

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



“Caracterización de la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno con capacidad promotora de crecimiento vegetal asociada a una *Brassicaceae* altoandina, *Lepidium meyenii* Walp.”

Presentado por:

CAROLINA ALHELÍ CHUMPITAZ SEGOVIA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2015

A Dios, a mis amados padres Jesús Chumpitaz y Nora Segovia, y hermanos, por darme la fuerza necesaria en la vida para el cumplimiento de mis metas y sueños.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Doris Zúñiga, patrocinadora de la presente tesis de investigación, por su valioso asesoramiento y por darme la oportunidad de poder capacitarme y desarrollarme profesionalmente en su laboratorio, incentivándome constancia permanente.

Al Proyecto “Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva” (Peru Biodiverso, GTZ-CONCYTEC) por hacer posible la obtención del material utilizado en el estudio.

A la Blgo. Katty Ogata, por orientarme durante la realización de este trabajo mediante sus conocimientos, recomendaciones y valiosas experiencias. Por brindarme su tiempo, confianza y amistad incondicional, los cuales valoro y atesoro inmensamente; además por inspirarme constantemente a ser mejor, profesionalmente y como ser humano.

A Ricardo Santos y Elena Ramos, por ser mis maestros, brindándome sus conocimientos y su tiempo tan valioso que ha aportado de manera especial a la realización de este trabajo.

A mis compañeros de LEMYB “Marino Tabusso”: Mónica, Jesús, Francis, Italo, Minoru, Alexandra, Lily, Diego, Martín, Claudia, Jhoselyn, por su amistad, contribuciones y por los buenos momentos compartidos como equipo.

A mis grandes amigos Lindacelia, Ana Claudia, Fiorella, José Carlos y David por su apoyo, consejos y por todos los momentos gratos compartidos en los que estudiamos y trabajamos duramente en la realización de nuestros sueños.

A mi padre Jesús, por siempre haberme incentivado la confianza y la fortaleza necesaria para salir adelante en la vida, por enseñarme que la familia es lo más valioso que se tiene. A mi madre Nora, por sus cuidados, comprensión, constancia y amor incondicional, por enseñarme a ser persistente y ayudarme a superarme cada vez más en la vida. A mis hermanos Silvia, Magaly, Daniel y Gabriela, por apoyarme y acompañarme en todo momento, siendo mis cómplices, grandes consejeros y mis mejores amigos.

A Dios, por bendecir y guiar mi camino, y por darme la fortaleza para seguir adelante cada día que pasa.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN LITERARIA.....	4
2.1 EL CULTIVO DE MACA	4
2.1.1 TAXONOMIA.....	4
2.1.2 BOTÁNICA.....	4
2.1.3 DISTRIBUCIÓN.....	5
2.1.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO	6
2.1.5 PRODUCCIÓN Y DEMANDA	7
2.2 MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR).....	8
2.3 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO.....	9
2.4 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN).....	9
2.5 BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO (DIAZÓTROFOS).....	11
2.6 LA NITROGENASA.....	11
2.7 GEN <i>NIFH</i>.....	12
2.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR-FILOGENÉTICA BACTERIANA.	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 MATERIALES.....	15
3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	16
a. MEDIOS DE CULTIVO.....	16
b. SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	16
c. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS.....	17
3.2 MÉTODOS.....	18
3.2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	18
3.2.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS.....	18
3.2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS.....	18
a. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	18

b. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.....	19
- CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE PH.....	19
- CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA...	19
c. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	19
3.2.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR.....	19
a. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA).....	19
b. SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	20
3.2.5 ANÁLISIS INTEGRADO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y PGPR.....	20
3.2.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	20
a. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	21
b. AMPLIFICACIÓN BOX-PCR FINGERPRINTING.....	21
3.2.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	22
a. AMPLIFICACIÓN PCR- ADN RIBOSOMAL 16S.....	22
b. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD Y CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS.....	23
3.2.8 DETECCIÓN DEL GEN DE LA NITROGENASA REDUCTASA (<i>nifH</i>).....	23
3.2.9 ENSAYO DE GERMINACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO.....	24
3.2.10 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	25
4.1 BACTERIAS DIAZÓTROFAS.....	25
4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	27
4.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.....	28
4.4 CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	32
4.5 ANÁLISIS INTEGRADO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.....	39
4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	41
4.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	44
4.8 DETECCIÓN DEL GEN DE LA NITROGENASA REDUCTASA (<i>nifH</i>)....	51
4.9 EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LAS CEPAS DIAZÓTROFAS PGPR EN LA GERMINACIÓN DE <i>L. meyenii</i>.....	53

V. CONCLUSIONES.....	57
VI. RECOMENDACIONES.....	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de las cepas en estudio.....	25
Cuadro 2. Relación de bacterias diazótrofes presente en suelos de cultivo de maca.....	26
Cuadro 3. Características morfológicas macroscópicas de las cepas en estudio en MMSN.....	27
Cuadro 4. Producción de ácido indol acético por parte de las cepas en estudio.....	33
Cuadro 5. Solubilización de sales fosfato a los 15 días de evaluación.....	36
Cuadro 6. Análisis filogenético de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de <i>L. meyenii</i> en base a la secuencia del gen del ARNr 16S.....	44
Cuadro 7 Efecto de las cepas PGRr <i>nifH</i> + en la germinación de semillas de <i>L. meyenii</i>	53
Cuadro 8. Características fisicoquímicas de los suelos muestreados.....	73
Cuadro 9. Características morfológicas de las cepas en estudio seleccionadas en función a su crecimiento en MMSN a las 72 horas de cultivo.....	74
Cuadro 10. Caracterización fisiológica de las cepas en función a su crecimiento a diferentes temperaturas con respecto al control a 28°C en medio LMA a los 5 días de cultivo.....	77
Cuadro 11. Caracterización fisiológica de las cepas en función a su crecimiento a diferentes niveles de pH con respecto al control a pH 7 en medio LMA a los 5 días de cultivo.....	79
Cuadro 12. Caracterización bioquímica de las cepas en estudios.....	82
Cuadro 13. Solubilización de fosfato bicálcico por parte de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de maca en medio NBRIP.....	83
Cuadro 14. Solubilización de fosfato tricálcico por parte de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de maca en medio NBRIP.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. A) La maca (<i>Lepidium meyenii</i>), A1) inflorescencia racemosa, A2) fruto tipo silicua; A3) raíz carnosa.....	5
Figura 2. Distribución geográfica de la producción de la maca en el Perú.	6
Figura 3. Comportamiento porcentual de la cantidad de bacterias provenientes de diferentes campos de cultivo de maca en base a un total de 47 cepas	26
Figura 4. Morfotipos de las cepas en estudio en MMSN con azul de bromotimol	28
Figura 5. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes temperaturas en medio LMA a los 5 días de cultivo.....	29
Figura 6. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes niveles de pH en medio LMA con azul de bromotimol a los 5 días de cultivo.....	31
Figura 7. Ensayo <i>Hugh-Leifson</i> para la determinación del metabolismo oxidativo/fermentativo.	32
Figura 8. Comportamiento porcentual de las cepas en base al nivel de producción de AIA (en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) producido.	32
Figura 9. Producción de ácido indolacético (AIA).....	35
Figura 10. Halos de solubilización de fosfato producido a los 3 días en medio NBRIP- bicálcico y NBRIP-tricálcico.....	37
Figura 11. Halos de solubilización de fosfato producidos por las cepas obtenidas del cultivo de maca a los 15 días en medio NBRIP-bicalcico (A) y NBRIP-tricalcico (B).	38
Figura 12. Dendograma fenotípico en base a las características morfológicas, fisiológicas y promotoras de crecimiento vegetal de las cepas en estudio.....	40
Figura 13. Perfiles BOX-PCR de las cepas en estudio.	41 y 42
Figura 14. Dendograma obtenido a partir de los perfiles BOX-PCR de las cepas en estudio.....	43
Figura 15. Árbol Neighbor-joining contruido por el método Kimura-2 parametros mostrando la localización taxonómica de la cepa LMTZ064-118 perteneciente al <i>phylum</i> α Proteobacteria en función a la secuencia del gen del ARNr 16S.....	45
Figura 16. Árbol <i>Neighbor-joining</i> construido por el método Kimura-2 parametros mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al <i>phylum</i> β Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S.....	46
Figura 17. Árbol <i>Neighbor-joining</i> mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al <i>phylum</i> γ Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S. Se usó la secuencia de <i>P. azotoformans</i> como <i>Outgroup</i>	48

Figura 18. Árbol <i>Neighbor-joining</i> mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al <i>phylum</i> γ Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S. Se usó la secuencia de <i>Paenibacillus sp.</i> como <i>Outgroup</i>	50
Figura 19. Amplificación del fragmento de 370 pb del gen <i>nifH</i> de las cepas representantes de los diferentes perfiles BOX-PCR.....	51
Figura 20. Efecto de la inoculación de las cepas <i>nifH+</i> diazótrofes en el porcentaje de germinación de semillas de <i>L. meyenii</i>	53
Figura 21. Efecto de la inoculación de las cepas <i>nifH+</i> diazótrofes en el porcentaje de germinación de semillas de <i>L. meyenii</i> a los 6 días post-inoculación.....	54
Figura 22. Efecto de la inoculación de las cepas <i>nifH+</i> en el porcentaje de germinación de semillas de <i>L. meyenii</i> a los 9 días post-inoculación....	55
Figura 23. Germinación de semillas de maca a los 9 días post-inoculación.....	55
Figura 24. Efecto de la inoculación de las cepas <i>nifH+</i> en el peso seco de germinados de <i>L. meyenii</i> a los 9 días post-inoculación.....	56
Figura 25. Efecto de la inoculación de cepas <i>nifH+</i> en el desarrollo de pelos radiculares en la germinación de semilla de maca.....	56
Figura 26. Crecimiento de cepas diazótrofes representantes de cada perfil BOX obtenidas del cultivo de maca a los 3 días en medio mineral sin nitrógeno (MMSN) con azul de bromotimol.....	93
Figura 27. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes temperaturas (6, 14, 22, 28 y 35°C) en medio LMA a los 5 días de cultivo.....	94 y 95
Figura 28. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes valores de pH a los 5 días en medio LMA con azul de bromotimol.....	96 y 97
Figura 29. Diversidad de perfiles BOX-PCR obtenido de las 47 cepas en estudio. Los carriles del I al XIX indican los 19 perfiles distintos obtenidos.....	98
Figura 30. Fragmento entre la posición 115 y 476 correspondiente al gen <i>nifH</i> en referencia al genoma de <i>A. vinelandii</i> (M20568).....	98
Figura 31. Germinación de semillas de maca a los 4dpi con cepas <i>nif H+</i> nativas de suelos de cultivo de maca.	99

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: CUADROS DE RESULTADOS.....	73
ANEXO 2: ESTADÍSTICAS.....	89
ANEXO 3: FIGURAS.....	93
ANEXO 4: MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES DE REVELADO Y REACTIVOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	100

RESUMEN

Lepidium meyenii Walp. (“maca”) es la única *Brassicaceae* cultivada entre los 3700 y 4500 msnm. Su raíz es muy valorada internacionalmente debido al alto valor nutricional, sin embargo, es muy extractiva, empobrece los suelos en materia de nutrientes disponibles luego de dos campañas de cosecha, siendo así un cultivo poco sostenible en el tiempo. La aplicación de inoculantes bacterianos diazótrofos promotores de crecimiento vegetal (PGPR) nativos es una alternativa ecológica para el desarrollo vegetal y el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Por ello, el presente trabajo de investigación está orientado a caracterizar fenotípica y molecularmente la diversidad de bacterias diazótroficas PGPR del cepario del Laboratorio de Ecología microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, obtenida de suelos de cultivo de maca de la meseta de Bombón pertenecientes a la provincia de San Pedro de Cajas, Junín. Cuarenta y siete cepas fueron sembradas en MMSN, encontrándose 5 morfotipos, destacando aquellas con colonias grandes, mucosas, capaces de acidificar el medio. El 95.7 % de las cepas fueron clasificadas como bacterias psicrótrofas. Todas fueron clasificadas como bacterias neutrófilas, con amplia tolerancia a pH entre 3 y 9. En cuanto a sus capacidades PGPR, todas produjeron AIA (0.1 a 75 µg/ml). El 74.5 % del total solubilizaron sales fosfato. Del análisis molecular, se obtuvo 19 perfiles BOX-PCR distintos, siendo identificados en función al gen del ARNr 16S pertenecientes a la clase γ -proteobacteria (*Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* y *Erwingella*), β -proteobacteria (*Burkholderia*, *Achromobacter* y *Variovorax*), y α -proteobacteria (*Rhizobium*). Se detectó la presencia del gen *nifH* en 6 clusters BOX-PCR, encontrándose emparentados con *Rahnella aqualitis*, *Pseudomonas brenneri*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Burkholderia caledonica*, *Pantoea agglomerans* y *Serratia liquefaciens*, indicando su potencial como PGPRs con actividad nitrogenasa (*nifH*⁺), además mostraron significancia ($p < 0.05$) en el porcentaje de germinación y peso seco de germinados de maca, sugiriendo la relevancia de estas cepas para ser usadas como inoculantes en este cultivo.

Palabras clave: Diazótrofos, PGPR, *nifH*, maca, *Lepidium*, zona altoandina, diversidad.

Abstract

Lepidium meyenii W. is the only *Brassicaceae* that grows in the highlands of Peru. Its root has high value in international markets, due to its nutritional properties. However, this crop needs nutrients to grow, impoverishing the soil after two harvest campaigns; which makes it unsustainable. Diazotrophic bacteria inoculums seems to be a friendly alternative way to improve plant growth and maintain the soil fertility. Therefore, this study was focused in the molecular and phenotypic characterization of the diazotrophs PGPR diversity that belongs to the strain bank of the Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, Department of Biology, in Universidad Nacional Agraria La Molina. Bacteria were isolated from a maca field located in La Meseta del Bombom, San Pedro de Cajas province - Junin. Forty-seven strains were able to grow on nitrogen free culture medium and all of them were classified into five morphotypes. The majority of the isolates showed big and mucous colonies with the ability to acidify the culture medium. 95.7% of the strains were psicrotrophyles and all of them were neutrophilic with a wide range of pH tolerance between 3 to 9. All bacteria produced indolacetic acid, ranging from values between 0.1 to 75 ug/ml. 74.5% of the isolates were able to solubilize phosphate salts. BOX-PCR fingerprint pattern was done, resulting in 19 different profiles that were identified using 16S rRNA analysis. According to this analysis, it was obtained that bacteria were related to γ -proteobacteria (*Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* and *Erwingella*), β -proteobacteria (*Burkholderia*, *Achromobacter* class and *Variovorax*); and α -proteobacteria (*Rhizobium*). Presence of *nifH* gene was detected in six BOX-PCR clusters. Species related with *Rahnella aqualitis*, *Pseudomonas brenneri*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Burkholderia caledonica*, *Pantoea agglomerans* and *Serratia liquefaciens*, showed the *nifH* gene, indicating their potential as PGPR with nitrogenase activity (*nifH*⁺). Finally, *nifH*⁺ PGPR strains were tested in its capability of improve germination of maca seeds, showing a significant ($p < 0.05$) increase in the germination percentage and in dry weight suggesting the relevance of these bacteria for been used as inoculums in this crop.

Key words: Diazotrophs, PGPR, *nifH*, maca, *Lepidium*, highlands, diversity.

I. INTRODUCCIÓN

La maca (*Lepidium meyenii* Walp.) es una Brassicaceae, cultivada en zonas altoandinas del Perú entre los 3700 y 4500 msnm y es domesticada en los Andes, en el piso ecológico de la Puna, caracterizada por presentar temperaturas entre 2 a 26°C, con presencia de heladas, altas radiaciones solares, vientos fuertes y suelos ácidos. La Meseta de Bombón, ubicada en la región Junín-Pasco, produce cerca del 90% de la producción nacional de maca (Aliaga *et al.*, 2007). Su raíz, utilizada como alimento, es abundante en proteínas, vitaminas y aminoácidos esenciales. Debido a ello, está siendo valorada y demandada por el mercado internacional (americano, europeo y asiático). Tan sólo en el periodo 2014, las exportaciones de este cultivo se duplicaron con respecto al año anterior (SIICEX, 2015), lo que demuestra su importancia económica. Un inconveniente que presenta la maca es que, al ser muy demandante en nutrientes, genera el empobrecimiento de los suelos en materia de nitrógeno y nutrientes disponibles, evitando que se pueda volver a cultivar por más de dos campañas de siembra consecutivas en el mismo terreno, es así que los agricultores se ven en la obligación de reponer la fertilidad de los suelos dejándolos descansar por varios años, ya que el proceso de mineralización es demasiado lento en tan exigentes condiciones ambientales, propias de la zona.

Las comunidades microbianas de suelo juegan un rol importante en la transformación orgánica y flujo de nutrientes. Entre los microorganismos asociados a las raíces, están las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) las cuales mediante mecanismos directos, como la producción de fitohormonas tipo auxina, la solubilización de sales fosfato y fijación de nitrógeno, o indirectos como biocontroladores de fitopatógenos (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011), permiten la mejora de los rendimientos de diversos cultivos de manera sostenible y ecológica en distintas etapas fenológicas de la planta.

Las bacterias diazótroficas, son microorganismos capaces de fijar el N₂ de la atmósfera (elemento constituyente de diferentes moléculas orgánicas), poniéndolo disponible en formas más asimilables. La capacidad fijadora de nitrógeno por parte de estas bacterias se atribuye a la presencia de un complejo enzimático denominado “nitrogenasa”, cuya información genética se encuentra codificada en los genes *nif* (Raymond *et al.*, 2004). Los diazótrofos son considerados PGPR, debido a su ventaja competitiva en ambientes pobres en nitrógeno; además de haberse reportado la capacidad de producción de fitohormonas del tipo auxinas, giberelinas y citoquininas (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993) así como actividad solubilizadora de sales fosfato (Loganathan & Nair, 2004).

Son numerosos los estudios de diversidad microbiana presente en el suelo, sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado completamente la biodiversidad microbiana para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Stewart, 1991). En tal sentido, son muy importantes los estudios sobre la diversidad y caracterización de cepas bacterianas nativas que estén involucradas en el proceso de fijación de nitrógeno y que tengan cualidades PGPR asociadas a suelos de cultivos altoandinos. El uso de la diversidad microbiana de dichas zonas sería una herramienta biotecnológica potencial para el futuro desarrollo de inoculantes nativos que puedan lograr aumentar la productividad de los suelos agrícolas de manera natural, en armonía con el medio ambiente, asegurando las características orgánicas del cultivo frente a la aplicación de fertilizantes sintéticos comunes, que a largo plazo generarían problemas productivos y medio ambientales. Así también, el hallazgo de especies bacterianas adaptadas a condiciones altoandinas amplía la información genética y metabólica con el objeto de la búsqueda de nuevos genes que permitan brindar la capacidad de tolerar ciertas condiciones de estrés ambiental en zonas altoandinas, permitiendo un mejor manejo del suelo, disminuyendo el periodo de descanso de los mismos y haciéndolos más productivos.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo caracterizar la diversidad de bacterias diazótroficas con capacidad PGPR presentes en suelos altoandinos relacionados a la maca, con la finalidad de que dichas cepas sean promisorias para el desarrollo de bioinoculantes, como una alternativa ecológica para el desarrollo vegetal y el mantenimiento de la fertilidad del suelo de cultivo de maca.

Objetivo general

Caracterizar e identificar bacterias diazótroficas con capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de suelos de cultivo de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) provenientes de la meseta del Bombón, del distrito de San Pedro de Cajas, Junín, que son parte de la colección de cepas bacterianas del Laboratorio de Ecología microbiana y biotecnología “Marino Tabusso” - UNALM.

Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotípicamente las bacterias en estudio mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.
- Evaluar a nivel de laboratorio la capacidad PGPR de cada uno de las bacterias.
- Caracterizar molecularmente la diversidad de las bacterias mediante el análisis BOX-PCR.
- Identificar el género y especie de las bacterias de cada grupo obtenido del análisis BOX-PCR utilizando el gen del ADN ribosomal 16S.
- Evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las bacterias mediante la amplificación del gen *nifH*.
- Evaluar el efecto de la inoculación de las cepas *nifH*⁺ en la germinación de semillas de maca a nivel de laboratorio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL CULTIVO DE MACA

Su nombre científico es *Lepidium meyenii* Walp. Es una planta herbácea bianual perteneciente a la familia *Brassicaceae* que es cultivada en zonas altoandinas del Perú.

2.1.1 TAXONOMIA

El género *Lepidium* se encuentra clasificado dentro de la familia Brassicaceae, Orden Brassicales, perteneciente al clado Eurosids II (APG III, 2009).

Cladus: Eurosids II

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Lepidieae

Género: *Lepidium*

Especie: *Lepidium meyenii* Walp.

NC: “Maca”

2.1.2 BOTÁNICA

La maca es una planta en forma de roseta, de tallo corto que posee un órgano subterráneo, formado por la parte inferior del hipocotilo y la raíz principal (León 1964; Tello *et al.* 1992). El hipocotilo almacena nutrientes volviéndose carnoso. Esto sucede durante el periodo

vegetativo (8 a 9 meses). Dicho órgano es napiforme axonomorfo, la cual ésta integrada a una raíz gruesa con numerosas raíces laterales absorbentes.

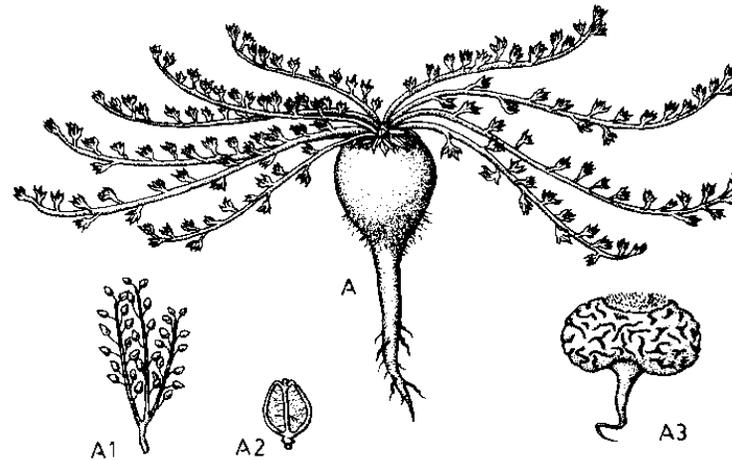


Figura 1. A) La maca (*Lepidium meyenii*), A1) inflorescencia racemosa, A2) fruto tipo silícula; A3) raíz carnosa. (FUENTE: FAO, 1994)

Sus hojas son compuestas con vaina ensanchada y con un limbo compuesto de 6 a 9 cm. Las hojas basales son pinnatífidas y caulinares. La inflorescencia es en forma de racimo axilar, cuyas flores son blancas con sépalos de color verde y violeta son hermafroditas y actinomorfas, con 2 estambres y un ovario bicarpelar. Los frutos silículas con dos semillas, de color naranja o amarillo.

2.1.3 DISTRIBUCIÓN

La maca es la única raíz tuberosa andina que tiene como centro de domesticación y producción la sierra alta de la zona central del Perú (Aliaga, 1999), siendo la Meseta de Bombón la zona de mayor producción y variabilidad genética del Perú y del mundo, la cual se encuentra ubicada entre el noroeste del departamento de Junín y suroeste del departamento de Pasco (Figura 2), entre los 4000 y 4500 msnm correspondiente al piso ecológico Puna, caracterizada por presentar alta irradiación solar, heladas, vientos fuertes y suelos ácidos. Por su gran demanda, la producción del cultivo se extendió a los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huánuco, Huancavelica y Puno en la zona central y sur del Perú, sin

embargo en estas zonas su uso es limitado para el autoconsumo y/o venta local (Aliaga *et al.*, 2007).

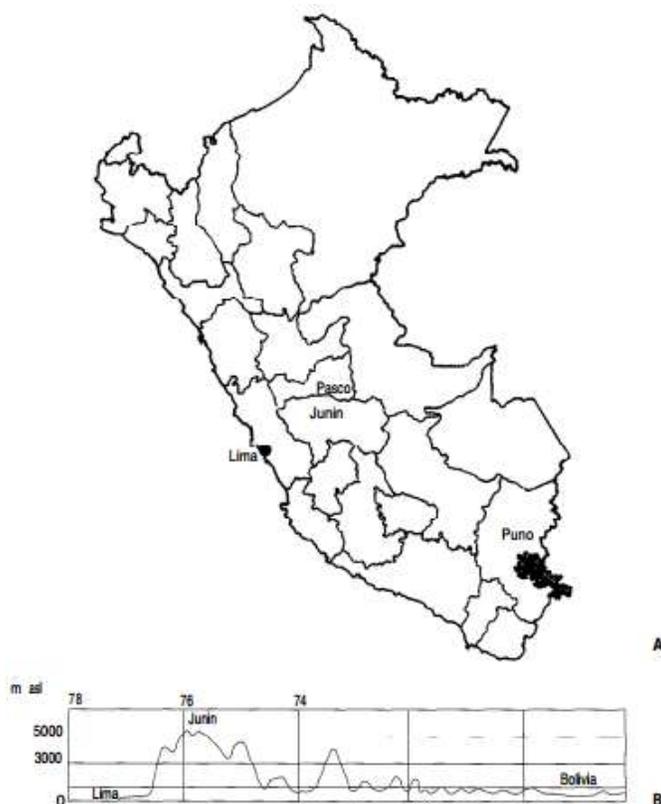


Figura 2. Distribución geográfica de la producción de la maca en el Perú.
(FUENTE: Quirós & Aliaga, 1997).

2.1.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO

La importancia de este cultivo recae en su alto valor nutricional. Solo su tallo (hipocotilo) posee el 11 por ciento proteínas en materia seca y 14 por ciento en la pasta entre las que se incluyen una alta variedad de aminoácidos esenciales, cantidades significativas de minerales (Ca, Mg, K, Fe, Si; I, Mn, Zn, Na, Cu) (Piacente *et al.*, 2002), y vitaminas como tiamina, riboflavina y ácido ascórbico. Esta planta es empleada desde tiempos precolombinos, atribuyéndosele propiedades medicinales como estimulante de la reproducción, energizante o

revitalizador físico-mental y como anticancerígeno debido a la producción de ciertos compuestos como los glucosinolatos (León, 1964).

La producción de maca se realiza de manera artesanal. Se siembra en monocultivo y es efectuada al voleo sobre terrenos trabajados (kallpar) o descansados (purum), en donde se ha producido un acumulamiento de importantes cantidades de nutrientes y materia orgánica por varios años. El suelo de cultivo debe estar libre de malezas, arado, granulado y mullido. Durante la siembra, las semillas son cubiertas de manera superficial con ramas o rastrillos, otra alternativa es usar ovejas las cuales pisan el piso logrando cubrirlas (Aliaga, 2004). El cultivo es intensivo en mano de obra para el deshierbo de maleza y desahije. Luego de 6 a 8 meses se procede con la cosecha, cuando las hojas se tornan amarillentas, indicando la madurez del cultivo. Durante el crecimiento y desarrollo de la planta no se efectúan labores que impliquen aplicaciones de productos sintéticos o nocivos para los ecosistemas, manteniéndose así una producción orgánica, pero aún artesanal.

2.1.5 PRODUCCIÓN Y DEMANDA

Este cultivo es muy demandado por el mercado internacional, siendo EEUU el principal destino (33.46%), seguido de Hong Kong, China, Japón, Australia, Alemania y Reino Unido, siendo las presentaciones más frecuentes las harinas (32.22%), seguido en forma de materia prima y cápsulas. La demanda ha ido en aumento en los últimos años, reportándose que solo hasta finales del 2014 hubo un incremento en las exportaciones de la maca peruana con respecto al 2013, al pasar de US\$ 14 millones a US\$ 36 millones de valor FOB (SIICEX, 2015). Estas cifras indican que la maca tiene un gran potencial comercial y un mercado por explorar a nivel mundial, y por ello exige nuevas tecnologías de manejo orgánico de los suelos que permita satisfacer la creciente demanda mejorando el rendimiento, la calidad del producto, y reponer la calidad nutricional del suelo de manera natural en armonía con el medio ambiente.

2.2 MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)

Los microorganismos que colonizan la rizósfera (rizobacterias) pueden ser clasificados de acuerdo a su efecto sobre la planta y por su mecanismo de interacción con la raíz. Las rizobacterias que habitan circundante a las raíces de las plantas y que ejercen efectos positivos sobre ellas mediante diferentes mecanismos son conocidas como *Plant growth-promoting rhizobacterias* (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980).

Las PGPR abarcan un gran número de especies bacterianas, el cual ha ido en aumento como resultado de numerosos estudios desarrollados en un amplio rango de especies vegetales (silvestres y cultivadas, de importancia económica) y debido a los avances realizados en taxonomía bacteriana y en el entendimiento de los diferentes mecanismos de acción de las PGPR (Lucy *et al.*, 2004). Especies pertenecientes a los géneros, *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y *Bacillus* han sido reportadas como excelentes mejoradores del crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 1989; Glick, 1995) y más recientemente ciertos géneros de *Enterobactereceae* como *Rahnella* (Berge *et al.*, 1991).

Los mecanismos que desarrollan las PGPR, que resultan beneficiosos en los sistemas suelo-planta, pueden ser del tipo directo o indirecto (Kloepper, 1993). Los mecanismos directos incluyen la producción de estimulantes como fitohormonas y compuestos volátiles, la mejora del estado nutricional de la planta poniendo en disponibilidad compuestos como fosfatos de fuentes insolubles, la fijación biológica de nitrógeno y la estimulación de mecanismos de resistencia a daños (resistencia sistemática inducida, ISR). Los mecanismos indirectos incluyen aquellos en los cuales el PGPR actúa como un agente biocontrolador reduciendo los daños, cuando estimulan otras simbiosis benéficas, o cuando generan una protección a la planta mediante la degradación de compuestos xenobióticos en suelos contaminados (Jacobsen, 1997).

Somers *et al.* (2004) clasifican a las rizobacterias en función a su acción biológica. Es así que existen los *fitoestimuladores* productores de hormonas, vitaminas y otras sustancias que estimulan la germinación de las semillas y del enraizamiento; los *biofertilizantes*, que debido a

su protagonismo en los ciclos biogeoquímicos, mejoran la estructura del suelo mediante la formación de agregados estables como consecuencia de su crecimiento, incrementando y poniendo disponibles nutrientes necesarios para las plantas; los *biopesticidas* o *controladores biológicos* que proporcionan protección a la planta frente al estrés biótico; y por último los *bioremediadores* y *mejoradores ecofisiológicos* que incrementando la resistencia y tolerancia al estrés abiótico como son la salinidad, sequía, degradación de productos xenobióticos.

Las PGPR, en la actualidad, vienen siendo usados potencialmente en la estimulación del crecimiento y en el incremento de los rendimientos en diferentes cultivos de importancia alimentaria y económica (Saharan & Nehra, 2011). Se han reportado en estudios anteriores que la inoculación de estos microorganismos genera mejoras en el crecimiento e incrementos del rendimiento en cultivos de interés económico como la maca, tara, papa, pallar, frejol, tomate (Zúñiga, 2010; Ogata & Zúñiga, 2010; Calvo *et al.*, 2008; Ramos & Zúñiga, 2008; Santillana *et al.* 2005).

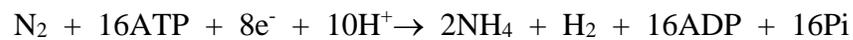
2.3 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es constituyente fundamental de muchas moléculas biológicas: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. El nitrógeno molecular constituye aproximadamente el 78 por ciento de la composición atmosférica y es la única reserva de nitrógeno accesible en la biósfera (Behar *et al.*, 2005), sin embargo, esta no puede ser utilizada directamente por organismos superiores como las plantas y deben de ser transformado a formas más asimilables como lo son el amonio y nitratos. Posteriormente, las plantas constituyen un medio por el cual el nitrógeno puede ser transformado y aprovechado por los animales y el hombre.

2.4 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno gaseoso (N₂) es asociado a otros elementos dando lugar a formas más asimilables metabólicamente. Es realizado por algunos microorganismos (principalmente bacterias y algunas Archeae) que

habitan en diversos ambientes. Esto es debido a que poseen el complejo enzimático nitrogenasa. La nitrogenasa es capaz de romper el triple enlace del N₂ y reducirlo a NH₄. Además, es capaz de reducir simultáneamente a la ferredoxina y a otros citocromos y coenzimas haciendo que los protones (H⁺) formen hidrógeno molecular (H₂) en la reacción. Este proceso es demandante en energía, requiriendo cantidades significativas en forma de ATP (un mínimo de 960 kJ por unidad de N fijado), esto es debido a la alta estabilidad del triple enlace presente en el N₂. Se necesitan de 8e⁻ para la formación de NH₃ y H₂ como productos finales través del complejo nitrogenasa (Pate & Layzell, 1990).



Esta enzima también es capaz de catalizar la reducción de diferentes sustratos que usualmente contienen un triple enlace en su estructura química, tal como N₂O, cianuro, ciclopropeno y acetileno (Staal *et al.*, 2001).

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico permite el ingreso del nitrógeno a muchos ecosistemas terrestres, acuáticos y marinos. Se estima que este proceso contribuye con el ingreso de este en un total del 65%, siendo así el mayor proveedor de este nutriente para la manutención de la vida en el planeta. El nitrógeno ya fijado es finalmente utilizado por organismos superiores para la formación de biomasa y energía (Hungria *et al.*, 2007)

Los diferentes cambios en los ciclos biogeoquímicos pueden afectar la tasa de fijación de nitrógeno. Por ejemplo, los niveles de oxígeno y amonio en el ambiente generan una regulación en los procesos de transcripción de los genes implicados en el proceso.

Según Alexander (1994), la tasa de fijación de nitrógeno también se ve influenciada por la humedad del suelo y la temperatura, incrementándose la actividad nitrogenasa cuando se incrementan estos factores.

2.5 BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO (Diazótrofos)

La capacidad de transformar el nitrógeno molecular a formas más asimilables, fijándolo al suelo y poniéndolo así disponible para las plantas está limitado a sólo ciertos grupos de microorganismos de bacterias y Archaea (Raymond *et al.*, 2004). Estos microorganismos son conocidos como Diazótrofos, los cuales se encuentran distribuidos en diferentes habitats, en buena parte, dentro de una amplia gama de microorganismos del suelo, de gran diversidad en taxonomía, adaptación y asociación con muchas especies vegetales (Dixon & Kahn, 2004). Son 87 especies de arqueas, 38 géneros de bacterias y 20 géneros de cianobacterias que se han identificado como microorganismos diazótrofos (Hussein, 1998), y este número ha ido en aumento.

La habilidad de fijar nitrógeno se encuentra presente en diversos grupos bacterianos que incluyen a las bacterias sulfuradas, Firmicutes, actinobacterias, cianobacterias y todas las subgrupos del *phylum* Proteobacteria (Dixon & Kahn, 2004). En la rizósfera de diferentes plantas, se ha reportado que la fijación de nitrógeno es realizada por ciertos géneros como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* y *Desulfovibrio* (Atlas & Bartha, 2002). Así también por ciertas enterobacterias tales como *Klebsiella oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia carotovora*, *Citrobacter freundii*, *C. intermedius*, *Rahnella aquatilis* y *Serratia marcescens*, entre otros, han sido reportadas como diazótropas asociadas con plantas, tanto en ambientes tropicales y fríos.

2.6 LA NITROGENASA

La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por medio del complejo enzimático denominado “Nitrogenasa”. Este complejo está constituido por dos subunidades metaloproteicas: la Proteína I dependiente de Fe-Mo también llamada dinitrogenasa, un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con un PM aproximado de 220 KDa, que es codificado por los genes *nifDK* y cuya función es la reducción del N_2 a amonio y del $2H^+$ a H_2 ; y la Proteína II dependiente de Fe o también llamada dinitrogenasa reductasa, un dímero γ_2 con un PM de 65 KDa

aproximadamente, cuya función es la de transportar los electrones aportados por donadores fisiológicos (ferrodoxina o flavodoxina) hacia la proteína I para la reacción de reducción. Es codificada por el gen *nifH* (Dedysh *et al.* 2004).

Existen diferentes tipos de nitrogenasa dependiendo de la naturaleza del grupo metal presente en su sitio activo. Las nitrogenasas convencionales son aquellas que son dependientes de Molibdeno (FeMoco) en su centro activo, mientras que las nitrogenasas alternativas son aquellas que son independientes de Molibdeno (FeCo) y aquellas dependientes de Vanadio (FeVaco) (Igarashi & Lance, 2003). Es así que existen cinco grupos de clasificación: El Grupo I consiste en las nitrogenasas convencionales presente en cianobacterias y α , β y γ proteobacterias, este grupo es el más amplio. El Grupo II incluye a las nitrogenasas convencionales pero de microorganismos anaerobios obligados, tal como bacterias metanogénicas, acetogénicas y Clostridia. El Grupo III contiene a las nitrogenasas alternativas. El grupo IV contiene análogos de la nitrogenasa no caracterizados y detectados solo en bacterias metanogénicas y algunas bacterias fotosintéticas. El grupo V: incluye a homólogos de la nitrogenasa tales como la clorofila reductasa y protoclorofila reductasa presente en cianobacterias (Raymond *et al.*, 2004).

La nitrogenasa es regulada por factores externos tales como la luz, oscuridad, cantidad de nitrógeno fijado, disponibilidad de nitrógeno en el medio, regulación en sitios alostéricos por cofactores, en la transcripción, pre y post-traducción.

2.7 EL GEN *nifH*

En los últimos años, la secuencia molecular de los genes de la nitrogenasa vienen siendo usados en investigaciones de diversidad y filogenia para diazótrofos en ambientes terrestres (Widmer *et al.*, 1999) y marinos (Zehr *et al.*, 1998). El enfoque molecular está basado en la amplificación de un gen que se encuentra altamente conservado en diversos grupos filogenéticos procarióticos: el gen *nifH*, el cual cuenta con una amplia colección en el *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=nifH>). Los genes *nifH* constituye uno de los genes estructurales que forma parte del operón *nifHDK*, que se encuentra implicado en el

proceso de fijación de nitrógeno y cuya codificación da lugar a la subunidad denominada dinitrogenasa Reductasa (Proteína II).

Al contener una alta información filogenética (Poly *et al.*, 2001), el análisis evolutivo molecular de los genes *nifH* resulta una herramienta representativa para el estudio de la diversidad de bacterias diazótrofes en el ambiente (Ueda *et al.*, 1995). Es posible la construcción de árboles filogenéticos similares con los obtenidos mediante el análisis del gen del ARN ribosomal. Bürgmann *et al.* (2004) describe en un estudio de filogenia en base a los genes *nifH* que en el dominio *Bacteria*, el *phylum* Cyanobacteria y el género *Frankia* (*Actinobacteria*) forman clústers independientes. El *phylum* *Proteobacteria* (con excepción de las δ -proteobacteria sulfato reductoras) forman un solo clúster con subcluster definidos, semejante a la filogenia basada en el análisis del ARN ribosomal.

Es así que la diversidad de genes *nifH* permite el estudio taxonómico de bacterias diazótrofes y pueden ser usados en investigaciones de diversidad de comunidades bacterianas capaces de fijar nitrógeno.

2.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR-FILOGENÉTICA BACTERIANA

En la actualidad se están empleando técnicas más sofisticadas en los estudios de diversidad y caracterización bacteriana utilizando diversas herramientas moleculares como el ARDRA, DGGE o REP-PCR, o por medio de pruebas fenotípicas. Todas estas analizan y comparan los genomas y establecen una homología entre ellas, permitiendo la formación de grupos bacterianos con información genética muy similar, los cuales suponen habilidades muy cercanas (Ramos *et al.*, 2007).

En particular, el análisis BOX-PCR es un método de *Repetitive Extragenic Polymorphism* (REP) PCR que se basa en la amplificación de segmentos de secuencias entre repeticiones extragénicas conservadas entre la mayoría de genomas bacterianos utilizando un primer oligonucleótido simple para producir patrones de bandas cuyo tamaño y número caracterizan y diferencian a una cepa de otra (Seurinck *et al.*, 2003). Las diferentes huellas obtenidas pueden ser posteriormente caracterizadas por métodos de identificación bacteriana más específicos

como los estudios de amplificación de genes esenciales, *Housekeeping*, y del gen del ARN ribosomal 16S bacteriano.

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pb, codificado por el *gen rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. En base a ello, fue considerado por Woese (1987) como cronómetro molecular definitivo por ser una molécula muy antigua presente en todas las bacterias, cuya estructura y función han permanecido constantes en el tiempo. Constituye, por tanto, una diana universal para identificación molecular, además el tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas. Dado que resulta relativamente fácil secuenciarlo, existen amplias bases de datos que se encuentran en continuo crecimiento.

El término secuenciamiento se refiere al método que se utiliza para la determinación del orden de los nucleótidos con bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina o timina) en una molécula de ADN. Los métodos de secuenciamiento emplean bases nitrogenadas marcadas (dye dNTPs) que permiten que se realice el proceso en una sola reacción de polimerización, la cual da como resultado una molécula de ADN con bases que emiten diferentes longitudes de onda o fluorescencia, proporcionando un cromatograma en el cual cada base nitrogenada presenta un color característico que permite la lectura de la secuencia.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S bacterianos lo que indique su relación evolutiva. Adicionalmente, el análisis comparativo de secuencias permite la construcción árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Woese, 1987). Es por ello que, la comparación de las secuencias del gen del ARNr 16S permite una factible caracterización y el establecimiento de relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procarióticos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A. CEPAS BACTERIANAS

- Las cepas empleadas en el siguiente estudio fueron obtenidas de muestras de suelos de cultivo de maca de la meseta de Bombón pertenecientes a la comunidad de San Pedro de Cajas, Junín como parte del proyecto Perú biodiverso GTZ-Concytec (Zúñiga, 2010) y que son parte del cepario del Laboratorio de ecología microbiana y biotecnología “Marino Tabusso”- UNALM.
- Cepa Azo16M2 (*Rahnella aquatilis*) aislado de la rizósfera de papa (Kohashikawa, 2010).
- Cepa Ps155 (*Pseudomonas sp.*) aislado de la rizósfera de maca (Zúñiga, 2010).
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218.
- Cepa CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

B. MATERIAL VEGETAL

- Semillas de *Lepidium meyenii* Walp.

3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

A. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio mineral sin nitrógeno, MMSN (Zapater, 1975).
- Agar levadura manitol (LMA) (Vincent, 1970).
- Caldo levadura manitol (LMC) (Vincent, 1970) suplementado con L-triptófano.
- Medio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP).
- Caldo nutritivo.
- Agar Nutritivo.
- Medio *Hugh-Leifson*, suplementado con glucosa.
- Agar agua 0.5%.
- Agarosa al 1%.

B. SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Agua mili Q.
- Buffer TBE 1X.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%.
- Etanol al 70%.
- Glicerol puro.
- Kit de extracción de ADN (Axygen Scientific).
- Kit de Purificación *PCR Cleanup AxyPrep* (Axygen Scientific)
- Lejía al 3%.
- Loading Dye 6X (Fermentas).
- Marcador 100pb plus (Axygen)
- Marcador Generuler 1kb DNA *ladder plus*
- Reactivo de Salkowski (Gordon & Weber 1950).
- Solución de 10 pmol/uL de primers fD1 y rD1 (Fermentas).
- Solución de 10 pmol/uL de primers PolF y PolR (Fermentas).
- Solución de 100 pmol/uL de primer BOX A1R (Fermentas).

- Solución de dNTP 25mM (Fermentas).
- Solución de KOH al 3%.
- Solución de peróxido de hidrogeno al 3%.
- Solución Salina 0.85%.
- Taq Polimerasa (con buffer Taq + KCl- MgCl₂ y Buffer MgCl₂ 25mM).

C. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Agitador mecánico orbital (MRC).
- Autoclave horizontal (Barnstead).
- Balanza analítica (Sartorius).
- Balanza de platillo (OHAUS Scout ProSP202).
- Beakers (PIREX).
- Bolsas de polietileno.
- Bureta de 25 ml.
- Cámara de electroforesis (Clever Scientific Ltd).
- Cámara fotográfica digital (Canon).
- Cámara de frío 4 – 10°C (LG).
- Congeladora de -20°C (Whirlpool).
- Congeladora de -80°C (Sanyo).
- Equipo de Baño María (Mettler).
- Espectrofotómetro (Genesys 6 – Thermo Electron Corp.)
- Estufa eléctrica de 28°C.
- Esteroscopio (Leica).
- Fotodocumentador de geles de electroforesis (Clever Scientific Ltd).
- Matrices Erlenmeyer.
- Microcentrífuga (Sigma).
- Micropipeta automática (Nichipet EX)
- Microscopio (Leica DM750)
- Placas Petri desechables 100 x 15”
- Pipetas graduadas.

- Potenciómetro (Hanna Instruments pH 211)
- Probetas.
- Refrigeradora (Bosch).
- Regla milimetrada de 30 cm.
- Termociclador (Eppendorf AG 22331 Hamburg, German)
- Tubos de prueba 25 x 250 mm (Pirex).
- Termoblock
- Vórtex (Gemmy UM-300).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

Los trabajos *in vitro* se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso (LEMB Marino Tabusso), perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS

Las cepas crio-preservedas en glicerol a -80°C fueron reactivadas en medio Levadura-Manitol (LMA) y medio mineral libre de nitrógeno (MMSN) y cultivadas a 28°C por 48 horas.

3.2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

A. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se evaluó la morfología de las colonias (superficie, color, textura, forma, borde y tamaño) de cada una de las cepas de acuerdo a su crecimiento en medio mineral libre de nitrógeno (Zapater, 1975) cultivadas a 28°C durante 72 horas.

B. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

– CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE pH

Las cepas fueron cultivadas en caldo levadura-manitol hasta obtener una población de 10^8 cel/ml. Posteriormente, las cepas se sembraron en Agar levadura-manitol (LMA) con los siguientes pH modificados: 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 7, 8 y 9 siendo luego incubadas a 28°C y evaluadas por un período de 5 días. Se midió el tamaño de las colonias (en cm).

– CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Las cepas fueron cultivadas en caldo levadura-manitol hasta obtener una población de 10^8 cel/ml. Posteriormente, las cepas se sembraron en LMA a pH 7 e incubaron a temperaturas: 6, 14, 22 y 28°C por un período de 5 días. Se evaluó el crecimiento en base al tamaño de las colonias (en cm).

C. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

A partir de cultivos frescos (48 horas), se analizó el comportamiento bioquímico de las cepas en base a su actividad catalasa (se utilizó peróxido de hidrogeno 3%), oxidasa por medio de tiras *Bactident* (Merck), su capacidad fermentativa frente a la glucosa en medio *Hugh-Leifson*, y se realizó el test KOH (al 3%), de acuerdo a lo establecido por la *National Standard Method*.

3.2.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR

Se verificó la conservación de las capacidades PGPR de las bacterias en estudio.

A. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Para esta prueba se empleó la técnica colorimétrica descrita por Gordon y Weber (1950). Las cepas fueron sembradas, con una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/ml en tubos con caldo LMC (5 ml) suplementado con L-triptófano 5 mM. Los tubos inoculados se incubaron a 28°C a 150 rpm por un periodo de 2 días. Se tomaron 500 µl del cultivo y centrifugará a 15000 rpm por 5 minutos, posteriormente se tomó 250 µl del

sobrenadante y adicionó 1 ml del Reactivo de *Salkowsky*. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y finalmente se evaluó el viraje de color de la solución a tonalidades rojizas a través de la medida de absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro.

B. SOLUBILIZACIÓN DE SALES FOSFATO

Las cepas fueron cultivadas en LMC a 28°C en agitación a 150 rpm hasta obtener una población de aproximadamente 10⁸ UFC/ml, concentración que se obtuvo a partir de la medición de la densidad óptica del cultivo y de un recuento en placa. Se tomó 5 µl del cultivo y se colocó en placas conteniendo medio *National Botanical Research Institute's phosphate growth medium* (NBRIP) en fosfato bicálcico y tricálcico. Las placas se incubaron por un periodo de 15 días a 28°C y se evaluó el crecimiento a través del tiempo y aquellas cepas que evidenciaron la presencia de un halo transparente alrededor de las mismas fueron consideradas solubilizadoras positivas, evaluándose medida de halo de solubilización y la eficiencia de solubilización (ES):

$$\text{ES (\%)} = \text{Diametro de halo de solubilización} \times (\text{Diametro de colonia})^{-1} \times 100$$

3.2.5 ANÁLISIS INTEGRADO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y PGPR

Se realizó un análisis de conglomerados en base a las características fenotípicas y PGPR de todas las cepas en estudio. Se utilizó el paquete estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, usándose para el análisis el método del vecino más cercano, *Euclidean* cuadrada.

3.2.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se prepararon cultivos *overnight* de las cepas en caldo nutritivo a 150 rpm a una temperatura de 28°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

A. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se tomó aproximadamente 2 ml del caldo de cultivo con las cepas crecidas *overnight*, y se colocó en microtubos de 2 ml centrifugándose las muestras por 2 minutos a 12000g descartándose luego cuidadosamente el sobrenadante. Para la obtención del ADN genómico se utilizó el Kit de extracción *AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep* (Axygen) y se procedió de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los microtubos conteniendo las muestras de ADN se guardaron en refrigeración a -20°C para su posterior análisis.

B. AMPLIFICACIÓN BOX-PCR FINGERPRINTING

El análisis de los perfiles de bandas de la caja BOX se realizó de acuerdo a Versalovic *et al.* (1991), modificado por Ormeño-Orrillo (comunicación personal, 2006). Se empleó el cebador BOX A1R:

BOX A1R: 5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

La mezcla de reacción para la amplificación BOX-PCR tendrá un volumen final de 25 μ l, y constará de: buffer Taq+KCl-MgCl₂ (1X), DMSO al 100%, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 1.25mM, primer BOX A1R 0.8 pmol/ μ l, Taq polimerasa 0.08 U/ μ l y 5 μ l de lisado. El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf AG 22331 (Eppendorf ® Mastercycler ® ep Systems, Alemania), bajo las siguientes condiciones (Zúñiga, 2012).

Reacción	Condiciones	Periodo
• Desnaturalización inicial	95 °C x 3 min	1 ciclo
• Desnaturalización	93 °C x 45 s	
• Annealing	53 °C x 1 min	25 ciclos
• Extensión	65 °C x 8 min	
• Extensión Final	65 °C x 16 min	1 ciclo

Los productos generados se analizaron mediante una corrida electroforética en gel de Agarosa al 1.5 % de dimensiones 15x15cm utilizando como marcador molecular el Generuler 1kb DNA *ladder plus*. (Fermentas), por 3 horas a 80V. El gel se reveló en una

solución de Bromuro de etidio 0.5ug/ml y se apreció con la ayuda de un trasiluminador UV. Para el análisis de agrupación de perfiles BOX-PCR generados, se utilizó el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) el cual se analizó mediante el programa bioinformático *DendroUPGMA* (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) calculándose la similaridad en base al coeficiente *Jaccard*.

3.2.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

A. AMPLIFICACIÓN PCR- ADN RIBOSOMAL 16S

Se empleó el método descrito por Weisburg *et al.* (1991) para amplificar un fragmento de 1500 pares de bases (pb) usando los oligonucleótidos fD1 y rD1:

fD1: (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')

rD1: (5' -CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3')

Cada 25 µl del volumen total de reacción PCR presentó: Buffer de reacción 1X (Fermentas), 200 µM de dNTPs (Fermentas), 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq-polimerasa recombinante (Fermentas). Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de PCR de polipropileno de 200 µl y en un termociclador modelo Eppendorf AG 22331 (*Eppendorf*® *Mastercycler*® *ep Systems*, Alemania). Los ciclos de amplificación a usar fueron:

Reacción	Condiciones	Periodo
• Desnaturalización inicial	93 °C por 2 min	1 ciclo
• Desnaturalización	93 °C por 45seg	
• <i>Annealing</i>	62 °C por 45 seg	30 ciclos
• Extensión	72° C por 2 min	
• Extensión Final	72° C por 5 min	1 ciclo

Los productos de la amplificación fueron examinados empleando geles de electroforesis de agarosa al 1% de 5x10 cm en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X por 1 hora a 80 V. Seguidamente, se realizó la purificación de los mismos mediante el uso del *kit PCR Cleanup AxyPrep (Axygen Scientific)* procediendo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se enviaron a secuenciar a la empresa MACROGEN Inc. (Seoul, Korea) de acuerdo a las especificaciones de la compañía.

B. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD Y CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Los resultados obtenidos del proceso de Secuenciamiento del gen del ARNr 16S para cada una de las cepas se examinaron con el programa BioEdit (Hall, 1999). Se utilizó la base de datos pública GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y por medio de la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Tool for nucleotides) y el EzBioCloud (Kim *et al.*, 2012) se obtuvo las secuencias más emparentadas y similares a cada una de las cepas en estudio. Se alinearon las secuencias totales con el programa CLUSTALX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). La construcción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el método *Neighbour-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) con un ensayo *bootstrap* calculado para 1000 réplicas con una distancia genética computarizada con el modelo Kimura-2 parámetros, con lo cual se mostró la localización taxonómica de cada una de las cepas basado en la secuencia del ADNr 16S.

3.2.8 DETECCIÓN DEL GEN DE LA NITROGENASA REDUCTASA (*NIFH*)

Se evaluó molecularmente la capacidad diazotrófica de las cepas PGPR representante de cada perfil BOX-PCR que fueron identificadas mediante la amplificación del gen del ARNr 16S.

Se utilizó los *primers* PolF (5´TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3´) y PolR (5´-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3) para la amplificación de un fragmento de 360 bp correspondiente al gen *nifH* situada entre las posiciones 115 y 457, referido a la secuencia codificada del gen *nifH* de *Azotobacter vinelandii* [M20568] (Poly *et al.*, 2001). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µl, conteniendo 1 µl DNA (50 ng), 0.25 pmol. µL⁻¹ de

cada primer, 200µM de cada dNTPs, 1X de Buffer Taq polimerasa y 2U de Taq Polimerasa recombinante (Fermentas). Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de PCR de polipropileno de 200 µl y en un termociclador Eppendorf AG 22331 (*Eppendorf*® *Mastercycler*® *ep Systems*, Alemania). Cada ronda de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4min, 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 54°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos; seguidos por una extensión final a 72°C por 5min. Los productos fueron analizados en geles de electroforesis de agarosa al 1.5% y revelados con bromuro de etidio (0.5 ug/ml).

3.2.9 ENSAYO DE GERMINACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO

Se seleccionaron las cepas que mostraron la presencia del amplicón del gen *nifH* (cepas *nifH+*) para evaluar su efecto como bioinoculantes en la germinación de semillas de *maca* en condiciones de laboratorio. Previamente se esterilizaron las semillas con alcohol de 70% por 90 segundos, siendo luego enjuagado con agua destilada y seguidamente tratadas con lejía al 3% por 2 min, y luego enjuagadas con agua destilada estéril. Por otro lado, las cepas *nifH+* se sembraron en placas con LMA y se incubaron a 28°C por 3 días. Luego se procedió a la colecta de la biomasa con el fin de ser utilizado como inóculo, embebiendo las semillas esterilizadas de maca. Veinticinco semillas inoculadas fueron colocadas sobre una placa con agar agua al 0.5%. Teniéndose tres replicas por tratamiento. Las placas fueron incubadas a 13°C. Se evaluó el porcentaje de germinación en cada tratamiento así como el peso seco de germinados durante la cosecha.

3.2.10 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Se realizará un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Mínima Diferencia Significativa (LSD) para comparar las medias de los resultados obtenidos en las evaluaciones. Se utilizó el paquete estadístico *Statgraphic Centurion XVI*. Las desviaciones estándar y gráficos se realizarán con el programa *Excel* del *Windows Office 2010*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 BACTERIAS DIAZÓTROFAS

Las cepas empleadas forman parte de la colección de microorganismos PGPR que se encuentran conservadas en el cepario del LEMYB Marino Tabusso - UNALM. Dichas cepas fueron aisladas de suelos altoandinos relacionados al cultivo de “Maca” (*Lepidium meyenii* Walpers) ubicados en la meseta de Bombón localizados entre 4100 a 4500 msnm, pertenecientes a la comunidad Campesina San Pedro de Cajas, provincia de Tarma, departamento de Junín como parte del Proyecto “Perú Biodiverso GTZ – CONCYTEC 2009” (Zúñiga, 2010).

Cuadro 1: Distribución de las cepas en estudio

Procedencia	Condición del suelo de cultivo	N° de aislamientos		Total
		Suelo no rizosférico	Suelo rizósferico	
Galpón Condorin	1er año de campaña	7	6	13
Acomachay	2do año de campaña	12	14	26
Pampa Cima D1	1 año de descanso	3	-	3
Pampa Cima D4	4 años de descanso	2	-	2
Condorin D10	10 años de descanso	3	-	3
Total				47

Cuarentaisiete cepas bacterianas fueron capaces de crecer en medio mineral libre de nitrógeno (Zapater, 1975), de las cuales 26 fueron procedentes de Acomachay, 13 de Galpón Condorín, y 8 cepas de los campos de descanso (Pampa Cima y Condorín), dando indicios de su capacidad diazotrófica. (Cuadro 1).

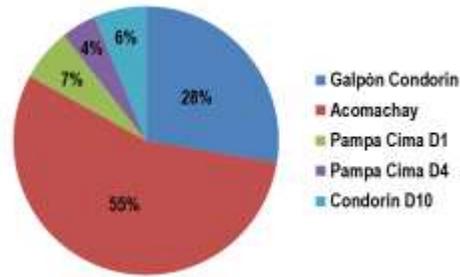


Figura 3. Comportamiento porcentual de la cantidad de bacterias provenientes de diferentes campos de cultivo de maca en base a 47 cepas.

El mayor número de cepas provinieron de los campos de Galpón Condorín y Acomachay (Cuadro 1, Figura 3), los que se caracterizaron por presentar mayores niveles de materia orgánica en comparación a los tres campos con suelo de descanso (ANEXO 1-Cuadro 8).

Los suelos de Acomachay y Galpón Condorin se encontraban en su segundo y primer año de cosecha respectivamente; mientras que los campos de descanso eran suelos en los que ya se habían realizado dos campañas de siembra y cosecha de maca y que no fueron utilizados por varios años para la siembra de ningún cultivo (Zúñiga, 2010). La falta de nutrientes inorgánicos disponibles en el medio, característico de suelos de descanso, limita el desarrollo de las poblaciones microbianas, esto es de esperarse ya que uno de los problemas que presenta la maca es que al ser muy extractivo, genera una alta demanda de nutrientes al suelo; lo que ocasiona el empobrecimiento de éste luego de dos campañas de cultivo.

Cuadro 2: Relación de bacterias diazótroficas presente en suelos de cultivo de maca.

† Procedencia	Cepas
Galpón Condorín (S)	LMTZ064-28, LMTZ064-75, LMTZ064-119, LMTZ064-122, LMTZ064-30, LMTZ064-94, LMTZ064-118
Galpón Condorín (R)	LMTZ064-84, LMTZ064-112, LMTZ064-115, LMTZ064-124, LMTZ064-130, LMTZ064-142
Acomachay (S)	LMTZ064-22, LMTZ064-35, LMTZ064-99, LMTZ064-140, LMTZ064-29, LMTZ064-95, LMTZ064-111, LMTZ064-138, LMTZ064-41, LMTZ064-96, LMTZ064-134, LMTZ064-139
Acomachay (R)	LMTZ064-72, LMTZ064-92, LMTZ064-116, LMTZ064-144, LMTZ064-85, LMTZ064-93, LMTZ064-126, LMTZ064-141, LMTZ064-90, LMTZ064-106, LMTZ064-129, LMTZ064-91, LMTZ064-107, LMTZ064-143
Condorín (D10)	LMTZ064-47, LMTZ064-64, LMTZ064-109
Pampa Cima (D4)	LMTZ064-53, LMTZ064-59
Pampa Cima (D1)	LMTZ064-21, LMTZ064-66, LMTZ064-120

† S: Suelo no rizosférico, R: Suelo rizosférico; D10, D4 y D1: campos de descanso de 10, 4 y 1 año, respectivamente.

Por otro lado, se sabe también que la rizósfera es un microclima adecuado donde se da un óptimo intercambio de O₂ y es fuente de elevadas cantidades de exudados radiculares, los que nutren el suelo de compuestos orgánicos y permiten que se produzcan extensas interacciones bioquímicas entre plantas y microorganismos (Walker *et al.*, 2003), lo que pudo haber generado la proliferación de bacterias en dichos suelos, en comparación a los suelos de descanso.

4.2 CARACTERIZACION MORFOLÓGICA

Se realizó la caracterización morfológica de las cepas en MMSN con azul de bromotimol (ANEXO 1-Cuadro 9), encontrándose cinco morfotipos (Cuadro 3, Figura 4). El morfotipo I, a diferencia del morfotipo II, logró acidificar el medio de cultivo, evidenciándose por el viraje de color del indicador azul de Bromotimol de verde a amarillo. Mientras que el morfotipo II mantuvo la neutralidad del medio de cultivo en el tiempo.

Por otro lado, el morfotipo III fue el grupo más abundante (53.2 % del total de las cepas), cuyas colonias se caracterizaron por ser las más grandes y mucosas (1.5-2.5mm de diametro) y en todos los casos acidificaron el medio de cultivo. Así también, el morfotipo IV se caracterizó por presentar colonias ovaladas y textura ligosa. Finalmente, se observó que sólo la cepa LMTZ064-59 presentó colonias de forma irregular, plana, de borde irregular, opaca, coloración atornasolada de 0.5 mm (Morfotipo V). Todas las cepas resultaron ser del tipo gram negativas.

Cuadro 3: Características morfológicas macroscópicas de las cepas en estudio.

Morfo Tipo	Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Textura	Tamaño (mm)	Viraje	N° de cepas
I	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1.5	+	3 (6%)
II	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1.5	-	14 (30%)
III	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2.5	+	25 (53%)
IV	Ovalado	Regular	Acuminada	Incoloro	Brillante	Ligosa	0.5-1	-	4(9%)
V	Circular	Irregular	Plano	Atornasolado	Opaca	Seca	0.5	-	1(2%)
TOTAL									47

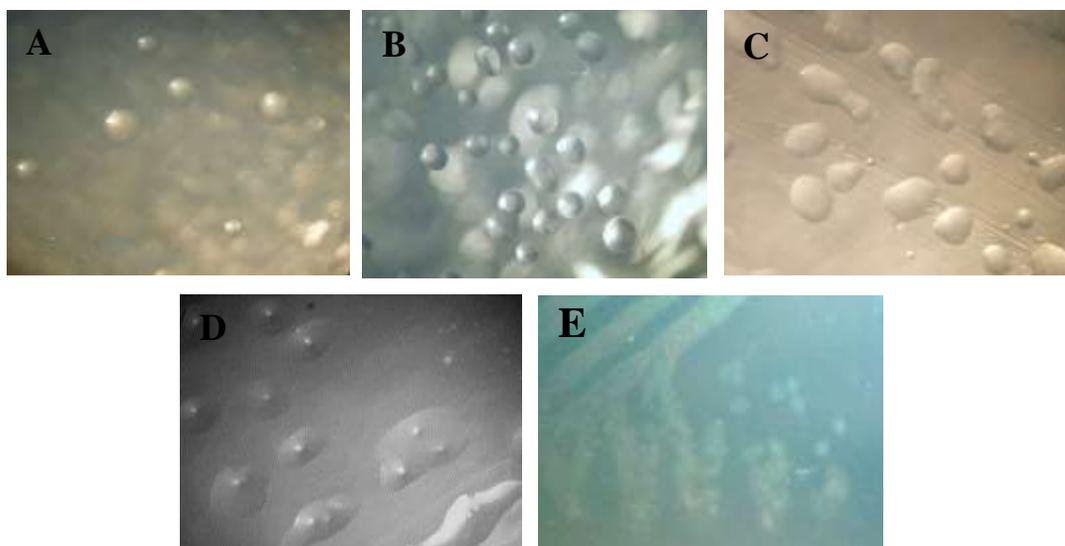


Figura 4. Morfotipos de las cepas en estudio en MMSN con azul de bromotimol. A: Morfotipo I, B: morfotipo II, C: Morfotipo III, D: Morfotipo IV y E: Morfotipo V

4.3 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Se evaluó el crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas a los cinco días post-siembra en medio LMA (ANEXO 1-Cuadro 10, ANEXO 3-Figura 27). Se observó que 45 cepas lograron crecer a 6°C, cuyos diámetros de crecimiento fueron un 20 a 55 por ciento menores al de sus controles a 28°C, observándose poca producción de mucosidad. La cepa LMTZ064-66 fue la única que no se vió afectada por la temperatura al igualar a su control a 28°C (Figura 5), mientras que las cepas LMTZ064-53 y LMTZ064-59 no manifestaron crecimiento. A 14°C, 46 cepas presentaron diámetros de crecimiento de 13 a 46 por ciento menores que al de sus controles a 28°C. La cepa LMTZ054-66 logró aproximarse al tamaño de su control sin verse afectada, mientras que la cepa LMTZ064-59 no creció. A 22°C, 39 cepas tuvieron diámetros próximos al de sus controles, con excepción de LMTZ064-21, LMTZ064-22, LMTZ064-59, LMTZ064-115, LMTZ064-122, LMTZ064-124, LMTZ064-130, y LMTZ064-141, cuyos diámetros de crecimiento fueron entre 17 y 35 por ciento menores. Finalmente a 35°C, 22 cepas no se vieron afectadas teniendo un crecimiento semejante a los controles, mientras que 18 cepas presentaron diámetros de crecimiento de un 13.6 a 33.3 por ciento menores al de sus controles. Las bacterias LMTZ064-41, LMTZ064-53, LMTZ064-64, y

LMTZ064-118 mostraron un diámetro de crecimiento superior a sus controles en un 14.3 a 28.6 por ciento. Las cepas LMTZ064-59, LMTZ064-66 y LMTZ064-75 no lograron crecer a dicha condición.

En este ensayo se observó que temperaturas de incubación alrededor de 28°C son óptimas para el crecimiento de estos microorganismos en términos de tamaño de colonia y producción de mucosidad (ANEXO 3- Figura 27). Esto concuerda con lo obtenido por Rico (2009) en sus ensayos con cepas diazótrofes aisladas de zonas altoandinas peruanas, donde temperaturas de incubación entre 20 y 28°C favorecieron el crecimiento de las mismas. Basado en la habilidad de crecimiento a diferentes niveles de temperatura, los microorganismos han sido clasificados en cinco categorías: Hipertermófilos, termófilos, mesófilos, psicrófilos y psicrótrofos. Estos últimos, conocidos también como psicrófilos facultativos, son capaces de multiplicarse a 0-7°C y tener un crecimiento óptimo alrededor de los 20 a 30°C (Willey *et al.*, 2008). Las cepas en estudio pertenecerían a la categoría psicrótrofos, teniéndose como excepción la cepa LMTZ064-59, que manifestó crecimiento exclusivo a 22 y 28°C (Figura 5), por lo que se le consideraría un microorganismo del tipo mesófilo.

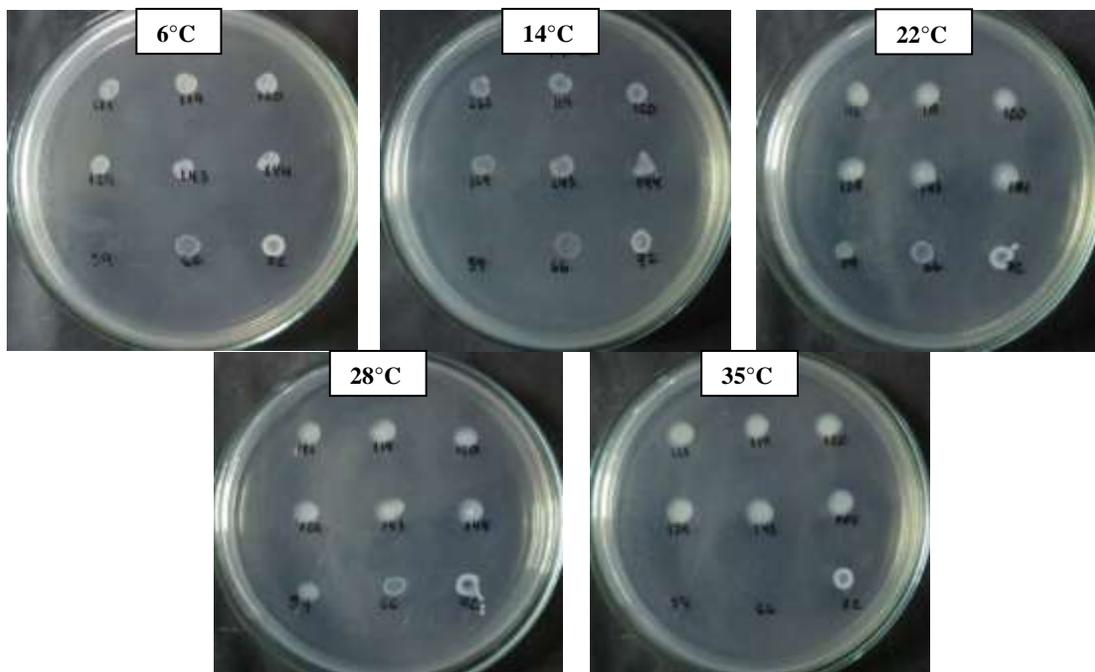


Figura 5. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes temperaturas en medio LMA a los 5 días de cultivo.

Tratamiento a 28°C: control positivo, pH 7.

Por otro lado, se evaluó el crecimiento de las cepas en medio LMA suplementado con azul de bromotimol a diferentes valores de pH (3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 7, 8 y 9) (ANEXO 1-Cuadro 11). Todas las cepas crecieron en los tratamientos evaluados. A pH 3.5 y 4, el diámetro de crecimiento de 31 y 22 cepas, respectivamente, se vieron afectadas al mostrar menores valores que el de sus controles a pH7, y 14 (29.8 por ciento) y 24 (51.1 por ciento) cepas, respectivamente, tuvieron diámetros de crecimiento similares al de sus controles. En los demás tratamientos (pH 4.5 a 9), el número de cepas con diámetros similares fue mayor al 80 por ciento (39 cepas). Por otro lado, cabe resaltar que 33 cepas (70.2 por ciento) fueron capaces de acidificar el medio de cultivo a pH 7, evidenciándose con el viraje de color del indicador azul de bromotimol de verde a amarillo (ANEXO 3-Figura 28). Los diferentes microorganismos requieren de niveles óptimos de pH para su crecimiento. De acuerdo a esta capacidad, pueden ser clasificados como neutrófilos (pH 6 - 8), acidófilos (pH 1 a 5.5) y alcalófilos (8.5 a 11.5) (Madigan *et al.*, 2003). De los resultados obtenidos, se observó que las cepas presentaron un mejor crecimiento a valores de pH alrededor de 7, así también se observó que el grado de producción de mucosidad de las cepas era mayor a dicha condición (Figura 6). Por tanto, las cepas en estudio serían clasificadas como bacterias del tipo neutrófilas. Cabe resaltar que estas presentaron un amplio rango de tolerancia a pH ácidos, esto es de esperarse ya que fueron obtenidas de suelos cuyos valores de pH se encontraban alrededor de 5 (ANEXO 1-Cuadro 8). Nogales *et al.* (2001) reportaron la capacidad de cepas diazótrofes del género *Burkholderia* de crecer en suelos ácidos. Así también, se detectó tolerancia a pH alcalinos (crecimiento a pH 8 y pH 9).

Se analizó el comportamiento bioquímico de las cepas (ANEXO 1-Cuadro 12). Se probó su actividad catalasa y su respuesta frente a KOH al 3 por ciento, obteniéndose que todas las cepas fueron KOH positivas (bacterias Gram negativas) y catalasa positiva lo cual es usual en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos (Willey *et al.*, 2008). Posteriormente, se evaluó su metabolismo oxidativo/fermentativo frente a la glucosa como única fuente de carbono y la actividad citocromo oxidasa (Figura 7). El 83 por ciento (39 cepas) del total presentó un metabolismo del tipo fermentativo y sin presencia de actividad citocromo oxidasa, dichas características son comunes en microorganismos anaerobios facultativos

(Willey *et al.*, 2008). Por otro lado, sólo las cepas LMTZ064-53, LMTZ064-64, LMTZ064-41, LMTZ064-47, LMTZ064-59, LMTZ064-90, LMTZ064-99 y LMTZ064-141 (17 % del total) presentaron actividad citocromo oxidasa y metabolismo oxidativo, común de bacterias del tipo aerobias, teniéndose a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* como ejemplos comunes de bacterias de suelo.

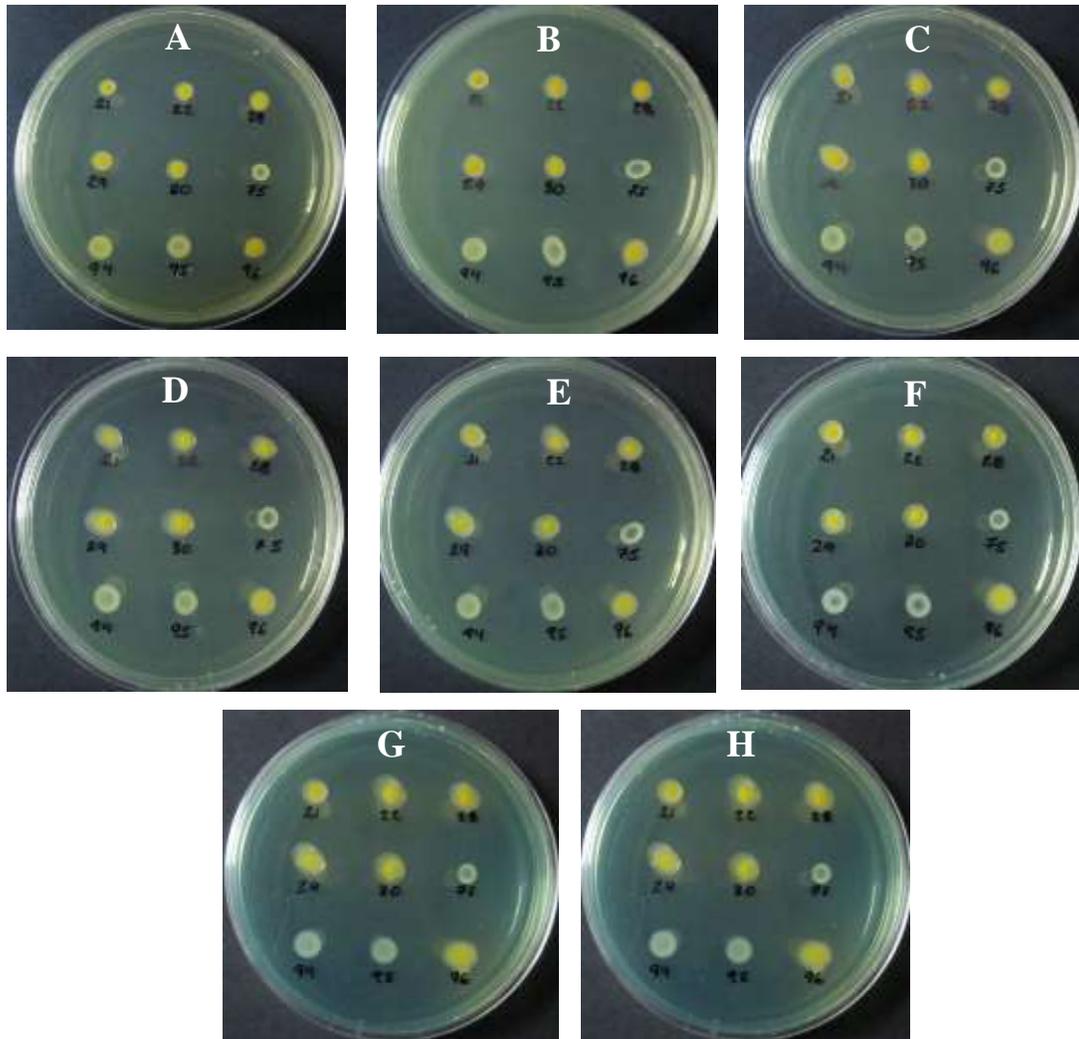


Figura 6. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes niveles de pH en medio LMA con azul de bromotimol a los 5 días de cultivo.

A: pH 3.5, B: pH 4, C: pH 4.5, D: pH 5, E: pH 5.5, F: pH 7 (control), G: pH 8 y H: pH 9.

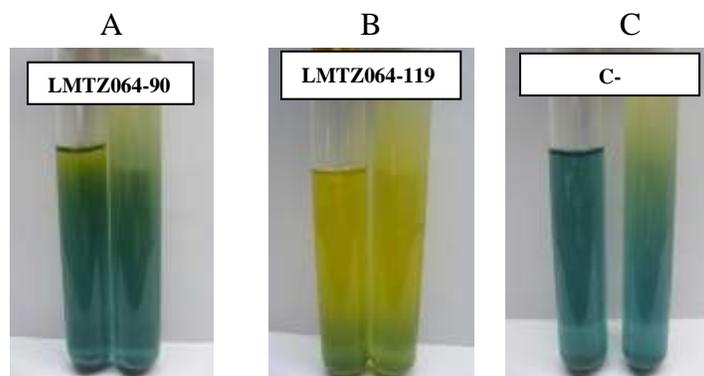


Figura 7. Ensayo *Hugh-Leifson* para la determinación del metabolismo oxidativo/fermentativo. A: Cepa LMTZ064-90, metabolismo Oxidativo. B: Cepa LMT064-119, metabolismo fermentativo. C-: control negativo sin inóculo.

4.4 CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL

Se monitoreó la capacidad PGPR de cada una de las cepas en base a la producción de ácido indol acético y solubilización de sales fosfato.

Todas las cepas fueron capaces de producir AIA en presencia del precursor L-Triptófano, cuyas concentraciones fueron de 0.1 a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aproximadamente (Cuadro 4). De las 47 cepas, veintiocho (60 por ciento aproximadamente) fueron capaces de producir cantidades entre 20 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 8 (17 por ciento) produjeron cantidades menores a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, y 11 cantidades entre 50 y 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ aproximadamente (Figura 8), siendo la cepa LMTZ064-142 la que más produjo con 74.37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

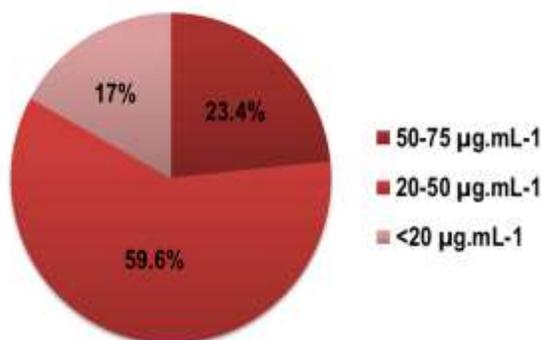


Figura 8. Comportamiento porcentual de las cepas en base a la producción de AIA (en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) producido.

Cuadro 4: Producción de ácido indol acético por parte de las cepas en estudio.

Cepa	DO (600 nm)	Producción de AIA † (µg/mL)	Cepa	DO (600 nm)	Producción de AIA † (µg/mL)
LMTZ064-21	0.648	52.981 ± 0.313	LMTZ064-107	0.64	24.310 ± 0.045
LMTZ064-22	0.6	61.842 ± 3.088	LMTZ064-109	0.665	42.32 ± 0.895
LMTZ064-28	0.608	60.323 ± 2.551	LMTZ064-111	0.57	26.557 ± 0.269
LMTZ064-29	0.626	68.899 ± 0.537	LMTZ064-112	0.556	20.766 ± 1.566
LMTZ064-30	0.598	52.886 ± 5.460	LMTZ064-115	0.572	18.550 ± 0.582
LMTZ064-35	0.545	23.234 ± 1.119	LMTZ064-116	0.54	64.911 ± 0.269
LMTZ064-41	0.576	16.209 ± 0.761	LMTZ064-118	0.513	32.633 ± 1.343
LMTZ064-47	0.551	24.120 ± 1.745	LMTZ064-119	0.523	22.73 ± 1.656
LMTZ064-53	0.712	0.101 ± 0.269	LMTZ064-120	0.511	27.85 ± 4.252
LMTZ064-64	0.605	0.544 ± 0.448	LMTZ064-122	0.52	29.85 ± 0.985
LMTZ064-59	0.605	5.323 ± 1.208	LMTZ064-124	0.518	21.41 ± 0.895
LMTZ064-66	0.589	6.842 ± 1.566	LMTZ064-126	0.504	23.23 ± 1.288
LMTZ064-72	0.685	29.532 ± 0.537	LMTZ064-129	0.524	24.66 ± 0.895
LMTZ064-75	0.61	21.430 ± 0.895	LMTZ064-130	0.52	30.29 ± 1.164
LMTZ064-84	0.57	29.500 ± 2.014	LMTZ064-134	0.54	30.58 ± 0.671
LMTZ064-85	0.59	27.949 ± 0.448	LMTZ064-138	0.503	1.65 ± 0.224
LMTZ064-90	0.694	32.665 ± 0.403	LMTZ064-139	0.538	32.06 ± 0.269
LMTZ064-91	0.556	39.690 ± 1.029	LMTZ064-140	0.545	39.25 ± 1.029
LMTZ064-92	0.546	31.652 ± 0.582	LMTZ064-141	0.685	64.25 ± 0.403
LMTZ064-93	0.6	65.892 ± 1.924	LMTZ064-142	0.55	74.37 ± 2.372
LMTZ064-94	0.58	72.506 ± 0.090	LMTZ064-143	0.569	25.67 ± 0.537
LMTZ064-95	0.63	66.842 ± 0.224	LMTZ064-144	0.582	31.68 ± 6.176
LMTZ064-96	0.595	24.500 ± 1.835	*Azo16M2	0.6	31.27 ± 0.403
LMTZ064-99	0.61	38.614 ± 1.208	*CIAT 899	0.618	16.34 ± 0.492
LMTZ064-106	0.59	19.089 ± 1.343	**LMTK032	0.8	15.9 ± 0.44

* Cepas control diazotrofas: Azo16M2 (*Rahnella aquatilis*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

**LMTK032: *Pseudomonas sp.* aislada de rizósfera de maca.

† ±: Desviación estándar de un total de tres réplicas.

El color rosado a fucsia es producto de la reacción del AIA con el reactivo de *Salkowsky* (Figura 9) y la intensidad es proporcional a la cantidad de fitohormona producida (Bric *et al.*, 1991).

M.S. Mirza *et al.* (2001) demostraron que la capacidad de producción de AIA por parte de bacterias PGPR varía entre especies e incluso entre cepas del mismo género. Beneduzi *et al.* (2013) reportaron que cepas diazótroficas de *Burkholderia*, *Agrobacterium* y *Stenotrophomonas* lograron producir concentraciones de AIA en un rango de 0.1 a 264 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Así también, cepas de los géneros *Pantoea*, *Burkholderia* y *Serratia* aisladas de cultivos de soja, fueron capaces de producir AIA, siendo los dos primeros géneros los de mayor producción (Li *et al.* 2008). Vasathkumar y McManus (2004) observaron que cepas de *Rahnella* produjeron un máximo de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Por otro lado, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* son capaces de generar cantidades en un rango de 14 a 106 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Khan *et al.* 2009). Es así que diversas cepas bacterianas son capaces de producir ácido indolacético en diferentes cantidades, dicha diferencia puede ser atribuida a la habilidad intrínseca de la cepa o a las condiciones en las que se encontraba el cultivo en el momento del análisis (Bashan *et al.*, 2008).

El ácido indol acético beneficia a las plantas ya que promueve la elongación y proliferación de las raíces, mejorando así la capacidad en la toma de agua y nutrientes (Verma *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha reportado que concentraciones muy altas de esta fitohormona podrían generar un desbalance hormonal y por ende un efecto inhibitor en el desarrollo de las plantas, ya que éstas no poseen un sistema regulador adecuado que mantenga los niveles fisiológicamente apropiados de AIA en sus tejidos, esto es debido a que las bacterias y las plantas difieren en sus mecanismos de biosíntesis y regulación de dicha fitohormona (Persello *et al.*, 2003).



Figura 9. Producción de ácido indolacético (AIA).

B: Control negativo. Rótulos del 21 al 142: cepas “LMTZ064” evaluadas. Cepas control positivos: Azo16M2 (*Rahnella sp.*), LMTK032 (*Pseudomonas sp.*) y CIAT899 (*R. tropici*).

Por otro lado, se evaluó la capacidad de solubilización de sales fosfato. Los halos de solubilización fueron evidentes a partir del día tres de evaluación (Figura 10). Se tuvo que el 78.72 por ciento de las cepas (37 cepas) fue capaz de solubilizar fosfato NBRIP-bicálcico y NBRIP-Tricálcico (ANEXO 1 – Cuadro 13 y 14), generando halos máximos entre 0.1 y 1.75 cm en medio bicálcico, con eficiencias de solubilización entre 22 y 350 por ciento, y halos en medio tricálcico entre 0.1 y 1.6 cm, cuyo rango de eficiencia se encontraba entre 18 y 407 por ciento al día 15 de evaluación (Cuadro 5, Figura 11).

Son diversos los géneros bacterianos capaces de solubilizar sales fosfatos. Kohashikawa (2010) reportó que bacterias diazótrofes del género *Rahnella*, aisladas de suelos de cultivo de papa, fueron capaces producir halos de 0.4 a 2.2 cm. Así también, los géneros *Burkholderia*, *Serratia* (Ji *et al.*, 2008) y *Pantoea* (Hong *et al.*, 2006) han sido reportados como buenos solubilizadores de estas sales.

Cuadro 5: Solubilización de sales fosfato a los 15 días de evaluación.

CEPA	Fosfato Bi-cálcico			Fosfato Tri-cálcico		
	DC (cm)	HS (cm)	ES (%)	DC (cm)	HS (cm)	ES (%)
LMTZ064-21	0.75	0.75	100	0.85	0.15	18
LMTZ064-22	0.75	0.50	67	0.65	0.65	100
LMTZ064-28	0.75	0.25	33	0.78	0.43	55
LMTZ064-29	0.73	0.68	93	0.85	0.65	76
LMTZ064-30	0.53	1.28	243	0.58	1.03	178
LMTZ064-35	0.48	1.13	237	0.45	1.15	256
LMTZ064-41	0.50	1.20	240	0.48	1.13	237
LMTZ064-47	0.48	1.33	279	0.45	0.95	211
LMTZ064-53	0.55	1.25	227	0.43	0.18	41
LMTZ064-64	0.48	1.33	279	0.43	0.18	41
LMTZ064-66	0.40	1.00	250	0.38	0.33	87
LMTZ064-75	0.45	0.10	22	0.55	0.10	18
LMTZ064-84	0.40	1.40	350	0.40	1.60	400
LMTZ064-85	0.40	1.40	350	0.40	1.60	400
LMTZ064-90	0.50	1.15	230	0.50	0.80	160
LMTZ064-91	0.43	1.48	347	0.40	1.40	350
LMTZ064-92	0.50	1.30	260	0.40	0.90	225
LMTZ064-96	0.50	1.10	220	0.40	0.60	150
LMTZ064-106	0.45	1.15	256	0.50	1.00	200
LMTZ064-107	0.45	1.15	256	0.40	0.93	231
LMTZ064-109	0.45	1.15	256	0.40	1.20	300
LMTZ064-111	0.45	1.25	278	0.50	1.10	220
LMTZ064-112	0.45	0.95	211	0.50	1.00	200
LMTZ064-115	0.45	1.15	256	0.50	0.70	140
LMTZ064-119	0.50	1.75	350	0.38	1.53	407
LMTZ064-120	0.40	1.20	300	0.45	1.15	256
LMTZ064-122	0.43	1.18	276	0.40	1.30	325
LMTZ064-124	0.50	0.90	180	0.43	1.03	241
LMTZ064-126	0.43	0.98	229	0.43	0.98	229
LMTZ064-129	0.43	0.98	229	0.43	0.98	229
LMTZ064-130	0.40	1.40	350	0.43	1.28	300
LMTZ064-134	0.45	1.15	256	0.50	1.00	200
LMTZ064-139	0.45	1.35	300	0.40	1.20	300
LMTZ064-140	0.43	1.28	300	0.40	1.30	325
LMTZ064-141	0.50	0.55	110	0.40	0.10	25
LMTZ064-143	0.45	1.25	278	0.35	1.05	300
LMTZ064-144	0.50	1.10	220	0.40	0.80	200
*Azo16M2 (Control+)	0.48	1.13	237	0.50	1.00	200
*Ps155 (Control+)	0.75	0.25	33	1.00	0.40	40

DC: Diámetro de colonia. HS: Halo de solubilización. ES: Eficiencia de solubilización.

* Cepas control +: Azo16M2 (*Rahnella sp.*) aislada de rizósfera de papa, Ps155 (*Pseudomonas sp.*) aislada de rizósfera de maca.

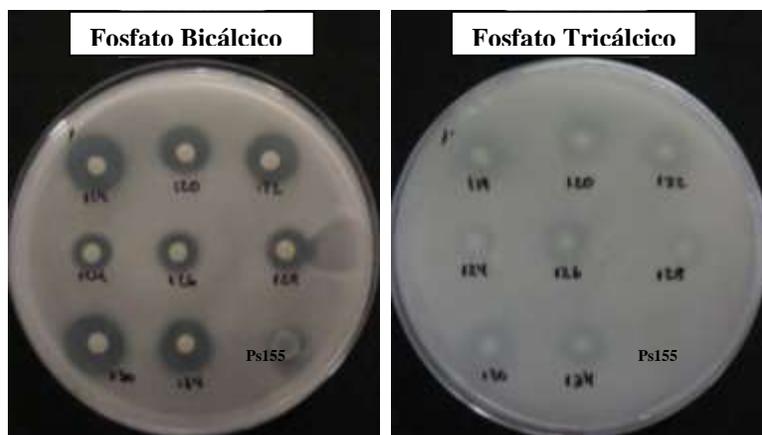
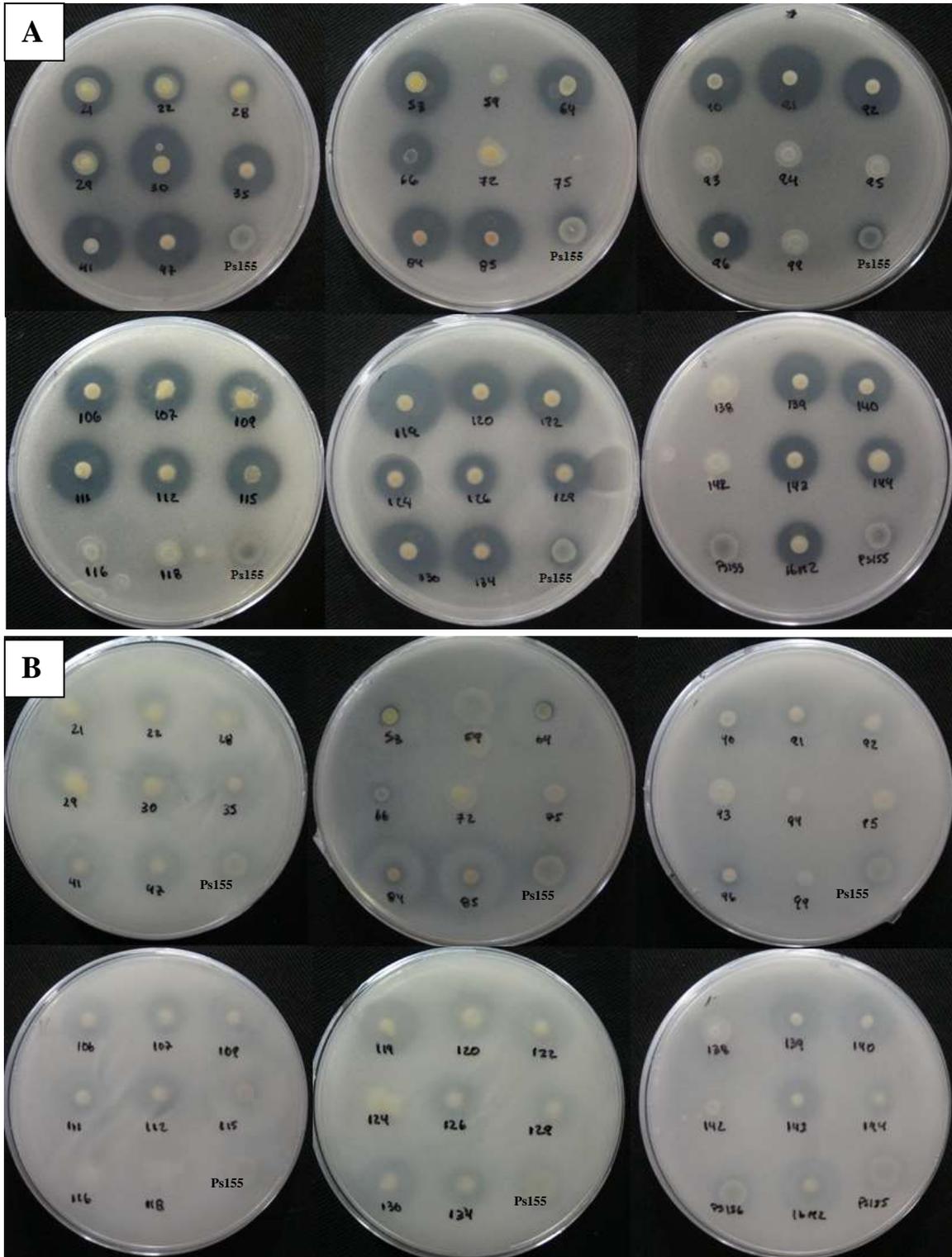


Figura 10. Halos de solubilización de fosfato producido los 3 días en medio NBRIP- bicálcico y NBRIP- tricálcico. Cepas control +: Ps155 (*Pseudomonas sp.*)

Los mecanismos de solubilización de fosfatos probablemente involucran el uso de enzimas fosfatasas no específicas, liasas y fitasas; sin embargo, se reporta que el proceso más eficiente de solubilización en bacterias Gram negativas resulta de la producción de ácidos orgánicos, principalmente de la oxidación directa de la glucosa exudado por la planta a ácido glucónico, el cual genera cambios en el pH del medio a través de la liberación de protones y su habilidad para quelatar iones, haciéndolo disponible el fosfato para las plantas_(Rodriguez *et al.*, 2000). Su producción ha sido observada también en cultivos de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*, *Azospirillum spp.* y *Rahnella aquatilis* (Lin *et al.*, 2006; Illmer & Schinner, 1992; Rodriguez *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1997).



**Figura 11. Halos de solubilización de fosfato producidos por las cepas obtenidas del cultivo de maca a los 15 días en medio NBRIP- bicálcico (A) y NBRIP- tricálcico (B).
Cepas control +: Ps155 (*Pseudomonas sp.*) y Azo16m2 (*Rahnella sp.*).**

4.5 ANÁLISIS INTEGRADO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y PGPR

Se empleó el análisis de agrupamiento o dendogramas para evaluar la relación existente entre las distintas características fenotípicas y PGPR evaluadas anteriormente en las cepas diazótroficas. La representación gráfica (Figura 12) muestra el grado de similitud entre dos cepas o *clústers* de estas a partir de la data obtenida de la matriz de coeficientes de similitud de todos los pares posibles (Crisci & Lopez, 1983). Se tomaron en cuenta los ensayos de producción de fitohormonas, solubilización de sales fosfato (bicálcico y tricálcico), crecimiento de las cepas a diferentes valores de temperatura y de pH, morfotipo y bioquímica. De acuerdo al análisis, las cepas fueron separadas en dos grandes conglomerados (I y II), donde los factores determinantes de agrupamiento fueron el nivel de crecimiento a diferentes valores de temperatura y pH, seguida de la capacidad solubilizadora de sales fosfato y producción de AIA. El conglomerado I se encontró conformado por cepas de morfotipos I y II, que presentaron poco crecimiento a diferentes valores de pH y temperaturas (0 a 0.75 cm). Todas tuvieron en común una buena actividad solubilizadora de sales fosfato, mientras que su producción de AIA fue entre 0.1 y 23.23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

El conglomerado II se caracterizaron por presentar buenos niveles de crecimiento a diferentes valores de pH y temperaturas en comparación al conglomerado I, a su vez este se dividió en dos subgrupos (II.1 y II.2). El subgrupo II.1 fue conformado por aquellas cepas con morfotipo II, que no presentaron actividad solubilizadora de sales fosfatos y cuya producción de AIA se encontraba entre los 1.65 a 74.37 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. El subgrupo II.2, agrupaba aquellas cepas con una alta capacidad solubilizadora de sales fosfato, a su vez se subdividió en dos *clústers*, II.2.a y II.2.b. El primero (II.2.a) se encontraba aquellas cepas que produjeron las mas altas concentraciones de AIA (entre 52.89 y 68.9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) y presentaban el morfotipo IV, con excepción de la cepa LMTZ064-30 (morfotipo II). El segundo *cluster* II.2.b fue el más grande, que abarcaba a aquellas cepas que presentaban el morfotipo III, los mayores diámetros de crecimiento a diferentes valores de temperatura y pH, los mejores halos de solubilización de sales fosfato, y cuya producción de AIA tuvo niveles intermedios entre 16.21 a 42.32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

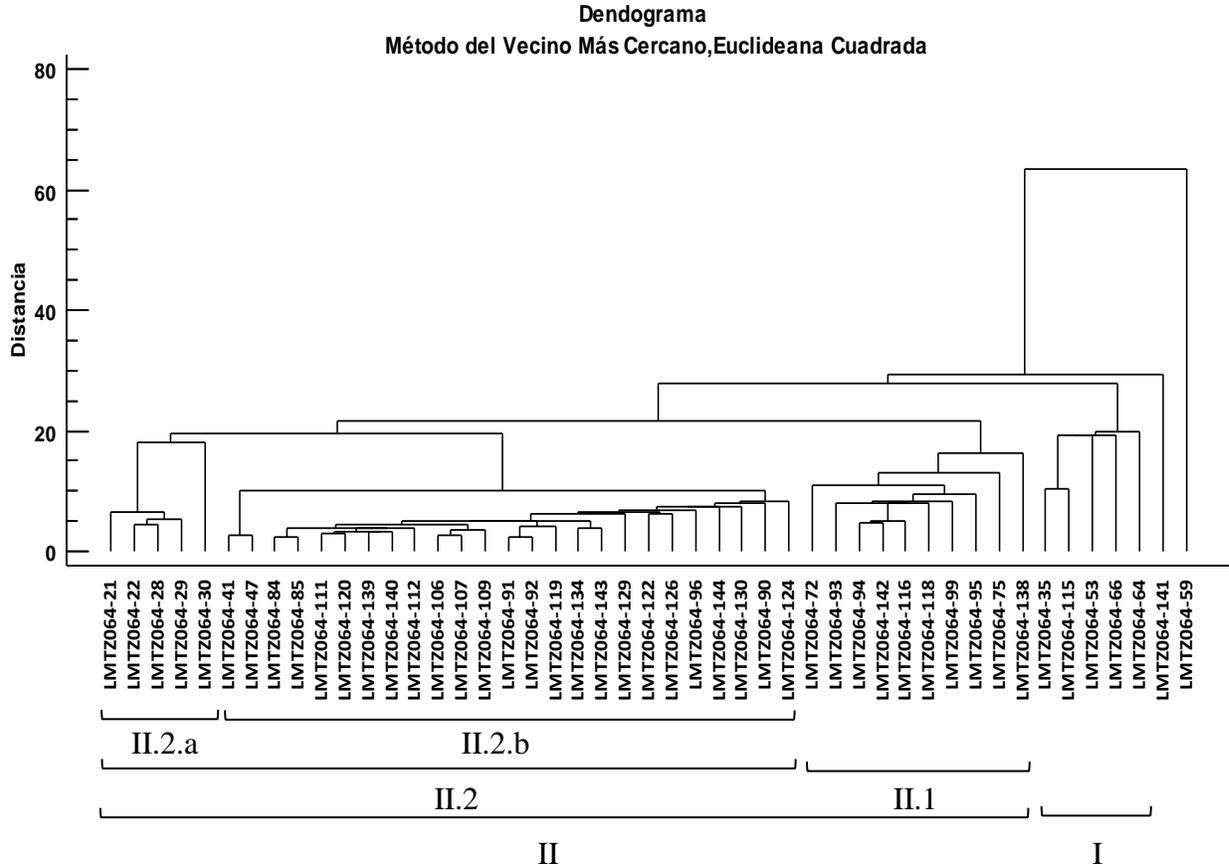


Figura 12. Dendograma fenotípico en base a las características morfológicas, fisiológicas y promotoras de crecimiento vegetal de las cepas en estudio.

Método del vecino más cercano, con una métrica de distancia euclídeana cuadrada.

Conglomerados: I y II; Sub grupos: II.1 y II.2; y Clusters: II.2.a y II.2.b.

Por otro lado, se observó que las cepas LMTZ064-59 y LMTZ064-141 actuaron como *outgroups*. La cepa LMTZ064-59 (morfortipo V) se caracterizó por presentar bajos niveles de crecimiento a diferentes condiciones, ausencia de actividad solubilización de fosfatos y baja producción de AIA ($5.325 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); mientras que la cepa LMTZ064-141 (morfortipo II) tuvo una producción mayor ($64.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y baja actividad solubilizadora de fosfato.

4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se amplificó los elementos repetitivos BOX, cuyas secuencias son altamente conservadas y presentes en múltiples copias en el genoma bacteriano (Lupski & Weinstock, 1992). Los perfiles BOX-BOX de las 47 cepas en estudio (Figuras 13) fueron clasificados dentro de un dendograma mediante el análisis UPGMA (Figura 14), encontrándose un total de 19 *clusters* diferentes (I al XIX) (ANEXO 3-Figura 30), siendo los perfiles VI, XI y XIII los que tuvieron mayor número de cepas representantes, los dos primeros con 16 por ciento cada uno y el último con 15 por ciento del total.

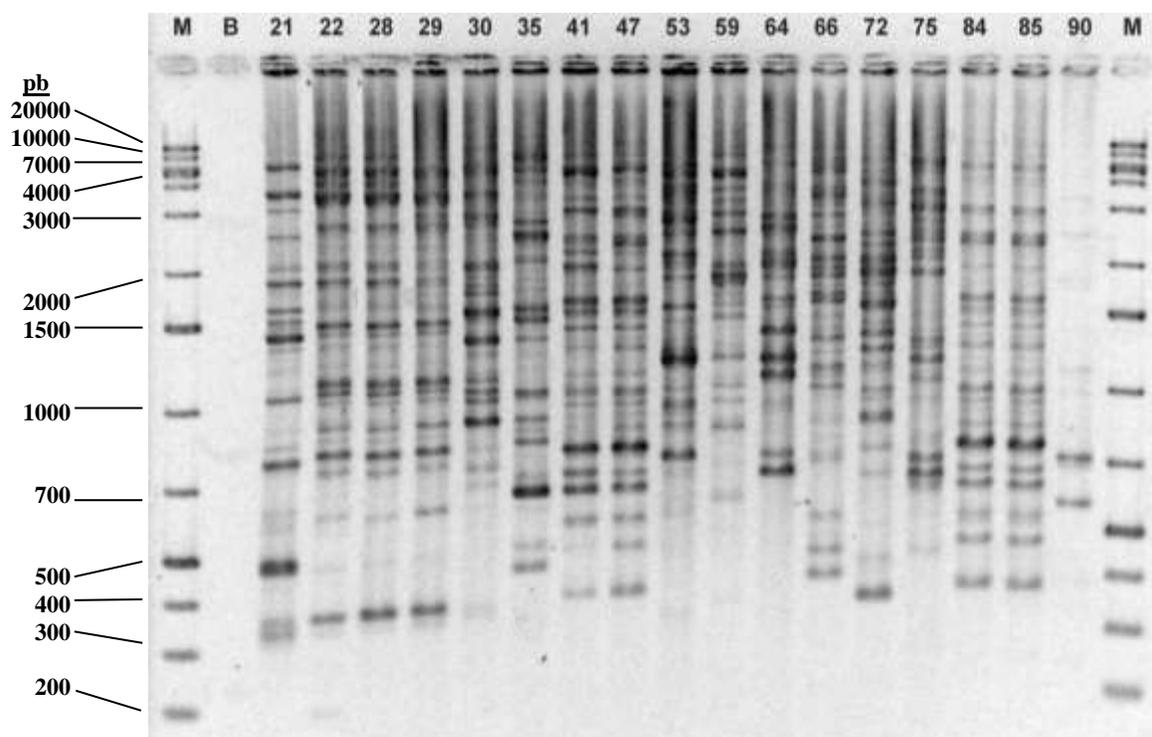


Figura 13. Perfiles BOX-PCR de las cepas en estudio.

Carriles con los números indican las diferentes cepas “*LMTZ064*” en estudio. Carriles M: Marcador de peso molecular 1Kb plus (Fermentas). Carril B: control sin ADN.

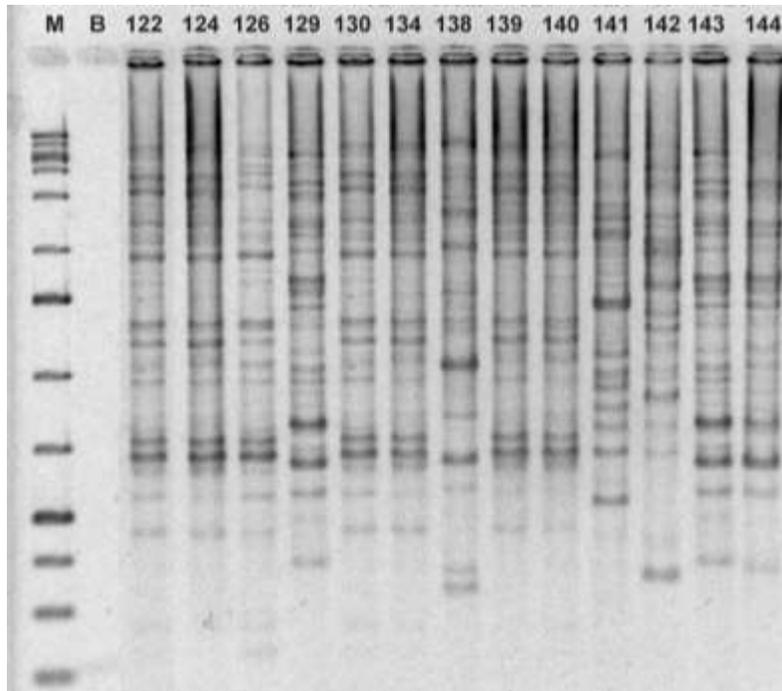
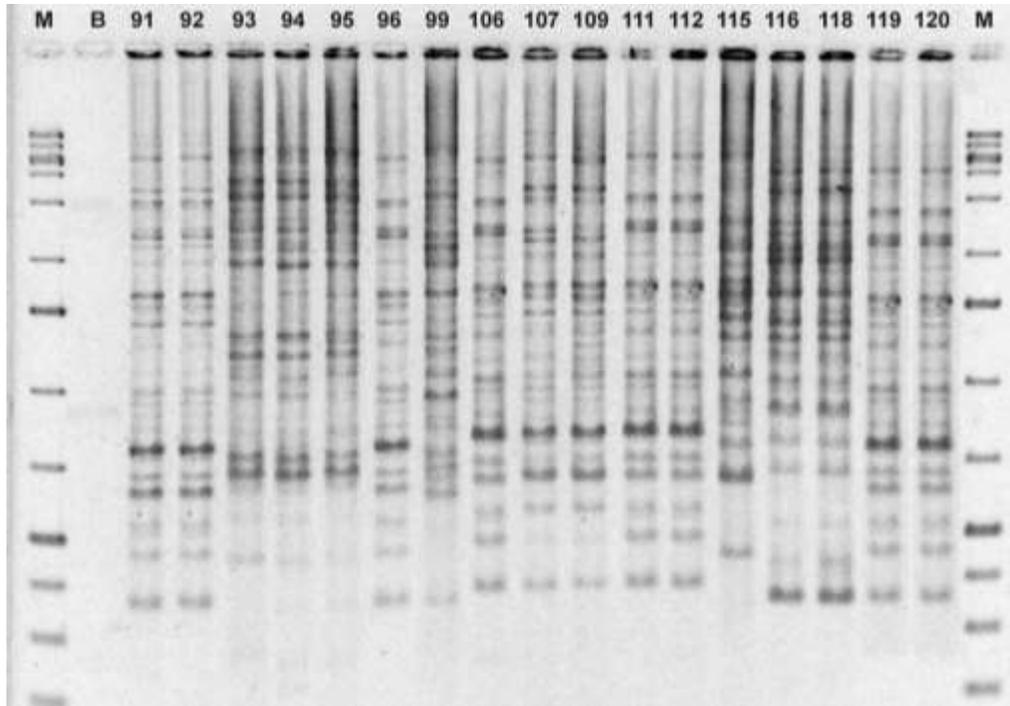


Figura 13. «Continuación». Perfiles BOX-PCR de las cepas en estudio. Carriles con los números indican las diferentes cepas “*LMTZ064*” en estudio. Carriles M: Marcador de peso molecular 1Kb plus (Fermentas). Carril B: control sin ADN.

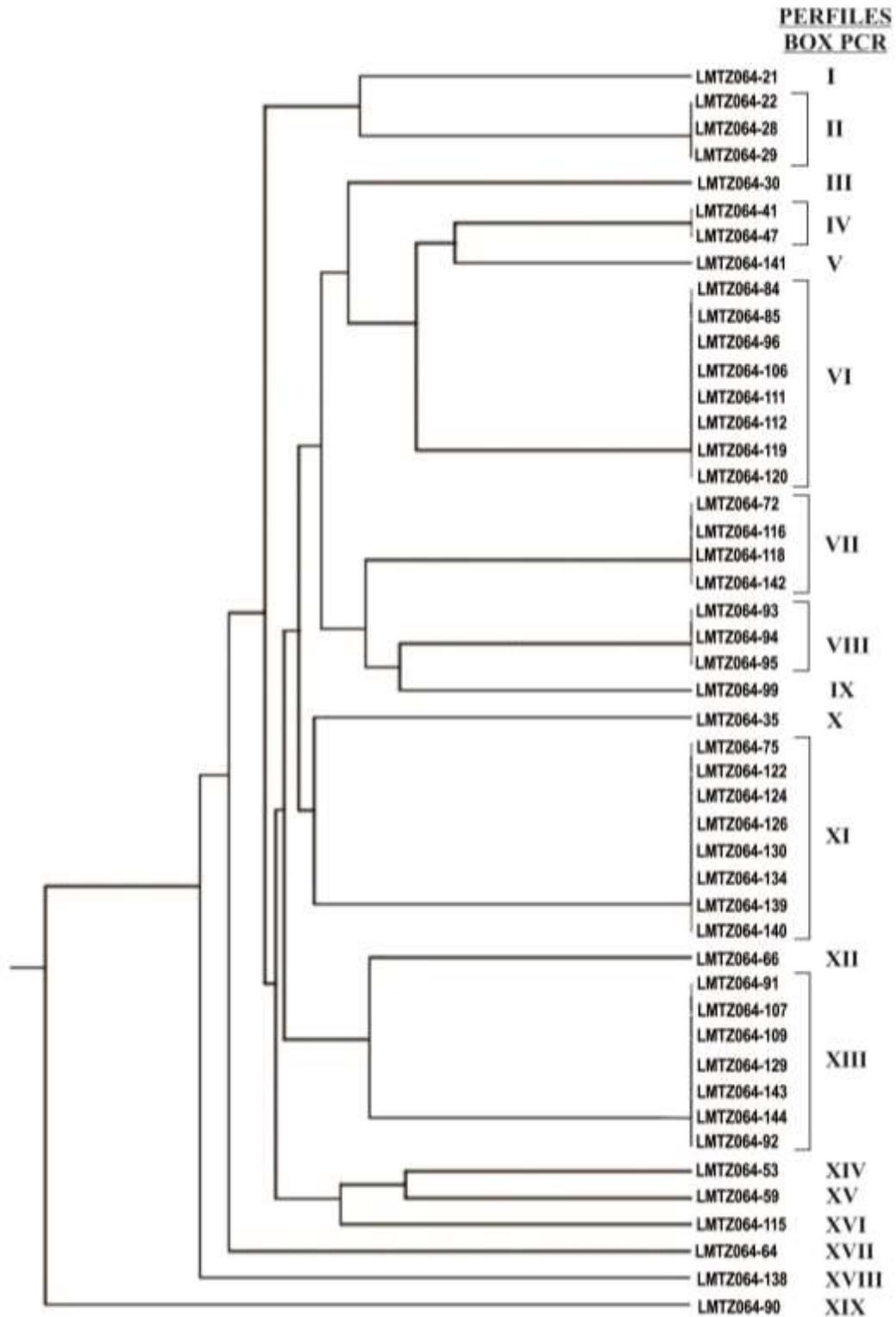


Figura 14. Dendrograma obtenido a partir de los perfiles BOX-PCR de las cepas en estudio.

Método de agrupamiento: UPGMA; coeficiente de Similaridad: Jaccard CCC(r): 0.958.

4.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó el análisis filogenético en base a la secuencia del gen del ARNr 16S a los diecinueve perfiles BOX-PCR diferentes obtenidos en la caracterización molecular. Las secuencias fueron analizadas mediante el sistema BLAST a través del servidor EzTaxon, determinando el porcentaje de similitud con especies cercanamente relacionadas y reportadas en la base datos del Genbank (Cuadro 6). Así también se realizó el estudio de filogenia por medio de la construcción de árboles filogenéticos (Figura 15 al 18).

Cuadro 6: Análisis filogenético en base a la secuencia del gen del ARNr 16S de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de *L. meyenii*

Perfil BOX-PCR	Nº Cepas	Cepa representante	Cepa tipo cercanamente relacionada basado en el gen del ARNr 16S	Número de accesoión	Nivel de Similitud (%)	Clase †
I	1	LMTZ064-21	<i>Pantoea eucalypti</i> LMG 24198 ^T	EF688009	99.33	γ
II	3	LMTZ064-22	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T	AJ233423	99.28	γ
III	1	LMTZ064-30	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T	AJ293463	100	γ
IV	2	LMTZ064-41	<i>Burkholderia caledonica</i> LMG19076 ^T	AF215704	98.46	β
V	1	LMTZ064-141	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	CP003190	99.86	γ
VI	8	LMTZ064-119	<i>Rahnella aquatilis</i> CIP 78.65 ^T	CP003244	98.22	γ
VII	4	LMTZ064-118	<i>Rhizobium nepotum</i> 39/7 ^T	FR87023	99.85	α
VIII	3	LMTZ064-95	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T	AJ293463	99.93	γ
IX	1	LMTZ064-99	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T	AY170848	100	β
X	1	LMTZ064-35	<i>Ewingella americana</i> GTC 1277 ^T	AB273745	98.5	γ
XI	8	LMTZ064-122	<i>Serratia quinivorans</i> CP6a ^T	AJ279045	99.3	γ
XII	1	LMTZ064-66	<i>Serratia liquefaciens</i> CIP 103238 ^T	AJ306725	98.53	γ
XIII	7	LMTZ064-109	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> MK06 ^T	GQ856217	98.17	γ
XIV	1	LMTZ064-53	<i>Burkholderia caledonica</i> LMG19076 ^T	AF215704	98.5	β
XV	1	LMTZ064-59	<i>Variovorax boronicumulans</i> BAM-48 ^T	AB300597	99.65	β
XVI	1	LMTZ064-115	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T	AJ293463	98.04	γ
XVI	1	LMTZ064-64	<i>Burkholderia caledonica</i> LMG19076 ^T	AF215704	98.31	β
XVI	1	LMTZ064-138	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T	AJ293463	99.33	γ
XIX	1	LMTZ064-90	<i>Pseudomonas brenneri</i> CFML 97-391 ^T	AF268968	99.59	γ

† Clase Alfa Proteobacteria = α, Clase Beta Proteobacteria = β y Clase Gamma Proteobacteria = γ.

Todos los aislamientos pertenecen al *phylum* Proteobacteria, agrupados en tres diferentes clases: El 8.5 por ciento perteneciente a la clase α -Proteobacterias, con cuatro cepas del género *Rhizobium*; el 12.77 por ciento son de la clase β -Proteobacterias, con cuatro cepas del género *Burkholderia*, una cepa del género *Variovorax* y una *Achromobacter*, y finalmente el 78.73 por ciento pertenece a la clase γ -Proteobacterias con 37 cepas representantes pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Rahnella* y *Pseudomonas*.

Se obtuvo que la cepa LMTZ064-118 (perfil VII) pertenece a la clase α -Proteobacterias, ubicándose en el mismo *cluster* que la cepa *Rhizobium nepotum* 39/7^T [FR87023] con un 99.85% de similitud (Figura 15). Esta cepa fue aislada por primera vez de callos de *Prunus cerasifera* (ciruelo) en Hungría (Pulawska *et al.* 2012) encontrándose cercanamente relacionada con *R. radiobacter*. No se cuenta con bibliografía que describa su capacidad de PGPR o fijadora de nitrógeno.

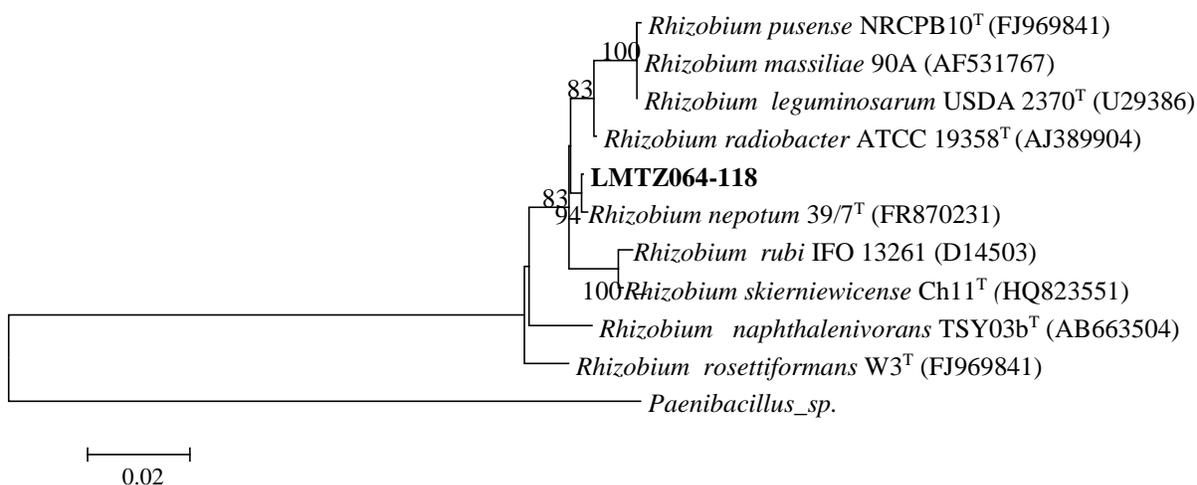


Figura 15. Árbol *Neighbor-joining* construido por el método Kimura- 2 parámetros mostrando la localización taxonómica de la cepa LMTZ064-118 perteneciente al *phylum* α Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S.

Se usó la secuencia de *Paenibacillus* sp. como *outgroup*. La significancia de cada rama es indicada por un *Bootstrap* con un p calculado para 1000 réplicas. Escala 0.2% de divergencia secuencial [2 nucleótidos (nt) por 1000 nt].

Las cepas ensayadas pertenecientes a la clase β -Proteobacterias se muestran en la Figura 16.

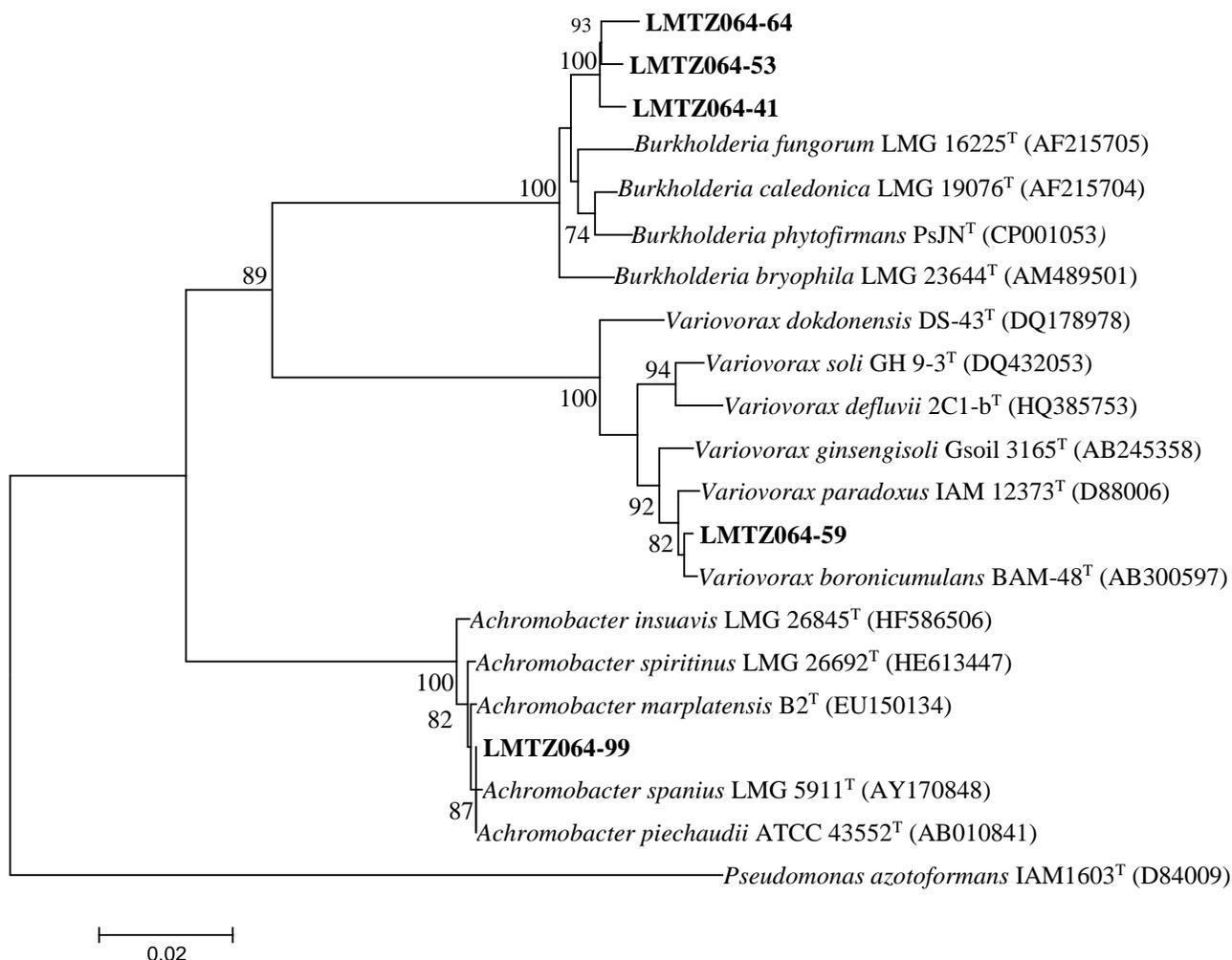


Figura 16. Árbol *Neighbor-joining* construido por el método Kimura - 2 parámetros mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al *phylum* β -Proteobacteria, en función a la secuencia del gen ARNr 16S.

Se usó la secuencia de *Pseudomonas azotoformans* como *Outgroup*. La significancia de cada rama es indicada por un *Bootstrap* con un p calculado para 1000 réplicas. Escala 0.2% de divergencia secuencial [2 nucleótidos (nt) por 1000 nt].

Las cepas LMTZ064-41, LMTZ064-53 y LMTZ064-64 (perfiles IV, XIV y XVII, respectivamente) se encontraron en el mismo *cluster* del género *Burkholderia*, presentando un 98.46, 98.5 y 98.31 por ciento de similitud, respectivamente, con la cepa *B. caledonica* LMG19076^T [AF215704]. *Burkholderia* spp. puede establecer asociación con diferentes cultivos estando en vida libre en la rizósfera o como endófitos, siendo muchas de estas cepas

reconocidas por su habilidad PGPR como fijadoras de nitrógeno (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001) y supresoras de fitopatógenos (Coenye & Vandamme, 2003); habiendo sido reportado su efecto positivo en el rendimiento de cultivos como el maíz y sorgo (Bevivino *et al.*, 1998; Chiarini *et al.*, 1998).

La cepa LMTZ064-59 (perfil XV) está relacionada a *Variovorax boronicumulans* BAM-48^T [AB300597] (99.65% de similitud) y a *V. paradoxus* IAM 12373^T [D88006] (99.44% de similitud). *V. boronicumulans* fue aislada por primera vez por Miwa *et al.* (2008) de suelos de campos experimentales en Japón. *Variovorax* es conocida por su capacidad PGPR de producir compuestos indólicos a nivel de laboratorio (Belimova *et al.*, 2004). Así también, es capaz de metabolizar mediante la enzima ACC deaminasa el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor inmediato del etileno, hormona causante de la reducción del desarrollo del hipocotilo y la elongación radicular de las plantas (Chen *et al.*, 2013).

La cepa LMTZ064-99 (Perfil IX) fue identificada como *Achromobacter spanius* LMG 5911^T [AY170848] (100% de similitud). Se ha reportado su capacidad PGPR en cultivos de *Vigna radiata* aislados de suelos de cultivo provenientes de la India (Ahmad *et al.*, 2006).

En el caso de la clase γ -proteobacterias (Figura 17 y 18), las cepas LMTZ064-21 (perfil I) y LMTZ064-22 (perfil II) estuvieron relacionadas a las cepas *Pantoea eucalypti* LMG 24198^T [EF688009] y *P. agglomerans* DSM 3493^T [AJ233423], con un 99.33 y 99.28 por ciento de similitud, respectivamente. *P. agglomerans* es conocido por su capacidad PGPR al producir fitohormonas (Feng *et al.*, 2006), solubilizar sales fosfato (Verma *et al.*, 2001) y fijar nitrógeno molecular (Merbach *et al.*, 1998) y ha sido aislado de diferentes cultivos como arroz, trigo y pastos (Ladha & Reddy, 2000; Riggs *et al.*, 2001; Merbach *et al.*, 1998). Por otro lado, *P. eucalypti* ha demostrado su habilidad solubilizadora de fosfatos inorgánicos a nivel de laboratorio (Castagno *et al.*, 2011).

La cepa LMTZ064-35 se encontró emparentada con un 98.5 por ciento de similitud *Ewingella americana*. Se ha reportado su capacidad biodegradadora de fenol, y ha sido

asociado a rizósferas de cultivos como espinaca y frejol (Khleifat, 2006; Babalola & Akindolire, 2011).

Por otro lado, se determinó que la cepa LMTZ064-119 (perfil VI) pertenece al género *Rahnella*, teniendo un 98.22 por ciento de similitud a *R. aquatilis* CIP 78.65^T [PRJNA86855]. Se ha reportado la capacidad de esta especie como fijadora de nitrógeno en rizósferas de cultivos de maíz, trigo (Berge *et al.*, 1991) y papa (Kohashikawa, 2010), así también su capacidad como biocontroladora de patógenos en cultivos de tomate (Hoda *et al.*, 2005).

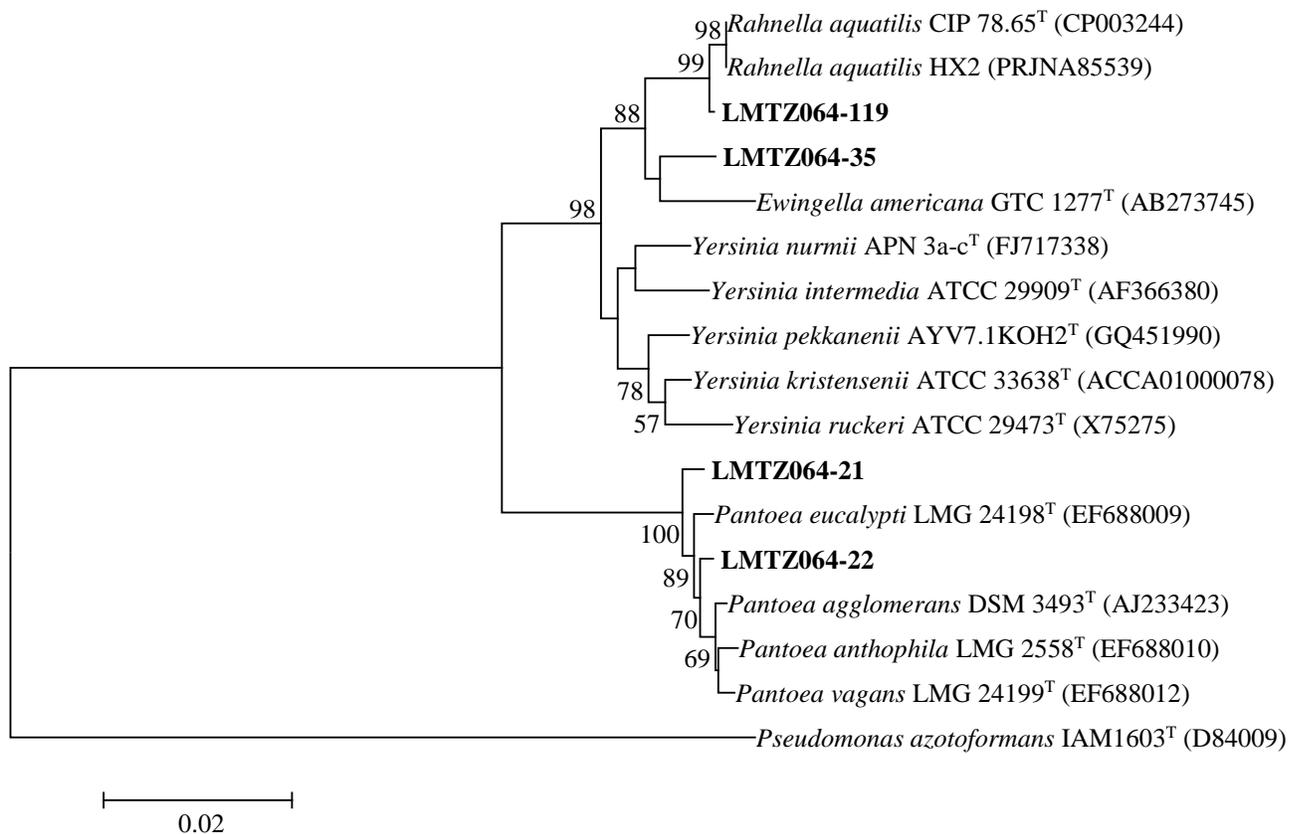


Figura 17. Árbol Neighbor-joining construido por el método Kimura - 2 parámetros mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al *phylum* γ Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S. Se usó la secuencia de *P. azotoformans* como *Outgroup*.

La significancia de cada rama es indicada por un *Bootstrap* con un *p* calculado para 1000 réplicas. Escala 0.2% de divergencia secuencial [2 nucleótidos (nt) por 1000 nt].

Las cepas LMTZ064-30, LMTZ064-95, LMTZ064-115 y LMTZ064-138 (perfiles III, VIII, XVI y XVIII, respectivamente) se encontraron en el mismo cluster que la especie *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T [AJ293463]. El aislamiento LMTZ064-30 mostró 100% de similitud con dicha especie; mientras que las cepas LMTZ064-95, LMTZ064-115 y LMTZ064-138 estuvieron relacionadas a ella con porcentajes de similitud de 99.93, 98.04 y 99.33 por ciento, respectivamente. Se reportó que este género tiene gran potencial para su aplicación en control biológico por su habilidad PGPR, actuando también como protector de raíces en condiciones de estrés biótico (Ryan *et al.*, 2009). Kai *et al.* (2007) observaron que *S. rhizophila* es capaz de inhibir el crecimiento micelial de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* hasta en un 90 por ciento.

La cepa LMTZ064-66 (perfil XII) y LMTZ064-122 (perfil XI) fueron clasificadas dentro del género *Serratia*, mostrando 98.46 por ciento de similitud con la especie *S. liquefaciens* CIP 103238^T [AJ306725] y 99.23 por ciento con *S. quinivorans* CP6a^T [AJ279045], respectivamente. Inoculantes preparados en base a cepas de este género demostraron una capacidad PGPR al incrementar los rendimientos en cultivos de soja y maíz (Feng *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1999).

La cepa LMTZ064-90 (perfil XIX) estuvo altamente relacionada con *Pseudomonas brenneri* CFML 97-391^T [AF268968] (99.59 por ciento de similitud). Esta cepa fue aislada por primera vez de muestras naturales de aguas minerales en Francia (Baida *et al.*, 2001) y Hayat *et al.* (2013) reportaron la capacidad PGPR de esta especie al determinar su habilidad de producir AIA, solubilizar sales fosfato y como fijador de nitrógeno a nivel de laboratorio.

La cepa LMTZ064-109 (perfil XIII), pertenece al género *Stenotrophomonas*, teniendo un 98.17 por ciento de similitud con la cepa *S. panacihumi* MK06^T [GQ856217]. Especies de este género se han encontrado asociadas a la rizósfera de diferentes cultivos agrícolas (Park *et al.*, 2005), pudiendo actuar como promotores de crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos como la fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas (Liba *et al.*, 2006).

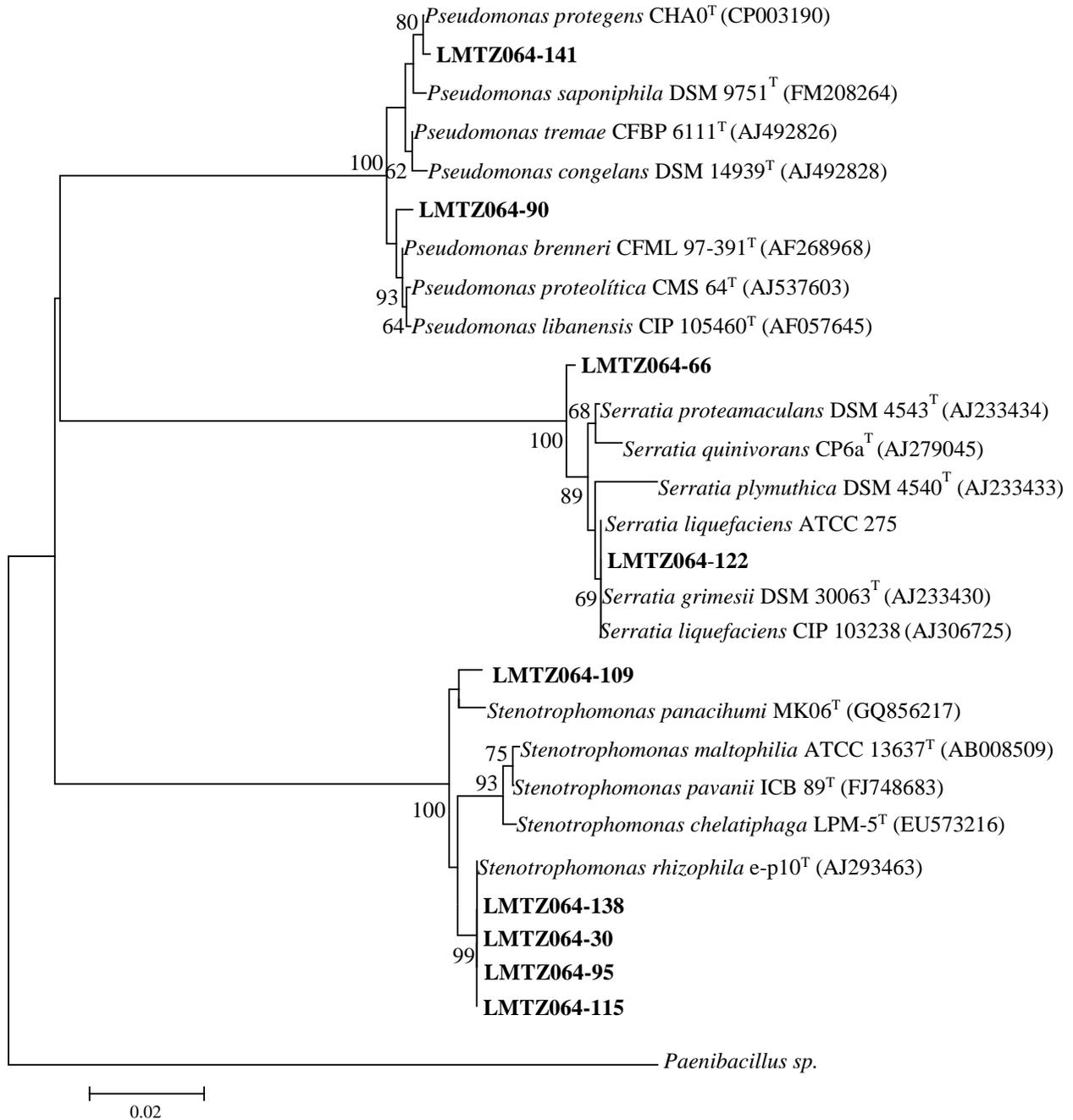


Figura 18. Árbol *Neighbor-joining* construido por el método Kimura - 2 parámetros mostrando la localización taxonómica de las cepas en negrilla pertenecientes al *phylum* γ Proteobacteria, en función a la secuencia del gen del ARNr 16S. Se usó la secuencia de *Paenibacillus* sp. como *Outgroup*.

La significancia de cada rama es indicada por un *Bootstrap* con un p calculado para 1000 réplicas. Escala 0.2% de divergencia secuencial [2 nucleótidos (nt) por 1000 nt].

Finalmente, se encontró que la cepa LMTZ064-141 (perfil V) está altamente relacionada a *Pseudomonas protegens* CHA0^T [CP003190] (99.86 por ciento de similitud). Esta especie (denominada anteriormente *P. fluorescens*) es conocida por su capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos (Ramette *et al.*, 2011).

4.8 DETECCIÓN DEL GEN DE LA NITROGENASA REDUCTASA (*nifH*)

Se evaluó a nivel molecular la capacidad fijadora de nitrógeno de cada una de las cepas representantes de los diecinueve clusters BOX-PCR. Se observó la presencia del amplicón de aproximadamente 360 pb (ANEXO 3-Figura 30) que coincide con el fragmento del gen *nifH* de la nitrogenasa reductasa (Poly *et al.*, 2001) en seis cepas representantes correspondiente LMTZ064-22 (perfil BOX-PCR II), LMTZ064-41 (perfil IV), LMTZ064-119 (perfil VI), LMTZ064-66 (perfil XII), LMTZ064-109 (perfil XIII) y LMTZ064-90 (perfil XIX) (Figura 19).

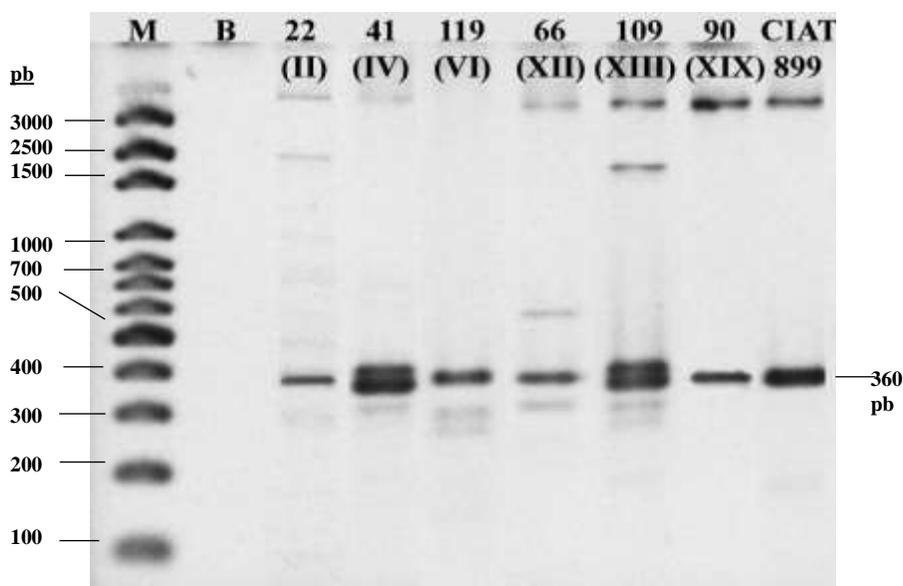


Figura 19. Amplificación del fragmento de 360 pb correspondiente al gen *nifH* de la nitrogenasa reductasa.

Carriles 22, 41, 119, 66, 109 y 90: Cepas *nifH*⁺. Números entre paréntesis: Perfiles BOX -PCR. CIAT 899: control *nifH*⁺ *R. tropici* CIAT899, B: control sin ADN. M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Axygen).

De acuerdo a lo analizado en los árboles filogenéticos (Cuadro 6, Figuras 15 al 18), la cepa LMTZ064-22 se encontró emparentado con *Pantoea agglomerans*, LMTZ06-41 con *Burkholderia caledonica*, LMTZ064-119 con *Rahnella aqualitis*, LMTZ064-66 a *Serratia liquefaciens*, LMTZ064-109 a *Stenotrophomonas panacihumi* y LMTZ064-90 a *Pseudomonas brenneri*.

Se ha detectado la capacidad diazotrófica en cepas de *P. agglomerans* en ensayos *in vitro* en base a su actividad reductora de acetileno (Asis & Adachi, 2004) así como su efecto promotor en el aumento del rendimiento en cultivos de maíz y garbanzo (Mishra *et al.*, 2011). Se ha observado la presencia del gen *nifH* en cepas pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Rahnella* y *Pseudomonas* (Doty *et al.*, 2009). *Burkholderia*, ha sido encontrada asociada con diferentes cultivos no-leguminosas tales como maíz y caña de azúcar, y su capacidad fijadora de nitrógeno es común dentro del género (Caballero-Mellano *et al.*, 2004). *Rahnella* ha sido reportada por primera vez como una bacteria diazotrófica por Berge *et al.* (1991) asociada a la rizósfera de cultivos de trigo y maíz al ser evidenciada su habilidad reductora de acetileno a nivel de laboratorio y por presentar el operón *nifHDK*. Se conoce poco de la habilidad diazotrófica dentro del género *Pseudomonas*, sin embargo, cepas de este género, aisladas de pastizales, han sido reportadas con esta capacidad por medio de la detección de la secuencia parcial del gen *nifH*, así como de promover un mejor desarrollo en cultivos de arroz al ser aplicados como inoculante (Mirza *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha reportado la habilidad fijadora de *Serratia sp.* en plantas de arroz, cuya presencia del gen *nifH* fue corroborado por técnicas de PCR (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Sandhiya *et al.*, 2005). Finalmente, Liba *et al.*, (2006) reportaron por primera vez la presencia del gen *nifH* en cepas de *Stenotrophomonas*, mientras que Reinhardt *et al.*, (2008) observaron dicha habilidad en función al test de reducción de acetileno y presencia de secuencias homólogas del gen *nifH*.

La presencia del fragmento de 360 pb del gen *nifH* detectado en las diferentes especies analizadas en el presente estudio, además de los estudios referidos en la bibliografía antes mencionada, indicaría el potencial de estas cepas como microorganismos diazotróficos (*nifH+*).

4.8 EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LAS CEPAS DIAZÓTROFAS PGPR EN LA GERMINACIÓN DE *L. meyenii*

Se evaluó el efecto como bioinoculantes de las seis bacterias diazótrofes *nifH*⁺ con capacidades PGPR en la germinación de semillas de *L. meyenii* bajo condiciones de laboratorio a 13°C (Figura 20, Cuadro 7).

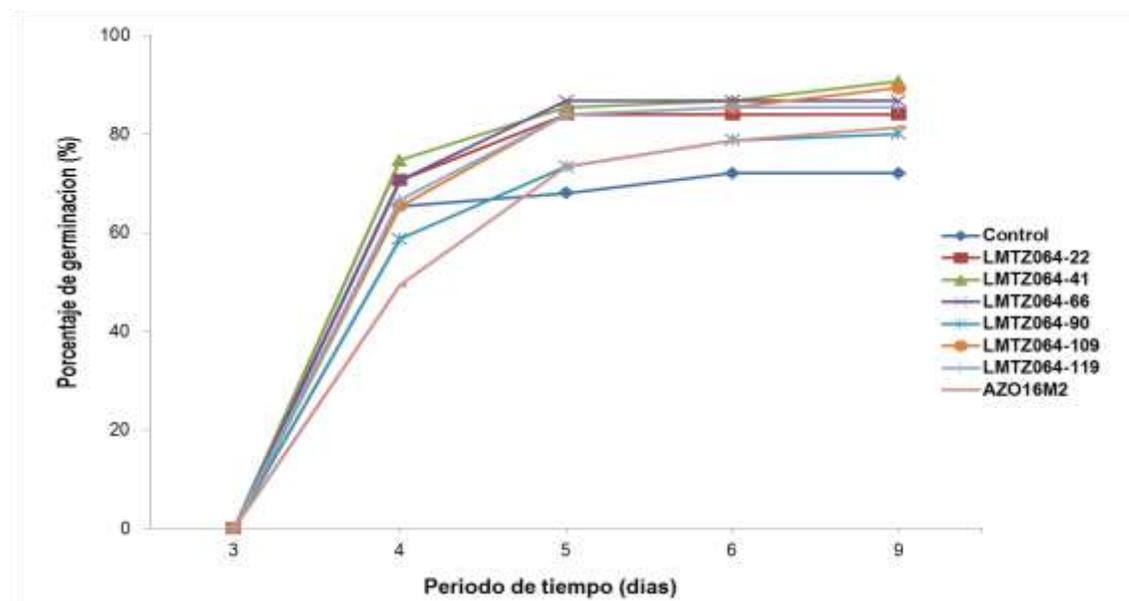


Figura 20. Efecto de la inoculación de las cepas *nifH*⁺ diazótrofes en el porcentaje de germinación de semillas de *L. meyenii*.

Azo16M2: *R. aquatilis*, diazótrofo PGPR aislado de rizósfera de *Solanum tuberosum* (Kohashikawa, 2010).

Cuadro 7: Efecto de las cepas *nifH*⁺ en la germinación de semillas de *L. meyenii*.

Tratamiento	% Germinación [†]				Peso seco de germinado (mg) ^{†*}
	Día 4	Día 5	Día 6	Día 9	
Control (sin inóculo)	65.33 ab	68.00 a	72.00 a	72.00 a	0.48 a
LMTZ064-22	70.67 b	84.00 b	84.00 b	84.00 bc	0.57 bc
LMTZ064-41	74.67 b	85.33 b	86.67 b	90.67 c	0.61 bc
LMTZ064-66	70.67 b	86.67 b	86.67 b	86.67 bc	0.59 bc
LMTZ064-90	58.67 ab	73.33 a	78.67 ab	80.00 b	0.59 bc
LMTZ064-109	65.33 ab	84.00 b	85.33 b	89.33 c	0.62 c
LMTZ064-119	66.67 b	84.00 b	85.33 b	85.33 bc	0.62 c
AZO16M2 (<i>Rahnella sp.</i>)	49.33 a	73.33 a	78.67 ab	81.33 b	0.53 ab

[†]Prueba estadística: LSD, las letras representan las diferencias significativas entre los tratamientos

*Peso seco de germinados obtenido en el 9dpi.

La germinación se observó a partir del cuarto día post inoculación (dpi) (ANEXO 3, Figura 31). No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 7, ANEXO 2), sin embargo hubo una tendencia positiva por parte de las cepas LMTZ064-41, LMTZ064-109, LMTZ064-66 y LMTZ064-22 a ser superiores al control sin inocular, mostrando porcentajes de germinación entre 66 a 75 por ciento, aproximadamente.

A partir del quinto día en adelante, hubo incrementos en el porcentaje de germinación en todos los tratamientos inoculados, mostrando diferencias significativas con respecto al control sin inocular (Cuadro 7). Al final del sexto dpi, las cepas LMTZ064-22, LMTZ064-41, LMTZ064-66, LMTZ064-109 y LMTZ064-119 tuvieron porcentajes entre el 78 y 87 por ciento, mostrando diferencias significativas con el control que presentó un porcentaje de germinación del 72 por ciento (Figura 21).

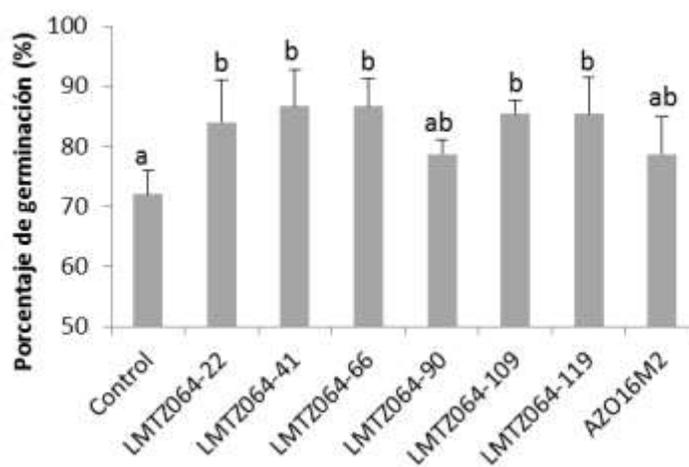


Figura 21. Efecto de la inoculación de las cepas *nifH*+ diazótrofes en el porcentaje de germinación de semillas de *L. meyenii* a los 6 dpi.

Finalmente al noveno dpi, los tratamientos inoculados mostraron valores entre 80 y 91 por ciento de germinación, obteniéndose diferencias significativas con respecto al control sin inocular ($p < 0.05$, ANEXO 2), siendo los tratamientos con las cepas LMTZ064-41 y LMTZ064-109 los que presentaron los mayores valores (Figura 22 y 23).

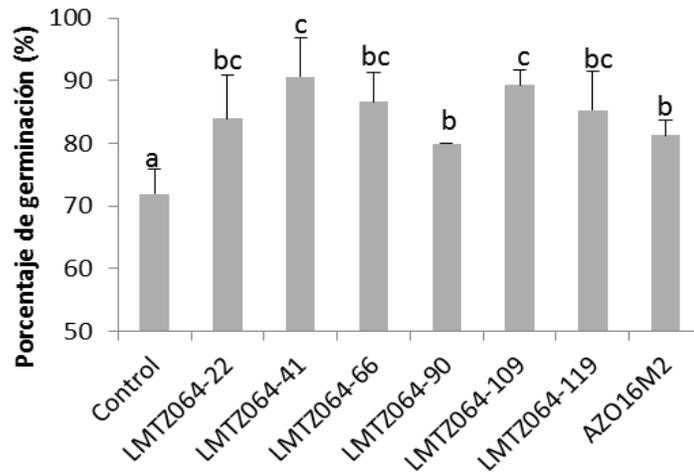


Figura 22. Efecto de la inoculación de las cepas *nifH*+ en el porcentaje de germinación de semillas de *L. meyenii* a los 9 dpi.

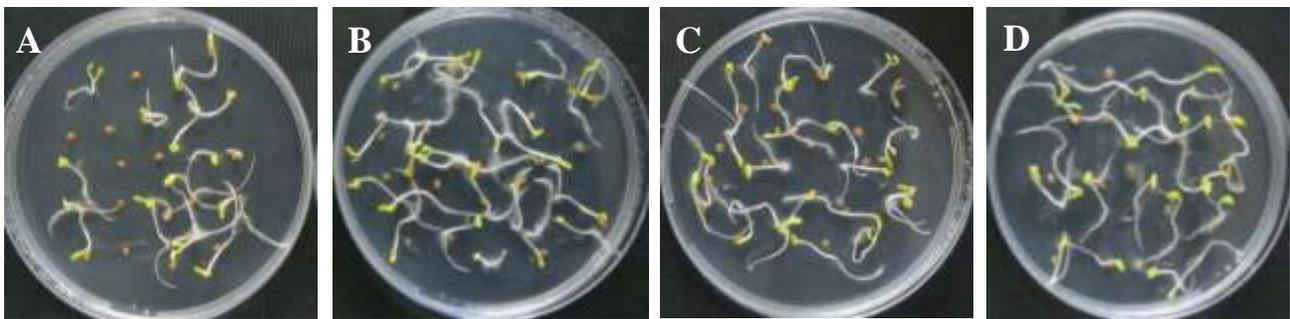


Figura 23. Germinación de semillas de maca a los 9 días post-inoculación.
A: Control sin inocular, B,C y D: tratamientos inoculados con la cepa *nifH*+ “LMTZ064-41” y “LMTZ064-109” y “LMTZ064-119”, respectivamente, nativas de suelos de cultivo de maca.

Se evaluó el peso seco de los germinados a los 9 dpi (Figura 24). Las tratamientos inoculados con las cepas *nifH*+ mostraron diferencias significativas con respecto al control (0.48 g) ($p < 0.05$, ANEXO 2); siendo los tratamientos con las cepas LMTZ064-109 y LMTZ064-119 los que tuvieron los mayores valores, cada uno con 0.62 g, aproximadamente (Cuadro 7).

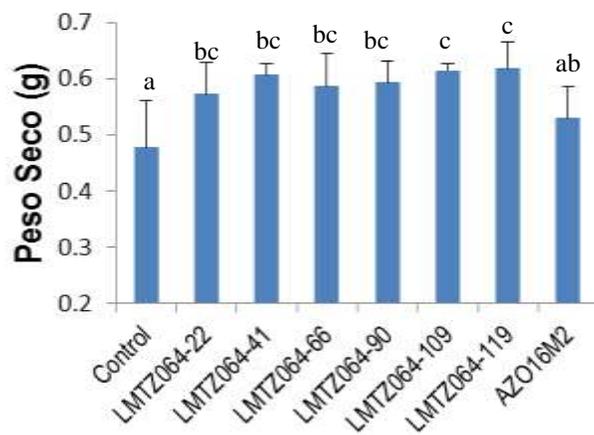


Figura 24. Efecto de la inoculación de las cepas *nifH*+ en el peso seco de germinados de *L. meyenii* a los 9 días post-inoculación.

Se observó una mayor producción y tamaño de pelos radiculares en los tratamientos inoculados con las diferentes cepas *nifH*+ en comparación al control sin inocular (Figura 25). Géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Rahnella* y *Burkholderia* pueden estimular la germinación de las semillas, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares, acelerando el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios (Campbell & Greaves., 1990; Kohashikawa, 2010; Sanchez-Yanez *et al.*, 2014).



Figura 25. Efecto de la inoculación de cepas *nifH*+ en el desarrollo de los pelos radiculares en la germinación de semilla de maca.

A: Control sin inocular. Tratamientos inoculados con las cepas *nifH*+ B: LMTZ064-119 (*Rahnella aquatilis*), C: LMTZ064-90 (*Pseudomonas brenneri*), D: LMTZ064-41 (*Burkholderia caledonica*) y E: LMTZ064-109 (*Stenotrophomonas sp.*), respectivamente.

V. CONCLUSIONES

1. Cuarenta y siete cepas provenientes de suelos de cultivo de maca fueron capaces de crecer en MMSN, siendo el 55 por ciento provenientes de los suelos de Acomachay seguido de Galpón Condorín con 28 por ciento. En función a su morfología, se encontraron cinco morfotipos, predominando el tipo III, cuyas colonias fueron las más grandes, mucosas y capaces de acidificar el MMSN. En cuanto a su fisiología, el 95.7 por ciento de las cepas fueron tolerantes a 6°C, con un óptimo crecimiento alrededor de 28°C, indicando una relación cercana al grupo de bacterias psicrótrofas. Todas las cepas eran del tipo neutrófilas, teniendo un amplio rango de tolerancia a pHs ácidos y básicos. El 83 por ciento presentó un metabolismo fermentativo sin actividad citocromo oxidasa. Todas las cepas fueron del tipo gram negativas.
2. En cuanto a las características PGPR, todas las cepas fueron productoras de ácido indol acético, obteniéndose cantidades entre 0.1 a 75 µg/ml; mientras que el 74.5 por ciento fueron capaces de solubilizar sales fosfato generando halos de solubilización de 0.1 a 1.75 cm en fosfato bicálcico y 0.1 a 1.6 cm en fosfato tricálcico con eficiencias de 22 a 350% y de 18 y 407%, respectivamente.
3. Del análisis integrado de características fenotípicas y PGPR, se observó que la producción de AIA, la capacidad solubilizadora de fosfato y morfotipo fueron determinantes para la agrupación de cepas, siendo aquellas con morfotipo III, producción de AIA intermedia, alta capacidad solubilizadora y tolerantes a diferentes condiciones de temperatura y pH las más abundantes.

4. Se caracterizó molecularmente la diversidad de las cepas en estudio, encontrándose un total de 19 perfiles BOX-PCR distintos (I al XIX) en base al análisis UPGMA, siendo los *clústers* VI, XI y XIII los que presentaron mayor número de cepas representantes, los dos primeros con 17 por ciento y el último con 15 por ciento del total.
5. Del análisis filogenético en base al gen del ARNr 16S, se determinó que los suelos de cultivo de maca presentan una amplia diversidad de géneros bacterianos pertenecientes al *Phylum* Proteobacteria, siendo el más abundante a las γ -Proteobacteria con los géneros *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ewingella* y *Serratia*; seguida de las β -Proteobacterias con los géneros *Burkholderia*, *Achromobacter* y *Variovorax*; y finalmente las α -Proteobacterias con el género *Rhizobium*.
6. Se detectó la presencia del amplicón de 370 pb perteneciente al gen *nifH* en las cepas LMTZ064-22 (*Pantoea sp.*), LMTZ064-41 (*Burkholderia sp.*), LMTZ064-119 (*Rahnella sp.*), LMTZ064-66 (*Serratia sp.*), LMTZ064-109 (*Stenotrophomonas sp.*) y LMTZ064-90 (*Pseudomonas sp.*), indicando la diversidad de géneros bacterianos PGPR con potencial actividad diazotrófica (*nifH*⁺) presentes en suelos de cultivo de maca pertenecientes a la Meseta de Bombón, departamento de Junín.
7. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación y peso seco de germinados de maca en los tratamientos inoculados con las cepas *nifH*⁺ en comparación al control sin inocular. Concluyéndose que dichas cepas tienen potencial para ser utilizadas como bioinoculantes para la maca.

VI. RECOMENDACIONES

1. Determinar otras capacidades PGPR en las cepas en estudio, tales como la producción de sideróforos, antagonismo y producción de compuestos volátiles.
2. Evaluar la capacidad PGPR tales como producción de AIA y solubilización a diferentes condiciones de temperatura y pH.
3. Evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas mediante ensayos de cromatografía de gases en base a la prueba de reducción de acetileno (ARA).
4. Realizar estudios moleculares complementarios mediante la construcción y análisis de árboles filogenéticos en base al gen *nifH* haciendo uso de más juegos de *primers* reportados en la bibliografía.
5. Evaluar la presencia de otros genes *nif* que se encuentren relacionados al proceso de fijación de nitrógeno.
6. Evaluar el efecto de la interacción de las bacterias diazótrofes (*nifH*+) con capacidad PGPR de este estudio como bioinoculantes en el crecimiento y desarrollo de plántula de nivel de laboratorio, invernadero y campo experimental en zonas altoandinas.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMAD, F; AHMAD, I; AQIL, F; WANI, A; SOUSCHE, Y. 2006. Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. *Biotechnology Journal* 1112–1123.
2. ALEXANDER, M. 1994. Introducción a la Microbiología de Suelos. AGT Editor S. A., México. 491 p.
3. ALIAGA, C. 1999. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la maca (*Lepidium meyenii Walpers*). Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello. 50 p. (Serie Ciencia y Tecnología no. 82).
4. ALIAGA, R. 2004. La Maca. En: Seminario J. (ed.). Raíces andinas: contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación. Lima, Perú. p 362-366. (Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). no. 6).
5. ALIAGA, R; ESPINOZA, E; JANAMPA, M; BLAS, R; BAZAN, R; RODRIGUEZ, G; VILLAGOMEZ, V. 2007. Fundamentos técnicos de zonificación para el cultivo de maca en la Meseta del Bombón Junín y Pasco. Perú biodiverso. Fundación para el desarrollo agrario, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 90 p.
6. APG III (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
7. ASIS, C; ADACHI, K. 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 38(1):19-23.

8. ATLAS; BARTHA, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ta ed. Pearson educación. Madrid, SPA. p 413-417.
9. BABALOLA, OO; AKINDOLIRE, AM. 2011. Identification of native rhizobacteria peculiar to selected food crops in Mmabatho municipality of South Africa. *Biological Agriculture & Horticulture* 27:294-309.
10. BAIDA, N; YAZOURH, A; SINGER, E; IZARD; D. 2001. *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Research in Microbiology* 152(5):493-502.
11. BASHAN, L E; ANTOUN, H; BASHAN, Y. 2008. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *The Journal of Physiology* 44:938-947.
12. BEHAR, A; YUVAL, B; JURKEVITH, E. 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis Capitata*. *Molecular Ecology* 14:2637-2643.
13. BELIMOVA, A; HONTZEASB, N; SAFRONOVAA, V; DEMCHINSKAYAA, S; PILUZZAC, G; BULLITTAC, S; GLICK, B. 2004. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry* 37: 241–250.
14. BENEDUZI, A; MOREIRA, F; COSTA, P; VARGAS, L; LISBOA, B; FAVRETO, R; BALDANI, J; PASSAGLIA, L. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology* 63:94-104.
15. BERGE, O; HEULIN, T; ACHOUAK, W; RICHARD, C; BALLY, R.; BALANDREAU, J. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Canadian Journal of Microbiology* 37:195-203.
16. BEVIVINO, A; SARROCCO, S; DALMASTRI, C; TABACCHIONI, S; CANTALE, C; CHIARINI, L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27:225–237.

17. BRIC, J; BOSTOCK, R; SILVESTONE, S. 1991. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2):535-538.
18. BÜRGMANN, H; WIDMER, F; VON SIGLER, W; ZEYER, J. 2004. New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1):240.
19. CABALLERO-MELLADO, J; MARTINEZ-AGUILAR, L; PAREDES-VALDEZ, G; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1165–1172. Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/pdf/Normas_IICA-CATIE.pdf.
20. CALVO, P; REYMUNDO, L; ZÚÑIGA, D. 2008. A study of potato (*Solanum tuberosum*) crop rhizosphere microbial population in highland zones. *Ecología Aplicada* 7(1, 2).
21. CAMPBELL, R; GREAVES, M. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In Lynch, J.M (eds). *The rhizosphere*. John Wiley & Sons Ltda., Chichester. p 11-34.
22. CASTAGNO, L; ESTRELLA, M; SANNAZZARO, A; GRASSANO, A; RUIZ, O. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and *in vitro* plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology* 110(5):1151–1165.
23. CHEN, LIN; DODD, I; THEOBALD, J; BELIMOV, A; DAVIES, W. 2013. The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany* 64(6):1565–1573.
24. CHIARINI, L; BEVIVINO, A; TABACCHIONI, S; DALMASTRI, C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia* *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology & Biochemistry* 30:81–87.

25. COENYE, T; VANDAMME, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5:719–729.
26. CRISCI, J; LOPEZ, M. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Secretaria General de la Organización de Estados Americanos. Washington, DC.132 p.
27. DEDYSH, SN; RICKE, P; LLESACK, W. 2004. *nifH* and *nifD* phylogenies an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of metanotrophic bacteria. *Microbiology* 150:1301-1313.
28. DIXON, R; KAHN, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*. 2(8):621-31.
29. DOTY, SH; OAKLEY, B; XIN, G; WON, KANG J; SINGLETON, G; KHAN, Z; VAJZOVIC, A; STALEY, J. 2009. Diazotroph ice endophytes of native black cottonwood and willow. *SYMBIOSIS* 47:23–33.
30. ESTRADA-DE LOS SANTOS, P; BUSTILLOS-CRISTALES, R; CABALLERO-MELLADO, J. 2001. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6):2790-2798.
31. FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS IT.). 1994. Neglected crops 1492 from a different perspective. FAO plant Production and Protection Serie No 26). 334 p.
32. FENG, Y; SHEN, D; SONG, W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology* 100: 938–945.
33. FENG, Z; NARJES, D; HYNES, R; SMITH, D. 1996. Plant Growth-promoting Rhizobacteria and Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Growth and Physiology at Suboptimal Root Zone Temperatures. *Annals of Botany* 79:243-249.
34. FUENTES-RAMÍREZ, L; JIMÉNEZ-SALGADO, T; ABARCA-OCAMPO, I. R; CABALLERO-MELLADO, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154:145-150.

35. GLICK, BR. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41(2):109–114.
36. GORDON, S; WEBER, R. 1950. Colorimetric estimation of indolacetic acid. Division of Biological and Medical Research. *Argonne National Laboratory. Chicago, IL.*
37. GYANESHWAR, P; JAMES, E; MATHAN, M; REDDY, P; REINHOLD-HUREK, B; LADHA, A. 2001. Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology* 183(8):2634–2645.
38. HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
39. HAYAT, R; SHEIRDIL, RA; IFTIKHAR-UL-HASSAN, M; AHMED, I. 2013. Characterization and identification of compost bacteria based on 16S rRNA gene sequencing. *Annals of Microbiology* 63(3):905-912.
40. HODA, H; EL-HENDAWY; MOHAMED E. OSMAN; NOHA M, SOROUR. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*, *Microbiological Research* 160(4):343-352.
41. HONG-JOO, SON; GEUN-TAE, PARK; MI-SUN, CHA; MOON-SOO, HEO. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology* 97(2):204-210. Disponible en <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/468512>.
42. HUNGRIA, M; CAMPO, R.J; CARVALHO, I. 2007. A importancia do processo de fixacao biológica do nitrogenio para a cultura da soja: componente esencial para a competitividad do produto brasileiro. Serie: Embrapa Soja. Documentos. 283. 80 p.
43. HUSSEIN, Z. 1998. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate: *Microbial Molecular Biology Reviews* 63:968-989.
44. IGARASHI, R. Y; LANCE, C. 2003. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38:351-384.
45. ILLMER, P; SCHINEER, F. 1992. Solubilization of insoluble phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 24:389-395.

46. JACOBSEN, C. S. 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil* 189:139-144.
47. JI HONG LIA, EN TAO WANGB, WEN FENG CHENA, WEN XIN CHENA. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology & Biochemistry* 40:238–246.
48. KAI, M; EFFMERT, U; BERG, G; PIECHULLA, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology* 187:351–360.
49. KHAN, A; JILANI, G; AKHTAR, M; NAQVI, S; RASHEED, M. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agricultural and Biological. Science* 1(1):48-58.
50. KHLEIFAT, KM. 2006. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochemistry* 41:2010–2016.
51. KIM, K; JORDAN, D; KRISHNAN, H. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* 153:273-277.
52. KIM, O.S; CHO, Y.J; LEE, K; YOON, S.H; KIM, M; NA H; PARK, S.C; JEON, Y.S; LEE J.H; YI, H; WON, S; CHUN, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:716–721.
53. KLOEPPER, JW. 1993. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: *Soil Microbial Ecology*, F.B. Jr., Metting, ed., Marcel Dekker inc., N.Y., pp.255-273.
54. KLOEPPER, JW; LEONG, J; TEINTZE, M; SCHROTH, MN. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885–886.
55. KLOEPPER, JW; LIFSHITZ, R; ZABLOTOWICZ, RM. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7(2): 39–43.

56. KOHASHIKAWA, N. 2010. Comportamiento de diferentes bacterias PGPR sobre el crecimiento del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, PE. pp 57-5.
57. LADHA, J; REDDY, P. 2000. The quest for nitrogen fixation in Rice. Int. Rice Res. Inst. pp 93-118.
58. LARKIN, M.A; BLACKSHIELDS, G; BROWN, N.P; CHENNA, R; MCGETTIGAN, P.A; MCWILLIAM, H; VALENTIN, F; WALLACE, I.M; WILM, A; LOPEZ, R; THOMPSON, J.D; GIBSON, T.J; HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
59. LEÓN, J. 1964. The “maca” (*Lepidium meyenii*), a little-known food plant of Peru. *Economic Botany* 18(2):122-127.
60. LIBA, C.M; FERRARA, F.I.S; MANFIO, G.P; FANTINATTI-GARBOGGINI, F; ALBUQUERQUE, R.C; PAVAN, C; RAMOS, P.L; MOREIRA-FILHO, C.A; BARBOSA, H.R. 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology* 101 (5):1076-86.
61. LIN, T. F; HUANG, H; SHEN, F; YOUNG, C. 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CCA174. *Bioresource Technology* 97:957-960.
62. LOGANATHAN, P; NAIR, S. 2004. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp nov. a salt tolerant, nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1185-1190.
63. LUCY, M; REED, E; GLICK, B. R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
64. LUPSKI, J; WEINSTOCK, G. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology* 174(14): 4525–4529.
65. MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J; SÁNCHEZ, M. 2003. Biología de los microorganismos: Brock. Ed. Pearson, 10 ed. Príncipe Hall. p 1011.

66. MERBACH, W; RUPPEL, S; SCHULZE, J. 1998. Dinitrogen Fixation of Microbe-Plant Associations as Affected by Nitrate and Ammonium Supply. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 34: 67-73.
67. MIRZA M., AHMAD W., LATIF F., HAURAT J., BALLY R., NORMAND P. & MALIK K. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47–54.
68. MIRZA, MS; SAMINA, MEHNAZ S; NORMAND, P; PRIGENT-COMBARET, C; MOËNNE-LOCCOZ; BALLY, R; MALIK, C. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils* 43:163–170.
69. MISHRA, A; SINGH, P; CHAUDHRY, V; TRIPATHI, CH; NAUTIYAL, SH. 2011. Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 3-405.
70. MIWA, H; AHMED, I; YOON, J; YOKOTA, A; FUJIWARA, T. 2008. *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:286–289.
71. NAUTIYAL, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:65-270.
72. NOGALES, B; MOORE, E. R. B; LLOBET-BROSSA, E; ROSSELLO-MORA, R; AMMAN, R; TIMMIS, K. N. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1874–1884.
73. OGATA, K; ZÚÑIGA, D. 2010. Desarrollo de nuevas técnicas biológicas en el manejo sostenible del suelo para la producción orgánica de maca. Informe técnico final, Proyecto Procyt N° 309-2009-CONCYTEC – OAJ.
74. PAN, B; BAI, YM; LEIBOVITCH, S; SMITH, D. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11:179–186.

75. PARK, M; KIM, C; YANG, J; LEE, W; KIM, S; SA, T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160:127–133.
76. PATE, J. S; LAYZELL, D.B. 1990. Energetics and biological cost of nitrogen assimilation. In: The biochemistry on plants. N.Y.-USA. Ed. Academic Press. p 1-41, Vol. 16.
77. PERSELLO, F; NUSSAUME, L; ROBAGLIA, C. 2003. Tales from the underground: molecular plant – rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* 26:189-199.
78. PIACENTE, S; CARONR, V; PLAZA, A; ZAMPELLI, A; PIZZA, C. 2002. Investigacion of the tuber constituents of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5239-7.
79. POLY, F; MONROZIER, L. J; BALLY, R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152:95–103.
80. PULAWSKA, J; WILLEMS, A; E. DE MEYER, S; SÜLE, S. 2012. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Systematic and Applied Microbiology* 35:4, 215–220.
81. QUIRÓS, C; ALIAGA, L. 1997. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). In: Hermann M. & editors. Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 21. International Plant Genetic Resources Intitute. Rome, Italy. p 174-197.
82. RAMETTE, A; FRAPOLLE, M; FISCHER-LE SAUX, M; GRUFFAZ, MEYER J; DÉFAGO, G; SUTRA, L; MOENNE-LOCCOZ, Y. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology* 34(3):180–188.
83. RAMOS, E; ZÚÑIGA, D. 2008. Effect of different bioinoculants on the microbial activity in the rhizosphere soil of *Phaseolus lunatus* var. *sieva* under field conditions. *Ecología Aplicada* 7(1,2): 131-139.
84. RAMOS, S; PEREYRA DE LA IGLESIA, T; PROBANZA, A; LUCAS GARCÍA, J; MEGÍAS, M; GUTIERREZ MAÑERO, F.J. 2007. Sc .reening for PGPR to improve

- growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems. *Plant and Soil* 287:59-68.
85. RAYMOND, J; SIEFERT, J; STAPLES, C; BLANKENSHIP, R. 2004. The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21(3):541-554.
86. REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14: 435-443.
87. REINHARDT, E; RAMOS, P; MANFIO, G; BARBOSA, H; PAVAN, C; MOREIRA-FILHO, C. 2008. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:414-422.
88. RICO, M. 2009. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis Blgo. Lima, PE. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 138 p.
89. RIGGS, P; CHELIUS, M; INIGUEZ, L; KAEPPLE, S; TRIPLETT, E. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9):829-836.
90. RODRIGUEZ, H; GONZALEZ, T; GOIRE, I; BASHAN, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91:552-555.
91. RODRIGUEZ, H; GONZALEZ, T; SELMAN, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology* 84: 155-161.
92. RYAN, R; MONCHY, S; CARDINALE, M; TAGHAVI, S; CROSSMAN, L; AVISON, M; BERG, G; VAN DER LELIE, G; MAXWELL, J. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7:514-525.
93. SAHARAN, BS; NEHRA, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Aston Journal Life Sciences and Medicine Research* 2011:LSMR-21.
94. SAITOU, N; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

95. SANCHEZ-YANEZ, J; LOPEZ, I; VILLEGAS, J; MONTANO, N. 2014. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter sp* y *Burkholderia sp* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria* 5(1):17-23.
96. SANDHIYA, GS; SUGITHA, TCK; BALACHANDAR, D; KUMAR, K. 2005. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia sp*. In rice. *Indian Journal of experimental Biology* 43:802-807.
97. SANTILLANA, N; ARELLANO, C; ZÚÑIGA, D. 2005. PGPR capacity of *Rhizobium* on *Lycopersicon esculentum* Miller. (Tomato). *Ecología Aplicada* 4(1,2):47-51.
98. SEURINCK, S; VERSTRAETE, W; SICILIANO, S.D. 2003. Use of 16S-23S rRNA intergenic Spacer Region PCR and Repetitive Extragenic Palindromic PCR Analysis of *Escherichia coli* Isolates to Identify Nonpoint Fecal Sources. *Applied Environmental Microbiology* 69 (8):4942–4950.
99. SIICEX (Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior). 2015. Reporte para el sector biocomercio: Maca. Disponible en:
http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=480.47900.
100. SOMERS, E; VANDERLEYDEN, J; SRINIVASAN, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30:205-240.
101. STAAL, M; LINTEL-HENKERT, S-TE; HARREN, F; STAL, L. 2001. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environmental Microbiology* 3:243-351.
102. STEWART, W. 1991. The important to sustainable agricultura of biodiversity among invertebrates and microorganisms. In: D. L. Hawksworth (ed) *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agricultura*: 3–5. Melksham UK, Redwood Press,
103. TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular biology and Evolution* 30:2725-2729.

104. TELLO, J; HERMANN, M; CALDER, A. 1992. Cultivated plants of *Lepidium meyenii* Walp): Cultivo Alimenticio Potencial para las Zonas Altoandinas. *Boletín de Lima* 81:59-66.
105. UEDA, T; SUGA, Y; YAHIRO, N; MATSUGUCHI, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology* 177:1414–1417.
106. VASATHKUMAR, A; MACMANUS, P. 2004. Indole-3-Acetyl Acid Producing Bacteria are Associated with Cramberry Stem Gall. *Phytopathology* 94:1164-1171.
107. VERMA, S; LADHA, J; TRIPATHI, A. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. *Journal of Biotechnology* 91:127-141.
108. VERSALOVIC, J; KOEUTH, T; LUPSKI, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823-6831.
109. VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Internat. Boil. Prog. Handbook N°15*. Oxford, UK, blackwell.
110. WALKER, T.S; BAIS, H.P; GROTEWOLD, E; VIVANCO, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132:44–51.
111. WEISBURG, W.G; BARNS, S.M; PELLETIER, D.A; LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703.
112. WIDMER, F; SHAFFER, B.T; PORTEOUS, L.A; SEIDLER, R.J. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglasfir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology* 65:374–380.
113. WILLEY, J.M; SHERWOOD, L; WOOLVERTON, C.J; PRESCOTT, L. M. 2008. Prescott, Harley and Klein's microbiology. New York, McGraw-Hill Higher Education. 1088 p.
114. WOESE, CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51:221-7.
115. ZAPATER, J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. *Anales Científicos de la UNALM* 13:45-57.

116. ZEHR, J.P; MELLON, M.T; ZANI, S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3444–3450.
117. ZÚÑIGA, D. 2010. Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Informe técnico final. Perú biodiverso GTZ-Concytec. Lima, Perú.
118. ZÚÑIGA, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: *Rhizobium*, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

ANEXO 1

CUADROS DE RESULTADOS

Cuadro 8: Características fisicoquímicas de los suelos muestreados.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES
ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION



Solicitante : DRA. DORIS ZUÑIGA
Departamento : JUNIN
Distrito : SAN PEDRO DE CAJAS
Referencia : H.R. 22229-017C-09

Provincia : JUNIN
Predio :
Fecha : 31-03-09

Lab	Número de Muestra Campo	pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
								Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
2153	Suelo solo - C1	4.27	0.26	0.00	4.4	60.6	176	64	34	2	Fr.A.	15.04	1.57	0.40	0.37	0.38	1.70	4.42	2.72	18
2154	C1-M1	4.57	0.31	0.00	5.0	63.7	121	54	40	6	Fr.A.	18.32	4.87	0.45	0.29	0.45	1.00	7.06	6.06	37
2155	M2-C1	4.20	0.64	0.00	4.5	60.7	214	70	26	4	Fr.A.	14.40	1.88	0.37	0.39	0.48	1.50	4.62	3.12	22
2156	M3-C1	4.23	0.49	0.00	5.3	61.9	204	70	26	4	Fr.A.	15.20	2.07	0.48	0.37	0.31	1.70	4.93	3.23	21
2157	M4-C1	4.03	0.49	0.00	3.9	77.5	130	66	28	6	Fr.A.	12.80	1.25	0.32	0.29	0.42	1.70	3.98	2.28	18
2158	M5-C1	4.21	0.92	0.00	5.5	75.5	406	66	30	4	Fr.A.	16.00	3.21	0.55	1.64	0.36	0.90	6.65	5.75	36
2159	Suelo C2	5.31	0.50	0.00	6.4	61.6	158	68	26	6	Fr.A.	23.68	13.78	0.98	0.95	0.30	0.30	16.31	16.01	58
2160	C2-M1	6.00	1.40	1.20	11.5	48.4	397	46	44	10	Fr.	29.28	26.47	1.22	1.11	0.49	0.00	29.28	29.28	100
2161	M2-C2	4.69	1.45	0.00	11.7	55.1	418	56	38	6	Fr.A.	25.92	15.12	1.07	1.17	0.50	0.40	18.26	17.86	69
2162	M3-C2	5.86	1.99	0.50	7.8	60.0	537	52	40	8	Fr.	24.00	20.89	1.22	1.21	0.38	0.30	24.00	23.70	99
2163	M4-C2	4.65	0.96	0.00	12.8	76.4	585	50	44	6	Fr.A.	28.48	7.34	1.00	1.15	0.52	1.20	11.21	10.01	35
2164	M5-C2	4.22	1.36	0.00	15.9	80.8	835	50	44	6	Fr.A.	29.92	7.28	1.37	1.70	0.33	1.90	12.58	10.68	36

Solicitante : DRA. DORIS ZUÑIGA
Departamento : JUNIN
Distrito : SAN PEDRO DE CAJAS
Referencia : H.R. 22229-017C-09

Provincia : JUNIN
Predio :
Fecha : 31-03-09

Lab	Número de Muestra Campo	pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
								Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
2165	D1-10 años	5.26	0.48	0.00	8.1	61.3	210	54	42	4	Fr.A.	22.40	12.78	1.48	0.52	0.38	0.40	15.57	15.17	68
2166	D2-4 años	4.59	0.38	0.00	5.5	65.2	161	40	49	11	Fr.	17.28	6.13	0.98	0.48	0.50	1.10	9.19	8.09	47
2167	D3-1año	4.48	0.60	0.00	4.7	65.9	231	52	44	4	Fr.A.	14.72	4.13	0.78	0.46	0.40	1.50	7.27	5.77	39

A = arena ; A.Fr. = arena franca ; Fr.A. = franco arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = franco limoso ; L = limoso ; Fr.Ar.A. = franco arcillo arenoso ; Fr.Ar. = franco arcilloso ; Fr.Ar.L. = franco arcillo limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = arcillo limoso ; Ar. = Arcilloso

Ing. Braulio La Torre Martínez
Jefe del Laboratorio

MC1: Galpón Condorín (rizósfera de maca), C1: Galpón Condorín (Suelo sin cultivo), MC2: Acomachay (rizósfera de maca), C2: Acomachay (suelo sin cultivo). D3: Pampa Cima (1 año de descanso), D2:Pampa Cima (4 años de descanso) y D1:Condorín (10 años de descanso).
(FUENTE: Zúñiga, 2010. Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva).

Cuadro 9: Características morfológicas de las cepas en estudio seleccionadas en función a su crecimiento en MMSN a las 72 horas de cultivo.

Proc.	Cepa	Características morfológicas de la colonia							TIPO GRAM	Viraje del medio
		Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Textura	Tamaño (mm)		
Galpón Condorín (Suelo)	LMTZ064-28	Ovalado	Regular	Acuminada	Incoloro	Brillante	Ligosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-30	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5	Negativa	-
	LMTZ064-75	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
	LMTZ064-94	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
	LMTZ064-119	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++
	LMTZ064-118	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5	Negativa	-
	LMTZ064-122	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
Galpón Condorín (rizósfera)	LMTZ064-84	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-142	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5	Negativa	-
	LMTZ064-124	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-130	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-112	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2	Negativa	+
	LMTZ064-115	Circular	Regular	Convexa	Incolora	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
Acomachay (suelo)	LMTZ064-22	Ovalado	Regular	Acuminada	Incoloro	Brillante	Ligosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-29	Ovalado	Regular	Acuminada	Incoloro	Brillante	Ligosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-41	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2	Negativa	++
	LMTZ064-35	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5	Negativa	+
	LMTZ064-95	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
	LMTZ064-96	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++

Proc. : Procedencia.

Cuadro 9: « Continuación ».

Proc.	Cepa	Características morfológicas de la colonia							TIPO GRAM	Viraje del medio
		Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Textura	Tamaño (mm)		
Acomachay (suelo)	LMTZ064-99	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
	LMTZ064-111	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-134	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	+++
	LMTZ064-140	Circular	Irregular	Convexo	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++
	LMTZ064-138	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-139	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++
Acomachay (rizósfera)	LMTZ064-72	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-85	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-90	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	-
	LMTZ064-91	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1-1.5	Negativa	+
	LMTZ064-92	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1-1.5	Negativa	+
	LMTZ064-93	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	-
	LMTZ064-106	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2	Negativa	++
	LMTZ064-107	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2	Negativa	++
	LMTZ064-116	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5	Negativa	-
	LMTZ064-126	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	++
	LMTZ064-129	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++
	LMTZ064-143	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++
LMTZ064-144	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2	Negativa	+	
LMTZ064-141	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	-	

Cuadro 9: « Continuación ».

Proc.	Cepa	Características morfológicas de la colonia							Tamaño (mm)	TIPO GRAM	Viraje del medio
		Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Textura				
Condorin (1 año)	LMTZ064-47	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1.5-2	Negativa	++	
	LMTZ064-64	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	+	
	LMTZ064-109	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1-1.5	Negativa	+	
Pampa cima (4 años)	LMTZ064-53	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	0.5-1	Negativa	+	
	LMTZ064-59	Circular	Irregular	Plano	Atornazolada	Opaca	Seca	0.5	Negativa	+	
Pampa cima (10 años)	LMTZ064-21	Ovalado	Regular	Acuminada	Incoloro	Brillante	Ligosa	0.5-1	Negativa	-	
	LMTZ064-120	Circular	Irregular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	2-2.5	Negativa	++	
	LMTZ064-66	Circular	Regular	Convexa	Incoloro	Brillante	Acuosa	1	Negativa	-	

Cuadro 10: Caracterización fisiológica de las cepas en función a su crecimiento a diferentes temperaturas con respecto al control a 28°C en medio LMA a los 5 días. De cultivo.

Cepa	Diámetro de crecimiento (cm)									
	6°C		14°C		22°C		28°C		35°C	
LMTZ064-21	0.7	(63.64)	0.8	(72.73)	0.8	(72.73)	1.1	(100)	0.8	(72.73)
LMTZ064-22	0.7	(58.33)	0.8	(66.67)	0.9	(75.00)	1.2	(100)	0.8	(66.67)
LMTZ064-28	0.7	(63.64)	0.8	(72.73)	1	(90.91)	1.1	(100)	0.8	(72.73)
LMTZ064-29	0.7	(70.00)	0.85	(85.00)	0.95	(95.00)	1	(100)	0.8	(80.00)
LMTZ064-30	0.7	(70.00)	0.55	(55.00)	1	(100.00)	1	(100)	0.75	(75.00)
LMTZ064-35	0.45	(64.29)	0.5	(71.43)	0.6	(85.71)	0.7	(100)	0.6	(85.71)
LMTZ064-41	0.5	(71.43)	0.5	(71.43)	0.7	(100.00)	0.7	(100)	0.8	(114.29)
LMTZ064-47	0.55	(45.83)	0.65	(54.17)	1.1	(91.67)	1.2	(100)	1	(83.33)
LMTZ064-53	0	(0.00)	0.5	(71.43)	0.7	(100.00)	0.7	(100)	0.9	(128.57)
LMTZ064-59	0	(0.00)	0	(0.00)	1	(83.33)	1.2	(100)	0	(0.00)
LMTZ064-64	0.5	(58.82)	0.5	(58.82)	0.85	(100.00)	0.85	(100)	1	(117.65)
LMTZ064-66	0.6	(100.00)	0.65	(108.33)	0.6	(100.00)	0.6	(100)	0	(0.00)
LMTZ064-72	0.55	(78.57)	0.6	(85.71)	0.7	(100.00)	0.7	(100)	0.6	(85.71)
LMTZ064-75	0.5	(66.67)	0.6	(80.00)	0.7	(93.33)	0.75	(100)	0	(0.00)
LMTZ064-84	0.6	(54.55)	0.6	(54.55)	1.1	(100.00)	1.1	(100)	0.9	(81.82)
LMTZ064-85	0.55	(50.00)	0.6	(54.55)	1	(90.91)	1.1	(100)	0.95	(86.36)
LMTZ064-90	0.55	(73.33)	0.55	(73.33)	0.7	(93.33)	0.75	(100)	0.8	(106.67)
LMTZ064-91	0.6	(63.16)	0.7	(73.68)	0.9	(94.74)	0.95	(100)	0.9	(94.74)
LMTZ064-92	0.4	(57.14)	0.6	(85.71)	0.8	(114.29)	0.7	(100)	0.7	(100.00)
LMTZ064-93	0.5	(50.00)	0.6	(60.00)	0.95	(95.00)	1	(100)	0.8	(80.00)
LMTZ064-94	0.45	(56.25)	0.65	(81.25)	0.7	(87.50)	0.8	(100)	0.8	(100.00)
LMTZ064-95	0.5	(66.67)	0.65	(86.67)	0.75	(100.00)	0.75	(100)	0.7	(93.33)
LMTZ064-96	0.55	(50.00)	0.8	(72.73)	1	(90.91)	1.1	(100)	0.9	(81.82)
LMTZ064-99	0.55	(61.11)	0.65	(72.22)	0.9	(100.00)	0.9	(100)	0.8	(88.89)
LMTZ064-106	0.55	(61.11)	0.7	(77.78)	1	(111.11)	0.9	(100)	0.9	(100.00)
LMTZ064-107	0.6	(60.00)	0.7	(70.00)	0.9	(90.00)	1	(100)	0.9	(90.00)
LMTZ064-109	0.6	(60.00)	0.7	(70.00)	1.1	(110.00)	1	(100)	1	(100.00)
LMTZ064-111	0.6	(60.00)	0.7	(70.00)	1.1	(110.00)	1	(100)	0.9	(90.00)
LMTZ064-112	0.6	(60.00)	0.7	(70.00)	0.9	(90.00)	1	(100)	0.9	(90.00)
LMTZ064-115	0.5	(76.92)	0.55	(84.62)	0.5	(76.92)	0.65	(100)	0.5	(76.92)
LMTZ064-116	0.45	(64.29)	0.55	(78.57)	0.8	(114.29)	0.7	(100)	0.75	(107.14)
LMTZ064-118	0.5	(71.43)	0.6	(85.71)	0.6	(85.71)	0.7	(100)	0.9	(128.57)
LMTZ064-119	0.6	(60.00)	0.7	(70.00)	0.9	(90.00)	1	(100)	0.8	(80.00)

Números entre paréntesis indican el porcentaje de crecimiento con respecto al control a 28°C.

Cuadro 10: « Continuación ».

Cepa	Diámetro de crecimiento (cm)									
	5°C		14°C		22°C		28°C		35°C	
LMTZ064-120	0.65	(65.00)	0.65	(65.00)	1	(100.00)	1	(100)	0.9	(90.00)
LMTZ064-122	0.6	(50.00)	0.7	(58.33)	0.9	(75.00)	1.2	(100)	0.85	(70.83)
LMTZ064-124	0.55	(55.00)	0.65	(65.00)	0.65	(65.00)	1	(100)	0.7	(70.00)
LMTZ064-126	0.5	(45.45)	0.7	(63.64)	1	(90.91)	1.1	(100)	0.8	(72.73)
LMTZ064-129	0.5	(50.00)	0.75	(75.00)	1	(100.00)	1	(100)	1.1	(110.00)
LMTZ064-130	0.55	(61.11)	0.65	(72.22)	0.6	(66.67)	0.9	(100)	0.6	(66.67)
LMTZ064-134	0.55	(55.00)	0.7	(70.00)	0.9	(90.00)	1	(100)	0.8	(80.00)
LMTZ064-138	0.6	(50.00)	0.65	(54.17)	1.15	(95.83)	1.2	(100)	1	(83.33)
LMTZ064-139	0.5	(52.63)	0.8	(84.21)	0.95	(100.00)	0.95	(100)	0.9	(94.74)
LMTZ064-140	0.55	(55.00)	0.7	(70.00)	0.9	(90.00)	1	(100)	0.9	(90.00)
LMTZ064-141	0.6	(80.00)	0.6	(80.00)	0.5	(66.67)	0.75	(100)	0.7	(93.33)
LMTZ064-142	0.45	(64.29)	0.6	(85.71)	0.8	(114.29)	0.7	(100)	0.6	(85.71)
LMTZ064-143	0.55	(55.00)	0.8	(80.00)	1	(100.00)	1	(100)	1	(100.00)
LMTZ064-144	0.5	(50.00)	0.7	(70.00)	1.1	(110.00)	1	(100)	1	(100.00)

Números entre paréntesis indican el porcentaje de crecimiento con respecto al control a 28°C.

Cuadro 11: Caracterización fisiológica de las cepas en función a su crecimiento a diferentes niveles de pH con respecto al control a pH 7 en medio LMA a los 5 días de cultivo.

Cepas	Diámetro de crecimiento (cm)															
	3.5		4		4.5		5		5.5		7		8		9	
LMTZ064-21	0.55	(64.71)	0.65	(76.47)	0.75	(88.24)	0.75	(88.24)	0.75	(88.24)	0.85	(100.00)	0.8	(94.12)	1	(117.65)
LMTZ064-22	0.6	(70.59)	0.7	(82.35)	0.8	(94.12)	0.75	(88.24)	0.75	(88.24)	0.85	(100.00)	1	(117.65)	1	(117.65)
LMTZ064-28	0.65	(76.47)	0.72	(84.71)	0.8	(94.12)	0.75	(88.24)	0.75	(88.24)	0.85	(100.00)	0.8	(94.12)	0.95	(111.76)
LMTZ064-29	0.65	(81.25)	0.75	(93.75)	0.85	(106.25)	0.85	(106.25)	0.85	(106.25)	0.8	(100.00)	0.85	(106.25)	0.95	(118.75)
LMTZ064-30	0.65	(86.67)	0.65	(86.67)	0.75	(100.00)	0.9	(120.00)	0.85	(113.33)	0.75	(100.00)	0.9	(120.00)	0.85	(113.33)
LMTZ064-35	0.55	(91.67)	0.6	(100.00)	0.7	(116.67)	0.65	(108.33)	0.65	(108.33)	0.6	(100.00)	0.6	(100.00)	0.65	(100.00)
LMTZ064-41	0.6	(63.16)	0.7	(73.68)	0.8	(84.21)	0.85	(89.47)	0.75	(78.95)	0.95	(100.00)	1.05	(110.53)	1.05	(110.53)
LMTZ064-47	0.8	(72.73)	0.95	(86.36)	1.1	(100.00)	1	(90.91)	0.95	(86.36)	1.1	(100.00)	1	(90.91)	1.15	(100.00)
LMTZ064-53	0.6	(80.00)	0.7	(93.33)	0.7	(93.33)	0.7	(93.33)	0.65	(86.67)	0.75	(100.00)	0.75	(100.00)	0.75	(100.00)
LMTZ064-59	0.8	(69.57)	0.9	(78.26)	0.95	(82.61)	1.15	(100.00)	0.95	(82.61)	1.15	(100.00)	1.2	(104.35)	1.2	(100.00)
LMTZ064-64	0.75	(88.24)	0.8	(94.12)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.75	888.24)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.8	(100.00)
LMTZ064-66	0.5	(76.92)	0.6	(92.31)	0.55	884.62)	0.65	(100.00)	0.6	(92.31)	0.65	(100.00)	0.55	(84.62)	0.6	(100.00)
LMTZ064-72	0.7	(77.78)	0.9	(100.00)	0.85	(94.44)	0.9	(100.00)	0.9	(100.00)	0.9	(100.00)	1.1	(122.22)	1.1	(122.22)
LMTZ064-75	0.6	(85.71)	0.6	(85.71)	0.65	(92.86)	0.65	(92.86)	0.65	(92.86)	0.7	(100.00)	0.75	(107.14)	0.65	(100.00)
LMTZ064-84	0.8	(72.73)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)
LMTZ064-85	0.75	(75.00)	0.9	(90.00)	1	(100.00)	0.85	(85.00)	0.85	(85.00)	1	(100.00)	1.05	(105.00)	1.1	(110.00)
LMTZ064-90	0.75	(62.50)	0.75	(62.50)	0.8	(66.67)	0.8	(66.67)	0.75	(62.50)	1.2	(100.00)	0.9	(75.00)	0.95	(79.17)
LMTZ064-91	0.7	(63.64)	0.75	(68.18)	0.9	(81.82)	0.85	(77.27)	0.8	(72.73)	1.1	(100.00)	0.9	(81.82)	1	(90.91)
LMTZ064-92	0.8	(66.67)	0.85	(70.83)	0.95	(79.17)	0.95	(79.17)	0.95	(79.17)	1.2	(100.00)	0.95	(79.17)	1.1	(91.67)

Números entre paréntesis indican el porcentaje de crecimiento con respecto al control a pH 7

Cuadro 11: « Continuación ».

Cepas	Diámetro de crecimiento (cm)															
	3.5		4		4.5		5		5.5		7		8		9	
LMTZ064-93	0.85	(100.00)	0.65	(76.47)	0.95	(111.76)	0.85	(100.00)	0.75	(88.24)	0.85	(100.00)	0.95	111.76	0.85	(100.00)
LMTZ064-94	0.8	(94.12)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.9	(100.00)
LMTZ064-95	0.7	(100.00)	0.6	(85.71)	0.6	(85.71)	0.9	(128.57)	0.9	(128.57)	0.7	(100.00)	0.8	(114.29)	0.85	(121.43)
LMTZ064-96	0.65	(56.52)	0.75	(65.22)	1	(86.96)	1	(86.96)	0.95	(82.61)	1.15	(100.00)	1.1	(95.65)	1.1	(100.00)
LMTZ064-99	1	(117.65)	0.95	(111.76)	0.9	(105.88)	0.9	(105.88)	0.75	(88.24)	0.85	(100.00)	0.85	(100.00)	0.9	(100.00)
LMTZ064-106	0.8	(72.73)	0.85	(77.27)	0.9	(81.82)	1.05	(95.45)	0.9	(81.82)	1.1	(100.00)	0.95	(86.36)	1	(90.91)
LMTZ064-107	0.8	(72.73)	0.8	(72.73)	1	(90.91)	1.05	(95.45)	0.95	(86.36)	1.1	(100.00)	1.05	(95.45)	1.05	(100.00)
LMTZ064-109	0.8	(72.73)	0.85	(77.27)	1	(90.91)	1.05	(95.45)	0.9	(81.82)	1.1	(100.00)	0.9	(81.82)	0.95	(86.36)
LMTZ064-111	0.75	(68.18)	0.75	(68.18)	0.95	(86.36)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.05	(95.45)	1.2	(109.09)
LMTZ064-112	0.7	(60.87)	0.8	(69.57)	0.9	(78.26)	0.9	(78.26)	0.9	(78.26)	1.15	(100.00)	1.1	(95.65)	1.2	(100.00)
LMTZ064-115	0.5	(83.33)	0.6	(100.00)	0.5	(83.33)	0.65	(108.33)	0.65	(108.33)	0.6	(100.00)	0.6	(100.00)	0.55	(100.00)
LMTZ064-116	0.95	(135.71)	0.9	(128.57)	0.85	(121.43)	1	(142.86)	0.85	(121.43)	0.7	(100.00)	1	(142.86)	0.75	(100.00)
LMTZ064-118	0.95	(126.67)	0.8	(106.67)	0.75	(100.00)	0.9	(120.00)	0.85	(113.33)	0.75	(100.00)	0.8	(106.67)	0.8	(100.00)
LMTZ064-119	0.75	(68.18)	0.75	(68.18)	0.95	(86.36)	0.9	(81.82)	0.95	(86.36)	1.1	(100.00)	1	(90.91)	1	(90.91)
LMTZ064-120	0.75	(68.18)	0.85	(77.27)	0.95	(86.36)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.05	(95.45)	1.05	(100.00)
LMTZ064-122	0.8	(72.73)	1	(90.91)	1	(90.91)	1	(90.91)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)
LMTZ064-124	0.8	(72.73)	1	(90.91)	1	(90.91)	1	(90.91)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)
LMTZ064-126	0.8	(72.73)	0.95	(86.36)	1	(90.91)	1	(90.91)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)	1.15	(104.55)	1.1	(100.00)
LMTZ064-129	0.75	(68.18)	0.75	(68.18)	0.95	(86.36)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.05	(95.45)	1.1	(100.00)

Números entre paréntesis indican el porcentaje de crecimiento con respecto al control a pH 7

Cuadro 11: « Continuación ».

Cepas	Diámetro de crecimiento (cm)															
	3.5		4		4.5		5		5.5		7		8		9	
LMTZ064-130	0.7	(63.64)	0.85	(77.27)	1	(90.91)	1	(90.91)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)
LMTZ064-134	0.6	(60.00)	0.75	(75.00)	0.9	(90.00)	0.9	(90.00)	0.9	(90.00)	1	(100.00)	1	(100.00)	1	(100.00)
LMTZ064-138	0.9	(94.74)	0.9	(94.74)	0.95	(100.00)	1	(105.26)	0.95	(100.00)	0.95	(100.00)	1.1	(115.79)	1.05	(110.53)
LMTZ064-139	0.7	(63.64)	0.85	(77.27)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	0.9	(81.82)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)
LMTZ064-140	0.7	(63.64)	0.85	(77.27)	0.9	(81.82)	0.9	(81.82)	1	(90.91)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1.05	(100.00)
LMTZ064-141	0.45	(100.00)	0.45	(100.00)	0.45	(100.00)	0.5	(111.11)	0.45	(100.00)	0.45	(100.00)	0.4	(88.89)	0.4	(88.89)
LMTZ064-142	0.95	(105.56)	0.85	(94.44)	0.7	(77.78)	0.9	(100.00)	0.85	(94.44)	0.9	(100.00)	0.9	(100.00)	0.9	(100.00)
LMTZ064-143	0.6	(54.55)	0.8	(72.73)	0.8	(72.73)	0.85	(77.27)	0.85	(77.27)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1	(90.91)
LMTZ064-144	0.65	(59.09)	0.85	(77.27)	0.85	(77.27)	0.85	(77.27)	0.85	(77.27)	1.1	(100.00)	1.1	(100.00)	1	(90.91)

Números entre paréntesis indica el porcentaje de crecimiento con respecto al control a pH 7

Cuadro 12: Caracterización bioquímica de las cepas en estudios.

*Cepa	Catalasa	Citocromo Oxidasa	Metabolismo †	*Cepa	Catalasa	Citocromo Oxidasa	Metabolismo †
LMTZ064-21	+	-	F	LMTZ064-107	+	-	F
LMTZ064-22	+	-	F	LMTZ064-109	+	-	F
LMTZ064-28	+	-	F	LMTZ064-111	+	-	F
LMTZ064-29	+	-	F	LMTZ064-112	+	-	F
LMTZ064-30	+	-	F	LMTZ064-115	+	-	F
LMTZ064-35	+	-	F	LMTZ064-116	+	-	F
LMTZ064-41	+	+	O	LMTZ064-118	+	-	F
LMTZ064-47	+	+	O	LMTZ064-119	+	-	F
LMTZ064-53	+	+	O	LMTZ064-120	+	-	F
LMTZ064-64	+	+	O	LMTZ064-122	+	-	F
LMTZ064-59	+	-	F	LMTZ064-124	+	-	F
LMTZ064-66	+	-	F	LMTZ064-126	+	-	F
LMTZ064-72	+	-	F	LMTZ064-129	+	-	F
LMTZ064-75	+	-	F	LMTZ064-130	+	-	F
LMTZ064-84	+	-	F	LMTZ064-134	+	-	F
LMTZ064-85	+	-	F	LMTZ064-138	+	-	F
LMTZ064-90	+	+	O	LMTZ064-139	+	-	F
LMTZ064-91	+	-	F	LMTZ064-140	+	-	F
LMTZ064-92	+	-	F	LMTZ064-141	+	-	F
LMTZ064-93	+	-	F	LMTZ064-142	+	-	F
LMTZ064-94	+	-	F	LMTZ064-143	+	-	F
LMTZ064-95	+	-	F	LMTZ064-144	+	-	F
LMTZ064-96	+	-	F	Ps155 (Control O+)	+	+	O
LMTZ064-99	+	+	O	<i>E. coli</i> (Control F+)	+	-	F
LMTZ064-106	+	-	F				

*Cepas gram negativas.

F: Metabolismo fermentativo; O: metabolismo oxidativo

Cepa Ps155: *Pseudomonas sp.*, control O+; *E. coli*: Control F+.

Cuadro 13: Solubilización de fosfato bicálcico por parte de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de maca en medio NBRIP.

	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)												
LMTZ064-21	0.63	0.23	36	0.73	0.78	107	0.75	0.75	100	0.75	0.75	100	0.75	0.75	100
LMTZ064-22	0.60	0.10	17	0.75	0.45	60	0.75	0.50	67	0.75	0.50	67	0.75	0.50	67
LMTZ064-28	0.60	0.00	0	0.75	0.15	20	0.75	0.25	33	0.75	0.25	33	0.75	0.25	33
LMTZ064-29	0.63	0.23	36	0.68	0.63	93	0.70	0.60	86	0.70	0.70	100	0.73	0.68	93
LMTZ064-30	0.50	0.60	120	0.53	1.18	224	0.53	1.28	243	0.53	1.28	243	0.53	1.28	243
LMTZ064-35	0.40	0.80	200	0.45	1.05	233	0.48	1.03	216	0.48	1.08	226	0.48	1.13	237
LMTZ064-41	0.45	0.85	189	0.45	1.25	278	0.50	1.20	240	0.50	1.20	240	0.50	1.20	240
LMTZ064-47	0.38	1.08	287	0.43	1.28	300	0.48	1.33	279	0.48	1.33	279	0.48	1.33	279
LMTZ064-53	0.43	0.58	135	0.55	0.75	136	0.55	1.15	209	0.55	1.18	214	0.55	1.25	227
LMTZ064-59	0.50	0.00	0	0.50	0.00	0	0.60	0.00	0	0.70	0.00	0	1.00	0.00	0
LMTZ064-64	0.38	0.00	0	0.45	0.35	78	0.45	1.00	222	0.48	1.20	253	0.48	1.33	279
LMTZ064-66	0.35	0.35	100	0.30	0.80	267	0.38	0.83	220	0.40	0.88	219	0.40	1.00	250
LMTZ064-72	0.43	0.00	0	0.43	0.00	0	0.60	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-75	0.40	0.08	19	0.43	0.10	24	0.45	0.10	22	0.45	0.10	22	0.45	0.10	22
LMTZ064-84	0.35	0.65	186	0.35	1.00	286	0.35	1.15	329	0.40	1.40	350	0.40	1.40	350
LMTZ064-85	0.35	0.65	186	0.35	1.05	300	0.35	1.15	329	0.40	1.40	350	0.40	1.40	350
LMTZ064-90	0.43	0.93	218	0.45	1.25	278	0.48	1.22	254	0.50	1.20	240	0.50	1.15	230
LMTZ064-91	0.38	1.28	340	0.43	1.48	347	0.43	1.48	347	0.43	1.48	347	0.43	1.48	347
LMTZ064-92	0.45	1.05	233	0.50	1.10	220	0.55	1.15	209	0.50	1.20	240	0.50	1.30	260

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

Cuadro 13: « Continuación ».

CEPA	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)												
LMTZ064-93	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-94	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-95	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-96	0.45	0.85	189	0.48	0.83	174	0.48	1.08	226	0.50	1.10	220	0.50	1.10	220
LMTZ064-99	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-106	0.35	0.75	214	0.35	0.95	271	0.40	1.10	275	0.45	1.05	233	0.45	1.15	256
LMTZ064-107	0.38	0.63	167	0.38	1.03	273	0.40	1.10	275	0.45	1.05	233	0.45	1.15	256
LMTZ064-109	0.38	0.73	193	0.43	0.88	206	0.45	1.05	233	0.45	1.05	233	0.45	1.15	256
LMTZ064-111	0.38	0.88	233	0.38	1.23	327	0.40	1.20	300	0.45	1.15	256	0.45	1.25	278
LMTZ064-112	0.35	0.65	186	0.35	0.95	271	0.40	1.00	250	0.40	1.00	250	0.45	0.95	211
LMTZ064-115	0.40	0.75	188	0.40	1.00	250	0.43	1.13	265	0.43	1.13	265	0.45	1.15	256
LMTZ064-116	0.75	0.00	0	0.75	0.00	0	0.78	0.00	0	0.83	0.00	0	0.88	0.00	0
LMTZ064-118	0.60	0.00	0	0.63	0.00	0	0.68	0.00	0	0.70	0.00	0	0.70	0.00	0
LMTZ064-119	0.38	0.88	233	0.38	1.13	300	0.40	1.35	338	0.50	1.50	300	0.50	1.75	350
LMTZ064-120	0.38	0.73	193	0.38	1.03	273	0.38	1.13	300	0.40	1.20	300	0.40	1.20	300
LMTZ064-122	0.38	0.78	207	0.38	1.03	273	0.40	1.20	300	0.43	1.18	276	0.43	1.18	276
LMTZ064-124	0.50	0.00	0	0.50	0.50	100	0.50	0.60	120	0.50	0.70	140	0.50	0.90	180
LMTZ064-126	0.38	0.53	140	0.38	0.73	193	0.38	0.73	193	0.40	0.80	200	0.43	0.98	229
LMTZ064-129	0.35	0.55	157	0.38	0.73	193	0.38	0.73	193	0.43	0.83	194	0.43	0.98	229

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

Cuadro 13: « Continuación ».

CEPA	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)												
LMTZ064-130	0.40	0.90	225	0.45	0.95	211	0.45	1.05	233	0.40	1.20	300	0.40	1.40	350
LMTZ064-134	0.35	0.75	214	0.40	0.90	225	0.40	0.90	225	0.45	1.10	244	0.45	1.15	256
LMTZ064-138	0.80	0.00	0	1.00	0.00	0	1.00	0.00	0	1.00	0.00	0	1.00	0.00	0
LMTZ064-139	0.40	0.85	213	0.38	1.18	313	0.40	1.30	325	0.43	1.40	329	0.45	1.35	300
LMTZ064-140	0.40	0.85	213	0.38	1.13	300	0.40	1.20	300	0.40	1.20	300	0.43	1.28	300
LMTZ064-141	0.30	0.00	0	0.40	0.50	125	0.45	0.65	144	0.45	1.10	244	0.65	1.10	169
LMTZ064-142	0.50	0.00	0	0.55	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0
LMTZ064-143	0.40	0.85	213	0.40	1.00	250	0.43	1.08	253	0.45	1.10	244	0.45	1.25	278
LMTZ064-144	0.45	0.45	100	0.45	0.90	200	0.50	0.90	180	0.50	0.90	180	0.50	1.10	220
Azo16M2	0.40	0.70	175	0.40	0.90	225	0.43	0.98	229	0.43	1.03	241	0.48	1.13	237
Ps155	0.65	0.05	8	0.70	0.30	43	0.70	0.10	14	0.73	0.18	24	0.75	0.25	33

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

Cuadro 14: Solubilización de fosfato tricálcico por parte de las cepas en estudio obtenidas de suelos de cultivo de maca en medio NBRIP.

CEPA	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)												
LMTZ064-21	0.68	0.13	19	0.68	0.13	19	0.68	0.13	19	0.85	0.15	18	0.85	0.15	18
LMTZ064-22	0.63	0.28	44	0.63	0.38	60	0.63	0.58	92	0.65	0.55	85	0.65	0.65	100
LMTZ064-28	0.65	0.25	38	0.65	0.35	54	0.75	0.25	33	0.75	0.25	33	0.78	0.43	55
LMTZ064-29	0.55	0.35	64	0.55	0.65	118	0.73	0.68	93	0.65	0.75	115	0.85	0.65	76
LMTZ064-30	0.45	0.20	44	0.50	0.10	20	0.48	1.13	237	0.50	1.10	220	0.58	1.03	178
LMTZ064-35	0.38	0.13	33	0.40	1.10	275	0.40	1.00	250	0.43	0.98	229	0.45	1.15	256
LMTZ064-41	0.38	0.23	60	0.48	0.33	68	0.45	1.05	233	0.43	1.18	276	0.48	1.13	237
LMTZ064-47	0.35	0.15	43	0.38	0.43	113	0.43	0.98	229	0.40	1.00	250	0.45	0.95	211
LMTZ064-53	0.40	0.10	25	0.40	0.15	38	0.40	0.15	38	0.43	0.18	41	0.43	0.18	41
LMTZ064-64	1.00	0.00	0	1.10	0.00	0	1.10	0.00	0	1.20	0.00	0	1.20	0.00	0
LMTZ064-59	0.40	0.10	25	0.40	0.20	50	0.40	0.20	50	0.43	0.18	41	0.43	0.18	41
LMTZ064-66	0.43	0.13	29	0.38	0.28	73	0.40	0.25	63	0.38	0.33	87	0.38	0.33	87
LMTZ064-72	0.55	0.00	0	0.60	0.00	0	0.73	0.00	0	0.78	0.00	0	0.83	0.00	0
LMTZ064-75	0.43	0.08	18	0.53	0.08	14	0.53	0.08	14	0.55	0.10	18	0.55	0.10	18
LMTZ064-84	0.35	0.38	107	0.35	1.40	400	0.38	1.43	380	0.40	1.60	400	0.40	1.60	400
LMTZ064-85	0.33	0.40	123	0.35	1.45	414	0.40	1.43	356	0.40	1.60	400	0.40	1.60	400
LMTZ064-90	0.40	0.60	150	0.40	1.10	275	0.40	1.20	300	0.45	1.30	289	0.50	0.80	160
LMTZ064-91	0.35	0.65	186	0.40	1.10	275	0.40	1.40	350	0.40	1.40	350	0.40	1.40	350
LMTZ064-92	0.40	0.60	150	0.40	1.10	275	0.35	1.35	386	0.40	1.50	375	0.40	0.90	225

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

Cuadro 14: « Continuación ».

CEPA	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)												
LMTZ064-93	0.73	0.00	0	0.85	0.00	0	0.88	0.00	0	1.00	0.00	0	1.10	0.00	0
LMTZ064-94	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0
LMTZ064-95	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.65	0.00	0	0.83	0.00	0	0.88	0.00	0
LMTZ064-96	0.40	0.40	100	0.40	0.30	75	0.35	0.85	243	0.40	1.20	300	0.40	0.60	150
LMTZ064-99	0.45	0.00	0	0.60	0.00	0	0.65	0.00	0	0.80	0.00	0	0.80	0.00	0
LMTZ064-106	0.35	0.75	214	0.40	0.90	225	0.50	1.00	200	0.50	1.00	200	0.50	1.00	200
LMTZ064-107	0.35	0.55	157	0.40	0.80	200	0.40	0.85	213	0.40	0.90	225	0.40	0.93	231
LMTZ064-109	0.30	0.90	300	0.40	1.00	250	0.40	1.00	250	0.40	1.20	300	0.40	1.20	300
LMTZ064-111	0.35	0.65	186	0.35	1.15	329	0.50	1.30	260	0.50	1.10	220	0.50	1.10	220
LMTZ064-112	0.35	0.75	214	0.35	1.05	300	0.40	1.10	275	0.50	1.00	200	0.50	1.00	200
LMTZ064-115	0.40	0.40	100	0.48	0.53	111	0.50	0.60	120	0.50	0.65	130	0.50	0.70	140
LMTZ064-116	0.60	0.00	0	0.70	0.00	0	0.75	0.00	0	0.85	0.00	0	1.20	0.00	0
LMTZ064-118	0.60	0.00	0	0.70	0.00	0	0.73	0.00	0	0.90	0.00	0	1.00	0.00	0
LMTZ064-119	0.35	0.65	186	0.35	1.35	386	0.38	1.33	353	0.38	1.53	407	0.38	1.53	407
LMTZ064-120	0.35	0.55	157	0.35	0.95	271	0.40	1.20	300	0.45	1.15	256	0.45	1.15	256
LMTZ064-122	0.35	0.75	214	0.35	1.15	329	0.40	1.30	325	0.38	1.33	353	0.40	1.30	325
LMTZ064-124	0.38	0.43	113	0.35	0.65	186	0.40	0.85	213	0.43	1.03	241	0.43	1.03	241
LMTZ064-126	0.38	0.48	127	0.35	0.85	243	0.40	1.00	250	0.43	0.98	229	0.43	0.98	229
LMTZ064-129	0.33	0.28	85	0.35	0.65	186	0.40	0.70	175	0.43	0.98	229	0.43	0.98	229

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

Cuadro 14: « Continuación ».

CEPA	Día 3			Día 6			Día 9			Día 12			Día 15		
	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)	TC (cm)	HS (cm)	ES (%)									
LMTZ064-130	0.35	0.75	214	0.40	1.10	275	0.40	1.10	275	0.40	1.10	275	0.43	1.28	300
LMTZ064-134	0.30	0.60	200	0.50	0.75	150	0.40	0.80	200	0.45	1.05	233	0.50	1.00	200
LMTZ064-138	0.70	0.00	0	0.80	0.00	0	0.80	0.00	0	0.80	0.00	0	0.90	0.00	0
LMTZ064-139	0.35	0.65	186	0.33	1.08	331	0.35	1.15	329	0.38	1.13	300	0.40	1.20	300
LMTZ064-140	0.35	0.85	243	0.33	1.18	362	0.35	1.25	357	0.38	1.23	327	0.40	1.30	325
LMTZ064-141	0.40	0.00	0	0.40	0.10	25	0.40	0.10	25	0.40	0.10	25	0.40	0.10	25
LMTZ064-142	0.45	0.03	6	0.48	0.00	0	0.48	0.00	0	0.50	0.00	0	0.50	0.00	0
LMTZ064-143	0.35	0.65	186	0.33	0.88	269	0.33	0.88	269	0.35	0.95	271	0.35	1.05	300
LMTZ064-144	0.35	0.45	129	0.45	0.35	78	0.50	0.40	80	0.53	0.38	71	0.40	0.80	200
Azo16M2	0.40	0.90	225	0.38	1.23	327	0.38	1.23	327	0.40	1.20	300	0.50	1.00	200
Ps155	0.73	0.18	24	0.78	0.43	55	0.80	0.50	63	0.85	0.45	53	1.00	0.40	40

TC: Tamaño de colonia.

HS: Halo de solubilización

ES: Eficiencia de solubilización.

ANEXO 2

ESTADÍSTICAS

Análisis de Conglomerados

Datos/VARIABLES:

Morfotipo
 AIA
 GROWN 6°C
 GROWN 14°C
 GROWN 22°C
 GROWN 28°C
 GROWN 35°C
 GROWN pH 3.5
 GROWN pH 4
 GROWN pH 4.5
 GROWN pH 5
 GROWN pH 5.5
 GROWN pH 7
 GROWN pH 8
 GROWN pH 9
 BiCa DIA 3
 BiCa DIA 6
 BiCa DIA 9
 BiCa DIA 12
 BiCa DIA 15
 TriCa DIA 3
 TriCa DIA 6
 TriCa DIA 9
 TriCa DIA 12
 TriCa DIA 15

Número de casos completos: 47

Método de Conglomeración: Vecino Más Cercano (Vínculo Simple)

Métrica de Distancia: Euclídeana Cuadrada

Conglomeración: observaciones

Estandarizar: sí

Resumen de Conglomeración

<i>Conglomerado</i>	<i>Miembros</i>	<i>Porcentaje</i>
1	47	100.00

Centroides

<i>Conglomerado</i>	<i>BiCa DIA 3</i>	<i>BiCa DIA 6</i>	<i>BiCa DIA 9</i>	<i>BiCa DIA 12</i>	<i>BiCa DIA 15</i>	<i>TriCa DIA 3</i>
1	0.485532	0.707021	0.795745	0.843404	0.86	0.352766

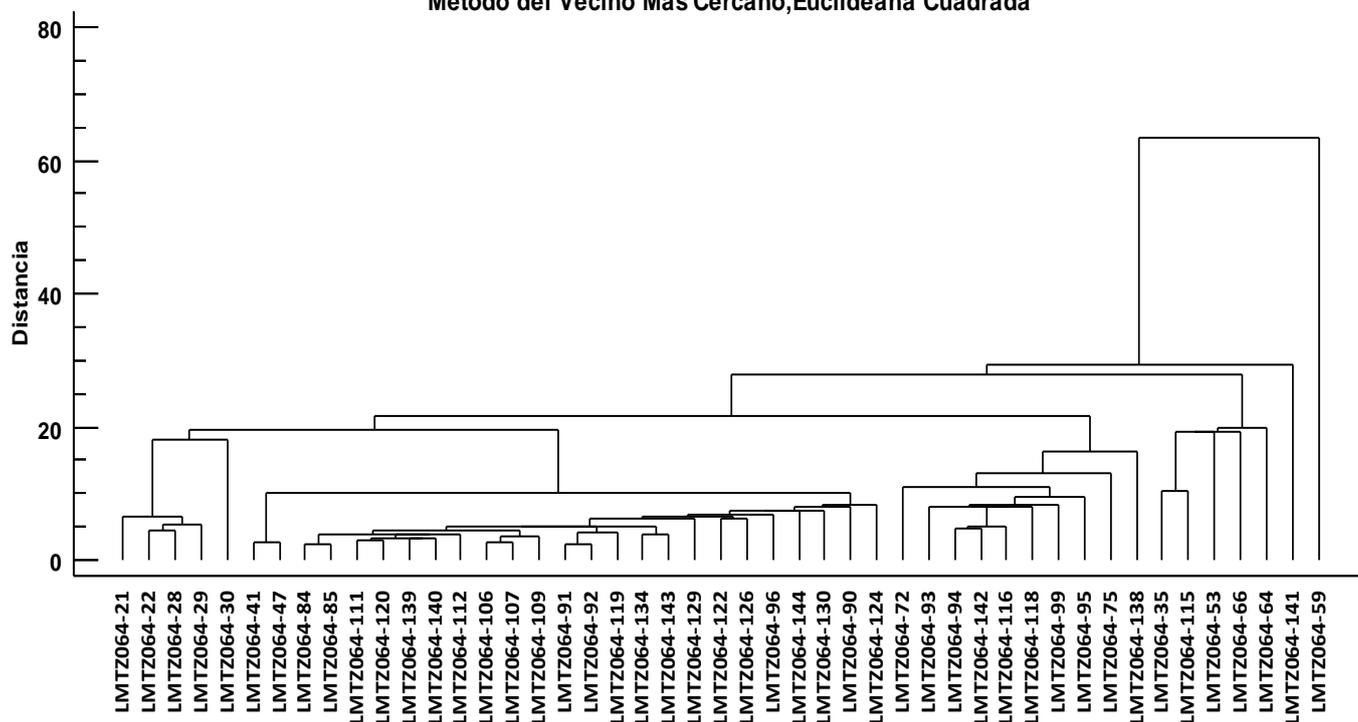
<i>Conglomerado</i>	<i>TriCa DIA 6</i>	<i>TriCa DIA 9</i>	<i>TriCa DIA 12</i>	<i>TriCa DIA 15</i>	<i>AIA</i>	<i>GROWN 6°C</i>
1	0.61	0.77234	0.841702	0.87766	33.6753	0.557447

<i>Conglomerado</i>	<i>GROWN 14°C</i>	<i>GROWN 22°C</i>	<i>GROWN 28°C</i>	<i>GROWN 35°C</i>	<i>GROWN pH 3.5</i>
1	0.646809	0.874468	0.951064	0.8	0.728723

<i>Conglomerado</i>	<i>GROWN pH 4</i>	<i>GROWN pH 4.5</i>	<i>GROWN pH 5</i>	<i>GROWN pH 5.5</i>	<i>GROWN pH 7</i>
1	0.798298	0.868085	0.888298	0.873404	0.961702

<i>Conglomerado</i>	<i>GROWN pH 8</i>	<i>GROWN pH 9</i>	<i>Morfotipo</i>
1	0.954255	0.969149	2.74468

Dendrograma
Método del Vecino Más Cercano, Euclídeana Cuadrada



Germinación de semillas (4 días)

Tabla ANOVA para % GERMINACION A LOS 4 DIAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1338.0	7	191.143	2.00	0.1181
Intra grupos	1525.33	16	95.3333		
Total (Corr.)	2863.33	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para % GERMINACION A LOS 4 DIAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AZO16M2	3	49.3333	X
LMTZ065-90	3	58.6667	XX
Control	3	65.3333	XX
LMTZ064-109	3	65.3333	XX
LMTZ064-119	3	66.6667	X
LMTZ064-66	3	70.6667	X
LMTZ064-22	3	70.6667	X
LMTZ064-41	3	74.6667	X

Germinación de semillas (5 días)

Tabla ANOVA para % GERMINACION A LOS 5 DIAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1060.67	7	151.524	4.94	0.0039
Intra grupos	490.667	16	30.6667		
Total (Corr.)	1551.33	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para % GERMINACION A LOS 5 DIAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	68.0	X
LMTZ065-90	3	73.3333	X
AZO16M2	3	73.3333	X
LMTZ064-119	3	84.0	X
LMTZ064-109	3	84.0	X
LMTZ064-22	3	84.0	X
LMTZ064-41	3	85.3333	X
LMTZ064-66	3	86.6667	X

Germinación de semillas (6 días)

Tabla ANOVA para % GERMINACION A LOS 6 DIAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	575.333	7	82.1905	3.16	0.0268
Intra grupos	416.0	16	26.0		
Total (Corr.)	991.333	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para % GERMINACION A LOS 6 DIAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	72.0	X
AZO16M2	3	78.6667	XX
LMTZ065-90	3	78.6667	XX
LMTZ064-22	3	84.0	X
LMTZ064-119	3	85.3333	X
LMTZ064-109	3	85.3333	X
LMTZ064-66	3	86.6667	X
LMTZ064-41	3	86.6667	X

Germinación de semillas (9 días)

Tabla ANOVA para % GERMINACION A LOS 9 DÍAS por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	744.0	7	106.286	4.98	0.0038
Intra grupos	341.333	16	21.3333		
Total (Corr.)	1085.33	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para % GERMINACION A LOS 9 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	72.0	X
LMTZ065-90	3	80.0	X
AZO16M2	3	81.3333	X
LMTZ064-22	3	84.0	XX
LMTZ064-119	3	85.3333	XX
LMTZ064-66	3	86.6667	XX
LMTZ064-109	3	89.3333	X
LMTZ064-41	3	90.6667	X

Peso Seco de germinados de maca

Tabla ANOVA para PESO SECO DE PLÁNTULA (mg) por TRATAMIENTO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0497775	7	0.00711107	3.12	0.0282
Intra grupos	0.0364743	16	0.00227965		
Total (Corr.)	0.0862519	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO DE PLÁNTULA (mg) por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	0.4771	X
AZO16M2	3	0.529367	XX
LMTZ064-22	3	0.573207	XX
LMTZ064-66	3	0.586477	XX
LMTZ065-90	3	0.593333	XX
LMTZ064-41	3	0.606807	XX
LMTZ064-109	3	0.615087	X
LMTZ064-119	3	0.61785	X

ANEXO 3

FIGURAS

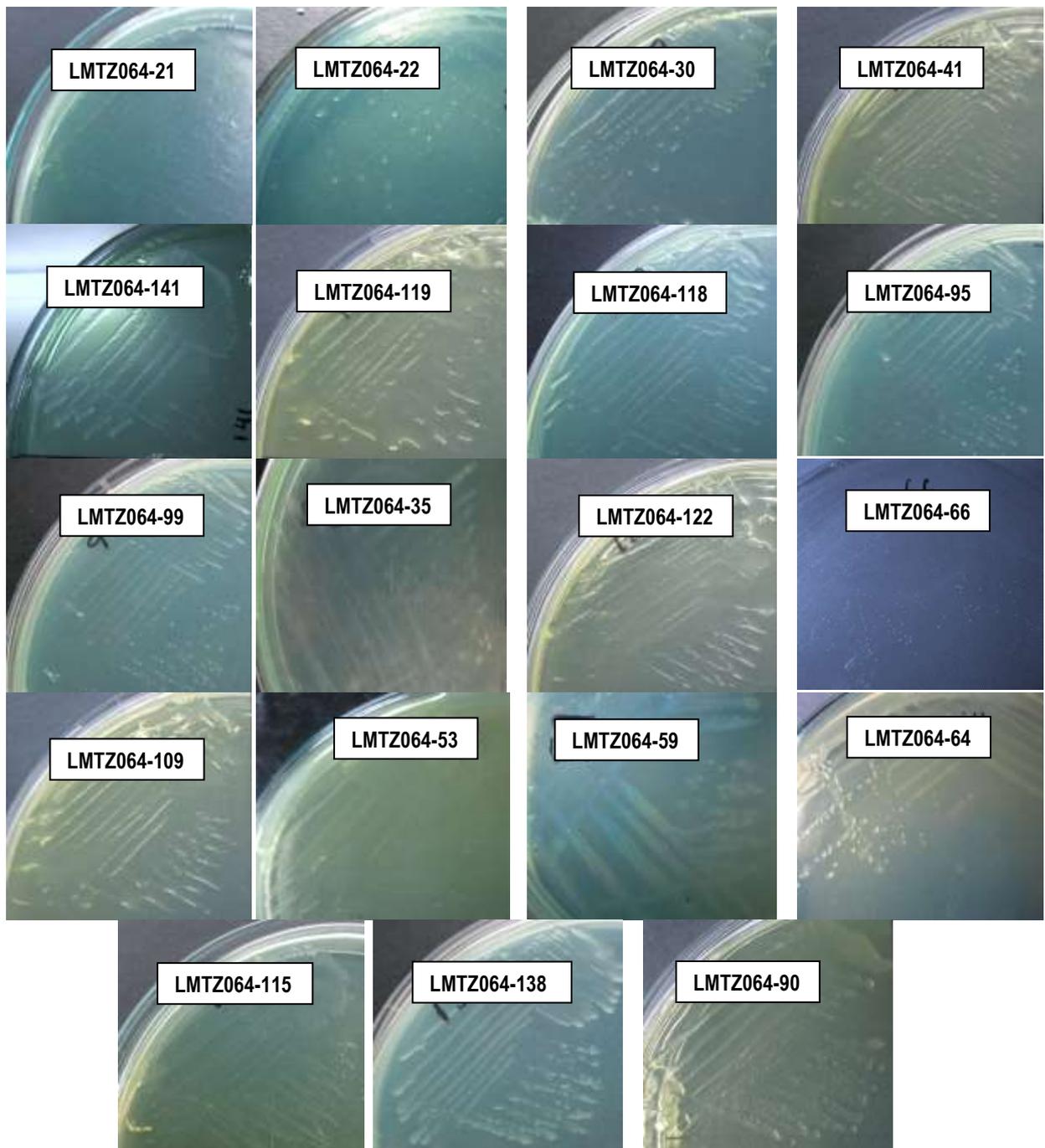
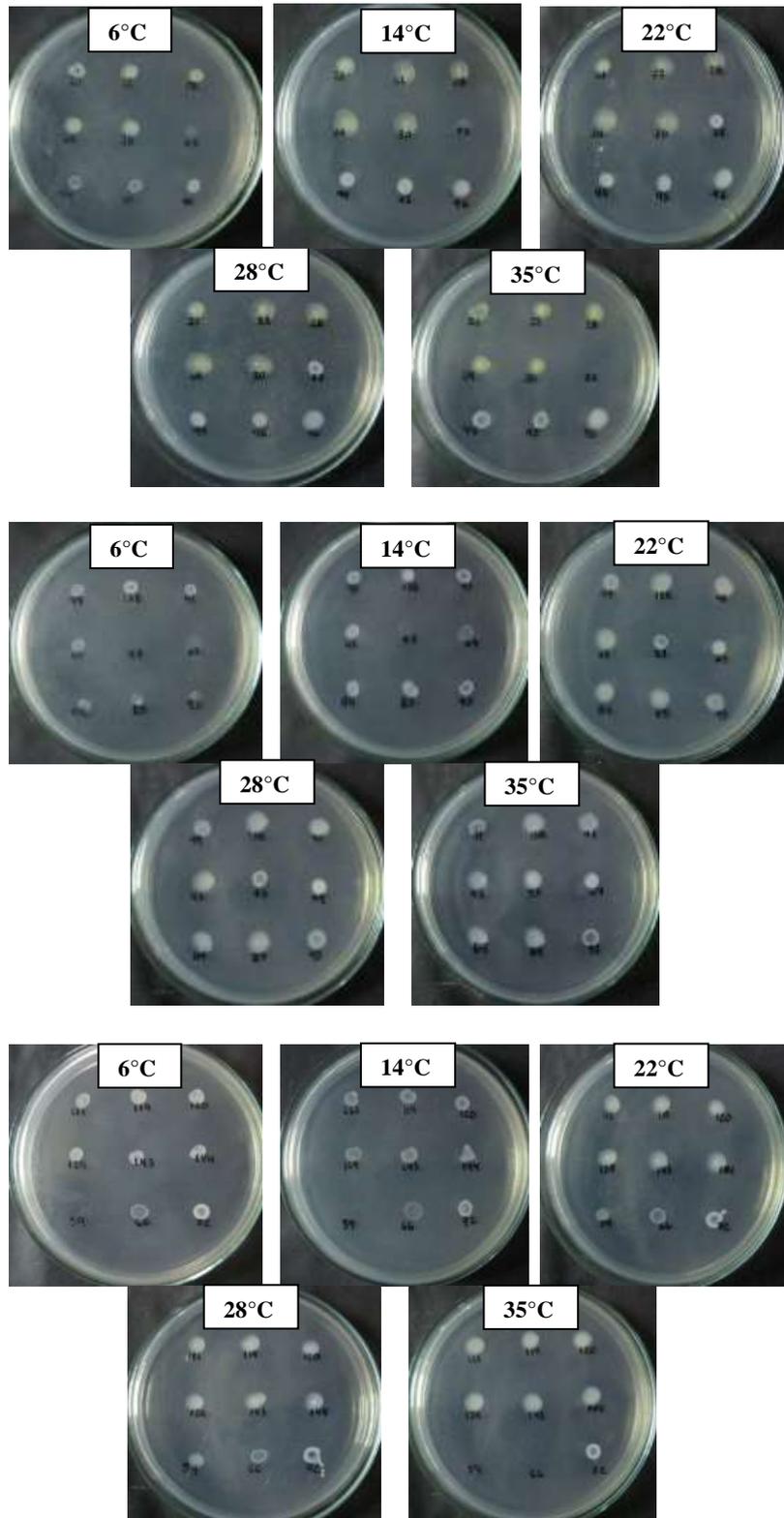
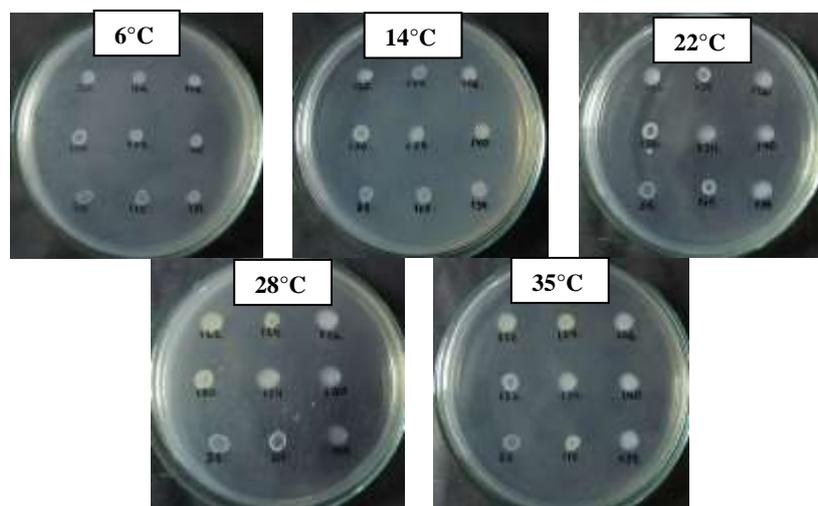
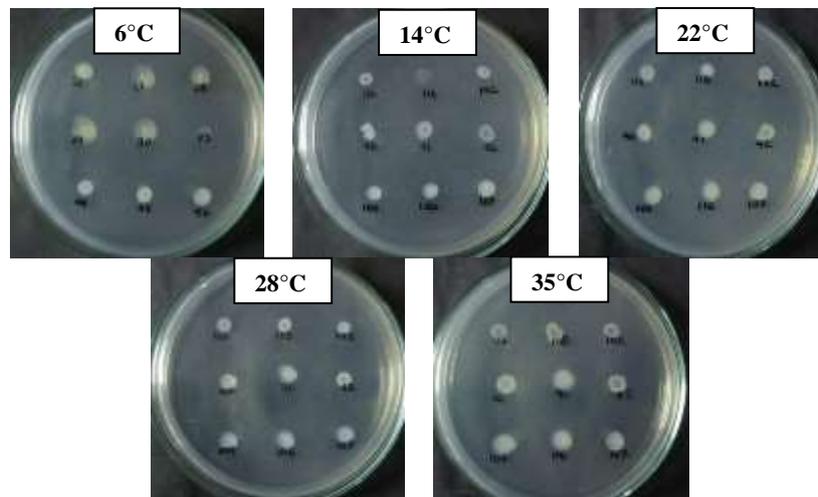


Figura 26. Crecimiento de cepas diazótroficas representativas de cada perfil BOX-PCR obtenidas del cultivo de maca a los 3 días en medio mineral sin nitrógeno (MMSN) con azul de bromotimol.



**Figura 27. Crecimiento de las cepas en estudios a diferentes temperaturas (6, 14, 22, 28 y 35°C) en medio LMA a los 5 días de cultivo.
Control: Tratamiento a 28°C**



**Figura 27. « Continuación » Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes temperaturas (6, 14, 22, 28 y 35°C) en medio LMA a los 5 días de cultivo.
Control: Tratamiento a 28°C**

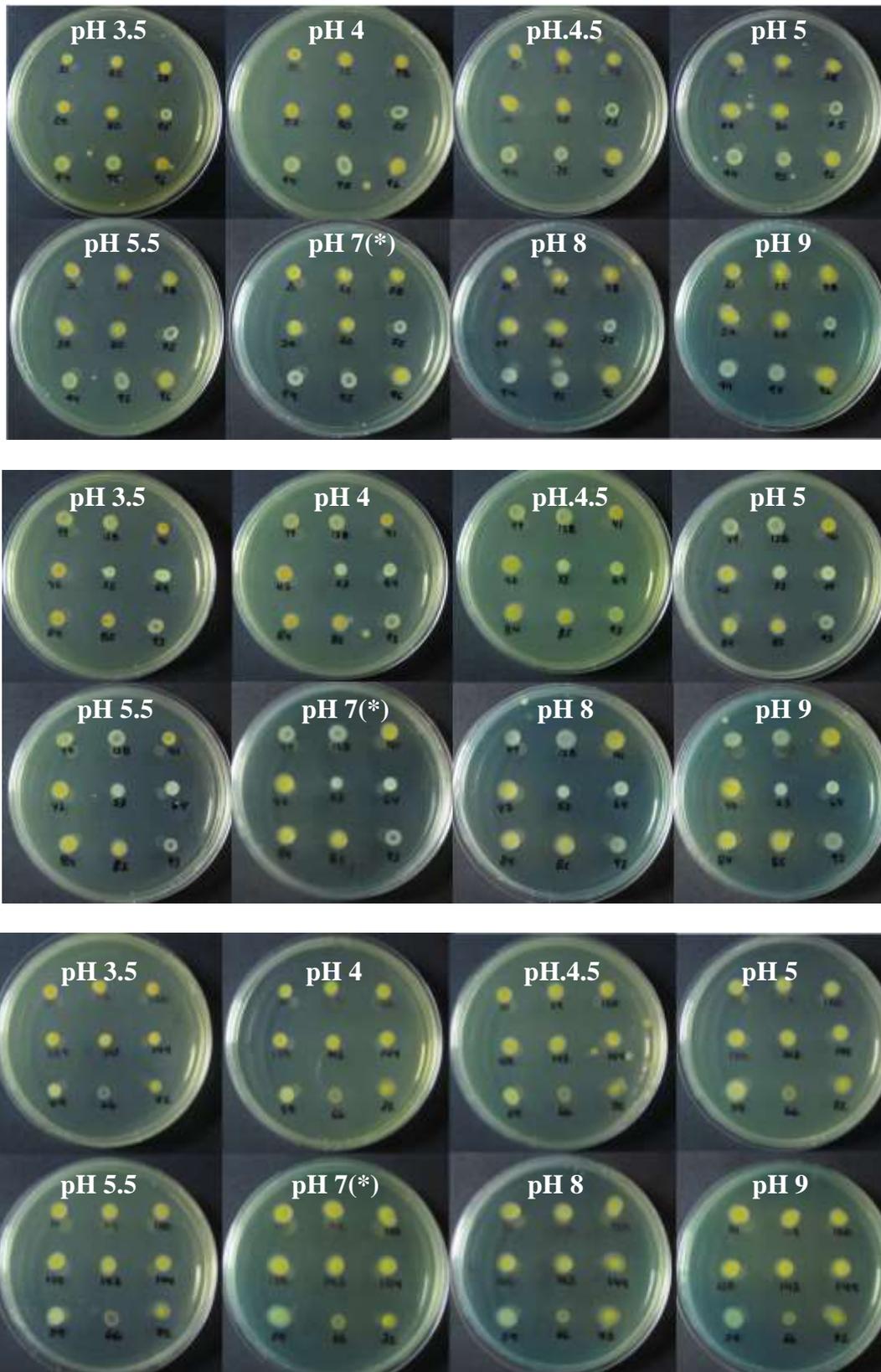


Figura 28. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes valores de pH en medio LMA con azul de bromotimol a los 5 días de cultivo (*= condiciones estándar a pH 7)

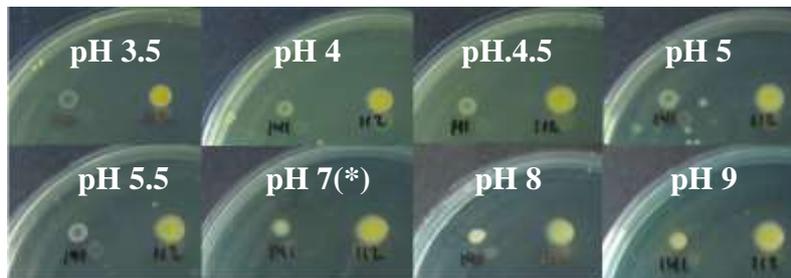
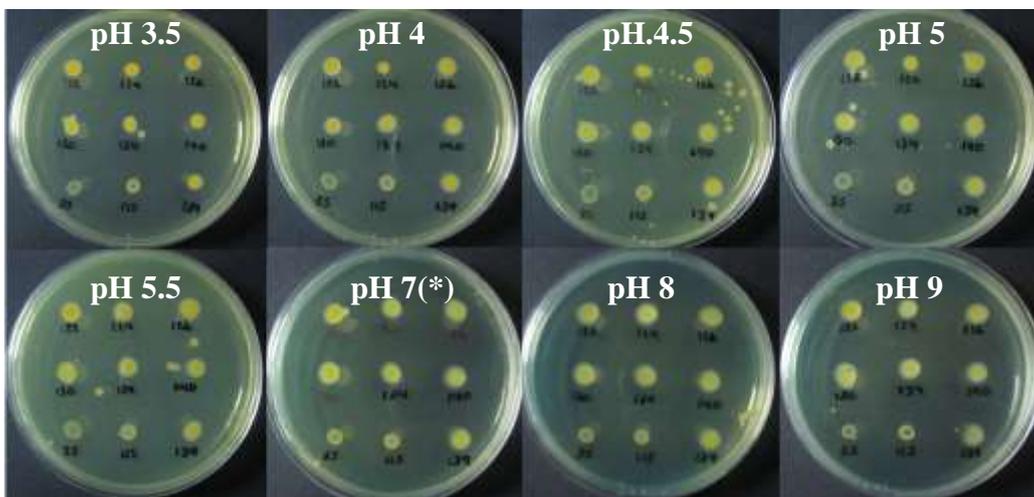
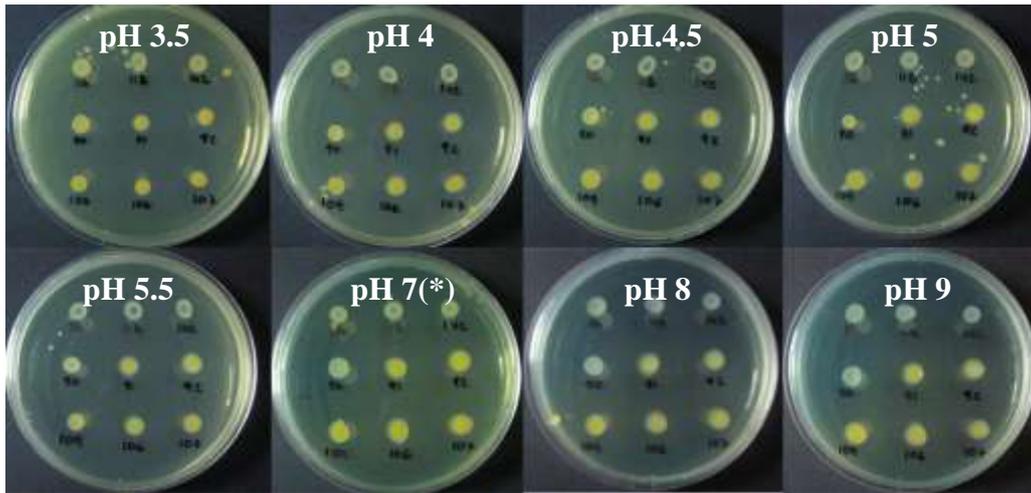


Figura 28. . « Continuación » Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes valores de pH en medio LMA con azul de bromotimol a los 5 días de cultivo (*=condiciones estándar a pH 7)

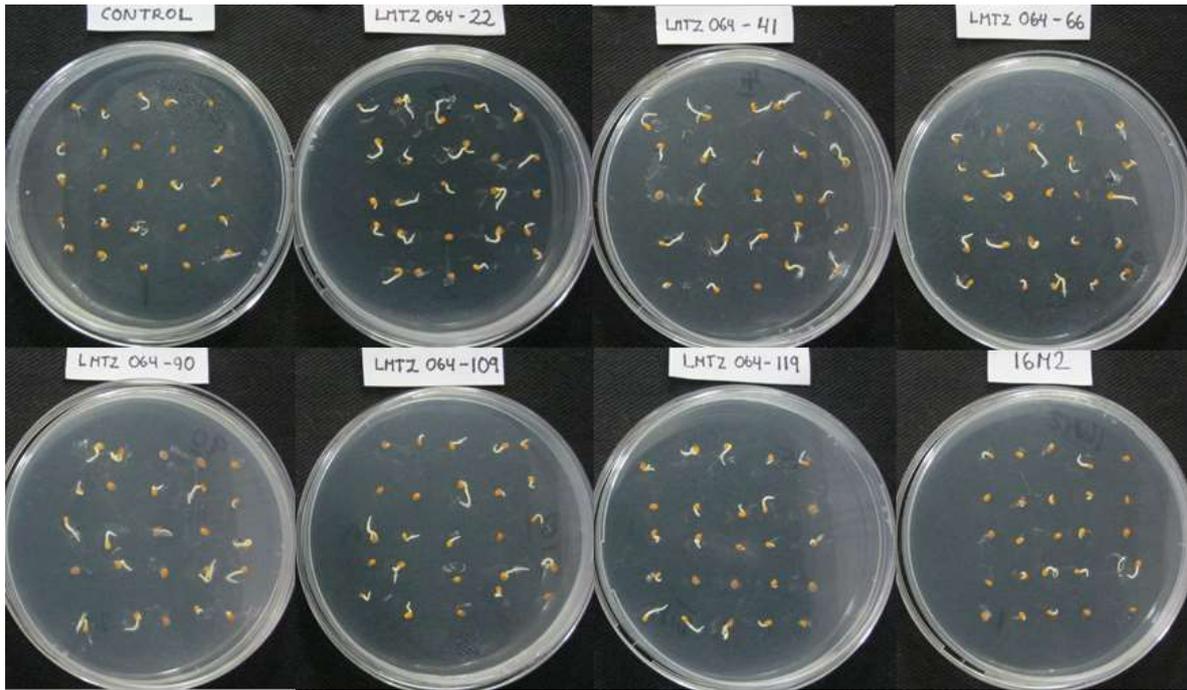


Figura 31. Germinación de semillas de maca a los 4dpi con cepas *nif H+* nativas de suelos de cultivo de maca.

Control: tratamiento sin inóculo. 16M2: control + (*Rahnella aqualitis*).

ANEXO 4

MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES DE REVELADO Y REACTIVOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1. AGAR NUTRITIVO

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Peptona de carne	5,00 g
Extracto de carne	3,00 g
Agar-Agar	15,00g
Ph	7,0 ± 0,2

2. AGAR LEVADURA MANITOL (LMA)

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Manitol	10,00 g
Extracto de levadura	0,50 g
Hidrógeno Fosfato Dipotásico	0,50 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,10 g
Cloruro de sodio	0,20 g
Agar-Agar	15,00 g
pH	7,0 ± 0,1

3. AGAR AGUA

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Agar-Agar	7,50 g

4. MEDIO MINERAL SIN NITRÓGENO (MMSN) (Zapater, 1975)

<u>Reactivos</u>	<u>Para 1 L</u>
Manitol	10 g
Sacarosa	10 g
K ₂ HPO ₄	0.6551 g
KH ₂ PO ₄	0.15 g
FeCl ₃	0.0034 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0108 g
NaCl	0.02 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01 g
MgSO ₄ .2H ₂ O	0.2 g
pH	7.0 ± 0.2
Agar-Agar	15 g
Azul de Bromotimol (0.5% en etanol 70%)	0.5 ml

5. NBRIP (NATIONAL BOTANICAL RESEARCH INSTITUTE'S PHOSPHATE GROWTH MEDIUM)

<u>Reactivos:</u>	<u>Para 1L</u>
Glucosa	10.00 g
Ca ₂ .(PO ₄) ₂ ó Ca ₃ .(PO ₄) ₂	5.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
KCl	0.20 g
MgCL ₂ .6H ₂ O	5.00 g
Agar	15.00 g
pH	7.0

6. CALDO LEVADURA MANITOL

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Manitol	10,00 g
Extracto de levadura	0,50 g
Hidrógeno Fosfato Dipotásico	0,50 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,10 g
Cloruro de sodio	0,20 g
pH	7,0 ± 0,1

7. CALDO NUTRITIVO

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Peptona de carne	5,00 g
Extracto de carne	3,00 g
pH	7,0 ± 0,2

8. AZUL DE BROMOTIMOL 0,5%

<u>Reactivos</u>	<u>Cantidad</u>
Alcohol de 70°	100ml
Azul de Bromotimol	0.5 g

9. REACTIVO DE SALKOWSKI (Gordon & Weber,1951)

<u>Reactivos:</u>	<u>Para 0.5L</u>
FeCl ₃ (0,01M)	0.8 g
H ₂ SO ₄ (7,1M)	188 ml
Agua Destilada	312 ml

10. SOLUCION SALINA

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidades</u>
Agua destilada	100 ml
NaCl	0.85 g
pH	7,0 ± 0,2

11. BUFFER TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X:

<u>Reactivo</u>	<u>Concentraciones</u>
Tris Base	89 mM
Ácido Bórico	89 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	2.0 mM

12. SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO

<u>Reactivo</u>	<u>Para 1L</u>
Solución stock (10mg/mL)	50 µl