

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL Y
AMBIENTAL



***Bacillus* spp. NATIVAS COMO POTENCIALES
PROMOTORES DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE
CUATRO CLONES DE *Theobroma cacao* L. “CACAO”, EN
CONDICIONES DE VIVERO**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO
FORESTAL Y AMBIENTAL**

Autora : Bach. Nury Janet Arevalo Rimarachin.

Asesoras : M.Sc. Lizbeth Maribel Córdova Rojas

M.Sc. Yuriko Sumiyo Murillo Domen.

JAÉN – PERÚ, JUNIO, 2022



Bach. Nury Janet Arévalo Rimarachin



M.Sc. Yuriko Sumiyo Murillo Domen.



M.Sc. Lizbeth Maribel Córdova Rojas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

Ley de Creación N° 29304

Universidad Licenciada con Resolución del Consejo Directivo N° 002-2018-SUNEDU/CD

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Jaén, del día **28 de junio del año 2022**; siendo las **03:30 horas**, se reunieron mediante el aplicativo de videoconferencias **Google Meet** (enlace meet.google.com/agv-zicj-vwm), los **miembros del Jurado Evaluador**:

Presidente : Ph.D. WILFREDO RUIZ CAMACHO
Secretario Mg. JOSEPH CAMPOS RUIZ
Vocal Dra. DELICIA LILIANA BAZÁN TANTALEAN

Para evaluar la **Sustentación del Informe Final**

- () Trabajo de Investigación
(**X**) **Tesis**
() Trabajo de Suficiencia Profesional

Titulado: “*Bacillus spp.* NATIVAS COMO POTENCIALES PROMOTORES DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE CUATRO CLONES DE *Theobroma cacao* L. “CACAO”, EN CONDICIONES DE VIVERO” presentado por la Bachiller Nury Janet Arevalo Rimarachin de la Carrera Profesional de **Ingeniería Forestal y Ambiental** de la Universidad Nacional de Jaén.

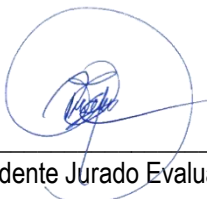
Después de la sustentación y defensa, **el Jurado Evaluador acuerda:**

- (**X**) Aprobar () Desaprobar (**X**) Unanimidad () Mayoría

Con la siguiente mención:

Excelente	18, 19, 20	()
Muy bueno	16, 17	(17)
Bueno	14, 15	()
Regular	13	()
Desaprobado	12 ò menos	()

Siendo las **04:20 horas** del mismo día, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación confirmando su participación con la suscripción de la presente.



Presidente Jurado Evaluador



secretario Jurado Evaluador



Vocal Jurado Evaluador

INDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
III. MATERIALES Y METODOS	4
3.1. Población	4
3.2. Muestra	4
3.3. Variables de estudio	4
3.4. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	4
3.5. Obtención de cepas de trabajo	4
3.6. Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado	5
3.7. Segunda fase: Efecto de rizobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de cacao	6
IV. RESULTADOS	12
V. DISCUSION	23
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
6.1. Conclusiones	25
6.2. Recomendaciones	25
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	26
DEDICATORIA	28
AGRADECIMIENTO	29
ANEXOS	30



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los cuatro clones de cacao obtenidos del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) -Bagua.....	6
Tabla 2. Análisis físico – químico de suelo experimental en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza – Chachapoyas, 2021.....	7
Tabla 3. Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) para evaluar promedio de los 7 tratamientos.	11
Tabla 4. Análisis de nitrógeno fijado, indoles y fósforo soluble alcanzado por <i>Bacillus</i> spp.	12
Tabla 5. Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 100. Considerando un nivel de significancia del 5% (0.05).....	16
Tabla 6. Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 100.	17
Tabla 7. Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 32.	18
Tabla 8. Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 32.	18
Tabla 9. Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 51.	19
Tabla 10. Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 51.	20
Tabla 11. Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 70.	21
Tabla 12. Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 70.	22



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de junio del 2021, Jaén.	7
Figura 2. Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de Julio el 2021, Jaén.	8
Figura 3. Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de agosto de 2021, Jaén.	8
Figura 4. Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de septiembre de 2021, Jaén.....	8
Figura 5. Obtención del inóculo bacteriano en el laboratorio de Biología de la UNJ.....	9
Figura 6. Resumen de medidas (altura, diámetro, numero de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 100	13
Figura 7. Resumen de medidas (altura, diámetro, numero de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 32	14
Figura 8. Resumen de medidas (altura, diámetro, numero de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 51	15
Figura 9. Resumen de medidas (altura, diámetro, numero de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 70	16



RESUMEN

Esta investigación aborda el tema acerca del efecto que tienen las bacterias de *Bacillus* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de cuatro clones de *Theobroma cacao* L. (Cacao), en condiciones de vivero, debido a que algunas especies sean estas forestales o no, presentan dificultades para desarrollarse es por eso que la incorporación de *Bacillus*, una bacteria de vida libre promotora del crecimiento vegetal (PGPR) ayuda a que el Cacao tenga un mejor desarrollo. El objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de cuatro clones de *Theobroma cacao* L. "cacao" en condiciones de vivero. Para ello se planteó una metodología con un enfoque cuantitativo, realizado en dos fases, la primera fase fue de alcance descriptivo y con el diseño de una sola casilla, se cuantificó el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado por las bacterias, y la segunda fase fue el estudio experimental, bajo un diseño completamente aleatorio, DCA, que se investigó el efecto de las bacterias en el desarrollo vegetativo de cacao. Las bacterias son cinco y se incluyó dos testigos, un químico y un absoluto sin aplicación, totalizando siete tratamientos con tres repeticiones cada uno.

Palabras clave: *Bacillus* spp., *Theobroma cacao* L., desarrollo vegetativo, PGPR.



ABSTRACT

This research project addresses the issue of the effect of native *Bacillus* spp. within the vegetative development of four clones of *Theobroma cacao* L. (Cacao), under vivarium conditions, because some forest or not forest species do not present difficulties to develop, that is why the incorporation of this free-living bacteria will help for this species to have a sustainable development. The main objective of this research was to determine the effect of the inoculation of native *Bacillus* spp. in the vegetative development of four clones of *Theobroma cacao* L. "Cacao" under vivarium conditions. For this, a methodology was proposed with a quantitative research carried out in two phases, the first of descriptive scope and with the design of a single box. the fixed nitrogen, the produced indoleacetic acid and phosphorus solubilized by the bacteria will be quantified. The second phase is an experimental study, under a completely randomized design, DCA, which investigated the effect of bacteria on the vegetative development of cocoa. There are ten bacterias and two controls were included, one chemical and one absolute without application, totaling twelve treatments with three repetitions each.

Key words: *Bacillus* spp., *Theobroma cacao* L., vegetative development, PGPR.



I. INTRODUCCION

El PGPR por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria) es una bacteria de vida libre y promotora del crecimiento vegetal al igual que *Bacillus* spp., es por ello que se optó por realizar esta investigación para fomentar su utilidad y sustituirlos por los fertilizantes químicos. Teniendo en cuenta que el género *Bacillus* coloniza la rizósfera de forrajes y cereales, mejorando su crecimiento y desarrollo. Se realizó una investigación para determinar el efecto de *Bacillus* en *Setaria lachnea* (nees) kunth. El inoculante (1mLg^{-1}) fue aplicado en semillas previamente desinfectadas y pre-germinadas que luego se sembraron en una mezcla suelo – arena (2:1), en cámara de crecimiento, a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 días. El poder germinativo de las semillas a los 21 días no se diferenció significativamente en los tratamientos testigo e inoculado. Entonces al investigar la adaptabilidad del cacao (*Theobroma cacao* L.) en condiciones deplorables permitió sugerir que el microbiota asociado con la rizósfera desempeña una función importante para la nutrición y el desarrollo de la planta. Se analizó el potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) aisladas de suelos cacaoteros. Dichas bacterias se aislaron en medios semiselectivos (NFb, JMV, LGI, JNFb). Los aislados puros se caracterizaron morfológica, bioquímicamente y complementariamente, también se estudió la capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN) por el método de micro-Kjeldahl, se seleccionaron para evaluar su potencial promotora de crecimiento durante 120 días en plantas de cacao clon CCN 51 establecidas a partir de semillas. El análisis y datos mostró que las plantas respondieron efectivamente a los tratamientos con bacterias donde el crecimiento y N (%) foliar incrementaron significativamente, en comparación con el testigo.



El propósito de este estudio fue determinar cuál es el efecto de la inoculación de 5 *Bacillus* spp. nativas en la altura, diámetro, número de hojas, biomasa aérea y radicular de cuatro clones de *Theobroma cacao* L. “cacao”, durante 90 días en condiciones de vivero, dentro del contexto de desarrollo sustentable, la biofertilización resurge como una práctica factible y necesaria en los sistemas de producción agrícola del Perú. El encarecimiento de los fertilizantes sintéticos y la preocupación de la sociedad por consumir alimentos libres de químicos, producidos con el menor impacto ambiental, justifica la investigación de bacterias promotoras del crecimiento como *Bacillus* spp., estableciendo las ventajas y alcances, pero también las limitaciones del empleo de microorganismos en la agricultura. Este proyecto tiene como finalidad determinar el efecto de *Bacillus* spp. nativas como promotoras del desarrollo en cuatro clones de *Theobroma cacao* L. “cacao” en condiciones de vivero y cuantificar el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado por 5 cultivos de *Bacillus* spp.



II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar el efecto de *Bacillus* spp. nativas como promotoras del desarrollo en cuatro clones de *Theobroma cacao* L. “cacao” en condiciones de vivero.

2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido, fósforo solubilizado por cinco cultivos de *Bacillus* spp.
- Determinar el efecto de cinco cultivos de *Bacillus* spp. nativas en la altura y biomasa aérea y radicular de cuatro clones de cacao, en condiciones de vivero.



III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Población

La población está constituida por las rizobacterias del género *Bacillus*.

3.2. Muestra

La muestra está formada por 5 cultivos de *Bacillus* spp. aisladas de raíces de tuna en Lambayeque, 2019.

3.3. Variables de estudio

Variable independiente

- Cinco cultivos de *Bacillus* spp.

Variable dependiente

- Desarrollo vegetativo de cuatro clones de cacao, en altura, diámetro, número de hojas, biomasa aérea y radicular.

3.4. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: en la primera fase descriptiva, con el diseño de una sola casilla, se cuantifico el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado por las bacterias. En la segunda fase, con un estudio experimental, bajo un diseño completamente aleatorio, DCA (Hernández *et al.*, 2019), se investigó el efecto de las bacterias en el desarrollo vegetativo de cacao. Las bacterias son cinco y se incluyó dos testigos, un químico y un absoluto sin aplicación, totalizando siete tratamientos con tres repeticiones cada uno.

3.5. Obtención de cepas de trabajo

Las bacterias fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Pedro Ruiz Gallo. Estas fueron cultivadas en caldo nutritivo a 30 °C, 150 rpm, durante 24 horas. A continuación, fueron sembradas mediante la técnica de estría en agar nutritivo. Después, se seleccionó cinco colonias características de cada género de bacteria y se sembró en agar nutritivo durante 48 horas, constituyendo las cepas de trabajo, que se incrementó según los requerimientos y se guardaron en refrigeración (8 °C).



3.6. Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado

Con las bacterias nativas se cuantifico el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado.

a) Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

Para la cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias nativas, se utilizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito descrito por Lara *et al*, (2007); Cadena y Martínez (2011). Cada una de las bacterias nativas cultivadas en agar nutritivo por 24 horas, fueron inoculadas en tubos de 15 x 150 mL conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo 10% y se incubo a 30 °C, por 72 horas, 9 mL de KCl 2M, se agitó a 150 rpm durante 1 hora y se dejó en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10 mL del sobrenadante y centrifugarlos (2000 rpm) durante 3 minutos. Luego, los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadió 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron para mezclar y se dejó en reposo durante 1 hora adicional. La positividad a la fijación de nitrógeno está dada por una coloración azul y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio.

b) Cuantificación de ácido indolacético (AIA) producido *in vitro*

Para la cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* según la reacción colorimétrica de Salkowski descrita por Mantilla (2007) y García y Muñoz (2010) cada bacteria nativa se cultivó en caldo nutritivo por 24 horas, de donde se tomaron 0,6 mL para inocularlos en 5 mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano. Después de la incubación a 30 °C, por 72 horas en agitación constante (150 rpm), los cultivos son centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. A continuación, 0,4 mL de cada uno de los sobrenadantes se depositaron en tubos, se agregó 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado en una relación 1:4, se mezcló y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indolacético está dada por una coloración grosella y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón que se obtuvo con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indolacético.



c) Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

Para la cuantificación de fósforo solubilizado según Vázquez *et al.* (2000), se obtuvo el inóculo de cada una de las bacterias cultivadas en 1 mL de caldo Sundara Rao Sinha Medium, SRSM a 30 °C, durante 20 horas, en agitación constante (150 rpm). A continuación, 0,6 mL de cada uno de los cultivos bacterianos son inoculados en frascos con 20 mL de caldo SRSM, e incubados a 30 °C, con agitación constante (150 rpm), por 96 horas. Después, los caldos son centrifugados y en el sobrenadante se determinó el pH y se cuantifico el fósforo soluble mediante el método colorimétrico del molibdato según Rodier y Rodi, 2005.

3.7. Segunda fase: Efecto de rizobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de cacao

Para determinar el efecto de las PGPR nativas en el desarrollo vegetativo de cacao según Carreño (2009), las bacterias en fase exponencial se inocularon en las rizósfera.

a) Ubicación del experimento e instalación del cultivo






El cultivo de cacao y la inoculación de cinco bacterias nativas, previamente caracterizadas se realizaron en el vivero de la Cooperativa Paraíso Cafetalero – Jaén.

b) Características de la especie vegetal

Los 4 clones de cacao (100, 32, 51 y 70) fueron obtenidos del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) -Bagua.

Tabla 1

Descripción de los cuatro clones de cacao obtenido del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) -Bagua

Accesión	Clon – 100	Clon - 32	Clon - 51	Clon - 70
				
Procedencia	Localidad de Jahuanga, Bagua Grande, Utcubamba, Amazonas.	Localidad de Lluhuana, Copallín, Bagua Grande, Amazonas.	Localidad de San José Bajo, Cajaruro, Utcubamba, Amazonas.	Localidad Diamante Bajo, Cajaruro, Utcubamba, Amazonas.
Fecha de Instalación	15/06/2016	15/06/2016	15/06/2016	15/06/2016



c). Acondicionamiento y análisis del suelo experimental

El suelo experimental estuvo constituido por 288 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5:2,0:0,5 que se solarizará durante 30 días. A continuación, la mezcla de suelo experimental se distribuyó en bolsas de polietileno negro, a razón de 2 kg por bolsa, totalizando 140 bolsas. En simultáneo se tomó una muestra representativa de 1 kg se suelo para realizar el análisis físico-químico en el laboratorio.

Tabla 2

Análisis físico – químico de suelo experimental en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza – Chachapoyas, 2021.

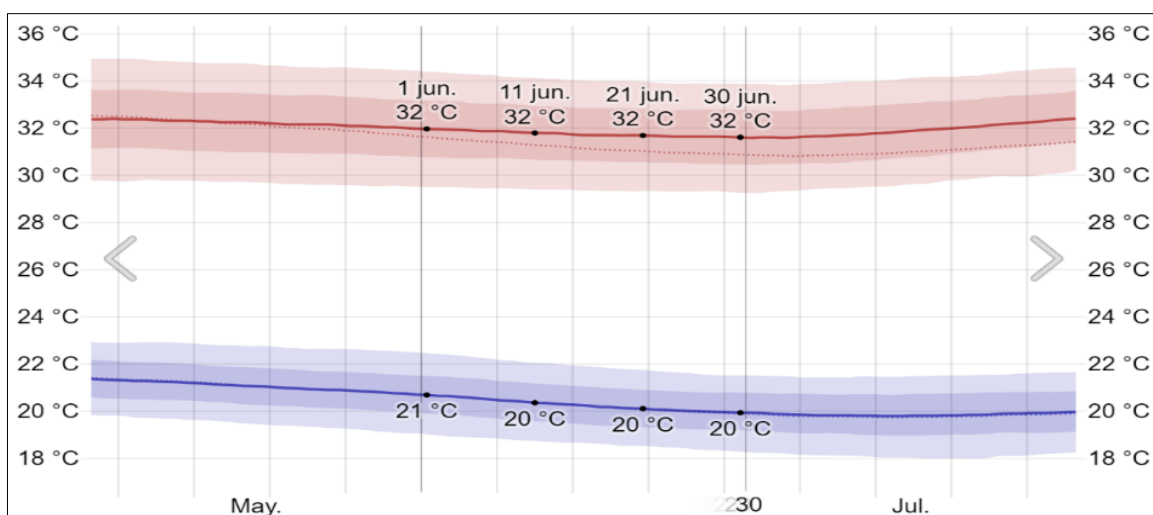
pH	CE (dS/m)	MO (%)	P (ppm)	K (ppm)	Clcáreo (%)	Tipo de suelo			
						A0	L0	Ar	Tipo de suelo
8.37	0.40	2.30	28.61	339.81	1.33	70.0	12.0	18.0	Fr.A.

d). Condiciones meteorológicas

Durante el cultivo de cacao se registraron las temperaturas máximas y mínimas, así como los porcentajes de humedad. Estos valores se tomaron del SENAMHI - zonal 3 Cajamarca/La Libertad.

Figura 1

Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de junio del 2021, Jaén.



La temperatura máxima (línea roja) y la temperatura mínima (línea azul) promedio diario con las bandas de los percentiles 25° a 75°, y 10° a 90°. Las líneas delgadas punteadas son las temperaturas promedio percibidas correspondientes.

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Figura 2

Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de Julio el 2021, Jaén

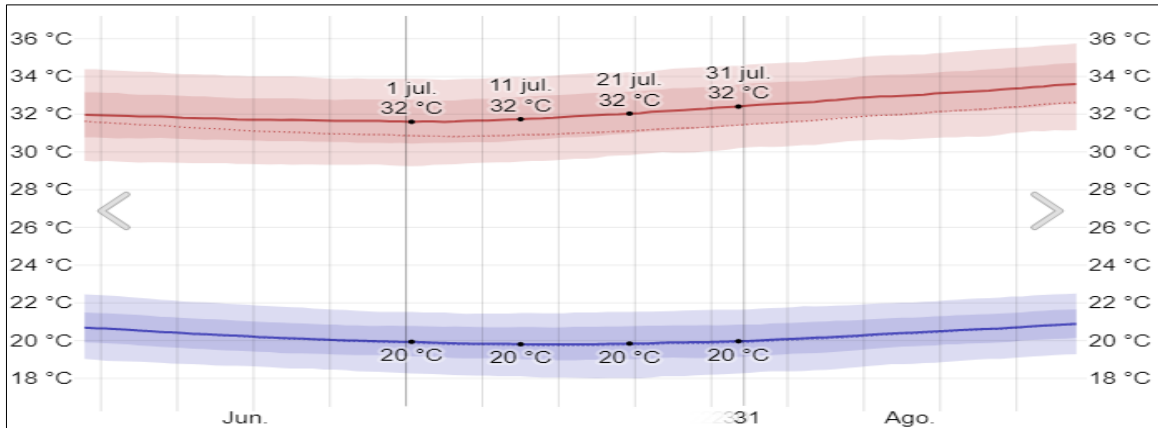


Figura 3

Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de agosto de 2021, Jaén.

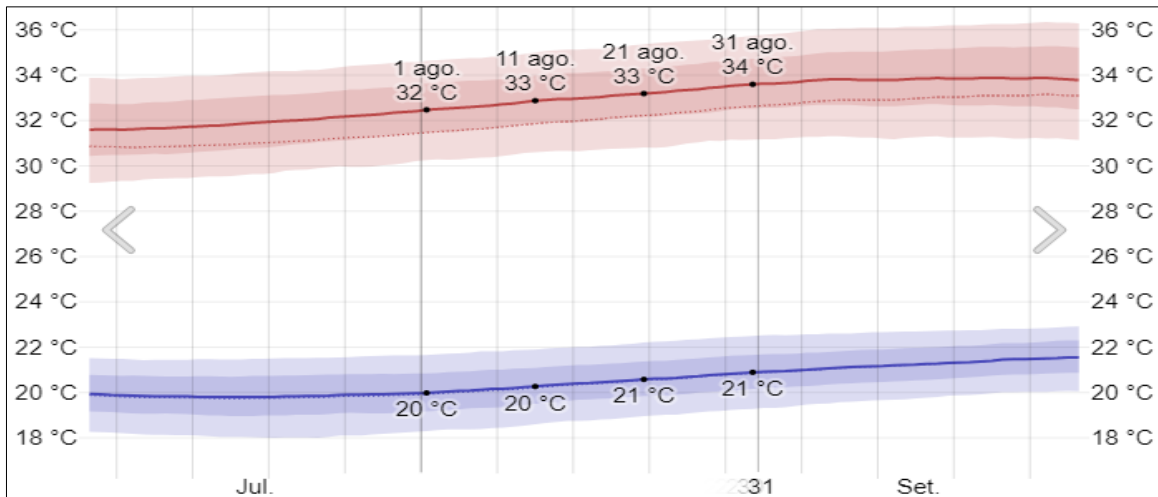
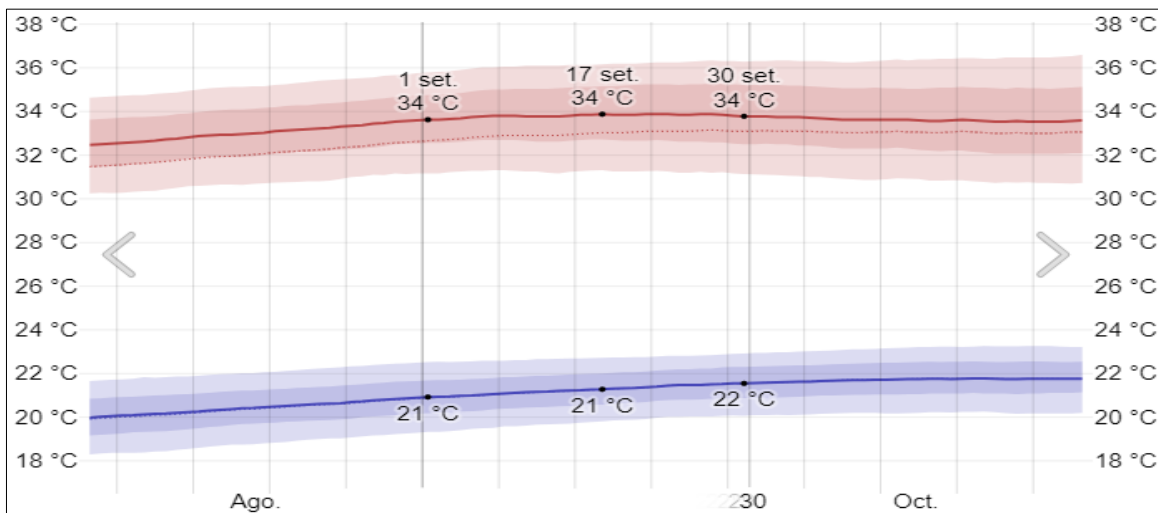


Figura 4

Temperatura máxima y mínima promedio durante el mes de septiembre de 2021, Jaén



[Signature]

[Signature]

[Signature]

c) Obtención del inóculo bacteriano

Para el inóculo, cada bacteria fue cultivada en 5 mL de agar nutritivo a 30 °C, por tiempo suficiente para alcanzar la fase exponencial. Después, se obtuvo 48 mL de una suspensión de células en solución salina esterilizada 0,85% p/v, cuya concentración se estandarizo $9,0 \times 10^8$ ufc mL⁻¹ por espectrofotometría a 660 nm.

Figura 5

Obtención del inóculo bacteriano en el laboratorio de Biología de la UNJ.



d) Tratamiento de germinación de las semillas

Las semillas de cacao se depositaron en una bolsa de polietileno compuesta por una primera capa de aserrín, donde dichas semillas estuvieron divididas de acuerdo a su código de clon (100, 32, 51, 70), y como segunda capa es decir encima de las semillas nuevamente se le agrego el aserrín, estas fueron cubiertas por bolsa de polietileno, donde se mantuvieron por 10 días hasta su germinación.

e) Aplicación de las bacterias en la rizósfera

En 72 bolsas de polietileno negro conteniendo el suelo experimental se sembraron tres semillas de cacao por bolsa y después de 7 días se eliminó la plántula menos vigorosa, quedando dos por tratamiento. A continuación, en 60 bolsas se inoculo las bacterias en la rizósfera. Previamente en ambos lados de las plántulas se realizó dos surcos a 5 cm del tallo y con una profundidad de 3 cm, donde se depositaron respectivamente 4 mL del inóculo bacteriano, totalizando 8 mL, a razón de 4 mL/plántula. A los testigos se les aplico nitrógeno (urea 46% N) y agua destilada (testigo químico y absoluto).

f) Evaluaciones

A los 30, 45, 60 y 90 días se midió la altura de las plantas. A los 90 días se extrajeron las plantas y se determinaron el peso de la biomasa seca de la parte aérea y radicular.

La altura de la planta se expresó en cm, considerando desde la base hasta el extremo final de la hoja bandera. A continuación, se cortó la parte aérea de cada una de las plantas a ras del suelo y junto con la raíz y suelo adherido se depositaron en bandejas de plástico. Para determinar el peso de la materia seca, tanto la raíz previamente lavada como la biomasa aérea se deshidratarán en el horno a 70 °C, hasta alcanzar peso constante (Ríos y Zúñiga, 2012). Después, el peso se determinó en una balanza digital.

g) Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos son ordenados en tablas y figuras que permitió determinar el potencial de los actinomicetos nativos como promotores del crecimiento de plantas. Con los valores de altura de planta, así como de biomasa radicular y aérea, se realizó las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, que son las asunciones principales del análisis de varianza en la aplicación de la estadística paramétrica, tal que los resultados de los análisis tengan validez estadística y se pueda llevar a cabo el proceso de inferencia a partir de la muestra.

Para el diseño completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal será:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = observación del i-ésimo tratamiento, J-ésima repetición

u = media general de la variable respuesta

t_i = efecto I-ésimo tratamiento, siendo $i=1,2,3,4,5, \dots 12$

E_{ij} = error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5 \dots = u_{12}$

H_a = Al menos una media diferente

Diseño experimental.

Tabla 3

Cuadro de análisis de varianza (ANOVA) para evaluar promedio de los 7 tratamientos.

Tratamientos				
T1	T2	T3	...	T7
Y10	Y20	Y30	...	Yk1
Y11	Y21	Y31	...	Yk2
Y12	Y22	Y32	...	Yk3
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
y_{1n1}	y_{2n2}	y_{3n3}	...	y_{knk}

Para evaluar los promedios de los rendimientos se utiliza la prueba de TUKEY porque los tratamientos tienen el mismo promedio de repeticiones (Mendoza y Bautista, 2016).

IV. RESULTADOS

En la tabla 4 observamos que las bacterias de *Bacillus* investigadas fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron ácido indol acético *in vitro*, cuantificándose 21,73ppm a 23,49ppm de nitrógeno; 29,25ppm a 31,62ppm de fósforo soluble y 52,15ppm a 68,13ppm de indol acético respectivamente;

Tabla 4

Análisis de nitrógeno fijado, indoles y fósforo soluble alcanzado por Bacillus spp.

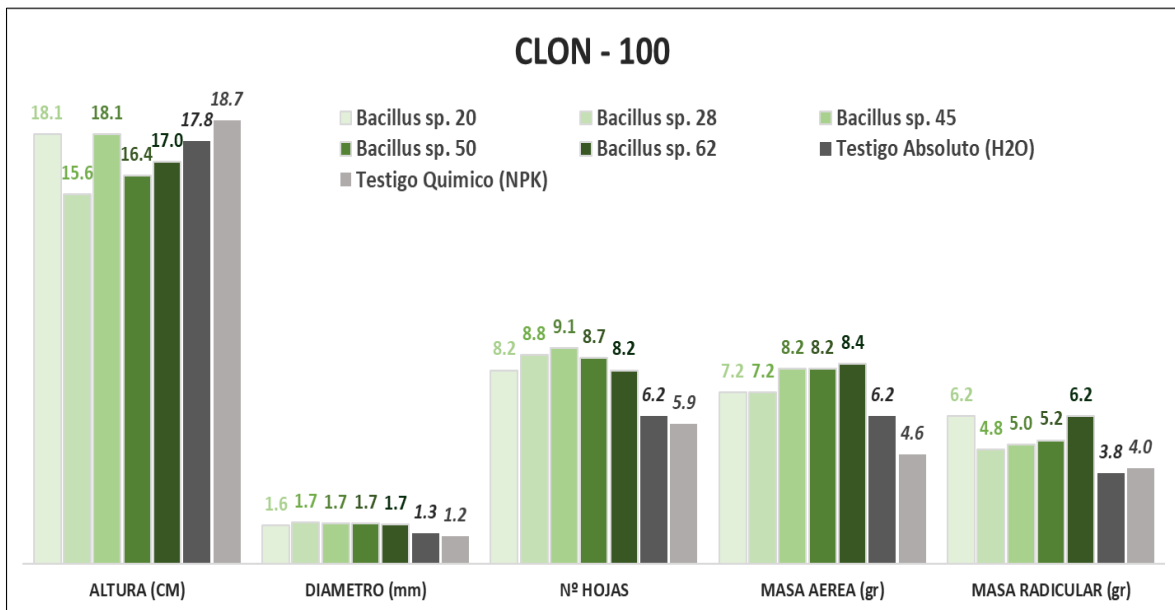
Bacterias	Indoles (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Nitrógeno fijado (ppm)
<i>Bacillus</i> sp.45	54,32	31,04	21,87
<i>Bacillus</i> sp.50	61,56	30,16	21,73
<i>Bacillus</i> sp.62	68,13	31,62	23,49
<i>Bacillus</i> sp.20	52,15	29,25	22,58
<i>Bacillus</i> sp.28	53,98	30,27	22,62

En la figura 6, se tienen resumidas, en promedios, cada una de las medidas correspondientes al CLON – 100, recolectadas para cada uno de los tratamientos, a través de los días de observación. Se puede ver que, para la altura, los valores obtenidos presentan resultados diferentes entre cada tratamiento, siendo el que corresponde al *Bacillus* sp. 28, el menor valor 15.6 cm, no observándose una diferencia entre los tratamientos y los testigos. En lo que respecta al diámetro, el resultado entre cada tratamiento es similar (entre 1,6 y 1,7 mm), marcando diferencias con los testigos cuyo diámetro es menor.

Respecto al número de hojas también se observa una diferencia de los tratamientos (entre 8,2 y 9,2 hojas en promedio) con los testigos (5,9 y 6,2 hojas en promedio). Tanto en la masa aérea como en la masa radicular, se puede observar diferencias entre algunos tratamientos y los testigos; sobresaliendo en ambas medidas del tratamiento con *Bacillus* sp. 62 y para el caso de la masa radicular, el tratamiento con *Bacillus* sp. 20.

Figura 6

Resumen de medidas (altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 100



En la figura 7, se tienen resumidas, en promedios, cada una de las medidas correspondientes al CLON – 32, recolectadas para cada uno de los tratamientos, a través de los días de observación. Se puede ver que los valores obtenidos para la altura presentan resultados diferentes entre cada tratamiento, respecto a los testigos, siendo el tratamiento con *Bacillus* sp. 62 el que tiene mayor altura con 16.7 cm. En lo que respecta al diámetro, el resultado entre cada tratamiento es similar (entre 1,8 y 2,0 mm), siendo superiores a los testigos (1,4 y 1,5 mm). Respecto al número de hojas, el tratamiento con mayor número de hojas, en promedio, corresponde al *Bacillus* sp. 20, con 10,7 hojas. Para las medidas correspondientes a la masa aérea y radicular el tratamiento con *Bacillus* sp. 45 es el que ha presentado mejores resultados, en promedio (masa aérea: 10,6 g y masa radicular: 11,2 g)

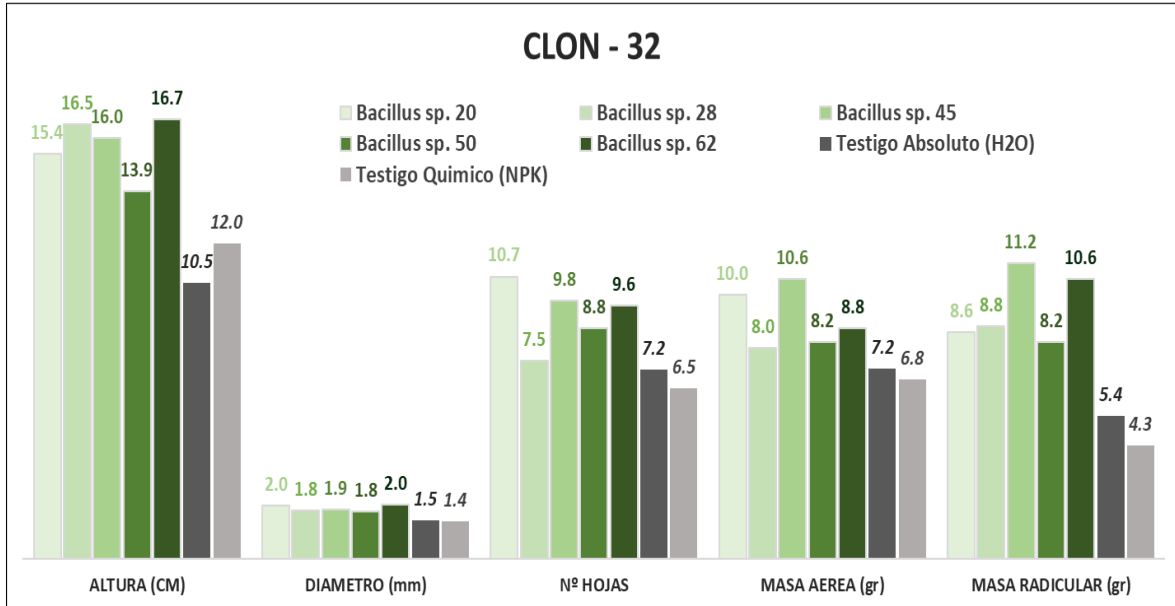
[Signature]

[Signature]

[Signature]

Figura 7

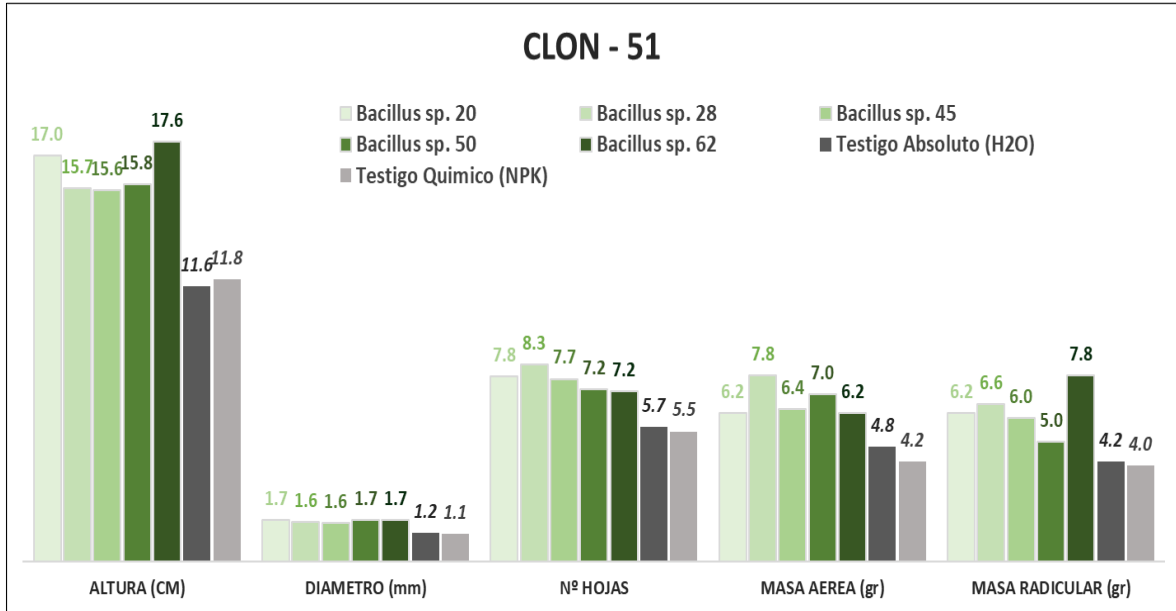
Resumen de medidas (altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 32



En la figura 8, se muestra el promedio de cada una de las medidas correspondientes al CLON – 51, para cada uno de los tratamientos, a través de los días de observación. Respecto a la altura se puede ver que el tratamiento con mayor medida es el que corresponde al *Bacillus* sp. 62, con 17.6 cm; además existe una diferencia notoria de los tratamientos con los testigos. En lo que respecta al diámetro, el resultado entre cada tratamiento es similar (entre 1,6 y 1,7 mm), siendo superiores a los testigos (1,2 y 1,1 mm). En cuanto al número de hojas, el tratamiento con mayor número, en promedio, corresponde al *Bacillus* sp. 28, con 8,3 hojas; también se puede ver que los testigos presentan valores por debajo de los tratamientos. Para las medidas correspondientes a la masa aérea, el tratamiento con *Bacillus* sp. 28 es el que ha presentado mejores resultados, en promedio 7,8 g; mientras que en la masa radicular el tratamiento con *Bacillus* sp. 62 es el que se diferencia del resto con 7,8 g. Para ambas medidas de masa, los testigos son los que presentan los valores más bajos.

Figura 8

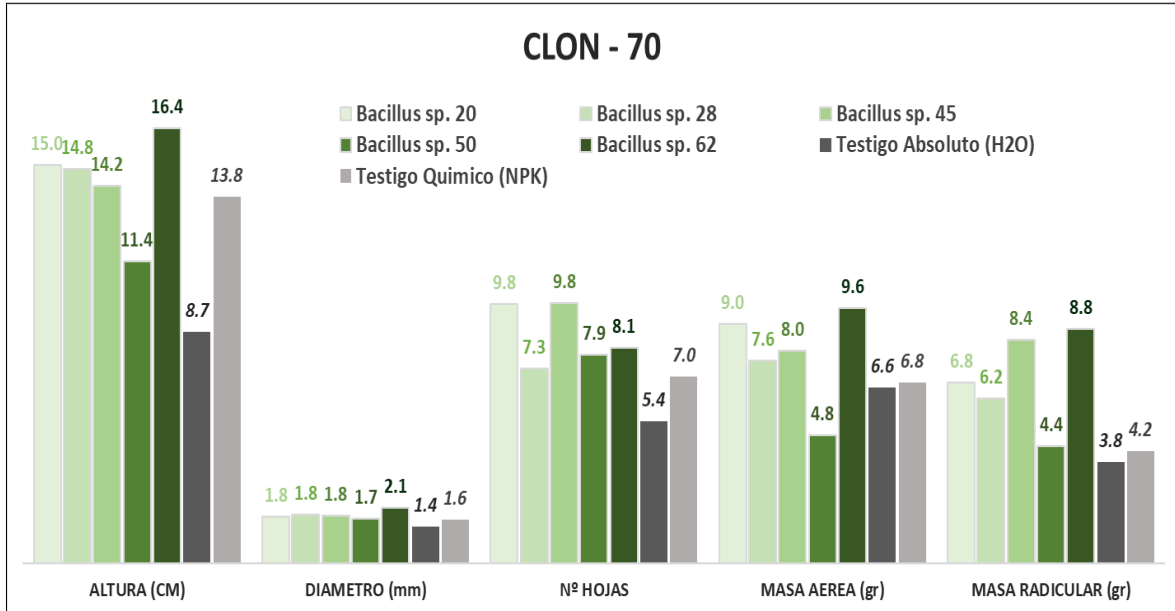
Resumen de medidas (altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 51



En la figura 9, se muestra el promedio de cada una de las medidas correspondientes al CLON – 70, para cada uno de los tratamientos, a través de los días de observación. Se observa que el tratamiento con mayor altura promedio corresponde al *Bacillus sp. 62*, con 16.4 cm; también es el que presenta mayor diámetro, con 2,1 mm en promedio. Respecto al número de hojas, sobresalen en promedio, los tratamientos con *Bacillus sp. 20* y *Bacillus sp. 45*, ambos con 9,8 hojas en promedio. Para las medidas correspondientes a la masa aérea y masa radicular, el tratamiento con *Bacillus sp. 62* es el que se diferencia del resto con 9,6 g y 8,8 g, respectivamente.

Figura 9

Resumen de medidas (altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular) para cada tratamiento, del CLON - 70



Para poder confirmar las diferencias que se han podido observar gráficamente en las figuras anteriores, se procedió con el análisis de varianza correspondiente, bajo el que se contrasta la hipótesis de igualdad de medias, considerando un nivel de significancia del 5%.

En la tabla 5 se tienen los resultados de análisis de varianza aplicado a cada una de las medidas del CLON – 100. Se puede ver que, tanto para las medidas de altura, diámetro, número de hojas y masa aérea, si hay diferencias significativas entre los valores de los tratamientos (p valor = 0,00 < 0,05); mientras que para la masa radicular no se puede afirmar que existen diferencias significativas entre los tratamientos observados (p valor = 0,20 > 0,05).

Tabla 5

Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 100. Considerando un nivel de significancia del 5% (0.05)

Clon	Medida	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	p valor
CLON-100	Altura (cm)	149	6	25	3.40	2.17	0.00
	Diametro (mm)	6	6	1	3.33	2.17	0.00
	Nº hojas	196	6	33	3.37	2.17	0.00
	Masa aerea (g)	131	7	19	5.63	2.31	0.00
	Masa radicular (g)	45	7	6	1.51	2.31	0.20

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Habiendo confirmado las diferencias significativas entre los tratamientos, según las medidas observadas del CLON - 100, se procede con la formación de grupos homogéneos que resulta de la comparación múltiple de los promedios de los tratamientos. De esta manera, en la tabla 2 se tienen los grupos conformados para cada una de las medidas. Respecto a la altura, el grupo con valores superiores lo comparten los dos testigos y los tratamientos con *Bacillus* sp. 45, *Bacillus* sp. 20, *Bacillus* sp. 62 y *Bacillus* sp. 50. Se tiene también que, tanto para el diámetro, como para el número de hojas y para la masa radicular; el grupo de valores superiores lo conforman todos los tratamientos y el testigo absoluto.

Tabla 6

Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 100.

MEDIDA	<i>Bacillus</i>	VALOR GRUPOS
ALTURA (CM)	Testigo químico (NPK)	18.7 a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	18.1 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	18.1 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	17.8 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	17.0 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	16.4 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	15.6 b
DIAMETRO (mm)	<i>Bacillus</i> sp. 28	1.7 a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	1.7 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	1.7 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	1.7 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	1.6 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	1.3 a b
	Testigo químico (NPK)	1.2 b
N° HOJAS	<i>Bacillus</i> sp. 45	9.1 a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	8.8 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	8.7 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	8.2 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	8.2 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	6.2 a b
	Testigo químico (NPK)	5.9 b
MASA AEREA (g)	<i>Bacillus</i> sp. 62	8.4 a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	8.2 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	8.2 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	7.2 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	7.2 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	6.2 a b
	Testigo Químico (NPK)	4.6 b

La tabla 7 muestra los resultados de análisis de varianza aplicado a cada una de las medidas del CLON – 32. Se tiene que, para cada una de las medidas observadas, existen diferencias significativas entre los valores de los tratamientos (p valor $< 0,05$).

Tabla 7

Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 32.

Clon	Medida	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	p valor
32	Altura (cm)	690	6	115	13.67	2.17	0.00
	Diámetro (mm)	7	6	1	3.09	2.17	0.01
	Nº hojas	296	6	49	3.40	2.17	0.00
	Masa aérea (g)	194	7	28	8.54	2.31	0.00
	Masa radicular (g)	308	7	44	7.19	2.31	0.00

En la tabla 8, se tienen los grupos homogéneos para los tratamientos del CLON – 32 en cada una de las medidas. Se puede ver que, para la altura, el grupo de tratamientos con valores superiores está conformado por los *Bacillus* sp. 62, *Bacillus* sp. 28, *Bacillus* sp. 45 y *Bacillus* sp. 20. Mientras que, para el diámetro, número de hojas y masa aérea; el grupo de valores superiores lo conforman todos los tratamientos y el testigo químico. Respecto a la masa radicular, el grupo con mayores valores en esta medida está conformado solo por los tratamientos con *Bacillus*.

Tabla 8

Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 32.

MEDIDA	<i>Bacillus</i>	VALOR	GRUPOS
ALTURA (cm)	<i>Bacillus</i> sp. 62	16.7	a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	16.5	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	16.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	15.4	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	13.9	b c
	Testigo Químico (NPK)	12.0	c
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	10.5	d
DIAMETRO (mm)	<i>Bacillus</i> sp. 62	2.0	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	2.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	1.9	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	1.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	1.8	a b





	Testigo Absoluto (H ₂ O)	1.5 a b
	Testigo Químico (NPK)	1.4 b
N° HOJAS	<i>Bacillus</i> sp. 20	10.7 a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	9.8 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	9.6 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	8.8 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	7.5 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	7.2 a b
	Testigo Químico (NPK)	6.5 b
	MASA AEREA (g)	<i>Bacillus</i> sp. 45
<i>Bacillus</i> sp. 20		10.0 a b
<i>Bacillus</i> sp. 62		9.0 a b
<i>Bacillus</i> sp. 50		8.2 a b
<i>Bacillus</i> sp. 28		8.0 a b
Testigo Absoluto (H ₂ O)		7.2 a b
Testigo Químico (NPK)		6.8 b
MASA RADICULAR (g)		<i>Bacillus</i> sp. 45
	<i>Bacillus</i> sp. 62	10.6 a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	8.8 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	8.6 a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	8.2 a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	5.4 b
	Testigo Químico (NPK)	4.3 b

En la tabla 9 se pueden observar los resultados de análisis de varianza aplicado a cada una de las medidas del CLON – 51. Según este análisis, para cada una de las medidas observadas, existen diferencias significativas entre los valores de los tratamientos (p valor < 0,05).

Tabla 9

Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 51.

Clon	Medida	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	P valor
51	ALTURA (cm)	682	6	114	8.74	2.17	0.00
	DIAMETRO (mm)	8	6	1	4.62	2.17	0.00
	N° HOJAS	137	6	23	3.04	2.17	0.01
	MASA AEREA (g)	87	7	12	4.68	2.31	0.00
	MASA RADICULAR (g)	88	7	13	3.34	2.31	0.01





En la tabla 10, se tienen los grupos homogéneos para los tratamientos del CLON – 51 en cada una de las medidas. Se observa que, para la altura, el grupo de tratamientos con valores superiores está conformado todos los tratamientos, diferenciándose estadísticamente de los testigos; resultado similar se observa para el diámetro. Mientras que, para las otras medidas, el grupo de valores superiores está conformado por los tratamientos con *Bacillus* y por el testigo absoluto.

Tabla 10

Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 51.

MEDIDA	<i>Bacillus</i>	VALOR	GRUPOS
ALTURA (cm)	<i>Bacillus</i> sp. 62	17.6	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	17.0	a
	<i>Bacillus</i> sp. 50	15.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	15.7	a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	15.6	a
	Testigo químico (NPK)	11.8	b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	11.6	b
DIAMETRO (mm)	<i>Bacillus</i> sp. 50	1.7	a
	<i>Bacillus</i> sp. 62	1.7	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	1.7	a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	1.6	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	1.6	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	1.2	b
	Testigo químico (NPK)	1.1	b
N° HOJAS	<i>Bacillus</i> sp. 28	8.3	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	7.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	7.7	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	7.2	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	7.2	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	5.7	a b
	Testigo químico (NPK)	5.5	b
MASA AEREA (g)	<i>Bacillus</i> sp. 28	7.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 50	7.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	6.4	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	6.2	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 62	6.2	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	4.8	a b
	Testigo químico (NPK)	4.2	b
MASA RADICULAR (g)	<i>Bacillus</i> sp. 62	7.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	6.6	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	6.2	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	6.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	5.0	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	4.2	a b
Testigo químico (NPK)	4.0	b	





En la tabla 11 se tienen los resultados del análisis de varianza aplicado a cada una de las medidas del CLON – 70; donde se puede ver que, para cada una de las medidas observadas, existen diferencias significativas entre los valores de los tratamientos (p valor < 0,05).

Tabla 11

Análisis de varianza de los tratamientos en cada una de las medidas observadas, para el CLON - 70.

Clon	Medida	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	P valor
CLON-70	ALTURA (cm)	805	6	134	20.72	2.17	0.00
	DIAMETRO (mm)	6	6	1	2.86	2.17	0.01
	Nº HOJAS	295	6	49	4.00	2.17	0.00
	MASA AEREA (g)	166	7	24	5.60	2.31	0.00
	MASA RADICULAR (g)	166	7	24	3.03	2.31	0.01

En la tabla 12, se tienen los grupos homogéneos para los tratamientos del CLON – 70 en cada una de las medidas. Se observa que, para la altura, el grupo de tratamientos con valores superiores está conformado los tratamientos con *Bacillus* sp. 62, *Bacillus* sp. 20, *Bacillus* sp. 28 y *Bacillus* sp. 45. Para las medidas correspondientes al diámetro, número de hojas y masa radicular, el grupo de valores superiores está conformado por todos los tratamientos con *Bacillus* y por el testigo químico. Finalmente, respecto a la masa aérea, el grupo de valores superiores lo conforman los tratamientos con *Bacillus* sp. 62, *Bacillus* sp. 20, *Bacillus* sp. 45 y *Bacillus* sp. 28, además de los dos testigos.





Tabla 12

Test de comparaciones múltiples entre tratamientos, en cada una de las medidas, para el CLON - 70.

MEDIDA	Bacillus	VALOR	GRUPOS
ALTURA (cm)	<i>Bacillus</i> sp. 62	16.4	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	15.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	14.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	14.2	a b
	Testigo químico (NPK)	13.8	b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	11.4	c
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	8.7	d
DIAMETRO (mm)	<i>Bacillus</i> sp. 62	2.1	a
	<i>Bacillus</i> sp. 28	1.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	1.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	1.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	1.7	a b
	Testigo químico (NPK)	1.6	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	1.4	b
N° HOJAS	<i>Bacillus</i> sp. 45	9.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	9.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 62	8.1	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	7.9	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	7.3	a b
	Testigo químico (NPK)	7.0	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	5.4	b
MASA AEREA (g)	<i>Bacillus</i> sp. 62	9.6	a
	<i>Bacillus</i> sp. 20	9.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 45	8.0	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	7.6	a b
	Testigo químico (NPK)	6.8	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	6.6	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	4.8	b
MASA RADICULAR (g)	<i>Bacillus</i> sp. 62	8.8	a
	<i>Bacillus</i> sp. 45	8.4	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 20	6.8	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 28	6.2	a b
	<i>Bacillus</i> sp. 50	4.4	a b
	Testigo químico (NPK)	4.2	a b
	Testigo Absoluto (H ₂ O)	3.8	b





V. DISCUSIÓN

El género *Bacillus* es utilizado por su capacidad benéfica de biofertilizante orgánico que permite a los cultivos agrícolas sobrevivir en condiciones desfavorables, asimismo por su intervención directa en los ciclos biogeoquímicos con lo que hacen disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos, que son aprovechados por las plantas y por la producción de metabolitos secundarios capaces de promover respuestas fisiológicas en las células vegetales (Santa Cruz, 2018). Es por ello que se verificó la actividad in vitro de las especies de *Bacillus* investigadas, con un potencial previamente reportado por Casos y Casos (2017) respecto a nitrógeno fijado y fósforo solubilizado, al igual que Herve (2019) que investigó la producción de ácido indolacético (IAA) en *Bacillus subtilis* aisladas de árboles de cacao.

En la presente investigación se evidenció un incremento en el desarrollo vegetativo de los cuatro clones de cacao, de igual manera Calvo *et al.* (2022) realizaron un estudio donde su hipótesis fue evaluar el efecto de *B. subtilis* en el crecimiento de *Z. mays*, observando que las cepas *B. subtilis* GBO3 y IN937b presentan efectos sobresalientes en el crecimiento general de plántulas de *Z. mays*, obteniéndose pesos de raíz de 7.3 y 6.67 g para los tratamientos 2 y 3, respectivamente (cepas GBO3 1×10^8 UFC.mL⁻¹ y IN937b 1×10^7 UFC.mL⁻¹), superando los 3.54 g del testigo, si bien existió un mayor peso en las raíces de las plántulas, esto no se vio reflejado en su longitud ($P=0.2532$).

Por otro lado, el resultado obtenido para *Bacillus* spp. 51 que se estudió en esta investigación tuvo un mayor realce con respecto a las mediciones de diámetro, altura y masa radicular de los cuatro diferentes clones de cacao en comparación con los dos testigos químico y absoluto que se utilizaron para demostrar su efectividad. Similar es el caso que reportó Romero (2021) cuando realizó un ensayo de invernadero en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis*), donde la bacteria *Bacillus* sp. MC-1 presentó los mejores índices de desarrollo vegetal superando hasta en un 18.1% a los tratamientos testigo y control, para las variables altura, diámetro del tallo, número de hojas, número de raíces, peso seco y peso húmedo, además al estudiar la germinación en plantulas de maracuyá inoculadas con *Bacillus* sp. MID-3 esta superó al testigo con un 20% de efectividad en altura y diámetro de



las plantulas, verificandose que esta cepa posee una mayor capacidad para sintetizar fitohormonas como el ácido indol acético, giberalinas y citoquininas, recalando que para los dos estudios se empleo un diseño de varianza completamente al azar (DCA) para determinar la variabilidad de las mismas.



Bach. Nury Janet Arévalo Rimarachin



M.Sc. Yuriko Sumiyo Murillo Domen.

24



M.Sc. Lizbeth Maribel Córdova Rojas

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- a) Las cinco cepas de *Bacillus* spp. nativas investigadas fijaron in vitro nitrógeno (21,73 a 23,49 ppm), indoles (52,15 a 68,13ppm) y fósforo soluble (29,25 a 31,62 ppm).
- b) Los cuatro clones de cacao inoculados con los cultivos de *Bacillus* seleccionados fueron los que alcanzaron un mayor incremento en los valores de altura, (Clon-51, *Bacillus* sp. 62, con 16.4 cm; también es el que presenta mayor diámetro, con 2,1 mm en promedio y Clon-70, *Bacillus* sp. 20 y 45 respecto al número de hojas, sobresalen en promedio ambos con 9,8). Los 5 cultivos de *Bacillus* spp aisladas previamente de tuna, realizaron un incremento en el desarrollo vegetativo de cacao.

6.2. Recomendaciones

- a) Investigar en estudios posteriores el efecto de estos microorganismos en otras especies forestales ya que no se tiene mucho registro de investigación en dichas plantaciones.
- b) Continuar con la investigación para determinar el efecto de los clones de cacao inoculados de *Bacillus* spp. en condiciones de campo con y sin aplicación de fertilizante químico para seguir verificando su efectividad.
- c) Se recomienda al Ministerio de Agricultura que debe incentivar la producción y comercialización de estos microorganismos como biofertilizantes debido a que son amigables con el ambiente y por el incremento del precio de fertilizantes químicos.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cadena, S., y Martínez, B. (2011). Caracterización de cepas de *Pseudomonas* spp. y su efecto en la germinación y emergencia de *Zea mays* L. "maíz" en Lambayeque. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Casos, D. M., & Casos, D. N. (2017). Caracterización de especies de *Bacillus* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Lambayeque: Repositorio Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Carreño, C. 2009. Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Calvo, G., Estrada, G., Méndez, M., y Miceli, L. (2022). Efectos de *Bacillus subtilis* cepas GBO3 y IN937b en el crecimiento de maíz (*Zea mays* L.). Mexico : Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Chiapas.
- García, F. y Muñoz, H. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (*Oryza sativa*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú
- Hernández, S. R., y Mendoza, C. (2019). Metodología de la Investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta, ciudad de México. México: Mc Graw Hil Education.
- Lara, C., Villalba, M., y Oviedo, L. (2007). Bacterias Fijadoras asimbióticas e nitrogeno en la zona agrícola de San Carlos. Colombia: Revista Colombiana de Biotecnología.
- Mantilla, M. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko ano) en periodo de enraizamiento. Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Mendoza, R. H., y Bautista, M. G. (2016). Curso de extensión: Introducción al Análisis de Datos utilizando R y Excel. Diseño Experimental. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.



- Ríos, P.; Zúñiga, L. 2012. *Bacillus* spp. aisladas de rizósfera de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial coimo promotoras del crecimiento de plantas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Rodier, J. y Rodi, L. (2005). Análisis de Aguas. España: Ediciones Omega
- Romero, B. F. (2021). Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento del cultivo de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp, en plántulas de maracuyá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Ecuador: Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil.
- Santa Cruz, P. Y. (2018). Efecto de *Bacillus* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en el desarrollo vegetativo de *Solanum lycopersicum* L. "tomate". Lambayeque - Chiclayo.
- Vásquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A., y Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*.



DEDICATORIA

A Dios:

Por darte la fortaleza, sabiduría y sobre todo guiarme en mi camino para alcanzar y poder lograr cumplir una de mis más grandes metas que he anhelado en mi vida profesional.

A mis padres:

Manuel y Gladys por su amor infinito, por ser ejemplo de perseverancia y constancia, por inculcarme los mejores valores y enseñarme a nunca rendirme y por su inmenso apoyo incondicional que me brindaron para así poder superarme tanto personal como profesionalmente.

A mis hermanos:

José, Miguel, Deiner, Marilú y Jheison, por su apoyo brindado en todo momento y por darme los mejores consejos y las fuerzas para poder lograr cumplir mis objetivos



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme permitido lograr este objetivo que marcara mi carrera y vida profesional.

Al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) de la provincia de Bagua, por proporcionarme las semillas de los cuatro clones de cacao, así mismo al Ing. Jheiner Vásquez, encargado del INIA por su asesoría y buen trato al momento de la recolección.

A mi alma mater, la Universidad Nacional de Jaén (UNJ), por brindarme el acceso a sus laboratorios y facilitarme la investigación, a los docentes de la carrera de Ingeniería Forestal y Ambiental, quienes con sus enseñanzas y ética profesional me permitieron culminar con mi carrera de forma satisfactoria para llegar a ser un profesional competitivo.

A la M.Sc. Lizbeth Maribel Córdova Rojas y M.Sc. Yuriko Sumiyo Murillo Domen, asesoras de tesis de la Universidad Nacional de Jaén, por su valiosa orientación, tiempo y apoyo que ha permitido la culminación de esta investigación.



ANEXOS

Anexo 01

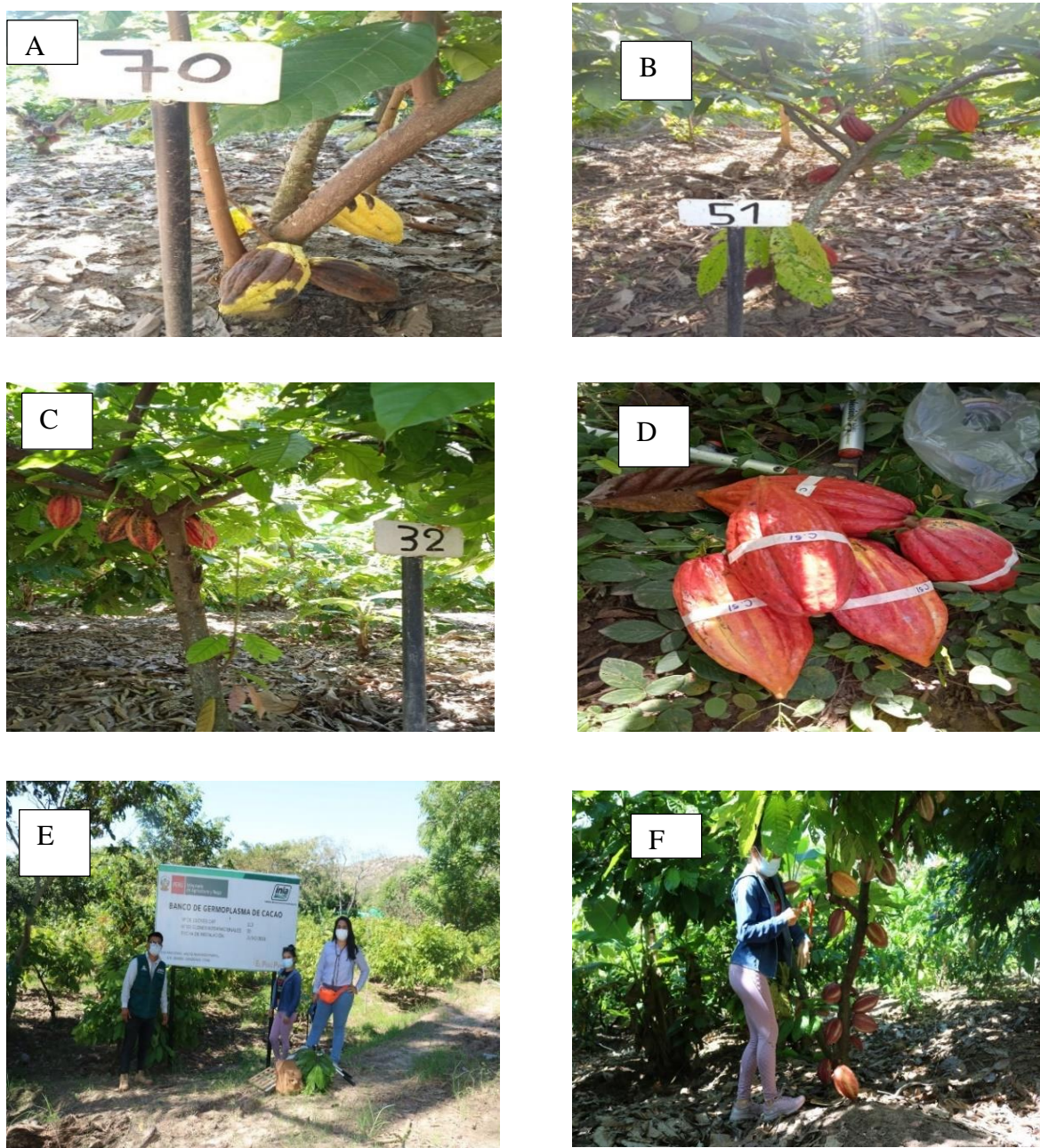


Figura 1. Colecta de los cuatro clones de cacao obtenidos por el banco de germoplasma del INIA-Bagua. A. Colecta del clon 70; B. Colecta del clon 51; C. Colecta del clon 32; D. Colecta del clon 100.

Nury Janet Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 02

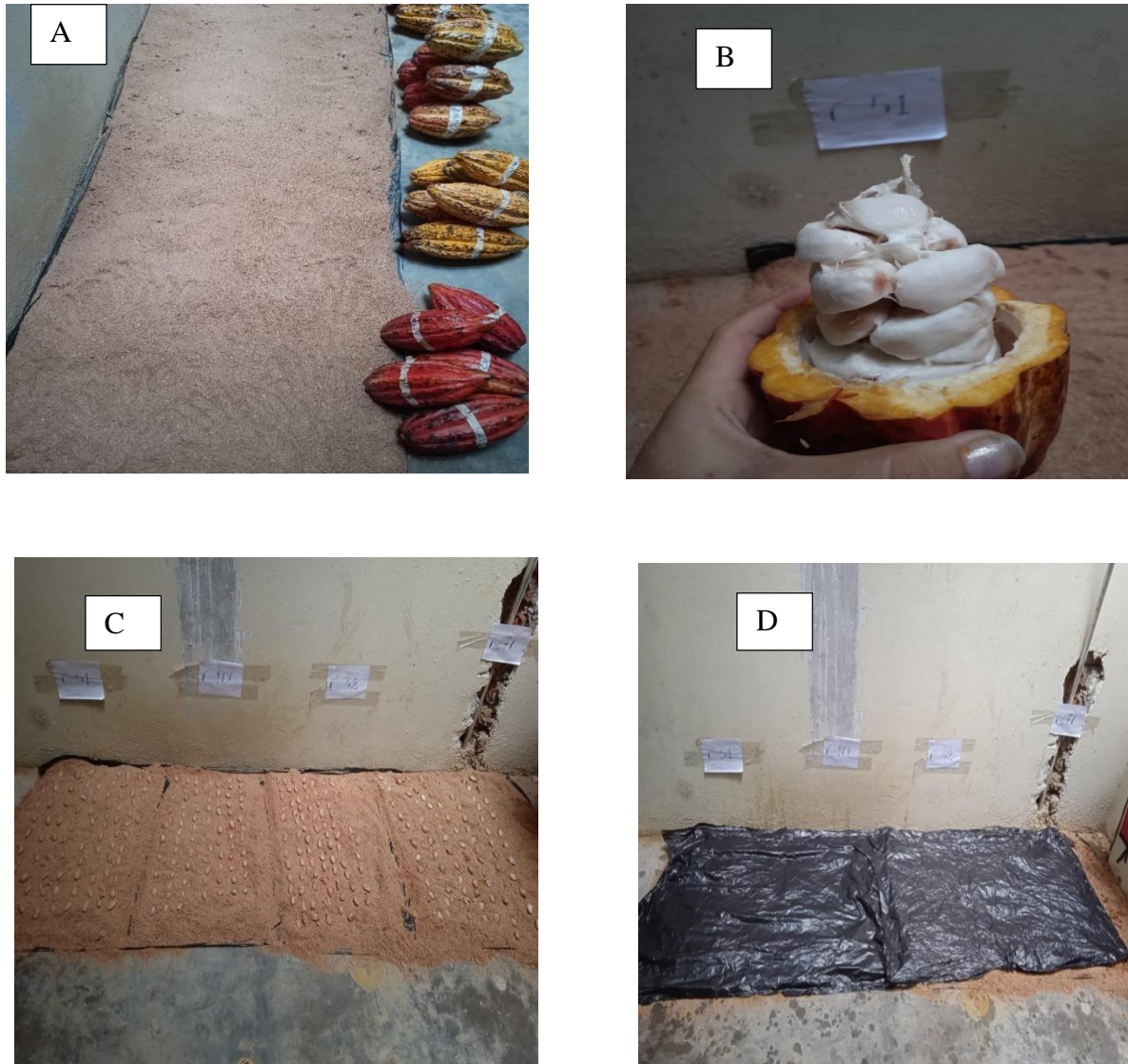


Figura 2. Extracción de las semillas de cacao para el proceso de pre germinación. A. Los cuatros clones correctamente codificados; B. Extracción de la semilla del clon 51; C. Semillas de cacao cubiertas por aserrín; D. Semillas de cacao cubiertas con una bolsa de polietileno.

Nury Janet Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 03

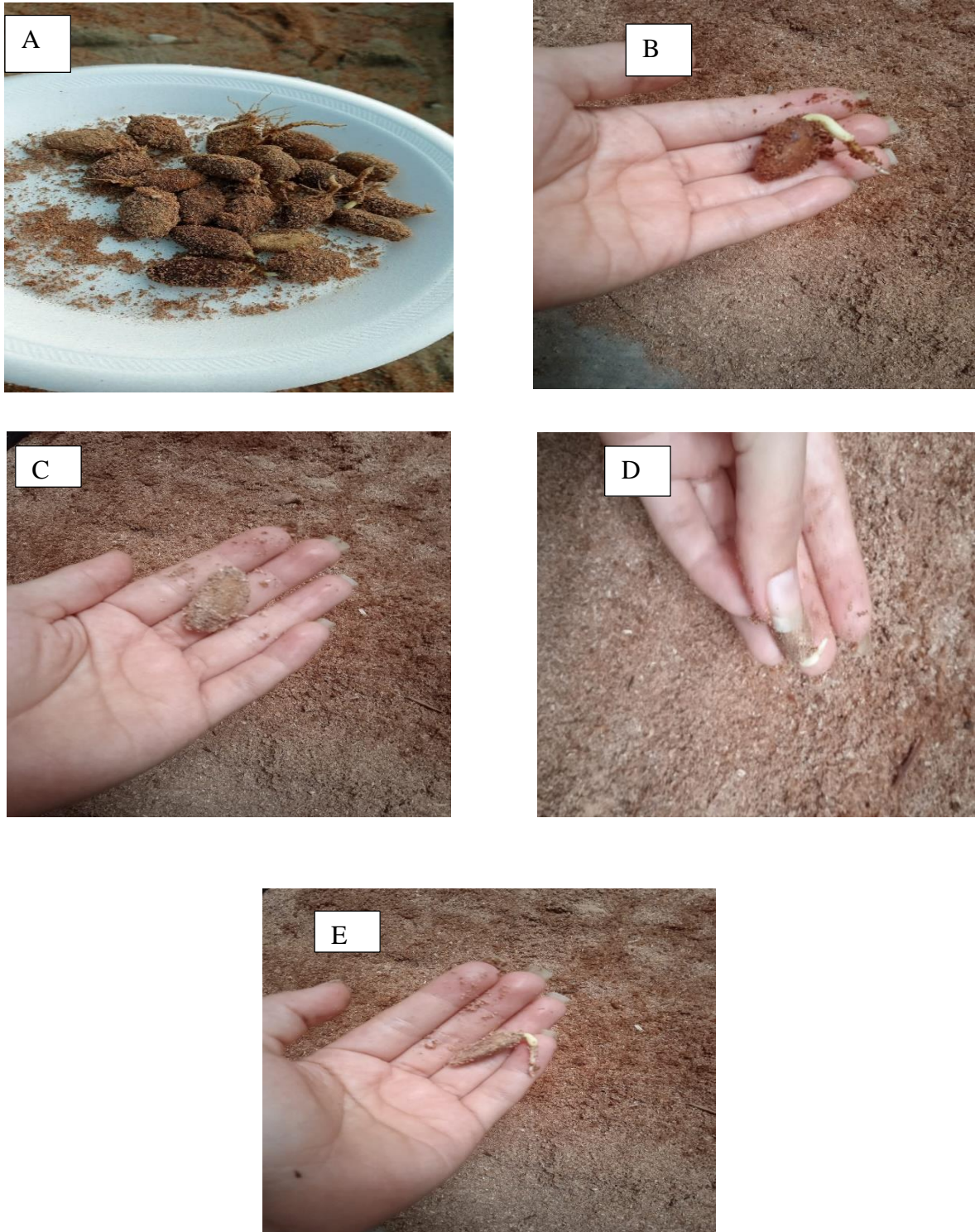


Figura 3. Semillas germinadas a los 10 días de iniciado su proceso. A. Semillas germinadas del clon 51; B. Semilla germinada del Clon 32; C. Semilla germinada del clon 100; D. Semilla germina del clon 70.

Nury Janet Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 04



Figura 4. Preparación y llenado del sustrato agrícola. A. Mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5:2,0:0,5; B. Llenado en bolsas de polietileno de dos kilogramos cada una; C. Instalación de bolsas llenas en el vivero; D. Sembrado de semillas a cada bolsa

Nury Arévalo

Yuriko Murillo

Lizbeth Córdova

Anexo 5



Figura 5. Preparación del inoculo bacteriano *Bacillus*. A. Pesado B. Calentado del caldo de agar nutritivo. C. Centrifugado de las muestras. E. Sembrado de bacterias en placas Petri. F. Bacterias listas e inoculadas.

Nury Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 06



Figura 6. Inoculación de cepas de *Bacillus* spp., agua y NPK a las plántulas de cacao. A. Inoculación de *Bacillus* a plántulas del clon 51; B. Inoculación de *Bacillus* a plántulas del clon 100; C. Inoculación de *Bacillus* a plántulas del clon 32; D. Inoculación de *Bacillus* a plántulas del clon 70; E. Inoculación de agua a plántulas de cacao para el testigo absoluto; F. Inoculación de NPK a plántulas de cacao para el testigo químico.

Nury Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 07

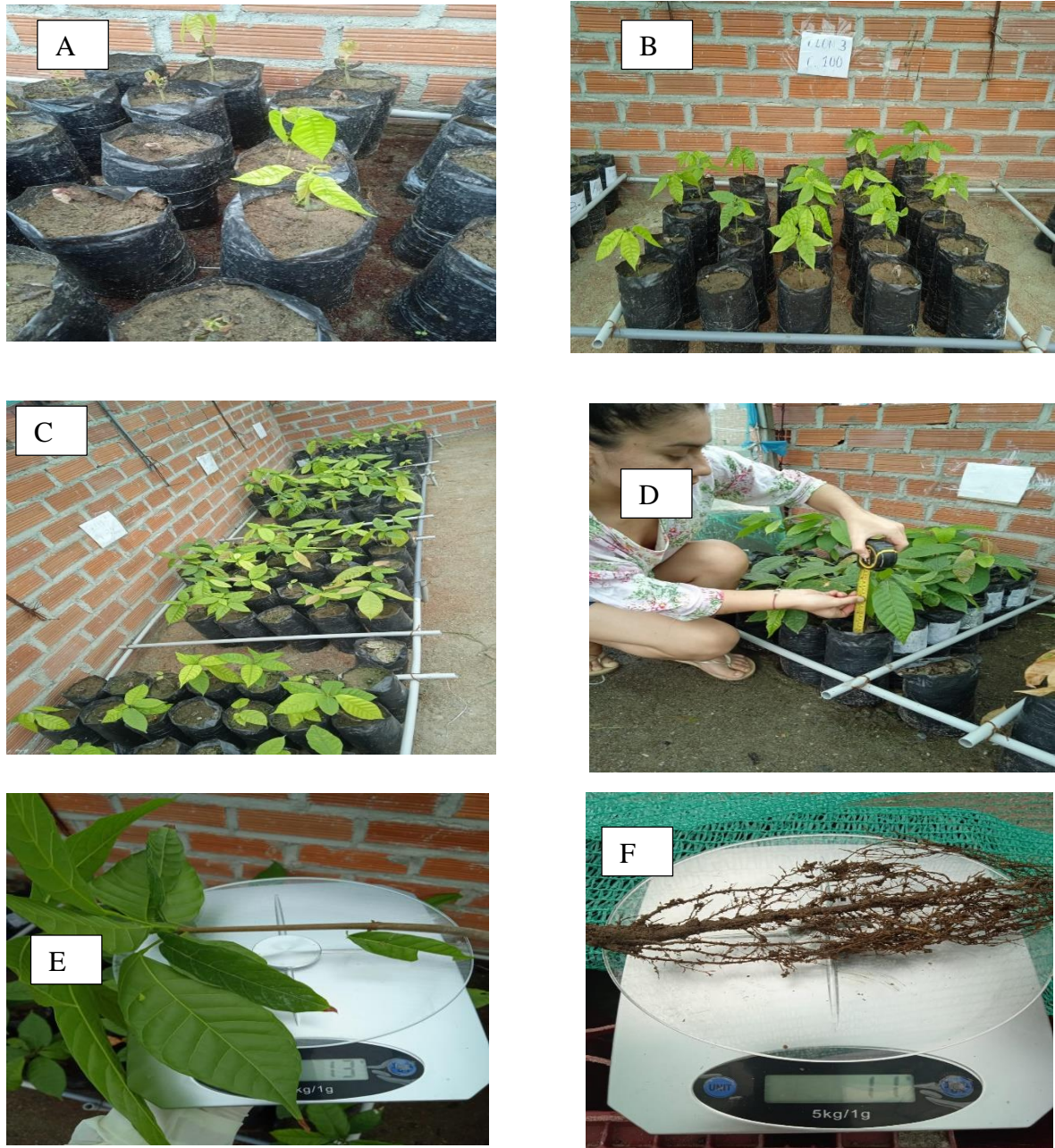


Figura 7. Mediciones de plántulas de cacao para determinar altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular a los (30, 60, 45 y 90 días). A. Medición a los 30 días; B. Medición a los 45 días; C. Medición a los 60 días; D. Medición a los 90 días; E. Peso de masa aérea a los 90 días; F. Peso de masa radicular a los 90 días.

Nury Janet Arévalo

Yuriko Sumiyo

Lizbeth Maribel

Anexo 08

A

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
REPETICION	5	15	3	2.5
Bacillus sp. 20	5	34	6.8	2.7
Bacillus sp. 28	5	31	6.2	11.2
Bacillus sp. 45	5	42	8.4	25.8
Bacillus sp. 50	5	22	4.4	2.3
Bacillus sp. 62	5	44	8.8	14.7
Testigo Absoluto (H2O)	5	19	3.8	2.7
Testigo Quimico (NPK)	5	21	4.2	0.7

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medio de los cuad</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	166	7	23.71428571	3.030579644	0.014632477	2.312741187
Dentro de los grupos	250.4	32	7.825			
Total	416.4	39				

B

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
REPETICION	5	15	3	2.5
Bacillus sp. 20	5	34	6.8	2.7
Bacillus sp. 28	5	31	6.2	11.2
Bacillus sp. 45	5	42	8.4	25.8
Bacillus sp. 50	5	22	4.4	2.3
Bacillus sp. 62	5	44	8.8	14.7
Testigo Absoluto (H2O)	5	19	3.8	2.7
Testigo Quimico (NPK)	5	21	4.2	0.7

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medio de los cuad</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	166	7	23.71428571	3.030579644	0.014632477	2.312741187
Dentro de los grupos	250.4	32	7.825			
Total	416.4	39				





C

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
REPETICION	5	15	3	2.5
Bacillus sp. 20	5	34	6.8	2.7
Bacillus sp. 28	5	31	6.2	11.2
Bacillus sp. 45	5	42	8.4	25.8
Bacillus sp. 50	5	22	4.4	2.3
Bacillus sp. 62	5	44	8.8	14.7
Testigo Absoluto (H2O)	5	19	3.8	2.7
Testigo Quimico (NPK)	5	21	4.2	0.7

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	166	7	23.71428571	3.030579644	0.014632477	2.312741187
Dentro de los grupos	250.4	32	7.825			
Total	416.4	39				

D

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
REPETICION	5	15	3	2.5
Bacillus sp. 20	5	34	6.8	2.7
Bacillus sp. 28	5	31	6.2	11.2
Bacillus sp. 45	5	42	8.4	25.8
Bacillus sp. 50	5	22	4.4	2.3
Bacillus sp. 62	5	44	8.8	14.7
Testigo Absoluto (H2O)	5	19	3.8	2.7
Testigo Quimico (NPK)	5	21	4.2	0.7

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	166	7	23.71428571	3.030579644	0.014632477	2.312741187
Dentro de los grupos	250.4	32	7.825			
Total	416.4	39				

Figura 8. Cuadro de resumen de análisis de varianza (ANOVA) de los cuatro clones de cacao. A. Cuadro resumen (ANOVA) clon 100. B. Cuadro resumen (ANOVA) clon 32. C. Cuadro resumen (ANOVA) clon 51. D Cuadro resumen (ANOVA) clon 70.

Anexo 09

Análisis de mediciones de altura, diámetro, número de hojas, masa aérea y masa radicular de los cuatro clones de cacao (100, 32, 51, 70).

100

ALTURA (CM)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	149.057857	6	24.8429762	3.40474828	0.004	2.167423231
Dentro de los grupos	970.4435	133	7.29656767			
Total	1119.50136	139				

DIAMETRO (mm)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	6.39671429	6	1.06611905	3.32576131	0.004	2.167423231
Dentro de los grupos	42.635	133	0.32056391			
Total	49.0317143	139				

Nº HOJAS

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	196.2	6	32.7	3.37231032	0.004	2.167423231
Dentro de los grupos	1289.65	133	9.69661654			
Total	1485.85	139				

MASA AEREA (gr)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	130.975	7	18.7107143	5.62728249	0.00027	2.312741187
Dentro de los grupos	106.4	32	3.325			
Total	237.375	39				

ALTURA (CM)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	689.791	6	114.9651667	13.674634	0.000	2.167423231
Dentro de los grupos	1118.1555	133	8.407184211			
Total	1807.9465	139				

DIAMETRO (mm)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7.244428571	6	1.207404762	3.08974445	0.007	2.167423231
Dentro de los grupos	51.9735	133	0.390778195			
Total	59.21792857	139				

Nº HOJAS

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	295.9714286	6	49.32857143	3.40205865	0.004	2.167423231
Dentro de los grupos	1928.45	133	14.49962406			
Total	2224.421429	139				

MASA AEREA (gr)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	193.5	7	27.64285714	8.53833425	7.0595E-06	2.312741187
Dentro de los grupos	103.6	32	3.2375			
Total	297.1	39				

MASA RADICULAR (gr)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	307.94375	7	43.99196429	7.18969794	3.4736E-05	2.312741187
Dentro de los grupos	195.8	32	6.11875			
Total	503.74375	39				





ALTURA (CM)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	682.160714	6	113.693452	8.7351039	0.000	2.167423231
Dentro de los grupos	1731.0875	133	13.0156955			
Total	2413.24821	139				

DIAMETRO (mm)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	8.493	6	1.4155	4.61951734	0.000	2.167423231
Dentro de los grupos	40.7535	133	0.30641729			
Total	49.2465	139				

Nº HOJAS

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	136.671429	6	22.7785714	3.03775193	0.008	2.167423231
Dentro de los grupos	997.3	133	7.49849624			
Total	1133.97143	139				

MASA AEREA (gr)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	87.2	7	12.4571429	4.6787391	0.00106142	2.312741187
Dentro de los grupos	85.2	32	2.6625			
Total	172.4	39				

MASA RADICULAR (gr)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	87.5	7	12.5	3.34448161	0.00867127	2.312741187
Dentro de los grupos	119.6	32	3.7375			
Total	207.1	39				





ALTURA (CM)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	805.1827143	6	134.197119	20.7154651	0.000	2.167423231
Dentro de los grupos	861.589	133	6.478112782			
Total	1666.771714	139				

DIAMETRO (mm)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5.752857143	6	0.958809524	2.8638213	0.012	2.167423231
Dentro de los grupos	44.5285	133	0.334800752			
Total	50.28135714	139				

Nº HOJAS

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	294.8857143	6	49.14761905	4.00026519	0.001	2.167423231
Dentro de los grupos	1634.05	133	12.28609023			
Total	1928.935714	139				

MASA AEREA (gr)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	165.575	7	23.65357143	5.59847844	0.00028105	2.312741187
Dentro de los grupos	135.2	32	4.225			
Total	300.775	39				

MASA RADICULAR (gr)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	166	7	23.71428571	3.03057964	0.01463248	2.312741187
Dentro de los grupos	250.4	32	7.825			
Total	416.4	39				



