

EFFECTO DE *Azospirillum brasilense* EN EL CRECIMIENTO DE *Alnus acuminata* Y *Morella pubescens* EN CONDICIONES DE LABORATORIO PARA LA RESTAURACION DE UN BOSQUE ANDINO

Dassy Dayanna Cifuentes Wilches

Laboratorio de Investigación de Biología INBIBO

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C.

2022

EFFECTO DE *Azospirillum brasilense* EN EL CRECIMIENTO DE *Alnus acuminata* Y *Morella pubescens* EN CONDICIONES DE LABORATORIO PARA LA RESTAURACION DE UN BOSQUE ANDINO

Dassy Dayanna Cifuentes Wilches

Director

Sergio Llano Consuegra M Sc.

Codirector

Juan Pablo Hernández Sánchez M Sc.

Laboratorio de Investigación de Biología INBIBO

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C

2022

Nota de Aprobación

Director: Sergio Llano Consuegra MSc.
Codirector: Juan Pablo Hernández MSc.

Jurado. Externo.

Jurado. Externo.

Jurado. Biol.

Bogotá D.C. _____ del mes de _____ del año _____

Agradecimientos

Agradezco en primera a Dios y al universo por haberme acompañado a lo largo de este camino en el desarrollo de mi vida como profesional, por haberme dado la capacidad de afrontar los días buenos y los no tan buenos.

A mi familia por siempre darme su amor y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, sobre todo a mi mamá Deicy Wilches por su lucha y esfuerzo constante para brindarme una mejor calidad de vida y siempre creer en las grandes capacidades, a mis abuelos, quienes a lo largo de mi vida me han cuidado como mis padres y me han inculcado la importancia de ser una buena persona.

A mi director Sergio Llano, por creer y confiar en mis capacidades, quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada etapa de este proyecto. A mi codirector Juan Pablo Hernández, por su amabilidad, apoyo incondicional y soporte total en el laboratorio de la Universidad. Les agradezco por su enorme apoyo y el permitirme desarrollar esta investigación brindándome su conocimiento para que todo saliera bien, espero estar a la altura de ustedes.

A mi mejor amigo Andrés Gómez Camargo por su compañía a lo largo de estos años, por todo el tiempo que me regaló para que todas las etapas de este proyecto se dieran de la mejor forma, por su cariño inigualable y, sobre todo por alentarme a alcanzar mis sueños y querer sacar siempre mi mejor versión, también por su asesoría en la parte estadística del proyecto.

A mi amiga Alejandra Mendoza, por su amistad incondicional, por transmitirme sus conocimientos y su apoyo en mi proceso de trabajo de grado.

A la Universidad El Bosque por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios, a Javier González por permitirme realizar el trabajo en la finca El Cardonal y por último a Don Nelson y Doña Rosalba por su paciencia, acompañamiento y transmisión de conocimientos.

*“La ciencia no conoce país,
porque el conocimiento pertenece a la humanidad,
y es la antorcha que ilumina el mundo”*

- Louis Pasteur

Nota de Salvedad

"La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Tabla de Contenido

1	Introducción	15
2	Marco de referencia	17
3	Pregunta de investigación	21
4	Justificación	21
5	Objetivos.....	22
5.1	Objetivo general	22
5.2	Objetivos específicos.....	22
6	Métodos	23
6.1	Área de estudio.....	23
6.2	Especies vegetales	25
6.2.1	Alnus acuminata.....	26
6.2.2	Morella pubescens.....	27
6.3	Colecta del suelo	27
6.4	Preparación de la semilla.....	28
6.5	Siembra.....	29
6.6	Inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i>	30
6.6.1	Elaboración del medio de cultivo y propagación de la bacteria	30
6.6.2	Concentraciones de <i>Azospirillum brasilense</i>	30
6.6.3	Aplicación de <i>Azospirillum brasilense</i>	31
6.7	Toma de datos	32
6.8	Análisis del suelo.....	32

6.8.1	Determinación de pH	32
6.8.2	Determinación de la humedad higroscópica	33
6.8.3	Determinación de la textura	33
6.9	Análisis estadísticos	34
7	Resultados y análisis	35
7.1	Longitud de la raíz.....	35
7.2	Longitud de la parte aérea	37
7.3	Peso seco de la raíz.....	40
7.4	Peso seco de la parte aérea	43
7.5	Análisis de suelo.....	47
8	Conclusiones.....	50
9	Recomendaciones	51
10	Referencias bibliográficas	52

Lista de figuras

Figura 1 Área de muestreo (Predio El Cardonal, Ubaque, Cundinamarca, Colombia).	23
Figura 2. Climadiagrama estación Llano Largo, zona de estudio.....	24
Figura 3. Terreno de la Finca el Cardonal seleccionado para la restauración.	25
Figura 4 Semillas a. <i>Alnus acuminata</i> b. <i>Morella pubescens</i>	28
Figura 5 Esquema de germinación de Morella pubescens (a) y Alnus acuminata (b) con sus respectivos tratamientos.....	30
Figura 6 Fotografías de la obtención de los tratamientos (a. Cultivo de <i>Azospirillum brasilense</i> ; b. centrifugado con las diluciones correspondientes para cada tratamiento; c. Lectura de la densidad celular).	31
Figura 7. Fotografías de las plántulas a los 15 días de germinación.....	31
Figura 8 Efecto de los tratamientos en a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i> en el transcurso de los días.....	36
Figura 9 Prueba de Fisher longitud de la raíz, diferencia entre días bajo el efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	37
Figura 10 Efecto de los tratamientos en la longitud de la parte aérea a través del tiempo en a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	39
Figura 11 Prueba de Fisher de longitud de la parte aérea entre los tratamientos bajo el efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> y el control a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	40
<i>Figura 12</i> Efecto de los tratamientos en el peso seco de raíz a través del tiempo en a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	42
Figura 13 Prueba de Fisher peso seco de la raíz diferencia entre tratamientos, bajo el efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> y el control en a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	43
Figura 14 Efecto de los tratamientos en el peso seco de raíz a través del tiempo a. <i>Alnus acuminata</i> y b. <i>Morella pubescens</i>	44

Figura 15 Prueba de Fisher peso seco de la parte aérea diferencia entre tratamientos, bajo el efecto de *Azospirillum brasilense* y el control en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.45

Figura 16 Nutrientes disponibles según la acides (pH) en el suelo.48

Lista de Tablas

Tabla 1 Concentraciones utilizadas en cada tratamiento de <i>Azospirillum brasilense</i>	29
Tabla 2 Variables analizadas durante el estudio.	35
Tabla 3 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos en <i>Alnus acuminata</i>	36
Tabla 4 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos en <i>Morella pubescens</i>	36
Tabla 5 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos, para <i>Alnus acuminata</i>	38
Tabla 6 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos, para <i>Morella pubescens</i>	38
Tabla 7 Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en <i>Alnus acuminata</i>	41
Tabla 8 Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en <i>Morella pubescens</i>	41
Tabla 9 Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea en <i>Alnus acuminata</i>	43
Tabla 10 Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea en <i>Morella pubescens</i>	44

Lista de Anexos

Anexo 1	Anova multifactorial de la longitud de raíz en <i>Alnus acuminata</i>	58
Anexo 2	Anova multifactorial de la longitud de parte aerea en <i>Alnus acuminata</i>	58
Anexo 3	Anova multifactorial de el peso seco de la raíz en <i>Alnus acuminata</i>	58
Anexo 4	Anova multifactorial de el peso seco de la parte aerea en <i>Alnus acuminata</i>	58
Anexo 5	Anova multifactorial de la longitud de la raíz en <i>Morella pubescens</i>	58
Anexo 6	Anova multifactorial de la longitud de la parte aerea en <i>Morella pubescens</i>	59
Anexo 7	Anova multifactorial del peso seco de la raíz en <i>Morella pubescens</i>	59
Anexo 8	Anova multifactorial del peso seco de la parte aerea en <i>Morella pubescens</i>	59

Resumen

Alnus acuminata y *Morella pubescens* son especies catalogadas como pioneras en los procesos de sucesión para la restauración ecológica del suelo. Durante el tiempo de estudio se evaluaron los efectos de 7 tratamientos realizados a base de diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense*, los cuales se aplicaron a las plántulas germinadas de estas especies de plantas forestales, con el objetivo de identificar la concentración más eficiente para su crecimiento y desarrollo. Se evidenció que todos los tratamientos aplicados estimulan la aceleración del crecimiento de la longitud de la raíz, la parte aérea, el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea para las dos especies de plantas, aunque el mejor tratamiento fue el que contenía mayor concentración del inóculo, lo que indica que a mayor concentración de la bacteria mayor es el efecto en desarrollo de las plantas. Este estudio aporta al conocimiento para la implementación de nuevas técnicas para manejo y restauración de suelos, lo cual es de vital importancia para la conservación de los bosques andinos en Colombia.

Palabras clave: *Alnus acuminata*, *Morella pubescens*, restauración ecológica, crecimiento y desarrollo.

Abstract

Alnus acuminata and *Morella pubescens* are species cataloged as pioneers in the succession processes for the ecological restoration of the soil. During the time the effects of 7 treatments carried out based on different concentrations of *Azospirillum brasilense* were evaluated, which were applied to the germinated seedlings of these species of forest plantations; with the aim of identifying the most efficient concentration for its growth and development. It was evidenced that all the applied treatments stimulate the acceleration of the growth of the length of the root, the aerial part, the dry weight of the root and the dry weight of the aerial part for the two species of plants, taking into account the best treatment. was the one that contained the highest concentration of the inoculum, which indicates that the higher the concentration of the bacteria, the greater the effect on plant development. This study favors the implementation of new techniques for soil management and restoration, which is of vital importance for the conservation of Andean forests in Colombia.

Keywords: *Alnus acuminata*, *Morella pubescens*, ecological restoration, growth and development.

1 Introducción

La restauración del suelo es un proceso que se puede definir como una base práctica que restablece los procesos ecológicos para mantener la composición, estructura y función de un ecosistema en diferentes unidades de paisaje y a distintas escalas. Un ecosistema se ha recuperado y restaurado cuando contiene suficientes recursos bióticos y abióticos para continuar su desarrollo sin ayuda adicional (Ramírez, 2020).

Una de las técnicas más comunes e iniciales en los procesos de restauración es la siembra de especies arbóreas nativas eficaces en el proceso de sucesión vegetal. La introducción de especies vegetales pioneras en restauración influye en la recuperación de algunas características óptimas del suelo (Garza *et al.*, 2022). El potencial en la mayoría de las especies nativas en procesos de restauración y reforestación es un conocimiento que hoy en día es muy escaso o inexistente; adicional a esto, sumado a la dispersa información disponible sobre estas en Colombia es muy común pasar por alto el uso de ellas en procesos en los que pueden desempeñar una función importante (Mora y Vargas, 2007).

Las pioneras arbóreas son un recurso esencial en las primeras etapas de procesos de restauración de bosques (Florentine y Westbrooke, 2004), esto se debe a que presentan diferentes características positivas en los procesos de regeneración, ya que poseen habilidades de colonización en suelos recién denudados y son buenas competidoras dentro de la vegetación que se desarrolla en tales condiciones (Gómez y Vázquez, 1983).

El género *Azospirillum* ha tomado gran relevancia desde tiempo atrás, pues su inoculación en las plantas conlleva a un aumento significativo del crecimiento en raíces, resistencia a agentes patógenos, aumento de elementos necesarios para la vida vegetal como el nitrógeno, inhibe la

proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal (Ucea *et al.*, 2020).

El aliso (*Alnus acuminata*) es una especie heliófila de estado sucesional temprano, puede crecer en lugares con alto nivel freático o mal drenados y casi siempre conforma bosques altos abiertos o cordones a lo largo de quebradas (Salamanca y Camargo, 2000; Villarpando *et al.*, 2011). Adicional a esto, es usada en sistemas silvopastoriles para el control de la degradación de los suelos por agricultura y ganadería semiextensiva de laderas; incluso, puede actuar como estabilizador de márgenes de ríos y quebradas (Salamanca y Camargo, 2000). Debido a que es una especie pionera, juega un rol valioso como rodal protector en laderas erosionadas y en cuencas hidrográficas de tierras altas. Además, a través de una relación simbiótica con un actinomiceto del género *Frankia* quien tiene la capacidad de fijar nitrógeno con las raíces (Añazco, 1996; Vizcaíno, 2017).

Por otra parte, el laurel de cera (*Morella pubescens*) es una especie que se encuentra desde los 1.300 hasta los 3.300 msnm, es importante ya que tiene capacidad de fijación de nitrógeno, por lo que se considera ideal para el resguardo de cuencas hidrográficas y el suelo y es reconocida por su capacidad de adaptación en suelos escasos de nutrientes (Astudillo, 2021). Expuesto lo anterior, el presente estudio busca evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* en un área del Cardonal, Ubaque, Cundinamarca, Colombia.

2 Marco de referencia

Dentro de la aparición de nuevas tecnologías para optimizar la implantación de los cultivos se encuentra el uso de los productos biológicos; es decir incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos. Dentro de este grupo se encuentran los microorganismos promotores del crecimiento vegetal conocidos hoy como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism) por sus siglas en inglés (Puente *et al.*, 2010). Estos se definen como microorganismos habitantes de la rizósfera que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Los mecanismos por los cuales los PGPM ejercen efectos positivos sobre las plantas son numerosos. Entre ellos se pueden mencionar la fijación de N₂ (ej. *Azospirillum*), la solubilización de fósforo (P) (ej. *Pseudomonas sp.*), la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fumárico y cítrico) y fosfatasas facilitando la solubilidad del fósforo y otros nutrientes. Además, la promoción del crecimiento de las plantas puede asociarse a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos patógenos (Puente *et al.*, 2010).

Azospirillum es el género de PGPM más ampliamente estudiado. Es reconocido por su capacidad de promover el crecimiento vegetal en plantas de interés agrícola, especialmente en cereales. Esta bacteria fue aislada de la rizósfera y de la superficie de las raíces de una amplia variedad de plantas cultivadas y silvestres del mundo. La amplia distribución geográfica entre hospederos indica la versatilidad para adaptarse a condiciones edáficas diversas (Okon, 1994).

El aliso (*Alnus acuminata*) es una especie ampliamente distribuida en América, principalmente en zonas de media y alta montaña, desde México hasta el norte de Argentina. Tres subespecies están ampliamente distribuidas en Latinoamérica, Centroamérica, desde la Sierra Madre en el sur de México hasta el sureste de Panamá (Correa, 2021). En Colombia, se encuentra en las Cordilleras Central y Oriental, conformando los ecosistemas andinos conocidos como “Bosques de niebla”, que

hacen parte de las zonas secas, húmedas y muy húmedas de los bosques Premontano, Montano y Montano bajo, según el Sistema de Zonas de Vida de Holdridge. No es exigente en cuanto a calidad de suelos siempre y cuando haya buena humedad y con buena capacidad de drenaje, crece en un amplio rango de textura desde la arcillosa hasta arenosa e inclusive en suelos pedregosos y superficiales (Correa, 2021). La capacidad de aprovechar el nitrógeno fijado por microorganismos le da la facultad de colonizar suelos pobres y fertilizar los suelos donde crece, acumulando una extraordinaria cantidad de materia orgánica en un tiempo relativamente corto. Se comporta como una especie marcadamente pionera, especialmente adecuada como rodal protector inicial de las laderas erosionadas y en las cuencas hidrográficas de las tierras altas (Morales, 2018).

Es interesante resaltar la asociación entre el aliso y bacterias PGPM de género *Frankia* y hongos micorrizógenos, estableciendo una relación múltiple con efecto aditivo en cuanto a la fisiología del árbol. Molina et al. (2008) realizaron un estudio en el departamento de Antioquia, en el cual se aislaron dos cepas de *Frankia* spp (UdeA905), y hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) de género *Glomus* (UdeA1907) de un área determinada sembrada con aliso, preparando inóculos para evaluarlas en un sistema silvopastoril con esta especie de árbol en asociación con una mezcla de gramíneas de géneros: *Pennisetum clandestinum*, *Brachiaria decumbens*, y *Melinis minutiflora*, en cuanto a la interacción de estas cepas con los elementos Boro, Cobalto y Molibdeno. Las variables evaluadas fueron diámetro del árbol, altura, concentración de nitrógeno y fósforo foliar y determinación de número de esporas de HMA. Algunas conclusiones del estudio fueron que la respuesta a los tratamientos fue significativa después del cuarto período, lo que sugiere hacer investigación a largo plazo con *Alnus acuminata*; así mismo se evidenció una correlación positiva entre el Co y la tasa de crecimiento del aliso (Molina et al., 2008).

En otro estudio realizado por Medina et al (2008) se identificó que la inoculación dual de bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos endomicorrizógenos, permitió aumentar significativamente las tasas de crecimiento del aliso en 24% y 50% para las variables altura y diámetro respectivamente; igualmente para la acacia, con un incremento de 92% y 71% para las mismas variables. Este estudio recomienda que el Aliso sea inoculado con hongos endomicorrizógenos y con fuentes de fósforo de lenta disponibilidad que garanticen un suministro adecuado del elemento a la planta, buscando la sostenibilidad de la especie y su aporte al sistema a largo plazo (Medina et al., 2008).

Por otro lado, en el laurel de cera (*Morella pubescens*) se han realizado múltiples investigaciones, las cuales recomiendan su siembra debido a su potencial económico y a sus servicios ecosistémicos para la conservación de suelos, control de la erosión y procesos de restauración para bosques secundarios y riberas hídricas, puesto que posee raíces profundas y abundantes las cuales, además, albergan en sus nódulos el actinomiceto *Frankia*, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno (N) (Añazco, 1996; Vizcaíno, 2017). En el trópico andino, representa reportes significativos para el desarrollo de la agroforestería, el manejo de cuencas hidrográficas y perspectivas microempresariales de productos no maderables con enfoque de sustentabilidad. Actualmente es de importancia incluir esta especie en los sistemas agroforestales especies multipropósito con el fin de generar diversos ingresos a los productores que les permitan acceder a mercados verdes con productos competitivos como aquellos a base de cera de laurel (Seraquive, 2021).

Seraquive (2021) evaluó tres sustratos para la producción de laurel de cera determinando el mejor sustrato según sus propiedades físicas y químicas para la siembra de semillas de esta especie. Caracterizó los parámetros fisicoquímicos de los sustratos evidenciándose que la turba tiene gran concentración de materia orgánica (M.O.) y de fósforo (P), por su parte la tierra negra presentó mayor concentración de potasio (K), seguido por la turba y tierra de montaña. En este estudio se concluye a partir de los resultados que la turba es la mejor opción para la producción de *Morella*

pubescens debido a que presenta mayor crecimiento tanto en altura como en cantidad de hojas durante el monitoreo y de recolección de datos (Seraquive, 2021).

3 Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* en condiciones de laboratorio para la restauración de un bosque andino?

4 Justificación

La restauración tiene grandes beneficios para revertir procesos negativos a nivel del paisaje asociados con la pérdida de cobertura de un ecosistema, sirve para incrementar la cobertura de este, mitigar los efectos de borde, restablecer la conectividad y enriquecimiento de áreas degradadas, contribuyendo de esta forma al aumento de las reservas de carbono acumulado en la biomasa de los bosques (Bennett, 2004).

En la finca El Cardonal se evidencia la influencia de ganadería, que con el paso del tiempo ha convertido el área en una región con susceptibilidad a la erosión y por ende pérdida de fertilidad del suelo, con la presencia de formaciones vegetales naturales secundarias donde predominan pastos, cultivos e infraestructuras de servicio (vías, viviendas, otros). Es de resaltar el interés por parte del propietario, para iniciar un proceso de restauración ambiental en sus terrenos, en busca de reestablecer los servicios ecosistémicos del mismo.

El conocimiento de los diferentes efectos de aceleramiento en el crecimiento de las plantas es fundamental en este tipo de estudios ya que se puede comprender los procesos de regeneración de las comunidades vegetales y tener éxito en proyectos de restauración forestal y acciones de conservación. No obstante, en Colombia es poco el conocimiento que se tiene sobre el efecto que tiene la bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en pioneras arbóreas como lo son *Alnus acuminata* y *Morella pubescens*.

El presente estudio busca aportar información sobre los métodos y procedimientos desde la germinación hasta la siembra de estas dos especies sometidas a diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense* bajo condiciones controladas de laboratorio. Este tipo de investigaciones posibilitan el aumento de conocimiento y comprensión de la biología y ecología de las plantas de nuestro país.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* en condiciones de laboratorio.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer cuál es el tratamiento apropiado para el crecimiento y desarrollo de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens*.
- Analizar las variables de crecimiento de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* en diferentes concentraciones de *Azospirillum brasilense*.

6 Métodos

6.1 Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, en busca de acelerar el proceso de sucesión vegetal para la restauración ecológica en el predio ‘El Cardonal’, ubicado en la vereda Belén, municipio de Ubaque, departamento de Cundinamarca (Figura 1). El municipio de Ubaque está localizado hacia el suroriente de Bogotá D.C y del departamento de Cundinamarca. Ocupa una extensión aproximada de 108 Km² y limita por el norte con Choachí, por el este con Fómeque, por el sur con Cáqueza y Chipaque y por el oeste con el Distrito Capital (Rozo, 2020).

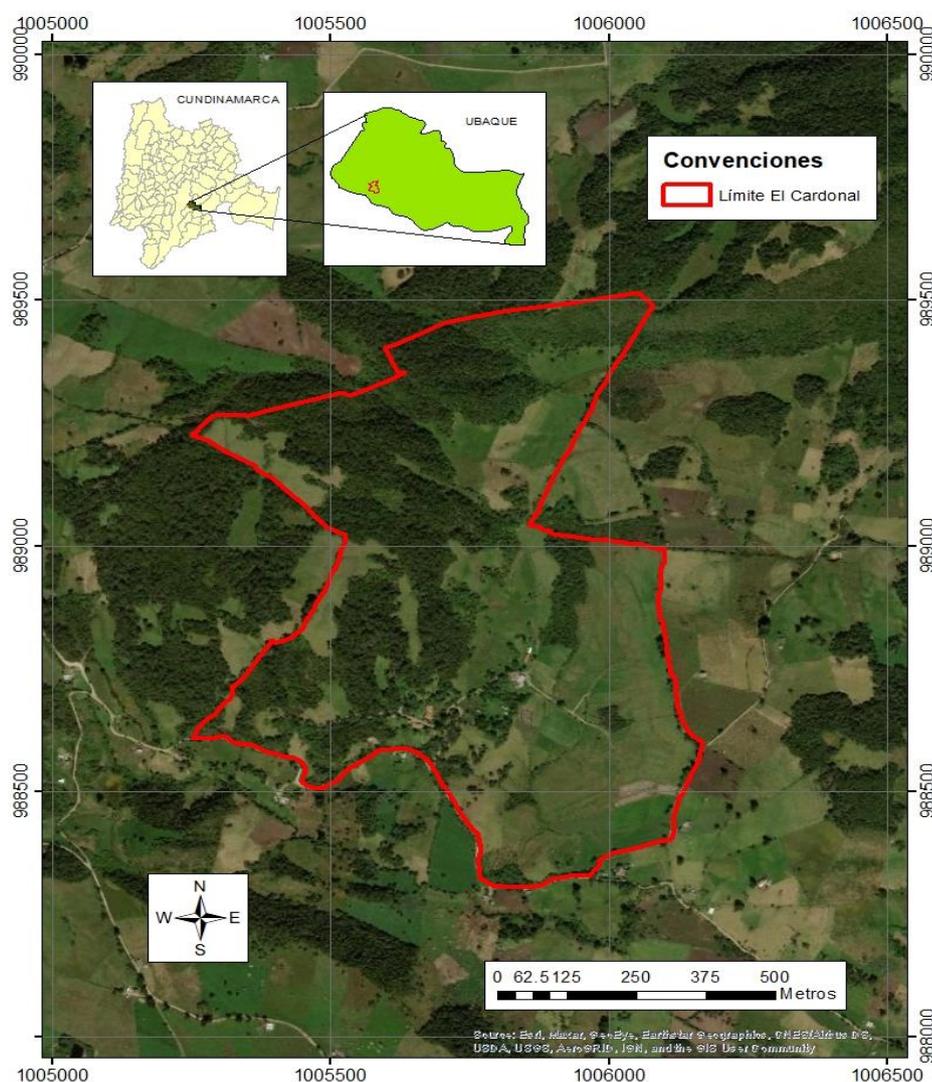


Figura 1 Área de muestreo (Predio El Cardonal, Ubaque, Cundinamarca, Colombia).

La topografía del municipio de Ubaque, como casi en toda la provincia de Oriente, es montañosa. La circundan los páramos del Parque Nacional Natural Chingaza, del complejo de páramos Cruz Verde – Sumapaz y el eje vial que conduce de Bogotá a Villavicencio. Ubaque posee gran riqueza en biodiversidad, gracias a la variedad de climas (Rozo, 2020; Morales *et al.*, 2007).

El área de estudio se ubica en cercanías páramo de Cruz Verde. Esta zona se encuentra en la parte alta de los municipios de Ubaque y Chipaque (Cundinamarca) a una altura de 2958 m.s.n.m., con una precipitación de 1778 mm/años distribuidos en un régimen monomodal, donde las épocas de mayor pluviosidad son los meses de mayo a julio y octubre a noviembre y la época seca son los meses de diciembre a marzo (Figura 2). La temperatura oscila entre 10° y 25° C y la humedad relativa se encuentra entre 84% y 94% (Morales *et al.*, 2007).

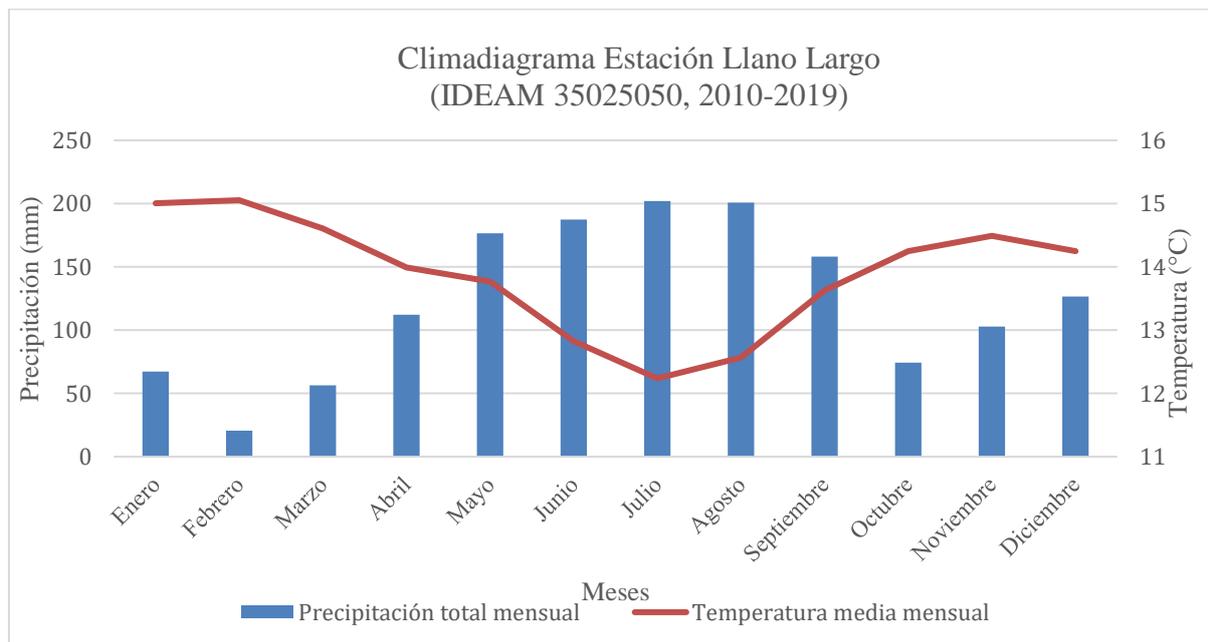


Figura 2. Climadiagrama estación Llano Largo, zona de estudio.

Se seleccionó un terreno de 1,295 m² en el sector sur del predio El Cardonal para iniciar el proceso de restauración en la finca, del cual se tomaron las muestras correspondientes para realizar el análisis

del suelo; también se tomó el suelo para realizar el proceso de sembrado de las plantas en el laboratorio (Figura 3).



Figura 3. Terreno de la Finca el Cardonal seleccionado para la restauración. Izquierda: panorámica; derecha: vista cenital.

6.2 Especies vegetales

Se realizó una búsqueda bibliográfica en donde se encontraron distintas especies vegetales pioneras en la sucesión vegetal presentes en Ubaque; posteriormente se efectuó una visita para corroborar cuáles de estas estaban presentes en un bosque andino ubicado en la finca El Cardonal para así seleccionar dos especies pioneras arbóreas para iniciar con la investigación, teniendo en cuenta criterios de selección como que posean importancia ecológica por ser óptimos para la protección de suelo y cuencas hidrográficas (Muñoz *et al.*, 1999). Se reconoce la importancia de estas plantas ya que son un recurso esencial en las primeras etapas de procesos de restauración debido a que presentan características de regeneración de los bosques; además, son evaluadas como estrategia para activar los procesos de sucesión dentro de plantaciones forestales, teniendo efectos positivos en el crecimiento (Correa *et al.*, 2012).

6.2.1 *Alnus acuminata*

El aliso (*Alnus acuminata*) es una especie arbórea que pertenece a la familia de las betuláceas, llega a medir hasta 20 m de altura, sus frutos son unas nueces aladas, hojas resinosas y en forma ovada. Es nativa en Colombia, se distribuye altitudinalmente desde los 1400 - 3200 msnm, creciendo en suelos profundos o medianamente profundos con subsuelo rocoso, aunque también puede desarrollarse en laderas con menor humedad y expuestas a vientos secos, pero entonces con menor crecimiento (Ortega y Liseth, 2021). Esta especie puede soportar temperaturas por debajo de 0 °C por breve tiempo, es capaz de soportar hasta temperaturas de bajo cero de -10 °C y nevadas esporádicas. Se observa en floración en septiembre a octubre y con frutos maduros en enero y febrero. Se reproduce a través de semillas, hijuelos de raíz y estacas (Ortega y Liseth, 2021). El árbol o arbusto tiene una forma perennifolio o caducifolio, de 10 a 25 m, en algunas ocasiones alcanza los 30 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 35 a 40 cm o hasta 1 m. Algunos individuos llegan a superar los 42 m de altura en plantaciones, con copa y hojas estrechas o angostas y piramidal (Ortega y Liseth, 2021). Presenta hojas con la lámina ovada, de 6 a 15 cm de largo y 3 a 8 cm de ancho, margen agudamente biserrado, el haz y el envés glabros en la madurez. Su tronco es cilíndrico a ligeramente ovalado, generalmente con varios troncos; en campo abierto desarrolla ramas gruesas desde la base mientras que en bosque denso alcanza una mayor proporción de tronco libre de ramas y nudos por una poda natural. Se caracteriza por una corteza lisa o ligeramente rugosa, escamosa en individuos viejos, con frecuencia marcada con arrugas transversales o constricciones circundantes; cuenta con inflorescencias masculinas en amentos de 5 a 10 cm de largo, generalmente en agrupaciones de 3; por otra parte, posee inflorescencias femeninas 3 a 4 en racimos, de 3 a 8 mm de largo en antesis; conos de 11 a 28 mm de largo y de 8 a 12 mm de diámetro; tiene frutos elípticos a obovados, papiráceo a coriáceo, con el margen alado y estilo persistente, con sistema radical poco profundo, amplio y extendido (Ortega y Liseth, 2021).

6.2.2 *Morella pubescens*

El laurel de cera o *Morella pubescens* es un árbol originario del bosque alto andino. Se destaca por sus flores y hojas en forma de parasol que ayudan a proteger y recuperar los suelos de la erosión generando sombra a su alrededor, así como protegiendo el suelo de las altas temperaturas. Es una especie promisoriosa de múltiples bondades ecológicas, industriales y medicinales; por su amplio rango de adaptación entre los 1600 y 3200 msnm, se encuentra distribuido en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y algunos países de Centroamérica (Cortez, 2021).

La especie *Morella pubescens* pertenece a la familia Myricaceae. Es un arbusto que puede llegar a medir hasta 5 m de altura, sus hojas son olorosas debido a que contiene aceites esenciales. Se desarrolla en climas templados o fríos, es cultivado y utilizado para proyectos de restauración en nuestro continente, en países como Bolivia, Ecuador, Perú y Colombia (Quijano y Pino, 2007). Las hojas son simples, alternas y helicoidales con borde aserrado, fragantes al ejercerles presión. Las flores masculinas son de color amarillo, café, y femeninas de color rojo. Sus frutos miden 5 mm de diámetro son de color café y de forma redonda. Esta planta tiene uso ecológico ya que también fija nitrógeno en el suelo (Cortez, 2021).

Por lo general los árboles empiezan a producir frutos después de los tres años de su siembra. La época principal de producción de frutos está comprendida entre julio y septiembre; pero en zonas más bajas (1600 msnm) puede producirse en mayo, mientras que en zonas más altas (3900 msnm) en octubre (Muñoz y Cabrera, 1999). Las semillas se encuentran en el interior del fruto, la superficie es rugosa de color marrón, posee una consistencia dura y de tamaño aproximado de 3.1 x 2.2 mm, estas son dispersadas por las aves (Lara, 2021).

6.3 Colecta del suelo

Se colectó suelo en el terreno escogido del predio El Cardonal para la siembra de las semillas de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* en condiciones de laboratorio. Inicialmente se realizó el

reconocimiento del área de muestreo para escoger el mejor lugar en conjunto con el propietario del predio. Para la toma de la muestra de suelo se limpió la superficie del terreno y con ayuda de la pala se tomó una muestra homogénea de 25 kg aproximadamente. Esta fue tomada entre 20 a 30 cm de profundidad y fue almacenada en bolsas ziploc para su posterior transporte al laboratorio INBIBO de la Universidad El Bosque y su correspondiente análisis del suelo (Hernández, 2020).

6.4 Preparación de la semilla

Debido a que los organismos de las dos especies seleccionadas en el lugar de estudio no se encontraban en época reproductiva, no se pudieron obtener las semillas en el tiempo adecuado para iniciar la investigación; por esta razón se realizó la compra de las semillas en el Vivero El Semillero ubicado en la ciudad de Medellín (Antioquia), el cual fue el único vivero distribuidor de semillas de especies de árboles nativos pioneros para la restauración que poseía estas especies; las semillas fueron limpiadas y almacenadas en un ambiente seco para evitar la proliferación de hongos. Para las semillas de laurel (*Morella pubescens*) se llevó a cabo una preparación inicial con inmersión en agua durante 24 horas para realizar la selección según flotabilidad y seguidamente se lijaron una por una para retirar la cubierta (Rincón Rosales *et al.*, 2003). En el caso del aliso (*Alnus acuminata*) se realizó la siembra directa ya que estas se encontraban sin cubierta, es decir, con el embrión expuesto listo para su germinación. (**Figura 4**).

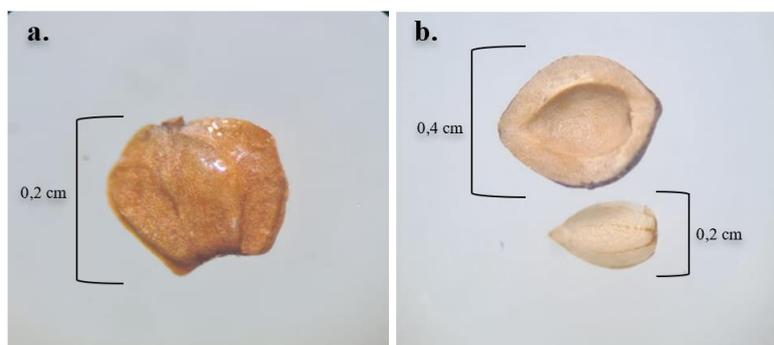


Figura 4 Semillas *a.* *Alnus acuminata* *b.* *Morella pubescens*

6.5 Siembra

Se realizó la siembra de 100 semillas de *Alnus acuminata* y 100 semillas *Morella pubescens*. Para esto se utilizaron dos bandejas germinadoras de semillas de 128 celdas, en las cuales se utilizaron 100 celdas por especie únicamente; en cada una de estas se dispuso 1 semilla por celda con 30 gramos de suelo colectado de la finca El Cardonal y las bandejas fueron humedecidas a diario a partir de su siembra. Pasados 15 días después de la siembra, a las semillas germinadas de cada especie se les aplicaron los tratamientos de *Azospirillum brasilense* en diferentes concentraciones (Tabla 1).

Tabla 1 Concentraciones utilizadas en cada tratamiento de *Azospirillum brasilense*

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
1 x 10 ⁷ UFC/ml	1 x 10 ⁸ UFC/ml	1 x 10 ⁹ UFC/ml

En el caso de *Alnus acuminata*, pasados los 15 días desde la germinación, de 100 semillas sembradas, germinaron 76 las cuales fueron distribuidas en los 3 tratamientos de *A. brasilense* y el control, se tomaron a 60 individuos para la medición de talla de la raíz y talla de la parte aérea. Los 16 individuos restantes fueron utilizados al azar por tratamiento, para medición de peso seco de la raíz y la zona aérea de la planta.

Por otro lado, en el caso de *Morella pubescens*, de igual forma pasados los 15 días, de 100 semillas sembradas germinaron 65 las cuales fueron distribuidas en los 3 tratamientos y el control. Se utilizaron 40 para medir la talla de raíz y la talla de la parte aérea. Es decir, 10 individuos para cada tratamiento. Los 15 individuos restantes fueron utilizados al azar por tratamiento para la medición de peso seco de la raíz y de la zona aérea de la planta (Figura 5).

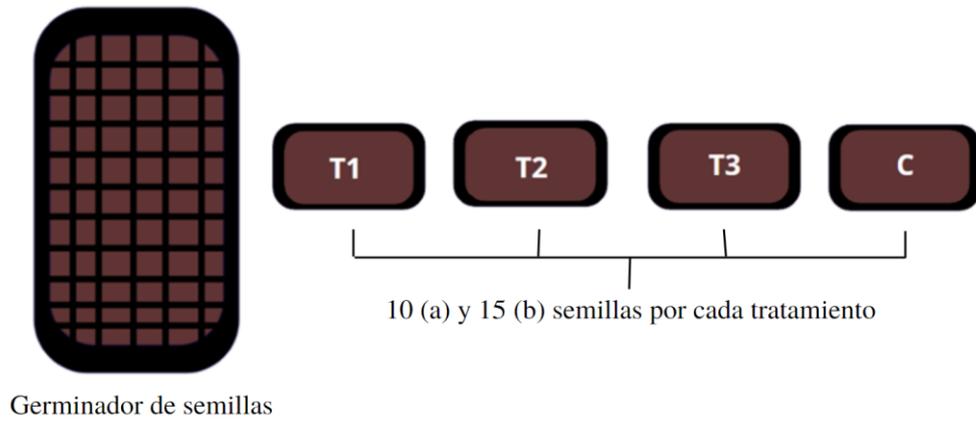


Figura 5 Esquema de germinación de *Morella pubescens* (a) y *Alnus acuminata* (b) con sus respectivos tratamientos.

6.6 Inoculación con *Azospirillum brasilense*

6.6.1 Elaboración del medio de cultivo y propagación de la bacteria

Se preparó 1 litro de agar nutritivo en medio líquido y se adicionaron 100 ml del medio a 2 matraces para realizar la siembra de *A. brasilense* Cd DMS 1843 dejándola en la incubadora por 24 horas. Este procedimiento se repitió pasadas 24 horas con la muestra ya obtenida, para un total de 4 matraces de 100 ml para la propagación de la bacteria (Hernández, 2020).

6.6.2 Concentraciones de *Azospirillum brasilense*

Se transfirieron 10 ml del inóculo a un tubo de centrifuga el cual se llevó a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, luego se desechó el sobrenadante. Posteriormente se realizó un lavado adicionando 10 ml de solución salina al 85% el cual se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, igualmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular; este lavado se realizó dos veces. Antes de resuspender el botón celular por última vez se adicionó 5 ml de solución salina al 85% a la centrifuga, luego se resuspendió y se midió la densidad celular (óptica) a 540 nm con ayuda de un espectrofotómetro (Hernández, 2020). Esta lectura fue cercana a 1 en absorbancia lo cual indica que la muestra del inóculo tiene aproximadamente 1×10^9 UFC/m, el cual sería el

tratamiento 1; para obtener el tratamiento 2 se transfirió 1 ml de la muestra ajustada a un tubo de ensayo con 9 ml de la solución salina para diluirlo a 1×10^8 UFC/mL; de la misma manera se obtuvo el tratamiento 3 con una dilución a 1×10^7 UFC/ml (Hernández, 2020) Figura 6.



Figura 6 Fotografías de la obtención de los tratamientos (**a.** Cultivo de *Azospirillum brasilense*; **b.** centrifugado con las diluciones correspondientes para cada tratamiento; **c.** Lectura de la densidad celular).

6.6.3 Aplicación de *Azospirillum brasilense*

Se aplicaron los respectivos tratamientos a las plántulas germinadas usando las concentraciones realizadas, se aplicó directamente a los 30gr de suelo por semilla germinada 5ml de cada tratamiento con la concertación de *Azospirillum brasilense* correspondiente; para el control se aplicó 5ml de agua para mitigar alteraciones en el experimento (Figura 7).



Figura 7. Fotografías de las plántulas a los 15 días de germinación.

6.7 Toma de datos

Las mediciones del control y de los tres tratamientos aplicados a *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* se tomaron semanalmente a partir de la aplicación de los inóculos de *Azospirillum brasilense*, a los 15, 22, 29 y 36 días después de la germinación de las semillas, donde se tomaron en cuenta las variables de tamaño de la parte aérea, tamaño de la raíz, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz con el fin de evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens*.

6.8 Análisis del suelo

El análisis de suelo es una herramienta útil la cual permite saber acerca del grado de suficiencia y deficiencia de los nutrientes encontrados en el suelo, en el presente estudio se realizó la determinación de pH, determinación de la humedad higroscópica, determinación de la densidad aparente y la determinación de la textura.

6.8.1 Determinación de pH

Se estandarizó el medidor de pH (sobremesa PCE-BPH 10), para lo cual se ajustó con tres soluciones reguladoras que son de pH 4, pH 7 y pH 8; para ello el compensador de temperatura se debe ajustar a la temperatura del patrón.

Relación suelo: agua 1:1

Se pesaron 10 g, de suelo y se agregaron 10 ml de agua destilada. Se agitó la suspensión con una varilla de vidrio a intervalos regulares durante 1 hora, agitando enérgicamente la suspensión y midiendo el pH durante el primer minuto después de haber introducido el electrodo.

Relación suelo: agua 1:2.5

Se pesaron 10 g, de suelo y se agregaron 25 ml de agua. Se agitó la suspensión con una varilla de vidrio a intervalos regulares durante 30 minutos. Se agitó enérgicamente la suspensión y posteriormente se midió el pH durante el primer minuto después de haber introducido el electrodo.

Relación suelo: agua 1:5

Pesaron 10 g, de suelo y agregaron 50 ml de agua destilada. Se agitó la suspensión con una varilla de vidrio a intervalos regulares durante 30 minutos. Se agitó enérgicamente la suspensión y se midió el pH durante el primer minuto después de haber introducido el electrodo.

Relación suelo: agua 1:10

Pesaron 10 g, de suelo y agregaron 100 ml de agua destilada. Se agitó la suspensión con una varilla de vidrio a intervalos regulares durante 30 minutos. Se agitó enérgicamente la suspensión y se midió el pH durante el primer minuto después de haber introducido el electrodo.

6.8.2 Determinación de la humedad higroscópica

El método tradicional utilizado para la determinación de la humedad del suelo en el laboratorio se realiza por medio de secado en horno, donde la humedad del suelo es la relación expresada en porcentaje entre el peso de agua existente en una determinada masa de suelo y el peso de las partículas sólidas (Hernández 2020).

Para iniciar se pesó el recipiente vacío (P_0), y se colocó 25 g la muestra de suelo en el recipiente el cual fue pesado con la muestra de suelo (P_1), seguido de esto se colocó el recipiente con la muestra de suelo dentro del horno durante 24 horas, a una temperatura de 110°C . Al transcurrir las 24 horas se determinó el peso del recipiente con la muestra de suelo seca (P_2). Para finalizar se determinó el porcentaje de humedad del suelo con la siguiente fórmula (Hernández, 2020):

$$H.H.(%) = \frac{P_1 - P_2}{P_2 - P_0} \times 100$$

6.8.3 Determinación de la textura

La textura indica el contenido relativo de partículas de diferente tamaño como la arena, el limo, y la arcilla del suelo. Con la textura se puede determinar la cantidad de agua que retiene y la velocidad con que el agua atraviesa el suelo. Para la determinación de porcentaje de arena, limo y arcilla se

colocaron 25 g de suelo en un vaso de precipitado el cual se llenó con agua 100ml de agua , se agitó bien y se dejó reposar durante una hora, transcurrido el tiempo el agua se volvió transparente y se observó que las partículas mayores se habían sedimentado, para continuar con el cálculo de la proporción estimada, se observó el porcentaje de la arena, el limo, y la arcilla indicado en el vaso de precipitado (Hernández, 2020).

6.9 Análisis estadísticos

Se realizó una medición del tamaño de la parte aérea, tamaño de la raíz con 60 individuos *para Alnus acuminata* y 40 para *Morella pubescens*, para el peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz en las dos especies seleccionadas se analizaron 8 individuos, es decir, 2 por cada intervalo de tiempo. Para cada ensayo se realizó un análisis de varianza, probando diferencias significativas entre los tratamientos, esto se realizó en el software estadístico Statgraphics Centurión. Adicionalmente, se realizó un análisis de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, el cual muestra las diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95,0% y un nivel de riesgo de 5,0%.

7 Resultados y análisis

Las cuatro variables analizadas (Tabla 2):

Tabla 2 Variables analizadas durante el estudio.

Variables	Unidades
Longitud de la raíz	cm
Longitud de la parte aérea	cm
Peso seco de la raíz	g
Peso seco de la parte aérea	g

7.1 Longitud de la raíz

Para la variable del tamaño de la raíz, se encuentra con mayor efecto el T3, seguido del tratamiento T2. En todos los intervalos de tiempo se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre el control y todos los tratamientos para *Alnus acuminata* ($p = 0,000$) (Anexo 1) y *Morella pubescens* ($p = 0,000$) (Anexo 5), sin embargo, también se evidencian diferencias importantes pasados los 22 días de germinación de las plántulas ya que la aplicación de tratamiento se realizó a los 15 días de germinación, es decir, el crecimiento y desarrollo de la raíz aumentó gradualmente en los tres tratamientos al transcurrir los días. Lo anterior indica que, a mayor concentración, es mayor el efecto en el crecimiento de la raíz. Los tratamientos organizados por Statgraphics como grupos homogéneos para realizar la prueba de múltiples rangos muestran con representación de una “x” el nivel de cercanía entre tratamientos; donde se evidencia que en *Alnus acuminata* (Tabla 3) y *Morella pubescens* los tratamientos aplicados no tienen datos similares, es decir, las mediciones de la longitud de la raíz no comparten datos cercanos entre tratamientos,(Tabla 4).

Tabla 3 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos en *Alnus acuminata*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	60	2,34833	0,02591	X
1X10 ⁷ UFC/mL	60	2,51667	0,02591	X
1X10 ⁸ UFC/mL	60	2,63167	0,02591	X
1X10 ⁹ UFC/mL	60	2,98167	0,02591	X

Tabla 4 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos en *Morella pubescens*

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	40	2,2475	0,0245268	X
1X10 ⁷ UFC/mL	40	2,5225	0,0245268	X
1X10 ⁸ UFC/mL	40	2,68	0,0245268	X
1X10 ⁹ UFC/mL	40	2,8825	0,0245268	X

Las diferencias en las longitudes de la raíz indican la eficiencia de la asociación de *Azospirillum brasilense* con las dos especies de plantas forestales trabajadas (Becerra, 2007), debido a esto se evidencia un crecimiento más rápido en el intervalo de tiempo de 29 a 36 días (

Longitud de la raíz vs. tratamiento vs. días

Figura 8). Los efectos positivos de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento de las plantas se han atribuido al mejoramiento en el desarrollo de la raíz, así como al incremento en la tasa de asimilación de agua y la utilización de minerales del suelo por parte de la planta (Ocampo, 2001).

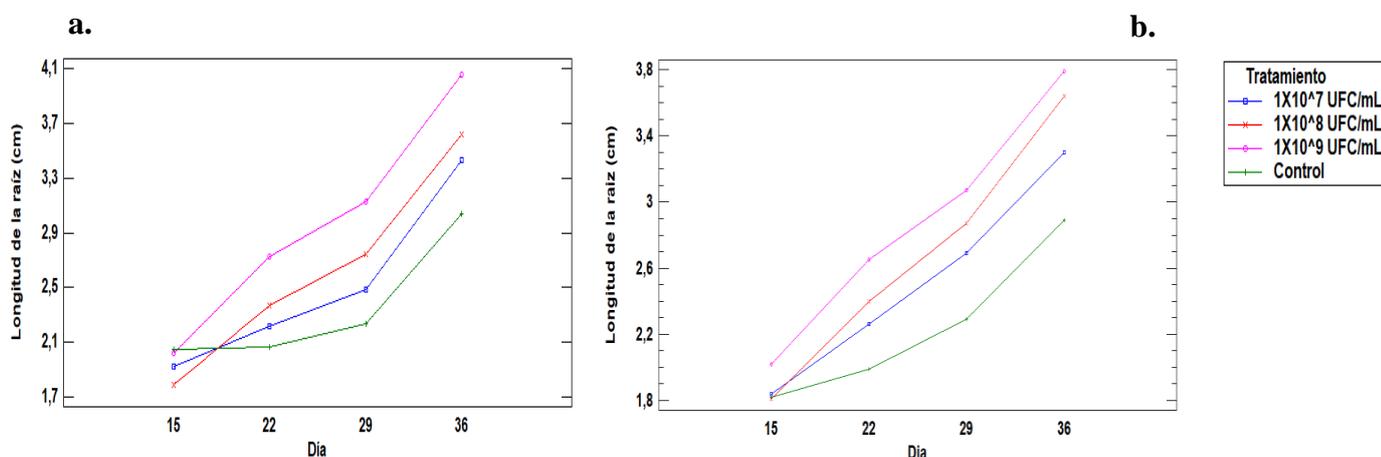


Figura 8 Efecto de los tratamientos en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens* en el transcurso

de los días.

Los tratamientos empleados presentan diferencias significativas entre ellos, esto se comporta de la misma forma para *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* (Figura 9). Pero se observa que hubo un crecimiento más rápido en la raíz de las plántulas de *Morella pubescens*, lo cual puede deberse a que la bacteria tiene una capacidad de proliferación mayor al transcurrir los días, lo que genera un incremento de los pelos absorbentes en las raicillas de las plántulas; esto provoca un aumento en el contenido de nitrógeno favoreciendo notoriamente el crecimiento de la raíz (German *et al.*, 2000).

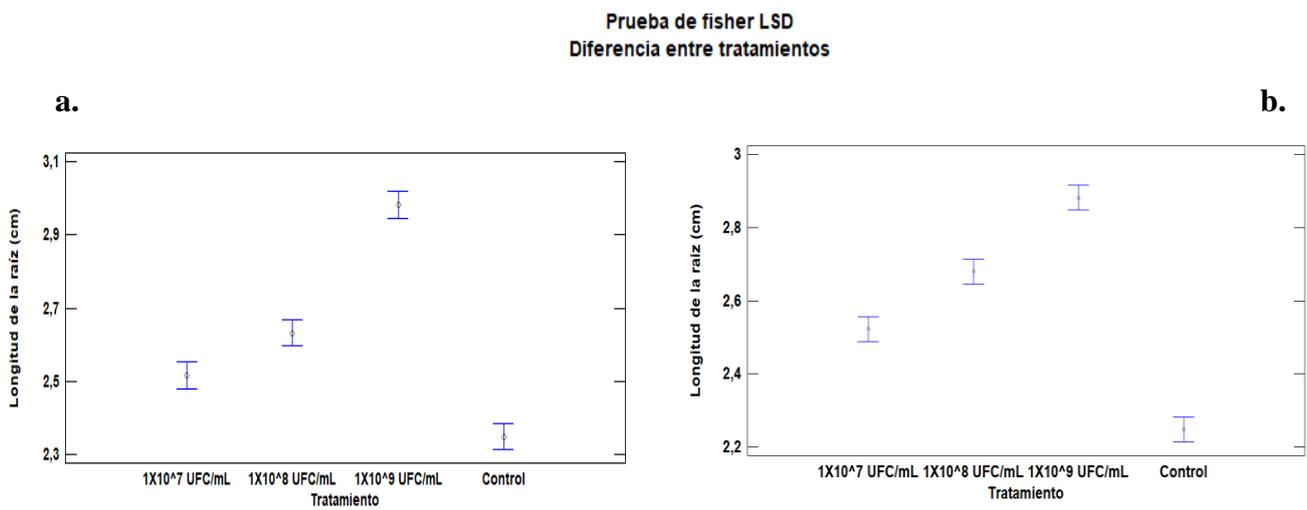


Figura 9 Prueba de Fisher longitud de la raíz, diferencia entre días bajo el efecto de *Azospirillum brasilense* **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.

En este estudio se puede concluir que T3 fue el más eficiente en cuanto al crecimiento de la longitud de la raíz, lo cual puede deberse a que esta fue la concentración adecuada para impulsar el efecto de los mecanismos de *Azospirillum brasilense* en asociación con *Alnus acuminata* y *Morella pubescens*, como la producción de auxinas y giberelinas que incrementan la formación de pelos radicales, con capacidad de fijación biológica y asisbiótica del Nitrogeno atmosférico, acelerando el crecimiento de la raíz (Karpati, E. *et al.*, 1999).

7.2 Longitud de la parte aérea

Para analizar la longitud de la parte aérea entre tratamientos, en los análisis de varianza donde se presentan diferencias significativas en las medidas de longitud aérea de plántulas de *Alnus acuminata* ($p=0,000$) (Anexo 2) y *Morella pubescens* ($p=0,000$) (Anexo 6), ; siendo T3 el que presentó mayor crecimiento y T1 el menor, pero aun así presentó un cambio favorable con respecto al control. Como ya se había mencionado los tratamientos organizados como grupos homogéneos, para realizar la prueba de múltiples rangos muestran con representación de una “x” el nivel de cercanía entre tratamientos; donde se evidencia que en *Alnus acuminata* (Tabla 5), y *Morella pubescens* (Tabla 6), los tratamientos aplicados no comparten un nivel de cercanía, es decir, los datos del crecimiento de la parte aérea no comparten ninguna similitud.

Tabla 5 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos, para *Alnus acuminata*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	60	3,34667	0,0394259	X
1X10 ⁷ UFC/mL	64	3,56094	0,0381739	X
1X10 ⁸ UFC/mL	56	3,67143	0,0408096	X
1X10 ⁹ UFC/mL	60	4,22	0,0394259	X

Tabla 6 Prueba de múltiples rangos para longitud de la raíz por tratamientos, para *Morella pubescens*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	40	2,8875	0,0372468	X
1X10 ⁷ UFC/mL	40	3,0775	0,0372468	X
1X10 ⁸ UFC/mL	40	3,475	0,0372468	X
1X10 ⁹ UFC/mL	40	3,9375	0,0372468	X

En la siguiente gráfica se observa el avance en el tiempo de la longitud de la parte aérea, teniendo en cuenta que para las dos especies de árboles pioneras en la sucesión vegetal, se observa la mayor tasa de crecimiento de 29 a 36 días después de la germinación. *Alnus acuminata* obtuvo un mayor crecimiento y desarrollo, alcanzando una longitud de la parte aérea mayor en comparación con *Morella pubescens*; todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas respecto al control, en los tratamientos evaluados el que presentó mayor incidencia en el crecimiento fue el tratamiento que contenía mayor concentración del inóculo (Figura 10);

Azospirillum brasilense produce fitohormonas que favorecen la germinación, crecimiento, desarrollo y estabilidad de la planta (Karpati, E. *et al.*, 1999).

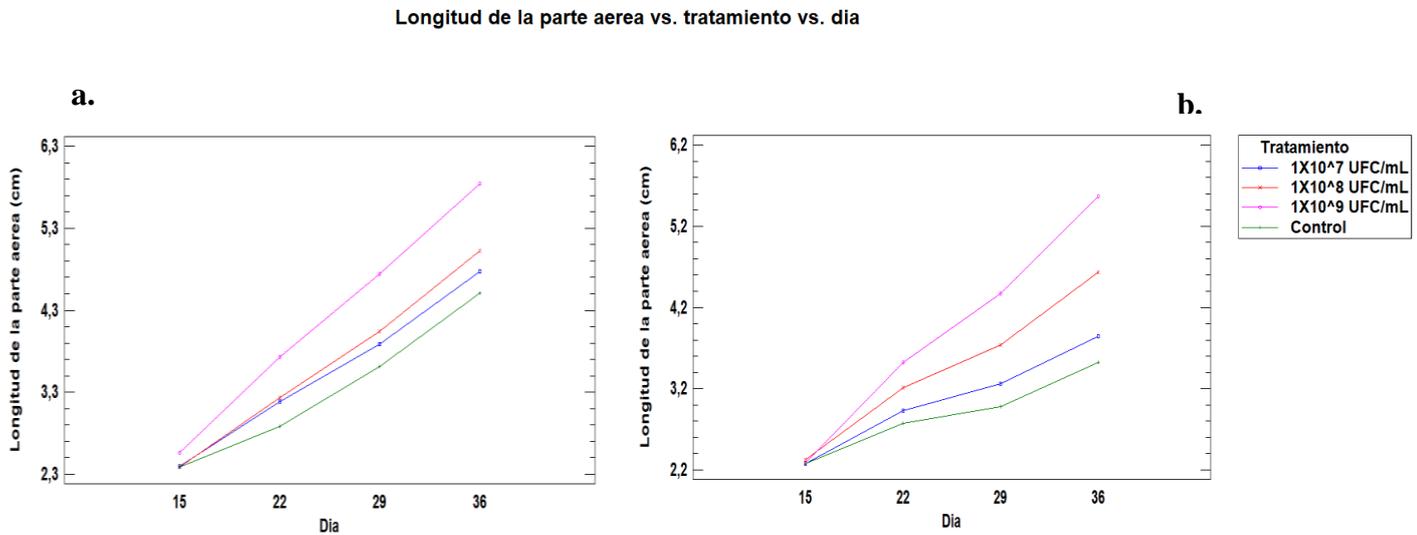


Figura 10 Efecto de los tratamientos en la longitud de la parte aérea a través del tiempo en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.

En la prueba de Fisher se vuelve a evidenciar que T3 obtuvo mejores resultados en el crecimiento y desarrollo de la parte aérea con un nivel del 95% de confianza (Figura 11). Los resultados mencionados muestran que los inóculos de los 3 tratamientos con *Azospirillum brasilense* aportan positivamente en el desarrollo de las plántulas; esto se puede verificar en un estudio realizado por Urgiles *et al.* (2016), en donde *Alnus acuminata*, con una mezcla de microorganismos promotores del crecimiento en suelo nativos, presentó un rendimiento de la planta significativamente mayor en comparación con los controles.

Teniendo en cuenta el estudio anterior se puede inferir que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una evolución significativa de las plántulas de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* inoculadas, las cuales obtuvieron una mayor longitud a través del tiempo que las no inoculadas.

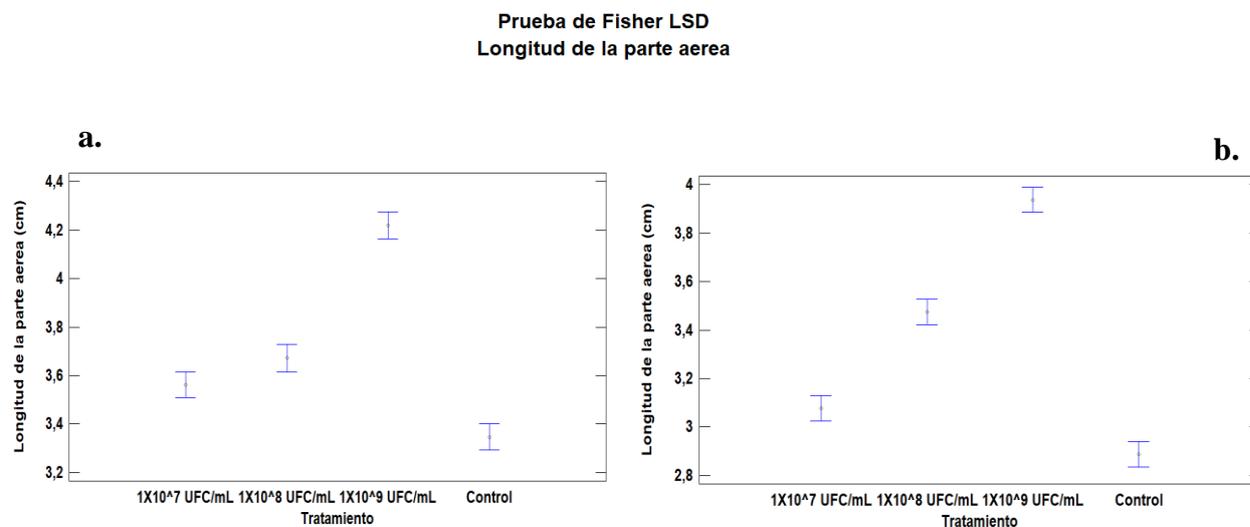


Figura 11 Prueba de Fisher de longitud de la parte aérea entre los tratamientos bajo el efecto de *Azospirillum brasilense* y el control **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*

Morella pubescens tuvo mayor diferencia en el crecimiento de la parte aérea en T1 y T2, mientras que en *Alnus acuminata* no presentó diferencias significativas en dichos tratamientos. La incidencia significativa en todos los tratamientos en comparación con el control se puede deber a la incidencia que estas plantas tienen en el desarrollo inicial, específicamente en la fase de latencia (0-90 días); este desarrollo exponencial es debido a las hormonas responsables de la división celular y elongación como auxinas, citoquinas, y giberelinas (Valdés, 2000).

7.3 Peso seco de la raíz

Se observa que el peso en ambas especies registró un incremento significativo entre tratamientos, en donde se presentan diferencias significativas en el peso seco de raíz en plántulas de *Alnus acuminata* ($p=0,057$) (Anexo 3) y *Morella pubescens* ($p=0,001$) (Anexo 7), siendo T3 el que

presentó el mayor peso y T1 el menor. En la prueba de múltiples rangos se representa con una “x” la similitud de los datos entre tratamientos; donde se evidencia que en *Alnus acuminata* no comparten datos cercanos entre los tratamientos aplicados (Tabla 7), y *Morella pubescens* presenta datos cercanos en el T1 y T2, pero estos no comparten ninguna relación entre los datos de peso seco con el T3 (Tabla 8).

Tabla 7 Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en *Alnus acuminata*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	8	0,5625	0,0446339	X
1X10 ⁷ UFC/mL	8	0,9	0,0446339	X
1X10 ⁸ UFC/mL	8	1,0375	0,0446339	X
1X10 ⁹ UFC/mL	8	1,3125	0,0446339	X

Tabla 8 Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en *Morella pubescens*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	8	0,2375	0,0272431	X
1X10 ⁷ UFC/mL	8	0,4625	0,0272431	X
1X10 ⁸ UFC/mL	8	0,525	0,0272431	X
1X10 ⁹ UFC/mL	8	0,7125	0,0272431	X

La tendencia observada evidencia la acción positiva de los inóculos en cuanto a la producción de biomasa; en el último intervalo de tiempo se registra mayor incremento con respecto a los demás, lo cual quiere decir que se generó mayor tasa de crecimiento radicular en todos los tratamientos aplicados en *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* (Figura 12).

En el caso del peso seco de la raíz para todos los tratamientos se observa que se comportó de la misma manera, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos al transcurrir de los días. Para los cuatro intervalos de tiempo se registraron medidas en promedio para *Alnus acuminata* de 0,2 g para los 15 días; 1,3 g para los 22 días; 1,6 g para los 29 días y 1,9 g para los 36 días; y para *Morella pubescens* de 0,2 g para los 15 días; 0,9 g para los 22 días; 1,3 g para los 29 días y 1,8 g para los 36 días.

Peso seco de la raíz vs tratamiento vs días

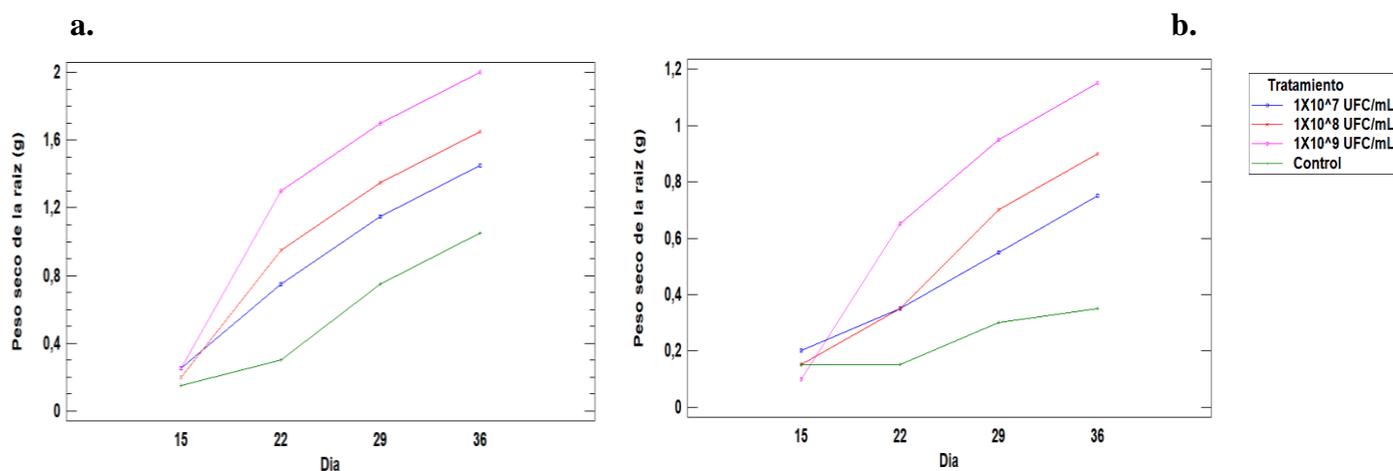


Figura 12 Efecto de los tratamientos en el peso seco de raíz a través del tiempo en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.

El peso seco de la raíz mostró diferencias significativamente estadísticas, donde se observaron los tratamientos en grupos homogéneos mediante la prueba de Fisher que evidenció nuevamente la eficiencia del T3 con respecto al control, con un nivel de confianza de 95%.

El T1 y T2 no presentaron diferencias significativas; sin embargo a partir del primer intervalo de tiempo se observan diferencias entre los tratamientos en relación con el control, presentando una tendencia de crecimiento al transcurrir los días, lo que indica que *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* tienen mayor efecto con *Azospirillum brasilense* a mayores concentraciones siendo el tratamiento 3 el más favorable para las plántulas (*Figura 13*).

Prueba de Fisher LSD
Peso seco de la raíz

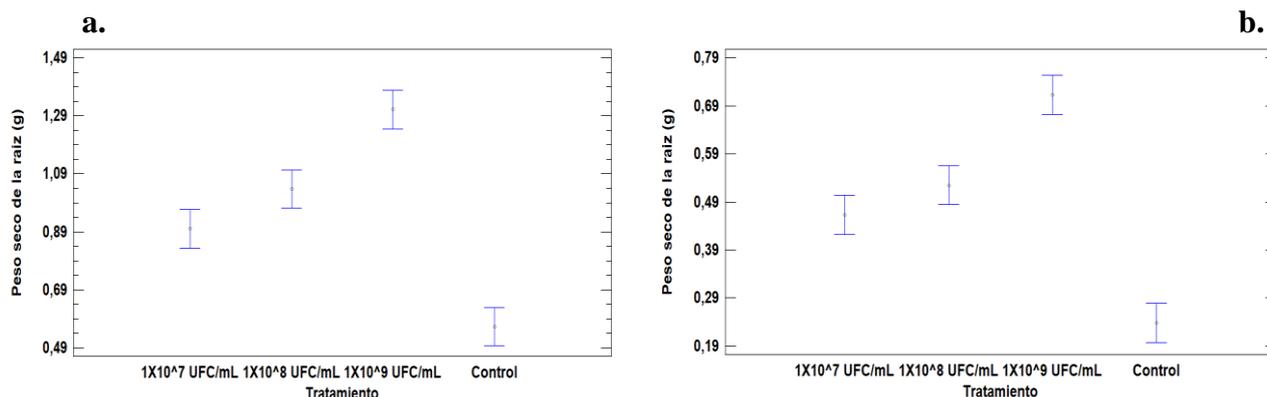


Figura 13 Prueba de Fisher peso seco de la raíz diferencia entre tratamientos, bajo el efecto de *Azospirillum brasilense* y el control en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*

7.4 Peso seco de la parte aérea

El peso seco de la parte aérea para *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; el tratamiento con más interacción en la planta fue nuevamente el 3, seguido del tratamiento 2. Se han encontrado estudios que definen que la interacción con el género *Azospirillum* proporciona una mayor producción de biomasa aérea de plantas de *Alnus* durante los primeros meses del crecimiento y desarrollo (Karpati, E. *et al.*, 1999).

En *Alnus acuminata* los tratamientos clasificados en grupos homogéneos evidenciaron que el T1 comparte los mismos niveles de coincidencia con el control; por otra parte, el T2 con respecto al control y a T1 tampoco tuvieron una diferencia estadísticamente significativa, pero por el contrario el T3 obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con todos los tratamientos y el control (Tabla 9). Por otra parte, en *Morella pubescens* el T1 comparte los mismos niveles de coincidencia en los datos con el control y T2, lo que quiere decir que este T1 no presenta diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea frente a los demás tratamientos, por el contrario T3 no presento datos cercanos a los demás tratamientos siendo este nuevamente el más efectivo (Tabla 10), con un análisis de varianza donde se presentan las diferencias significativas, en las medidas del

peso seco de la parte aérea de plántulas de *Alnus acuminata* ($p=0,0202$) (Anexo 4) y *Morella pubescens* ($p=0,0437$) (Anexo 8).

Tabla 9 Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea en *Alnus acuminata*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1X10 ⁷ UFC/mL	8	1,15	0,0579601	X
Control	8	1,2	0,0579601	X
1X10 ⁸ UFC/mL	8	1,5	0,0579601	X
1X10 ⁹ UFC/mL	8	1,7	0,0579601	X

Tabla 10 Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea en *Morella pubescens*.

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Control	8	1,0	0,0459279	X
1X10 ⁷ UFC/mL	8	1,125	0,0459279	XX
1X10 ⁸ UFC/mL	8	1,2375	0,0459279	X
1X10 ⁹ UFC/mL	8	1,4875	0,0459279	X

La ganancia de biomasa a través de los intervalos de tiempo fue aumentando gradualmente para las dos especies; en *Alnus acuminata* el primer intervalo tuvo una ganancia de 0,24 g para los 22 días, de 0,19 g para los 29 días y de 0,5 g para los 36 días; esto puede indicar que el tiempo de germinación de la planta es un factor que afecta la producción de biomasa, teniendo en cuenta que la biomasa tuvo un aumento constante, generando mayor ganancia de biomasa en el intervalo de 15 a 22 días. En *Morella pubescens* el primer intervalo de tiempo tuvo una ganancia de 0,23 g para los 22 días, de 0,33 g para los 29 días y de 0,43 g para los 36 días.

Peso seco de la parte aerea vs, tratamiento vs. días

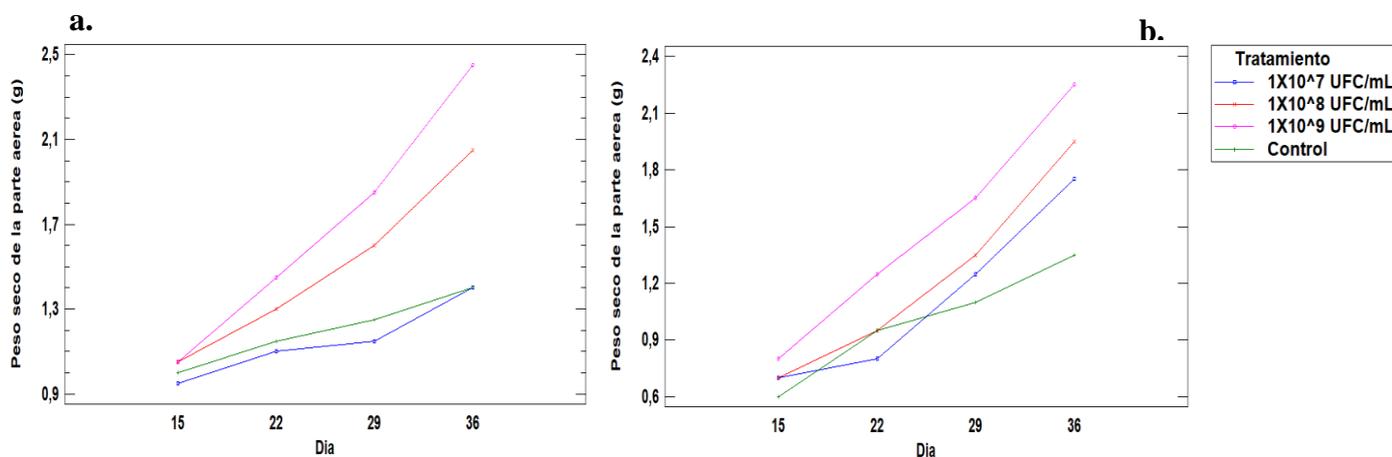


Figura 14 Efecto de los tratamientos en el peso seco de raíz a través del tiempo **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.

El resultado de la asociación y efectos de *Azospirillum* sobre las plántulas produjo un avance en la acumulación de la biomasa a medida que los intervalos de tiempo transcurren, esto se puede ratificar con un estudio realizado por Oliveira *et al* (2005), donde concluye que la biomasa producida después de la inoculación de *Frankia* y *Azospirillum* fue significativamente mayor en comparación con los controles no inoculados; se evidencia que el tratamiento con más rendimiento fue el T3 con mayor concentración del inóculo (*Figura 15*).

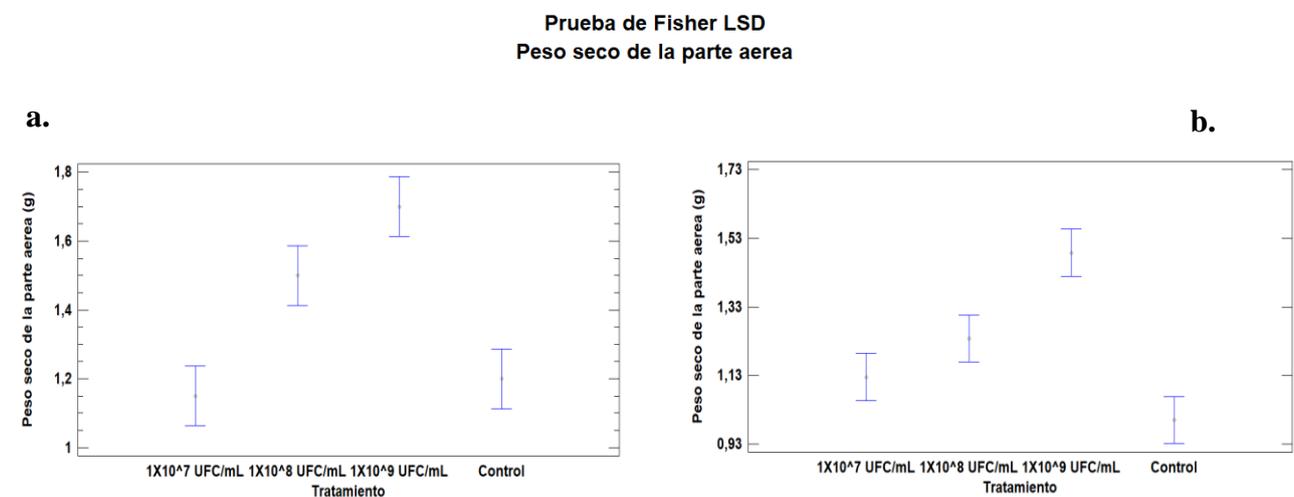


Figura 15 Prueba de Fisher peso seco de la parte aérea diferencia entre tratamientos, bajo el efecto de *Azospirillum brasilense* y el control en **a.** *Alnus acuminata* y **b.** *Morella pubescens*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian el aporte significativo de la cepa de *A. brasilense Cd DMS 1843* en el crecimiento y desarrollo de las dos especies pioneras trabajadas para la restauración, *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* tienen la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con bacterias y hongos micorrizogénicos generando esta actividad biológica (Hill, 2001).

La fijación de nitrógeno también es propia de algunos microorganismos específicos como los organismos procarióticos, algas cianofíceas y actinomicetos que son un grupo de bacterias Gram positivas con propiedades de descomposición de la materia orgánica, entre ellos *Azospirillum brasilense*; el grupo de organismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo homogéneo ya que tienen como única característica en común la presencia de la enzima nitrogenasa (Eckert *et al.*, 2001). La presencia del sistema enzimático nitrogenasa les permite hacer la reducción del nitrógeno molecular (N₂) atmosférico, hasta convertirlo en NH₄ que es la forma asimilable para ellas, esta enzima funciona en los microorganismos que viven en forma libre o asociados, quienes pueden utilizar el nitrógeno del aire como fuente del elemento e incorporarlo en compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo (Ferrari *et al.*, 2015). Los compuestos transportados vía xilema o floema son aminoácidos, principalmente amina, amidas o ureidos formados por reacciones de aminación y desaminación (Hill, 2001).

Algunos géneros de plantas angiospermas, establecen simbiosis con ciertos microorganismos para mitigar la deficiencia de nitrógeno del suelo; *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* realizan este proceso a través de nódulos radiculares, presentando interacciones con organismos del suelo, donde además de establecer relaciones simbióticas con hongos micorrizogenos y con actinomicetos de género *Frankia* y *Rhizobium*, establece una relación simbiótica con el género *Azospirillum*, los cuales ayudan a la formación de nódulos en la raíz con la capacidad de fijar nitrógeno de forma eficiente para el desarrollo de las plantas (Russo, 1994). En esta asociación los nódulos están formados por agrupaciones de raíces laterales cortas que se convierten en una estructura lobular rodeadas de células corticales, con presencia de bacterias como *Azospirillum brasilense* quien pasa el Nitrógeno fijado a la planta en forma de amonio, y protege a la nitrogenasa del oxígeno en el interior, por lo que consiguen resistir concentraciones de oxígeno más altas; aunque todavía se desconoce la forma de cómo llega la bacteria a la zona de influencia de la planta, en este proceso biológico los factores ambientales tales como el pH, la humedad y textura del suelo, son de gran

importancia (Karpati, E. *et al.*, 1999).

Algunos autores como Molina y Diez (2008) reportaron evidencias interesantes del efecto de la inoculación de bacterias y actinomicetos, como también de *Azospirillum brasilense* en cuanto al desarrollo de *Alnus acuminata*, quienes encontraron también un efecto positivo en el desarrollo de la planta, lo cual también ha sido reportado por otros autores en la inoculación dual de bacterias fijadoras de nitrógeno para *Alnus acuminata* (Ospina *et al.*, 2005).

Esta investigación es un aporte significativo para iniciar procesos de sucesión vegetal a lo largo del país, teniendo en cuenta las características específicas de cada zona. Actualmente la restauración de suelos es uno de los retos ambientales y sociales más significativos en la lucha para mitigar el cambio climático, ya que los suelos son un componente de los ecosistemas terrestres y la base del desarrollo de las comunidades biológicas, donde se encuentra el 95% de toda diversidad del planeta. La asociación de estas comunidades con algunas especies de árboles mejora la absorción de agua y la asimilación de fósforo y nitrógeno, entre otros nutrientes, favoreciendo al establecimiento temprano de árboles en sitios marginales; *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* son especies pioneras estadios tempranos de la sucesión vegetal (Warnes, 1992) y pueden proliferar en sitios afectados por inundaciones, incendios, deslizamientos de tierra, y en suelos altamente degradados. La especies vegetales que son capaces de adaptarse a estos suelos debe tener una baja demanda en nutrientes, y permiten un buen uso de la disposición de los mismos a través de la descomposición de hojarasca y de raíces muertas; teniendo así un efecto positivo en el crecimiento y por ende un impacto satisfactorio cuando se emplean *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* para la restauración de ecosistemas degradados de bosques andinos en el caso de la zona de estudio, ya que se considera que son especies pioneras en el aporte de nutrientes del suelo, por cual cumple un papel importante en el proceso de restauración (Molina, 2005); La restauración es un proceso biológico que puede durar muchos años, por ende la implementación de estrategias que ayuden a acelerar dicho proceso podría facilitar la ejecución de objetivos a alcanzar en un proceso restauración ambiental. Este

proyecto podría generar un aporte significativo que abre la ventana a nuevas investigaciones e implementaciones de este tipo.

7.5 Análisis de suelo

El suelo de la muestra analizada fluctúa en un rango de pH ácido de 5.03 a 5.63, pero se encuentra dentro de un rango óptimo para la proliferación de *Azospirillum* como organismo promotor de crecimiento. En la Figura 16 podemos observar los nutrientes disponibles en el suelo según la acidez en que se encuentre; según el pH encontrado en el área de estudio el suelo puede presentar los nutrientes como el calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y boro pueden bajar su disponibilidad para las plantas, por el contrario nutrientes como el aluminio, hierro, manganeso, cobre y zinc aumentan su disponibilidad en el suelo y puede llegar a ser tóxico (**Figura 16**) (Rosas et al., 2008). La finca el Cardonal es una zona prevista para iniciar un proceso de restauración ecológica, en donde el terreno seleccionado para iniciar presenta un suelo ácido debido a la intervención antrópica dirigida hacia prácticas en agricultura y ganadería, esto disminuye drásticamente el proceso de mineralización de la materia orgánica e incluso puede detenerse por completo ya que la actividad microbiana reduce en condiciones de pH bajo, dando como consecuencia menor disponibilidad de nitrógeno, lo que explica el crecimiento rápido en las plántulas de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* frente a las concentraciones de *Azospirillum brasilense* bacteria nitrificante (Julca et al., 2006).

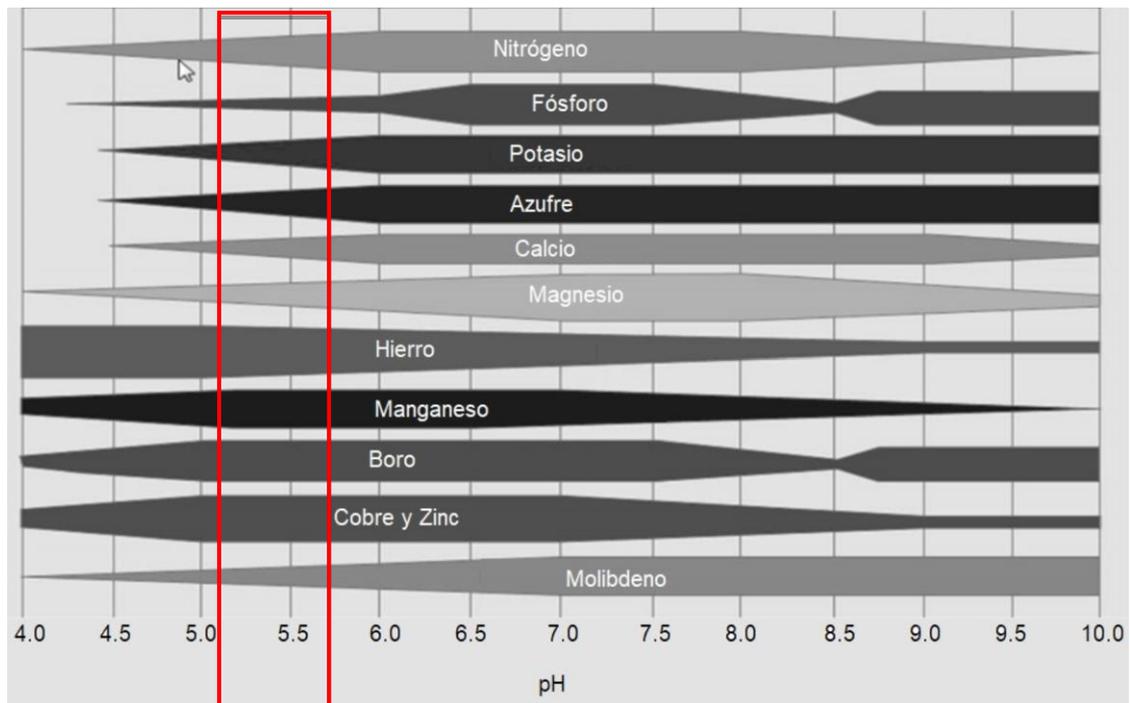


Figura 16 Nutrientes disponibles según la acidez (pH) en el suelo, (Rosas et al., 2008).

Por otra parte, el vapor de agua contenido en la atmósfera y que es absorbido por partículas del suelo se denomina humedad higroscópica. El suelo colectado del área de estudio presenta un 0.0108 %:

$$H.H \% = \frac{68\text{ g} - 55\text{ g}}{55\text{ g} - 43} \times 100 = 0.0108$$

Un suelo que presenta porcentaje de humedad higroscópica comprendido en un rango de 5 a 50% está en su máxima capacidad de retención (Julca et al., 2006), el suelo analizado en el presente estudio se encuentra por debajo de dicha capacidad, lo que ratifica la importancia de iniciar el proceso de restauración en el terreno.

La textura indica el contenido relativo de partículas de diferente tamaño, como la arena, el limo y la arcilla en el suelo, esta define la cantidad y el tamaño de los espacios que existen entre las partículas del suelo, lo cual determina la destreza que tiene el agua para moverse a través del suelo y la

cantidad (Marín, 2009); en este caso se identificó 5% de arena, 93% de limo, y 2% de arcilla; lo que define al sustrato como un suelo limoso, el cual se caracteriza por tener buena capacidad para retener agua y por ende conservar los nutrientes en el mismo (Rosas *et al.*, 2008).

8 Conclusiones

- El mejor tratamiento para iniciar el proceso de restauración en la finca el Cardonal, fue el que presentó mayor concentración del inóculo (1×10^9 UFC/ml) de *Azospirillum brasilense* aplicado en las dos especies forestales.
- *Alnus acuminata* presentó una mayor tasa de crecimiento y desarrollo con cada uno de los tratamientos en todos los intervalos de tiempo.
- La respuesta a los tratamientos por parte de *Alnus acuminata* y *Morella pubescens* fue significativa después del segundo intervalo de tiempo (22 días).
- Se considera que a pesar de que la mayor concentración de *Azospirillum brasilense*, podría ser más eficiente en el crecimiento y desarrollo la aplicación de tratamientos mezclando más de un organismo promotor del crecimiento como las del género *Frankia*.

- La degradación de los suelos puede alterar los servicios ecosistémicos que presta el territorio, por lo cual el no iniciar procesos de restauración ecológica puede resultar en un estado de deterioro o recuperarse lentamente.
- El peso seco de la parte aérea y de la raíz es un muy buen estimador del carbono total de la planta, por ende, en las especies trabajadas hubo un aumento significativo de biomasa.

9 Recomendaciones

Se recomienda continuar con este estudio, realizando otras metodologías de inoculación como incluir combinaciones de más microorganismos promotores de crecimiento vegetal, y así cubrir un nivel de investigación más amplio.

Adicionalmente, se recomienda incluir análisis de nitratos y nitritos, como un análisis detallado del porcentaje de los componentes de suelo, ya que se podría llegar a saber con veracidad los efectos positivos o negativos de los microorganismos en el aporte de estas en diferentes procesos, ya que pueden aportar en el desarrollo de investigaciones en diferentes áreas como fisiología, conservación, ecología, taxonomía, biotecnología, botánica y restauración ecológica.

Así mismo, se recomienda realizar la siembra de estas dos especies (*Alnus acuminata* y *Morella pubescens*) así como el seguimiento adecuando directamente en el predio, ya que son pioneras en los procesos de sucesión vegetal y pueden contribuir a la restauración de la vegetación en El Cardonal.

10 Referencias bibliográficas

- Añazco, M. (1996). El Aliso. Quito, Ecuador: Fernando Heredia.
- Astudillo, R. (2021). Evaluación del desarrollo de *Prunusserotina* y *Morella pubescens* que contribuirán a la restauración ecológica en el cerro Mishquiyacu Azuay-Ecuador.
- Becerra, A., Arrigo, N. M., Bartoloni, N., Domínguez, L. S., y Cofré, M. N (2007). Arbuscular mycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* Kunth in Northwestern Argentina in relation to season and soil parameters. *Ciencia del Suelo* 25(1), 7-13.
- Bennett, A. F. (2004). *Enlazando el paisaje: El papel de los corredores y la conectividad en la conservación de la vida silvestre*. IUCN.
- Corpoica. (2010). El aliso (*Alnus Acuminata* H.B.K) como alternativa silvopastoril en el manejo sostenible de praderas en el trópico alto Colombiano. Colombia : Produmedios.
- Correa, C. (2021). *Determinación de la composición química del aceite esencial de Morella pubescens* (Bachelor's thesis).
- Correa, J., Volante, J., y Seghezzi, L. (2012). Análisis de la fragmentación y la estructura paisaje en bosques nativos del norte argentino.
- Cortez, J. (2021). Monitoreo del crecimiento de *Prunusserótina* y *Morella pubescens* para la restauración ecológica en el cerro Mishquiyacu Azuay–Ecuador, luego de la fase de prendimiento.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. and Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereinarum* sp. Nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbio.* 51: 17.26

- Ferrari, A. E., y Wall, L. G (2015). Utilización de arboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Revista de la facultad de agronomía, La Plata*, 105(2), 63-87.
- Foth, Henri D., 1986: «Fundamentos de la ciencia del suelo», Ediciones CECSA, Méjico.
- Florentine, S., y Westbrooke, M. (2004). Restoration on abandoned tropical pasture lands-do we know enough? *Journal of Nature Conservation*. 12: 85-94
- Fitzpatrick, E. A., 1985: «Suelos: su formación, clasificación y distribución», Ediciones CECSA, Méjico. - Foth, Henri D., 1986: «Fundamentos de la ci
- Garza, C., Campos, J., Valenzuela, D., Alba, L., y Nicolás, A. (2022). Siembra directa de árboles nativos para la restauración de la selva estacionalmente seca. *Acta Botanica Mexicana*, (129).
- German, M. Burdman, S. Okon, Y Kigel, J (2000). Efectos of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under differant water regimes. *Biology and Fertility Solis*, (264).
- Gómez, A. y Vásquez, C. (1983). Estudios sobre sucesión secundaria en los trópicos Calido-Húmedos: El ciclo de vida de las especies secundarias. En: Cervera, A., Gomez Pompa, A., Rodríguez,S., Vasquez Yanes, C. (Eds). *Investigaciones sobre regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. Editorial continental. 579-593 pp.
- Hernández, J (2020). Guía de laboratorio Laboratorio. INBIBO Universidad el Bosque.
- Hill, D. (2001) Lichens and co-ordination of the symbionts. *MicrobioL*. 137 pp.
- Julca, A., Meneses, L., Blas, R., y Bello, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1), 49-61.

Karpati, E. Kiss, P. Ponyi, T. Fendrik, I. Zamaroczy, M. Orosz, L. (1999) Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*. 181: 3949-3955.

Lara, J. (2021). *Determinación de tratamientos pregerminativos en semillas de morella pubescens (humb. & bonpl. ex willd.) wilbur y myrcianthes hallii (o. berg) mcvaugh, Ibarra, Ecuador* (Bachelor's thesis).

MARIN M., G. El análisis del suelo para diagnosticar su fertilidad. En : Suelos y fertilización de cultivos. Medellín, ICA. 2009. p. 467-510 (Compendio No. 38).

Medina, M., Orozco, H., y Diez, M. (2008). Establecimiento de un sistema silvopastoril mediante las especies *Alnus acuminata* HBK y *Acacia decurrens* Willd y respuesta al empleo de organismos rizosféricos en San Pedro (Antioquia). *Livestock Research for Rural Development*, 20(1)

Molina, M., Medina, M., y Mahecha, L. (2008). Microorganismos y micronutrientes en el crecimiento y desarrollo del Aliso (*Alnus acuminata* HBK) en un sistema silvopastoril alto andino. *Livestock Research for Rural Development*, 20(4).

Molina, M., Ledesma, L. M., y Medina, M (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizogenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles alto andino, en el crecimiento y desarrollo de Aliso (*Alnus acuminata*). *Livestock Research for Rural Development*, 20(4).

Mora, F. y Vargas, O. (2007). La restauración ecológica, definiciones y dimensiones. En: Vargas, O. y Grupo de Restauración Ecológica (Eds). *Estrategias para la restauración ecológica del bosque altoandino, El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología, Colciencias.

Morales, L. (2018). Utilización de árboles fijadores de nitrógeno *Escallonia pendula* y *Alnus acuminata* para la recuperación de suelos erosionados.

Morales, M., Otero J., Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C. y Cárdenas, L. (2007). Atlas de páramos de Colombia. *Morales M., Otero J., Van der Hammen T., Torres A., Cadena C., Pedraza C., Rodríguez N., Franco C., Betancourth JC, Olaya E., Posada E. y Cárdenas L. 2007. Atlas de páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, DC 208 p.*

Muñoz, J. y Luna, C. 2002. Laurel de cera. Universidad de Nariño. PIFIL. Casa editorial diario del sur. Pasto, Colombia. 126p

Muñoz, J., y Cabrera, C. (1999). Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación del Laurel de cera *Myrica Pubescens* H.& B ex Willdenow. Santafe de Bogota: Convenio Andres Bello.

Ocampo O. (2001) Uso de microorganismos rizosfericos en Solanáceas. Centro de investigación y de Estudios Avanzados del IPN U. Irapuato, Depto., biotecnología y bioquímica, Buenavista, Saltillo, IPN

Oliveira, R.S., Castro, P. M. L., Dood, J, C., y Vosatka, M. (2005). Synergistic effect of glomus intraradices *Azospirillum* and *Frankia* spp. On the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. *Chemosphere*, 60 (10), 1462-1470.

Okon, Y. (1994). *Azospirillum/plant associations*. Edited by Yaacov Okon.

Ortega, S., y Liseth, Y. (2021). Evaluación de la calidad de ensilaje a base de forraje de aliso (*Alnus acuminata* spp) y Microorganismo Eficientes Autóctonos, EMAS. UPEC.

Ospina, C. M., Hernandez, R. J., Gomez, D. E., Godoy, J. A., Aristizabal, F. A., Patiño, J. N., y Medina, J. A (2005). El aliso o cerezo *Alnus acuminata* HBK ssp. *Acuminata*. Guías silviculturales

para el manejo de especies forestales con miras a las produccion de madres en la zona andina colombiana. FNC-Cenicafe, Chinchina.

Palomeque, X., Günter, S., Hildebrandt, P., Stimm, B., Aguirre, N., y Weber, M. (2020) Reforestación con especies nativas y exóticas: caso del valle de San Francisco, Zamora Chinchipe.

Puente, M., García, J., Rubio, E., & Peticari, A. (2010). Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. *INTA–Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea*, (116).

Quijano, C. y Pino, J. (2007). CONSTITUYENTES VOLÁTILES DE LAS HOJAS DE *Morella pubescens* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Wilbur. *Revista Cubana de Química*, XIX(1), 54-57.

Ramírez, C. (2020). *Plan estratégico de restauración ecológica para el centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, Costa Rica* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Rincón, R., Culebro, N., Gutierrez, F. y Dendooven, L. (2003). Scarification of seeds of *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze and its effect on germination. *Seed Science and Technology*, 31(2), 301-307.

Rosas, J., Escamilla, E., y Ruiz, O. (2008). Relación de los nutrimentos del suelo con las características físicas y sensoriales del café orgánico. *Terra latinoamericana*, 26(4), 375-384.

Rozo, M. (2020). ESQUEMA DE ORDENAMIENTO PARA EL MUNICIPIO DE UBAQUE, CUNDINAMARCA (POT). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA, ALCALDIA MUNICIPAL DE UBAQUE

Russo, R. O. (1994) Los sistemas agrosilvopastoriles en el contexto de la una agricultura sostenible. *Agroforestación en las Américas*, 1 (2), 10-13.

Salamanca, B. y Camargo, G. (2000). Protocolo distrital de restauración ecológica: Guía para la restauración de ecosistemas nativos en las áreas rurales de Santa Fe de Bogotá. Santa Fe de Bogotá, Colombia: DAMA.

Seraquive, R. (2021). Evaluación de tres sustratos para la producción de laurel *Morella pubescens* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) en la comunidad Lagunas, cantón Saraguro, provincia de Loja.

Ucea, J., Quiroz, J., y Hernández, J. (2020). Impacto de *Azospirillum brasilense*, una rizobacteria que estimula la producción del ácido indol-3-acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1), 34-39.

Urgiles, N., Haug, I., Setaro, S., y Aguirre, N. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Tecnología en Marcha*, 30(4), 5-14.

Valdés, M. 2000. La simbiosis actinorríca. En: la fijación Biológica de Nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas. Peñas Cabriales J. J., Ed. Improsa S. A., Irapuato, pp. 29-40.

Villarpando, D., Villarpando, P. y Villalobos, J. (2011). Fichas botánicas de especies agroforestales nativas y naturalizadas aptas para tierras altoandinas. La Paz, Bolivia: Care

Vizcaíno, M. (2017). Determinación del impacto forestal del aliso (*alnus acuminata* HBK), asociado a cultivos de ciclo corto y sin fertilizantes, en la parroquia el Carmelo provincia del Carchi (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador

Anexos

Anexo 1 Anova multifactorial de la longitud de raíz en *Alnus acuminata*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Día	82,0101	3	27,3367	678,67	0,0000
B:Tratamiento	12,9251	3	4,30837	106,96	0,0000
INTERACCIONES					
AB	5,78004	9	0,642227	15,94	0,0000
RESIDUOS	9,02267	224	0,0402798		
TOTAL (CORREGIDO)	109,738	239			

Anexo 2 Anova multifactorial de la longitud de parte aerea en *Alnus acuminata*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Día	223,317	3	74,439	798,15	0,0000
B:Tratamiento	24,997	3	8,33233	89,34	0,0000
INTERACCIONES					
AB	6,49306	9	0,721451	7,74	0,0000
RESIDUOS	20,8911	224	0,0932639		
TOTAL (CORREGIDO)	275,409	239			

Anexo 3 Anova multifactorial de el peso seco de la raíz en *Alnus acuminata*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	2,33344	3	0,777812	48,80	0,0000
B:Día	7,89844	3	2,63281	165,20	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,612812	9	0,0680903	4,27	0,0057
RESIDUOS	0,255	16	0,0159375		
TOTAL (CORREGIDO)	11,0997	31			

Anexo 4 Anova multifactorial de el peso seco de la parte aerea en *Alnus acuminata*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	1,615	3	0,538333	20,03	0,0000
B:Día	2,8525	3	0,950833	35,38	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,7775	9	0,0863889	3,21	0,0202
RESIDUOS	0,43	16	0,026875		
TOTAL (CORREGIDO)	5,675	31			

Anexo 5 Anova multifactorial de la longitud de la raíz en *Morella pubescens*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	8,61319	3	2,87106	119,32	0,0000
B:Día	50,7467	3	16,9156	702,98	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,05956	9	0,22884	9,51	0,0000
RESIDUOS	3,465	144	0,0240625		
TOTAL (CORREGIDO)	64,8844	159			

Anexo 6 Anova multifactorial de la longitud de la parte aerea en *Morella pubescens*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	25,9527	3	8,6509	155,89	0,0000
B:Día	92,5997	3	30,8666	556,22	0,0000
INTERACCIONES					
AB	13,5316	9	1,50351	27,09	0,0000
RESIDUOS	7,991	144	0,0554931		
TOTAL (CORREGIDO)	140,075	159			

Anexo 7 Anova multifactorial del peso seco de la raíz en *Morella pubescens*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	0,920938	3	0,306979	51,70	0,0000
B:Día	1,88344	3	0,627813	105,74	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,462813	9	0,0514236	8,66	0,0001
RESIDUOS	0,095	16	0,0059375		
TOTAL (CORREGIDO)	3,36219	31			

Anexo 8 Anova multifactorial del peso seco de la parte aerea en *Morella pubescens*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	1,0325	3	0,344167	20,40	0,0000
B:Día	5,6325	3	1,8775	111,26	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,4	9	0,0444444	2,63	0,0437
RESIDUOS	0,27	16	0,016875		
TOTAL (CORREGIDO)	7,335	31			