

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“Peletización de semillas de trébol con *Pseudomonas sp* aisladas de la rizósfera de maca, y evaluación de su efecto en la emergencia de semillas”

Presentado por:

Cindy Karen Anyaipoma Terreros

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Lima - Perú

2014

A MIS QUERIDOS PADRES

GLADIS Y ELISEO

Por su amor, confianza y apoyo incondicional.

A MI HERMANO

FRANK DONNY

Por ser como es.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Doris Zúñiga Dávila, patrocinadora del siguiente trabajo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y por sus consejos.

A Katty Ogata, por sus consejos, por apoyarme en todo momento y por sus palabras de aliento en el desarrollo de este trabajo.

A Miguel Angel Canales Torres, por su tiempo, comprensión y ayuda incondicional en todo el proceso de la realización de este trabajo. Te amo.

A Irene Quin e Italo Vergani, por hacer de las largas horas de trabajo sean más fáciles, por su amistad y por su ayuda incondicional en el desarrollo de mi tesis. Los quiero mucho chicos.

A Paola, Moniquita, Claudia, Elena, Fiorella, Lindacelia, Carito, Lucia y Ricardo, por las largas conversaciones y los gratos momentos compartidos durante el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas del LMT que de una u otra forma me alentaron y colaboraron desinteresadamente para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	10
II. REVISIÓN LITERARIA	12
2.1 <i>Trifolium pratense</i> (<i>trébol rojo</i>)	
2.1.1 Taxonomía	12
2.2 <i>Lepidium meyenii</i> (maca)	13
2.2.1 Taxonomía	14
2.3 <i>Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)</i>	14
2.3.1 Género <i>Pseudomonas sp.</i>	15
2.3.2 Taxonomía	16
2.4 Colonización de las radículas en las semillas de maca	16
2.5 Peletización de semillas	19
2.5.1. Proceso de las semillas peletizadas	21
2.5.2 Ventajas de las semillas peletizadas	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Lugar de ejecución	23
3.2 Materiales	23
3.2.1 Material Biológico	23
3.2.2 Materiales y equipos de laboratorio	23
3.3 Métodos	25
3.3.1 Reactivación de las cepas	25

3.3.2 Curva de crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivo	26
3.3.3 Ensayos de germinación con la bacteria PGPR	27
3.3.4 Colonización de las raíces de maca	28
3.3.5 Prueba de supervivencia de las semillas de trébol peletizadas	29
3.3.6 Análisis de datos	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1 Crecimiento de la <i>Pseudomonas sp.</i>	32
4.1.2 Reactivación de las cepas	32
4.1.3 Evaluación del crecimiento de la cepa en los cuatro medios de cultivo	32
4.1.4 Germinación de semillas de trébol rojo	37
4.2 Colonización de las raíces de las plántulas de maca	39
4.2.1 Evaluación de las <i>Pseudomonas sp.</i> en la radícula de la plántula de maca	39
4.2.2 Efecto en el peso seco de las plántulas de maca	40
4.2.3 Efecto en la longitud de la raíz de las plántulas de maca	41
4.3 Efecto de la peletización de las semillas de trébol rojo en la promoción de su crecimiento	43
4.3.1 Determinación de la mejor combinación de semillas-adhesivos- inoculante-cubierta	43
4.3.2 Prueba de germinación en placa	44
4.3.3 Determinación de la supervivencia de los microorganismos inoculados en las semillas peletizadas	46
4.3.4 Promoción del crecimiento en plántulas de trébol rojo	48

V. CONCLUSIONES	52
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO 1: TABLAS	63
ANEXO 2: FIGURAS	65
ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	68
FIGURAS	
Figura 1. Metabolismo de la glucosa, gluconato, 2-cetogluconato, manitol, sorbitol y fructosa en bacterias del género <i>Pseudomonas</i> .	18
Figura 2. Diagrama de la relación entre factores que afectan el funcionamiento de semillas peletizadas.	20
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i> en los medios LMC (1), G (2), A (3) y AG (4) a 28°C.	36
Figura 4. Porcentaje de germinación del trébol a las 48 horas por la <i>Pseudomonas sp.</i>	37
Figura 5. Germinación de las semillas de trébol a las 48 horas.	38
Figura 6. Promedio del peso seco de las plántulas de trébol cosechados 7 días después de su inoculación.	39
Figura 7. X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide).	41
Figura 8. Patrones de colonización de <i>Pseudomonas sp.</i> en raíces de <i>Lepidium meyenii</i> “maca” monitoreados a los de 3,7,15 y 28 días post-inoculación.	42
Figura 9. Biofilm en el sistema de plántulas de maca in vitro siete días post-inoculación.	43
Figura 10. Semillas de trébol peletizadas.	44
Figura 11. Porcentaje de emergencia de semillas peletizadas de trébol en placa.	45
Figura 12. Semillas de trébol germinadas a las 48 horas post-inoculación.	46

Figura 13. Supervivencia del inoculante <i>Pseudomonas sp.</i> en los medios G y LMC en las semillas peletizadas con la formulación arcilla:cal:aserrín.	48
Figura 14. Porcentaje de emergencia de las semillas peletizadas de trébol a las 48 horas.	50
Figura 15. Plántulas de trébol a los 30 días.	51

TABLAS

Tabla 1. Composición del medio LMC y medios modificados.	27
Tabla 2. Formulas para la determinación de los parámetros de crecimiento de la <i>Pseudomonas sp.</i> en el medio de cultivo.	27
Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de la <i>Pseudomonas sp.</i> utilizando los medios de cultivo.	35
Tabla 4. Altura, peso fresco y peso seco de plántulas de trébol a los 30 días de evaluación.	51

RESUMEN

El establecimiento exitoso de un cultivo depende de diversos factores como la temperatura, condiciones climáticas, pH del suelo, patógenos, humedad, modo de siembra, viabilidad de la semilla, entre otros. Una forma de controlar algunos de estos factores es el uso de inoculantes biológicos y una cubierta. Esta última puede influir en el microambiente de cada semilla inoculada, protegiéndola de factores negativos. Por tanto éste estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la peletización con la cepa Ps 42 (*Pseudomonas sp.*) en la promoción de crecimiento de *Trifolium pratense*. Con este fin, se evaluaron el crecimiento de la cepa Ps 42 en los medios LMC (extracto de levadura – manitol), A (extracto de levadura – Azúcar rubia), G (glutamato monosódico – manitol) y AG (glutamato monosódico – azúcar rubia), la colonización de este microorganismo en las radículas de las plántulas de maca, se usaron estas semillas porque en el futuro se piensa realizar la peletización en maca y es importante asegurarse que la cepa colonice la radícula de maca para que esta pueda expresar su capacidad PGPR sobre la maca. También se evaluó los diferentes tipos de adhesivos y cubiertas para la preparación de los pellets, la supervivencia de la cepa Ps42 en la semilla peletizada y finalmente su efecto en la promoción del desarrollo de las plántulas de trébol. Se observó que el tiempo de duplicación fue de 142, 181, 81 y 1062 min en los medios LMC, A, G y AG, respectivamente. En cuanto a la colonización, fue mayor el día 7 post-inoculación y disminuyó con el tiempo. Asimismo en el día 7 el peso seco fue significativamente mayor ($P = 0,0003$, $P = 0,015$) que el control en 0.0002 g tanto en la raíz como en la parte aérea. Por otro lado, la cubierta conformada por arcilla:cal:aserrín (99:1:10) en combinación con el adhesivo conformado por la mezcla del inoculante y agua azucarada a una concentración final de azúcar de 50%, mostró la mejor estructura de pellet. En cuanto a la evaluación de supervivencia del inoculante en el pellet, el tratamiento PG (pellet+G) presentó una supervivencia significativamente mayor ($P = 0,001$) de la cepa Ps42 respecto al tratamiento PLMC (pellet+LMC) en 31% al tercer día de almacenamiento. Además, en la evaluación de la promoción del desarrollo de semillas de trébol peletizadas, los tratamientos PLMC y PG mostraron una tendencia a incrementar los pesos secos de las plántulas con respecto al control N+, en 13,26% y 13.02% respectivamente. Por lo tanto se recomienda usar el medio de cultivo G y LMC en la preparación de inoculantes para estimular el desarrollo del trébol así como para la elaboración de semillas de trébol peletizadas.

Palabras clave: *Pseudomonas sp.*, curva de crecimiento, peletización.

SUMMARY

The successful establishment of a crop depends on different factors such as temperature, climatic conditions, soil pH, pathogen organisms, moisture, method of soil cultivation, seeds viability, amongst others. A way to control some of these factors is to apply coated biological inoculants on the seeds. Coatings can influence the microenvironment of each inoculated seed, protecting it from negative factors. The objective of this study was to assess the effect of clover seeds pelleting with Ps42 strain (*Pseudomonas sp.*) in promoting growth of *Trifolium pretense*. To this end, YEM (Yeast Extract - Manitol), A (sugar - Manitol), G (Monosodium glutamate – Manitol) and AG (Sugar – Monosodium glutamate) media were used and the radicle colonizing capacity of strain Ps42 in maca seedlings was assessed. Maca seedlings were used because it is the aim to carry out pelleting of maca seeds in the future; therefore, it is important to ensure that strain Ps42 is able to colonize maca radicle so that Ps42 strain can express PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) capacity in this crop. Different pelleting materials, Ps42 strain survival in pelleted clover seeds and the effect of pelleting in clover seedling development were also assessed. The duplication times using YEM, A, G and AG culture media were: 142, 181, 81 y 1062 min respectively. Furthermore, colonization was higher on the seventh day post-inoculation and decreased through time, on this day the dry weight was significantly higher ($P = 0,0003$; $P = 0,015$) than control in 0.0002g on both, root and aerial part. On the other hand, coating based on a combination of arcilla:cal:aserrín (99:1:10) and inoculants with sugary water (final concentration of 50% sugar), presented the best pellet structure. PG (pellet+G) treatment showed a significantly better survival of Ps42 strain ($P=0.001$) than PLMC (pellet+LMC) in 31% on the third day of storage. In addition, the PLMC and PG treatments showed to increase the dry weight compared with control N+, in 13.26% and 13.02% respectively. Hence, we recommend using G and LMC culture media for biological inoculants production to stimulate clover growth, as well as to produce pelleted clover seeds.

Keywords: *Pseudomonas sp.*, growth curve, pelleting.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la agricultura es una actividad económica que se da desde la época prehispánica, para ello se han utilizado diferentes tipos de fertilizantes, uno de los más importantes es el guano de las islas que ha sido ampliamente utilizado desde la antigüedad y cuya aplicación ayuda en el incremento de producción de diferentes cultivos de interés.

En la actualidad los agricultores, con el fin de obtener mayores rendimientos en menor tiempo utilizan fertilizantes químicos, lo que viene provocando gran deterioro ambiental: contaminación de aguas, erosión y cambios en la estructura físico-química del suelo así como una drástica disminución de la biota edáfica (Justic *et al.*, 1995; Rabalais *et al.*, 1996; Tejada *et al.*, 2005). La disminución de estos daños sólo será posible mediante el uso de tecnologías limpias, como la biofertilización o uso de inoculantes biológicos. Este método utiliza microorganismos del suelo como inoculantes en la mejora de los cultivos, y se plantea como una alternativa segura, efectiva y económica para recuperar la productividad de los suelos (Mahecha, 2002). Sin embargo, la disminución en los costos de la producción industrial de estos inoculantes biológicos o inoculantes microbianos se presenta como un reto, debido a que los microorganismos deben conservar su capacidad promotora de crecimiento vegetal y sobrevivir en la semilla por un periodo de tiempo necesario para que estas puedan estar activas durante la siembra y crecimiento de la planta en campo. Es así que la técnica denominada peletización surge como una posible alternativa para la permanencia del inoculante microbiano en la semilla.

El presente trabajo tiene como objetivo mejorar el sistema de peletización de semillas utilizando el trébol como modelo, evaluando diferentes tipos de sustancias adhesivas y de cubiertas en la preparación de los pellets. Asimismo se probaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción del inoculante. Evaluándose el efecto de los peletizados en la emergencia de las semillas de trébol y su supervivencia al almacenamiento.

Objetivo general

- Evaluar el efecto en la promoción de crecimiento de la peletización de semillas de *Trifolium pratens*. inoculadas con *Pseudomonas sp.* (Ps42) aislada de la rizósfera de maca.

Objetivos específicos

- Determinar la curva de crecimiento de la cepa Ps42 en estudio al reemplazar las fuentes de carbono y/o nitrógeno en el medio de cultivo.
- Evaluar la colonización de la cepa Ps42 en la radícula del cultivo de maca.
- Desarrollar y seleccionar la cubierta y adhesivo adecuados para la formulación de semillas peletizadas de trébol.
- Determinar la supervivencia de la cepa Ps42 en las semillas peletizadas de trébol.

Hipótesis

- La peletización de semillas de *Trifolium pratense* inoculadas con *Pseudomonas sp* tienen efectos positivos en el desarrollo de esta Fabaceae.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Trifolium pratense* (trébol rojo)

El trébol rojo es una Fabaceae, originaria del Atlántico norte y centro de Europa y del Mediterráneo, los Balcanes, Asia Menor, Irán, India, Himalaya, Rusia del Ártico al sur de Siberia Oriental, el Cáucaso y el Lejano Oriente. Se extendió a Inglaterra en 1650 y fue traído a América por los colonizadores británicos (Frame, 1998), adaptándose muy bien entre los 2500 m.s.n.m (zona de quebrada) y los 4000 m.s.n.m (zona de puna) de la serranía peruana (Martínez, 1976).

Es conocida y utilizada para mejorar los suelos debido a su alta capacidad de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Flores *et al.*, 1992, citado por Rodriguez, 2008). Produce un rendimiento en materia seca que varía entre 1.8 a 3.3 Tn. ha⁻¹, con un contenido de aproximadamente el 19% de proteína bruta, 1.8 a 2.1% de calcio y 1.4% de fósforo (Cárdenas y Ruiz, 1983; Ruiz y Tapia, 1987. Citado por Rodriguez, 2008).

Es utilizado en sistemas de rotación trigo-leguminosa, debido a los buenos resultados en la producción de diversos cultivos y a su efecto positivo sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo (Wortmann *et al.*, 2000).

Trifolium pratense es perenne de poca duración, desarrolla ligeramente una corona encima de la superficie del suelo, que consiste en una acumulación de brotes formados en la base de la planta. Las yemas basales producen, tallos huecos verticales, pubescentes, de 60-80 cm. Estos brotes son más numerosos en floración tardía que los tipos de floración temprana. Pasa el invierno como un rizoma con una corona. Las hojas son trifoliadas, pubescentes y alternadas con una mancha pálida invertida, en forma de medialuna en la superficie media-superior (Langer, 1981. citado por Rodriguez, 2008). La raíz principal se extiende a un metro o más de profundidad, pero las plantas más viejas tienen raíces adventicias y laterales, principalmente provenientes de la corona. Las inflorescencias terminales constan de racimos compuestos con numerosas flores de color rosa o púrpura. Las flores se cruzan polinizadas por abejorros y abejas. Las vainas contienen una o dos semillas en forma de riñón, que son de color amarillo, marrón o púrpura en color, con semillas de color púrpura que es generalmente más pesado que los otros.

La semilla puede ser de color marrón a púrpura teniendo tres veces mayor tamaño que trébol blanco. Por lo que contiene entre 441 000 a 661 000 semillas/kg.

2.1.1 Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Trifolium*

Especie: *Trifolium pratense*

2.2 *Lepidium meyenii* (maca)

La maca, *Lepidium meyenii* Walpers, es una Brassicaceae nativa de los andes peruanos cultivadas principalmente en la meseta de Bombón, departamento de Junín; entre los 3700 y 4500 msnm. (Marín-Bravo, 2003). Dicha zona se caracteriza por sus bajas temperaturas, suelos ácidos (pH = 4.27-5.26) (Zúñiga, 2009), alta irradiación solar y frecuentes heladas. León (1964) reportó a la raíz de la maca como cultivo empleado desde tiempos precolombinos como planta medicinal y alimenticia. La medicina tradicional peruana hace mención entre sus principales propiedades la de estimulante de la reproducción, energizante y revitalizadora (Tovar, 2001). La raíz posee 11 % de proteínas calculadas en materia seca y 14 % en pasta de maca donde encuentran aminoácidos como ácido aspártico, glutámico, serina, histidina, glicina, treonina, cistina, alanina, arginina, tirosina, fenilalanina, valina, metionina, isoleucina, lisina, así como ácidos grasos, carbohidratos, lípidos y proteínas (Dini *et al.*, 1994)

Morfológicamente la maca se describe como una planta típica de la puna andina, de porte arrosetado; presenta una corona de hojas basales que surgen por encima de un eje carnoso en el suelo (Chacón, 1990; León, 1964; Marín-Bravo, 2003; Tello *et al.*, 1992). El cultivo es considerado bianual y presenta una fase vegetativa en la que se produce el crecimiento y expansión del órgano de reserva y una fase reproductiva, caracterizada por la producción de flores y frutos. Sin embargo, durante los años de condiciones climáticas favorables

(ausencia de heladas y abundante humedad) las plantas pueden completar su ciclo reproductivo en un año (Quiroz y Aliaga, 1997).

2.2.1 Taxonomía

Es la única representante de la familia Brassicaceae cultivada en la Puna. En 1893, Walpers denominó a la maca con el nombre de *Lepidium meyenii* (Obregón, 1998), Chacón (1990) reportó en una revisión botánica de muestras de maca cultivados en los Andes Centrales, como una especie nueva *Lepidium peruvianum*. Siguiendo el principio de prioridad de Código Internacional de Nomenclatura Botánica la maca debería denominarse *L. meyenii*.

Ubicación taxonómica de la maca (Seminario, 2004)

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida o Dicotiledónea

Sub clase: Dilleniidae

Orden: Capparales

Familia: Brassicaceae o Crucífera

Tribu: Lepidieae

Especie: *Lepidium* sp.

2.3 Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) habitan en la rizósfera de las plantas y pueden ser de vida libre o simbiótica. Alguno de ellos pueden tener los siguientes efectos positivos: incrementar la germinación, mejorar la colonización de las raíces, estimular el crecimiento de las plantas, realizar actividades de control biológico, inducir resistencia a patógenos, producir fitohormonas, mejorar la asimilación de agua y nutrientes (Dileep y Dubet, 1992; Essaid *et al.*, 2000), entre otras características. En la agricultura estos microorganismos son usados principalmente para mejorar el rendimiento de la producción agrícola y proteger a las plantas de algunas enfermedades (Nowak *et al.*, 1998; Nowak y Lazarovits, 1997). Dentro de éste grupo de microorganismos se destacan los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989) *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Bashan y Holguin, 1997).

2.3.1 Género *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas*, descrito morfológicamente por primera vez por Migula en el año 1894 (Palleroni, 1984; citado por Scarpellini *et al.*, 2004), es utilizado para nombrar un amplio grupo de cepas bacterianas Gram-negativas, móviles (Scarpellini *et al.*, 2004), pueden presentar flagelos laterales cortos, también se han descrito la presencia de uno o varios flagelos polares (Del Castillo, 2008). Son consideradas ubicuas, juegan un rol importante en el reciclaje de nutrientes, tienen una amplia distribución en el medio ambiente y constituyen una parte importante de la comunidad microbiana del suelo (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Son aerobias, no fermentativas y con un metabolismo respiratorio estricto con oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en algunos casos el nitrato puede ser usado como aceptor alternativo de electrones, permitiendo el crecimiento anaerobio. La mayoría de especies son organotrófas y se cultivan a pH neutro, a temperaturas de mesofilia y no requieren factores de crecimiento (Del Castillo, 2008). Cuando se cultivan en alcanos o gluconatos pueden formar poli-hidroxicanoatos (Haywood *et al.*, 1990).

Las *Pseudomonas* de interés humano pueden ser causantes de enfermedades, biodegradadoras, controladoras biológicas y PGPR. Dentro de los beneficiosos que brinda alguna de las cepas de este género para el desarrollo de las plantas se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes, la producción y segregación de reguladores de crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, biocontrol de patógenos, desarrollo de las raíces, entre otros (Pan *et al.*, 1999). Destacándose las especies de *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *P. putida* (De Freitas y Germida, 1990; De Freitas y Germida, 1991; De Freitas y Germida, 1992).

Este género por las características antes mencionadas continúa siendo investigado en varios cultivos de importancia para la dieta humana, por ejemplo en *Solanum tuberosum* se han hecho ensayos con la *Pseudomonas* spp. (Frommel *et al.*, 1991; Kloeper *et al.*, 1989), en cuanto al tomate se han utilizado *Pseudomonas fluorescens* (Gagné *et al.*, 1993) y *Pseudomonas* spp. (Van Peer *et al.*, 1990), en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays*) se han realizado ensayos con *Pseudomonas* sp. (Santillana, 2006). Hasta el

2008, se han descrito aproximadamente 60 especies del género *Pseudomonas* y se han secuenciado el genoma de cinco especies diferentes, los cuales indican que todas ellas comparten un conjunto de 2000 genes de un total de 5000 a 6000 genes presentes en sus correspondientes genomas (Del Castillo, 2008). Nelson (2002) afirma que las cepas ino­cuas a diferencia de las patógenas, no portan los genes que codifican exotoxinas, enzimas hidrolíticas específicas, factores a respuesta hipersensitiva y sistemas de secreción tipo III. En contraste ambas cepas (patógenas e ino­cuas), expresan genes para la síntesis de polímeros, adhesivos, pili tipo IV, adhesinas, proteínas relacionadas con el estrés.

El género se caracteriza por tener elevada versatilidad metabólica, utilizando una amplia gama de compuestos orgánicos como los hidratos de carbono, ácidos alifáticos, a­minas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos y alcoholes. (Del Castillo, 2008; Palleroni, 1993; Ridgway, 1990; y Stainer *et al.*, 1966)

El catabolismo de carbohidratos se caracteriza por no utilizar la ruta de Embden-Meyerhof provocado por la ausencia del gen que codifica la enzima fosfofructokinasa, la cual convierte la Fructosa-6-P en Fructosa-1,6-bisP (Raps y De Moss, 1962; Wood y Schwerdt, 1954; citados por Del Castillo, 2008; Moat *et al.*, 2003; Tiwari y Campell, 1969). En lugar de esta vía metabólica, la mayoría de *Pseudomonas* usan la via Entner-Doudorof (Spangler y Gilmour, 1966), la cual se descubrió en *Pseudomonas saccharophila*. (Entner y Doudorof, 1952 citado por Del Castillo, T. 2008, Stern *et al.*, 1960;). En la figura 1, se muestra el metabolismo de la glucosa, gluconato, 2-cetogluconato, manitol, sorbitol y fructosa descubiertas en *Pseudomonas saccharophila*. Eckford *et al.*, (2002), afirma la capacidad del género *Pseudomonas* de utilizar hidrocarburos en ambientes deficientes de nitrógeno.

2.3.2 Taxonomía

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: Pseudomonas

2.4 Colonización de las radículas en las semillas de maca.

La colonización de las raíces por microorganismo puede dar origen a enfermedades cuando se trata de patógenos o estimular el desarrollo de éstas, controlando ciertas plagas mediante la producción de metabolitos antimicrobianos, o degradando contaminantes químicos peligrosos para la planta o el hombre (Rainey 1999).

En cuanto al género *Pseudomonas*, la colonización de raíces y la actividad que promueve el crecimiento de las plantas han sido intensamente estudiadas (Berg y Smalla, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2001), encontrándose que una de sus principales características es la facilidad para colonizar las raíces de las plantas (Hansen *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2000).

La colonización puede realizarse en el interior de la radícula (endófito) o en la superficie, como lo demuestra estudios anteriores con esa bacteria presentes tanto, en la superficie como en la endorizosfera del cultivo de tomates (Van Peer *et al.*, 1990).

Así mismo se ha reportado que los microorganismos usan como fuente de alimento los exudados de la raíces (Lugtenberg y Dekkers, 1999) que son ricos en carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Davey y O'Toole, 2000; Knee *et al.*, 2001).

Por otro lado, el establecimiento exitoso y eficiente de microorganismo presentes en la rizósfera juegan un rol central para el uso de PGPR dentro de las prácticas agronómicas (Buddrus -Schiemann *et al.*, 2010).

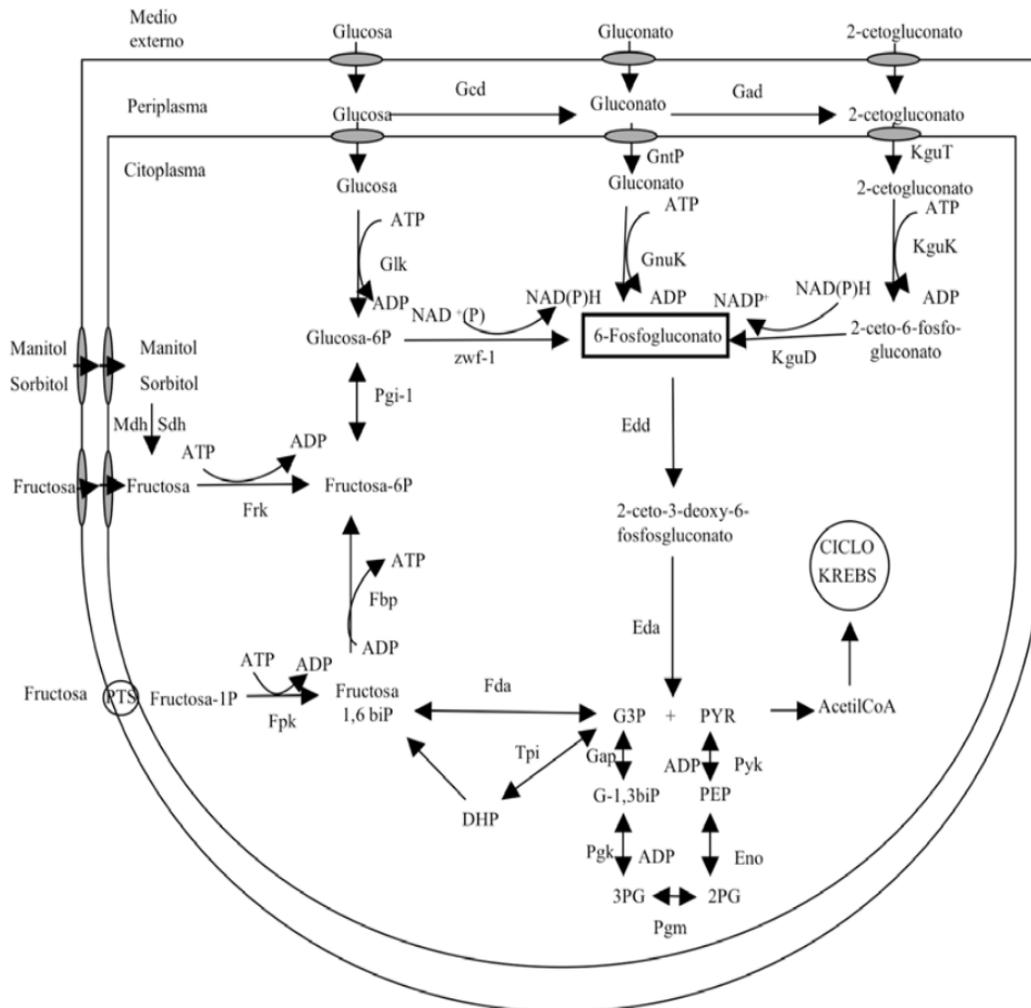


Figura 1. Metabolismo de la glucosa, gluconato, 2-cetogluconato, manitol, sorbitol y fructosa en bacterias del género *Pseudomonas*. Abreviaciones: Ged, glucosa deshidrogenasa; Gad, gluconato deshidrogenasa; Mdh, manitol deshidrogenasa; Sdh, sorbitol deshidrogenasa; Glk, glucoquinasa; Zwf, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; GnuK, gluconoquinasa; Kgu, 2-cetogluconato quinasa; KguD, 2-cetogluconato-6-fosfato reductasa; Edd, 6-fosfogluconato deshidrataza; Eda, 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato aldosa; Pgi, glucosa-6-fosfato isomerasa; Fbp, fructosa-1,6-bifosfatasa; Fda, fructosa-1,3-bifosfato aldolasa; Pgi, glucosa-6-fosfato isomerasa; Fbp, fructosa-1,6-bifosfatasa; Fda, fructosa-1,3-bifosfato aldolasa; Fpk, fructosa-1-fosfato quinasa; Frk, fructoquinasa; PTS, sistema de transporte fosfotransferasa de fructosa; GntP, transportador de gluconato; KguT, transportador de 2-cetogluconato; Tpi, triosa fosfoato isomerasa; Gap, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Pgk, 3-fosfoglicerato quinasa; Pgm, fosfoglicerato mutasa; Eno, enolasa; Pyk, piruvato quinasa; PYR, piruvato; PEP, fosfoenolpiruvato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; G1,3biP, glicerato-1,3-bifosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato. Blevins *et al.*, 1975 citado por Del Catillo, 2008)

2.5 Peletización de semillas

La peletización se define como la aplicación de suficiente material inerte alrededor de las semillas para formar una pequeña esfera (CIAT, 1991), llegando a pesar aproximadamente diez veces su peso.

El establecimiento exitoso de una semilla depende de varios factores como el vigor de la semilla, tipo de suelo y su fertilidad, condiciones climáticas, método de cultivo, presencia o/y ausencia de organismos antagonistas o benéficos como insectos, entre otros. El agricultor solo puede controlar algunos de estos factores, por ejemplo el uso de fertilizantes químicos para mejorar la fertilidad de los suelos, lo cual es costoso y con el tiempo podría contaminar los suelos. Una alternativa para controlar estos factores es peletizar las semillas, es decir crear una barrera entre el medio exterior y la semilla que la proteja de factores perjudiciales externos y mantenga el tratamiento que se le esté aplicando a las semillas. En la figura 2. se muestra un esquema de los factores presentes en la semilla peletizada (Scott, 1989).

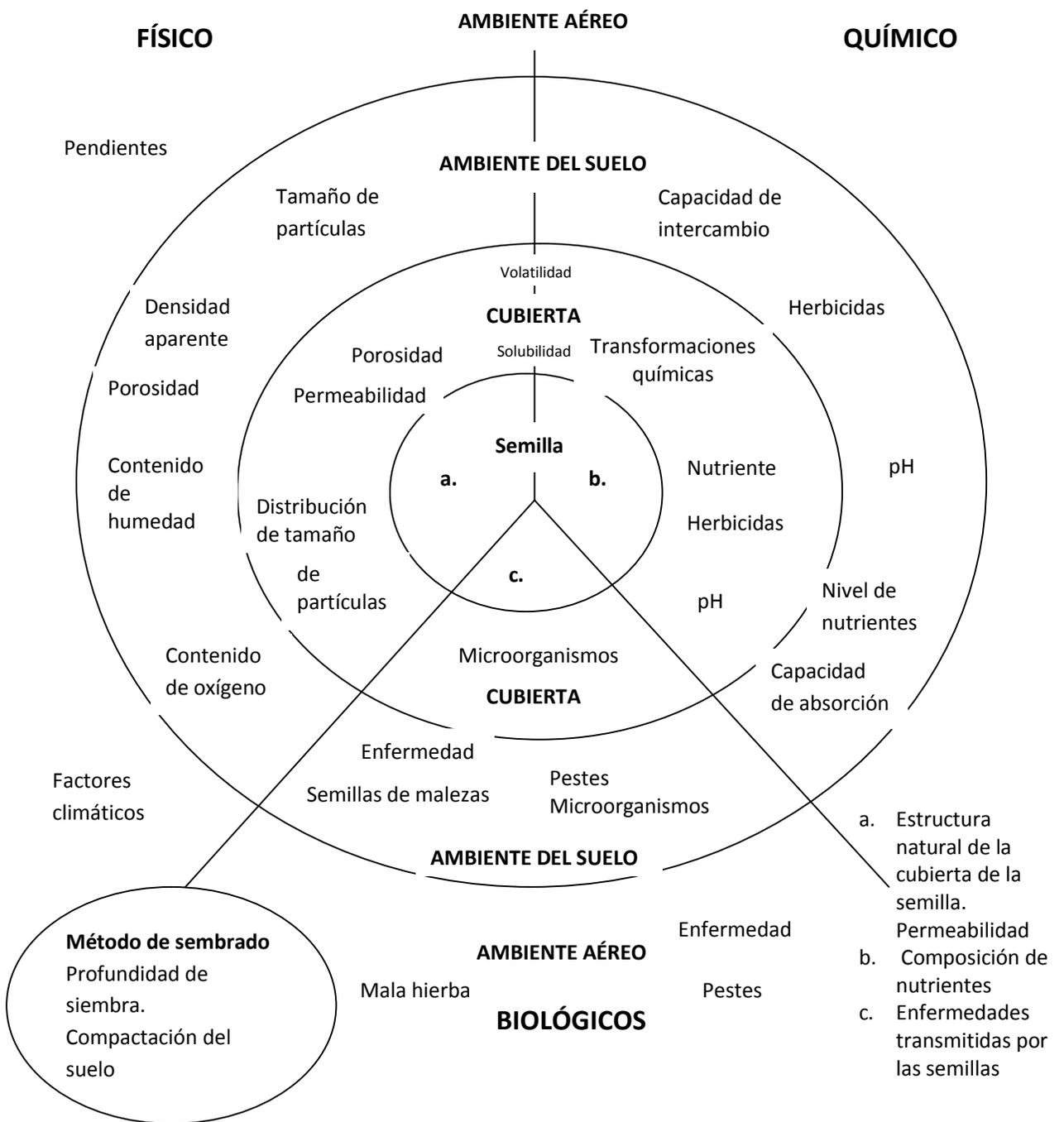


Figura 2. Diagrama de la relación entre factores que afectan el funcionamiento de semillas peletizadas. (Scott, 1989).

2.5.1. Proceso de las semillas peletizadas

Los pasos para realizar la peletización consisten en recubrir las semillas con un material inerte, la cantidad dependerá del material usado y del tamaño de la semilla. Es necesario tener un exceso de éste material para asegurar un buen recubrimiento de la semilla, es importante resaltar que el material de cubierta se adiciona todo a la vez antes de empezar a mezclar. Después de peletizadas las semillas se dejan extendidas el tiempo necesario para que sequen y endurezcan los pelets. Este paso es importante, porque con esto se evita que los pellets se descascaren. (CIAT, 1988)

A. Adhesivos

Conocidos como goma o stickers, el proceso de peletización requiere del uso del adhesivo, porque cuando se prescinde de éstos y solo se usa agua, por ejemplo, la cubierta es frágil y puede quebrarse con facilidad. Entre los adhesivos usados, se encuentra la goma arabiga, metil celulosa, gelatina y caseína, caseinato, agua azucarada.

B. Material de cubierta

Los materiales más comunes son la cal, yeso, dolomita, carbonato de calcio y roca fosfórica, vermiculita.

2.5.2 Ventajas de las semillas peletizadas

La peletización, gracias a la característica de encapsulamiento de la semilla es una tecnología atractiva para los agricultores ya que permite el establecimiento exitoso de un cultivo agronómico. Este depende de varios factores como vigor de semilla, tipo de suelo y fertilidad, condiciones climáticas, ausencia o presencia de organismos antagonistas o benéficos como insectos, micorrizas u otras plantas. Los agricultores pueden controlar algunos de estos factores aplicando herbicidas o fertilizantes químicos. Sin embargo, la aplicación de estos compuestos químicos puede ser costosa y el uso inadecuado podría causar grandes pérdidas económicas, degradación física y pérdida biológica del suelo. El uso de inoculantes, se convierte entonces, en una alternativa amigable con el medio ambiente, ya que su aplicación a los campos de cultivo favorece la disminución de fertilizantes químicos que ocasionan la degradación de suelos (Alarcón *et al.*, 2000). En la actualidad, la inoculación con poblaciones microbianas no es muy bien entendida y es

escasamente usada en el sector agrícola. Además, es importante recalcar que tratándose de microorganismos vivos, es importante tener un cuidado especial en el mantenimiento de la carga microbiana óptima para su buen funcionamiento en el campo. La combinación de la inoculación bacteriana, junto con una sustancia pegajosa, seguida por la cubierta, sería la combinación del inoculante biológico con la peletización. Este sistema crearía una barrera entre el exterior y la semilla formando un microambiente para el inoculante biológico. Esto sería una alternativa para disminuir la pérdida de poblaciones microbianas del inoculante y hacer más fácil el manejo de las semillas.

Se han realizado investigaciones con diferentes tipos de cubiertas como dolomita, roca fosfórica, carbonato de calcio, vermiculita en combinación con goma arábica, metil etil celulosa, agua azucarada, como adhesivos, obteniéndose buenos resultados en semillas de trébol (Lowther, 1975), tomate (Goviden-Soulange, 2008), papa (Kloepper, 1980).

Esta técnica puede ser usada para mejorar la producción agrícola, en cultivos como la remolacha (*Beta vulgaris*) se requiere tener una siembra de precisión la cual no se puede lograr en condiciones naturales de la semilla.

Por otro lado, facilitaría la siembra aérea provocando el incremento de las áreas de cultivo en regiones de suelos arenosos o en áreas de sabana. Éste es el caso de las semillas *Andropogon gayanus* en Brasil, las cuales son livianas y pilosas (CIAT, 1991). Cook (1980) afirma que ésta técnica ayudaría al establecimiento de semillas grandes sembradas superficialmente, pero que en general, no aportaría beneficios importantes para el cultivo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM.

3.2 Materiales

3.2.1 Material Biológico

a. Material Vegetal Semillas de maca proporcionadas por la empresa Ecoandino SAC.
Semillas de trébol rojo proporcionadas por Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM.

b. Microorganismo

Pseudomonas sp. (Ps42) emparentada con *P. reinekei* MT1^T y *P. vancouverensis* DhA-51^T del banco de germoplasma del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” (Zuñiga, 2009).

3.2.2 Materiales y equipos de laboratorio

a. Medios de Cultivo

- Caldo Levadura Manitol (LMC)
- Agar nutritivo

b. Soluciones y Reactivos

- Ajinomotto
- Alcohol al 70 %.
- Azúcar
- Boro
- Buffer pH 4 y 7.
- Buffer sodio fosfato (pH 7-0,1M)
- Calcio
- Carbonato de calcio
- Cobalto
- Cobre

- Fierro
- Fosforo
- Goma arábica
- Hipoclorito de Sodio a 1.5 %.
- $K_3Fe(CN)_6$
- $K_4Fe(CN)_6$
- Kanamicina (20 000 ug/ml)
- KNO_3
- Magnesio
- Manganeso
- Molibdeno
- Potasio
- Solución HCl, 1N.
- Solución NaOH, 1N.
- Solución nutritiva N+
- Solución salina a 0.85 %.
- Streptomina (20 000 ug/ml)
- X-Gluc (20 mg/ml)
- Zinc

c. Equipos de Laboratorio

- Autoclave vertical (Barnstead).
- Balanza analítica (Sartorius).
- Baldes plásticos.
- Beakers (50 ml, PIREX).
- Bolsas de papel.
- Cámara fotográfica digital (Sony CyberShot).
- Congeladora de $-80^{\circ}C$ (Sanyo).
- Equipo de Baño María (Mettler).
- Espectrofotómetro (Genesys 6 – Thermo Electron Corp.)
- Estufa eléctrica de $28^{\circ}C$.

- Horno microondas (Samsung).
- Matraces Erlenmeyer (100 ml, 500 ml)
- Mechero Bunsen.
- Micropipeta automática (200µl, 1 ml,Nichipet EX)
- Microcentrífuga *Sigma*
- Microscopio (Leica DM750)
- Placas Petri desechables 100 x 15”
- Pinzas de metal
- Pipetas graduadas. (10, 25 ml)
- Probetas.(50, 1000 ml)
- Refrigeradora (Bosch)
- Refrigeradora de fotoperiodo de 10 horas de luz blanca y 14 horas de oscuridad
- Tamiz (500 µm)
- Tubos de prueba 25 x 250 mm (Pirex).
- Vórtex (Gemmy UM-300)

d. Polvos

- Aserrin
- Arcilla
- Cal
- Carbonato de calcio
- Yeso

3.3 Métodos

3.3.1 Reactivación de las cepas

La cepa de *Pseudomonas sp.* (Ps42) se obtuvo del Banco de cepas del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso reactivándose en agar nutritivo.

3.3.2 Curva de crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivo

Se determinó la curva de crecimiento de la cepa Ps42 en cuatro caldos de cultivo diferentes LMC, A, G y AG donde se reemplazaron las fuentes de carbono y nitrógeno, considerándose como medio base el LMC (extracto de levadura – manitol) (Vicent, 1970) . En el medio A se reemplazó la fuente de carbono por azúcar rubia, considerando nueva formulación en donde la proporción de carbono fue de 2:1 con respecto al medio base. En el medio G se reemplazó la fuente nitrogenada por glutamato monosódico y se obtuvo una proporción de nitrógeno de 10:13 con respecto al medio LMC. Por último, en el medio AG se sustituyeron las fuentes de carbono y nitrógeno por azúcar rubia y glutamato monosódico, respectivamente, en la Tabla 1 se muestra la composición de los cuatro medios de cultivo. Para cada caso, se preparó un inóculo inicial tomando una colonia típica de la cepa Ps42 sembrándose luego, en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo casoy e incubándose a 28°C a 150 rpm hasta obtener una biomasa de 10^8 UFC/ml. Posteriormente el pre-inoculo se sembró en cantidades necesarias para obtener una concentración de 10^3 UFC/ml en cada uno de los medios de cultivo. A partir de ese momento se midió la densidad óptica de los 4 medios de cultivos a 600 nm cada 9 horas por un periodo de 200 horas aproximadamente y se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por mililitro de cada medio de cultivo (UFC/ml). También se determino el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial, las formulas para estos cálculos se presentan en la Tabla 2 (Carrillo, 2003). Se seleccionaron los medios de cultivo donde las cepas presentaran un mayor tiempo de supervivencia.

Tabla 1. Composición del medio LMC y medios modificados.

Ingrediente	Composición (g/l)			
	LMC	A	G	AG
Fosfato de potasio	0.5	0.5	0.5	0.5
Sulfato de magnesio	0.2	0.2	0.2	0.2
Cloruro de sodio	0.1	0.1	0.1	0.1
Manitol	10		10	
Azúcar rubia		10		10
Extracto de levadura	0.5	0.5		
Glutamato de sodio			0.5	0.5

Tabla 2. Formulas para la determinación de los parámetros de crecimiento de la *Pseudomonas sp.* en el medio de cultivo.

Td = t/n	Td: Tiempo de duplicación (min) T: Tiempo de duración de la fase exponencial n: números de generaciones
VEC = Ln2/g	VEC: Velocidad específica de crecimiento g: tiempo de generación

3.3.3. Ensayos de germinación con la bacteria PGPR

a. Desinfección de las semillas

Para el ensayo de germinación se desinfectaron las semillas de trébol rojo con alcohol al 70%, seguidamente se enjuagaron las semillas seis veces con abundante agua estéril, incorporándose posteriormente la lejía al 3% por espacio de 3 minutos, lavándose finalmente con agua destilada estéril (Zúñiga D., 2009).

b. Inoculación de la semilla en los medios seleccionados

Se sembró la cepa Ps42 en los medios de cultivo seleccionados y se incubó a 28°C hasta que alcanzaron una densidad de 10^8 UFC/ml. Posteriormente, se embebieron las semillas estériles con las suspensiones microbianas por un periodo de 15 minutos. Finalmente, se colocaron 25 semillas inoculadas en cada placa petri con Agar Agua al 0.8%, bajo oscuridad a 20 ± 2 °C (Ortiz, 2013). Se evaluó la germinación cada doce horas durante tres días y se cosecho el día siete. Los resultados se presentaron en porcentaje de germinación y biomasa seca en gramos.

3.3.4. Colonización de las raíces de maca

a. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para evaluar la colonización de la *Pseudomonas sp.* (Ps42) en la radícula de la plántula de maca, se evaluó la expresión del gen *gusA* insertada en la *Pseudomonas sp.* La bacteria utilizada fue obtenida del Banco de cepas del Laboratorio de Ecología microbiana y Biotecnología Marino Tabusso.

b. Germinación, inoculación y crecimiento de las plántulas de maca

Las semillas de maca fueron esterilizadas por inmersión consecutiva en hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos, enjuagadas con agua destilada estéril (seis veces) e hidratadas con agua estéril por 2 horas. Se colocaron 25 semillas por placa en medio agar agua al 0.8%, se dejó crecer en oscuridad y a 12 ± 2 °C hasta observar radículas de aproximadamente 1cm. Estas plántulas fueron cultivadas en condiciones asépticas en tubos (25mm x 150mm) conteniendo agar vegetal B&D 0.5% (Broughton y Dilworth, 1971). Las plántulas crecieron en un ambiente con condiciones controladas (12°C, 12 h luz, 12 h noche). Al día siguiente, un cultivo de *Pseudomonas sp.* en fase exponencial fue centrifugado (6000 rpm, 5 min) y lavado tres veces con 0.85% NaCl. Porciones de 100 µl de esta suspensión fueron inoculados directamente en el medio vegetal B&D de las plántulas de maca.

c. Tinción de las raíces inoculadas con X-gluc

Para distinguir los patrones de colonización fue necesario evaluarlos en 4 periodos de tiempo (3, 7, 15 y 28 días post – inoculación), las raíces fueron escindidas y cuidadosamente lavadas tres veces por inmersión consecutiva en 0.85% NaCl sin agitación durante 1 min. Las raíces lavadas fueron transferidas a tampón sodio fosfato (pH 7-0,1M) conteniendo 0.5 mg/ml X-gluc, 0.33 mg/ml $K_3Fe(CN)_6$, y 0.42 mg/ml $K_4Fe(CN)_6$ e incubadas a 37°C en oscuridad por 16 h. Después de la tinción, las raíces fueron lavadas tres veces en tampón fosfato (Vande Broek *et al.* 1998) y examinadas bajo un microscopio de luz (Leica DM750) para observar los patrones sitio específico de la colonización. Para cada uno de los tres tratamientos *Pseudomonas sp.* expresa el gen *gusA*, *Pseudomonas sp.* y control (sin inoculante), se utilizó 5 repeticiones, y el mismo ensayo se repitió en cuatro periodos de tiempo (3, 7, 15 y 28 días).

d. Efecto de *Pseudomonas sp.* sobre el crecimiento de las plántulas de maca *in vitro*

Se realizó un muestreo de la zona aérea y radicular, tomando como parámetros el peso de la plántula y longitud de las raíces. Las raíces luego de ser evaluadas en el item a. fueron secadas con papel toalla para quitar el exceso de humedad, se midieron la longitud de cada una de ellas, siendo luego llevadas a 35°C durante 24 h, posteriormente se pesaron con una balanza analítica (Sartorius[®]).

3.3.5 Prueba de supervivencia de las semillas de trébol peletizadas

Para este ensayo se usaron semillas de trébol debido a que esta leguminosa tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mejorando de esta forma los suelos de cultivo (Flores *et al.*, 1992, citado por Rodriguez, 2008). Asimismo el uso de esta semilla es precedente para la peletización en semillas de maca.

a. Preparación del inoculante líquido

Se seleccionaron los medios de cultivo que generaron valores altos de germinación. Para la preparación del inoculante se tomó una colonia típica de la cepa Ps42 y se sembró en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo casoy, incubándola a 28°C a 150 rpm durante 24 horas, luego se sembró 1 ml del inóculo en cada uno de los medios de cultivo elegidos y se

incubó a 28°C a 150 rpm, durante el periodo necesario hasta que la biomasa alcanzó una densidad de 10^9 UFC/ml (Benintende, 2010; Ferreira, 2011).

b. Preparación de las semillas peletizadas.

Para seleccionar la cubierta y adhesivo adecuados para la formación de las semillas de trébol peletizadas, se usó la combinación de dos tipos de adhesivos líquidos (azúcar y goma arábiga al 25%, 50%, 75%, 100%) y cinco tipos de cubierta estériles en polvo (carbonato de calcio, cal, arcilla, aserrín, yeso y la combinación entre éstas últimas, obteniéndose así un total de 90 tratamientos. Las semillas fueron desinfectadas según la metodología dada en el punto 6.3.1, y se esperó a que estuvieran secas. Se preparó una mezcla de 3 ml del adhesivo y el inoculante a una concentración de 10^8 (UFC/ml) estos últimos fueron elaborados por separado con los medios de cultivo LMC y G, en la proporción 1:1, luego en esta mezcla se embebieron 3 g de semillas. Posteriormente se les vertió la cubierta en polvo 5 veces el volumen de la mezcla inóculo-adhesivo (Kloepper y Schroth, 1980).

Con las cubiertas que formaron un pellet uniforme y consistente se realizó una prueba de germinación. Adicionalmente a este tratamiento se agregaron 4 tratamientos más, los que consistieron en semillas peletizadas con la(s) cubiertas que formaron un pellet sin inoculante al que denominaremos con la letra P, semillas sólo con inoculante elaborados con los medios LMC simbolizada con SILMC y con el medio G con SIG, y finalmente semillas sin inoculante denominada CONTROL. Se usaron placas con Agar Agua al 0.8% y se incubaron a 22 ± 2 °C en oscuridad durante 6 días.

c. Determinación de la supervivencia de los microorganismos inoculados en las semillas peletizadas.

El propósito de este ensayo fue asegurar que las células bacterianas presentes en los inoculantes y en las semillas peletizadas, se hallen vivas para que puedan tener algún efecto en la germinación de las semillas de trébol. Benintende (2010) recomienda para rizobios 1×10^3 UFC/semilla para producir una buena infección de las raíces.

Para la determinación de la supervivencia en las semillas peletizadas se prepararon nuevamente cuatro repeticiones por cada tratamiento escogidos en el ensayo anterior. Se

vertieron 20 semillas en 100 ml de solución salina y se agito vigorosamente con la finalidad de desprender de la semilla todo el recubrimiento, esta suspensión se denomina 1×10^2 , 1 ml de esta dilución se diluyó en 9 ml de solución salina, obteniéndose una dilución de 1×10^3 así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^6 (CIAT, 1988). Esta metodología se realizó con cada repetición. Los resultados se expresan en UFC/semilla de trébol.

d. Promoción de crecimiento a nivel de plántulas

En este ensayo se utilizaron potes o macetas de 13x16 cm con arena de río lavada, esterilizada y finalmente humedecida. Se instalaron siete tratamientos: semillas desinfectadas regadas con solución nutritiva (N+), semillas desinfectadas regadas con solución nutritiva sin nitrógeno (N-), semillas inoculadas con la cepa en el medio levadura-manitol (SILMC), semillas inoculadas con la cepa en el medio modificado con glutamato (SIG), semillas peletizadas con inoculante en medio levadura manitol (PLMC), semillas peletizadas con inoculante en medio modificado con glutamato (PG) y semillas peletizadas con el adhesivo (P), estos seis últimos tratamientos fueron regados con solución nutritiva sin nitrógeno (N-) y permanecieron 30 días a 22°C con fotoperiodo de 10 horas luz. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones con 50 semillas. Los parámetros a evaluar fueron porcentaje de emergencia, altura, peso fresco y seco de la radícula y la parte aérea.

3.3.6. Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar, realizándose un análisis de variancia y la prueba de comparaciones múltiples de Mínima Diferencia Significativa (LSD). Para esto se utilizó el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI*. Las desviaciones estándar y los gráficos se realizaron con el programa *Excel*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento de la *Pseudomonas sp.*

4.1.2 Reactivación de las cepas

La cepa *Pseudomonas sp.* tardaron en crecer 48 h en agar nutritivo a 28 °C. Presentando características propias de éste género, como son la presencia de olor típico y ligero atornasolamiento a contra luz.

4.1.3 Evaluación del crecimiento de la cepa en los cuatro medios de cultivo.

Para determinar si la sustitución del manitol y extracto de levadura, las cuales son fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo LMC, modifican el crecimiento de la *Pseudomonas sp.* Se evaluó su crecimiento en los medios LMC, A, G y AG. Tal como se explicó en la sección materiales y métodos, el medio A tuvo como fuente de carbono al azúcar rubia, el medio G al glutamato monosódico como fuente de nitrógeno y el medio AG se sustituyeron las fuentes de carbono y nitrógeno por azúcar rubia y glutamato monosódico, respectivamente. Se eligieron estas fuentes de carbono y nitrógeno por su uso doméstico, porque son asequibles y por su bajo precio. En este ensayo se evaluó la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas sp.* en los medios durante 200 horas (tabla 3).

De acuerdo con los datos de absorbancia (A_{600}) y concentración de células expresadas en $\text{Log}_{10} \text{UFCml}^{-1}$ de cultivo (Figura 3), el tiempo de duplicación de la bacteria fue de 142, 181, 81 y 1062 min en los medios LMC, A, G y AG respectivamente (tabla 3). La elevada versatilidad metabólica característica de este género (Del Castillo, 2008; Palleroni, 1993; Ridgway, 1990; y Stainer *et al.*, 1966) permitió que la *Pseudomonas sp.* crezca en los cuatro medios de cultivo.

En el estudio de la curva de crecimiento los resultados mostraron las fases de latencia, exponencial, estacionaria y muerte. En la primera etapa de crecimiento denominada fase de latencia, se caracteriza por el incremento de la actividad metabólica y una mínima división celular. Dicha fase mostró una duración aproximada de 2 h en los medios LMC, A y G, y 9 h para el medio AG (Figura 3). Los resultados demuestran que la cepa en los tres primeros medios pasa rápidamente a la fase exponencial. Sin embargo esto no ocurre con el medio AG, debido a que probablemente necesite más tiempo para sintetizar nuevas

enzimas que le permitan metabolizar los compuestos como el glutamato monosódico y el azúcar presentes en el nuevo medio de cultivo (Madigan et., al 1997).

La siguiente fase identificada fue la exponencial, en la cual las células se dividen en dos, estas en otras dos y así sucesivamente. En esta etapa se determinaron los parámetros tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento, ambos son valores característicos para cada tipo de microorganismo en un medio de cultivo determinado y son inversamente proporcionales entre sí, tal como lo indican sus unidades de medición (Tabla 3.). El valor de estos parámetros depende de factores internos como la capacidad de crecimiento del microorganismo, la actividad enzimática y el uso de rutas metabólicas alternativas además de factores externos como el ambiente en que se encuentran.

Los valores mayores del parámetro tiempo de duplicación fueron 181 y 1062 min en los medios A y AG, respectivamente. En cuanto a la velocidad específica los resultados mostraron para el medio G un valor de 0.008 min^{-1} , siendo superior en 0.004 min^{-1} al medio LMC, 0.005 min^{-1} al medio A y 0.007 min^{-1} al medio AG. (Tabla 3).

Una posible explicación para los altos valores del tiempo de duplicación y baja velocidad específica de los medios A y AG sería la presencia de azúcar rubia como fuente de carbono. A pesar que este sustrato provee a ambos medios el doble de fuente carbonada en comparación a los medios LMC y G, la actividad de la enzima invertasa (primera enzima del catabolismo de la sacarosa) probablemente sería baja, lo que podría ser provocado por factores externos como el pH neutro del medio de cultivo. Estudios han demostrado que esta enzima producida por *Thermotoga maritima* tiene una actividad óptima bajo condiciones ácidas (pH=4,5) (Campos *et al.*, 2007). Otra explicación sería la hidrólisis parcial de la sacarosa a glucosa y fructosa, provocando una disminución de la cantidad de fuente carbonada. Tanto la glucosa como la fructosa pueden ser metabolizadas por las *Pseudomonas sp.* debido a que la gran mayoría de este género tienen los sistemas de transporte y enzimas como las fructoquimasa y glucoquinasa necesarias para el metabolismo de la fructosa y glucosa, respectivamente (De Ley, 1960; Entner y Doudoroff, 1953 citados por Del Catillo, 2008).

Es probable que los valores de estos parámetros, tiempo de duplicación y velocidad específica, de la *Pseudomonas sp.* en el medio AG, tenga mayor influencia por la presencia del azúcar rubia que por la presencia del glutamato monosódico, debido a que este medio

tuvo la misma fuente de nitrógeno (glutamato monosódico) que el medio G y este último mostró el mayor valor de la velocidad específica (0.008 min^{-1}) y menor tiempo de duplicación (81 min) (tabla 3) en comparación a los medios de cultivo LMC, A y AG.

Los valores de los parámetros velocidad específica y tiempo de duplicación determinados en el medio G reflejan una buena adaptación de la *Pseudomonas sp.* en este medio de cultivo en comparación a los otros tres (LMC, A y AG), lo cual podría estar influenciado por la presencia de manitol y poco influenciado por la presencia de glutamato monosódico. El manitol presente en el medio G es directamente metabolizado por la *Pseudomonas sp.* lo que podría provocar el aumento de la velocidad específica y la disminución del tiempo de duplicación en el medio de cultivo AG.

En cuanto al medio LMC, el cual tiene en su composición al manitol como fuente carbonada presentó una menor velocidad específica (0.004 min^{-1}) y mayor tiempo de duplicación (142 min) en comparación al medio G. Esto pudo deberse a que la presencia del extracto de levadura presente en el medio LMC, el cual generó la necesidad de las células de expresar mayor variedad de enzimas catalíticas para degradar este sustrato, que es más complejo que el glutamato monosódico del medio G; provocando que la células tengan un mayor gasto energético, lo cual provocaría la disminución de su velocidad de crecimiento. Este sustrato, extracto de levadura, presente también en el medio A podría estar provocando el mismo efecto en la *Pseudomonas sp.*

La tercera fase fue la estacionaria, esta duró 72, 81, 171 y 54 h en los medios LMC, A, G y AG respectivamente, la culminación de esta etapa provoca el comienzo de la fase de muerte, la cual empezó después de las 126, 117, 216 y 153 h en los medios LMC, A, G y AG. La cual podría ser provocada por el agotamiento de la fuente carbono o nitrógeno en el medio de cultivo, también conocido como sustrato limitante, (Monod, 1942. Citado por Izquierdo *et al.*, 2004) o por la acumulación de alguna sustancia inhibidora producida por las *Pseudomonas sp.* dependiendo del metabolismo seguido por el microorganismo.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de la *Pseudomonas sp.* utilizando los medios de cultivo LMC, G, A y AG.

	Tratamientos			
	LMC	G	A	AG
Tiempo de duplicación (min)	142	81	181	1062
Velocidad específica de crecimiento (min^{-1})	0.004	0.008	0.003	0.001

LMC: medio de cultivo Extracto de levadura-manitol, G: medio de cultivo glutamato monosódico-manitol, A: azúcar rubia-extracto de levadura y AG: medio de cultivo azúcar rubia-glutamato monosódico.

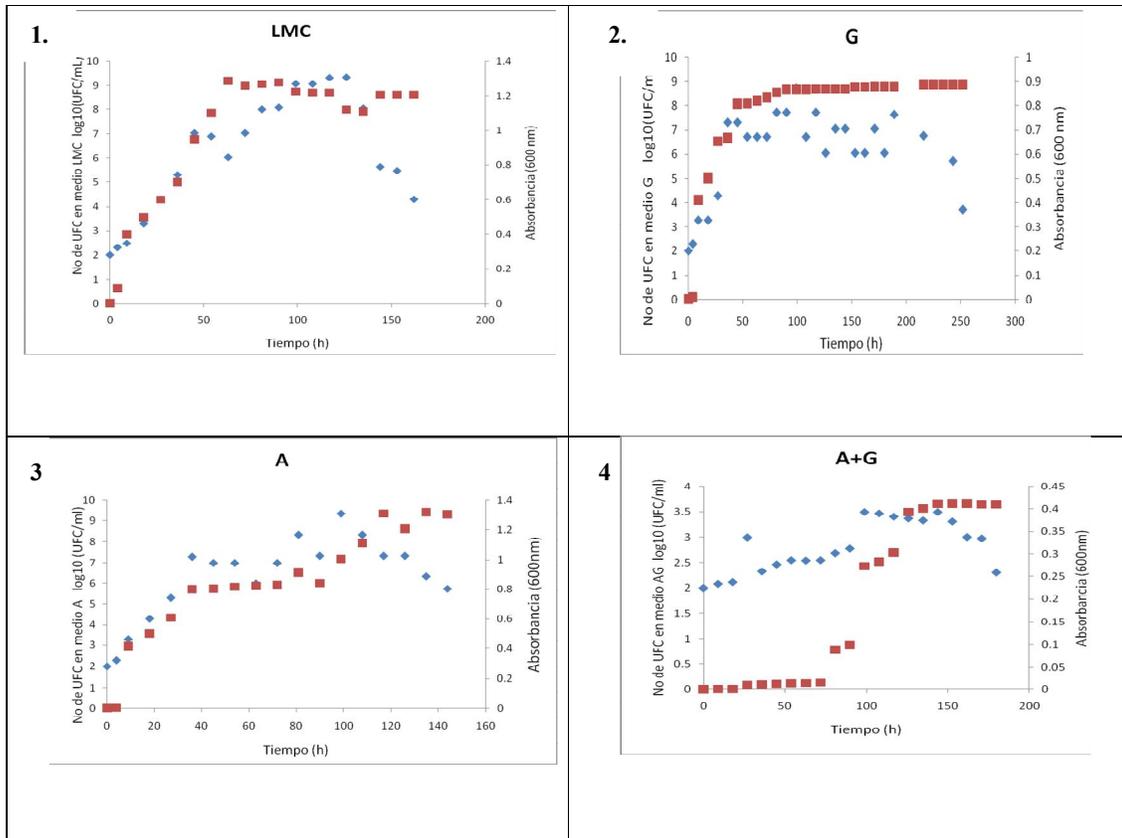


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas sp.* en los medios LMC (1), G (2), A (3) y AG (4) a 28°C. Datos de los valores de absorbancia (■). Datos de concentración de células en Log_{10} UFCmL⁻¹ de cultivo (◆).

4.1.4 Germinación de semillas de trébol rojo

A partir del ensayo anterior, se tomaron sólo los medios que presentaron los mayores valores de velocidad específica, porque la obtención necesaria de unidades formadoras de colonia por mililitro en el menor tiempo significaría la disminución del costo en la producción de inoculantes. Los medios seleccionados fueron LMC, A y G donde la *Pseudomonas sp.* mostró velocidades específicas de 0.004, 0.008 y 0.003 min^{-1} respectivamente (Tabla 3).

Se evaluaron los medios de cultivo LMC, A, G y el control. El inoculante elaborado con el medio G, mostró una tendencia de aumentar el porcentaje de germinación, encontrándose a las 48 h un porcentaje de germinación significativamente mayor en comparación con los otros tres tratamientos, superando en 20% y 12% al control y al inoculante LMC respectivamente (Figura 4 y 5, Anexo 3-E1).

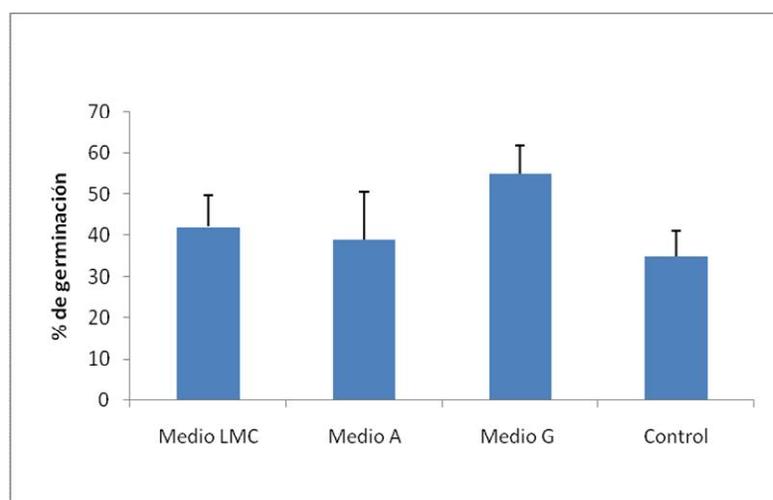


Figura 4. Porcentaje de germinación del trébol a las 48 horas por la *Pseudomonas sp.* LMC: semillas inoculadas con Ps42 en medio LMC; A: semillas inoculadas con Ps42 en medio A; G: semillas inoculadas en medio G; Control: semillas embebidas con agua.

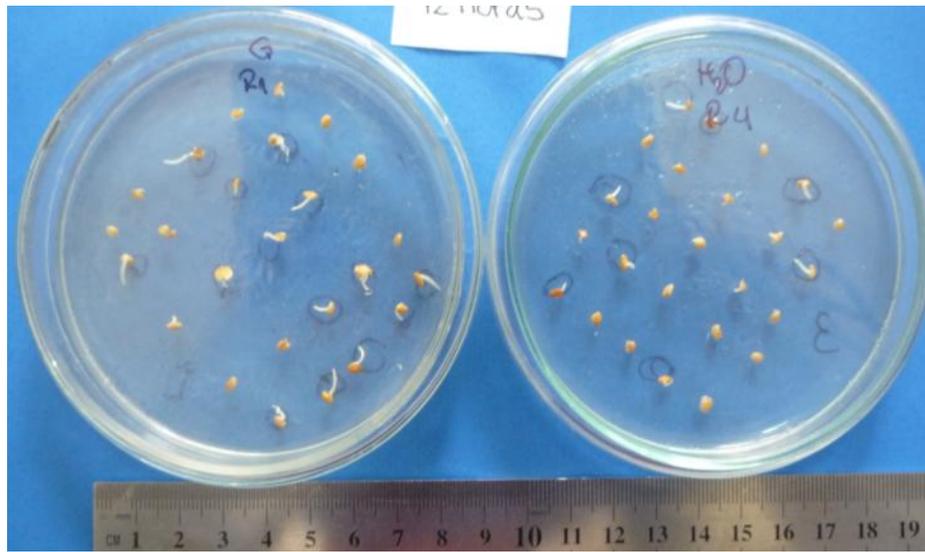


Figura 5. Germinación de las semillas de trébol a las 48 horas, usando como inoculante a la *Pseudomonas sp.* en el medio G a la izquierda y el control (agua) a la derecha.

En cuanto a la biomasa seca de las plántulas en placa, cosechadas 7 días después de su inoculación mostraron un promedio de 0.046 g para el medio LMC y 0.041 g para el medio G. Siendo el peso seco de las plántulas del medio LMC significativamente mayor a los inoculantes A y control (agua) en 0.009 y 0.01 g respectivamente (figura 6, Anexo 3-E1). Lo cual muestra que la cepa en el medio LMC podrían expresar mejor capacidad PGPR, como la producción de hormonas de crecimiento (Tsavkelova, 2006)

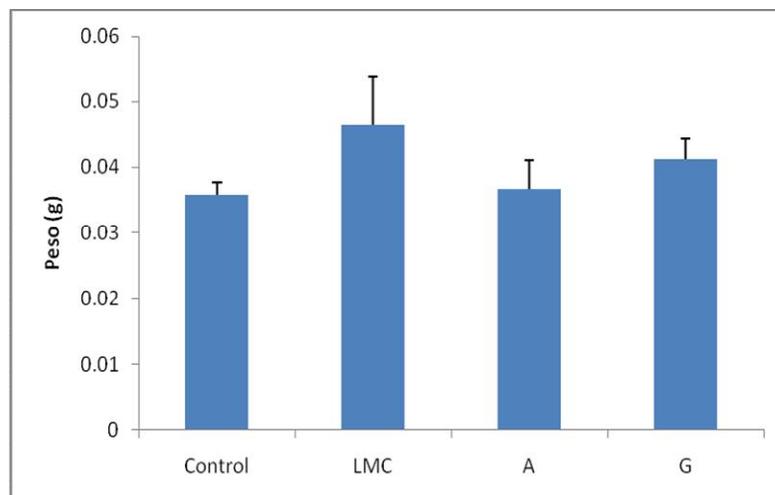


Figura 6. Promedio del peso seco de las plántulas de trébol cosechados 7 días después de su inoculación. LMC, peso seco de la plántula inoculada con Ps42 en medio LMC; A peso seco de la plántula inoculada con Ps42 en medio A; G, peso seco de la plántula inoculada con Ps42 en medio G y Control, semillas embebidas con agua.

4.2 Colonización de las raíces de las plántulas de maca.

4.2.1 Evaluación de *Pseudomonas sp.* en la radícula de la plántula de maca.

El ensayo se realizó en semillas de maca debido a que el futuro se piensa peletizar esta semilla, por tanto es importante asegurar que la *Pseudomonas sp.* (Ps42) colonice la radícula de maca para que esta pueda expresar su capacidad PGPR sobre la maca.

La asociación de la cepa Ps42 con la raíz de maca fue examinada cualitativamente con el sustrato X-glu siendo evaluados los días 3, 7, 15 y 28 post-inoculación.

Las observaciones realizadas con un microscopio de luz mostraron que 3 días post-inoculación las bacterias colonizaron el cuello y el ápice inferior de la raíz. Por otro lado, en el día 7 se observó una mayor asociación de la bacteria a toda la radícula (Figura 8). La asociación bacteria-raíz se evidencia por la aparición del producto di-cloro-di-bromoindigo que da la coloración azul característica de la raíz por la actividad de la enzima β -glucuronidasa, expresada por el gen *gusA*, sobre el sustrato cromogénico Xglu (Karcher, 2002) (Figura 7). Asimismo, apareció un biofilm a partir de ese día (Figura 9), coincidiendo esto, con estudios realizados en *Pseudomonas sp.* asociadas a cultivos de papa (Rocha *et al.*, 2009). En el día 15 el biofilm se ubicó en la zona central de la raíz

observándose colonización en las zonas apicales. Finalmente, el día 28 se pudo apreciar colonización tenue en la zona central e inferior de la raíz disminuyendo el biofilm.

El incremento en la colonización en el día 7 se puede explicar por la afinidad de la cepa a la composición de los exudados radiculares. Estos, pueden ser lipopolisacáridos, celulosa, tiamina, aminoácidos, biotina e isoflavonoides, que sirven como nutrientes para la bacterias asociadas (Hansen *et al.*, 1997; Rainey, 1999). La presencia y cantidad de estos compuestos no solo varían de unas plantas a otra, sino, dentro de una misma especie pueden variar en función de la edad, estado fisiológico y condiciones ambientales (Rovira 1969; Barber y Lynch, 1977). Por tanto, es probable que la disminución de la colonización a través del tiempo sea provocada por el descenso de los exudados afines a la bacteria, o debido al estado fisiológico de la planta. La presencia de flagelos laterales cortos o polares en la *Pseudomonas sp.* (Scarpellini *et al.*, 2004, Del Castillo, 2008) también pudieron contribuir en la colonización de las radículas de *Lepidium meyenii*. Es importante mencionar que el tratamiento control (plántulas sin biofertilizante) no mostró coloración cuando se hizo el revelado durante la evaluación. La colonización de las cepas pertenecientes a este género es variable, reportándose en ensayos similares colonización bacteriana de la raíz a partir del día 9 en plantas de trigo (Turnbull *et al.*, 2001) y 14 días en caña de azúcar (Rainey, 1999).

4.2.2 Efecto en el peso seco de las plántulas de maca

En cuanto al efecto de la colonización del microorganismo en el desarrollo de la maca no existió diferencias significativas en el peso seco de las plántulas inoculadas con la *Pseudomonas sp.* que expresaba el gen *gusA* y las *Pseudomonas sp.* silvestre (Ps42) (Anexo 3-E2).

Por otro lado, el peso seco de las raíces del tratamiento con cepa transformada fue significativamente mayor al tratamiento control en 0.0002 en los 3, 7 y 15 días y 0.0001 a los 28 días post-inoculación. En cuanto al peso seco aéreo en los días 3 y 7 el control fue superado en 0.000021 y 0.00022 respectivamente por el tratamiento con la cepa transformada (Anexo 3-E2).

4.2.3 Efecto en la longitud de la raíz de las plántulas de maca

En este parámetro no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos, por tanto es probable que la *Pseudomonas sp.* no esté involucrada en el incremento de la longitud radicular (Anexo 3-E2). Sin embargo, las raíces inoculadas mostraron un engrosamiento lo cual difería del control que mostró una raíz delgada y frágil.

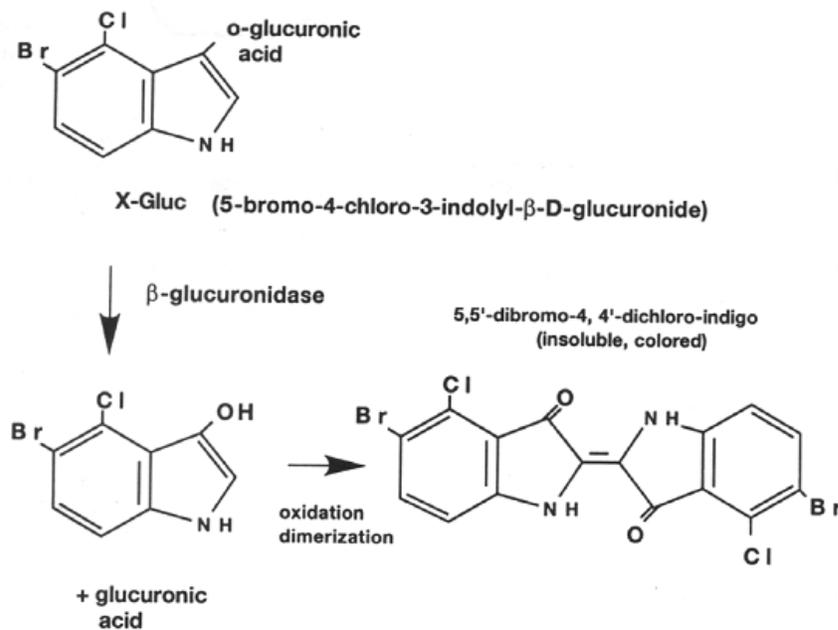


Figura 7. X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide), sustrato de la βglucuronidasa, es cortada para producir ácido glucurónico y cloro-bromoindigo. El cual es oxidado y posteriormente dimerizado para producir un precipitado insoluble de color azul denominado dicloro-dibromoindigo.

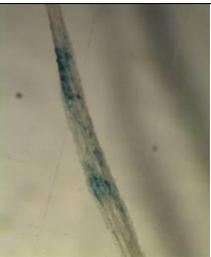
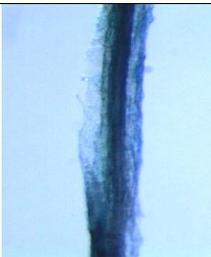
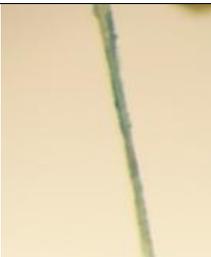
Patrones de colonización	Día 3	Día 7	Día 15	Día 28
Zona del cuello de la raíz				
Zona central de la raíz				
Zona apical inferior de la raíz				

Figura 8. Patrones de colonización de *Pseudomonas sp.* en raíces de *Lepidium meyenii* “maca” monitoreados a los de 3,7,15 y 28 días post-inoculación.

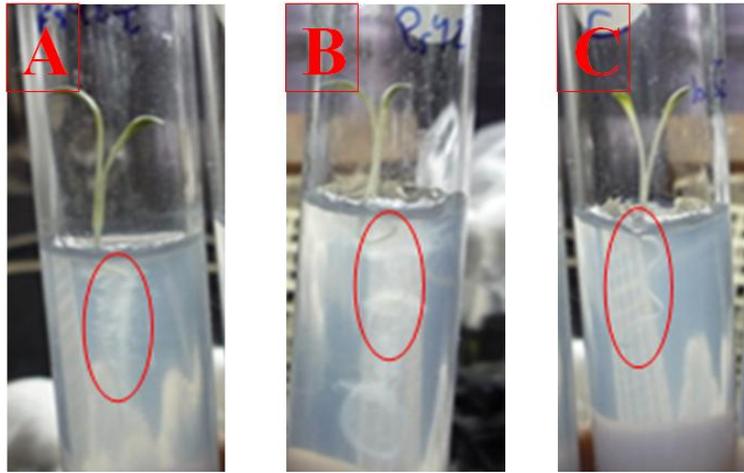


Figura 9. Biofilm en el sistema de plántulas de maca in vitro siete días post-inoculación. Biofilm formado en la figura A y B, y ausente en la figura C. (A) Plántulas con inóculo de *Pseudomonas sp.* expresando el gen *gusA*, (B) plántulas inoculadas con *Pseudomonas sp.* y (C) plántulas sin inóculo.

4.3 Efecto de la peletización de las semillas de trébol rojo en la promoción de su crecimiento

4.3.1 Determinación de la mejor combinación de semilla-adhesivo-inoculante-cubierta

De los 90 tratamientos, dos cubiertas formaron la estructura de pellet, estas fueron las cubiertas conformadas por las proporciones 99:1:10 de arcilla:cal:aserrín y 1:1 de cal:arcilla, ambas, en combinación con el inoculante y agua azucarada como adhesivo, dicha mezcla estuvo a una concentración final de 50% de azúcar (Figura 10, A y N).

El pH para la cubiertas constituidas por arcilla:cal:aserrín fue 5.9 y para la cubierta cal:arcilla fue 12, respectivamente. Para los ensayos posteriores se eligió la primera cubierta debido a que la cepa utilizada en el pellet fue aislada de suelos con pH entre 5.20 y 5.21 (Anexo 2). Este parámetro es uno de los más importantes para mantener la supervivencia del microorganismo en la semilla peletizada, así como para contabilizar las unidades formadoras de colonias en los pellets.

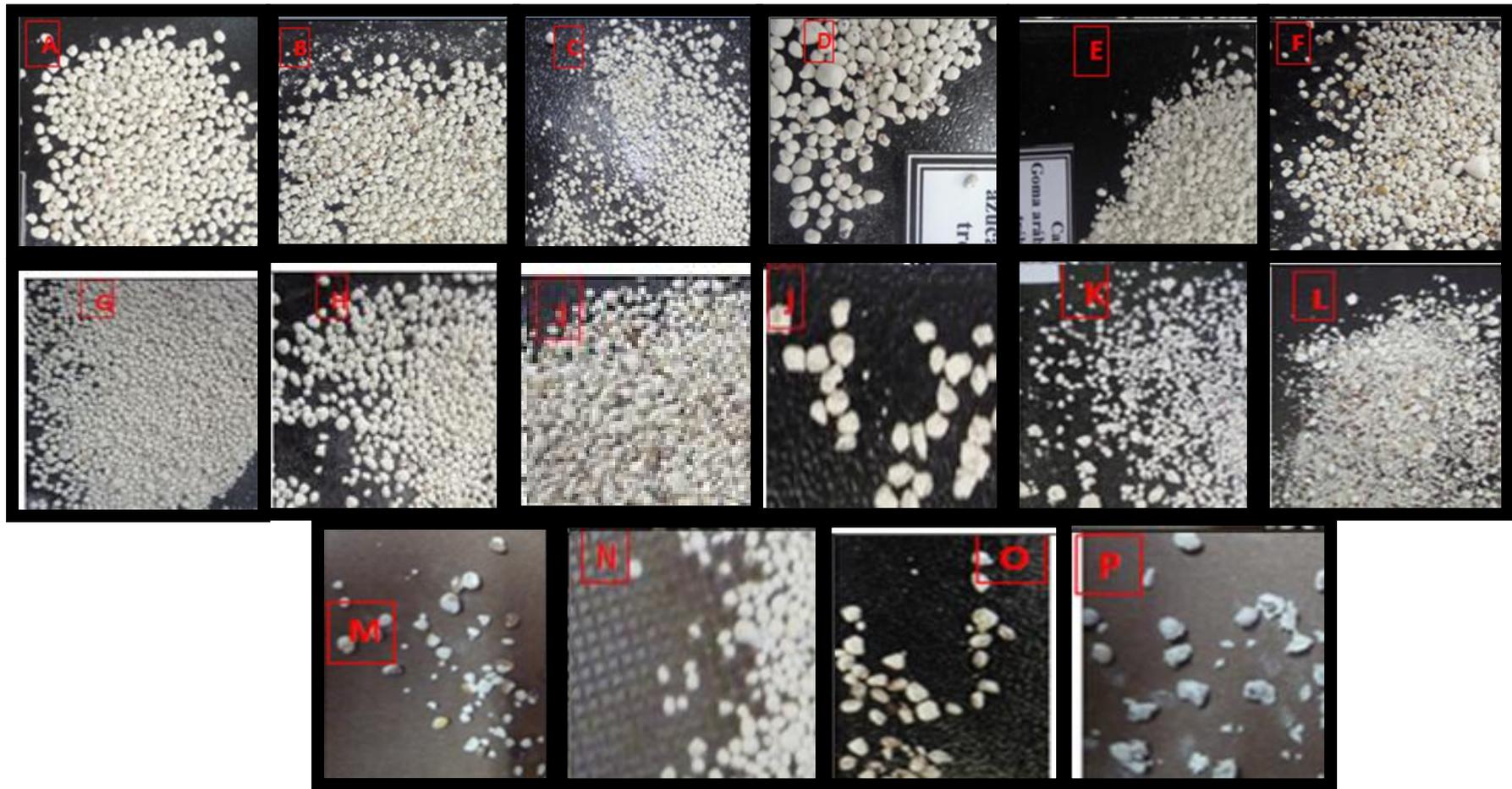


Figura 10. Semillas de trébol peletizadas. (A) 1:4, cal:arcilla; goma arábica 50 %; (B) 1:2, cal:arcilla; (C) 1:1, arcilla:cal: azúcar 50%; (D) 1:1, arcilla:cal: azúcar 25%; (E) Cal, goma arabiga 50%; (F) cal, azúcar 25%; (G) 1:1, arcilla:cal; goma arabiga 50%; (H) cal, azúcar 50%; (I) 1:1, maizena:arcilla; azúcar 50%; (J) Carbonato de calcio; azúcar 50%; (K) Carbonato de calcio; azúcar 25%; (L) Maizena; 25% azúcar; (M) Cal; 25% goma arábica; (N) 99:10:1, arcilla:aserrín:cal; azúcar 50%; (O) Maizena; azúcar 50%; (P) Maizena; goma arabiga 50%.

4.3.2 Prueba de germinación en placa

Este ensayo se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de la peletización en el desarrollo de las semillas de trébol.

Tal como se mencionó en el ítem 3.3.5-b, se evaluaron las cubiertas y adhesivos de las que se seleccionó aquellas que formaron un pellet uniforme, siendo elegidas a partir de los resultados del ensayo anterior. Los medios de cultivo para la elaboración de los inoculantes, que formaron parte del adhesivo de la cubierta, fueron elegidos a partir del ensayo ubicado en el ítem 4.1.5. El primer tratamiento PLMC estuvo conformado por la cubierta formulada por arcilla:cal:aserrín en la proporción 99:1:10 en combinación con la mezcla del inoculante elaborado con el medio de cultivo LMC y agua azucarada, el segundo tratamiento PG estuvo conformado por la misma cubierta y agua azucarada en combinación con el inoculante elaborado con el medio de cultivo G. Adicionalmente se evaluaron cuatro tratamientos más, obteniéndose un total de 6 tratamientos.

Los resultados mostraron lo siguiente, los tratamientos LMCP y GP tuvieron 2% y 8% de emergencia el día uno, respectivamente; valores inferiores a las semillas inoculadas con los medios LMC, G y al control (agua), que presentaron porcentajes de germinación de 67%, 62% y 47% respectivamente (Figura 11). Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado debido a que las semillas peletizadas tardan en germinar ya que la radícula emergente tiene que romper la cubierta del pellet. La mayoría de las radículas emergentes de las semillas peletizadas con inoculante y sin inoculante presentaron un mayor grosor (Figura 12), esto podría deberse a la misma razón de la demora en la emergencia antes explicada. Esta característica se fue perdiendo con el tiempo.

El porcentaje de germinación al término del día 6 fue de 84% y 50% para CONTROL y P, respectivamente. Para el tratamiento SILMC fue 92% y SIG fue 96%, finalmente para los tratamientos LMCP fue 18% y para GP fue 47% (Anexo 3-E3).

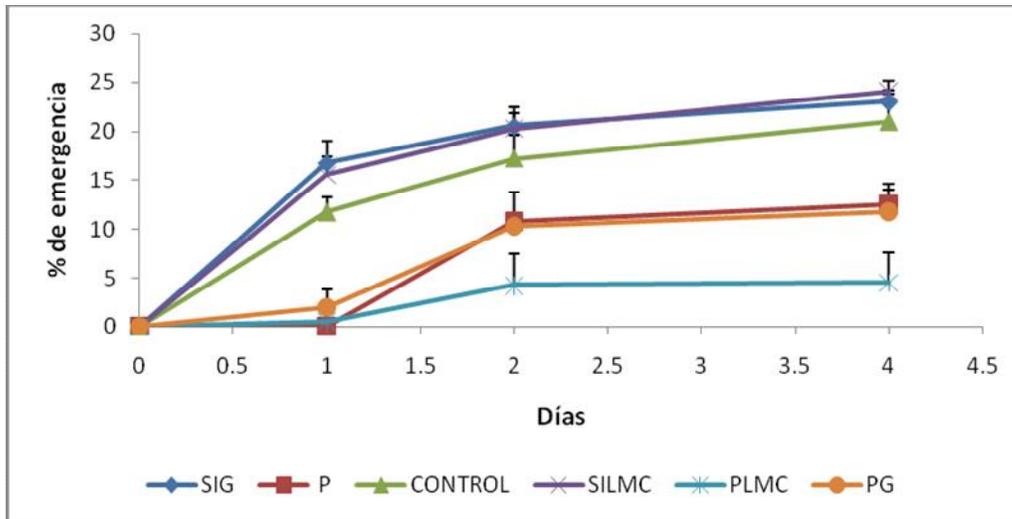


Figura 11. Porcentaje de emergencia de semillas peletizadas de trébol en placa.

Control: semillas peletizadas sin inoculante, P: semillas peletizadas sin inoculante, SILMC: semillas con inoculante en medio LMC, SIG: semillas con inoculante en medio G, PLMC: semillas peletizadas con inoculante en medio LMC y PG: semillas peletizadas con inoculante en medio G.

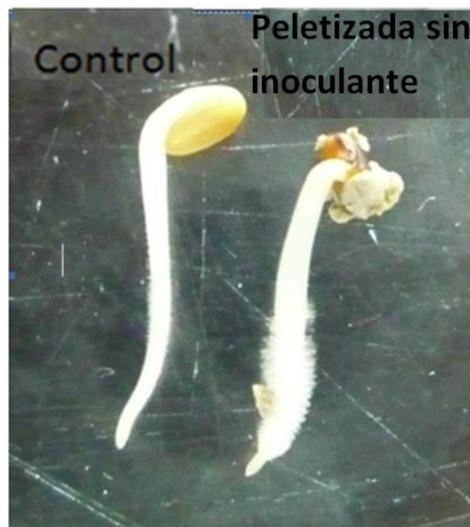


Figura 12. Semillas de trébol germinadas a las 48 horas post-inoculación.

4.3.3 Determinación de la supervivencia de los microorganismos inoculados en las semillas peletizadas.

La contabilización de las unidades formadoras de colonias en la evaluación de la supervivencia de las semillas peletizadas es importante, debido a que asegura que la cepa utilizada esté viva en la semilla y pueda beneficiar a la planta con sus características PGPR. Es por ello que países como Argentina y Brasil (Benintende, 2010; Ferreira, 2011) cuentan con normas de control de calidad de biofertilizantes, sin embargo, estas solo son válidas para microorganismos del género *Rhizobium* mas no para otras especies microbianas. Benintende (2010), recomienda la inoculación de 10^3 UFC/semilla de rizobium para semillas pequeñas y para semillas medianas 10^4 UFC/semilla debido a que el inoculante sobre las semilla solo sobrevive aproximadamente del 5 al 10%.

En este ensayo se evaluó la supervivencia del inoculante en la cubierta de los tratamientos PLMC y PG. Los resultados de este ensayo mostraron que el tratamiento PLMC a los 15 minutos post-peletización mostró un promedio de 192.5×10^4 UFC/semilla, 1 día post-peletización disminuyó a 166.5×10^4 UFC/semilla, 2 días post-peletización aumentó significativamente con respecto al primer día de medición a 149.7×10^5 UFC/semilla y finalmente para el día 3 disminuyó significativamente hasta 250×10^2 UFC/semilla (Figura 13, Anexo 3-E4).

En cuanto al tratamiento PG, presentó a los 15 minutos post-peletización 111×10^4 UFC/semilla, el día 1 post-peletización incrementó a 131×10^4 UFC/semilla, el día 2 post-peletización incrementó significativamente a 148×10^6 UFC/semilla con respecto a las dos evaluaciones anteriores, finalmente el día 3 disminuyó a 32×10^3 UFC/semilla (Figura 13, Anexo 3-E4).

En los tratamientos PLMC y PG, la supervivencia disminuyó al tercer día post-inoculación, sin embargo el tratamiento PG tuvo una supervivencia significativamente mayor al tratamiento PLMC en 31% (Anexo 3E4).

En Cuanto a la composición de la cubierta de la semilla peletizada, el aserrín contiene 99.13% de materia orgánica (Anexo 1-A1), los tres componentes principales son celulosa, lignina y hemicelulosa. Siendo estos dos últimos polisacárido no celulósico e

hidroscópicos (Carmona, 2010). Esta característica podría explicar la supervivencia de la cepa Ps42 en las semillas peletizadas, ya que al retener agua, estas moléculas estarían disponibles para que el microorganismo las utilice en su actividad metabólica; lo que se conoce como actividad de agua.

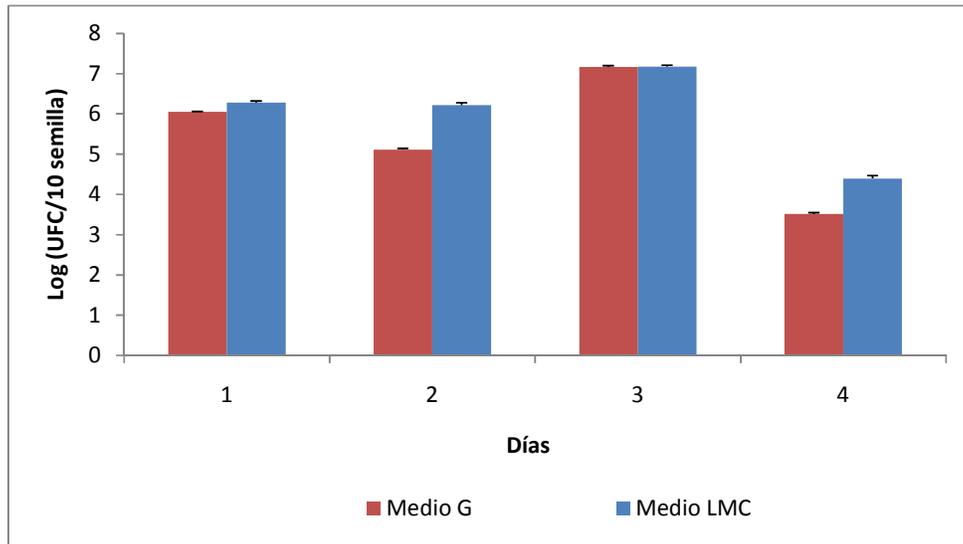


Figura 13. Supervivencia del inoculante *Pseudomonas sp.* en los medios G y LMC en las semillas peletizadas con la formulación arcilla:cal:aserrín.

4.3.4 Promoción del crecimiento en plántulas de trébol rojo

El uso de los fertilizantes químicos en las zonas donde se desarrolla la agricultura podría provocar a largo plazo la contaminación de suelo, fauna y flora. Una posible alternativa al uso de fertilizantes químicos es el uso de semillas peletizadas usando inoculantes biológicos a partir de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), las cuales promueven el desarrollo de los cultivos, sin provocar efectos nocivos a los elementos bióticos y abióticos.

Los tratamientos SILMC y SIG presentaron los mayores valores de emergencia en semillas de trébol a las 48 h con 10.25% y 14%. Respectivamente. Siendo este último significativamente mayor a N+, P y N-, los cuales presentaron porcentajes de

emergencias de 3,25%, 3,75% y 2.5%, respectivamente. Asimismo, el tratamiento SILMC fue significativamente mayor a N- en 7,75 % (Figura, 14), (Anexo 3-E5).

Para la determinación del parámetro peso seco de las plantas, la cosecha se realizó 30 días post-inoculación y las plántulas se dejaron secar durante una semana a 35°C (Figura 15). El tratamiento PLMC mostró una tendencia positiva en el peso seco de la plántula con respecto a los controles N+. N- y P incrementándolo en 13.26%, 15.71% y 17,26% respectivamente. Asimismo, esta tendencia positiva mencionada anteriormente, se presentó también en los tratamientos SLMC, SIG y PG. A pesar de ello no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos comparados con los controles (Tabla 4, Anexo 3-E5). En cuanto al parámetro peso seco aéreo los tratamientos SIG, PLMC, PG y SILMC presentaron un peso significativamente mayor al tratamiento N+ en 25.47%, 28,25%, 31.56% y 32.70% respectivamente. En cuanto al parámetro peso seco de las radículas el tratamiento PLMC presentó un mayor valor frente a los controles N- y P en 30.13% y 29.67% respectivamente. En este último parámetro no se encontró diferencias significativas (Tabla 4, Anexo 3-E5).

En cuanto a la altura de planta, se observó que los tratamientos N+, N-, SIG y SILMC fueron mayores (12.350, 12.150, 11.960 y 12.225 mm respectivamente) en comparación con los tratamientos P, PG y PLMC, a pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas, (Tabla 4, Anexo 3-E5). Probablemente la cubierta de los tratamientos donde las semillas estuvieron peletizadas provocó que la emergencia se retarde ocasionando la disminución de su altura.

El incremento del peso seco de la planta de trébol es un indicador de efecto PGPR de la cepa evaluada en este ensayo. Asimismo, es importante mencionar que en estudios anteriores se determinó que esta cepa aislada de la rizósfera de maca poseía la capacidad de producir 2.54 ug/ml de AIA (ácido de indolacético) (Zúñiga, 2009), la cual es una fitohormona responsable de la división, extensión, diferenciación de la células y tejidos vegetales. Estimulando la germinación de semillas y tubérculos; incrementando la formación de raíces, controlando los procesos de crecimiento vegetal, tropismo, florecencia y fructificación de las plantas. También afecta a la fotosíntesis, formación

de pigmentos, biosíntesis de varios metabolitos, y genera resistencia hacia los factores de estrés (Tsakelova *et al.*, 2006)

Por lo tanto, la presencia de la cepa Ps42 en las semillas peletizadas y semillas inoculadas con esta cepa, tiene grandes posibilidades de ser utilizada como inoculantes biológicos en combinación con la peletización por los resultados obtenidos en el peso seco de las plántulas posiblemente causadas por la producción de hormonas.

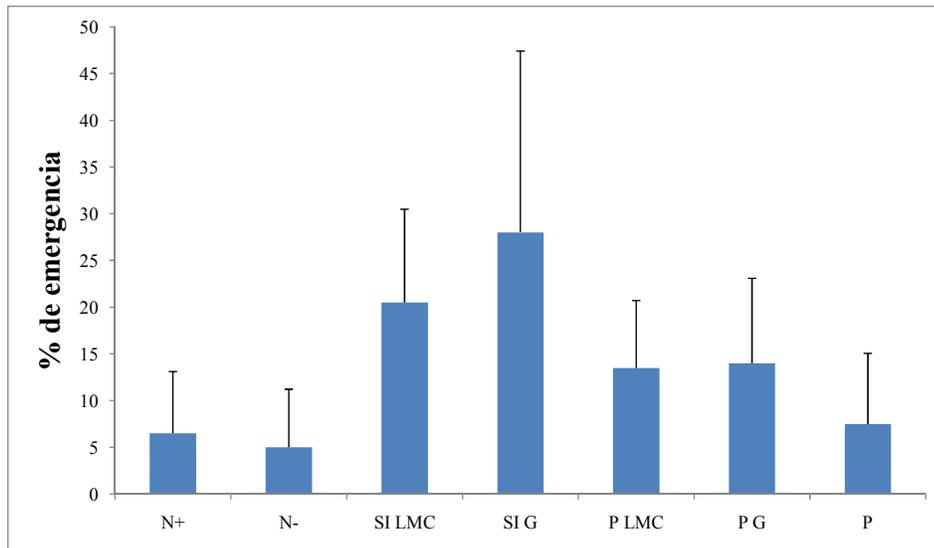


Figura 14. Porcentaje de emergencia de las semillas peletizadas de trébol a las 48 horas. N+: solución nutritiva con nitrógeno, N-: solución nutritiva sin nitrógeno, SILMC: semillas inoculadas con la cepa en medio LMC, SIG: Semillas inoculadas con la cepa en medio G, PLMC: semillas peletizadas con inoculante en medio LMC, PG: semillas peletizadas con inoculante en medio G, P: semillas peletizadas.

Tabla 4. Altura, peso fresco y peso seco de plántulas de trébol a los 30 días de evaluación.

Tratamiento	Altura (mm)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
Control N -	12.150	1.324	0.100
Control N +	12.350	1.426	0.103
P	11.525	1.173	0.099
SIG	11.960	1.365	0.115
PG	11.850	1.460	0.119
SI LMC	12.225	1.326	0.115
P LMC	11.165	1.318	0.119

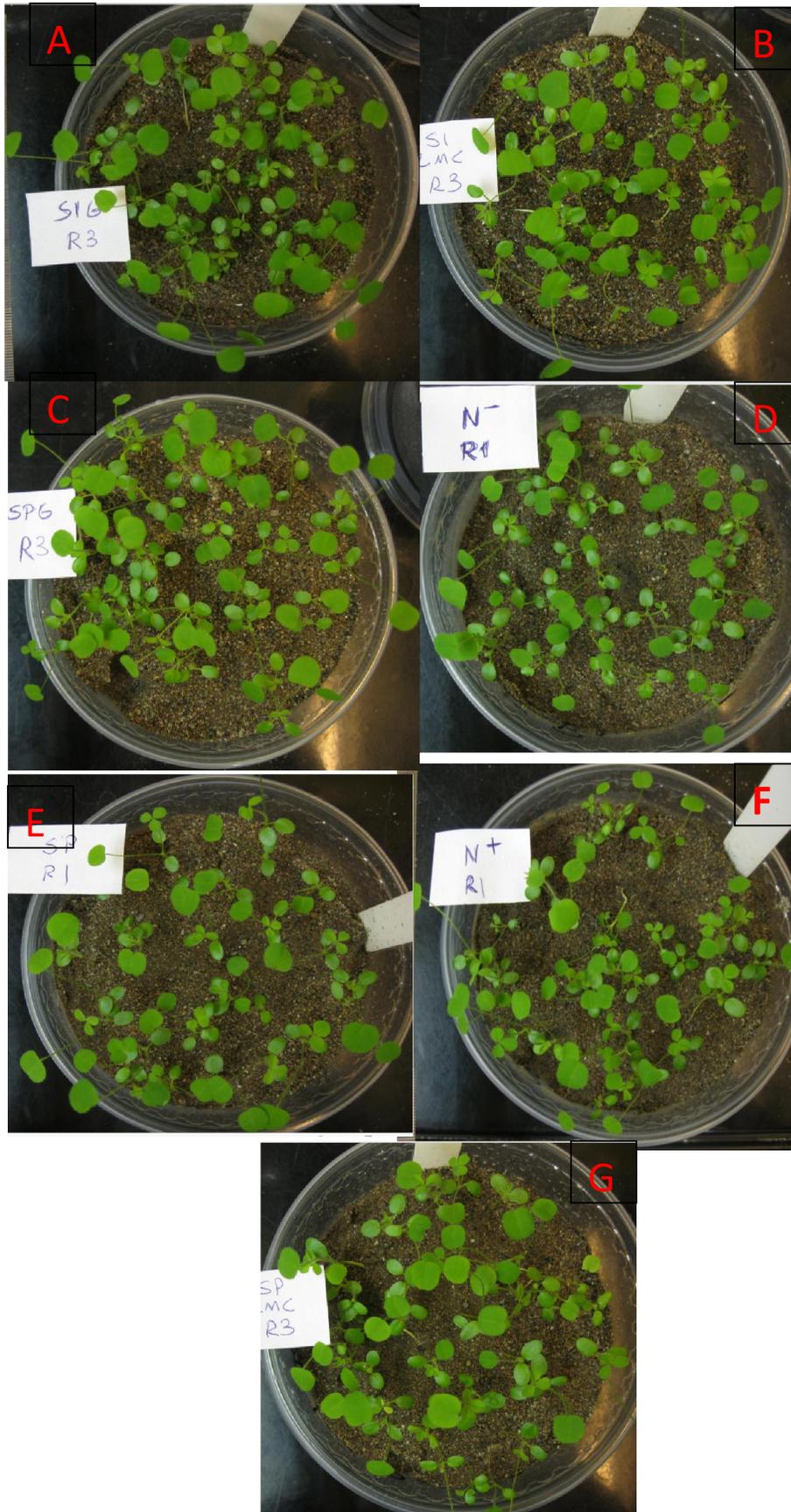


Figura 15. Plántulas de trébol a los 30 días. (SIG)-Semillas inoculas con la cepa en medio G(A), (SILMC)-semillas inoculas con la cepa en medio LMC (B), (PG)-semillas peletizadas con inoculante en medio G (C), (N)-solución nutritiva sin nitrógeno (D), (P)-semillas peletizadas(E), (N+)-solución nutritiva con nitrógeno (F) y (PLMC)-semillas peletizadas con inoculantes en medio LMC

V. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El medio de cultivo LMC podría ser sustituido por el medio G en la producción de inoculantes, debido a que la cepa Ps42 mostró en este medio un tiempo de duplicación de 81 min, siendo este el menor valor frente a los medios LMC, A y AG.
2. La colonización de cepa Ps42 que expresa el gen *gusA* en la radícula de maca fue cualitativamente mayor el día 7 en comparación a los días 3, 15 y 28 post-inoculación, debido a que colonizó el ápice, zona central, central alta y baja, y cuello de la radícula. A partir de estos resultados se infiere que la cepa Ps42 también coloniza la radícula de maca.
3. De los 90 tratamientos evaluados para el ensayo de peletización solo la cubierta conformada por la proporción 99:1:10 de arcilla:cal:aserrín y el adhesivo constituido por la mezcla del inoculante con agua ambos con una concentración final del 50% de azúcar rubia, el cual fue seleccionado a partir de un total de 8 tratamientos, formaron la estructura de un pellet adecuada para el manejo de la semilla de trébol.
4. La supervivencia de la cepa Ps42 en la semilla de trébol peletizada con la cubierta seleccionada y el inoculante crecido en el medio G fue 32×10^3 UFC/semilla, este valor fue significativamente mayor a las semillas peletizadas con el inoculante en el medio LMC, el cual fue 250×10^2 UFC/semilla.
5. Los mayores valores de peso seco de la planta de trébol con respecto a los controles P, N- y N+, lo presentaron los tratamientos PLMC, PG, SIG y SILMC, los cuales fueron 0.119 g, 0.119 g, 0.115 g y 0.115 g, respectivamente.
6. Por lo tanto los inoculantes elaborados con los medios de cultivo LMC y G; y las semillas peletizadas con estos medios de cultivo pueden ser utilizados como inoculantes biológicos, por su efecto positivo en el crecimiento del trébol.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar los tratamientos PLMC, PG, SILMC y SIG a nivel de parcela.
2. Evaluar cualitativa y cuantitativamente la colonización de las *Pseudomonas sp.* en la radícula de trébol.
3. Realizar una optimización en la peletización de semillas de *Trofolium pratense*.
4. Mejorar la composición de la cubierta de peletización para aumentar el tiempo la supervivencia del inoculante biológico
5. Evaluar el tiempo de supervivencia del inoculante en semillas peletizadas en almacenamiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agric.Téc. Méx.* 26(2):191-203.
2. Bashan, Y. y Holguin, G. 1997. *Azospirillum* plant relationship: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol.* 43:103-121.
3. Barber, D. y Lynch, J. 1977. Microbial growth in rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 9:305-308.
4. Benintende, S. 2010. Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Rev Argent Microbiol.*42:129-132.
5. Berg, G. y Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Eco.* 68(1):1-13.
6. Broughton, W. y Dilworth, M. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* 125:10775-1080.
7. Buddrus-Shiemann, K.; Schmid, M.; Schreiner, K.; Welzl, G. y Hartmann, H. 2010. Root Colonization by *Pseudomonas sp.* DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere bacterial Community of Barley. *Microb Ecol.* 60(2):381-393.
8. Campos, J.; Cervantes, C.; Ramírez, M. y Sosa, C. 2007. Aspectos de la biotecnología microbiana. (Online). Consultado 16 de Junio 2013. <http://www.cic.umich.mx/documento/suplemento/2008/febrero/35.pdf>
9. Carmona, C. 2010. Estudio del comportamiento de una mezcla de aserrín y grasa láctea de desecho. Tesis para optar el grado de Licenciado en Ciencia de los Alimentos. UACH Chile. 45 p.
10. Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola. (Online). Consultado 13 de Abril 2012. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdf>.

11. Chacón, G. 1990. La Maca *Lepidium peruvianum* sp. Nov. y su hábitat. *Rev. peru. biol.* 3(2):171-272.
12. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Manual de Evaluación, Selección y Manejo de sistemas Leguminosas-Rhizobium para el incremento de la fijación de nitrógeno. Vol. A, Teoría; Vol. B, Métodos. CIAT. Cali, Colombia. Pp 11-1 – 11-8, 19-10 – 19-14.
13. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Establecimiento y renovación de pasturas: Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación. CIAT. Cali, Colombia. Pp.45-46.
14. Cook, S. 1980. Establishing pasture species in existing swards; a review. *Trop. Grassl.* 14(3):181-187.
15. Davey, M. y O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):847-867.
16. De Freitas, J. y Germida, J. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol.* 36(4):265-272.
17. De Freitas, J. y Germida, J. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 37:780-784.
18. De Freitas, J. y Germida, J. 1992. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonas under field conditions. *Soil. Biol. Biochem.* 24(11):1137-1146.
19. Del Castillo, T. 2008. Análisis Genómicos, transcripcional y de flujo del metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas putida*. Tesis para optar en título de Doctor.UGR. Granada.105p.
20. Dileep, B. y Dubet, H. 1992. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biol Biochem.* 24(6):539-542.

21. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P. y Schettiono, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.* 49(4):347-349.
22. Eckford, R.; Cook, F.; Saul, D.; Aislabie, J. y Foght, J. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel contaminated antarctic soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10):5181-5185.
23. Essaid, A.; Belarbi A.; Hachet C.; Nowak J. y Audran J. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microb. Letters.* 71(4):91-95.
24. Ferreira, F. 2011, NORMAS SOBRE ESPECIFICAÇÕES, ARANTIAS, REGISTRO, EMBALAGEM E ROTULAGEM DOS INOCULANTES DESTINADOS À AGRICULTURA, Diário oficial da União- Seção 1, Brasília – DF, BRA, mar. 25:3.
25. Frame J.; Charlton J. y Laidlaw A. 1998. Temperate Forage Legumes. *Trifolium pratense*. (Online). Consultado 23 de Abril 2012. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gbase/data/pf000349.htm>.
26. Frommel, M.; Nowak, J. y Lazarovitis, G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by a Nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96(3):928-936.
27. Gagné, S.; Dehbi, L.; Le Quéré, D.; Morin, J.; Lemay, R. y Fournier, N. 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biol. Biochem.* 25(2):269-272.
28. Goviden-Soulange, J. y Levantard, M. 2008. Comparative studies of seed priming and pelleting percentage and meantime to germination of seeds tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Afr. J. Agric. Res.* 3(10):725-731.
29. Hansen, M.; Kragelund, L.; Nybroe, O. y Sørensen, J. 1997. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence

technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23(4):353-360.

30. Haywood, G.; Anderson, A.; Ewing, F. y Dawes. 1990. Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-Hidroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl Environ Microbiol.* 56(11):3354-3359.
31. Justic, D.; Rabalais, N.; Turner, R. y Dortch, Q. 1995. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 40(3):339-356.
32. Karcher, S. 2002. Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene.(Online). Consultado 23 de Junio de 2012. www.ableweb.org/volumes/vol-23/3-karcher.pdf.
33. Kloepper, J. y Schroth, M. 1980. Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. *Phytopathology.* 71:590-592.
34. Kloepper, J.; Lifshitz, R. y Zablutowilz, R. 1989. Free-Living bacterial inoculation for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7(2):39-44.
35. Knee, E.; Gao, M.; Gong, F.; Teplitski, M.; Jones, A.; Foxworthy, A.; Mort, A.; y Bauer, W. 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol Plant Microbe Interact.* 14(6):775-784.
36. León, J. 1964. The Maca (*Lepidium meyenii*), a little-known food plant of Perú. *Econ. Bot.* 18:122-127.
37. Lowther, W. 1975. Pelleting materials for oversown clover. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 3:121-125.
38. Lugtenberg, J.; Dekkers, L. y Bloemberg, G. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461 – 490.
39. Lugtenberg, J. y Dekkers, L. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environ. Microbiol.* 1(1):9-13.

40. Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1997. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. España. Editorial Pearson Prentice Hall. 985p.
41. Mahecha L. 2002. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 15(2):226-231.
42. Marín-Bravo, M. 2003. Histología de la Maca, *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Rev. peru. Boil.* 10(1):101-108.
43. Martínez, F. (1976) Comportamiento de cepas de *Rhizobium trifolii* en dos condiciones de suelos diferentes en trébol rojo (*Trifolium pratense*). V Reunión de especialista en investigadores forrajeros del Perú. Ayacucho-Perú. 154 pp.
44. Moat, A.; Foster, J. y Spector, M. 2003. *Microbial Physiology*. Wiley-Liss. Pp: 350-360.
45. Nelson, K.; Weinel, C; Paulsen, I.; Dodson, R.; Hilbert, H.; Martins dos Santos, V.; Fouts, D.; Gill, S.; Pop, M.; Holmes, M.; Brinkac, L.; Beanan, M.; DeBoy, R.; Daugherty, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; White, O.; Peterson, J.; Khouri, H.; Hance, I.; Chris Lee, P.; Holtzapple, E.; Scanlan, D.; Tran, K.; Moazzez, A.; Utterback, T.; Rizzo, M.; Lee, K.; Kosack, D.; Moestl, D.; Wedler, H; Lauber, J.; Stjepandic, D.; Hoheisel, J.; Straetz, M.; Heim, S.; Kiewitz, C.; Eisen, J.; Timmis, K.; Düsterhöft, A.; Tümmeler, B.; y Fraser, C. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 4(12):799-808.
46. Nowak, J. y Lazarovits, G. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Hort. Sci.* 32(2):188-192.
47. Nowak, J.; Asiedu, S.; Bensalim, S.; Richards, J.; Stewart, A.; Smith, C.; Stevens, D. y Sturz, A. 1998. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 52:97-103.
48. Obregón, V. 1998. Maca, planta medicinal y nutritiva del Perú 1era. Edición, Instituto de Fitoterapia. Lima. 182 p.

49. Ortiz, C. 2013 Estudio de bacterias psicrótrofas aisladas de la zona de Junín con capacidad PGPR y su uso como potenciales biorremediadoras de metales pesados en una planta forrajera. Tesis para optar el título de Biólogo. UNALM. Lima. 159p.
50. O'Sullivan, D. y O'Gara, F. 1992 Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56(4):622–676.
51. Palleroni, N. 1993-1994. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64(3-4):231-251.
52. Pan, B.; Bai, Y.; Leibovitch, S. y Smith, D. 1999. Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *Europ. J. Agronomy.* 11:179-186.
53. Quiroz, C. y Aliaga, R. 1997. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized neglected crops. 21. Hermann, M. and Hellers, J. editors. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 173-197p.
54. Rabalais, N.; Wisman, W.; Turner, R.; Justic, D.; Gupta, B. y Dortch, Q. 1996. Nutrient changes in the Mississippi River and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries.* 19(2):386-407.
55. Rainey, B. 1999. Adaptation of *Pseudomona fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 1:243-257.
56. Ramos, C.; Molbak, L. y Molin, S. 2000. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2):801-809.
57. Ridgway, H. y Safari, J. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbio.* 56(11):3565-3575.
58. Rocha, N.; Zuno, F.; Estrada, P.; Gallegos, J.; Aldana, M.; Virgen, G.; Miller, M. y Muñoz, C. 2009. PRODUCCIÓN in vitro DE PLÁNTULA DE PAPA INOCULADA CON *Pseudomonas* sp. *Terra Latinoamericana.* 27(3):207-217.

59. Rodriguez, H. 2008. Análisis de la importación de semillas forrajeras en el periodo 2000-2005. Trabajo monográfico para optar el título de Ingeniero zootecnista. UNALM.Lima. 75p.
60. Rovira, A. 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35:35-57.
61. Santillana, N. 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas sp.* *Ecol. Apl.* 5(1,2):87-91.
62. Scarpellini, M.; Franzetti, L. y Galli, A. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 236:257-260.
63. Scott, J. 1989. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. *Advances in agronomy.* 42(1):46-73.
64. Seminario J. 2004. Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. 361-366 p.
65. Spangler, W. y Gilmor, C. 1966. Biochemistry of Nitrate Respiration in *Pseudomonas stutzeri* I. Aerobic and Nitrate Respiration Routes of Carbohydrate Catabolism. *J. Bacteriol.* 91(1):245-250.
66. Stainer, R.; Palleroni, N. y Doudoroff, M. 1966. The Aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43:159-271.
67. Stern, J.; Wang, C. y Gilmour, C. 1960. Comparative catabolism of carbohydrates in *Pseudomonas* species. *J Bacterio.* 79(4):60-11.
68. Tejada, M.; Benítez, C. y González, J. 2005. Effects of Application of Two Organomineral Fertilizers on Nutrient Leaching Losses and Wheat Crop. *Agron. J.* 97(3):960-967.

69. Tello, J.; Hermann M. y Calderón, A. 1992. La Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) Cultivo Alimenticio Potencial para las zonas Altoandinas. *Boletín de Lima*. 31:59-66.
70. Tiwari, N. y Campbell, J. 1969. Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochimica et biophysica acta*. 192(3):395-401.
71. Tovar, O. 2001. Plantas Medicinales del Valle del Mantaro. Ciudad: Lima. Editorial: Concytec. Publicación CONCYTEC. Lima. 114 p.
72. Tsavkelova, E., Klimova, S., Cherdyntseva, T. y Netrusov, A. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42 (2):117-126.
73. Turnbull, A., Morgan, J., Whipps, J. and Saunders, J. 2001. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomona fluorescens* in soil and in the attachment and colonization of wheat roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:21-31.
74. Vande Broek, A.; Lambrecht, M. and Vanderleyden. J. 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 8:2599-2606.
75. van Peer, R.; Punte, H.; de Weger, L and Schippers, B. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere psedomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2462-2470.
76. Vicent, J. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Internat. Biol. Prog. Handbook No. 15. Oxford, UK. Blackwell.
77. Wortmann , C.; McIntyre, B. y Kaizzi, C. 2000. Annual soil improving legumes: agronomic effectiveness, nutrient uptake, nitrogen fixation and water use. *Field Crops Res.* 68:75-83.
78. Zúñiga, D. 2009. “Caracterización y selección de bacterias promotoras d crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Proyecto PERÚ BIODIVERSO – CONCYTEC – GTZ 2009.

ANEXO 1: TABLAS

A.1 Análisis del aserrín pino chileno

ANÁLISIS DE MICRONUTRIENTES	
Fe (ppm)	142
Cu (ppm)	10
Zn (ppm)	7
Mn (ppm)	4
B (ppm)	99

ANÁLISIS DE CARBONO	
C (%)	57.42

ANÁLISIS DE MATERIA ORGÁNICA Y MACRONUTRIENTES	
pH	4.02
C. E. (dS/m)	0.37
M. O. (%)	99.13
N (%)	0.24
P ₂ O ₅ (%)	0.02
K ₂ O (%)	0.06
CaO (%)	0.23
MgO (%)	0.06
Hd (%)	9.83
Na (%)	0.04

ANEXO 2: FIGURAS

ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

E1. Crecimiento de plántulas de trébol rojo en placas.

Porcentaje de germinación (2 días)

Tabla ANOVA para GERMINACIÓN DÍA 2 por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	899	3	299.667	4.39	0.0265
Intra grupos	820	12	68.3333		
Total (Corr.)	1719	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para GERMINACIÓN DÍA 2 por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CONTROL	4	35	X
A	4	39	X
LMC	4	42	X
G	4	55	X

Peso seco de las plántulas (7 días)

Tabla ANOVA para PESO DÍA 7 por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000281753	3	9.39175E-05	4.89	0.0191
Intra grupos	0.000230685	12	1.92237E-05		
Total (Corr.)	0.000512437	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PESO DÍA 7 por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	0.0357	X
A	4	0.03675	X
G	4	0.041175	XX
LMC	4	0.046325	X

E2. Colonización de las raíces de las plántulas de maca.

Peso seco aéreo (PSA) (3 días)

Tabla ANOVA para PSA 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.65E-07	2	8.27E-08	18.22	0.0002
Intra grupos	5.90E-08	13	4.54E-09		
Total (Corr.)	2.24E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	6	0.00075	X
Ps42M	5	0.00096	X
Ps42	5	0.00096	X

Peso seco de la raíz (PSR) (3 días)

Tabla ANOVA para PSR 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.64E-07	2	8.20E-08	23.52	0
Intra grupos	4.53E-08	13	3.49E-09		
Total (Corr.)	2.09E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	6	0.00016667	X
Ps42M	5	0.00034	X
Ps42	5	0.0004	X

Peso seco aéreo (PSA) (7días)

Tabla ANOVA para PSA 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.01E-07	2	5.05E-08	5.8	0.0159
Intra grupos	1.13E-07	13	8.72E-09		
Total (Corr.)	2.14E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	6	0.00116667	X
Ps42M	5	0.00132	X
Ps42	5	0.00134	X

Peso seco de la raíz (PSR) (7días)

Tabla ANOVA para PSR 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.50E-07	2	7.50E-08	16.25	0.0003
Intra grupos	6.00E-08	13	4.62E-09		
Total (Corr.)	2.10E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	6	0.0005	X
Ps42M	5	0.0007	X
Ps42	5	0.0007	X

Peso seco aéreo (15días)

Tabla ANOVA para PSA 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.75E-08	2	1.88E-08	2.03	0.1707
Intra grupos	1.20E-07	13	9.23E-09		
Total (Corr.)	1.58E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	6	0.0013	X
Ps42M	5	0.0014	X
Ps42	5	0.0014	X

Peso seco de la raíz (PSR)(15 días)

Tabla ANOVA para PSR 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.10E-08	2	2.55E-08	4.86	0.0266
Intra grupos	6.83E-08	13	5.26E-09		
Total (Corr.)	1.19E-07	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	6	0.00058333	X
Ps42M	5	0.0007	X
Ps42	5	0.0007	X

Peso seco aéreo (PSA) (28 días)

Tabla ANOVA para PSA 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.33E-08	2	1.67E-08	2.5	0.1237
Intra grupos	8.00E-08	12	6.67E-09		
Total (Corr.)	1.13E-07	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	5	0.0013	X
Ps42M	5	0.0014	X
Ps42	5	0.0014	X

Peso seco de la raíz (PSR) (28 días)

Tabla ANOVA para PSR 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.33E-08	2	1.67E-08	3.33	0.0706
Intra grupos	6.00E-08	12	5.00E-09		
Total (Corr.)	9.33E-08	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	5	0.0006	X
Ps42M	5	0.0007	X
Ps42	5	0.0007	X

Long de la radicular (LR) (cm) (3 días)

Tabla ANOVA para LR 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.197333	2	0.0986667	0.65	0.5392
Intra grupos	1.82	12	0.151667		
Total (Corr.)	2.01733	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para LR 3 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	5	1.64	X
Ps42M	5	1.8	X
Ps42	5	1.92	X

Long de la radicular (LR) (cm) (7 días)

Tabla ANOVA para LR 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0303333	2	0.0151667	0.20	0.8238
Intra grupos	0.924	12	0.077		
Total (Corr.)	0.954333	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para LR 7 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	5	2.07	X
Ps42M	5	2.12	X
Ps42	5	2.18	X

Long de la radicular (LR) (cm) (15 días)

Tabla ANOVA para LR 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.633333	2	0.316667	2.41	0.1323
Intra grupos	1.58	12	0.131667		
Total (Corr.)	2.21333	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para LR 15 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ps42M	5	2.0	X
control	5	2.3	X
Ps42	5	2.5	X

Long de la radicular (LR) (cm) (28 días)

Tabla ANOVA para LR 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0662533	2	0.0331267	0.52	0.6050
Intra grupos	0.75832	12	0.0631933		
Total (Corr.)	0.824573	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para LR 28 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	5	2.4	X
Ps42M	5	2.454	X
Ps42	5	2.56	X

E3. Germinación de semillas peletizadas en placa

Porcentaje de germinación (6 días)

Tabla ANOVA para GERMINACIÓN DÍA 6 por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19230.0	5	3846.0	46.65	0.0000
Intra grupos	1484.0	18	82.4444		
Total (Corr.)	20714.0	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para GERMINACIÓN DÍA 6 por TRATAMIENTO
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
LMCP	4	18	X
GP	4	47	X
control P	4	50	X
control	4	84	X
LMC	4	92	X
G	4	96	X

E4. Supervivencia de los microorganismos inoculadas en las semillas peletizadas.

Tabla ANOVA para Unidades Formadoras de Colonia crecidas en el medio LMC por semilla peletizadas (UFC (LMC)/semilla) por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.77328E14	3	1.92443E14	518.98	0.0000
Intra grupos	4.44975E12	12	3.70812E11		
Total (Corr.)	5.81778E14	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para UFC (LMC)/semilla por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
día 3	4	25000.0	X
día 1	4	1.665E6	X
día 0	4	1.925E6	X
día 2	4	1.4975E7	X

Tabla ANOVA para Unidades Formadoras de Colonia crecidas en el medio G por semilla peletizadas (UFC (G)/semilla) TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.45531E16	3	2.15177E16	938.86	0.0000
Intra grupos	2.75026E14	12	2.29189E13		
Total (Corr.)	6.48282E16	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para UFC (G)/semilla por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
día 3	4	32750	X
día 0	4	1.11E06	X
día 1	4	1.31E06	X
día 2	4	1.48E08	X

E5. Ensayo de crecimiento en potes o macetas de plántulas de trébol rojo peletizadas.

Emergencia de plántulas (2 días)

Tabla ANOVA para EMERGENCIA 2 DÍAS por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	416.714	6	69.4524	2.6	0.0485
Intra grupos	562	21	26.7619		
Total (Corr.)	978.714	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para EMERGENCIA 2 DÍAS por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
N-	4	2.5	X
N+	4	3.25	XX
P	4	3.75	XX
P LMC	4	6.75	XXX
P G	4	7	XXX
SI LMC	4	10.25	XX
SI G	4	14	X

Altura de planta (cm) (30 días de evaluación)

Tabla ANOVA para ALTURA 30 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.22709	6	0.704514	0.78	0.5923
Intra grupos	18.8797	21	0.899033		
Total (Corr.)	23.1068	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para ALTURA 30 DÍAS por TRATAMIENTO

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P LMC	4	11.165	X
P	4	11.525	X
PG	4	11.85	X
SIG	4	11.96	X
Control N -	4	12.15	X
SI LMC	4	12.225	X
Control N +	4	12.35	X

Peso fresco de las plántulas de trébol peletizadas (30 días)

Tabla ANOVA para PESO FRESCO por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.204027	6	0.0340044	0.53	0.7767
Intra grupos	1.33837	21	0.0637321		
Total (Corr.)	1.5424	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PESO FRESCO por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P	4	1.17338	X
PLMC	4	1.3175	X
N-	4	1.32435	X
SI LMC	4	1.32583	X
SIG	4	1.3648	X
N+	4	1.42618	X
PG	4	1.45945	X

Peso seco de las plántulas de trébol peletizadas (30 días)

Tabla ANOVA para PESO SECO por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00187072	6	0.000311787	1.53	0.2164
Intra grupos	0.00427359	21	0.000203504		
Total (Corr.)	0.00614431	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P	4	0.0989	X
N-	4	0.100475	X
N+	4	0.1034	X
SI LMC	4	0.11475	X
SIG	4	0.114925	X
PG	4	0.118875	X
PLMC	4	0.1192	X

Peso seco de la raíz (PSR) de las plántulas de trébol peletizadas (30 días)

Tabla ANOVA para PSR por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00055	6	9.1804E-05	0.67	0.6765
Intra grupos	0.00289	21	0.00013748		
Total (Corr.)	0.00344	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P	4	0.0189	X
SP	4	0.01903	X
SILMC	4	0.0194	X
PG	4	0.02435	X
SIG	4	0.02478	X
PLMC	4	0.02705	X
N+	4	0.03155	X

Peso seco aéreo (PSA) de las plántulas de trébol peletizadas (30 días)

Tabla ANOVA para PSA por TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00188	6	0.00031383	2.78	0.0379
Intra grupos	0.00237	21	0.00011305		
Total (Corr.)	0.00426	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA por TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P	4	0.07185	X
SP	4	0.07988	X
N-	4	0.08158	X
SIG	4	0.09015	X
PLMC	4	0.09215	X
PG	4	0.09453	X
SILMC	4	0.09535	X

ANEXO 4: MEDIOS DE CULTIVO

Medio extracto de Levadura-Manitol (LMC) (Vicent, 1970)

Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Medio extracto de Levadura-Azúcar (A)

Azúcar	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Medio glutamato monosodico-Manitol (G)

Manitol	10.0 g
Glutamato monosodico	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Medio glutamato monosodico-Manitol (AG)

Azúcar	10.0 g
Glutamato monosodico	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Solución Nutritiva de Broughton and Dilworth (SNBD) (Broughton and Dilworth, 1971)

Solución 1	
CaCl ₂ .2H ₂ O	294.1 g/l
Solución 2	
K ₂ HPO ₄	136.1 g/l
Solución 3	
Fe-Citrato	13.26 g/l
MgSO ₄ .H ₂ O	123.3 g/l
K ₂ SO ₄	87.0 g/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0.338 g/l
Solución 4	
H ₃ BO ₃	0.247 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.288 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.100 g/l
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.056 g/l
NaMoO ₂ .2H ₂ O	0.048 g/l
Agar	15 g

Mezclar 0.5 ml de cada solución 1 al 4 y diluir en 1000 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8.