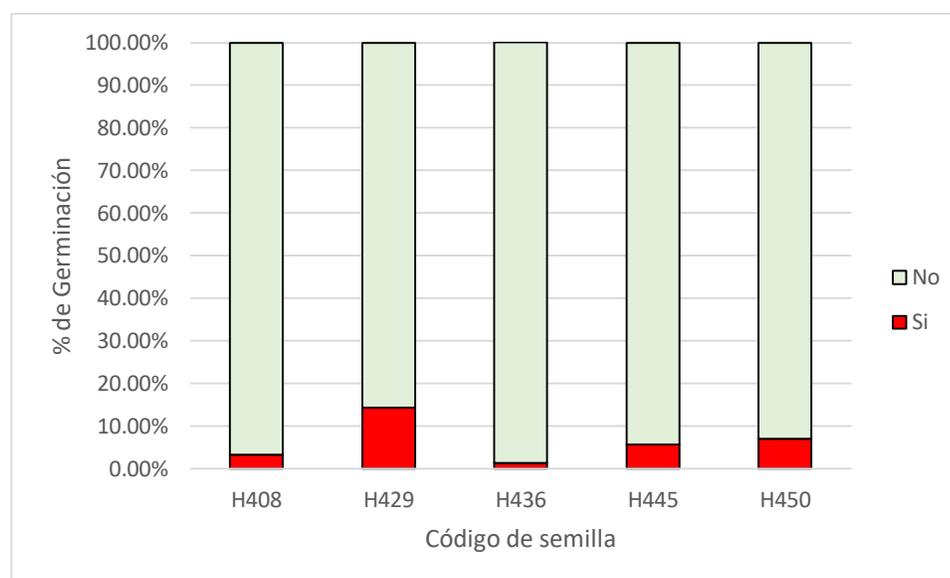
Figura 13*Germinación por código de semilla.***Figura 14***Germinación según tratamiento*

Las semillas que germinaron pertenecían a los grupos de códigos H408, H429, H436, H445 y H450. Este grupo de semillas, de las que alguna germinó, representó el 41% de las 620.

Si se circunscribe el análisis a las 254 semillas de estos códigos, la germinación fue del 5,5%. Entre los diferentes códigos de este grupo existen diferencias, H429 tuvo el mayor porcentaje de germinación (14%) y H450 el 7% (Figura 15).

Figura 15

Germinación por código de semilla



En este mismo grupo la germinación por tratamiento tiene mayores valores para la aplicación del consorcio (9.5%) que para *Trichoderma* sola (4,6%) o *Bacillus* (4.7%) que para el control (3.2%).

Por los números pequeños aglutinamos las diferentes opciones de tratamiento en dos grupos: con tratamiento microbiano y sin tratamiento (control). En esta

agrupación el tratamiento también brindó mejores porcentajes de germinación (6.3%) que en los controles (3.2%). La diferencia no fue significativa (Fisher $p>0.05$) (Anexo 4).

En esta misma comparación por códigos de semillas, al considerar al tratamiento solamente en dos grupos se observó que en cuatro códigos el porcentaje de germinación es mayor con tratamiento que sin él y en uno solo, el control tiene mayor nivel de germinación. De todas estas diferencias ninguna fue significativa (Tabla 5 y 6).

Tabla 5

Germinación según códigos de semillas y tratamiento sí o no

Código Semilla	Tratamiento	Germinación				Total	
		Germinó		No germinó		N°	%
		N°	%	N°	%		
H408	Con	2	4,2%	46	95,8%	48	100,0%
	Sin	0	0,0%	16	100,0%	16	100,0%
	Total	2	3,1%	62	96,9%	64	100,0%
H429	Con	6	16,2%	31	83,8%	37	100,0%
	Sin	1	8,3%	11	91,7%	12	100,0%
	Total	7	14,3%	42	85,7%	49	100,0%
H436	Con	1	1,7%	59	98,3%	60	100,0%
	Sin	0	0,0%	20	100,0%	20	100,0%
	Total	1	1,3%	79	98,8%	80	100,0%
H445	Con	1	7,1%	13	92,9%	14	100,0%
	Sin	0	0,0%	4	100,0%	4	100,0%
	Total	1	5,6%	17	94,4%	18	100,0%
H450	Con	2	6,1%	31	93,9%	33	100,0%
	Sin	1	10,0%	9	90,0%	10	100,0%
	Total	3	7,0%	40	93,0%	43	100,0%
Total	Con	12	6,3%	180	93,8%	192	100,0%
	Sin	2	3,2%	60	96,8%	62	100,0%
	Total	14	5,5%	240	94,5%	254	100,0%

Tabla 6*Germinación según código de semilla y tratamiento (resumen)*

Código de Semilla	N°	% Germinación		Signific Fisher
		con tratamiento	sin tratamiento	
H 408	64	4.2	0.0	p > 0.05
H429	49	16.2	8.3	p > 0.05
H436	80	1.7	0.0	p > 0.05
H445	18	7.1	0.0	p > 0.05
H450	43	6.1	10.0	p > 0.05
Total Grupos de semilla con germinación	254	6.3	3.2	

La germinación en cada código de semilla, según el tratamiento aplicado, presentó variaciones. Destacan el H429 y el H450 que con tratamiento con el consorcio microbiano tienen un valor de germinación del 25% y del 18%.

Tabla 7

Germinación según código de semillas y tratamiento (desagregado)

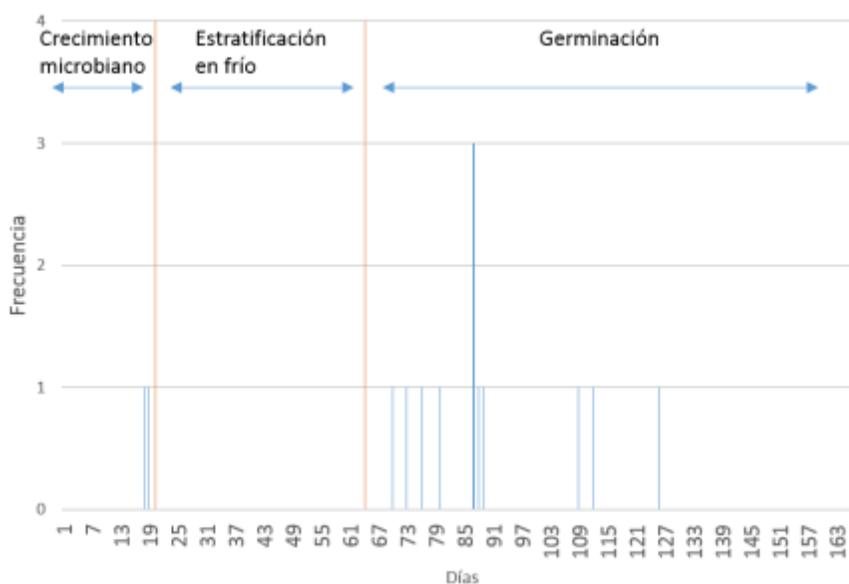
Código Semilla	Tratamiento	Germinación				Total	
		Germinó		No germinó		N°	%
		N°	%	N°	%		
H408	<i>Trichoderma</i>	1	6,3%	15	93,8%	16	100,0%
	<i>Bacillus</i>	0	0,0%	16	100,0%	16	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	1	6,3%	15	93,8%	16	100,0%
	Control	0	0,0%	16	100,0%	16	100,0%
	Total	2	3,1%	62	96,9%	64	100,0%
H429	<i>Trichoderma</i>	1	7,7%	12	92,3%	13	100,0%
	<i>Bacillus</i>	2	16,7%	10	83,3%	12	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	3	25,0%	9	75,0%	12	100,0%
	Control	1	8,3%	11	91,7%	12	100,0%
	Total	7	14,3%	42	85,7%	49	100,0%
H436	<i>Trichoderma</i>	0	0,0%	20	100,0%	20	100,0%
	<i>Bacillus</i>	1	5,0%	19	95,0%	20	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	0	0,0%	20	100,0%	20	100,0%
	Control	0	0,0%	20	100,0%	20	100,0%
	Total	1	1,3%	79	98,8%	80	100,0%
H445	<i>Trichoderma</i>	1	20,0%	4	80,0%	5	100,0%
	<i>Bacillus</i>	0	0,0%	5	100,0%	5	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	0	0,0%	4	100,0%	4	100,0%
	Control	0	0,0%	4	100,0%	4	100,0%
	Total	1	5,6%	17	94,4%	18	100,0%
H450	<i>Trichoderma</i>	0	0,0%	11	100,0%	11	100,0%
	<i>Bacillus</i>	0	0,0%	11	100,0%	11	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	2	18,2%	9	81,8%	11	100,0%
	Control	1	10,0%	9	90,0%	10	100,0%
	Total	3	7,0%	40	93,0%	43	100,0%
Total	<i>Trichoderma</i>	3	4,6%	62	95,4%	65	100,0%
	<i>Bacillus</i>	3	4,7%	61	95,3%	64	100,0%
	<i>Trichoderma+Bacillus</i>	6	9,5%	57	90,5%	63	100,0%
	Control	2	3,2%	60	96,8%	62	100,0%
	Total	14	5,5%	240	94,5%	254	100,0%

Tiempo de germinación

Durante el período de estratificación a 4°C no germinó ninguna semilla y la mayor frecuencia de germinación se obtuvo después del periodo de estratificación en frío. Las primeras semillas que germinaron pertenecieron al código 429. El promedio de días transcurridos entre siembra y germinación fue de 80 ± 30 . La primera semilla germinó el día 18 y la última el 126, durante el tiempo total de observación que fue de 167 días (Figura 16).

Figura 16

Distribución del tiempo transcurrido para germinación



El tiempo promedio de germinación es menor en las semillas que tuvieron tratamiento (78 d) que en aquellas que no lo tuvieron (92.5 d) sin que esta diferencia fuera significativa ($p > 0.05$) (Anexo 5).

Cuando se desagregó el tratamiento, el tiempo promedio de germinación fue menor en las semillas que lo tuvieron con la participación de *Trichoderma*. Para el tratamiento individual con *Trichoderma* 64 días y en el consorcio *Trichoderma + Bacillus* 75, en tanto que en los controles fue de 92,5. Estas diferencias no fueron significativas ($F= 0.749$ $p > 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8

Días promedio de germinación según tratamiento

Tratamiento	Media	N	Desv. típ.
<i>Trichoderma</i>	64,00	3	39,837
<i>Bacillus</i>	98,00	3	24,576
<i>Trichoderma+Bacillus</i>	75,00	6	30,522
Control	92,50	2	27,577
Total	80,07	14	30,386

Anova 0.749 p > 0.05

El tiempo promedio de germinación fue menor en el código de semillas H429 (67 días) y el más prolongado en el H436 (126 días). Los tiempos promedio entre los cinco códigos tienen diferencias que no fueron significativas ($F = 0.996$ $p > 0.05$) (Tabla 9).

Tabla 9

Días promedio de germinación según código

Código	Media	N	Desv. típ.
H408	78,50	2	12,021
H429	67,71	7	35,382
H436	126,00	1	
H445	87,00	1	
H450	92,33	3	18,230
Total	80,07	14	30,386

Anova F 0.096 p > 0.05

Para el análisis del tiempo de germinación tomando en cuenta la interacción Tratamiento y Código de Semillas se utilizó ANOVA factorial, el que estableció que las diferencias existentes no fueron significativas (Tto * codSem $F = 0,733$ $p = ,535$ $p > 0.05$) (Anexo 6).

Capítulo 4: Discusión

En el estudio el total de germinación fue de 2.3%. Haouala (2013), al evaluar diferentes tratamientos para potenciar la germinación de *Rosa rubiginosa* L. obtiene una germinación máxima del 30% con estratificación fría y entre 3,6 y 11% para estratificación cálida. La variación en la temperatura en las tres fases del estudio puede explicar la baja germinación.

Veinte de los veinticinco códigos de semillas no germinaron. Anderson y Byrne (2007), mencionan que existe una variación en el nivel de latencia entre especie, variedad y lote de semillas por la presencia de latencia endógena y exógena.

Según Zhiqiong Zhou et al. (2009), los aquenios de rosas presentan latencia en la madurez y requieren un tratamiento post cosecha para estimular la germinación. Tratamientos post cosecha como el hormonal, la escarificación, la estratificación por temperatura e inoculación microbiana se utilizan para mejorar el porcentaje de brotación (Meyer, 2008).

Los microorganismos aislados de la rizosfera de la planta pueden potencializar el crecimiento y la biodisponibilidad de nutrientes (Sarma et al., 2015). Las especies aisladas en el presente estudio, identificadas mediante caracterización morfológica y molecular como *Trichoderma asperellum* y *Bacillus licheniformis*, según Albayrak (2019) y Chakraborty et al. (2020), son utilizadas en conjunto con cepas como *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en biopreparados potenciadores de crecimiento y control de patógenos.

El análisis de las secuencias amplificadas de la región ITS obtuvo un 98,29% de identidad con *Trichoderma asperellum*. Chaverri et al. (2015), reportan que existen limitaciones para el reconocimiento de especie del género *Trichoderma* con la región ITS y proponen la amplificación del factor de elongación 1-alfa (TEF 1- α) para la identificación de especie.

El análisis de las secuencias amplificadas del gen 16S rRNA obtuvo un 99,3% de identidad con *Bacillus licheniformis*. Mohkam et al. (2016), reportan que para la identificación de los aislados de *Bacillus*, la secuencia del 16s rRNA se puede complementar con las secuencia de genes como *rpob*, *recA* o *gyrB* para la distinción entre especies estrechamente relacionadas.

Según Sharma et al. (2020), el recubrimiento de semillas con bioproductos constituidos con *Trichoderma* aumenta la germinación de la semilla, el tamaño de la raíz y la longitud del brote en plantas como maní (*Arachis hypogea*), cebolla (*Allium cepa*), soja (*Glycine max*), trigo (*Triticum aestivum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y berenjena (*Solanum melongena*), entre otras. La interacción de plantas de diferentes especies con *Trichoderma* permite desarrollar ensayos genéricos para identificar aislados con el mejor potencial (Stewart & Hill, 2014).

La selección del aislamiento bacteriano para ser parte del consorcio microbiano se realizó en base al mayor sinergismo presentado en los cultivos duales. Sarma et al. (2015), mencionan que esta metodología minimiza la falla de los experimentos causado por la incompatibilidad microbiana y puede generar un mayor impacto en el control de enfermedades y estimulación del crecimiento. Sostienen que las investigaciones

generalmente seleccionan los microorganismos en base a la efectividad individual ante un patógeno o producción individual de promotores de crecimiento vegetal, sin realizar estudios de compatibilidad.

En el estudio se utilizaron 620 semillas correspondientes a 25 códigos. Las semillas de 20 códigos no germinaron durante los 167 días del período de observación. El total de semillas de esos códigos correspondió al 60 % de las semillas utilizadas. Según De Vries & Dubois (2015) los aquenios de rosas híbridas tienen diferentes niveles de latencia por especie. Gudin (2017) describe que por el grado y tipo de latencia, el tiempo y temperatura de enfriamiento necesarios deben ser distintos.

La inoculación microbiana a la semilla o al sustrato es aplicado para estimular la ruptura de latencia y aumentar la brotación. El porcentaje de germinación con los diferentes tratamientos fue mayor con la aplicación de un inóculo microbiano que en el control, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Lee et al. (2010), obtienen la mejor tasa de germinación de semillas de *Rosa rugosa* y el doble del porcentaje comparado con el control, inoculando *Klebsiella oxytoca* en las semillas y comparando con otros tratamientos de escarificación química, mecánica e irradiación UV.

En el presente estudio el porcentaje de germinación de semillas de rosas híbridas fue bajo; el código H429 fue el de mayor porcentaje de germinación (14%). Entre las semillas de este código, las tratadas con el consorcio presentaron mayor porcentaje (25%) que los otros tratamientos (7% y 16%) y el control (8%). En el estudio realizado por Luca Pipino et al. (2011), el experimento con inoculación microbiana

obtiene el 78% de brotación al inocular un producto comercial que contiene compuestos orgánicos, bacterias y co-metabolitos producidos por fermentación bacteriana y un 71% con una formulación comercial constituida por esporas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae*; la germinación en el control es del 62%. Si se toma en cuenta todos los genotipos sembrados en NIRP International realizando solamente estratificación en frío, el porcentaje general de germinación es 16.9%. Los altos valores de brotación se deben a la selección de progenitores con alta probabilidad de germinación y fertilidad.

En el estudio, la mayor frecuencia de germinación se observó después de los 44 días de estratificación en frío. Ueda (2003), explica que la estratificación en frío disminuye la concentración de ácido abscísico (ABA) en el aquenio, el cual es un importante inhibidor de la germinación.

Capítulo 5: Conclusiones

- Se aislaron e identificaron cepas nativas de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus licheniformis*.
- Se identificó biocompatibilidad entre los aislados de *Trichoderma asperellum* y *Bacillus licheniformis*.
- No existió diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de germinación en los que se aplicó diferentes tratamientos.
- Veinte de los veinticinco códigos de semillas utilizados no germinaron durante el periodo de observación.

Capítulo 6: Recomendaciones

- Utilizar el factor de elongación 1-alfa (TEF 1- α) para la identificación de especie en el género *Trichoderma* y la secuencia de genes como *rpob*, *recA* o *gyrB* para la identificación de especies en el género *Bacillus*.
- Realizar un estudio que compare la influencia en la germinación del cambio de temperatura en los períodos de estratificación. Permitiría identificar inducción de latencia secundaria por la variación de temperatura.
- Realizar un estudio en el que la aplicación de los tratamientos microbianos sea directamente a la semilla. Esto podría intentarse en dos variantes: a) Si el estudio previo ratifica latencia secundaria, se le aplicaría inmediatamente luego de la recolección de las semillas; o b) caso contrario, después de los tres meses de estratificación en frío.
- Circunscribir estudios en el grupo de códigos de semillas que germinaron, para profundizar en aplicación de consorcios microbianos.
- Utilizar la técnica de aplicación en “bloques” que facilitaría los estudios con número mayor de semillas de los grupos identificados con respuesta ya establecida a la aplicación microbiológica.

Capítulo 7: Bibliografía

- Acurio, R., & España, C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *La Granja*, 25(1), 53–61.
- Al-Ani, L. K. T. (2019). Bioactive secondary metabolites of *Trichoderma* spp. for efficient management of phytopathogens. In H. B. Singh, M. S. Reddy, C. Keswani, E. Sansinenea, & C. García-Estrada (Eds.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 125–143). Springer Nature Singapore.
- Albayrak, Ç. B. (2019). *Bacillus* species as biocontrol agents for fungal plant pathogens. In M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, & G. Haesaert (Eds.), *Bacilli and agrobiotechnology: Phytostimulation and biocontrol*. (1st ed., pp. 239–265). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_13
- Alp, Ş., Çelik, F., Türkoğlu, N., & Karagöz, S. (2009). The effects of different warm stratification periods on the seed germination of some *Rosa* taxa. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5838–5841. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1110>
- Anderson, N., & Byrne, D. H. (2007). Methods for *Rosa* germination. *Acta Horticulturae*, 751, 503–508. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.751.64>
- Arzate Fernández, A. M., Bautista Puga, M. D., Piña Escutia, J. L., Reyes Díaz, J. I., & Vázquez García, L. M. (2011). *Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)* (Universidad Autónoma del Estado de México (Ed.); 1st ed.).

- Astorga, K., Meneses, K., Zúñiga, C., Brenes, J. A., & Rivera, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(2), 82–91.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in Genomic Perspective. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 25–40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00002-3>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1988). Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. *American Journal of Botany*, 75(2), 286–305. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb13441.x>
- Byrne, D. H., Pemberton, H. B., Holeman, D. J., Debener, T., Waliczek, T. M., & Palma, M. A. (2019). Survey of the rose community: desired rose traits and research issues. *Acta Horticulturae*, 1232, 189–192. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1232.28>
- Canli, F., & Kazaz, S. (2009). Biotechnology of roses: progress and future prospects. *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 10(1), 167–183.
- Caser, M., Dente, F., Ghione, G. G., Mansuino, A., Giovannini, A., & Scariot, V. (2014). Shortening of selection time of *Rosa hybrida* by in vitro culture of isolated embryos and immature seeds. *PROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANTS*, 14(3), 139–144.
- Chakraborty, B. N., Chakraborty, U., & Sunar, K. (2020). Induced immunity developed by *Trichoderma* species in plants. In A. K. Sharma & P. Sharma (Eds.), *Trichoderma Host Pathogen Interactions and Applications* (pp. 125–147). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_7

- Chalivendra, S., & Ham, J. H. (2019). *Bacilli* in the biocontrol of mycotoxins. In M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, & G. Haesaert (Eds.), *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol* (1st ed., pp. 49–62). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_3
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, *107*(3), 558–590. <https://doi.org/10.3852/14-147>
- Conev, R., & Sandhu, P. (2015). Effect of achene coat scarification , maceration and stratification on seed germination in cold hardy garden roses. *Acta Horticulturae*, *1064*, 247–252. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1064.28>
- De Vries, D. P., & Dubois, L. A. M. (2015). Factors affecting the germination of hybrid rose achenes: a review. *Acta Horticulturae*, *1064*, 151–164. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1064.18>
- Expoflores. (2020). *Informe Anual de Exportaciones de Rosas*.
- Figueiredo, M., Bonifacio, A., Rodrigues, A., de Araujo, F., & Stamford, N. (2016). Beneficial microorganisms: current challenge to increase crop performance. In *Bioformulations: for sustainable agriculture* (pp. 53–70). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3>
- Fougère-Danezan, M., Joly, S., Bruneau, A., Gao, X. F., & Zhang, L. B. (2015). Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Annals of Botany*, *115*(2), 275–291. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu245>

- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In G. Harman & C. Kubicek (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium* (pp. 3–34).
- Gudin, S. (2017). Seed Propagation. *Reference Module in Life Sciences Elsevier*, 1016–1018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.05093-7>
- Habig, J., Hassen, A. I., & Swart, A. (2015). Application of microbiology in conservation agriculture. In M. Farooq & K. Siddique (Eds.), *Conservation Agriculture* (1st ed., pp. 525–557). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11620-4>
- Haouala, F. (2013). Enhancing Seed Germination in Rose (*Rosa rubiginosa* L.). *Medicinal & Aromatic Plants*, 02(06), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000139>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Allah_Abd, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>
- Jarrín, F. (2010). Protocolo de extracción de ADN de bacterias y hongos CTAB-Modificación del Centro Internacional de la PAPA. In INIAP (Ed.), *Uso y conservación de la biodiversidad de cepas de Azospirillum spp. para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la Sierra del Ecuador* (p. 32).
- Kazaz, S., Erbas, S., & Baydar, H. (2010). Breaking seed dormancy in oil rose (*Rosa*

- damascena* Mill .) by microbial inoculation. *African Journal of Biotechnology*, 9(39), 6503–6508.
- Lee, J. Y., Kim, Y. C., Han, T. H., Kim, S. T., & Gi, G. Y. (2010). Study on increasing rose seed germination. *Acta Horticulturae*, 855, 183–188.
- Leus, L., Van Laere, K., De Riek, J., & Van Huylenbroeck, J. (2018). Rose. In *Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding* (Vol. 11, pp. 719–769). https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_27
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(5), 11–22.
- Meyer, S. E. (2008). *Rosa* L.: rose, briar. In *The Woody Plant Seed Manual* (pp. 974–980).
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2016). Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, recA, rpoB gene sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 8–18. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>
- Monti, M. M., Pedata, P. A., Gualtieri, L., & Ruocco, M. (2020). The vocabulary of *Trichoderma*-plant interactions. In A. K. Sharma & P. Sharma (Eds.), *Trichoderma Host Pathogen Interactions and Applications* (pp. 19–33). Springer Nature Singapore.
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., & Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF*, 3(2), 11–16.
- Nadeem, M., Riaz, A., Younis, A., Akond, M., Farooq, A., & Tariq, U. (2013). Improved

- technique for treating seed dormancy to enhance germination in *Rosa × hybrida*. *Turkish Journal of Botany*, 37(3), 521–529. <https://doi.org/10.3906/bot-1204-35>
- Nakkeeran, S., Rajamanickam, S., Vanthana, M., & Renukadevi, P. (2018). Feasibility of consortia for the management of pests and diseases of crop plants. In *Biocontrol of Soil Borne Pathogens and Nematodes* (pp. 113–133).
- Pipino, L., Scariot, V., Van Labeke, M. C., & Leus, L. (2013). Hybrid rose breeding: Improving seed production efficiency. *Acta Horticulturae*, 990, 281–286. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.990.33>
- Pipino, Luca, Scariot, V., Gaggero, L., Mansuino, A., Van Labeke, M. C., & Giovannini, A. (2011). Enhancing seed germination in hybrid tea roses. *Propagation of Ornamental Plants*, 11(3), 111–118.
- Rahman, M. M., & Moccaldi, L. A. (2019). Application method and efficacy of *Bacillus* spp. in mitigating abiotic and biotic stresses and enhancing plant performance. In M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, & G. Haesaert (Eds.), *Bacilli and agrobiotechnology: Phytostimulation and biocontrol* (1st ed., pp. 267–289). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_14
- Rani, U., Sharma, S., & Kumar, V. (2019). *Bacillus* species: A potential plant growth regulator. In M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, & G. Haesaert (Eds.), *Bacilli and agrobiotechnology: Phytostimulation and biocontrol* (1st ed., pp. 29–47). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_2
- Salwan, R., Rialch, N., & Sharma, V. (2019). Bioactive volatile metabolites of *Trichoderma*: An overview. In H. B. Singh, M. S. Reddy, C. Keswani, E. Sansinenea, & C. García-

- Estrada (Eds.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 87–111). Springer Nature Singapore.
- Sansinenea, E. (2019). *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. In H. B. Singh, M. S. Reddy, C. Keswani, E. Sansinenea, & C. García-Estrada (Eds.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 225–237). Springer Nature Singapore.
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>
- Sharma, P., & Gothwal, R. (2017). *Trichoderma*: A potent fungus as biological control agent. In J. Singh & G. Seneviratne (Eds.), *Agro-environmental sustainability* (Vol. 1, pp. 113–125). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2>
- Sharma, P., Jambhulkar, P. P., Raja, M., Sain, S. K., & Javeria, S. (2020). *Trichoderma* spp. in consortium and their rhizospheric interactions. In A. K. Sharma & P. Sharma (Eds.), *Trichoderma Host Pathogen Interactions and Applications* (pp. 267–292). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_14
- Shivakumar, Y. H., Tejaswini, U. K., Mythali, J. B., Seetharamu, G. K., & Munikrishappa, P. M. (2019). Seed germination in rose (*Rosa* spp.) as influenced by pre-sowing treatments and genotypes. *International Journal of Chemical Studies*, 7(2), 128–130.
- Siddiquee, S. S. S. (2017). *Practical handbook of the biology and molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7>

- Silva, A. (2018). *Acción in vitro de Trichoderma spp. y Bacillus spp. como controladores biológicos conjuntos contra Fusarium oxysporum en uvilla (Physalis peruviana), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador.* [PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR]. [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación Final - Alexander Silva segunda corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14680/Disertación_Final_Alexander_Silva_segunda_corrección.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(1), 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Stewart, A., & Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 415–428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>
- Swain, H., & Mukherjee, A. K. (2020). Host – pathogen – *Trichoderma* interaction. In A. K. Sharma & P. Sharma (Eds.), *Trichoderma Host Pathogen Interactions and Applications* (pp. 149–165). Springer Nature Singapore.
- Ueda, Y. (2003). Seed maturation and germination. In *Elsevier* (pp. 623–626).
- Uggla, M., Gustavsson, K. E., & Nybom, H. (2005). Beauty lies within - Inner quality of rose hips. *Acta Horticulturae*, 690, 231–238. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.690.35>
- Vainstein, A. (Ed.). (2002). *Breeding For Oramentals: Classical and Molecular Approaches.* SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V.
- Vukosavljev, M., Zhang, J., Esselink, G. D., Van Westende, W. P. C., Cox, P., Visser, R.

- G. F., Arens, P., & Smulders, M. J. M. (2013). Genetic diversity and differentiation in roses: A garden rose perspective. *Scientia Horticulturae*, 162, 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.015>
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53–67. <https://doi.org/10.1234/ct.v25i2.510>
- Younis, A., Riaz, A., Ahmed, R., & Raza, A. (2007). Effect of hot water, sulphuric acid and nitric acid on the germination of rose seeds. *Acta Horticulturae*, 755, 105–108. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.755.12>
- Zakeel, M. C. M., & Safeena, M. I. S. (2019). Biofilmed biofertilizer for sustainable agriculture. In R. A. Ansari & I. Mahmood (Eds.), *Plant Health Under Biotic Stress* (pp. 65–82). Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4>
- Zhou, Z., & Bao, W. (2011). Levels of physiological dormancy and methods for improving seed germination of four rose species. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 818–824. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.024>
- Zhou, Z., Bao, W., & Wu, N. (2009). Effects of scarification, stratification and chemical treatments on the germination of *Rosa soulieana* Crépín achenes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 75–80.
- Zhou, Z. Q., Wu, N., Bao, W. K., & Qiu, P. F. (2008). Post-dispersal factors regulating dormancy and germination of *Rosa soulieana* seeds. *Belgian Journal of Botany*, 141(1), 103–111.
- Zlesak, D. C. (2008). ROSE *Rosa x hybrida*. In *Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century* (Vol. 53, Issue 9, pp. 695–740).

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Capítulo 8: Anexos