

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN SUELOS**



**“DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA RIZÓSFERA DE PAPAS  
NATIVAS AMARGAS CULTIVADAS EN EL ALTIPLANO PUNEÑO  
Y SU CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL”**

**Presentada por:**

**ELENA ROCÍO RAMOS VÁSQUEZ**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN SUELOS**

**Lima – Perú**

**2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN SUELOS**

**“DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA RIZÓSFERA DE PAPAS  
NATIVAS AMARGAS CULTIVADAS EN EL ALTIPLANO PUNEÑO  
Y SU CAPACIDAD PROMOTORA DE CRECIMIENTO VEGETAL”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**ELENA ROCÍO RAMOS VÁSQUEZ**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Oscar Loli Figueroa  
**PRESIDENTE**

Dra. Doris Zúñiga Dávila  
**PATROCINADORA**

Dr. Sady García Bendezú  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Luis Tomassini Vidal  
**MIEMBRO**

## AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta tesis he tenido la suerte de compartir el camino con muchas buenas personas, ya sea en el ámbito profesional y/o amical, ellas me han apoyado desinteresadamente y han contribuido a darme motivaciones, fuerzas, aliento para que pueda cumplir con esta meta.

- Agradezco a la Dra. Doris Zúñiga Dávila, patrocinadora de esta tesis, por darme la oportunidad de desarrollar la investigación y por compartir conmigo su experiencia en la discusión de este trabajo, por sus consejos y aliento.
- Al Dr. Sady García Bendezú, por sus revisiones exhaustivas del manuscrito, soporte en las discusiones y sugerencias dadas.
- A la Dra. Encarna Velazquez de la Universidad de Salamanca, España, por su guía en el análisis molecular de las cepas.
- A los proyectos de investigación PROCOM 255-2008-CONCYTEC-OAJ “Calidad microbiológica y físico-química de la tunta elaborada en el distrito de Ilave, Puno”, PROCOM 273-2009-CONCYTEC-OAJ “Aplicación de desinfectantes orgánicos para la destrucción de microorganismos patógenos aislados del proceso productivo de tunta (Ilave, Puno)” y a la Fundación para el Desarrollo Agrario, Subcuenta Biol-111-FDA/UNALM, por financiar la investigación.
- Al Consorcio de Productores de Tunta “Los Aymaras”, por las facilidades dadas en la toma de muestras.
- Agradezco el apoyo incondicional de mi familia, mi alegría y mi motor impulsor para seguir desarrollándome. A mi hermano Enrique, por su ayuda con los gráficos en R.
- A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, con quienes he compartido momentos de trabajo y de frustración. Agradezco especialmente a Verónica Hurtado y Ricardo Santos, por su ayuda en la instalación de los ensayos.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1	Zonas agroecológicas del altiplano y cultivos de la región	4
2.2	Tecnología agrícola tradicional	6
2.3	Las papas nativas en el altiplano	7
2.4	Papas nativas amargas	8
2.5	Distribución de papas nativas en el altiplano puneño	10
2.6	Requerimientos del suelo y prácticas de cultivo	11
2.7	Descripción botánica	13
2.8	Interacciones planta-microorganismos	13
2.9	Factores que afectan la densidad y diversidad de las poblaciones microbianas de la rizósfera	14
2.10	Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal	15
2.11	Colonización de las PGPRs en la rizósfera	16
2.12	Mecanismos de acción de las PGPRs	17
	2.12.1 Fitoestimulación	17
	2.12.2 Incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales	18
	2.12.3 Control de patógenos	22
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	25
3.1	Area de estudio	25
3.2	Unidades experimentales	25
	3.2.1 Occucuri blanco o jankochoquepito ( <i>S. curtilobum</i> )	25
	3.2.2 Locka ( <i>S. juzepczukii</i> )	27
3.3	Toma de muestras	27
3.4	Lugar de ejecución	28
3.5	Cuantificación de las poblaciones microbianas de la rizósfera de cultivos de papa amarga	29

3.5.1	Aerobios mesófilos viables (AMV)	29
3.5.2	Mohos y levaduras (MYL)	29
3.5.3	Actinomicetos (ACTI)	29
3.5.4	Bacterias esporogénicas	30
3.5.5	Bacterias sulfito reductoras (ASR)	30
3.5.6	Diazótrofos de vida libre (DIAZO)	31
3.5.7	<i>Pseudomonas</i> sp. (PS)	31
3.5.8	Coliformes totales (CT)	31
3.5.9	Coliformes fecales (CF)	32
3.6	Análisis estadístico de las poblaciones microbianas	32
3.6.1	Diferencias estadísticas de microorganismos en la rizósfera	32
3.6.2	Diferencias estadísticas de microorganismos en tubérculos de papas amargas	32
3.7	Ensayos de caracterización de suelos	33
3.7.1	Caracterización de suelos de la rizósfera de cultivos de papa de las comunidades elegidas	33
3.7.2	Análisis de micronutrientes totales y disponibles	33
3.7.3	Análisis de metales pesados	33
3.7.4	Cuantificación de lombrices en el suelo	33
3.8	Aislamiento de las cepas y caracterización morfológica	34
3.9	Conservación y almacenamiento de las cepas	34
3.10	Caracterización molecular de los aislamientos	34
3.10.1	Reactivación de las cepas	34
3.10.2	Obtención de ADN bacteriano	35
3.10.3	Verificación de la calidad del ADN extraído	35
3.10.4	Amplificación BOX-PCR	36
3.10.5	Agrupamiento de perfiles BOX-PCR semejantes	37
3.10.6	Amplificación del gen ribosomal 16S	37
3.10.7	Purificación del producto de amplificación del gen ribosomal 16S	38
3.10.8	Secuenciamiento del gen ribosomal 16S y establecimiento de las relaciones filogenéticas	38
3.11	Determinación de la capacidad PGPR de los aislamientos	39

3.11.1	Influencia de la inoculación de cepas con potencial PGPR en la germinación de semillas de trébol rojo	39
3.11.2	Determinación de la capacidad de producción de AIA	41
3.11.3	Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos	41
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
4.1	Análisis de suelos de cultivo de papas amargas	43
4.1.1	Análisis Microbiológico	43
4.1.2	Análisis Fisicoquímico	49
4.2	Análisis de tubérculos de papas amargas a la cosecha	55
4.2.1	Análisis Microbiológico	55
4.3	Aislamiento de cepas microbianas	56
4.4	Caracterización molecular de los aislamientos	57
4.5	Capacidad promotora de crecimiento de las cepas	71
4.5.1	Influencia de la inoculación de cepas con potencial PGPR en la germinación de semillas de trébol rojo	71
4.5.2	Determinación de la capacidad de producción de AIA	75
4.5.3	Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos	78
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
5.1	De las poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas	81
5.2	De la caracterización molecular de las cepas microbianas	81
5.3	De la evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal	82
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>84</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>100</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b>	Zonas agroecológicas del altiplano peruano	6
<b>CUADRO 2.</b>	Clasificación taxonómica de algunas variedades de papas nativas	8
<b>CUADRO 3.</b>	Papas amargas, extensión cultivada por provincias del departamento de Puno	11
<b>CUADRO 4.</b>	Distribución de muestras de suelo tomadas para el ensayo	28
<b>CUADRO 5.</b>	Caracterización de los suelos rizosféricos de las comunidades de Jallamilla y Concahui	53
<b>CUADRO 6.</b>	Contenido de micronutrientes disponibles (ppm) en suelos de las comunidades de Jallamilla y Concahui	54
<b>CUADRO 7.</b>	Concentraciones (ppm) de algunos elementos pesados encontrados en suelos de las comunidades de Jallamilla y Concahui	54
<b>CUADRO 8.</b>	Clasificación filogenética de cepas microbianas encontradas en suelo rizosférico y tubérculos de papas amarga	61
<b>CUADRO 9.</b>	Efecto de la inoculación microbiana en el peso fresco y seco aéreo y radicular de semillas germinadas de trébol	72
<b>CUADRO 10.</b>	Producción de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) por las 52 cepas ensayadas, durante 12 días de evaluación	76
<b>CUADRO 11.</b>	Eficiencia de solubilización (%) de las cepas aisladas de suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Zonas agroecológicas del altiplano puneño	5
<b>FIGURA 2.</b>	Rutas de biosíntesis del ácido 3-indol acético	17
<b>FIGURA 3.</b>	Ubicación geográfica del área de estudio	26
<b>FIGURA 4.</b>	Tubérculos de papas nativas	27
<b>FIGURA 5.</b>	Poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas. Esporogénicos mesófilos aerobios (EMA) y anaerobios (EMANA), esporogénicos termófilos aerobios (ETA) y anaerobios (ETANA), esporogénicos psicrófilos aerobios (EPA) y anaerobios (EPANA), diazótrofos de vida libre (DIAZO) y <i>Pseudomonas</i> (PS).	44
<b>FIGURA 6.</b>	Poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas. Anaerobios sulfito reductores (ASR), aerobios mesófilos viables (AMV), mohos y levaduras (MYL), actinomicetos (ACTI), coliformes totales (CT) y fecales (CF).	45
<b>FIGURA 7.</b>	Poblaciones microbianas en tubérculos de papas amargas	55
<b>FIGURA 8.</b>	Perfiles de amplificación BOX-PCR de 47 cepas microbianas aisladas de suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas	60
<b>FIGURA 9.</b>	Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias del orden Bacillales.	65
<b>FIGURA 10.</b>	Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia <i>Pseudomonadaceae</i>	66
<b>FIGURA 11.</b>	Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia <i>Rhizobiaceae</i>	67
<b>FIGURA 12.</b>	Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	68
<b>FIGURA 13.</b>	Curvas de producción de AIA de los aislamientos de suelo rizosférico y papas amargas con mayor potencial para este parámetro	75

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b>	Caracterización morfológica de las colonias microbianas procedentes de suelos y de tubérculos de papas amargas	101
<b>ANEXO 2.</b>	Poblaciones microbianas de suelos rizosféricos de papas amargas expresada en Log (UFC/g ) ó Log (NMP/g)*	104
<b>ANEXO 3.</b>	Análisis estadístico de las poblaciones microbianas en la rizósfera de papas amargas	106
<b>ANEXO 4.</b>	Poblaciones microbianas en tubérculos de papas amargas expresadas en Log (UFC/g )	110
<b>ANEXO 5.</b>	Análisis estadístico de las poblaciones microbianas en tubérculos de papas	111
<b>ANEXO 6</b>	Evaluación de la biomasa fresca y seca de la parte aérea y radicular de semillas germinadas inoculadas con cepas microbianas	113

## RESUMEN

La presente investigación pretende evaluar la dinámica de las poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas y seleccionar cepas efectivas como PGPRs. Se colectó suelo rizosférico (franco arenoso, pH 5.1 - 5.5) de papas de variedades locka (*Solanum juzepczukii*) y occucuri blanco (*S. curtilobum*), de la cuenca del río Ilave, Puno (3 850 msnm). Se obtuvieron 65 aislamientos microbianos, observándose 34 diferentes perfiles de amplificación BOX-PCR de 47 cepas caracterizadas molecularmente. Se identificó *Bacillus simplex*, reportado en la literatura como secretor de auxinas y *B. safensis*, de esporas altamente resistentes. Otras cepas fueron relacionadas con *B. pumilus* y *B. licheniformis*, conocidos productores de fitohormonas. Estuvieron presentes cepas relacionadas a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* y *Brevibacterium frigiditolerans*, aislamientos relacionados a *Brevibacillus laterosporus*, utilizado como controlador biológico y *Lysinibacillus parviboronicapiens*. Además, cepas relacionadas a *Pseudomonas fragi*, conocidas promotoras de la movilización de fósforo, *P. gessardii*, reportado como productor de enzimas resistentes al frío y *P. azotoformans* de demostrada capacidad fijadora de nitrógeno. Se identificó *P. protegens* y otras cepas se relacionaron a *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*, *P. koreensis*, *Rhizobium* sp. y *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*. Se evaluó la capacidad PGPR de 52 aislamientos. *Brevibacterium frigiditolerans* (M3SUBE26), *Brevibacillus laterosporus* (M5SUBE24) y AZ3 (N.D.) inoculados en semillas de trébol rojo, aumentaron en más del 50 %, la biomasa fresca de los germinados, frente al control no inoculado. El 59.62 % de las cepas produjeron  $> 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, AZ2, AZ1 y AZ4, relacionadas a *Rhizobium* produjeron entre 16.3 - 21.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . El 44.23 % reportó halos de solubilización de fosfatos en medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, tres cepas, correspondientes a *Pseudomonas protegens* y *P. fragi*, mostraron eficiencia de solubilización entre 400 – 500 %. Las cepas anteriormente mencionadas presentan potencial para su evaluación a nivel de invernadero.

**Palabras clave:** papas amargas, rizósfera, poblaciones microbianas, PGPRs, AIA, solubilización de fosfatos.

## ABSTRACT

This research aims to evaluate the microbial population dynamics in the bitter potato rhizosphere, selecting effective strains as PGPR. Rhizospheric soils (sandy loam, pH 5.1 - 5.5) of locka (*Solanum juzepczukii*) and occucuri blanco (*S. curtilobum*) potato varieties were collected from the river basin wrench, Puno (3850 masl). Sixty five microbial isolates were obtained, showing 34 different BOX-PCR amplification profiles since 47 molecularly characterized strains. *Bacillus simplex*, reported in the literature as auxin producer and *B. safensis* producer of highly resistant spores, were identified. Other strains were related to *B. pumilus* and *B. licheniformis*, known as phytohormone producers. Strains related to *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and *Brevibacterium frigoritolerans*, isolates related to *Brevibacillus laterosporus*, used as biological control agents and *Lysinibacillus parviboronicapiens* were present. In addition, strains related to *Pseudomonas fragi*, known as promoters of phosphorus mobilization, *P. gessardii*, reported as producer of cold-resistant enzymes and *P. azotoformans*, proven by their capacity for nitrogen fixation. *P. protegens* was identified and to other strains were related to *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*, *P. koreensis*, *Rhizobium* sp. and *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*. The PGPR capacity of 52 isolates was evaluated. *Brevibacterium frigoritolerans* (M3SUBE26), *Brevibacillus laterosporus* (M5SUBE24) and AZ3 (ND) inoculated on red clover seeds, rose by more than 50 %, the fresh biomass of sprouts compared to uninoculated control. The 59.62 % of the strains produced  $>1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of IAA, AZ2, AZ1 and AZ4 related to *Rhizobium* produced 16.3 - 21.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of IAA. The 44.23 % of strains reported phosphate solubilization halos on NBRIP medium supplemented with tricalcium phosphate, three strains corresponding to *Pseudomonas protegens* and *P. fragi*, shown solubilization efficiency between 400-500%. The aforementioned strains have potential for greenhouse-level evaluation.

**Keywords:** bitter potatoes, rhizosphere, microbial populations, PGPR, IAA, phosphate solubilization.

## I. INTRODUCCIÓN

El Altiplano es una extensa llanura en Sudamérica, que por su altitud (entre 3812 y por arriba de los 5000 msnm) y condiciones climáticas (temperaturas por debajo de los 0 °C por las noches y muy altas por el día), es considerada muy adverso para vivir y una de las zonas más pobres de América. Alrededor del 65 % de la población andina económicamente activa, se dedica a la agricultura (OEA, 1996), siendo la papa, la base de la alimentación de sus pobladores. En la actualidad, este es el principal cultivo transitorio del Perú y representa el 25 % del PBI agropecuario (MINAGRI, 2014).

En nuestro territorio, se cultivan 2800 variedades de papa, de las más de 4000 conocidas en Latinoamérica. Se han reportado 367.7 mil ha del cultivo, 21.9 % de los cuales, son papas nativas. Las papas nativas amargas (*S. juzepczukii* y *S. curtilobum*), constituyen el 2.5 % de la superficie total de papa de nuestro país (INEI, 2014). Ciertamente, esta gran diversidad ha sido conservada por las comunidades desde la antigüedad. Los diferentes cultivares están bien adaptados a las duras condiciones que prevalecen en el lugar y han asegurado la supervivencia de población a través de su consumo y aunque muchas de ellas no son comercializadas, en los últimos tiempos, el mercado de papas nativas ha aumentado rápidamente, de apenas 100 TM en 2005 a 5000 TM en 2010 (CIP, 2011).

Las papas nativas amargas (*Solanum juzepczukii* y *S. curtilobum*) se pueden cultivar en alturas muy elevadas (hasta 4200 msnm), donde los riesgos de pérdidas de cosecha debido a heladas y sequías en variedades dulces (*S. tuberosum* spp. *andigena*) son muy altos. Estas especies contienen altas concentraciones de glicoalcaloides, entre 13 - 49 mg/100g de peso fresco (Canahua, 1998), a los que se le atribuye su resistencia al frío. En el año 2013, el principal departamento productor de papa fue Puno, con 643 mil TM (INEI, 2014), provenientes de unas 50 mil ha cultivadas. Del total del área de siembra, 8 mil ha son de papas amargas.

Dentro del escenario agrícola tradicional en el que se desenvuelve el altiplano puneño, la producción de papa se enfrenta a un limitado o nulo acceso de los agricultores a

fuentes fertilizantes para la nutrición de los cultivos. La provisión de nutrientes a sus campos depende principalmente de fuentes orgánicas producidas en los corrales familiares. Ante esto y de manera alternativa, se plantea el uso de biofertilizantes, pues existe una prometedora perspectiva del uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs por sus siglas en inglés) como sistema biotecnológico para la mejora de la producción de los cultivos. Esta alternativa evita los efectos secundarios de los métodos de fertilización química y protege a los cultivos frente a plagas. Las PGPRs promueven el crecimiento en plantas y pueden facilitar el desarrollo de la raíz y del follaje (Santillana *et al.*, 2005), permitiendo optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula. De manera directa, intervienen en la fijación de nitrógeno, estimulan la síntesis de hormonas y sideróforos; y solubilizan los fosfatos inorgánicos. Indirectamente, promueven la inhibición de actividad fúngica e inducen la resistencia sistémica adquirida (Príncipe *et al.*, 2007).

Los microorganismos en general cumplen un rol fundamental en el mantenimiento del suelo como ecosistema (Loynachan, 2001; Paul & Clark, 1989). Las bacterias de la rizósfera afectan el crecimiento y el desarrollo de las plantas superiores y aunque existe un gran interés en la manipulación de comunidades microbianas nativas y microorganismos benéficos específicos de la rizósfera, poco se sabe acerca de los procesos dinámicos de estos organismos y son escasos los estudios cuantitativos de las poblaciones de bacterias en la rizósfera. A pesar de la importancia del cultivo de papa en nuestro país, los estudios acerca de las interacciones con comunidades microbianas son escasas (Ferreira *et al.*, 2008) y las investigaciones en papas amargas menos frecuentes. Bajo la hipótesis de investigación que en la rizósfera de papas nativas amargas del Altiplano peruano existen poblaciones microbianas de interés PGPR, el presente estudio busca aportar información de dichos microorganismos, identificando especies que podrían resultar benéficas como promotoras de crecimiento.

Así, los objetivos de esta investigación son los siguientes:

**Objetivo general:**

Evaluar la presencia y cuantificar las poblaciones microbianas de importancia agronómica y sanitaria en la rizósfera de variedades de papa amarga (Locka y Occucuri

blanco) de dos comunidades de Ilave – Puno, seleccionando aquellos de mejor potencial promotor de crecimiento

**Objetivos específicos:**

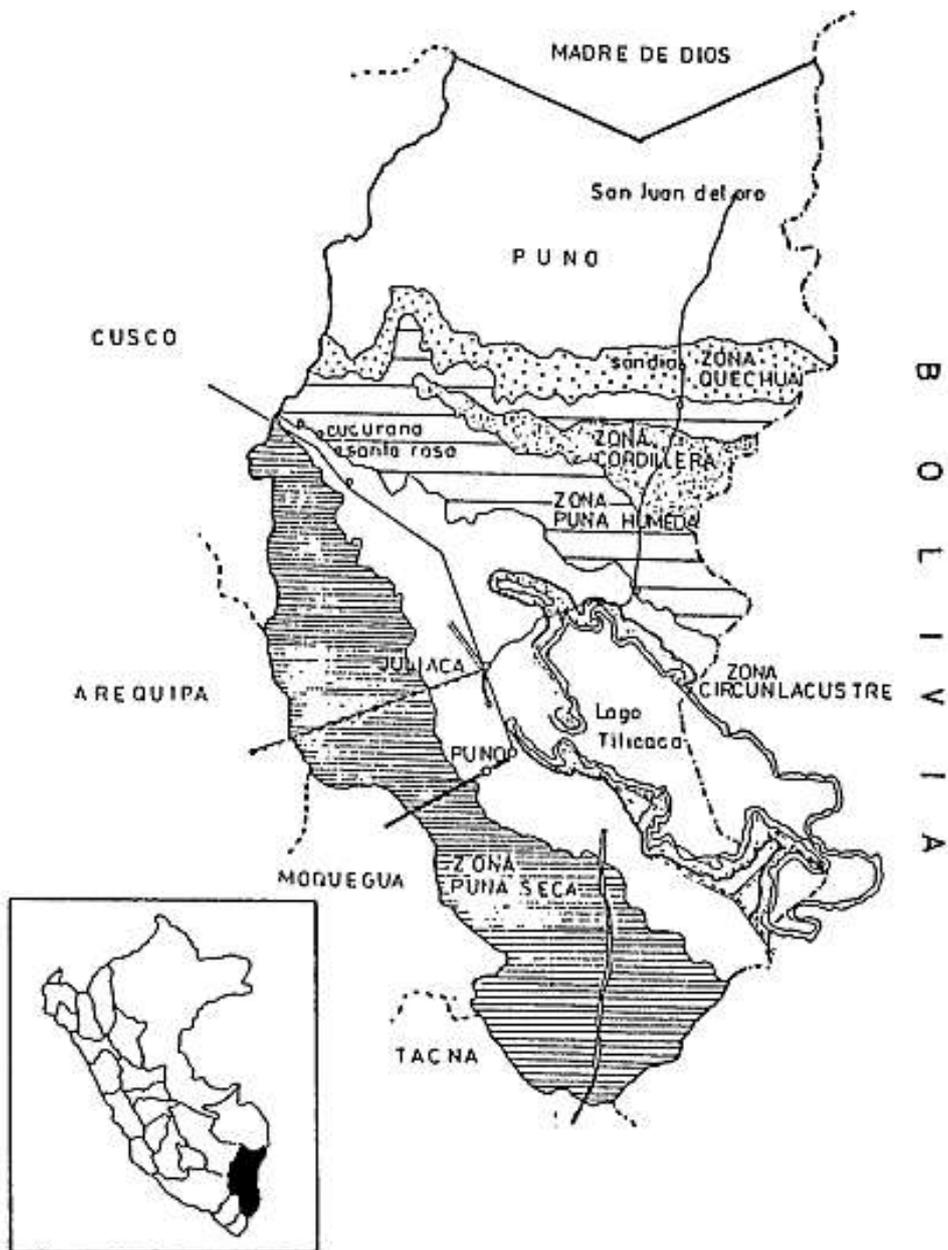
- Cuantificar las poblaciones microbianas de géneros de importancia agronómica (aerobios mesófilos viables, mohos y levaduras, actinomicetos, bacterias esporulantes del género *Bacillus*, diazótrofos y *Pseudomonas* sp.) para cultivos de papas nativas de variedad amarga locka y occucuri blanco en las comunidades de Concahui y Jallamilla (distrito de Ilave – Puno).
- Relacionar las características físico-químicas de los suelos de cultivo con las poblaciones rizosféricas encontradas.
- Realizar el aislamiento, caracterización morfológica e identificación filogenética de las cepas de los grupos bacterianos anteriores presentes en la rizósfera.
- Determinar la capacidad promotora de crecimiento de las diversas cepas identificadas y realizar una selección de las más efectivas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Zonas agroecológicas del Altiplano y cultivos de la región

El altiplano peruano-boliviano está conformado por una serie de llanuras, montañas y cerros aislados. Se sitúa en los Andes, entre los 14° y 22° de latitud sur y entre los 3700 - 4100 msnm. Geográficamente, las características de la cuenca hidrográfica y el espejo total del lago Titicaca, que actúa como centro regulador, son determinantes en la configuración de 4 zonas agroecológicas (Cuadro 1, Figura 1): circunlacustre, suni, puna húmeda y puna seca (Pulgar Vidal, 1996; Salis, 1989; Tapia, 1996). Estas zonas estratifican un área en dominios ambientalmente homogéneos. Para propósitos agrícolas, brindan información de los criterios principales: la precipitación y el riesgo de heladas, este último altamente correlacionado con la altitud.

La extensión altoandina cultivable en Puno es de aproximadamente 250000 ha y la mayor parte de la producción agrícola es para subsistencia. La precipitación varía desde 440 hasta 1000 mm.año<sup>-1</sup> y es más alta hacia el noreste y en las áreas periféricas del Lago Titicaca y más baja hacia el suroeste, donde las sequías pueden prolongarse hasta 150 días.año<sup>-1</sup>. La temperatura mínima media en la región, puede descender hasta -10 °C. El riesgo en la producción de cultivos es alto debido en particular a las sequías, granizo y heladas. Las heladas pueden causar la pérdida parcial o completa del área foliar de un cultivo, conduciendo a una reducción en la fotosíntesis y por tanto del rendimiento. A su vez, las pérdidas causadas por las fuertes heladas pueden causar a una disminución en la superficie total sembrada en la siguiente temporada debido a la escasez de semillas (Morlon, 1989). El alto riesgo de los fenómenos climáticos, también pueden conducir a una menor inversión en el campo agrícola. Por otro lado, durante los años en los que se manifiesta el fenómeno de El Niño, junto con otras expresiones climáticas extremas, las repercusiones pueden ser devastadoras.



**Figura 1:** Zonas agroecológicas del altiplano puneño. Fuente: Tapia (1984)

En la zona del altiplano existe un elevado número de variedades que han sido seleccionadas y cultivadas por los campesinos durante siglos y que se adaptan a las diferentes condiciones geográficas y climáticas. En el Cuadro 1, se citan los cultivos más desarrollados según la zona agroecológica. La papa es el cultivo económicamente más importante.

**Cuadro 1:** Zonas agroecológicas del altiplano peruano

	<b>Circunlacustre</b>	<b>Suni</b>	<b>Puna Húmeda</b>	<b>Puna Seca</b>
Altitud (msnm)	3800 – 3900	3850 – 4000	4000 – 4500	4000 – 4800
Temperatura (°C)	-1 a 12	-4 a 9	-6 a 6	-8 a -6
T° mín. promedio en enero (°C)	5	3.7	2	1
T° mín. promedio en julio (°C)	-1	-8	-16	-10
Precipitación (mm/año)	700 – 750	600 – 850	800 – 1000	440 – 600
Periodo libre de heladas (días/año)	150 – 180	90 – 145	60 – 110	30 – 60
Tipo de suelo	Franco arenoso	Franco arenoso, arcilloso	Franco arcilloso	Franco arenoso
Fuente de agua	Subsuelos, manantiales, ríos, lluvia	Manantiales ríos, lagunas, riego, lluvia	Ríos, manantiales, lluvia	Manantiales ríos, lluvia
Cultivos	Papa, quinua, habas, cebada, avena, trigo, arveja, maíz, cebolla, zanahoria, nabo	Papa dulce/amarga quinua, cañihua, cebada	Papa amarga, cañihua	-
Pastos y forrajes	Avena, cebada	Cebada, avena, forrajeros, pastos nativos alfalfa, trébol	Pastos nativos alfalfa, cebada, avena	Pastos nativos, bofedales

Fuente: Tapia (1996)

## 2.2 Tecnología agrícola tradicional

Los cultivos andinos están directamente relacionados con una tecnología agrícola tradicional empleada a nivel de los habitantes de la zona. El conjunto de técnicas contribuye al desarrollo de una agricultura de tipo ecológico, como son la diferenciación

de las zonas agroecológicas, la rotación de cultivos tanto a nivel de chacra individual, como de las rotaciones sectoriales, la asociación de especies, así como el empleo de fertilizantes orgánicos y en muchos casos el uso de productos biodegradables para el control de plagas y enfermedades (Tapia, 2000).

En los terrenos más elevados de los Andes, la papa es el cultivo que inicia el ciclo de rotación, seguido por algún cultivo de grano o leguminosa; de esta manera se emplean de mejor forma los fertilizantes orgánicos y se controla mejor el ataque de plagas. Los tubérculos andinos como la oca (*Oxalis tuberosa*), olluco (*Ullucus tuberosus*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*), pueden seguir al cultivo de la papa en los suelos con suficiente fertilidad. Así mismo, la asociación de varios tubérculos andinos permite un mejor uso de diferentes tipos de suelos, así como controlar el ataque de insectos. Es común encontrar campos de papa rodeados de oca, que disminuyen el ataque del gorgojo de los Andes o gusano blanco (*Premnotrypes* spp.) a través del exudado de sus raíces (Calvache, 1988). Los cultivos andinos nativos, también están muy relacionados con el uso de herramientas tradicionales como la chaquitacla, o arado de pie.

La tecnología para la deshidratación de tubérculos como la papa amarga, entre otros métodos ancestrales, es un proceso plenamente adaptado a la zona más fría de los Andes y con el empleo de los recursos locales (Vallenas, 1992).

### **2.3 Las papas nativas en el altiplano**

Se cree que los tubérculos silvestres de papa fueron domesticados aproximadamente 8000 años atrás, por agricultores de las llanuras y laderas de la montaña cerca del lago Titicaca (CIP, 2011). En la actualidad, más de 4000 variedades de papas son cultivadas en la zona andina de Perú, Bolivia y Ecuador, 2800 de las cuales son cultivares peruanos, los cuales han sido bien adaptados a las duras condiciones que prevalecen en el altiplano.

Taxonómicamente, las papas nativas están divididas en cuatro especies: *S. ajanhuiri* (diploide,  $2n=24$ ), *S. juzepczukii* (triploide,  $2n=36$ ), *S. curtilobum* (pentaploide,  $2n=60$ ) y *S. tuberosum* L., esta última con dos grupos cultivados: Andigena (*Andigenum*) y Chilotanum (Spooner *et al.*, 2007). De manera más sencilla, Canahua & Arcos (2002),

nos hablan de dos tipos de papas nativas: dulces y amargas, dentro de los cuales incluyen tres de las especies anteriormente mencionadas (Cuadro ) y donde *S. ajanhuiri*, es del tipo “semi-amargo”.

**Cuadro 2:** Clasificación taxonómica de algunas variedades de papas nativas

Tipo de papa nativa	Especie	Nombre común
Dulce	<i>Solanum tuberosum</i> spp. <i>Andígena</i>	Ccompis, Imilla negra, Imilla blanca, Sani imilla, Ccoillo, Andina, Yungay, San Juan-INIA, Chaska, Cica, entre otras
Amarga	<i>Solanum juzepczukii</i>	Piñaza, Ruckii, Locka, K´eta, Parinas, Parkos.
	<i>Solanum curtilobum</i>	Occucuris

Fuente: Canahua & Arcos (INIA) (2002)

Está ampliamente demostrado, que debido a su resistencia a las heladas, las papas amargas desempeñan un rol definitivo en el equilibrio de la frágil ecología del altiplano. Canahua & Aguilar (1992) y Huanco (1992) estimaron que alrededor de un tercio del área total de papa del altiplano peruano es cultivado con papas amargas, de los cuales 60 % son *S. juzepczukii*, y el 33 % son *S. curtilobum*. En Bolivia, las variedades amargas representan el 15 % del área total de papa (Rea, 1992).

## 2.4 Papas nativas amargas

Las papas amargas son parte del sistema de producción de la zona agroecológica alto andina (3800 a 4200 msnm), pertenecen a las especies: *S. juzepczukii* y *S. curtilobum*. Estas contienen una elevada cantidad de glicoalcaloides, los cuales le confieren un sabor amargo al que deben su nombre. Los glicoalcaloides presentes incluyen, solanina, chaconina, tomatina, misina y solamargina, en un rango de 13 - 49 mg/100g de peso fresco (Canahua, 1998). Sin embargo, concentraciones de 150 mg/kg han sido reportadas como altas para el consumo directo de papas (Lepper, 1949). Desde el punto de vista de selección de cultivares para consumo humano, el límite debería ser 60 - 70

mg/kg (6 - 7 mg/100 g) (Ross *et al.*, 1978). Debido a esto, los tubérculos de papas amargas no pueden ser consumidos en fresco, necesitando ser transformados en chuño ó tunta (papa deshidratada bajo la acción de heladas y lavada con agua de río).

Fisiológicamente, el elevado contenido de glicoalcaloides de estas especies, su alta presión.osmótica y la producción de hormonas como el ácido abscísico (ABA) y cloruro de clorocolina (CCC) confieren resistencia de los cultivos al frío (Estrada, 1991). Además, desde el punto de vista morfológico, se cree que la tolerancia al frío de las papas amargas, se relaciona con la formación de un parénquima en empalizada (de dos o tres capas), dentro de la epidermis, además de su número de estomas, 2 o 3 veces mayor que en los cultivos susceptibles y el hábito arrosado de la planta, que tiende a atrapar el calor del suelo (Estrada, 1991).

Hijmans (1999) estimó que el 25 % de la superficie total de papa cultivada en el Altiplano tiene un riesgo extremadamente alto de heladas (> 33 %), en donde es más común que se cultiven papas amargas y es que son indudables las virtudes genéticas que poseen, además de su gran resistencia a las heladas (toleran hasta -7 °C), es posible obtener rendimientos superiores a 30 y hasta 40 TM/ha, iguales o superiores a las variedades comerciales de papa dulce y a costos hasta 25 % bajos que para estas. Durante las heladas, la temperatura del aire cerca de la superficie de la tierra desciende por debajo de 0 °C (Kalma *et al.*, 1992). La temperatura a la que se producen daños por estos eventos depende de la especie y del cultivar. Para *S. tuberosum* subsp. *andigena*, la papa de variedad “dulce” más comúnmente cultivada en los Andes, es probable que el daño ocurra cuando la temperatura cae por debajo de -2 °C (Carrasco *et al.*, 1997). Superior resistencia a las heladas se da en otras especies de papas cultivadas y silvestres. Por ejemplo, *S. ajanhuiri* y *S. curtilobum* incurren en daños entre -3 a -5 °C (Huanco, 1992; Tapia & Saravia, 1997), mientras que *S. juzepczukii* generalmente resiste temperaturas hasta -5 °C o inferiores (Huanco, 1992; Canahua & Aguilar, 1992; Tapia & Saravia, 1997). Con la excepción de *S. ajanhuiri*, los tubérculos resistentes a las heladas tienden a ser amargos y *S. curtilobum*, con un menor contenido de glicoalcaloides que *S. juzepczukii*, es más susceptible que ésta a las heladas.

## 2.5 Distribución de papas nativas en el altiplano puneño

El departamento de Puno es el principal productor de papa a nivel nacional (14.1 %), con alrededor de 145680 agricultores para este cultivo (Ministro de Agricultura y Riego, 2013). En el 2013, de 50 mil ha sembradas de papa, 8 mil fueron de las variedades amargas (INEI, 2014). Puno, a pesar de ser el departamento con mayor producción de papa, mantiene rendimientos de 11.5 TM/ha, por debajo del promedio nacional. Sin embargo, según Huanco (1992), el altiplano de Puno, posee un buen potencial de desarrollo, sobre todo en la zona agroecológica Suni.

Según la clasificación de Holdridge (1982), los cultivos de papa amarga se desarrollan dentro de la formación ecológica pradera o bosque húmedo montano, y según ONERN (1965) en los sub-tipos climáticos “A”, “B” y “C”, respectivamente. Sin embargo, para fines de uso práctico; es posible decir que las áreas de mayor cultivo están en las zonas agroecológicas de Suni Alta y Suni Baja.

En la zona agroecológica Suni Alta ó “C”, con localidades representativas: Chuquibambilla, Lampa Macari, Umachiri, Putina Nuñoa, Santa Rosa, los cultivos se restringen mayormente a papas amargas de la especie *S. juzepczukii*, cañihua y forraje, sólo en laderas se cultiva papa dulce, quinua y cebada grano.

En la zona agroecológica Suni Baja ó “B”, con localidades representativas: E.E. Illpa, Juliaca, Cabanillas, Asillo Azángaro, la agricultura a base de papas dulces, tubérculos menores y quinua se restringe a laderas, lomadas y pie de ladera. En las áreas planas, expuestas a riesgo de heladas, aparecen cultivos de papa amarga, cañihua y forrajes.

Pocas áreas de cultivo con papas amargas se pueden ver en la zona agroecológica Circunslacustre ó “A”, con localidades representativas E.E. Tahuaco (Yunguyo), C.E. Camacani (Platería), Taraco, Huancané, Arapa y Orurillo. Las laderas y cerros presentan menor riesgo de heladas y son destinadas al cultivo de papas dulces (Huanco, 1992; Rea, 1992). En menor proporción, se cultivan papas amargas de las especies *Solanum curtilobum* y *S. ajanhuiri*.

La distribución por provincias (Cuadro 3); evidencia que la mayor concentración de la producción está en Azángaro, El Collao, Chucuito, Puno, San Román y Melgar. En

éstas provincias existen áreas con camellones, canchones, montículos de piedra recogida, etc. que actualmente están cubiertas de pastos naturales. Probablemente el área cultivada se redujo a pequeñas comunidades con la explotación de la ganadería extensiva en las épocas colonial y republicana. Sin embargo, se estima, que con programa de fomento de la producción, transformación y consumo es posible revalorar el cultivo y superar las 50 000 ha.

**Cuadro 3:** Papas amargas, extensión cultivada por provincias del departamento de Puno

<b>Provincia</b>	<b>Extensión [ha (%)]</b>	<b>Producción [TM]</b>	<b>Distritos</b>
Chucuito	1 867 (12.2)	14 002	Juli, Huacullani, Desaguadero
El Collao	2 035 (13.3)	14 245	Ilave, Pílcuyo
Azángaro	2 693 (17.6)	19 120	Azángaro, Nicasio
Melgar	1 469 (9.6)	10 870	Ayaviri, Orurillo, Nuñoa
Puno	1 576 (10.3)	11 190	Acora, Pino, Huata, Coata
Lampa	796 (5.6)	5 490	Pucará, Lampa
Huancané	964 (6.3)	6 655	Huancané, Taraco
San Román	1 622 (10.6)	11 678	Juliaca, Cabana
Putina	627 (4.1)	4 514	Putina
Carabaya	1 040 (6.8)	7 180	Carabaya
Otras	611 (4.0)	4 280	Kelluyo, Moho

Fuente: CEDECUM – SEMINAL S.A. – CIP. 1998

## 2.6 Requerimientos del suelo y prácticas de cultivo

Los cultivos de papas amargas se producen entre los meses de octubre a marzo, cuando las temperaturas más altas coinciden con la temporada de lluvias. Su desarrollo se da entre 6 - 14 °C, con precipitaciones que varían según la región y año entre 400 - 1400 mm.

Las papas amargas requieren de un tratamiento diferente al de las papas dulces: exige distintas clases de suelo, húmíferos o francos, ubicados en diferentes zonas, las amargas

por su resistencia a las heladas pueden ser cultivadas en zonas más altas que las dulces y son menos afectadas por la excesiva humedad o la sequía. Aunque la siembra se realiza casi al mismo tiempo que las papas dulces, la cosecha es relativamente tardía. Por otra parte, las papas amargas siempre tienen matas menos desarrolladas, aunque esto no significa una mala calidad del cultivo. En la época de la selección de papas, que corresponde generalmente a los meses de junio y julio, una gran parte de estas variedades es destinada a la elaboración de chuño.

Los cultivos de papa amarga, requieren suelos que tengan suficiente materia orgánica (3 - 5 %) y que hayan tenido un período de barbecho o rotación adecuada. Los mejores rendimientos se obtienen en suelos con un descanso previo de tres a cuatro años y que hayan sido fertilizados con 2 - 3 TM/ha de estiércol. Las papas amargas predominan en suelos donde la principal producción es la ganadería y donde existen pastos naturales y con poca presión sobre la tierra. Los suelos pueden ser sometidos a un sistema de rotación de cultivos con cañihua o plantas forrajeras como cebada o avena, pudiendo incluir rotaciones con tubérculos como la oca y ullucu o mezclas de estas especies y aplicando períodos de descanso prolongados (hasta seis años) a la mitad de las tierras disponibles, durante los cuales la vegetación natural cubre el suelo de nuevo.

El periodo de siembra de papa amarga está muy condicionado por la presencia de lluvia. El plazo se extiende de setiembre a noviembre, dependiendo de si las lluvias comienzan temprano o tarde. La tradición es escalonar la siembra en dos o tres fechas, como medio de reducir el riesgo climático. El cultivo requiere de uno a dos aporcados que se efectúan cuando la planta llega a una altura de 20 - 30 cm. Las variedades de *S. juzepczukii* se adaptan mejor a suelos poco profundos que *S. curtilobum*, que tiene raíces más largas. El inicio de tuberización coincide con el inicio de la floración, aproximadamente 7 - 9 semanas después de la emergencia, y dura unas cuatro semanas, tiempo durante el cual la ausencia de fuertes heladas es de vital importancia. En ese sentido existe una diferenciación entre ecotipos precoces, intermedios y tardíos, que pueden madurar entre cuatro a siete meses.

Aunque la papa puede multiplicarse por semillas y por esquejes, en la práctica la multiplicación es siempre vegetativa, haciéndose por medio de los tubérculos. La

profundidad de la plantación puede ir desde los 5 a 15 cm., dependiendo del tipo de suelo (Cortbaoui, 1988).

Las variedades amargas son susceptibles a los nemátodos (*Nacobbus aberrans*) y al gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp.) por su crecimiento postrado, así como al hongo de la verruga (*Synchytrium endobioticum*).

## **2.7 Descripción botánica**

Las papas amargas variedad Locka (*S. juzepczukii*), tienen un periodo vegetativo de 160 días y un rendimiento de hasta 30 TM/ha. Su porte es de unos 30 - 50 cm y tiene un hábito de crecimiento semirrosetado, con hojas alargadas y derechas, de pecíolos cortos; la corola es pequeña y de color azul. Sus tubérculos son fusiformes, de tamaño mediano a grande, con ojos superficiales, piel color crema y carne blanca.

*S. curtilobum*, tiene un periodo vegetativo que varía entre 5 - 8 meses. El clon 'Piñaza' es uno de los más precoces con 150 días; los clones 'Ruckii' son los más tardíos, con hasta 195 días. El cultivo se distingue por sus hojas más coriáceas, la corola es más grande y de color púrpura, con lóbulos muy cortos, de punta aguda. Los tubérculos varían en tamaño y forma entre redondeados ('Piñaza'), elípticos, oblongos y oblongo alargados ('Luki') y de color. Los tubérculos de 'Occucuri blanco' son de tubérculos oblongo comprimidos, de tamaño mediano a grande, de ojos semiprofundos, piel color marfil claro y carne blanca morados y blancos. Su periodo vegetativo es de 170 días y su rendimiento es de hasta 25 TM/ha.

## **2.8 Interacciones planta-microorganismos**

La rizósfera es la zona inmediatamente influenciada por las raíces vivas de las plantas y se caracteriza por su fuerte relación a la actividad microbiana en suelos. El suelo rizosférico soporta mayores densidades de microorganismos que aquellos suelos libres de raíces, en buena parte debido a los exudados radicales. Las moléculas liberadas vía exudación, desempeñan diversas funciones, además de servir como sustratos carbonados (azúcares) y nitrogenados para los microorganismos. Algunas sirven como

precursores para la síntesis de otras moléculas que alteran la fisiología de la planta, por ejemplo, el triptófano como precursor de auxinas. Otras moléculas funcionan como sustancias quimiotácticas (ácidos fenólicos) o inhibidoras frente a otros microorganismos, o también pueden mejorar la nutrición mineral de la planta, como los ácidos orgánicos, o suministrando fósforo y otros nutrientes al mineralizarse la materia orgánica (Subba Rao, 1982). En ese ambiente particular, se llevan a cabo muy importantes e intensas interacciones entre la planta, el suelo y la microfauna. Las interacciones bioquímicas e intercambios de moléculas señal entre las plantas y los microorganismos del suelo, han sido descritas y revisadas (Pinton *et al.*, 2007).

Los microorganismos que habitan en la rizósfera compiten por agua, nutrientes y espacio y algunas veces mejoran su competitividad, mediante el desarrollo de una asociación íntima con la planta (Hartmann *et al.*, 2009). Estos microorganismos juegan roles importantes en el crecimiento y el éxito adaptativo de su hospedero (Nihorimbere *et al.*, 2010).

## **2.9 Factores que afectan la densidad y diversidad de las poblaciones microbianas de la rizósfera**

Los efectos sobre la población del suelo varían con la especie o la variedad del vegetal (Frioni, 1999). La edad de la planta, su estado sanitario y vigor, el tipo y posición de la raíz, así como el tipo de suelo y el ambiente determinan el efecto rizosférico. Así mismo, el grado de lignificación del aparato radical, el cual está asociado a la edad del cultivo, afecta decisivamente la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Lynch, 1990; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1995) y por lo tanto, es un factor que influye en el funcionamiento de la rizósfera.

En cuanto a la diversidad microbiana de la rizósfera, podría estar en función de las diferentes etapas de la maduración de cada cultivar, lo que podría influir en los diferentes tipos y cantidades de los exudados radiculares. Las raíces asociadas a las comunidades bacterianas suelen ser dinámicas y pueden ser altamente afectadas por el estado de desarrollo de la planta (Roesti *et al.*, 2006).

La obtención de poblaciones elevadas de un grupo microbiano determinado, no implica una mayor diversidad, esto solo se sabrá luego de un adecuado procedimiento de identificación de microorganismos. Ferreira *et al.* (2008), encontraron que diferentes variedades de papa mostraron diferentes perfiles PCR-DGGE y que la similitud entre comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de los diferentes cultivos disminuía conforme avanzaba el periodo de crecimiento de la planta.

## **2.10 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal**

Las bacterias edáficas de vida libre PGPRs, literalmente, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989), se pueden encontrar asociadas a muchos tipos de plantas y en diversos ambientes. Pueden colonizar la superficie de las raíces y la interfase con el suelo, otras pueden tener características endofíticas en raíz, vástago, hojas, tubérculos y otros órganos (Compant *et al.*, 2005).

Dentro de las PGPRs se incluyen varios géneros bacterianos, entre los que destacan *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Serratia* (Klopper *et al.*, 1989), *Azospirillum* (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994), *Pseudomonas* (Cook & Baker, 1983; Sorensen *et al.*, 2001), *Azotobacter* (Khalid & Ashad., 2004), *Frankia*, *Thiobacillus* (Bakker *et al.*, 2007). *Burkholderia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Hafnia*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium* (Franco, 2008). También tienen propiedades benéficas para los cultivos las micorrizas (Gosling *et al.*, 2006) y los actinomicetos (Maier *et al.*, 2004).

Desempeñan funciones clave para la planta, tales como:

- Fitoestimulación, debida a mecanismos de síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento: auxinas, giberelinas, citoquininas (Probanza *et al.* 1996; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996; Gutiérrez Mañero *et al.*, 2001). De esta manera propician la emergencia o enraizamiento, mejorando a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes, el vigor y la producción de las plantas, así como su tolerancia a situaciones de estrés.
- Incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales (fijación de nitrógeno,

solubilización de fosfatos).

- Control biológico de patógenos mediante efectos antagonistas o de inducción de resistencia sistémica (van Loon *et al.*, 1998).

## 2.11 Colonización de las PGPRs en la rizósfera

El éxito de las PGPRs introducidas al sistema suelo, depende en primer lugar de una buena colonización a nivel de rizósfera. Los siguientes pasos, se encuentran implícitos en el proceso: (i) la capacidad de las PGPR para sobrevivir a la inoculación de la semilla, (ii) su multiplicación en la esfermosfera (región que rodea a la semilla) debido a los exudados que libera, (iii) la adhesión a la superficie radical, y (iv) la colonización del sistema radicular en desarrollo (Kloepper, 1993).

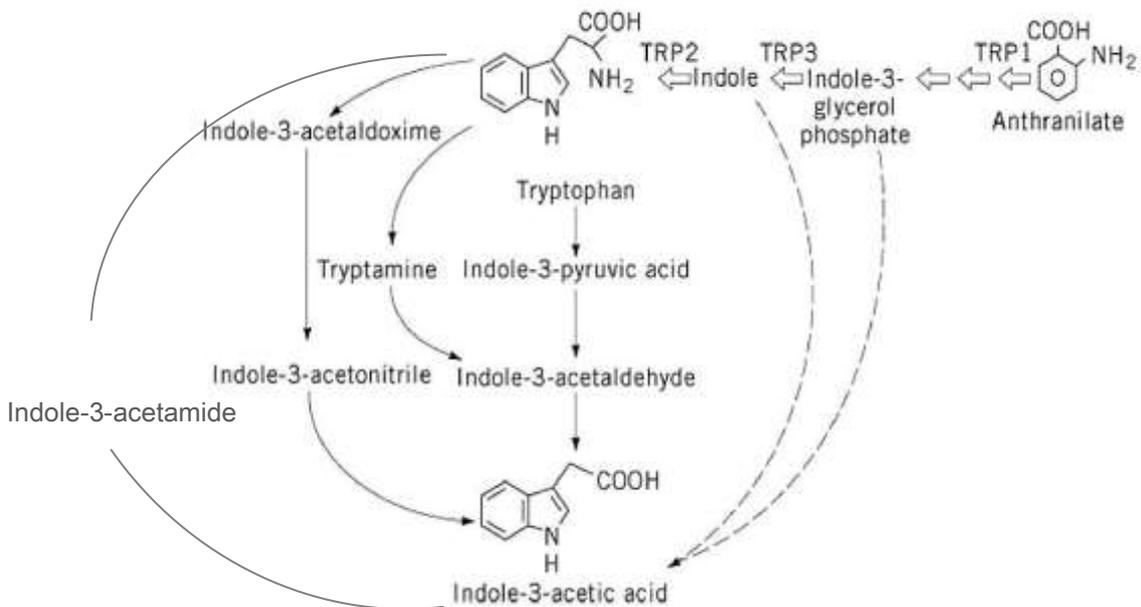
La colonización puede ocurrir a través de interacciones físicas (flagelos, pili, polisacáridos, fragmentos de quitina y otras adhesinas) o a través de la señalización por moléculas pequeñas, como la biotina y aminoácidos. El pili tipo IV de las bacterias está involucrado en su adhesión a las plantas, en la adhesión entre las células bacterianas (Darzins & Russell, 1997) y en la formación de biopelículas (O'Toole & Kolter, 1988). Por otro lado, los exopolisacáridos microbianos protegen a las bacterias contra las influencias ambientales, tales como desecación, presión osmótica, antibióticos y antagonistas (Becker & Pühler, 1998; O'Toole *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 2002) y también pueden estabilizar las enzimas segregadas. Las sustancias químicas atrayentes presentes en los exudados radiculares, también juegan un rol importante dentro de la colonización, ya que afectan el crecimiento y fisiología de las poblaciones rizobacterianas (Gnanamanickam *et al.*, 1999). Finalmente, las PGPRs forman biopelículas en la superficie de las raíces, donde las células se encuentran densamente empaquetadas y cubiertas por una capa de exopolisacáridos, creando así un ambiente adecuado para los sistemas reguladores de genes (Fuqua & Greenberg, 2002). Comparado a bacterias individuales, el porcentaje de células competentes resulta mayor en biopelículas. Muchas PGPRs producen antibióticos y metabolitos secundarios bajo el control de un *quorum sensing* (Loh *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004), un mecanismo de comunicación intercelular bacteriano que controla la expresión de genes en respuesta a una densidad poblacional.

## 2.12 Mecanismos de acción de las PGPRs

### 2.12.1 Fitoestimulación

Las auxinas, citoquininas y giberelinas juegan un rol importante en la fitoestimulación. Estas hormonas pueden ser sintetizadas por las plantas mismas, pero también por sus microorganismos asociados, como el caso del *Azospirillum* spp., que además tiene la capacidad de fijar nitrógeno (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* pueden producir ácido 3-indol acético, citoquininas, giberelinas e inhibidores de la producción de etileno.

El ácido 3-indol acético (AIA) es una fitohormona conocida por estar involucrada en la iniciación radicular, división y alargamiento celular (Salisbury, 1994). Al aumentar la división a nivel celular, aumenta el tamaño de los frutos y número de hojas (Uggla *et al.*, 1996; García-Breijo, 2003). En tanto que la promoción del desarrollo del sistema radical, característico de este tipo de reguladores, permite a las semillas jóvenes tener un pronto acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente (Patten & Glick, 2002).



**Figura 2:** Rutas de biosíntesis del ácido 3-indol acético

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano y probablemente éste último es el precursor de la fitohormona formada en la planta viva. Aunque se conocen cuatro vías de formación de dicha auxina (Figura 2), cada una de ellas tiene intermediario distinto (García-Breijo, 2003). Así, diferentes grupos de plantas emplean diversas rutas para producir AIA a partir de triptófano.

La capacidad de producir AIA ha sido ampliamente demostrada en bacterias comúnmente asociadas a la superficie de las plantas (Wichner & Libbert, 1968). La síntesis ocurre a partir del mismo aminoácido que utilizan las plantas, por medio de la indol-acetamida, que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta. Esta ruta aunque ha sido demostrada en plantas superiores (Kawaguchi *et al.*, 1993; Saotome *et al.*, 1993), tiene rara ocurrencia en ellas. Existe, sin embargo, una ruta alternativa tomada por otras bacterias (Figura 2), que involucra la utilización del ácido-3-indol pirúvico como intermediario (Fett *et al.*, 1987; Patten & Glick, 2002) y que es más común para plantas y microorganismos.

## **2.12.2 Incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales**

### **a. Fijación no simbiótica de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta. Dicho elemento es primordial en la formación de estructuras moleculares como ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros. A nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación del elemento, pues se presenta en varias bacterias de tipo rizosférico. Algunos géneros que incluyen organismos diazótrofos son *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. Otros fijadores de nitrógeno endofíticos no simbióticos son *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Gluconacetobacter*.

El hábitat de estas bacterias puede ser la rizósfera, la superficie radical, la endodermis, los espacios intercelulares de células de la corteza, el sistema vascular (Ramos *et al.*, 2002) y también las hojas (Vlassak *et al.*, 1973). En estas asociaciones la planta hospedera proporciona exudados de las raíces como fuente de energía para la fijación de

N<sub>2</sub>. Sin embargo, el beneficio para la planta es principalmente indirecto, ya que aproximadamente el 90 % del N<sub>2</sub> fijado llega a ser disponible para la planta solo después de la muerte de las bacterias (Marschner, 1995). Las estimaciones de la cantidad de N<sub>2</sub> fijado por bacterias diazotróficas varían en gran medida. En cereales (plantas C3) cultivados bajo condiciones de campo en climas templados, la cantidad de N<sub>2</sub> fijado está entre 5 - 10 kg N.ha<sup>-1</sup>.año<sup>-1</sup> (Vinther *et al.*, 1981). Okon & Labandera-Gonzalez (1994) reportaron que aproximadamente el 60 - 70 % de los experimentos de inoculación con *Azospirillum*, registraron entre 5 - 30 % de incremento en el rendimiento. Generalmente los efectos positivos se obtienen a niveles de fertilización de N bajos o medios. En caña de azúcar (planta C4), se muestra un mayor potencial para la fijación asociativa de N<sub>2</sub>, con encima del 60 - 80 % de N de la planta siendo derivado de estas asociaciones, lo que se traduce en más de 200 kg N.ha<sup>-1</sup> (Boddey *et al.*, 1991).

#### **b. Solubilización de fosfatos insolubles**

El fósforo (P) es, después del nitrógeno, el principal nutriente inorgánico para las plantas y microorganismos. Sus funciones se encuentran relacionadas al desarrollo radicular, fuerza del tallo, formación de flores y semillas, madurez y producción del cultivo, fijación de nitrógeno en leguminosas, calidad del cultivo y resistencia a enfermedades (Khan & Joergensen, 2009). Se encuentra presente en procesos biológicos esenciales como son la división celular, la fotosíntesis, la respiración, la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos. Es componente en moléculas vitales como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP. En el suelo, es un factor limitante del desarrollo vegetal, a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas, Su captura biológica del aire no es posible como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999).

Las concentraciones de P en la solución suelo son muy bajas, desde 0.01 a 0.3 mg.L<sup>-1</sup> (Ozanne, 1980) y aunque solo constituye una parte del P total del suelo, es la porción disponible para los requerimientos inmediatos de la planta. Los bajos índices de P asimilable en el suelo, se deben a que el elemento soluble reacciona con iones como calcio, hierro o aluminio, que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. La mayoría de fósforo orgánico presente en el suelo está

en forma de fosfatos de inositol y los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos son también inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas & Bartha, 2002). Ante esto, existe un grupo de microorganismos heterotróficos que solubilizan formas inorgánicas de P y que vienen siendo utilizadas como biofertilizantes desde 1950s (Kudashev, 1956; Krasilnikov, 1957). Entre las bacterias solubilizadoras de fosfato destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*. *Xanthomonas campestris* también ha sido registrada hace pocos años como solubilizador de fosfatos (Sharan *et al.*, 2008). Entre los hongos solubilizadores se mencionan principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y levaduras (Patiño, 2010). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares y producen fosfatasas como monoésterfosfato hidrolasas (fitasas y fosfomonoesterasas).

El mecanismo desolubilización de minerales de fosfato por cepas solubilizadoras se encuentra asociado con la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Goldstein, 1995; Kim *et al.*, 1997), que a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelan los cationes enlazados al fosfato, convirtiéndolos en formas solubles (Kpombrekou & Tabatabai, 1994). Existe evidencia experimental para apoyar el papel de los ácidos orgánicos en la solubilización de este elemento (Halder *et al.*, 1990). Sin embargo, el proceso es un fenómeno complejo, el cual depende de muchos factores, como las condiciones nutricionales, fisiológicas y de crecimiento del cultivo (Reyes *et al.*, 1999).

### **c. Producción de sideróforos**

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, con alrededor de 5 % en peso. Sin embargo, se encuentra en forma de minerales insolubles como hematita, goethita y pirita, carbonatos y silicatos. La atmósfera aerobia del planeta ha provocado que las superficies de hierro se conviertan en oxi-hidróxido polímeros que restringen

severamente la biodisponibilidad del elemento. La concentración de iones de hierro libre a pH neutro, probablemente no es mayor que  $10^{-18}$  M (Spiro, 1977).

La importancia del hierro radica en que es un mineral esencial para los organismos vivos. Es requerido para procesos enzimáticos fundamentales, la reducción de oxígeno en la síntesis de ATP, la reducción de precursores ribósido del ADN, la formación del grupo hemo, entre otros. La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener el hierro necesario para llevar a cabo la fijación, ya que la enzima nitrogenasa, compuesta de varias unidades proteicas, requiere de 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005). Para un crecimiento óptimo, se necesita al menos la concentración de 1  $\mu$ M de hierro (Neilands, 1995).

La quelación es un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995; Sánchez, 2006) y los sideróforos (del griego: transportadores de hierro) basan su actividad en ello. Los sideróforos son agentes quelantes de bajo peso molecular (200 - 2000 Da), producidos por bacterias aeróbicas y anaerobios facultativos, así como hongos y plantas para facilitar la toma eficiente de hierro (Chu *et al.*, 2010). Su biosíntesis se realiza a nivel celular por un conjunto de enzimas específicas para el sideróforo respectivo. Los genes correspondientes se encuentran en el cromosoma o en el plásmido y su expresión está controlada por la cantidad celularmente disponible de hierro (Crosa & Walsh, 2002). Por lo tanto, los productos metabólicos microbianos (principalmente metabolitos secundarios) pueden ser clasificados como sideróforos, si (i) exhiben capacidad quelante del hierro, (ii) participan en el transporte activo a través de la membrana y (iii) su biosíntesis es regulada por el nivel de hierro intracelular

Es así que los sideróforos microbianos pueden estimular directamente el crecimiento de la planta, incrementando la disponibilidad de hierro en el suelo alrededor de las raíces o indirectamente por competitividad, inhibiendo el crecimiento de patógenos de la planta, menos eficientes para la absorción de hierro (Marek-Kozaczuk *et al.*, 1996).

Más de 500 sideróforos naturales han sido aislados y caracterizados. Las dos clases más comunes son los hidroxamatos y fenol-catecholatos. Muchas *Pseudomonas* secretan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso, pyoverdinas o pseudobactinas. Especies de actinomicetos, como *Nocardia*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*, se han

descrito como productoras de sideróforos del tipo hidroximato (Müller & Raymond, 1984).

### **2.12.3 Control de patógenos**

La supresión de los patógenos vegetales provenientes del suelo, es un importante mecanismo indirecto para el desarrollo de la planta. La supresión de las poblaciones perjudiciales en la rizósfera, se produce por varios mecanismos, por antagonismo, competencia o resistencia inducida.

#### **a. Antagonismo**

La colonización del sistema radicular por las PGPRs provoca la liberación de metabolitos antagonistas involucrados en la inhibición directa de los patógenos vegetales (Shoda, 2000; Raaijmakers *et al.*, 2002).

Este mecanismo incluye la antibiosis y el parasitismo. La antibiosis implica la inhibición del crecimiento microbiano, a través de antibióticos difusibles y compuestos orgánicos volátiles, toxinas y biosurfactantes. En tanto que el parasitismo involucra la producción de enzimas extracelulares que degradan pared celular, como quitinasas y  $\beta$ -1, 3 -glucanasa (Compant *et al.*, 2005; Haas & Défago, 2005). La degradación de los factores de patogenicidad del agente patógeno, así como las toxinas del organismo benéfico, han sido reportados como mecanismos de protección (Haas & Défago, 2005).

Cepas de *Bacillus subtilis* producen una gran variedad de poderosos metabolitos antifúngicos, por ejemplo, zwittermicin-A, kanosamina y lipopéptidos de las familias surfactina, iturina y fengycina (Emmert & Handelsman, 1999). La excreción de quitinasas y glucanasas por especies de *Trichoderma* y *Streptomyces* también han demostrado que desempeñan un papel importante en parasitismo de hongos fitopatógenos (Whipps, 2001).

## **b. Competencia**

La competencia por sitios disponibles en las superficies de la raíz por los nutrientes proporcionados por ella y las semillas, así como por oxígeno, ocurre comúnmente entre organismos habitantes del suelo. El fenómeno de fungostasis o inhibición de la germinación de esporas fúngicas en el suelo, es el resultado de la competencia por nutrientes, especialmente carbono (Alabouvette *et al.*, 2006). Dada la abundancia relativa de sustratos en la rizósfera, la eficiencia en la absorción de nutrientes y catabolismo de las bacterias es un factor clave para la competitividad (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003). La implementación de estrategias metabólicas como la capacidad de conversión extracelular de la glucosa a ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico permite a algunas bacterias, incluyendo varias especies de *Pseudomonas*, secuestrar eficientemente glucosa y darle una ventaja competitiva sobre los microorganismos que carecen de la capacidad de utilizar estos compuestos (Gottschalk, 1986). La competencia por los elementos traza, como hierro, cobre, zinc, manganeso, etc., también se produce en los suelos. Por ejemplo, el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos vivos y la escasez de su forma bio-disponible en los hábitats del suelo resultan en una feroz competencia (Loper & Henkels, 1997).

## **c. Resistencia inducida**

Las bacterias asociadas a las plantas también pueden reducir la actividad de los microorganismos patógenos, activando una mejor defensa de la planta, fenómeno denominado “Resistencia Sistémica Inducida”, “ISR” por sus siglas en inglés (Shoda, 2000; vanLoon, 2007; Nihorimbere *et al.*, 2010).

A veces, el mecanismo de ISR elicitado por PGPRs, se traslapa parcialmente con la “Resistencia Sistémica Adquirida” (SAR) inducida por patógenos. Tanto ISR como SAR representan un estado de resistencia basal mejorada de la planta que depende de compuestos de señalización, como ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico (van Loon, 2007). La expresión de una reacción de defensa natural contra el estrés de origen biótico o abiótico es exhibido por todas las plantas, e involucran respuestas ante estrés físico (calor o frío); inoculación de organismos patógenos o no patógenos, moléculas químicas sintéticas o naturales (Alabouvette *et al.*, 2006).

El reconocimiento temprano del agresor por la planta es uno de los mecanismos implicados en la obtención de reacciones de defensa de la planta (Lugtenberg *et al.*, 2002). Se inicia de inmediato una cascada de señales moleculares y la transcripción de muchos genes, resultando, eventualmente, en la producción de las moléculas de defensa de la planta hospedera (van Loon, 2000). Tales moléculas de defensa incluyen a las fitoalexinas, proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, inhibidores de proteasas, etc.) y lignina para el refuerzo de las paredes celulares (van Loon, 2000). En efecto, el engrosamiento de la pared celular, las aposiciones de pared o la muerte rápida de las células vegetales dañadas como resultado de la necrosis de los tejidos adyacentes inmediatos, son barreras que impiden la nutrición del patógeno y contribuyen a aminorar la invasión progresiva de hongos (Lugtenberg *et al.* 2002; Alabouvette *et al.*,2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Área de estudio**

La zona de estudio se situó en la cuenca del río Ilave, de la provincia de El Collao, al sur del departamento de Puno (Figura 3), entre las coordenadas geográficas 16°06'00" y 69°38'00" de latitud sur y oeste, respectivamente. La cuenca tiene un área aproximada de 7705 km<sup>2</sup> y altitudes que oscilan entre 3830 - 5585 msnm. Mayormente, la superficie se encuentra cubierta de vegetación (pastos) y terrenos eriazos; con áreas dispersas y muy fragmentadas dedicadas al cultivo agrícola [4.98 %, de acuerdo a la Dirección Regional de Agricultura Puno (2008)] y donde la mayoría de unidades agropecuarias poseen superficies menores de 3 ha.

Se seleccionaron dos campos de cultivo de papas nativas de las comunidades altoandinas de Jallamilla y Concahui (3860 msnm), pertenecientes a miembros del Consorcio de Productores de Tunta "Los Aymaras". Los campos elegidos presentaban cultivos alternos de papas dulces y amargas, sembradas hacia finales de octubre del 2008 en suelos franco arenosos, poco profundos.

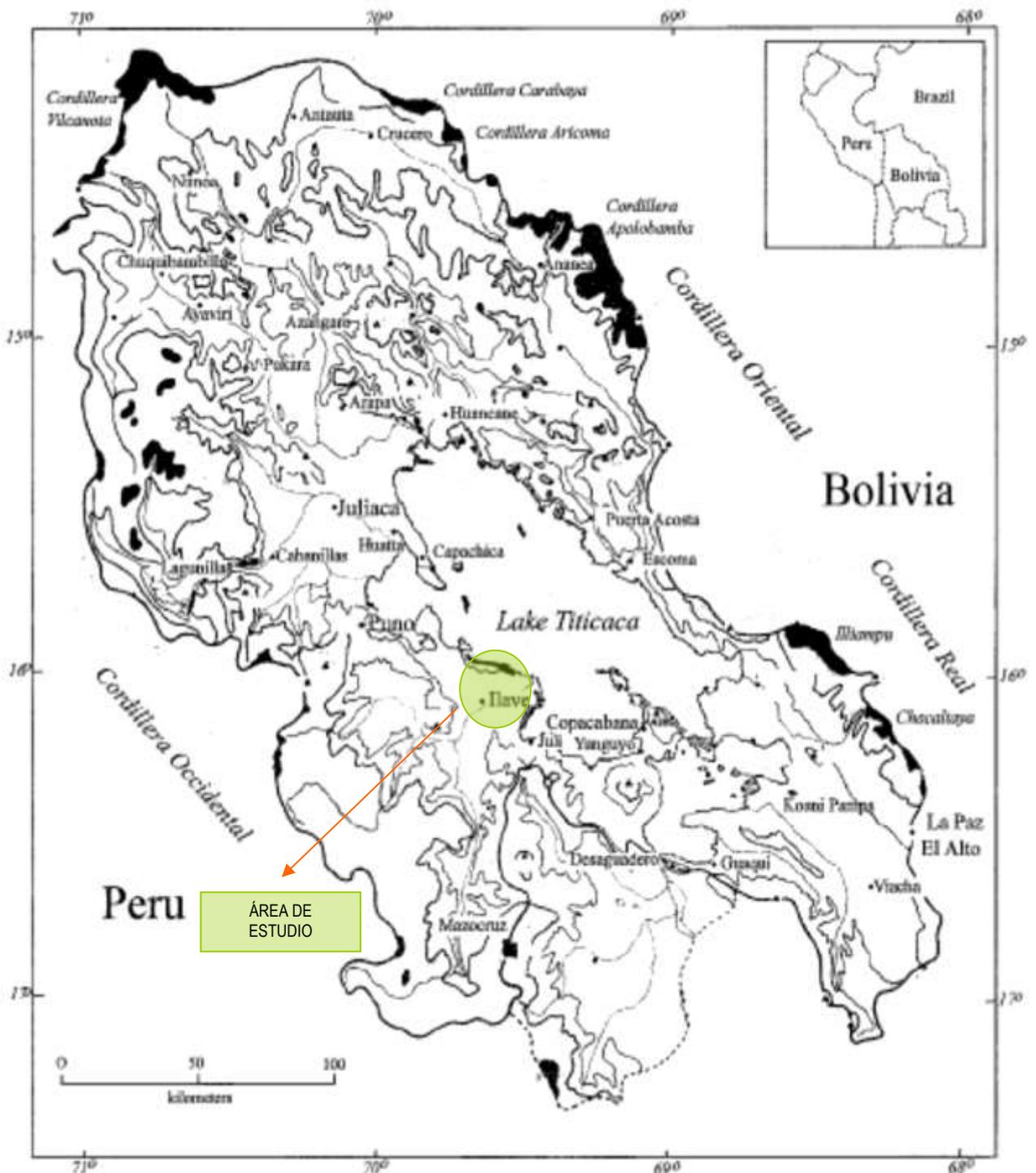
#### **3.2 Unidades experimentales**

Se escogió evaluar la rizósfera de papas nativas amargas de las variedades 'Occucuri blanco' y 'Locka' y los tubérculos de las mismas.

##### **3.2.1 Occucuri blanco o janko choquepito (*S. curtilobum*)**

Es una variedad de tolerancia media a las heladas, con un periodo vegetativo de 170 días, susceptible a la sequía, así como a la verruga y la roña y tolerante a la rizoctoniasis, pudrición seca y granizadas (medianamente). La forma de su tubérculo es

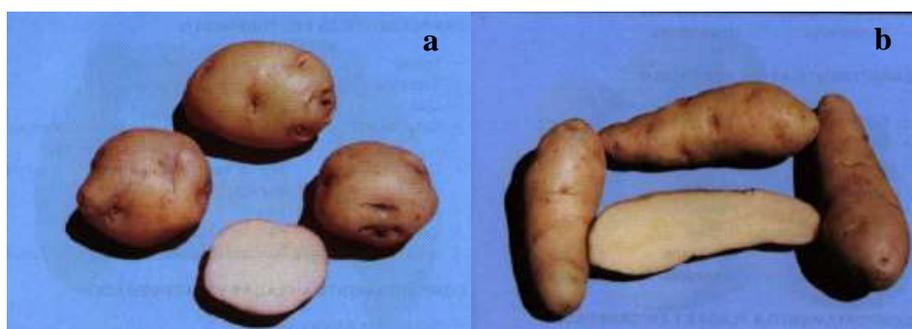
oblongo comprimido, de tamaño mediano a grande y con ojos semi-profundos, con piel color marfil claro y carne blanca (Figura 4a).



**Figura 3:** Ubicación geográfica del área de estudio

### 3.2.2 Locka (*S. juzepczukii*)

Está catalogada como una variedad altamente tolerante a las heladas. Tiene un periodo vegetativo aproximado de 160 días. Es susceptible a la sequía, como también a la verruga, roña, pudrición seca, rizoctoniasis y trips. Por otro lado, tiene tolerancia media a las granizadas. La forma de su tubérculo es fusiforme, de tamaño mediano a grande y con ojos superficiales, con piel color crema y carne blanca Figura 4b).



**Figura 4:** Tubérculos de papas nativas (a) Occucuri blanco, (b) Locka

### 3.3 Toma de muestras

Para cada campo de cultivo, se eligieron aleatoriamente, dos plantas de tamaño promedio de cada una de las dos variedades de papa seleccionadas (Sección 3.2). Se tomó una porción de suelo circundante a sus raíces, de aproximadamente 500 g. De los mismos campos, se tomaron muestras de suelo desnudo, de los alrededores de los surcos, que no presentan influencia de cultivos. Las muestras fueron colectadas en bolsas Ziploc, las mismas que se colocaron en un cooler con geles de refrigeración, para mantener una temperatura aproximada de 4 °C hasta el momento del ensayo. Las evaluaciones se realizaron en tres diferentes etapas de desarrollo fenológico (Cuadro 4): floración (enero del 2009), desarrollo de tubérculos (abril del 2009) y cosecha (mayo del 2009).

**Cuadro 4:** Distribución de muestras de suelo tomadas para el ensayo

<b>Muestreo</b>	<b>Comunidad</b>	<b>Variedad de papa</b>
Floración	Jallamilla	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
		Rizósfera - 'Locka'
		Suelo sin influencia de cultivos
	Concahui	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
Rizósfera - 'Locka'		
Suelo sin influencia de cultivos		
Desarrollo de tubérculos	Jallamilla	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
		Rizósfera - 'Locka'
		Suelo sin influencia de cultivos
	Concahui	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
Rizósfera - 'Locka'		
Suelo sin influencia de cultivos		
Cosecha	Jallamilla	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
		Rizósfera - 'Locka'
		Suelo sin influencia de cultivos
	Concahui	Rizósfera - 'Occucuri blanco'
Rizósfera - 'Locka'		
Suelo sin influencia de cultivos		

### **3.4 Lugar de ejecución**

La determinación de las poblaciones microbianas, aislamientos, ensayos de biología molecular y de capacidad promotora de crecimiento, se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" del Departamento de Biología la UNALM.

Los ensayos de caracterización, contenido de micronutrientes disponibles y metales pesados en suelos, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (UNALM).

### **3.5 Cuantificación de las poblaciones microbianas de la rizósfera de cultivos de papa amarga**

De cada una de las muestras (suelo o papa) se tomaron 10 g (previa homogenización) y se adicionaron a 90 mL de agua peptonada al 0.1 % p/v para luego ser mezclados por agitación vigorosa (dilución  $10^{-1}$ ). Se procedió a la realización de diluciones decimales seriadas, utilizando la misma solución diluyente.

Los recuentos en placa fueron realizados mediante la técnica de inoculación por incorporación. Las enumeraciones por número más probable (NMP) constaron de baterías de 3 tubos por dilución. Todos los resultados fueron expresados sobre la base de peso seco de la muestra de suelo y se reportaron en cada caso como UFC/g ó NMP/g.

#### **3.5.1 Aerobios mesófilos viables (AMV)**

Su cuantificación se realizó a través del método del APHA (1992). Alícuotas de 1 mL de cada una de las diluciones seleccionadas ( $10^{-4}$  –  $10^{-7}$ ) fueron inoculadas en placas Petri estériles (por duplicado), adicionando luego el agar Plate Count. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Se contabilizaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias y su media aritmética fue multiplicada por la inversa de la dilución y expresada como UFC/g.

#### **3.5.2 Mohos y levaduras (MYL)**

Se sembraron alícuotas de 1 mL de las diluciones  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  dentro de placas Petri estériles (por duplicado). Se utilizó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y la incubación de las placas se realizó durante 5 días a 25 °C. El conteo de estos microorganismos fue realizado en placas conteniendo entre 9 y 90 colonias y el resultado fue expresado como UFC/g.

#### **3.5.3 Actinomicetos (ACTI)**

Se incorporó el medio Almidón-Caseína a cada una de las placas inoculadas con las diluciones  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ . El medio fue suplementado con fluconazol al 0.25 %, para inhibir

el crecimiento de hongos. La incubación se realizó a 28 °C por 7 días. Las colonias características de este grupo microbiano fueron contabilizadas en placas conteniendo entre 30 y 300 colonias de actinomicetos. El resultado fue reportado como UFC/g.

#### **3.5.4 Bacterias esporogénicas**

Con la finalidad de destruir las células vegetativas, se aplicó un tratamiento térmico a cada una de las diluciones elegidas,  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ , utilizando baño de agua a 80 °C por 30 min (APHA, 1992). Se incorporó Agar Triptona Glucosa Extracto de Carne (TGE) a las placas Petri inoculadas con las alícuotas de las diluciones previamente tratadas. También fueron sembrados 10 mL de la dilución  $10^{-1}$ , como representación de la muestra original.

La incubación se dio a 28°C por 48 h (esporulados mesófilos) [EMA y EMANA], 5 - 10 °C por 7 - 10 días (esporulados psicrófilos) [EPA y EPANA] y a 52.5 °C por 48 h (esporulados termófilos) [ETA y ETANA]. La incubación se dio tanto en condiciones aeróbicas, como anaeróbicas. Para lograr las condiciones anaerobias, se hizo uso de jarras de incubación con sistemas generadores e indicadores de anaerobiosis Anaerocult® y Anaerotest®. Luego de transcurrido el periodo de incubación en cada uno de los casos, se contabilizaron las colonias crecidas en las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias y el resultado fue expresado como UFC/g.

#### **3.5.5 Bacterias sulfito reductoras (ASR)**

Se transfirió 1 mL de cada dilución seleccionada ( $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ ), en placas Petri estériles. Se adicionó Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN) y luego de homogenizar, las placas fueron invertidas e introducidas en una jarra de anaerobiosis, junto con un sistema generador de anaerobiosis e indicador (Anaerocult® y Anaerotest®). La incubación se dio a 35 °C durante 24 h. Se realizó el conteo de las colonias coloreadas de color negro (sulfito reductoras), de las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. Los resultados fueron expresados como UFC/g.

### **3.5.6 Diazótrofos de vida libre (DIAZO)**

Su determinación se realizó mediante el método del número más probable (Zapater, 1975). Se inoculó, por triplicado, 1 mL de cada una de las diluciones elegidas ( $10^{-1}$  –  $10^{-8}$ ) de la muestra, en tubos conteniendo 10 mL de medio mineral sin nitrógeno con indicador azul de bromotimol al 0.5 % (pH 7). Las baterías de tubos fueron incubadas a 28 °C por 7 - 10 días. La presencia de un velo superficial característico sobre el medio de cultivo, la turbidez y el cambio de color del indicador fueron reportados como resultados positivos en cada tubo y para la expresión de resultados se consultó la Tabla de NMP.

### **3.5.7 *Pseudomonas* sp.(PS)**

Una fase presuntiva (NMP) consideró la inoculación, por triplicado, de alícuotas de 1 mL con cada una de las diluciones elegidas ( $10^{-1}$  -  $10^{-6}$ ) en tubos con 10 mL de Caldo Asparagina. Después de 48 h de incubación a 28 °C, los tubos que registraron fluorescencia bajo la luz UV fueron transferidos a agar Cetrimide. Se evaluó el crecimiento característico de colonias luego de 24 h de crecimiento a 28 °C. Paralelamente, los cultivos fueron aislados en placas de agar no diferencial (ejem. agar nutritivo o agar tripticasa de soya) y desde los aislamientos frescos crecidos allí, se realizaron tinciones Gram y pruebas de la citocromo oxidasa, haciendo uso de tiras reactivas de Bactident oxidase®. Las bacterias Gram negativas, oxidasa positivas fueron consideradas del género *Pseudomonas* sp. y su cuantificación se dio a través de la consulta de la Tabla del NMP.

### **3.5.8 Coliformes totales (CT)**

En cada uno de 3 tubos conteniendo 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa y campana Durham invertida, se inoculó 1 mL de cada una de las diluciones seleccionadas de la muestra,  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ . La batería de tubos fue incubada a 35 - 37 °C durante 24 - 48 h. Los tubos que mostraron producción de gas, fueron transferidos (una asada) a tubos con 10 mL de caldo lactosa bilis (2 %) verde brillante con campana Durham invertida. Se evaluó la producción de gas luego de 24 - 48 h de incubación a  $36 \pm 1$  °C, que confirmó

la presencia de microorganismos coliformes. Para determinar el resultado, se consultó la Tabla del NMP y se reportó como NMP/g.

### **3.5.9 Coliformes fecales (CF)**

La siembra, por asada, se realizó a partir de los tubos de caldo lauril sulfato triptosa gas positivo, presuntivos de crecimiento coliforme y hacia tubos con 10 mL de caldo EC, los mismos que fueron incubados a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Transcurrido el periodo de incubación, se evaluó la formación de gas, que indicó un resultado positivo. Para la determinación de la cantidad de microorganismos coliformes fecales, se hizo uso de la Tabla del NMP.

## **3.6 Análisis estadístico de las poblaciones microbianas**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R (R Development Core Team, 2011).

### **3.6.1 Diferencias estadísticas de microorganismos en la rizósfera**

Para analizar las diferencias en la carga microbiana del suelo, se aplicó un diseño factorial completo  $3^2 \times 2$ , utilizando como factores la época de muestreo (Floración, Tuberización, Cosecha), el tipo de suelo (sin influencia de cultivos, rizósfera de Locka, rizósfera de Occucuri blanco) y la comunidad (Jallamilla, Concahui).

### **3.6.2 Diferencias estadísticas de microorganismos en tubérculos de papas amargas**

Para analizar las diferencias en la carga microbiana de los tubérculos, se aplicó un diseño factorial completo  $2 \times 2$ , utilizando como factores la comunidad (Jallamilla, Concahui) y la variedad de tubérculo (Occucuri blanco, Locka).

### **3.7 Ensayos de caracterización de suelos**

#### **3.7.1 Caracterización de suelos de la rizósfera de cultivos de papa de las comunidades elegidas**

- pH (suspensión suelo:agua, 1:1)
- Salinidad (C.E. del extracto acuoso suelo: agua, 1:1)
- Carbonatos totales (método gaso-volumétrico utilizando calcímetro)
- Materia orgánica (Método de Walkley y Black, oxidación del C-orgánico con dicromato de potasio)
- Fósforo disponible (método de Olsen modificado, extracción con  $\text{NaHCO}_3$  5 M, pH 8.5)
- Potasio disponible (extracción con acetato de amonio, pH 7.0)
- Textura del suelo (método del hidrómetro)
- Capacidad de intercambio catiónico (saturación con acetato de amonio, pH 7.0)
- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  cambiables (reemplazo con acetato de amonio, pH 7.0 y cuantificación por fotometría de llama y/o absorción atómica)
- $\text{Al}^{3+} + \text{H}^+$  (método de Yuan, extracción con KCl, N)

#### **3.7.2 Análisis de micronutrientes totales y disponibles**

- Boro, cobre, hierro, manganeso, zinc

#### **3.7.3 Análisis de metales pesados**

- Plomo, cadmio, cromo, arsénico

#### **3.7.4 Cuantificación de lombrices en el suelo**

Con ayuda de una pala de jardinero y por triplicado, se midió una porción de terreno de  $900 \text{ cm}^2$  (un pie cuadrado) y se cavó hasta una profundidad de 30.48 cm (12 pulg) [USDA, 1999]. Se intentó minimizar el número de cortes con la pala para evitar daño a las lombrices. Se estudiaron las muestras de suelo contra un fondo de color pálido para

facilitar el reconocimiento de las lombrices, las mismas que se separaron, contaron y pesaron.

### **3.8 Aislamiento de las cepas y caracterización morfológica**

Con ayuda de un asa de Kolle, se picaron las cepas más representativas de cada muestra analizada. Se sembraron en medio selectivo para el microorganismo aislado (Sección 3.5). Las colonias fueron re-aisladas las veces necesarias para obtener las cepas puras.

Las características morfológicas de las cepas aisladas fueron evaluadas a las 24 h de incubación en el medio selectivo, excepto para el caso de actinomicetos, que se incubaron por 3 días y los mohos que se hicieron crecer entre 3 y 5 días. Se tomaron en cuenta características de tamaño, borde, forma y textura de los aislamientos.

### **3.9 Conservación y almacenamiento de las cepas**

Se sembró una asada de las cepas bacterianas en caldo Casoy y se incubó a 28 °C durante 24 h. Para los actinomicetos, la incubación se dio en caldo Almidón – Caseína durante 72 h. Se tomó una alícuota de 1 mL del caldo y se dispensó en un vial criogénico. Luego se adicionó 0.5 mL de glicerol al 87 %. Las cepas fueron guardadas por duplicado en cajas criogénicas y se almacenaron en congelación a -80 °C.

### **3.10 Caracterización molecular de los aislamientos**

#### **3.10.1 Reactivación de las cepas**

Las cepas bacterianas a ensayarse fueron sembradas por estría en placas conteniendo medio de crecimiento no diferencial. Luego de su crecimiento se realizó un segundo pase y su incubación se dio a 28 °C por 18 - 24 h. De las colonias crecidas puras, se tomó una asada y se inoculó en tubos con 5 mL de caldo Casoy, los mismos que fueron llevados a agitación por 12 - 16 h a 28 °C.

### **3.10.2 Obtención de ADN bacteriano**

Se hizo uso del kit comercial AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Inc., USA). En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se colectó el caldo inoculado con la cepa a ensayar, aproximadamente  $1 \times 10^9$  células/mL (equivalente a 1 mL de cultivo bacteriano a un  $OD_{600} = 1.0 - 1.5$ ). Se centrifugó a  $12000 \times g$  por 30 min, luego de lo cual se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 150  $\mu$ L de buffer S, conteniendo RNasa A. Se añadieron 20  $\mu$ L de lisozima y luego de mezclar bien se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. A la mezcla fueron añadidos 30  $\mu$ L de EDTA (pH 8.0) 0.25 M y luego de homogenizar, los tubos fueron incubados en hielo durante 5 min. Transcurrido el tiempo se adicionaron 450  $\mu$ L de buffer G-A, se mezcló en vortex por 15 segundos y se calentó en baño de agua a 65 °C por 10 min. Seguidamente se añadieron 400  $\mu$ L de buffer G-B, 1 mL de buffer DV (pre enfriado a 4 °C) y se centrifugó a  $12000 \times g$  por 2 min. Luego de descartar la fase coloreada, se repitió la aplicación del buffer DV y los pasos subsiguientes. A continuación, la fase inferior se trasvasó a un filtro (Spin filter) posicionado dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugó a  $12000 \times g$  por 1 min. Se descartó el filtro y se adicionaron 400  $\mu$ L de buffer BV al filtrado, luego de mezclar bien, se trasvasó a una columna Miniprep, posicionada dentro de un microtubo de 1.5 mL. Se centrifugó a  $12000 \times g$  por 1 min. Descartado el filtrado, se añadieron 500  $\mu$ L de buffer W1 a la columna Miniprep y se centrifugó una vez más a  $12000 \times g$  por 1 min. Se repitió dos veces más el paso anterior, pero adicionando el buffer W2 en lugar del W1 y se descartando el filtrado. Finalmente se centrifugó ( $12000 \times g$  por 1 min) la columna Miniprep vacía, luego se transfirió a un microtubo nuevo y se incorporó, al centro de la membrana, 100 - 200  $\mu$ L de eluyente (pre calentado a 65 °C). Después de reposar por 1 min a temperatura ambiente se centrifugó a  $12000 \times g$  por 1 min, obteniéndose el ADN en solución.

### **3.10.3 Verificación de la calidad del ADN extraído**

Se preparó un gel de agarosa al 1 % en buffer tris-ácido bórico-EDTA 1X (TBE 1X), de dimensiones 15 x 10 cm. El gel solidificado fue colocado en el interior de una cámara de electroforesis y sumergido en buffer TBE 1X. Para cada cepa ensayada, se procedió a

mezclar 5  $\mu\text{L}$  del lisado con 1.0  $\mu\text{L}$  de buffer de carga loading dye 6X. Las mezclas fueron cargadas en cada uno de los pocillos del gel, destinando el primer pocillo al marcador molecular (1  $\mu\text{L}$  de Lambda DNA 500  $\mu\text{g}$  (Fermentas Inc., USA) + 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga + agua MilliQ c.s.p. 6  $\mu\text{L}$ ). Cargado el gel, se procedió al cierre de la cámara de electroforesis y a la conexión de los electrodos. La corrida electroforética fue llevada a cabo a 80 V por 60 min. Concluido el tiempo de corrida, el gel fue trasladado cuidadosamente a una bandeja con solución acuosa de bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dejando reposar durante 15 min. Posteriormente se traspasó el gel a una bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 min para su lavado. El gel fue colocado contra la luz UV del fotodocumentador y se tomaron las imágenes digitales respectivas.

### 3.10.4 Amplificación BOX-PCR

El análisis de las bandas de la caja BOX fue realizado de acuerdo a Versalovic *et al.* (1991), modificado por Ormeño-Orrillo (comunicación personal, 2006). Se empleó el primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').

La mezcla de reacción para la amplificación BOX-PCR (25  $\mu\text{L}$ ), constó de: buffer Taq +KCl -MgCl<sub>2</sub> (X), DMSO al 10 %, MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM, dNTPs 1.25 mM, primer BOX A1R 0.8 pmol/ $\mu\text{L}$ , Taq polimerasa 0.08 U/  $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$  de lisado. Los tubos de reacción fueron llevados al termociclador. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones.

Perfil de temperaturas para reacciones de amplificación BOX-PCR

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

Para comprobar la amplificación, 5  $\mu\text{L}$  de la reacción fueron mezclados con 1  $\mu\text{L}$  de loading dye 6X. La corrida electroforética se efectuó en gel de agarosa 1.5 % de

dimensiones 15 x 15 cm, durante 3 horas a 80 voltios. Se utilizó como marcador molecular Gene Ruler 1 kb ADN Ladder Plus (Fermentas Inc., USA).

### 3.10.5 Agrupamiento de perfiles BOX-PCR semejantes

Las imágenes de los geles con los perfiles de amplificación BOX-PCR de cada una de las cepas ensayadas, fueron alineados en función a los marcadores de peso molecular. Se compararon los perfiles entre sí, buscando bandas en común que muestren un mismo peso molecular. Se formaron agrupamientos de alta similitud, de manera que los patrones de los diferentes grupos obtenidos se diferenciaron uno del otro.

### 3.10.6 Amplificación del gen ribosomal 16S

Se tomó el ADN de las cepas representantes de cada agrupamiento de perfiles (Sección 3.10.5) y se les realizó la amplificación del gen ribosomal 16S, por medio de una reacción de PCR con los primers fD1 y rD (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') respectivamente. La mezcla de reacción para la amplificación (25 µL), constó de: buffer Taq +KCl -MgCl<sub>2</sub> (X), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.5 mM, primers 0.5 pmol/µL cada uno, Taq polimerasa 0.5 U/µL y 5 µL de lisado. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones.

Perfil de temperaturas para reacciones de amplificación del gen 16S

Desnaturalización inicial	93 °C x 2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C x 45 s	
Annealing	62 °C x 45 s	30 ciclos
Extensión	72 °C x 2 min	
Extensión Final	72 °C x 5 min	1 ciclo

Los productos de amplificación fueron corridos en gel de agarosa 1 % en buffer TBE 1X (dimensiones 15 x 10 cm) en cámaras de electroforesis a 60 V por 150 min

aproximadamente hasta que la banda más oscura del buffer alcance la mitad del largo del gel. Se utilizó como marcador molecular Gene Ruler 1 kb ADN Ladder Plus (Fermentas Inc., USA). Luego de realizar el revelado del gel, se apreció una banda a un peso molecular de 1500 pb.

### **3.10.7 Purificación del producto de amplificación del gen ribosomal 16S**

Para eliminar cualquier tipo de impureza que pueda dañar o degradar el producto de amplificación, se realizó la purificación del producto de amplificación, para ello, se añadió un volumen triple de buffer PCR – A, a dicho producto. Se colocó una columna de PCR (AxyPrep Inc., USA) al interior de un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se pipeteó la reacción anterior hacia dentro de la columna. Se procedió luego a centrifugar a 12 000 x g por 1 min. Se descartó el filtrado del tubo de microcentrífuga y se colocó nuevamente la columna de PCR dentro del mismo tubo.

Luego de adicionar 700 µL de buffer W2 dentro de la columna se centrifugó nuevamente, descartando otra vez el filtrado e incorporando 400 µL adicionales del mismo buffer. Se transfirió la columna de PCR al interior de un tubo de eppendorf de 1.5 mL. Para eluir el DNA, se añadieron 25 - 30 µL del eluyente (pre-calentado a 65 °C) hacia el centro de la membrana. Se dejó reposar por 1 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó 12000 x g por 1 min.

### **3.10.8 Secuenciamiento del gen ribosomal 16S y establecimiento de las relaciones filogenéticas**

Para el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las cepas caracterizadas, se realizó el secuenciamiento del gen ribosomal 16S. Los productos de PCR purificados fueron enviados a Macro Gen Inc. (Seúl, Korea), laboratorio que brinda dicho servicio.

Tras la obtención de los cromatogramas, y empleando los programas BioEdit versión 7.0.5.3 y Chromas Lite versión 2.01, las secuencias obtenidas fueron revisadas, tratando de detectar posibles errores por solapamiento o repetición de bases. Las secuencias dadas por cada primer (fD1 y rD1) fueron alineadas y empalmadas y la identificación de

secuencias de cepas tipo y cepas de referencia se realizó a través del BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) y EzTaxon (Chun *et al.*, 2007). El software ClustalX 2.0.5 (Thompson *et al.*, 1997), permitió la alineación de las secuencias de las cepas problema y de las cepas tipo. Una vez alineadas se cortaron los extremos para que todas las secuencias tengan la misma longitud

Para la construcción de la filogenia se utilizó el método estadístico neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) el cual es ampliamente empleado en estudios de evolución basados en técnicas moleculares, utiliza una matriz de distancias, la cual va agrupando en parejas según la divergencia promedio hasta llegar a una base. Por otro lado, haciendo uso del software Mega4 (Tamura *et al.*, 2007), se empleó el distanciamiento filogenético computado por el modelo de Tamura-Nei, en tanto que el test de filogenias inferidas “bootstrap” evaluó la fidelidad del árbol filogenético construido. El test bootstrap crea un número arbitrario de posibles dendrogramas por medio de cambios puntales en diferentes bases de las secuencias y elige uno de consenso, así, en cada divergencia se muestra un porcentaje el cual representa el número de ramas que se han repetido del total de árboles creados.

### **3.11 Determinación de la capacidad PGPR de los aislamientos**

#### **3.11.1 Influencia de la inoculación de cepas con potencial PGPR en la germinación de semillas de trébol rojo**

##### **- Preparación del inóculo**

A partir de cultivos frescos de cada una de las cepas microbianas a ensayar, se inocularon, independientemente, frascos con caldo Extracto de Levadura – Manitol (LMC). El medio fue incubado a 28 °C, durante 24 h. Los inoculantes provenientes de las cepas de diazótrofos y *Pseudomonas* fueron ajustados a una concentración aproximada de  $10^8$  UFC/ml ( $\% T_{600\text{ nm}} = 60\%$ ); los provenientes de cepas de *Bacillus* fueron ajustados a una población aproximada a  $10^5$  UFC/ml.

- **Desinfección de semillas**

Las semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), un promedio de 120 por cepa a ensayar, fueron sumergidas en una solución 70 % alcohol durante 3 min, tras lo cual se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente fueron sumergidas en solución 3 % hipoclorito de sodio, durante 3 min, enjuagando repetidamente con agua destilada estéril, hasta asegurar la pérdida de olor de las soluciones desinfectantes (Zúñiga, 2012).

- **Inoculación de semillas y siembra en placas**

Las semillas previamente desinfectadas, fueron embebidas durante 15 min en el caldo microbiano correspondiente a la cepa a ensayar. El exceso de inóculo en las semillas fue retirado por contacto con papel toalla estéril. Se utilizó agua destilada estéril para embeber las semillas del tratamiento control (sin inoculación).

Por cada tratamiento inoculado, se dispusieron tres placas petri (120 x 20 mm), con agar agua 0.75 %. Con la ayuda de pinzas estériles, se colocaron 36 semillas sobre el agar de cada una de las tres placas. De manera similar, se procedió a colocar las semillas del tratamiento control. Las placas fueron incubadas en oscuridad a  $22 \pm 2$  °C durante 72 h.

- **Parámetros de evaluación**

Se reportó la cantidad de semillas que evidenciaban aparición de radícula y si presentaban o no pubescencia radicular. Las evaluaciones fueron realizadas cada 24 h y durante 3 días.

Finalizado el ensayo, se retiraron los germinados del medio de crecimiento de cada una de las 3 placas por tratamiento. La sección aérea fue separada de la radícula y haciendo uso de una balanza analítica, se procedió a realizar el pesado en fresco. Las secciones fueron colocadas dentro de sobres de papel, y fueron llevadas a estufa a 50 °C por 48 h, periodo después del cual se halló el peso seco.

- **Análisis estadístico de la biomasa de tréboles inoculados con cepas microbianas**

Para analizar las diferencias de la biomasa de tréboles inoculados con cepas microbianas, se aplicó el Anova de una vía y su alternativa no-paramétrica Kruskal Wallis, así como otras pruebas de comparación de pares de tratamiento asumiendo varianzas no homogéneas como la de T3 Dunnet.

### **3.11.2 Determinación de la capacidad de producción de AIA**

Por medio de este ensayo, se determina la capacidad de producir AIA o alguno de sus precursores (Bric *et al.*, 1991). La aparición del color rosa a fucsia, es debida a una reacción oxidativa causada por el ácido, y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el cloro del  $\text{FeCl}_3$ , presente en el reactivo de Salkowsky (Gordon & Weber, 1951).

Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión microbiana de  $\text{D.O.}_{500\text{nm}} = 60\%$  Transmitancia (aproximadamente  $10^6$  UFC/mL) en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio de cultivo LMC suplementado con 2.5 mM de L-triptófano. Los tubos fueron incubados a 28 °C durante 12 días. Durante este período, se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y se trasvasaron a un eppendorf, centrifugando a 12000 rpm por 5 min. Alícuotas de 250  $\mu\text{L}$  del sobrenadante (por duplicado) fueron colocadas en tubos de ensayo, adicionando luego 1 mL de reactivo de Salkowsky (proporción 1:4) (Gordon & Weber, 1951). Seguidamente, los tubos fueron incubados por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia de la mezcla a 530 nm en el espectrofotómetro (Genesys 6 – Thermo Electron Corp.). El nivel producido de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) fue estimado por una curva estándar.

### **3.11.3 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos**

Se sembró, por puntura, en el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) con fosfato bicálcico o tricálcico y en medio YED-P (Extracto de levadura-dextrosa con fosfato tricálcico), una colonia proveniente de una cepa fresca y pura, y se

incubó a 28 °C por 5 a 15 días, durante los cuales se realizaron evaluaciones periódicas de la formación de halos transparentes de solubilización alrededor del crecimiento de las colonias. Se reportó el diámetro de los halos (Nautiyal, 1999), así como la eficiencia de solubilización (SE) de acuerdo a Nguyen *et al.* (1992), donde:

$$SE = [\text{diámetro de solubilización (mm)} / \text{diámetro de la colonia (mm)}] \times 100$$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de suelos de cultivo de papas amargas

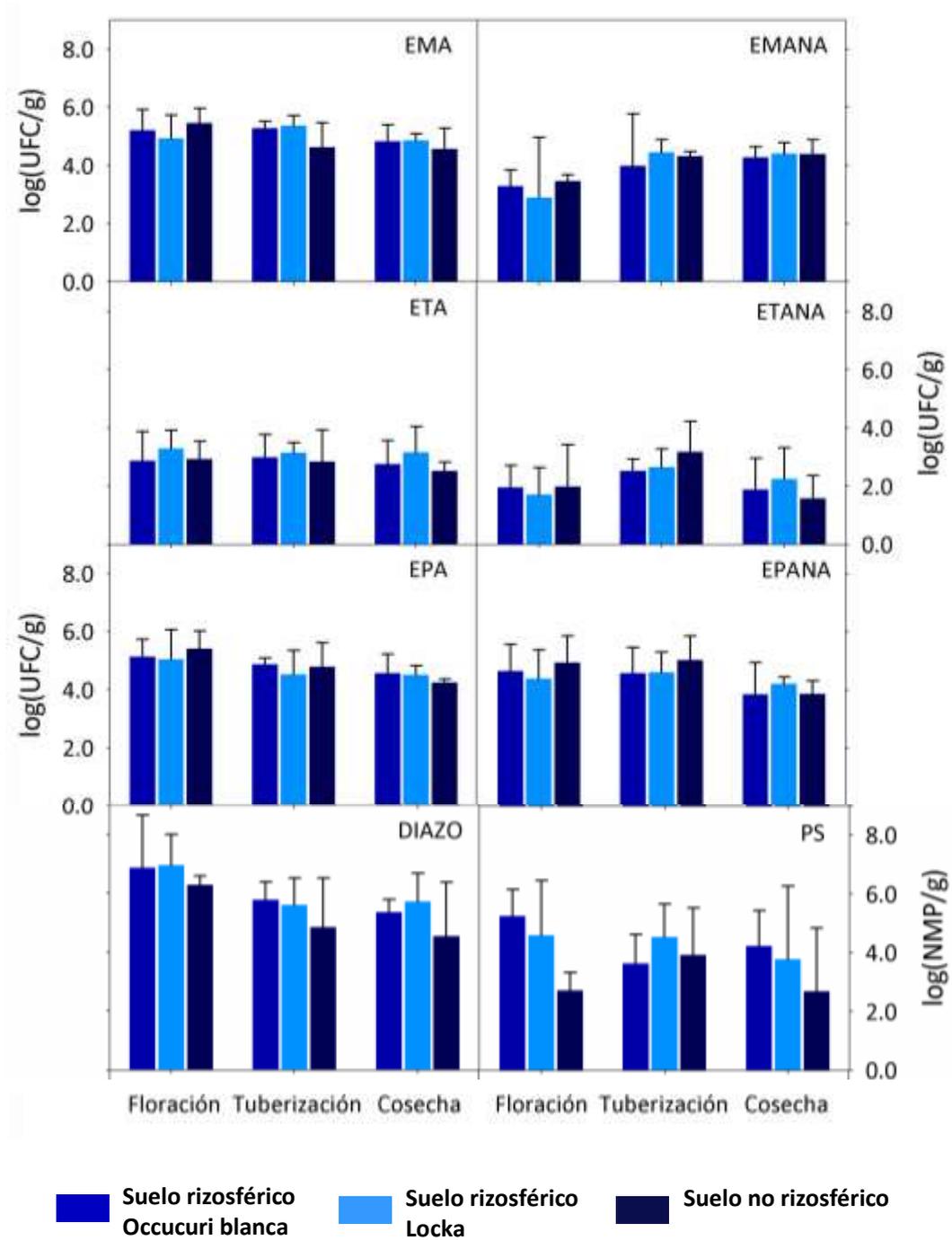
#### 4.1.1 Análisis microbiológico

En las Figuras 5 y 6, se presentan los resultados de la cuantificación de los microorganismos rizosféricos de papas amargas, variedades Occucuri blanco y Locka destinadas para la elaboración de tunta (resultados expresados como logaritmo de las poblaciones encontradas).

En la mayoría de los grupos microbianos estudiados (EMA, EMANA, ETANA, EPA, EPANA, ASR, ACTI, DIAZO, CF) se observaron diferencias significativas en las poblaciones según la época de muestreo (Floración, Desarrollo de tubérculos ó Cosecha), no encontrándose diferencias según la comunidad ni en la variedad cultivada. Los efectos simples de la época de muestreo fueron diferentes para cada grupo microbiano, no mostrando un patrón uniforme. Además del estado fisiológico de la planta, influyó también la temperatura del suelo, la cual estuvo dentro de los siguientes rangos durante los muestreos: 13 - 15 °C (enero), 10 - 12°C (abril), 8 - 11 °C (mayo).

Según definición, la rizósfera es la zona inmediatamente influenciada por las raíces vivas de las plantas y se caracteriza por su fuerte relación a la actividad microbiana en suelos. El suelo rizosférico soporta mayores densidades de microorganismos que aquellos suelos libres de raíces, en buena parte debido a los exudados radicales, descamación de células y tejidos que actúan como fuente de carbono, energía, nitrógeno, fósforo, etc.; por la alteración de la estructura del suelo y la óxido-reducción de materiales orgánicos o minerales, entre otros (Frioni, 1999). Sin embargo, la influencia rizosférica solo se evidenció en las poblaciones de diazótrofos de vida libre y *Pseudomonas* sp. (Figura 5). Así, durante la floración, las *Pseudomonas* se mostraron en mayor cantidad en los suelos cultivados ( $10^5$  NMP/g) respecto el suelo descubierto

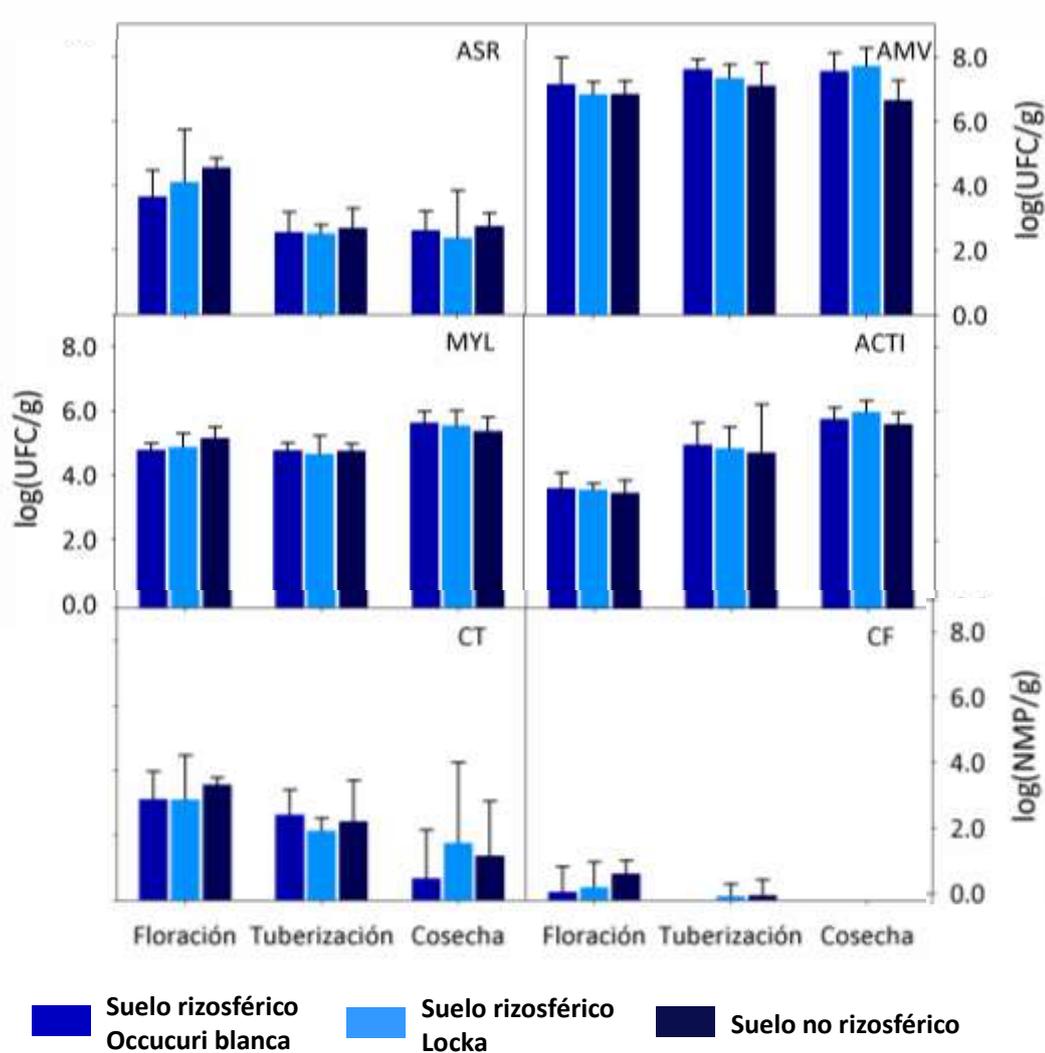
( $10^3$  NMP/g). En efecto, entre el 30 – 40 % de la materia orgánica del suelo ingresa por exudación (Lee & Pankurst, 1992) y el papel de los exudados no se reduce a retribuir a



**Figura 5:** Poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas. Esporogénicos mesófilos aerobios (EMA) y anaerobios (EMANA), esporogénicos termófilos aerobios (ETA) y anaerobios (ETANA), esporogénicos psicrófilos aerobios (EPA) y anaerobios (EPANA), diazótrofos de vida libre (DIAZO) y *Pseudomonas* (PS).

los microorganismos con fuentes de carbono sencillas, sino que la planta es capaz de modificar las pautas y composición de sus exudados para favorecer o seleccionar a determinadas bacterias para que mejoren el desarrollo del vegetal y ya es ampliamente conocido que algunas especies de diazótrofos, así como *Pseudomonas* son grupos microbianos que poseen capacidades benéficas para ciertos cultivos.

Los diazótrofos se caracterizan por crecer en zonas inmediatamente adyacente a las raíces, ayudando a fijar nitrógeno y produciendo también hormonas de crecimiento que



**Figura 6:** Poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas. Anaerobios sulfito reductores (ASR), aerobios mesófilos viables (AMV), mohos y levaduras (MYL), actinomicetos (ACTI), coliformes totales (CT) y fecales (CF).

afectan el desarrollo radicular. En tanto que las bacterias del género *Pseudomonas* degradan una amplia variedad de azúcares, aminoácidos, alcoholes y aldosas provenientes de los exudados radiculares y han demostrado tener efecto benéfico en la nutrición de la planta, mediante la producción de sideróforos; algunas especies pueden degradar compuestos de elevado peso molecular como ácidos húmicos y pesticidas, unas son utilizadas en el control de fitopatógenos y otras producen sustancias estimuladoras de crecimiento como etileno y ácido indol acético (Paul & Clark, 1996). No se reportó influencia significativa de la rizósfera en el resto de las poblaciones microbianas. La cantidad de aerobios mesófilos viables estuvo siempre en el rango de  $10^6 - 10^7$  UFC/g (Figura 6), el de mohos y levaduras entre  $10^4 - 10^5$  UFC/g; Calvo *et al.* (2009), reportaron cantidades de  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g bacterias para la rizósfera de cultivos de papas nativas de variedades imilla negra y ccompis en nueve localidades aledañas al Lago Titicaca (suelo franco arenoso de pH 6.25) y el mismo rango de hongos que el encontrado en esta investigación. Las poblaciones de *Bacillus* sp. que reportaron, estuvieron en  $10^5$  UFC/g, en Jallamilla y Concahui el rango de esporulados mesófilos aerobios (EMA) estuvo entre  $10^4 - 10^5$  UFC/g y  $10^2 - 10^3$  UFC/g esporulados mesófilos anaerobios (EMANA) (Figura 5).

Según Frioni (1999), los efectos sobre la población del suelo varían con la especie o la variedad del vegetal. Kato-Noguchi & Ino (2005) y Kerdchoechuen (2005) han manifestado de igual manera que la composición química de los exudados radiculares varía no sólo entre las diferentes especies de plantas, sino también entre cultivares de la misma especie vegetal. Diferentes variedades de la misma especie podrían presentar algunas diferencias fisiológicas, por ello, bajo las mismas condiciones de cultivo, las diferentes variedades pueden promover la selección de las distintas comunidades microbianas asociadas a los tejidos vegetales (Gomes *et al.*, 2003). Por lo dicho anteriormente cabría esperar diferencias entre las poblaciones microbianas de las dos variedades de papa evaluadas, más aún perteneciendo a diferente especie, sin embargo este efecto no fue evidenciado, por lo que resultaría conveniente el análisis químico de los exudados de los cultivos para dar una mejor explicación al evento. Las moléculas liberadas vía exudación, desempeñan diversas funciones, además de servir como sustratos carbonados (azúcares) y nitrogenados a los microorganismos. Algunas sirven como precursores para la síntesis de otras moléculas que alteran la fisiología de la planta, por ejemplo, el triptófano como precursor de auxinas. Otras moléculas funcionan

como sustancias quimiotácticas (ácidos fenólicos) o inhibidoras frente a otros microorganismos, o también pueden mejorar la nutrición mineral de la planta, como los ácidos orgánicos.

Evaluando la dinámica de las poblaciones en el tiempo, podemos apreciar la existencia de tendencias al incremento o el decline de determinados grupos microbianos. Frioni (1999) reporta que los máximos de estimulación encontrados se producen durante las etapas de floración y/o fructificación, para luego declinar abruptamente cuando comienza la senescencia de las raíces. Gomes *et al.* (2003) e Ibekwe & Grieve (2004) también observaron una mayor influencia de la planta en la rizósfera asociada a comunidades microbianas en las primeras etapas de desarrollo. Durante el primer muestreo (floración), la población de *Pseudomonas* sp. fue mayor que en los muestreos siguientes, mostrando un ligero decline de  $10^5$  a  $10^4$  NMP/g, aunque este resultara no significativo (Figura 5). En el caso de los diazótrofos sí se produjo una disminución significativa de las poblaciones entre muestreos, desde  $10^7$  -  $10^8$  NMP/g, durante la floración, hasta  $10^5$  -  $10^6$  NMP/g, durante la cosecha.

Durante la senescencia proliferan microorganismos que participan en descomposición de los tejidos muertos. Las bacterias son más eficaces que los hongos al utilizar compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, los hongos metabolizan fácilmente los polímeros de elevado peso molecular, que son más abundantes en los restos vegetales. Por ello son más eficaces durante el comienzo de la descomposición de las raíces muertas (Nakas & Klein, 1980), en la Figura 6, se observa una ligera tendencia al aumento del grupo de mohos y levaduras hacia etapas tardías de los cultivos. Las diferencias son más marcadas y significativas en la proliferación de los actinomicetos, ya que este grupo microbiano se desarrolla en presencia de materia orgánica en descomposición, siendo capaces de degradar compuestos de gran resistencia, tales como celulosa, lignina, quitina, pectina, queratina, complejos aromáticos, ácidos húmicos y fosfolípidos, hacia formas más simples. Los actinomicetos variaron su población desde  $10^3$  UFC/g en el primer muestreo, hasta  $10^5$  UFC/g, a la cosecha (Figura 6). El suelo de la comunidad de Concahui, con mayor contenido de materia orgánica (Sección 4.1.2), registró mayor población de este grupo microbiano respecto a la encontrada en Jallamilla, aunque la diferencia no resultase significativa. También debe indicarse que los suelos rizosféricos siempre presentaron mayor contenido de este grupo

microbiano que el suelo no rizosférico (diferencias no significativas), esto seguramente por el contenido de materia orgánica del suelo. Así mismo, debe señalarse que las poblaciones de actinomicetos son sensibles a condiciones de acidez del suelo, Brady & Weil (2008) reporta que el desarrollo óptimo de este grupo microbiano se da entre pH 6.0 y 7.5 y los pH de los suelos de las dos comunidades en estudio estuvieron en el rango de 5.09 - 5.54. Esto explicaría en parte las bajas poblaciones obtenidas para actinomicetos en las etapas tempranas de los cultivos ( $10^3$  UFC/g). A pesar de ello, estas cantidades son superiores a las reportadas por Calvo *et al.* (2009), quienes encontraron durante la etapa previa a la cosecha de papas dulces, cantidades de  $10^4$  UFC/g, en tanto que las encontradas en la presente investigación estuvieron en el orden de  $10^5$  -  $10^6$  UFC/g.

Sin embargo, hablar de rizósfera o de la influencia de las plantas en el suelo resulta complejo. Son varios los factores que influyen en la respuesta final, las características del cultivo, la edad de la planta, su estado sanitario y vigor, el tipo y posición de la raíz, así como el tipo de suelo, las prácticas de cultivo, el ambiente, el estrés biótico o abiótico y el factor climático determinan el efecto rizosférico. Así mismo, el grado de lignificación del aparato radical, el cual está asociado a la edad del cultivo, afecta decisivamente la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Lynch, 1990; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1995) y, por lo tanto, es un factor que influye en el funcionamiento de la rizósfera. También debe remarcarse que en campo el control de todas estas variables es más complicado, aunque lo encontrado se ajuste mejor a las condiciones reales.

Finalmente, los resultados encontrados no implican que una población elevada presente una mayor diversidad microbiana, esto solo se sabrá luego de un adecuado procedimiento de identificación de microorganismos. Ferreira *et al.* (2008) encontraron que diferentes variedades de papa mostraron diferentes perfiles PCR-DGGE y encontraron que la similitud entre comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de los diferentes cultivos era menor conforme avanzaba el periodo de crecimiento de la planta.

#### **4.1.2 Análisis Físicoquímico**

##### **- Análisis de caracterización de suelos**

Los resultados del análisis de caracterización de los suelos de cultivo de papa amarga (variedades locka y occucuri blanco) de las comunidades de Concahui y Jallamilla (Cuadro 5), reflejan suelos de textura moderadamente gruesa, franco arenosos, de acidez moderada a fuertemente ácida (pH: 5.07 - 5.78), no salinos (C.E.[e.s.]: 0.46 - 1.08 dS/m), con ausencia de carbonatos, contenido de materia orgánica bajo a medio (1.5 - 3.6 %), altos en fósforo (15.0 - 25.1 ppm) y potasio disponibles (368 - 464 ppm), así como baja a media retención de iones (C.I.C.: 9.92 - 11.36 me/100 g).

Evaluando ciertas tendencias de los resultados, respecto a las variedades de papa ensayadas, se observa una mayor C.E.(e.s.) para los suelos de cultivo de papa variedad Locka (0.84 - 1.08 dS/m) respecto a la C.E.(e.s.) de los suelos cultivados con papa variedad Occucuri blanco (0.46 - 0.56 dS/m); así mismo, suelos con Occucuri blanco presentan menor contenido de fósforo disponible (15.0 - 19.1 ppm) respecto a lo reportado por el suelo de Locka (25.1 - 21.4 ppm). Del mismo modo se puede señalar que la cantidad de manganeso disponible es mayor en suelo de la variedad Locka (11.8 - 12.10 ppm).

Luego de realizar los cálculos de las relaciones catiónicas de los elementos en el suelo, se determinó que en los cultivados con la variedad Occucuri blanco, existe un desbalance producto de un estado hipocálcico (T1 y T6), existiendo además un estado hipomagnésico en T6. Los suelos de la variedad Locka, que fueron evaluados, evidenciaron estados hipocálcico e hipomagnésico (T4 y T7), además de estado hipopotásico (suelo T7).

##### **- Análisis de micronutrientes disponibles**

El pH del suelo de la comunidad de Jallamilla, pH: 5.29 - 5.78, se encuentra asociado a la máxima disponibilidad de varios de los micronutrientes. En efecto, el hierro se encuentra en concentraciones altas (85.0 - 182.0 ppm), el manganeso se encuentra alrededor del nivel medio – alto (4.8 - 12.1 ppm), el zinc presenta niveles medios (2.0 - 3.1 ppm) y el cobre está en niveles óptimos (2.2 - 3.6 ppm). Sin embargo, el boro se

encuentra en concentraciones bajas a medias (0.3 - 0.9 ppm) [Cuadro 6], lo que podría llevar a degeneración de tejidos meristemáticos, ruptura de tejidos que provocan manchas necróticas y alteración del desarrollo del tubo polínico

Respecto al contenido de micronutrientes disponibles en el suelo de la comunidad de Concahui (pH: 5.07 - 5.10), se revela un nivel alto de hierro (298.0 - 302.0 ppm), evidentemente superior a lo encontrado en la comunidad de Jallamilla, el boro está presente en nivel óptimo - alto (0.5 - 1.6 ppm), el cobre también se encuentra en concentraciones óptimas (3.4 - 3.5 ppm); el manganeso se encuentra alrededor del nivel medio-alto (4.6 - 11.8 ppm). Sin embargo, el zinc es el micronutriente de concentración baja en el suelo, por lo que podrían verse afectados alterados muchos procesos metabólicos y síntesis de auxinas, velocidad de germinación y vigor de la plántula (Ratto & Miguez, 2006).

#### - **Análisis de metales pesados**

La acumulación de metales pesados en tejidos vegetales por absorción u otras formas de asociación natural, lo hace potencialmente biodisponibles a los seres humanos y animales a través del consumo de productos (Gincchio *et al.*, 2002; Friesl *et al.*, 2006; Ruiz & Armienta, 2012). Los suelos ensayados de las comunidades de Jallamilla y Concahui presentaron valores de plomo, cadmio y cromo considerados normales (Lacutusu, 2000). El Pb se presentó en niveles inferiores a 13.53 ppm, el Cd tuvo un máximo de 0.01 ppm y el Cr no superó los 7.72 ppm (Cuadro 7).

Los suelos de la comunidad de Jallamilla excedieron el límite máximo permisible de arsénico [10 ppm (US Environmental Protection Agencies - EPA) y 20 ppm (Minnesota Department of Health)], presentando valores entre 20.96 - 27.00 ppm; la contaminación con arsénico interfiere con el proceso metabólico y podría esperarse una disminución de la germinación de las semillas (Franco-Hernández *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010). Es discutida la concentración de este elemento en suelos de la comunidad de Concahui. De acuerdo a la EPA, el límite máximo permisible es de 10 ppm, en tanto los estándares en países como Canadá, Inglaterra, Países Bajos y Australia se encuentran en el rango de 10 - 20 ppm para suelos de uso agrícola, siendo tóxico a 5 ppm para cultivos sensibles (Duxbury & Zavala, 2005). Otros autores (Minnesota Department of Health, 2007)

reportan como rango seguro 5 - 20 ppm de arsénico en suelo. Visto desde el punto de vista de la EPA, los suelos de Concahui, podrían significar un riesgo para la salud humana, por haberse presentado muestras con 15.13 ppm.

### **4.1.3 Cuantificación de Lombrices**

En el suelo de cultivo de la comunidad de Concahui se encontró un total de 82 lombrices/m<sup>2</sup> de capa arable (35 cm de profundidad), con un peso fresco de 13.25 g y 3.36 g de peso seco. En el suelo del terreno de cultivo de la comunidad de Jallamilla solo se evidenciaron 6 lombrices/m<sup>2</sup> de capa arable, que tuvieron 0.935 g de peso fresco y 0.28 g de peso seco.

La USDA (1999) considera que alrededor de 100 lombrices/m<sup>2</sup> es una población adecuada en sistemas agrícolas, reportando además que las poblaciones por lo general no exceden a 200 lombrices/ m<sup>2</sup> en sistemas cultivados. Visto desde este modo, el suelo de la comunidad de Concahui se aproxima más a los valores referenciales y tomando este parámetro como indicador de la calidad del suelo, se puede podría inferir que el suelo de Concahui tiene mejores características nutricionales y físicoquímicas que el suelo de Jallamilla. Se ha reportado que las lombrices mejoran la calidad del suelo incrementando la disponibilidad de nutrientes, acelerando la descomposición de materia orgánica, a través de la incorporación de residuos al suelo y activando procesos de mineralización como los de humificación. Así mismo, mejora las condiciones físicas del suelo, tales como agregación y porosidad y suprime ciertas plagas u organismos nocivos, acrecentando el número de microorganismos benéficos (USDA, 1999).

**Cuadro 5:** Caracterización de los suelos rizosféricos de las comunidades de Jallamilla y Concahui

Cód.	Localidad	Variedad	pH	C.E. [1:1] (dS/m)	CaCO <sub>3</sub> (%)	M.O. (%)	P (ppm)	K (ppm)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural	CIC (me/100g)	Ca <sup>2+</sup> (me/100g)	Mg <sup>2+</sup> (me/100g)	K <sup>+</sup> (me/100g)	Na <sup>+</sup> (me/100g)	Al <sup>3+</sup> + H <sup>+</sup> (me/100g)
T1	1	1	5.78	0.23	0.00	1.50	15.00	368.00	70.00	22.00	8.00	Fr.A.	9.92	6.37	1.93	0.71	0.26	0.20
T4	1	2	5.29	0.42	0.00	2.80	25.10	401.00	68.00	28.00	4.00	Fr.A.	10.72	5.37	1.15	0.78	0.69	0.30
Media			<b>5.54</b>	<b>0.33</b>	<b>0.00</b>	<b>2.15</b>	<b>20.05</b>	<b>384.50</b>	<b>69.00</b>	<b>25.00</b>	<b>6.00</b>	<b>Fr.A.</b>	<b>10.32</b>	<b>5.87</b>	<b>1.54</b>	<b>0.75</b>	<b>0.48</b>	<b>0.25</b>
SD			0.35	0.13	0.00	0.92	7.14	23.33	1.41	4.24	2.83		0.57	0.71	0.55	0.05	0.30	0.07

Cód.	Localidad	Variedad	pH	C.E. [1:1] (dS/m)	CaCO <sub>3</sub> (%)	M.O. (%)	P (ppm)	K (ppm)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural	CIC (me/100g)	Ca <sup>2+</sup> (me/100g)	Mg <sup>2+</sup> (me/100g)	K <sup>+</sup> (me/100g)	Na <sup>+</sup> (me/100g)	Al <sup>3+</sup> + H <sup>+</sup> (me/100g)
T6	2	1	5.07	0.28	0.00	2.90	19.10	464.00	62.00	32.00	6.00	Fr.A.	11.04	5.25	0.75	0.75	0.31	0.30
T7	2	2	5.10	0.54	0.00	3.60	21.40	398.00	60.00	34.00	6.00	Fr.A.	11.36	5.86	0.77	0.81	0.24	0.40
Media			<b>5.09</b>	<b>0.41</b>	<b>0.00</b>	<b>3.25</b>	<b>20.25</b>	<b>431.00</b>	<b>61.00</b>	<b>33.00</b>	<b>6.00</b>	<b>Fr.A.</b>	<b>11.20</b>	<b>5.56</b>	<b>0.76</b>	<b>0.78</b>	<b>0.28</b>	<b>0.35</b>
SD			0.02	0.18	0.00	0.49	1.63	46.67	1.41	1.41	0.00		0.23	0.43	0.01	0.04	0.05	0.07

Comunidad: (1) Jallamilla, (2) Concahui.

Variedad: Suelo cultivado con papa (1) Occucuri blanco, (2) Locka.

**Cuadro 6:** Contenido de micronutrientes disponibles (ppm) en suelos de las comunidades de Jallamilla y Concahui

<b>Micronutrientes disponibles (ppm)</b>	<b>Jallamilla</b>	<b>Concahui</b>	<b>Interpretación<sup>a</sup></b>
Boro	0.3 – 0.9	0.5 – 1.6	0.5-1.0 óptimo, >1.0 alto
Cobre	2.2 – 3.6	3.4 – 3.5	1-20 óptimo
Hierro	85.0 – 182.0	298.0 - 302.0	> 50 alto
Manganeso	4.8 – 12.1	4.6 – 11.8	5-10 medio
Zinc	2.0 – 3.1	0.8 – 2.9	<2 bajo, 2-3 medio

<sup>a</sup>Molina & Meléndez (2002)

**Cuadro 7:** Concentraciones (ppm) de algunos elementos pesados encontrados en suelos de las comunidades de Jallamilla y Concahui

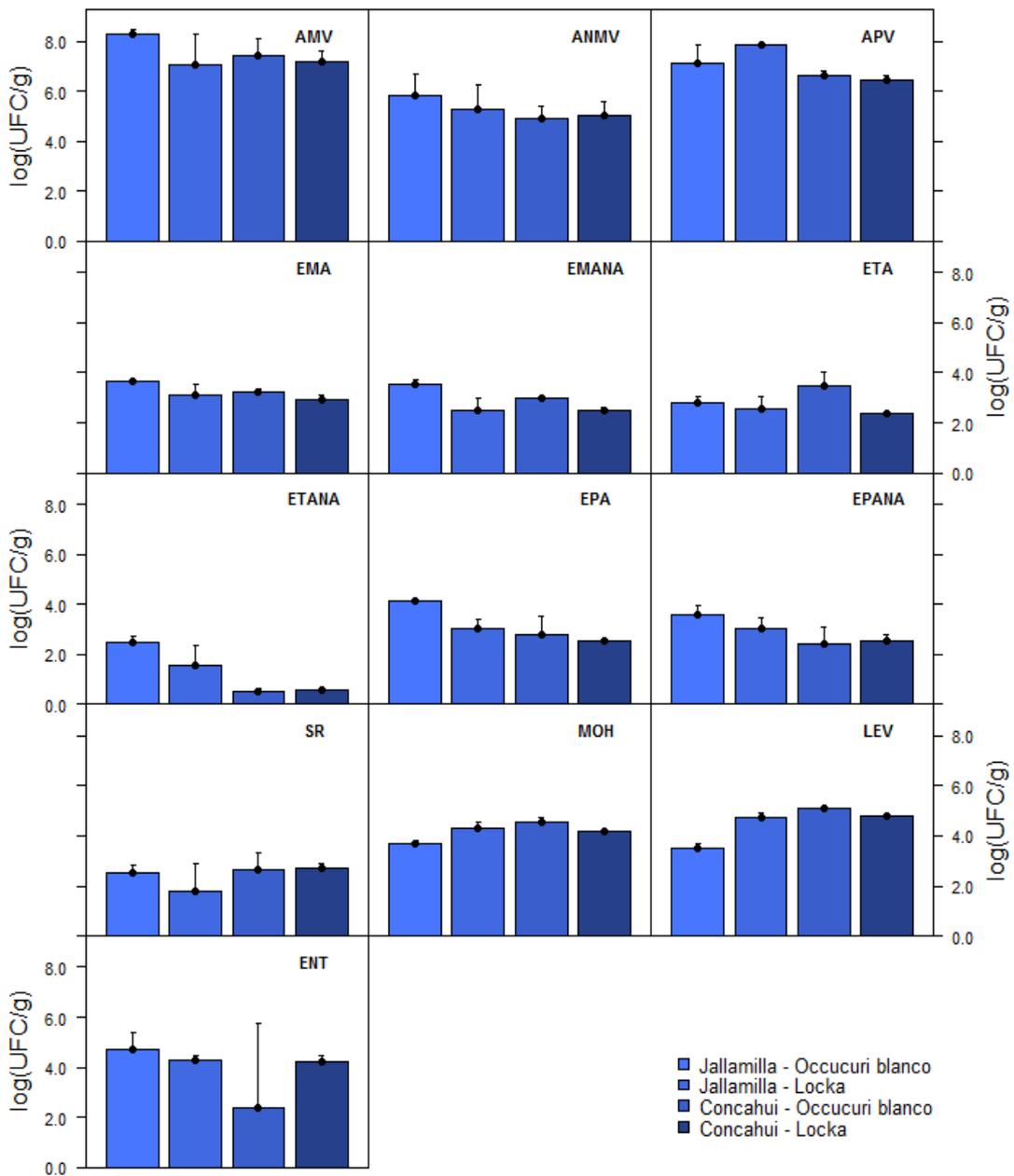
<b>Elementos pesados (ppm)</b>	<b>Jallamilla</b>	<b>Concahui</b>	<b>Contenido normal</b>	<b>Máximo permisible</b>
Plomo	9.27 -10.56	10.78 -13.53	0.1 – 20	100
Cadmio	0.00	0.00 - 0.01	0.1 - 1.0	3
Cromo	4.87 - 7.72	4.62 - 4.91	2.0 - 50.0	100
Arsénico	20.96 - 27.00	0.00 - 15.13	5.0 – 20.0*	10 (EPA), 20 (MDH*)

Fuente: Lactusu (2000) yMinnesota Department of Health (2007\*)

## 4.2 Análisis de tubérculos de papas amargas a la cosecha

### 4.2.1 Análisis Microbiológico

En la Figura 7, se presentan los datos de las poblaciones microbianas obtenidas en los tubérculos de papas amargas de las variedades Occucuri blanco y Locka, de las comunidades de Jallamilla y Concahui.



**Figura 7:** Poblaciones microbianas en tubérculos de papas amargas

Se destaca la presencia de microorganismos esporulados (hasta  $10^4$  UFC/g), bacterias sulfito reductoras ( $10 - 10^3$  UFC/g), mohos y levaduras ( $10^3 - 10^5$  UFC/g), *Enterobacteriaceae* (hasta  $10^5$  UFC/g) y presencia de *Pseudomonas* sp. Estos microorganismos provienen básicamente por influencia del suelo de cultivo.

Del análisis estadístico realizado, se evidencia que las variedades de tubérculo evaluadas, solo influyeron en las poblaciones de EMANA, siendo la variedad Occucuri blanco la que obtuvo mayores concentraciones de estos microorganismos. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en las cargas microbianas de ETANA, EPA y APV por efecto de la localidad. Para los casos mencionados, las poblaciones fueron significativamente superiores en la comunidad de Jallamilla.

#### **4.3 Aislamiento de cepas microbianas**

Se aislaron un total de 65 cepas microbianas, 59 provenientes de suelo y 15 de tubérculos de los tubérculos de papas amargas. Estas fueron purificadas, caracterizadas morfológicamente (Anexo 1) y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4 Caracterización molecular de los aislamientos

Se realizó la caracterización molecular de 47 de las cepas aisladas, 33 cepas Gram positivas y 14 Gram negativas. Las cepas Gram positivas ensayadas mostraron 23 diferentes perfiles BOX-PCR (Cuadro 8, Figura 8) y las Gram negativas evidenciaron 11 perfiles distintos. La técnica empleada es una buena herramienta para el agrupamiento de bacterias con el objetivo de selección de aislamientos representativos de cada grupo y secuenciamiento del gen ARN ribosomal 16S. Cepas con el mismo perfil BOX-PCR pertenecen a la misma especie y tienen secuencias del gen rARN 16S idénticas

Los resultados obtenidos del secuenciamiento del gen rARN 16S, reflejan que 25 de los aislamientos pertenecieron a la familia *Bacillaceae*, géneros *Bacillus* y *Brevibacterium* (perfiles BOX-PCR: I -XV), la *Paenibacillaceae*, género *Brevibacillus* (perfil BOX-PCR: XVI) y 1 a *Planococcaceae*, género *Lysinibacillus* (perfil BOX-PCR: XVII) [Cuadro 8]. Así mismo, 8 cepas pertenecieron a la familia *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas* (perfiles BOX-PCR:XXIV–XXX), 3 a *Rhizobiaceae*, género *Rhizobium* (perfiles BOX-PCR: XXXI-XXXII), 2 a la familia *Brucellaceae*, género *Pseudochrobactrum* (perfil BOX-PCR: XXXIII) y 1 a *Enterobacteriaceae*, género *Enterobacter* (perfil BOX-PCR: XXXIV).

Se reportaron 7 especies de *Bacillus* (Figura 9), siendo *B. simplex* la especie más frecuente (14.9 %) de las cepas caracterizadas molecularmente. Los aislamientos M3SUBE22, M3PABE08, M3PABE10, M3PABE12, M3PABE09 y M3SUBE25 fueron identificadas como *B. simplex* NBRC 15720<sup>T</sup> [AB363738], con 100.00 % de similitud y M3PABE11 reportó 99.80 % de similitud con la misma especie. La segunda especie más abundante (10.6 %) fue *B. licheniformis*, las cepas M3PABE03, M5SUBE01, M3PABE06, M3PABE05 y M5SUBE07 se relacionaron a *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> [AE017333], con porcentajes de similitud entre 99.80 - 99.87 %. El 6.4 % de las cepas ensayadas molecularmente se relacionaron a *B. pumilus* ATCC 7061<sup>T</sup> [ABRX01000007] con 99.93 % de similitud (M5SUBE23, M5SUBE04 y M3SUBE20). Una de las cepas (M5SUPS26) fue identificada (100 % de similitud) como *B. safensis* FO-036b<sup>T</sup> [AF234854]. Los aislamientos M3SUBE17, M3SUBE16 y M3SUBE21 se ubicaron dentro del cluster conformado por las cepas *B. mycoides* DSM

2048<sup>T</sup> [ACMU01000002] y *B. weihenstephanensis* WSBC 10204<sup>T</sup> [Z84578]. Finalmente, la cepa M3SUBE18 se ubicó en el mismo cluster que *B. thuringiensis* ATCC 10792<sup>T</sup> [ACNF01000156], *B. anthracis* ATCC 14578<sup>T</sup> [AB190217], *B. anthracis* Ames<sup>T</sup> [AE016879] y *B. cereus* ATCC 14579<sup>T</sup> [AE016877]. Finalmente, M5SUBE27, M5SUBE25 y M3SUBE19 fueron relacionadas al cluster comprendido por *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429<sup>T</sup> [AMXN01000021].

Dos cepas (4.3 % de los aislamientos ensayados molecularmente) fueron relacionadas al género *Brevibacterium* M3SUBE26 fue identificada (100 % de similitud) como *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801<sup>T</sup> [AM747813] y M3PABE07 estuvo relacionada a la misma especie con 99.93 % de similitud.

Un aislamiento (2.1 %) estuvo relacionado al género *Brevibacillus*, perteneciente a la familia *Paenibacillaceae*. M5SUBE24 reportó 99.92 % de similitud con *Brevibacillus laterosporus* DSM 25 [AB112720]

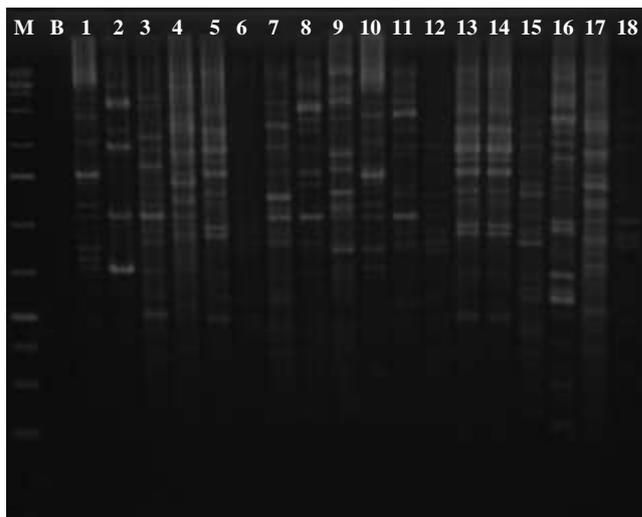
La cepa M3PABE13 (2.1 %) fue relacionada a la familia *Planococcaceae*, específicamente a *Lysinibacillus parviboronicapiens* BAM-582 [AB300598] con 99.79 % de similitud.

Se reportaron 6 especies de *Pseudomonas* (Figura 10), encontrándose que las cepas M5SUPS36 y AZ6 (4.3 % de las cepas caracterizadas molecularmente) estaban relacionadas a *P. azotoformans* IAM1603<sup>T</sup> [D84009] con 99.70 % de similitud. Los aislamientos M5SUBE49 y M5SUBE51 se relacionaron a *P. fragi* ATCC 4973 [AF094733] con 99.93 % de similitud. M5SUPS27 tuvo 98.90 % de similitud a *P. gessardii* CIP 105469<sup>T</sup> [AF074384]. AZ7 fue identificada (100 % de similitud) como *P. protegens* CHA0<sup>T</sup> [AJ278812]. AZ5 fue relacionada a *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* ATCC 49054<sup>T</sup> [EU391388] con 99.85% de similitud y finalmente AZ8 presentó 99.58 % de similitud con *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> [AF468452].

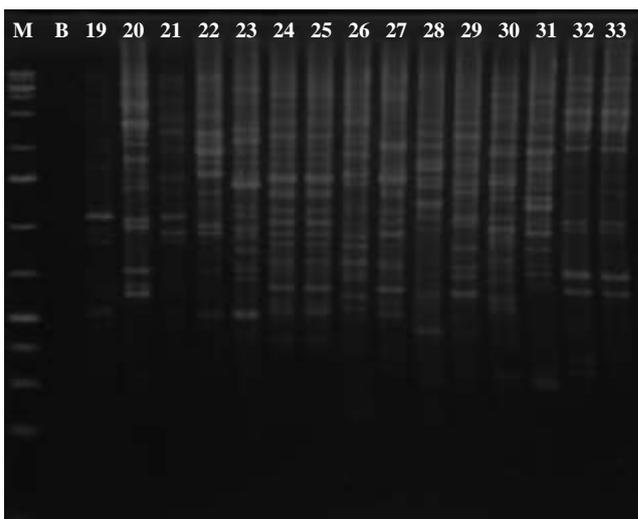
Tres cepas (6.4 %) estuvieron relacionadas a microorganismos de la familia *Rhizobiaceae* (Figura 11). AZ1, AZ2 y

AZ4 estuvieron relacionadas a *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> [JH719379] y *Rhizobium massiliae* 90A<sup>T</sup> [AF531767], con 99.37 % de similitud a ambas cepas tipo.

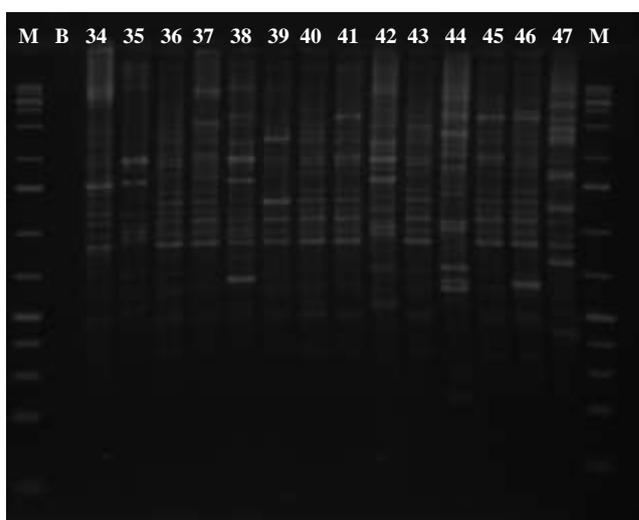
Un aislamiento (2.1%) perteneció a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 12). AZ9 presentó 99.17% de similitud a la especie *Enterobacter soli* LF7a<sup>T</sup> [CP003026].



M	Marcador 1kb	9	M5SUBE26
B	Blanco	10	M5SUBE23
1	M5SUBE04	11	M3SUBE26
2	M3SUBE22	12	M3SUBE17
3	M3PABE13	13	M3PABE05
4	M5SUBE49	14	M3PABE06
5	M3PABE03	15	M3SUBE18
6	M3SUBE16	16	M5SUBE25
7	M3PABE07	17	M5SUBE51
8	M3PABE08	18	M5SUBE41



M	Marcador 1kb	26	AZ3
B	Blanco	27	AZ4
19	M3PABE15	28	AZ5
20	M5SUBE27	29	AZ6
21	M5PABE40	30	AZ8
22	M5SUBE01	31	AZ9
23	AZ7	32	M3SUPS03
24	AZ1	33	M3SUPS04
25	AZ2		



M	Marcador 1kb	41	M5PABE10
B	Blanco	42	M5SUBE07
34	M3SUBE20	43	M3SUBE26
35	M3PABE06	44	M3SUBE19
36	M3SUBE21	45	M3PABE09
37	M3PABE11	46	M3SUBE25
38	M3PABE12	47	M5SUBE48
39	M3PABE07	M	Marcador 1kb
40	M3PABE13		

**Figura 8:** Perfiles de amplificación BOX-PCR de 47 cepas microbianas aisladas de suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas

**Cuadro 8:** Clasificación filogenética de cepas microbianas encontradas en suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas

Perfil BOX-PCR	Cepa	Especie más cercanamente relacionada según secuenciamiento del gen ribosomal 16S	Número de accession	% Similitud	Familia	Clase	Phylum
I	M5SUBE23	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	ABRX01000007	99.93	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
II	M5SUBE04	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	ABRX01000007	99.93	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
	M3SUBE20	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	ABRX01000007	99.93			
III	M3SUBE22	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
IV	M3PABE08	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
V	M3PABE10	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
VI	M3PABE12	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
VII	M3PABE11	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	99.80	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
	<u>M3PABE09</u>	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00			
	<u>M3SUBE25</u>	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 <sup>T</sup>	AB363738	100.00			
VIII	<u>M3PABE03</u> , M5SUBE01	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	AE017333	99.80	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
	<u>M3PABE06</u> , M3PABE05	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	AE017333	99.87			
	<u>M5SUBE07</u>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	AE017333	99.80			

«Continuación»

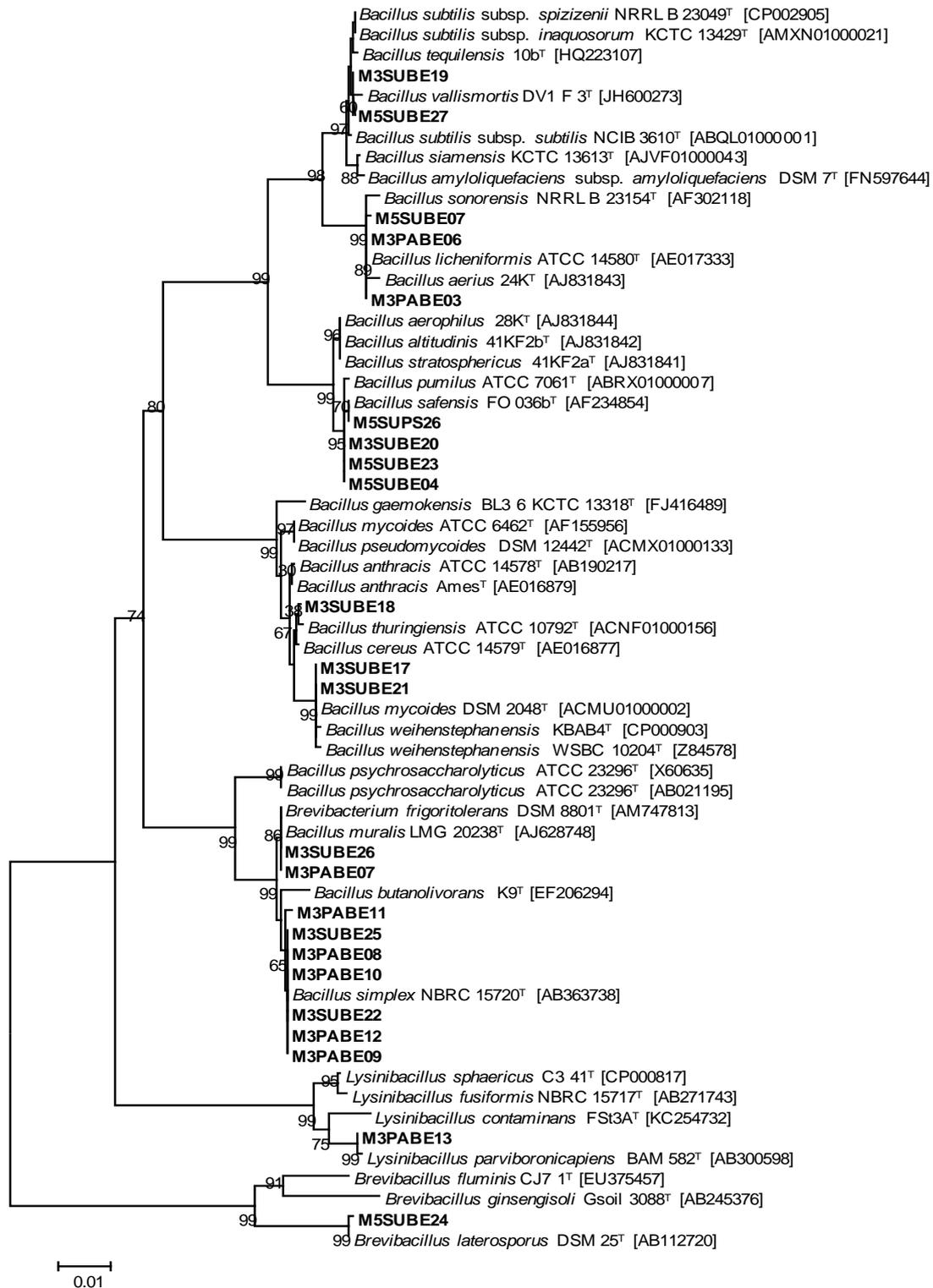
Perfil BOX-PCR	Cepa	Especie más cercanamente relacionada según secuenciamiento del gen ribosomal 16S	Número de accession	% Similitud	Familia	Clase	Phylum
IX	M5SUPS26	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b <sup>T</sup>	AF234854	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
X	<u>M3SUBE17</u> ,	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 <sup>T</sup>	ACMU01000002	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
	M3SUBE16	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204 <sup>T</sup>	Z84578	99.93			
XI	M3SUBE21	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 <sup>T</sup>	ACMU01000002	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
		<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204 <sup>T</sup>	Z84578	99.93			
		<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC KBAB4 <sup>T</sup>	CP000903	99.87			
XII	M3SUBE18	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 <sup>T</sup>	ACNF01000156	99.87	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
		<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 <sup>T</sup>	AB190217	99.62			
		<i>Bacillus anthracis</i> Ames <sup>T</sup>	AE016879	99.60			
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <sup>T</sup>	AE016877	99.60			
XIII	<u>M5SUBE27</u> ,	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 <sup>T</sup>	AMXN01000021	99.71	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
	M5SUBE25	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 <sup>T</sup>	ABQL01000001	99.64			
	<u>M3SUBE19</u>	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 <sup>T</sup>	AMXN01000021	99.73	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
		<i>Bacillus tequilensis</i> 10b <sup>T</sup>	HQ223107	99.72			
		<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1 <sup>T</sup>	JH600280	99.66			
XIV	M3PABE07	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 <sup>T</sup>	AM747813	99.93	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes

«Continuación»

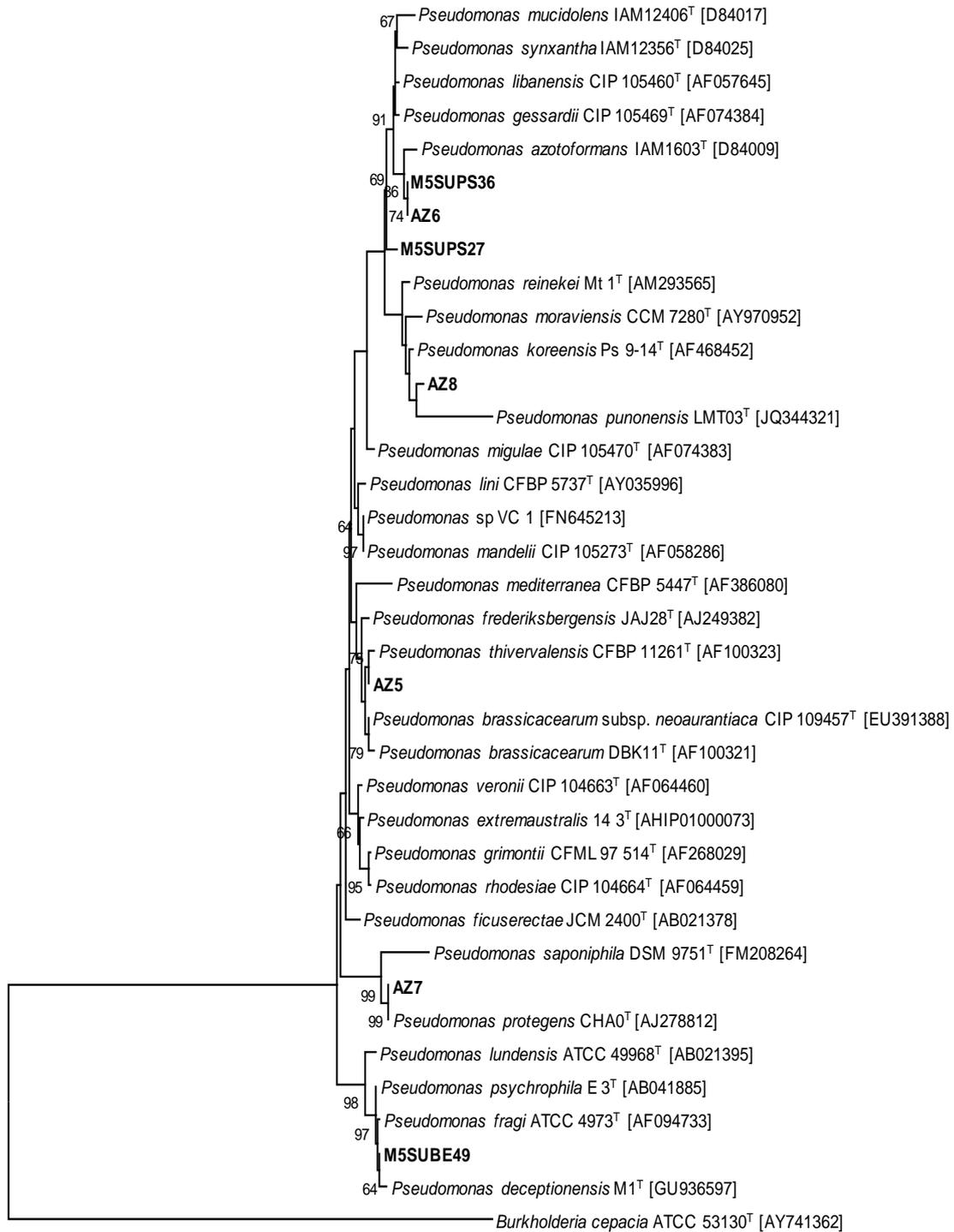
Perfil BOX-PCR	Cepa	Especie más cercanamente relacionada según secuenciamiento del gen ribosomal 16S	Número de accession	% Similitud	Familia	Clase	Phylum
XV	M3SUBE26	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 <sup>T</sup>	AM747813	100.00	<i>Bacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
XVI	M5SUBE24	<i>Brevibacillus laterosporus</i> DSM 25 <sup>T</sup>	AB112720	99.92	<i>Paenibacillaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
XVII	M3PABE13	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> BAM-582 <sup>T</sup>	AB300598	99.79	<i>Planococcaceae</i>	Bacilli	Firmicutes
XVIII	M5SUBE26	N.D.	-	-	-	-	-
XIX	M5SUBE41	N.D.	-	-	-	-	-
XX	M3PABE15	N.D.	-	-	-	-	-
XXI	M5PABE40	N.D.	-	-	-	-	-
XXII	M5SUBE48	N.D.	-	-	-	-	-
XXIII	AZ3	N.D.	-	-	-	-	-
XXIV	M5SUPS36	<i>Pseudomonas azotoformans</i> IAM1603 <sup>T</sup>	D84009	99.70	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXV	AZ6	<i>Pseudomonas azotoformans</i> IAM1603 <sup>T</sup>	D84009	99.70	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXVI	M5SUPS27	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP 105469 <sup>T</sup>	AF074384	98.857	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria

«Continuación»

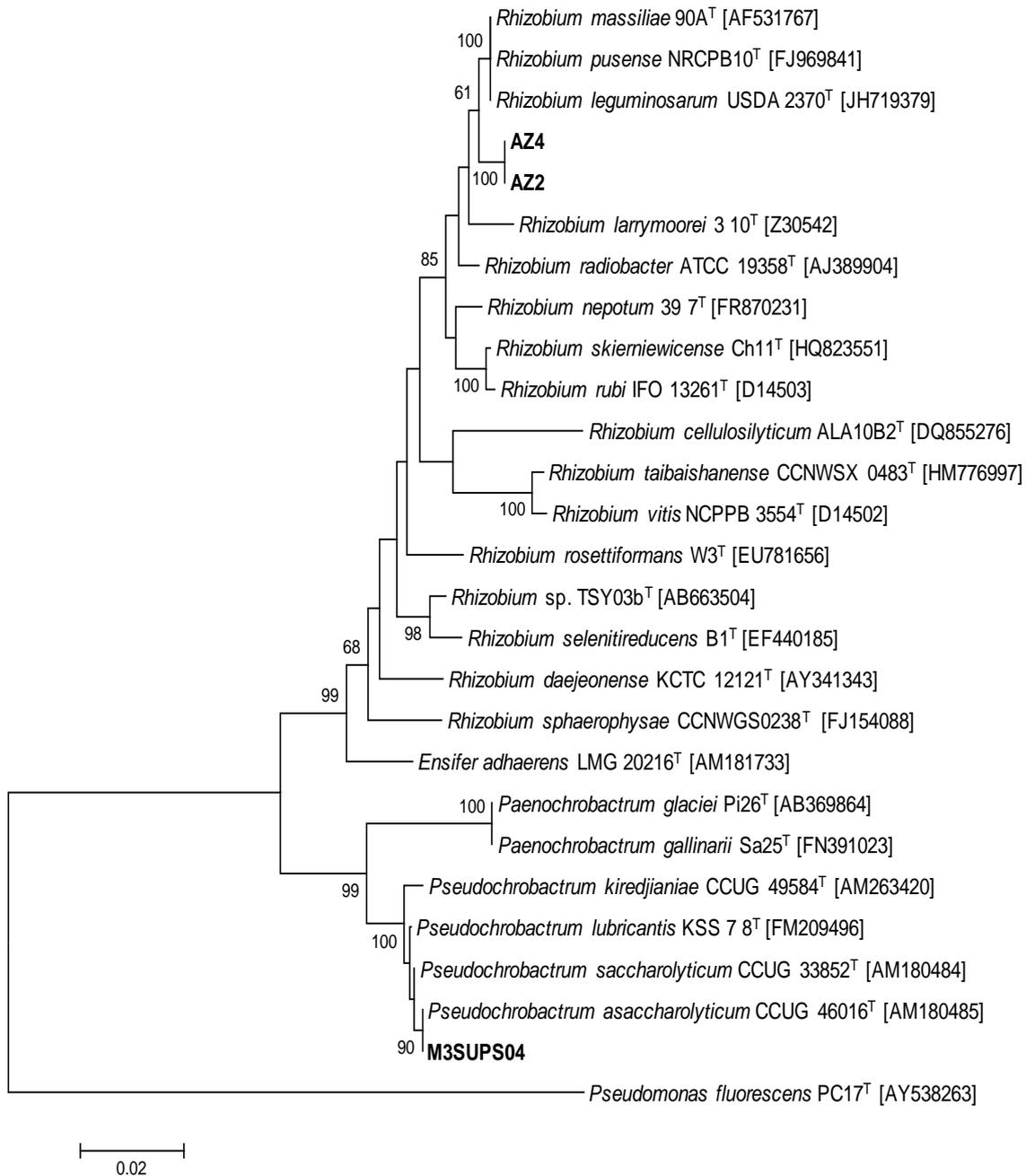
Perfil BOX-PCR	Cepa	Especie más cercanamente relacionada según secuenciamiento del gen ribosomal 16S	Número de accession	% Similitud	Familia	Clase	Phylum
XXVII	M5SUBE49, M5SUBE51	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 <sup>T</sup>	AF094733	99.93	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXVIII	AZ7	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 <sup>T</sup>	AJ278812	100.00	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXIX	AZ5	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neourantiaca</i> ATCC 49054 <sup>T</sup>	EU391388	99.85	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXX	AZ8	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 <sup>T</sup>	AF468452	99.51	<i>Pseudomonadaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria
XXXI	AZ2 AZ1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	JH719379	99.37	<i>Rhizobiaceae</i>	Alphaproteobacteria	Proteobacteria
		<i>Rhizobium massiliae</i> 90A <sup>T</sup>	AF531767	99.37			
XXXII	AZ4	<i>Rhizobium massiliae</i> 90A <sup>T</sup>	AF531767	99.37	<i>Rhizobiaceae</i>	Alphaproteobacteria	Proteobacteria
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	JH719379	99.37			
XXXIII	M3SUPS04, M3SUPS03	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016 <sup>T</sup>	AM180485	100.00	<i>Brucellaceae</i>	Alphaproteobacteria	Proteobacteria
		<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> CCUG 33852 <sup>T</sup>	AM180484	99.85			
		<i>Pseudochrobactrum lubricantis</i> KSS 7.8 <sup>T</sup>	FM209496	99.77			
XXXIV	AZ9	<i>Enterobacter soli</i> LF7a <sup>T</sup>	CP003026	99.17	<i>Enterobacteriaceae</i>	Gammaproteobacteria	Proteobacteria



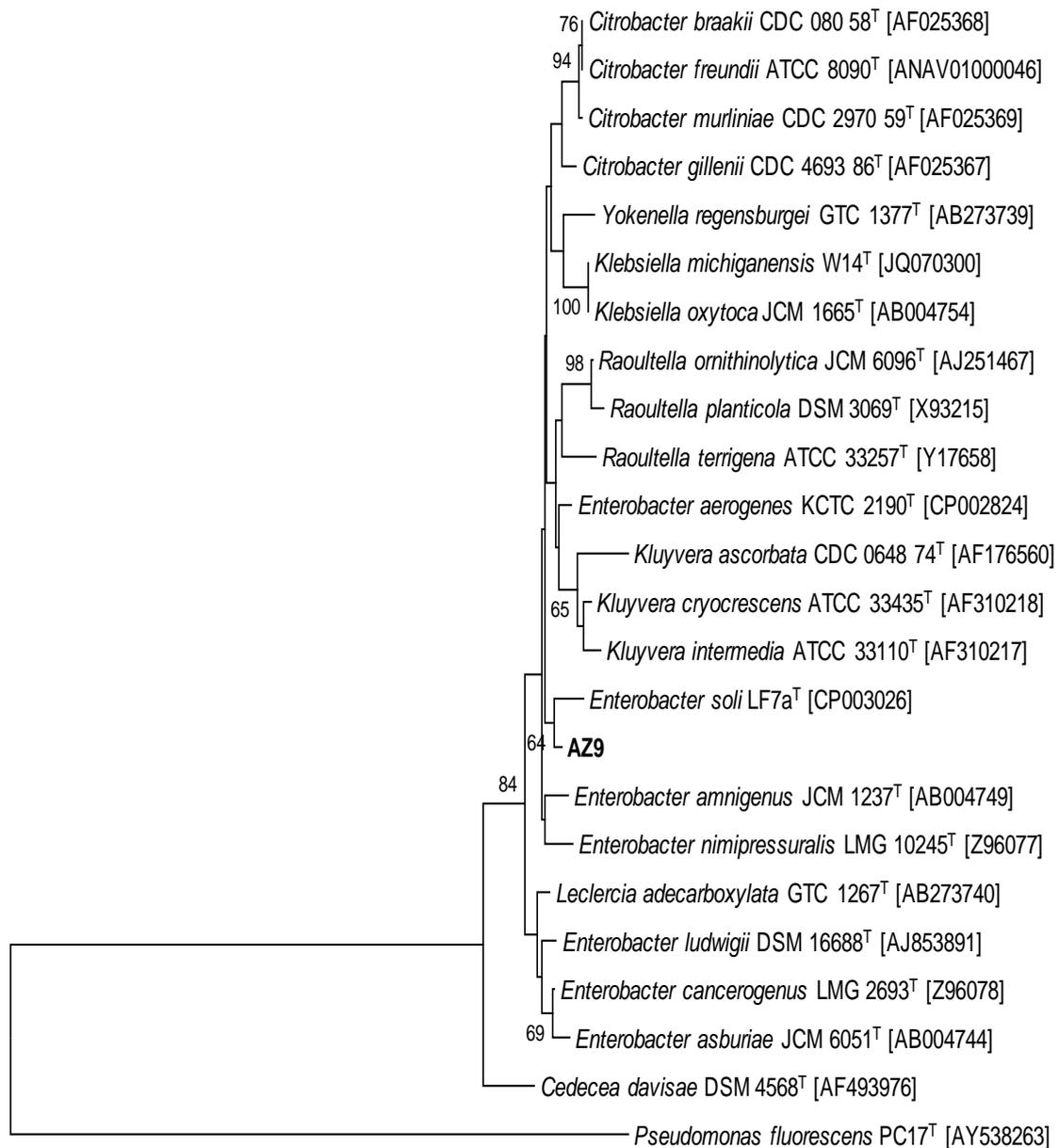
**Figura 9:** Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias del orden **Bacillales**. El método de reconstrucción filogenética fue *Neighbour-joining* (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Tamura-Nei. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de *bootstrap* mayor al 60 % (1000 pseudoréplicas). Los aislamientos microbianos del suelo rizosférico y papas amargas se indican en negrita.



**Figura 10: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia *Pseudomonadaceae*.** El método de reconstrucción filogenética fue *Neighbour-joining* (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Tamura-Nei. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de *bootstrap* mayor al 60 % (1000 pseudoréplicas). Los aislamientos microbianos del suelo rizosférico y papas amargas se indican en negrita.



**Figura 11: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia *Rhizobiaceae*.** El método de reconstrucción filogenética fue *Neighbour-joining* (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Tamura-Nei. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de *bootstrap* mayor al 60 % (1000 pseudoreplicas). Los aislamientos microbianos del suelo rizosférico y papas amargas se indican en negrita.



**Figura 12: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.** El método de reconstrucción filogenética fue *Neighbour-joining* (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Tamura-Nei. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de *bootstrap* mayor al 60 % (1000 pseudorélicas). Los aislamientos microbianos del suelo rizosférico y papas amargas se indican en negrita.

Algunas de estas cepas han sido reportadas en la literatura por sus efectos benéficos en el desarrollo vegetal. *Bacillus simplex* es una bacteria benéfica del suelo, capaz de secretar auxinas (Botanical Society of America, 2011). Por otro lado, inoculaciones individuales de *B. simplex* y *B. cereus* dieron como resultado en un incremento significativo en la raíz y dispare del peso fresco, peso seco y longitud total de la raíz en plantas de tomate (Hassen & Labuschagne, 2010).

*Bacillus pumilus* y *B. licheniformis* producen relativamente altas cantidades de C19-GAs GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>20</sub>, presentando potencial para la elongación de tallo y brotes de *A. glutinosa* (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001).

De acuerdo con Kohler *et al.* (2007) la inoculación con *B. subtilis* incrementó significativamente las actividades ureasa, proteasa y fosfatasas del suelo de la rizósfera de plantas de lechuga y también aumentó el contenido de P y K foliar. Así mismo, ha demostrado antagonismo contra *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp. y además controla eficazmente las enfermedades causadas por los nemátodos (Trabelsi & Mhamdi, 2013) provocando mejora en el crecimiento de las plantas o el rendimiento.

Algunas cepas muestran como *B. safensis* MS11 han sido destacadas por su alto nivel de resistencia al arsenito, arsenato, boro y 15 % tolerancia a la sal. La cepa también ha sido asociada con resistencia a múltiples metales pesados como el Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn, por lo podría utilizarse en la remediación de suelos afectados por sales y ciclos biogeoquímicos de contaminación por arsénico (Raja & Omine, 2012).

Las cepas relacionadas a *B. thuringensis* podrían ser agente de biocontrol polivalente, bioestimulador y biofertilizante que podría promover el crecimiento de las plantas.

*Brevibacillus laterosporus* posee enzimas que exhiben actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti*. Sus enzimas quitinolíticas extracelulares también contribuyen a la actividad insecticida (Prasanna *et al.*, 2013). *Lysinibacillus parviboronicapiens* puede tolerar 6 % (w/v) de NaCl y 50 mM de boro, pero su crecimiento óptimo se observa sin adición de boro o de NaCl (Miwa *et al.*, 2009).

*Pseudomonas azotoformans* es capaz de degradar Cihalofop-butyl (CyB), un ariloxifenoxi propanoato de etilo (AOPP) herbicida ampliamente utilizado para el control de hierbas en campos de arroz (Nie *et al.*, 2011).

Por otro lado, *Pseudomonas fragi* posee la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir enzimas lipolíticas y proteolíticas termotolerantes (Wiedmann *et al.*, 2000), así como aromas frutales debido a la degradación de aminoácidos (Miller *et al.*, 1993).

*Pseudomonas protegens* producen el metabolito secundario 2,4-diacetilfloroglucinol antimicrobiano (PHL), el cual juega un papel importante en el control biológico de las enfermedades de las plantas (Ramette *et al.*, 2011).

## 4.5 Capacidad promotora de crecimiento de las cepas

### 4.5.1 Influencia de la inoculación de cepas con potencial PGPR en la germinación de semillas de trébol rojo

Se ha reportado que el tratamiento con PGPRs incrementa el porcentaje de germinación, vigor de las plántulas, emergencia, posición de la planta, crecimiento de las raíces, de brotes, la biomasa total de las plantas, el peso de las semillas, floración temprana, aumento del grano, forraje, producción de frutos, etc. (van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Durante 3 días consecutivos se evaluó la aparición de radículas en las semillas de trébol rojo previamente tratadas con los diferentes inoculantes microbianos (Cuadro 9). Aunque no se apreciaron diferencias significativas respecto del control (Cepa 0), se pudo apreciar que durante las primeras 24 h de evaluación, la tasa de germinación fue superior para las semillas inoculadas con las cepas M3SUPS03, M5SUBE41, AZ4 y AZ9, manteniendo los porcentajes de germinación comparables a los del control durante las 48 y 72 h de evaluación.

Luego de realizar el análisis estadístico de los datos de peso fresco aéreo y radicular (PFA y PFR) y peso seco aéreo y radicular (PSA y PSR) de las semillas germinadas, se determinó que ocho (8) de las cepas ensayadas, cinco Gram positivas (M3PABE07, M3SUBE26, AZ3, M3PABE15 y M5SUBE24) y tres Gram negativas (M5SUBE49, M5SUBE51 y AZ8) obtuvieron biomasa fresca significativamente superior a la registrada por el control (PFA:  $0.00989 \pm 0.00041$  g y PFR:  $0.00272 \pm 0.00015$  g). Se destaca la biomasa fresca obtenida por las cepas M3SUBE26 (*Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801<sup>T</sup>) [PFA:  $0.01498 \pm 0.00111$  g y PFR:  $0.00472 \pm 0.00094$  g], AZ3 (N.D.) [PFA:  $0.01590 \pm 0.00204$  g y PFR:  $0.00802 \pm 0.00011$  g] y M5SUBE24 (relacionado a *Brevibacillus laterosporus* DSM 25<sup>T</sup>) [PFA:  $0.01779 \pm 0.00086$  g y PFR:  $0.00801 \pm 0.00068$  g], cuyos tratamientos alcanzaron porcentajes de germinación superiores al 84 %.

**Cuadro 9:** Efecto de la inoculación microbiana en el peso fresco y seco aéreo y radicular de semillas germinadas de trébol

Cód.	Cepa	% Germinación			Biomasa al tercer día (g)			
		Día 1	Día 2	Día 3	PFA ± sd	PSA ± sd	PFR ± sd	PSR ± sd
0	Control -	<b>71.36 ± 4.49</b>	<b>93.25 ± 1.62</b>	<b>94.10 ± 1.56</b>	<b>0.00989 ± 0.00041</b>	<b>0.00077 ± 0.00002</b>	<b>0.00273 ± 0.00015</b>	<b>0.00022 ± 0.00001</b>
1	M3SUBE18	70.37 ± 1.60	85.19 ± 1.60	93.52 ± 3.21	0.01280 ± 0.00080	0.00091 ± 0.00005	0.00385 ± 0.00059	0.00027 ± 0.00003
2	M3SUBE17	75.40 ± 1.37	87.30 ± 3.64	92.86 ± 4.12	0.00915 ± 0.00030	0.00078 ± 0.00002	0.00263 ± 0.00010	0.00019 ± 0.00000
3	M3PABE06	68.52 ± 3.21	83.33 ± 2.78	88.89 ± 0.00	0.01355 ± 0.00093	0.00086 ± 0.00018	0.00439 ± 0.00049	0.00022 ± 0.00002
4	M5SUBE38	73.15 ± 6.42	77.78 ± 10.02	86.11 ± 9.62	0.01063 ± 0.00075	0.00085 ± 0.00013	0.00338 ± 0.00045	0.00026 ± 0.00003
5	M5SUBE40	60.19 ± 4.24	71.30 ± 9.76	75.00 ± 8.33	0.01152 ± 0.00202	0.00091 ± 0.00011	0.00197 ± 0.00140	0.00025 ± 0.00002
6	M3PABE08	62.04 ± 3.21	77.78 ± 7.35	89.81 ± 5.78	0.01317 ± 0.00185	0.00094 ± 0.00019	0.00482 ± 0.00081	0.00023 ± 0.00002
7	<b>M3PABE07</b>	59.26 ± 11.23	66.67 ± 2.78	72.22 ± 4.81	<b>0.01579 ± 0.00190</b>	<b>0.00134 ± 0.00022</b>	<b>0.00791 ± 0.00065</b>	<b>0.00024 ± 0.00013</b>
9	M5SUBE01	71.30 ± 6.99	76.85 ± 4.24	83.33 ± 4.81	0.01072 ± 0.00047	0.00100 ± 0.00012	0.00335 ± 0.00036	0.00026 ± 0.00003
10	M3SUBE16	64.81 ± 6.42	81.48 ± 3.21	91.67 ± 0.00	0.01291 ± 0.00086	0.00568 ± 0.00792	0.00485 ± 0.00093	0.00026 ± 0.00005
11	M5SUBE37	61.11 ± 4.81	77.78 ± 2.78	91.67 ± 2.78	0.01257 ± 0.00133	0.00099 ± 0.00017	0.00474 ± 0.00077	0.00023 ± 0.00008
12	M5SUBE27	70.37 ± 13.13	79.63 ± 5.78	86.11 ± 4.81	0.01153 ± 0.00098	0.00105 ± 0.00010	0.00310 ± 0.00030	0.00022 ± 0.00003
13	M5SUBE22	69.44 ± 4.81	78.70 ± 4.24	89.81 ± 5.78	0.01251 ± 0.00062	0.00097 ± 0.00011	0.00377 ± 0.00091	0.00029 ± 0.00005
14	M5SUBE07	80.56 ± 0.00	86.11 ± 2.78	90.74 ± 1.60	0.00986 ± 0.00016	0.00092 ± 0.00006	0.00241 ± 0.00051	0.00028 ± 0.00002
15	<b>M3SUBE26</b>	75.00 ± 2.78	82.41 ± 5.78	87.04 ± 6.99	<b>0.01498 ± 0.00111</b>	<b>0.00113 ± 0.00016</b>	<b>0.00473 ± 0.00094</b>	<b>0.00026 ± 0.00009</b>
16	M3SUPS03	<b>82.54 ± 6.87</b>	<b>90.48 ± 2.38</b>	<b>96.03 ± 3.64</b>	0.00870 ± 0.00030	0.00078 ± 0.00004	0.00280 ± 0.00023	0.00021 ± 0.00002
18	M3PABE11	69.44 ± 5.56	85.19 ± 8.49	87.96 ± 8.93	0.01032 ± 0.00130	0.00097 ± 0.00011	0.00352 ± 0.00173	0.00027 ± 0.00008
19	<b>M5SUBE51</b>	25.60 ± 20.58	34.98 ± 29.81	34.98 ± 29.81	<b>0.01055 ± 0.00023</b>	<b>0.00113 ± 0.00008</b>	0.01287 ± 0.01672	0.00021 ± 0.00002

«Continuación»

Cód.	Cepa	% Germinación			Biomasa al tercer día (g)			
		Día 1	Día 2	Día 3	PFA ± sd	PSA ± sd	PFR ± sd	PSR ± sd
20	M5SUBE49	74.60 ± 7.27	84.13 ± 2.75	88.10 ± 4.12	0.01293 ± 0.00040	0.00097 ± 0.00003	0.00578 ± 0.00060	0.00022 ± 0.00002
21	M5SUBE48	81.48 ± 5.78	86.11 ± 5.56	88.89 ± 4.81	0.00978 ± 0.00080	0.00104 ± 0.00004	0.00121 ± 0.00077	0.00027 ± 0.00004
22	<b>M5SUBE49</b>	17.12 ± 14.77	20.48 ± 11.96	21.33 ± 11.50	<b>0.01166 ± 0.00100</b>	<b>0.00106 ± 0.00009</b>	0.01581 ± 0.02070	0.00088 ± 0.00099
23	M3PABE05	66.67 ± 11.11	82.41 ± 6.99	93.52 ± 1.60	0.01190 ± 0.00071	0.00111 ± 0.00027	0.00468 ± 0.00019	0.00019 ± 0.00005
24	M3PABE10	68.52 ± 11.56	78.70 ± 8.49	81.48 ± 8.02	0.01325 ± 0.00101	0.00112 ± 0.00001	0.00381 ± 0.00041	0.00028 ± 0.00002
25	M3PABE09	60.19 ± 13.13	69.44 ± 13.89	75.00 ± 14.70	0.01155 ± 0.00086	0.00094 ± 0.00013	0.00348 ± 0.00085	0.00025 ± 0.00002
26	M3PABE13	69.44 ± 10.02	82.41 ± 9.76	87.04 ± 6.99	0.01136 ± 0.00049	0.00103 ± 0.00006	0.00319 ± 0.00065	0.00023 ± 0.00002
27	<b>M3PABE15</b>	65.74 ± 4.24	78.70 ± 1.60	84.26 ± 3.21	<b>0.01591 ± 0.00088</b>	<b>0.00116 ± 0.00009</b>	<b>0.00682 ± 0.00089</b>	<b>0.00042 ± 0.00025</b>
28	M3SUBE22	62.96 ± 11.23	76.85 ± 3.21	83.33 ± 2.78	0.01074 ± 0.00136	0.00098 ± 0.00003	0.00397 ± 0.00040	0.00030 ± 0.00004
29	M3SUBE21	45.37 ± 18.07	68.52 ± 6.99	75.93 ± 3.21	0.01207 ± 0.00375	0.00114 ± 0.00019	0.00544 ± 0.00180	0.00020 ± 0.00014
30	M5SUBE41	<b>79.63 ± 5.78</b>	<b>90.74 ± 3.21</b>	<b>94.44 ± 2.78</b>	0.01102 ± 0.00056	0.00102 ± 0.00004	0.00483 ± 0.00047	0.00030 ± 0.00001
31	M5SUBE42	66.67 ± 2.78	76.85 ± 4.24	81.48 ± 1.60	0.01244 ± 0.00057	0.00101 ± 0.00005	0.00402 ± 0.00053	0.00030 ± 0.00002
32	M3SUPS04	66.67 ± 4.81	75.00 ± 7.35	81.48 ± 5.78	0.01093 ± 0.00096	0.00091 ± 0.00006	0.00367 ± 0.00056	0.00028 ± 0.00001
33	M3PABE03	63.89 ± 4.81	78.70 ± 8.02	90.74 ± 3.21	0.01222 ± 0.00059	0.00080 ± 0.00004	0.00371 ± 0.00062	0.00019 ± 0.00004
34	AZ1	75.60 ± 10.53	84.87 ± 2.51	89.08 ± 1.38	0.01309 ± 0.00028	0.00112 ± 0.00001	0.00540 ± 0.00015	0.00025 ± 0.00002
35	AZ2	70.68 ± 11.04	89.12 ± 6.23	91.65 ± 5.17	0.01063 ± 0.00025	0.00107 ± 0.00001	0.00441 ± 0.00027	0.00017 ± 0.00001
36	<b>AZ3</b>	60.19 ± 13.98	79.63 ± 1.60	84.26 ± 4.24	<b>0.01590 ± 0.00204</b>	<b>0.00122 ± 0.00009</b>	<b>0.00802 ± 0.00111</b>	<b>0.00026 ± 0.00013</b>
37	AZ4	<b>75.97 ± 5.89</b>	<b>87.99 ± 4.06</b>	<b>90.57 ± 5.36</b>	0.01037 ± 0.00020	0.00105 ± 0.00006	0.00414 ± 0.00007	0.00023 ± 0.00001

«Continuación»

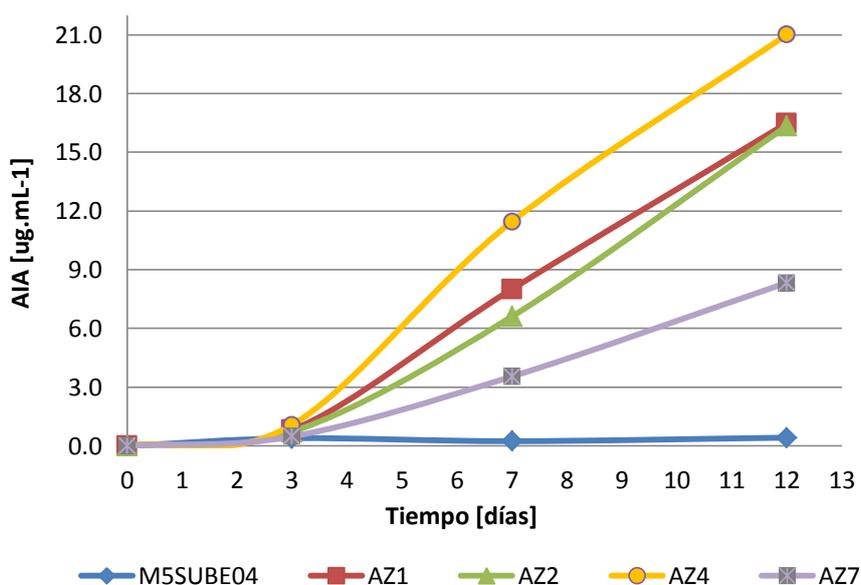
Cód.	Cepa	% Germinación			Biomasa al tercer día (g)			
		Día 1	Día 2	Día 1	PFA ± sd	PSA ± sd	PFR ± sd	PSR ± sd
38	AZ5	75.40 ± 9.62	86.51 ± 2.75	87.30 ± 1.37	0.01076 ± 0.00083	0.00091 ± 0.00003	0.00315 ± 0.00017	0.00023 ± 0.00001
39	AZ6	65.74 ± 20.85	77.78 ± 16.90	80.56 ± 12.11	0.01139 ± 0.00041	0.00098 ± 0.00001	0.00319 ± 0.00055	0.00028 ± 0.00002
40	AZ7	10.30 ± 15.87	16.65 ± 26.85	20.62 ± 33.71	0.00615 ± 0.00532	0.00036 ± 0.00055	0.00221 ± 0.00191	0.00014 ± 0.00012
41	AZ8	62.04 ± 8.02	68.52 ± 11.23	74.07 ± 6.99	<b>0.01607 ± 0.00178</b>	<b>0.00135 ± 0.00018</b>	0.00416 ± 0.00074	0.00012 ± 0.00003
42	AZ9	<b>82.83 ± 2.54</b>	<b>91.34 ± 5.04</b>	<b>93.65 ± 7.27</b>	0.01040 ± 0.00077	0.00091 ± 0.00004	0.00516 ± 0.00018	0.00011 ± 0.00000
43	M3SUBE19	44.44 ± 10.02	75.93 ± 6.99	81.48 ± 5.78	0.01189 ± 0.00063	0.00087 ± 0.00012	0.00294 ± 0.00149	0.00022 ± 0.00002
44	M3SUBE20	58.33 ± 16.90	81.48 ± 10.52	84.26 ± 8.02	0.01306 ± 0.00185	0.00128 ± 0.00018	0.00384 ± 0.00123	0.00019 ± 0.00011
45	M3SUBE24	73.15 ± 8.49	84.26 ± 4.24	93.52 ± 3.21	0.01252 ± 0.00128	0.00123 ± 0.00016	0.00434 ± 0.00051	0.00027 ± 0.00003
46	M3SUBE25	75.00 ± 7.35	85.19 ± 4.24	87.04 ± 4.24	0.01000 ± 0.00039	0.00107 ± 0.00003	0.00209 ± 0.00042	0.00027 ± 0.00002
48	M5SUBE25	62.96 ± 6.42	80.56 ± 2.78	87.96 ± 5.78	0.01309 ± 0.00110	0.00119 ± 0.00027	0.00410 ± 0.00060	0.00026 ± 0.00005
49	M5SUBE23	61.11 ± 7.35	84.26 ± 1.60	90.74 ± 1.60	0.01377 ± 0.00059	0.00091 ± 0.00009	0.00506 ± 0.00033	0.00022 ± 0.00002
<b>50</b>	<b>M5SUBE24</b>	67.59 ± 10.52	80.56 ± 7.35	85.19 ± 6.99	<b>0.01779 ± 0.00086</b>	<b>0.00123 ± 0.00009</b>	<b>0.00801 ± 0.00068</b>	<b>0.00031 ± 0.00006</b>
52	M5SUBE05	61.11 ± 12.11	81.48 ± 8.49	87.96 ± 6.99	0.01271 ± 0.00075	0.00096 ± 0.00012	0.00448 ± 0.00084	0.00026 ± 0.00002

PFA: peso fresco aéreo, PSA: peso seco aéreo, PFR: peso fresco radicular, PSR: peso seco radicular. sd: desviación estándar.

#### 4.5.2 Determinación de la capacidad de producción de AIA

Para determinar el potencial PGPR de las cepas aisladas producto de esta investigación, han sido ensayadas un total de 41 cepas provenientes de suelo (30 aislamientos Gram positivos, 11 Gram negativos) y 11 cepas Gram positivas provenientes de los tubérculos de papa.

El ácido 3-indol acético (AIA) es una fitohormona conocida por estar involucrada en la iniciación radicular, división y alargamiento celular (Salisbury, 1994). Todas las cepas produjeron AIA (Cuadro 10), aunque solo el 59.62 % lo hizo en concentraciones mayores a  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  y tres cepas lo hicieron de manera significativa (Figura 13) con concentraciones entre  $16.34$  y  $21.01 \mu\text{g.mL}^{-1}$  luego de 12 días de evaluación (cepas AZ2, AZ1 y AZ4, relacionadas a *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> y *R. massiliae* 90A<sup>T</sup>). AZ7 (*Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup>) produjo  $8.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA durante el mismo periodo. Cepas de *Azotobacter* aisladas de *Solanum tuberosum* de zonas altoandinas reportaron entre  $7.6$  y  $588 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA (Rico, 2009). En tanto que Castellanos *et al.* (2009) seleccionaron cepas con producciones de AIA superiores a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para formulación de biofertilizantes.



**Figura 13:** Curvas de producción de AIA de los aislamientos de suelo rizosférico y papas amargas con mayor potencial para este parámetro.

**Cuadro 10:** Producción de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) por las 52 cepas ensayadas, durante 12 días de evaluación

Código	Cepa	3 días	7 días	12 días
1	M3SUBE18	0.000 $\pm$ 0.000	0.893 $\pm$ 0.253	1.012 $\pm$ 0.084
2	M3SUBE17	0.089 $\pm$ 0.042	1.042 $\pm$ 0.042	3.512 $\pm$ 0.000
3	M3PABE06	0.030 $\pm$ 0.042	0.417 $\pm$ 0.084	0.625 $\pm$ 0.042
4	M5SUBE38	0.060 $\pm$ 0.000	0.149 $\pm$ 0.042	1.280 $\pm$ 0.126
5	M5SUBE40	0.119 $\pm$ 0.084	0.476 $\pm$ 0.000	1.399 $\pm$ 0.042
6	M3PABE08	0.060 $\pm$ 0.000	0.625 $\pm$ 0.042	0.744 $\pm$ 0.042
7	M3PABE07	0.804 $\pm$ 0.042	2.381 $\pm$ 0.168	4.315 $\pm$ 0.042
8	M5SUBE04	0.387 $\pm$ 0.126	0.238 $\pm$ 0.000	0.417 $\pm$ 0.000
9	M5SUBE01	0.179 $\pm$ 0.000	0.446 $\pm$ 0.126	0.685 $\pm$ 0.042
10	M3SUBE16	0.238 $\pm$ 0.000	0.774 $\pm$ 0.084	1.161 $\pm$ 0.042
11	M5SUBE37	0.714 $\pm$ 0.337	0.268 $\pm$ 0.042	0.625 $\pm$ 0.042
12	M5SUBE27	0.506 $\pm$ 0.126	0.893 $\pm$ 0.168	0.893 $\pm$ 0.000
13	M5SUBE22	0.298 $\pm$ 0.000	0.387 $\pm$ 0.126	0.744 $\pm$ 0.042
14	M5SUBE07	0.208 $\pm$ 0.042	0.446 $\pm$ 0.042	0.506 $\pm$ 0.042
15	M3SUBE26	0.476 $\pm$ 0.084	1.339 $\pm$ 0.042	2.262 $\pm$ 0.000
16	M3SUPS03	1.161 $\pm$ 0.042	3.601 $\pm$ 0.042	4.077 $\pm$ 0.126
17	M3PABE12	0.387 $\pm$ 0.042	0.565 $\pm$ 0.042	1.161 $\pm$ 0.042
18	M3PABE11	0.387 $\pm$ 0.042	0.863 $\pm$ 0.042	1.339 $\pm$ 0.042
19	M5SUBE51	0.774 $\pm$ 0.000	0.982 $\pm$ 0.042	1.637 $\pm$ 0.042
20	M5SUBE49	1.726 $\pm$ 0.000	1.369 $\pm$ 0.168	2.054 $\pm$ 0.210
21	M5SUBE48	0.149 $\pm$ 0.042	0.387 $\pm$ 0.042	0.833 $\pm$ 0.168
22	M5SUBE49	1.161 $\pm$ 0.210	1.012 $\pm$ 0.084	1.577 $\pm$ 0.042
23	M3PABE05	0.208 $\pm$ 0.042	0.327 $\pm$ 0.042	0.685 $\pm$ 0.126
24	M3PABE10	0.357 $\pm$ 0.000	1.042 $\pm$ 0.210	1.071 $\pm$ 0.084
25	M3PABE09	0.625 $\pm$ 0.295	0.833 $\pm$ 0.000	1.369 $\pm$ 0.000
26	M3PABE13	0.446 $\pm$ 0.042	0.923 $\pm$ 0.042	1.667 $\pm$ 0.168
27	M3PABE15	0.387 $\pm$ 0.126	1.101 $\pm$ 0.042	2.351 $\pm$ 0.042
28	M3SUBE22	0.357 $\pm$ 0.000	1.012 $\pm$ 0.084	1.637 $\pm$ 0.042
29	M3SUBE21	0.476 $\pm$ 0.000	0.952 $\pm$ 0.168	1.667 $\pm$ 0.084

«Continuación»

Código	Cepa	3 días	7 días	12 días
30	M5SUBE41	0.387±0.042	0.238±0.000	1.458±0.210
31	M5SUBE42	0.744±0.126	1.071±0.084	1.131±0.084
32	M3SUPS04	1.012±0.084	2.381±0.084	3.661±0.547
33	M3PABE03	0.238±0.084	0.387±0.126	0.417±0.084
<b>34</b>	<b>AZ1</b>	<b>0.804±0.042</b>	<b>8.006±0.210</b>	<b>16.488±0.673</b>
<b>35</b>	<b>AZ2</b>	<b>0.714±0.000</b>	<b>6.607±0.337</b>	<b>16.339±0.295</b>
36	AZ3	0.060±0.000	0.744±0.126	2.411±0.295
<b>37</b>	<b>AZ4</b>	<b>1.071±0.000</b>	<b>11.458±0.800</b>	<b>21.012±0.589</b>
38	AZ5	0.506±0.126	3.304±0.126	3.214±0.084
39	AZ6	0.685±0.042	0.506±0.042	1.190±0.253
<b>40</b>	<b>AZ7</b>	<b>0.476±0.168</b>	<b>3.542±0.042</b>	<b>8.333±0.000</b>
41	AZ8	0.476±0.084	1.101±0.042	2.470±0.042
42	AZ9	0.565±0.126	1.429±0.084	3.780±0.295
43	M3SUBE19	0.030±0.042	0.298±0.000	0.923±0.042
44	M3SUBE20	0.089±0.042	0.179±0.084	0.536±0.168
45	M3SUBE24	0.089±0.042	0.476±0.084	0.863±0.042
46	M3SUBE25	0.327±0.042	1.637±0.042	1.577±0.126
47	M5SUBE26	0.089±0.126	0.060±0.000	0.893±0.168
48	M5SUBE25	0.030±0.042	0.298±0.000	0.536±0.084
49	M5SUBE23	0.149±0.042	0.149±0.042	0.268±0.042
50	M5SUBE24	0.030±0.042	0.030±0.042	1.667±0.084
51	M5SUBE06	0.149±0.042	0.000±0.000	0.149±0.042
52	M5SUBE05	0.119±0.084	0.000±0.000	0.327±0.042

#### 4.5.3 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos

Se ha reportado que varios microorganismos del suelo, en particular las bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, poseen la capacidad de convertir los fosfatos insolubles del suelo hacia formas solubles, mediante la secreción de ácidos orgánicos, como ácido fórmico, acético, propiónico, glicólico-láctico, fumárico y succínico (Rashid *et al.*, 2004). Estos ácidos disminuyen el pH y llevan a cabo la disolución de las formas enlazadas a los fosfatos. Algunos de los hidroxiacidos pueden quelarse con el calcio y el hierro, resultando en la solubilización y utilización efectiva de fosfatos (Gaur & Ostwal, 1972; Kundu *et al.*, 2009). Así mismo, existen algunas *Pseudomonas*, que poseen capacidad para sintetizar y liberar enzimas del tipo fosfatasas, tanto ácidas como alcalinas, que hidrolizan los enlaces ésteres del fósforo orgánico presente en la materia orgánica del suelo, dejándolo disponible para la planta.

Luego de 14 días de evaluación, el 44.23 % de las cepas evaluadas produjeron un halo de solubilización de fosfatos en el medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, el 30.77 % solubilizaron fosfato dicálcico en el mismo medio, en tanto que el 19.23 % solubilizaron fosfato tricálcico en medio YED-P (Cuadro 11).

Los mejores porcentajes de eficiencia de solubilización (ES) se obtuvieron a los 7 días de evaluación, en el medio NBRIP con fosfato tricálcico, por dos especies del género *Pseudomonas*. Las cepas AZ7 (*Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup>, con 400 % ES), M5SUBE51 y M5SUBE49 (relacionadas a *Pseudomonas fragi* ATCC 4973<sup>T</sup>, con 500 % ES cada una) fueron las mejores cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico.

**Cuadro 11:** Eficiencia de solubilización (%) de las cepas aisladas de suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas

Cód.	Cepa	NBRIP + 2Ca			NBRIP + 3Ca			YED + 3Ca		
		5 días	7 días	14 días	5 días	7 días	14 días	5 días	7 días	14 días
3	M3PABE06	-	-	-	-	-	103.33	-	-	-
4	M5SUBE38	-	-	-	-	-	-	-	-	125.00
5	M5SUBE40	-	-	-	-	-	-	-	-	125.00
6	M3PABE08	-	-	-	-	-	105.00	-	-	-
8	M5SUBE04	-	-	-	-	-	103.33	-	-	-
9	M5SUBE01	-	-	-	-	-	110.00	-	-	-
11	M5SUBE37	-	-	-	-	-	-	-	-	200.00
13	M5SUBE22	-	-	-	-	-	125.00	-	-	-
14	M5SUBE07	-	-	-	-	-	110.00	-	-	-
<b>19</b>	<b>M5SUBE51</b>	-	-	<b>166.67</b>	<b>250.00</b>	<b>500.00</b>	<b>200.00</b>	<b>266.67</b>	<b>300.00</b>	<b>357.14</b>
<b>20</b>	<b>M5SUBE49</b>	-	-	<b>200.00</b>	<b>300.00</b>	<b>500.00</b>	<b>200.00</b>	<b>233.33</b>	<b>285.71</b>	<b>328.57</b>
22	M5SUBE49	-	-	133.33	200.00	300.00	200.00	228.57	285.71	285.71
29	M3SUBE21	-	-	-	-	-	103.33	-	-	-
30	M5SUBE41	-	-	-	-	-	-	-	-	125.00
32	M3SUPS04	-	-	-	-	-	105.00	-	-	-
33	M3PABE03	-	-	-	-	-	116.67	-	-	-

«Continuación»

Cód.	Cepa	NBRIP + 2Ca			NBRIP + 3Ca			YED + 3Ca		
		5 días	7 días	14 días	5 días	7 días	14 días	5 días	7 días	14 días
34	AZ1	-	-	-	-	-	110.00	-	-	-
35	AZ2	-	-	-	-	-	110.00	-	-	-
36	AZ3	-	-	140.00	-	-	133.33	-	-	-
37	AZ4	-	-	100.00	-	-	116.67	-	-	-
38	AZ5	-	-	250.00	-	150.00	166.67	-	150.00	160.00
39	AZ6	-	-	110.00	-	-	125.00	-	-	-
<b>40</b>	<b>AZ7</b>	-	-	<b>200.00</b>	<b>150.00</b>	<b>400.00</b>	<b>250.00</b>	<b>157.14</b>	<b>177.78</b>	<b>142.86</b>
41	AZ8	-	-	120.00	-	-	128.57	-	-	-
42	AZ9	-	100.00	162.50	-	133.33	150.00	-	-	-
45	M3SUBE24	-	-	110.00	-	-	-	-	-	-
46	M3SUBE25	-	-	102.50	-	-	-	-	-	-
47	M5SUBE26	-	-	105.00	-	150.00	133.33	-	-	-
49	M5SUBE23	-	-	105.00	-	-	-	-	-	-
51	M5SUBE06	-	-	105.00	-	-	-	-	-	-
52	M5SUBE05	-	-	103.33	-	-	110.00	-	-	125.00

## V. CONCLUSIONES

### 5.1 De las poblaciones microbianas de la rizósfera de papas amargas

- Se cuantificaron las poblaciones microbianas de suelo rizosférico (franco arenoso, pH 5.1–5.5) y tubérculos de dos variedades de papas amargas (Locka y Occucuri blanco) de las comunidades andinas de Jallamilla y Concahui (Ilave – Puno). En la mayoría de los grupos microbianos estudiados, se observaron diferencias significativas en la carga microbiana de los suelos según la época de muestreo (influencia del estado fenológico y temperatura), más no según la localidad ni la variedad cultivada.
- Las poblaciones de *Pseudomonas* y diazótrofos de vida libre se presentaron en mayor concentración en suelos cultivados que en suelo sin influencia de cultivos. Durante la floración llegaron a  $10^5$  y  $10^7 - 10^8$  NMP/g respectivamente.
- Las poblaciones en los tubérculos de papas amargas al momento de la cosecha fueron similares a las encontradas en el suelo del que provinieron.

### 5.2 De la caracterización molecular de las cepas microbianas

- Se obtuvieron 34 diferentes perfiles BOX-PCR a partir de 47 cepas aisladas de suelo rizosférico y tubérculos de papas amargas, caracterizadas molecularmente.
- El secuenciamiento del gen rARN 16S evidenció la presencia de bacterias de la familia *Bacillaceae* (*Bacillus* y *Brevibacterium*), *Paenibacillaceae* (*Brevibacillus*) y *Planococcaceae* (*Lysinibacillus*). Además se registraron miembros de la familia *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), *Rhizobiaceae*, (*Rhizobium*), *Brucellaceae* (*Pseudochrobactrum*) y *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*).
- Los microorganismos más frecuentes de la familia *Bacillaceae* presentes en suelo de la rizósfera y tubérculos de papas amargas fueron: *B. simplex* NBRC 15720<sup>T</sup>

(100 % y 99.80 % de similitud) y cepas relacionadas *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> (99.80 - 99.87 % de similitud). Otras cepas se relacionaron a *B. pumilus* ATCC 7061<sup>T</sup> (99.93 % de similitud) y también se identificó *B. safensis* FO-036b<sup>T</sup> (100 % de similitud). Algunos aislamientos se ubicaron dentro del cluster conformado por *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis* y otras dentro del mismo cluster que *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. cereus*. Finalmente, algunos aislamientos fueron relacionados al cluster comprendido por *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*. Un aislamiento estuvo relacionado con 99.92 % de similitud a *Brevibacillus laterosporus* DSM 25<sup>T</sup>, de la familia *Paenibacillaceae* y otro a *Lysinibacillus parviboronicapiens* BAM-582, con 99.79 % de similitud (familia *Planococcaceae*).

- Se reportaron 6 especies de *Pseudomonas* entre los microorganismos aislados de suelo de la rizósfera y tubérculos de papas amargas. Algunas cepas fueron relacionadas a *P. azotoformans* IAM1603<sup>T</sup> y *P. fragi* ATCC 4973, con 99.70 y 99.93 % de similitud. Otros aislamientos tuvieron 98.9 % de similitud a *P. gessardii* CIP 105469<sup>T</sup>. Se identificó *P. protegens* CHA0<sup>T</sup> y algunas cepas fueron relacionadas a *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* ATCC 49054<sup>T</sup> con 99.85 % de similitud y otras a *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> con 99.58 % de similitud.
- Se registraron microorganismos de la familia *Rhizobiaceae*, relacionados a *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> y *Rhizobium massiliae* 90A<sup>T</sup> (99.37 % de similitud para cada caso).

### 5.3 De la evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal

- Cinco aislamientos Gram positivos (M3PABE07, M3SUBE26, AZ3, M3PABE15 y M5SUBE24) y tres Gram negativos (M5SUBE49, M5SUBE51 y AZ8) obtuvieron biomasa fresca significativamente superior a la registrada por el control [PFA:  $0.00989 \pm 0.00041$  g y PFR:  $0.00272 \pm 0.00015$  g].
- Los aislamientos que produjeron mayor cantidad de ácido indol acético, fueron 3 (AZ2, AZ1 y AZ4), correspondientes a cepas de *Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup> y las relacionadas a *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> y *R. massiliae* 90A<sup>T</sup>,

con una producción entre 16.3 y 21.0  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  de AIA.

- Tres cepas de *Pseudomonas*, M5SUBE51 y M5SUBE49, relacionadas a *P. fragi* ATCC 4973<sup>T</sup> y AZ7, *Pseudomonas protegens* CHA0<sup>T</sup>, obtuvieron las mayores relaciones de eficiencia de solubilización de fosfatos, con porcentajes entre 400 y 500 % luego de 7 días de incubación en medio NBRIP con fosfato tricálcico.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Realizar la identificación microbiana y establecer las relaciones filogenéticas de las cepas que no fueron caracterizadas molecularmente.
- Completar la evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal de todos los aislamientos obtenidos.
- Algunas de las cepas obtenidas (35.38 %) fueron aisladas bajo condiciones de psicofilia, por lo que sería conveniente evaluar su capacidad promotora de crecimiento vegetal bajo las mismas condiciones.
- Sería conveniente validar la presencia de las especies microbianas identificadas con un nuevo muestreo y evaluación

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alexander M.** 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, 491 pp.

**Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C.** 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.*, 114: 329-341

**American Public Health Association (APHA).** 1992. Compendium of methods for microbial examination of foods. 3ª Edición.

**Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.

**Atlas R.M., Bartha R.** 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley (eds.). Madrid. 561 pp.

**Bakker P.A., Raaijmakers J.M., Bloemberg G.V., Hofte M., Lemanceau P., Cooke M.** 2007. New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 241-242

**Becker A., Pühler A.** 1998. Production of exopolysaccharides. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.). The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 97-118 pp.

**Botanical Society of America.** 2011. Triarch “Botanical Images” Student Travel Awards *Plant Sci. Bull.*, 57: 46.

**Boddey R.M., Uriquiaga S., Reis V.M., Dobereiner J.** 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. *Plant Soil*, 137: 111-117.

**Brady N.C., Weil R.R.** 2008. The Nature and Properties of Soil. 14 ed. Pearson-Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 990 pp.

**Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.R.** 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Microbiol.*, 57: 535-538.

**Calvache H.** 1988. Manejo de plagas en sistemas de producción, En: I Seminario sobre Sistemas de Producción en Papa. Manejo de plagas y enfermedades. IICA-BID-ICA. PROCIANDINO. Pasto, Colombia.

**Calvo P., Reymundo L., Zúñiga D.** 2009. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecol. Apl.* 7: 141-148.

**Canahua A.** 1998. Informe técnico: Producción y promoción de semilla de papas amargas en Puno. Experiencias y perspectivas. CEDECUM – SEMINAL S.A. – CIP. Puno, Perú.

**Canahua A., Aguilar P.** 1992. Agroecología de las papas amargas en Puno. En: J. Rea, J.J. Vacher (eds.). La Papa Amarga. Primera Mesa Redonda: Perú - Bolivia. La Paz 7-8 Mayo 1991. ORSTOM. La Paz., 57-61 pp.

**Canahua R., Arcos J. Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA)** 2002. Variedades nativas y mejoradas de papa en Puno. Imprenta del Instituto Nacional de Investigación Agraria. Lima. 118 pp.

**Carrasco E., Devaux A., García W., Esprella R.** 1997. Frost tolerant potato varieties for the Andean Highlands. In: Program Report 1995-1996. International Potato Center, Lima. 27-232 pp.

**Castellanos D., Cubillos R., Argüello H.** 2009. Selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético) a partir de muestras de suelo rizosférico, como primera etapa en el desarrollo de un biofertilizante. *Rev. Bras. Agroecologia.* 4: 1720-1723.

**Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.** 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol.*, 157: 503-523.

**Chu B.C., Garcia-Herrero A., Johanson T.H., Krewulak K.D., Lau C.K., Peacock R.S.** 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometal*, 23: 601–611.

**Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W.** 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2259-2261.

**Centro Internacional de la Papa (CIP).** 2011. Annual Report 2010. Putting Strategy into Action: Implementing the CIP corporate and strategic plan to enhance pro-poor research impacts. Metrocolor S.A, Lima-Perú, 124 pp

**Cook R.J., Baker K. F.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, 151 pp.

**Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Ait Barka E.** 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microb.*, 71: 4951–4959.

**Cortbaoui R.** 1988. Siembra de “Papa”. Boletín de Información Técnica. Segunda edición. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. 19 pp.

**Crosa J.H., Walsh C.T.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 223-249.

**Darzens A., Russell M.A.** 1997. Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system - A review. *Gene*, 192: 109-115.

**Dirección Regional de Agricultura Puno.** 2008. Plan estratégico regional del sector agrario de Puno 2009–2015. Puno-Perú. Diciembre 2008. 59 pp. Consultado el 13 febrero de 2015. Disponible en: [http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/conocenos/transparencia/planes\\_estrategicos\\_regionales/puno.pdf](http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/conocenos/transparencia/planes_estrategicos_regionales/puno.pdf).

**Duxbury J.M., Zavala Y.J.** 2005. What are safe levels of arsenic in food and soils? Symposium on the behaviour of arsenic in aquifers, soils and plants: Implications for management. Organised by: CYMMIT. IDB Bhaban, Dhaka, 16th – 18th January.

**Emmert E.A.B., Handelsman J.** 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 1-9.

**Estrada N.** 1991. Importancia genética de las papas amargas. In: La Papa amarga. I MESA REDONDA: PERU - BOLIVIA La Paz, 7 y 8 de mayo. J. Rea y J.J. Vacher (eds.). ORSTOM Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération.

**Fett W.A., Osman S.F., Dunn M.F.** 1987. Auxin production by plant-pathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1839–1845.

- Ferreira E., Dusi A., Xavier G., Rumjanek N.** 2008. Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 43: 605-612.
- Franco M.** 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 260 pp.
- Franco-Hernández M.O., Vásquez-Murrieta M.S., Patiño-Siciliano A., Dendooven L.** 2010. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. *Biores. Techn.*, 101: 3864-3869.
- Friessl W., Friedl J., Platzer K., Horak O., Gerzabek M.H.** 2006. Remediation of contaminated agricultural soils near a former Pb/Zn smelter in Austria: batch, pot and field experiments. *Environ. Pollut.* 144: 40-50.
- Frioni L.** 1999. Procesos Microbianos. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (eds.). Argentina. 331 pp.
- Fuqua C., Greenberg E.P.** 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3: 685–695.
- García Breijo F.J.** 2003. Biología y Botánica, Parte III: El Funcionamiento de las plantas. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado el 12 noviembre de 2010. Disponible en: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/programa.htm>.
- Gaur A.C., Ostwal K.P.** 1972. Influence of phosphate dissolving bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J. Expt. Biol.*, 10: 393-394
- Ginocchio R., Rodriguez P.H., Badilla-Ohlbaum R., Allen H.E., Lagos G.E.** 2002. Effect of soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 1736-1744.
- Gnanamanickam S.S., Priyadarshini V.B., Narayanan N.N., Vasudevan P., Kavitha S.** 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Curr. Sci.*, 77: 1435-1443.
- Goldstein A.H.** 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hort.*, 12: 185–193.

- Gomes N., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K.** 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the Tropics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 3758-3766.
- Gosling, P., A. Hodge, G. Goodlass, G.D. Bending.** 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 113: 17-35.
- Gottschalk G.** 1986. Bacterial metabolism. Berlin. Heidelberg. Germany. New York. USA: Springer.
- Gordon S.A., Weber R.P.** 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol.*, 26: 192-195.
- Gutiérrez-Mañero F., Pozuelo-Gonzalez J., Lucas J., Probanza A.** 1995. Effects of nodular extracts of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. on nitrogen fixation (Acetylene reduction assay) and denitrification in different soils. *Orsis*, 10: 17-23.
- Gutiérrez Mañero F.J., Acero N., Lucas J.A., Probanza A.** 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil*, 182: 67-74.
- Gutiérrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., Talon M.** 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant*, 111: 206 – 211.
- Gutiérrez R.** 2008. Papas nativas desafiando al cambio climático. Soluciones Prácticas-ITDG. Perú. 82 pp.
- Haas D., Défago G.** 2005. Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- Halder A.K., Mishra A.K., Bhattacharya P., Chakrabarty P.K.** 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36: 81–92
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D., Berg G.** 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, 321: 235-257.

- Hassen A.I., Labuschagne N.** 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World J. Microb. Biotech.*, 26: 1837-1846.
- Hijmans R.J.** 1999. Estimating frost risk in potato production on the Altiplano using interpolated climate data. Impact on a changing world. Program Report 1997-1998. International Potato Center, Lima. 373-380 pp.
- Holdridge L.R.** 1982. Ecología basada en zonas de vida, IICA. San José, Costa Rica, 216 pp.
- Huanco V.** 1992. Potencial de las papas amargas en el altiplano de Puno, Perú. En: Mesa Redonda Perú -Bolivia sobre Papa Amarga. Edit. ORSTOM La Paz, Bolivia.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M.** 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48: 239-248.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).** 2014. Producción de papa creció 45 %. Nota de prensa N° 082– 30 Mayo 2014. Consultado el 13 febrero de 2015. Disponible en: [http://www.inei.gov.pe/ media/MenuRecursivo/noticias/nota-de-prensa-n-082-2014-inei.pdf](http://www.inei.gov.pe/media/MenuRecursivo/noticias/nota-de-prensa-n-082-2014-inei.pdf).
- Kalma J.D., Laughlin G.P., Caprio J.M., Hamer P.J.C.** 1992. The bioclimatology of frost. *Advances in Bioclimatology 2*. Springer-Verlag, Berlin. 144 pp.
- Kato-Noguchi H, Ino T.** 2005. Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. *J Plant Physiol.*, 162: 718-721.
- Kawaguchi M., Fujioka S., Sakurai A., Yamaki Y.T.R., Syono, K.** 1993. Presence of a pathway for the biosynthesis of auxin via indole-3-acetamide in trifoliata orange. *Plant Cell Physiol.*, 34: 121-128.
- Kerdchoechuen O.** 2005. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 108: 155-163.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A.** 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Applied Microbiol.*, 29: 473-480.

- Kim K.Y., Jordan D., Krishnan H.B.** 1997. *Rahnella aqualitis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.*, 153: 273–277.
- Khan K.S., Joergensen R.G.** 2009. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. *Bioresour. Technol.*, 100: 303-309.
- Kloepper J.W.** 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. F.B. Metting, Jr. (ed.) Marcel Dekker Inc., New York, USA. 255-274 pp.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablutowicz R.M.** 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.*, 7: 39–43.
- Kohler J., Caravaca F., Carrasco L., Roldan A.** 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Appl. Soil Ecol.*, 35: 480-487.
- Kpombrekou K., Tabatabai M.A.** 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.*, 158: 442–453.
- Krasilnikov N.A.** 1957. On the role of soil micro-organism in plant nutrition. *Microbiologiya*, 26: 659-672.
- Kudashev I. S.** 1956. The effect of phosphobacterin on the yield and protein content in grains of autumn wheat, maize and soybean. *Doki. Akad. Skh. Nauk.*, 8: 20-23.
- Kundu B.S., Nehra K., Yadav R., Tomar M.** 2009. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of Chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Ind. J. Microbiol.*, 49: 120-127.
- Lacutus R.** 2000. Appraising levels of soil contamination and pollution with heavy metals. In: Heinike H. J., Eckselman W., Thomasson A.J., Jones R.J.A, Montanarella L. and Buckeley B. (eds.). *Land information systems for planning the sustainable use of land resources*. European Soil Bureau Research Report No. 4. Office of Official Publication of the European Communities, Luxembourg, 393-402 pp.
- Lee K.E., Pankhurst C.E.** 1992. Soil organisms and sustainable productivity. *Aust. J. Soil Res.*, 30: 855-892.

- Loper J.E., Henkels M.D.** 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 99-105.
- Lepper W.** 1949. Solaninhalte von 58 Kartoffelsorten. *Z. Lebensmitt.-Untersuch.*, 89: 264-273.
- Loh J., Pierson E.A., Pierson L.S. III, Stacey G., Chatterjee A.** 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 285–290.
- Lynch J.** 1990. The rhizosphere. Lynch J. (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 458 pp.
- Loynachan T.** 2001. Soil Microbial Ecology Laboratory Manual. Iowa State University (USA). 76 pp.
- Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V.** 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 373-383.
- Maier A, Riedlinger J, Fiedler H-P, Hampp R.** 2004. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic, and plant parasitic soil fungi in dual culture. *Mycol. Prog.*, 3: 129–136.
- Marek-Kozaczuk M., Deryto M., Skorupska A.** 1996. The insertion mutants of *Pseudomonas* sp. 267 defective in siderophore production and their effect on clover (*Trifolium pretense*) nodulated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Plant Soil*, 179: 269-274.
- Marschner H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. London Academy Press. 889 pp.
- Miller III A., Scanlan R.A, Lee J.S., Libbey L.M.** 1993. Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Appl. Microbiol.*, 25: 952-955.
- Minnesota Department of Health.** 2007. Hazardous substances in Minnesota: Arsenic. Setiembre 2007. Consultado el 30 mayo de 2009. Disponible en: <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/hazardous/topics/arsenic.html>
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI).** 2014. La papa. Principales aspectos agroeconómicos. Primera Edición. Centro de Documentación Agraria-CENDOC. 41 pp.

Consultado el 06 setiembre de 2015. Disponible en [http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/2014/papa\\_2014.pdf](http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/2014/papa_2014.pdf).

**Miwa H., Ahmed I., Yokota A., Fujiwara T.** 2009. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low boron-containing bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, 59: 1427–1432.

**Morlon P.** 1989. Du climat à la commercialisation: l'exemple de l'Altiplano péruvien. En: Eldin M. y Milleville P. Le risque en agriculture. ORSTOM, Paris. 187-224 pp.

**Müller G., Raymond K.** 1984. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. *J. Bacteriol.*, 160: 304-312.

**Nakas J.P., Klein D.A.** 1980. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semi-arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 113-117.

**Nautiyal C.** 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265-270.

**Neilands J.B.** 1995. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, 270: 26723–26726

**Nguyen C., Yan W., Le Tacon F., Lapeyrie F.** 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton, *Plant Soil*, 143: 193–199.

**Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P.** 2010. Focus on: beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15: 327-337.

**Nie Z.J., Hang B.J., Cai S., Xie X.T., He J., Li S.P.** 2011. Degradation of cyhalofop-butyl (CyB) by *Pseudomonas azotoformans* strain QDZ-1 and cloning of a novel gene encoding CyB-hydrolyzing esterase. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 6040-6046.

**Organización de los Estados Americanos (OEA).** 1996. Diagnóstico ambiental del sistema Titicaca- Desaguadero-Poopo-Salar de Coipasa (Sistema TDPS), Bolivia – Perú. Organización de los Estados Americanos, Washington. 192 pp.

**Okon Y., Labandera-Gonzalez C.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1591-1601.

**Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales (ONERN-CORPUNO).** 1965. Programa de Investigación y Evaluación de Recursos Naturales del Departamento de Puno. ONERN. Lima, Perú.

**O'Toole G.A., Kolter R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30:295-304.

**O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R.** 2000. Review. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 49-79

**Ozanne P.G.** 1980. Phosphate nutrition in plants- a general treatise. In *The Role of Phosphorus in Agriculture*, F.E. Khasawneh, E.C. Sample and E.J. Kamprath (eds.). American Soc. Agron., Crop Sci. Soc. of Am. and Soil Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin. 910 pp.

**Patiño C.** 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del Cauca, estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis para optar por el grado de doctor en Ciencias Agropecuarias, Línea de investigación manejo de suelos y aguas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordinación General de Posgrados. Palmira.

**Patten C.L., Glick B.R.** 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3795-3801.

**Paul E.A., Clark F.E.** 1989. Occurrences and distribution of soil organics. In: *Soil microbiology and biochemistry*. E.A. Paul and F.E. Clark (eds.). Academic Press, San Diego. 81-84 pp.

**Paul E., Clark F.E.** 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. New York. 340 pp.

**Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C.** 2003. Tales from the underground: molecular Plant–Rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.*, 26: 189-199.

**Pinton R., Veranini Z., Nannipieri P.** 2007. *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York, USA: Taylor & Francis Group, LLC.

**Prasanna L, Eijsink VG, Meadow R, Gåseidnes S.** 2013. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 1601-1611.

**Príncipe A., Alvarez F., Castro G., Zachi L., Fischer S., Mori G., Jofré E.** 2007. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. *Curr. Microbiol.*, 55: 314-322.

**Probanza A., Lucas J.A., Acero N., Gutiérrez-Mañero F.J.** 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant Soil*, 182: 59–66.

**Pulgar Vidal J.** 1996. Geografía del Perú: Las ocho regiones naturales. Décima edición. Lima: PEISA.

**R Development Core Team.** 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

**Raja C.E., Omine K.** 2012. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. *Afr. J. Biotech.*, 11: 2267-2275.

**Ramos H.J.O., Roncato-Maccari L.D.B., Souza E.M., Soares-Ramos J.R.L., Hungria M., Pedrosa F.O.** 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *J. Biotechnol.*, 97: 243-252.

**Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T.** 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrolagents. *Anton van Leeuwenhoek*, 81: 537–547.

**Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raghuchander T., Prakasam V., Samiyappan R.** 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection*, 20: 1-11.

**Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y.** 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34: 180-188.

**Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S., Latif F.** 2004. Organic acids production and phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biol. Sci.*, 7: 187-196.

**Ratto S., Miguez F.** 2006. Zinc en el cultivo de maíz, deficiencia de oportunidad. En: Informaciones Agronómicas N° 63. J. Espinosa (ed.) INPOFOS. Quito. Octubre de

2006. 8-11 pp. Consultado el 17 julio de 2015 Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/E1EE67F86A34A12A852579A3006D4BBB/\\$FILE/Inf-Agro%2063.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/E1EE67F86A34A12A852579A3006D4BBB/$FILE/Inf-Agro%2063.pdf)

**Rea J.** 1992. Vigencia de las papas nativas en Bolivia. En: Rea J. and J.J. Vacher. La papa amarga. I Mesa redonda Perú-Bolivia. La Paz, 7-8 mayo 1991. ORSTOM, La Paz. 15-23 pp.

**Reyes I., Bernier L., Simard R., Antoun H.** 1999. Effect of nitrogen source on solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28: 281–290.

**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 de Grado. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Fac. Ciencias Biológicas. 152 pp.

**Roesti D., Gaur R., Johri B.N., Imfeld G., Sharma S., Kawaljeet K., Aragno M.** 2006. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 1111-1120.

**Ross H., Pasemann P., Nitzsche W.** 1978. Der Glykoalkaloid gehalt von Kartoffelsorten in seiner Abhängigkeit von Anbauort und -jahr und seiner Beziehung zum Geschmack. *Z. Pfl. Zücht.*, 80: 64-79.

**Ruiz E.A., Armienta M.A.** 2012. Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 28: 103-117.

**Saitou N., Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.

**Salis A.** 1989. Caracterización de 8 comunidades seleccionadas representativas de 4 zonas agroecológicas de Puno. Informe Proyecto PISA, Puno, Perú.

**Salisbury F.** 1994. The role of plant hormones. En: Plant-Environment Interactions, Wilkinson, R.E. (ed.). Marcel Dekker. New York, USA. 39-81 pp:

**Sánchez L.** 2006. Metabolito bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* como agente biocontrolador en cultivos de interés agrícola. Consultado el 12 julio de 2007. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos36/metabolitobacteriano/metabolito-bacteriano.shtml>.

- Santillana N., Arellano C., Zúñiga D.** 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecol. Apl.*, 4: 47-51.
- Saotome M., Shirahata K., Nishimura R., Yahaba M., Kawaguchi M., Syono K., Kitsuwa T., Ishii Y., Nakamura T.** 1993. The identification of indole-3-acetic acid and indole-3-acetamide in hypocotyls of Japanese cherry. *Plant Cell Physiol.*, 34: 157-159.
- Shoda M.** 2000. Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.*, 89: 515-521
- Sorensen J., Jensen L.E., Nybroe O.** 2001. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas inoculants*: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant Soil*, 232: 97-108.
- Spiro T.** 1977. Chemistry and biochemistry of iron, p. 23-32. In E. B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, and R. R. Crichton (eds.). Proteins of iron metabolism. Grune and Stratton, New York.
- Spooner D., Núñez J., Trujillo G., Herrera M.R., Guzmán F., Ghislain M.** 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 19398–19403.
- Somers E., Vanderleijden J., Srinivasan M.** 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30: 205–240.
- Sharan A., Shikha, Darmwal N.S., Gaur R.** 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline–alkali soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 753-759.
- Smith E.S., Christophersen M.H., Pope S., Andrew S.F.** 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrat-ing mycorrhizal influences. *Plant Soil*, 327: 1-21.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 187-209.
- Steenhoudt O., Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24:487-506.

- Subba Rao N.** 1982. Biofertilizers in agriculture. Serie 7. Oxford & IBH Publishing. Nueva Deli. 186 pp.
- Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., Zuberer D.A.** 2005. Principles and applications of soil microbiology, Second Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Swaminathan M.** 1991. Sustainable agricultural systems and food security. *Outlook Agr.*, 20: 243-249.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.
- Tapia N.M.E.** 1984. El ecosistema de los Andes del Sur del Perú y su relación con los pastizales. En: Pastoreo y pastizales de los Andes del Sur del Perú. INIPA/PCAIRM. Lima, Perú. 49-76.
- Tapia M.** 1996. Ecodesarrollo en los Andes Altos. Fundación Friedrich Ebert. Lima.
- Tapia M.** 2000. Agroecología de los cultivos andinos subexplotado en: cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Segunda Edición. Organización de las Naciones Unidas.
- Tapia N., Saravia G.** 1997. Biodiversidad en papas amargas. Prov. Tapacará, Dpto. de Cochabamba. AGRUCO. Cochabamba. 53 pp.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 25: 4876-4882.
- Trabelsi D., Mhamdi R.** 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Res. Int.*, doi:10.1155/2013/863240.
- Uggla C, Moritz T, Sandberg G, Sundberg B.** 1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *P. Natl Acad. Sci.*, 93: 9282-9286.
- United States Department of Agriculture (USDA).** 1999. Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo. Washington. 82 pp. Consultado el 07 agosto de 2013. Disponible en: <http://soils.usda.gov/sqi/assessment/files/KitSpanish.pdf>.
- van Loon J.C.** 2000. Induced resistance. In: Slusarenko A.J., Fraser R.S.S. & van Loon J.C. (eds.). *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 521-574 pp.

**van Loon L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254.

**van Loon L.C., Bakker P., Pieterse C.M.J.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 453-483.

**Vallenas M.** 1992. Procesamiento de la papa amarga en la zona sur del Perú. Elaboración de chuño y tunta. En: La papa amarga. I Mesa Redonda, Perú-Bolivia. ORSTOM, La Paz, Bolivia.

**Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucl. Acids Res.*, 19: 6823-6831.

**Vinther F., Idris M., Jensen V.** 1981. Biological nitrogen fixation associated with roots of field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, 144: 385-394.

**Vlassak K., Paul E., Harris R.** 1973. Assessment of biological nitrogen fixation in grassland and associated sites. *Plant Soil*, 38: 637-649.

**Wichner S., Libbert E.** 1968. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism I. Detection of IAA-producing epiphytic bacteria and their role in long duration experiments on tryptophan metabolism in plant homogenates. *Physiol Plant*, 21: 227-241.

**Whipps J.M.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52: 487-511

**Wiedmann, M., Weilmeier D., Dineen S.S., Ralyea R.M., Boor K.J.** 2000. Molecular and Phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2085-2095.

**Zapater J.** 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N<sub>2</sub>. *Anales científicos de la UNALM*, 13: 45-57.

**Zúñiga D.** 2012. Manual de Microbiología agrícola: *Rhizobium*, PGPR, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. 106 pp.

## **VIII. ANEXOS**

**ANEXO 1:** Caracterización morfológica de las colonias microbianas procedentes de suelos y de tubérculos de papas amargas

<b>Código*</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Borde</b>	<b>Textura</b>	<b>Observaciones</b>
M3PABE01	T3p-a	ETA	Pequeño	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE02	T3p-b	ETA	Pequeño	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE03	T4p-b	ETA	Mediano	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE04	T6p-a	ETA	Grande	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE05	T6p-b	ETA	Pequeño	Amorfo	Crema	Irregular	Seco	Centro denso
M3PABE06	T6p-c	ETA	Mediano	Amorfo	Crema	Irregular	Seco	Centro denso
M3PABE07	T1p – a	EPA	Grande	Circular	Crema	Regular	Seco	Bien definido
M3PABE08	T2p – a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Irregular	Seco	Centro denso
M3PABE09	T2p – b	EPA	Mediano	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE10	T3p – a	EPA	Mediano	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE11	T3p – b	EPA	Mediano	Ovalado	Crema	Irregular	Acuoso	-
M3PABE12	T4p – a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3PABE13	T6p – a	EPA	Mediano	Circular	Traslúcido	Regular	Acuoso	-
M3PABE14	T6p – b	EPA	Mediano	Circular	Crema	Irregular	Seco	-
M3PABE15	T8p – a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Cremoso	-
M3SUBE16	T1 – a	EMANA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Cremoso	-
M3SUBE17	T1 – b	EMANA	Pequeño	Ovalado	Crema	Regular	Cremoso	-
M3SUBE18	T4 – a	EMANA	Mediano	Ovalado	Crema	Regular	Cremoso	-
M3SUBE19	T4 – b	EMANA	Grande	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE20	T8 – a	EMANA	Pequeño	Circular	Crema	Irregular	Seco	-
M3SUBE21	T9 – a	EMANA	Pequeño	Ovalado	Crema	Regular	Acuoso	-

«Continuación»

<b>Código</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Borde</b>	<b>Textura</b>	<b>Observaciones</b>
M3SUBE22	T10 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE23	T12 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE24	T12 - b	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE25	T13 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE26	T14 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	-
M3SUBE27	T15 - a	EPA	Mediano	Ovalado	Crema	Irregular	Acuoso	-
M5SUBE01	S1 -a	ETA	Mediano	Convexo	Blanquecino	Regular	Acuoso	Centro difuso
M5SUBE02	S2 - b	ETA	Mediano	Ovalado	Blanquecino	Regular	Acuoso	Borde difuso
M5SUBE03	S5 -a	ETA	Pequeño	Circular	Blanco opaco	Regular	Cremoso	-
M5SUBE04	S6 - a	ETANA	Grande	Circular	Blanco opaco	Regular	Acuoso	-
M5SUBE05	S7 - a	ETA	Grande	Circular	Incoloro turbio	Regular	Acuoso	-
M5SUBE06	S7 - b	ETA	Grande	Ovalado	Blanquecino	Regular	Cremoso	Centro difuso
M5SUBE07	S7 - c	ETA	Pequeño	Circular	Blanquecino	Regular	Cremoso	-
M5SUBE22	S1 - c	EMA	Pequeño	Convexo	Crema	Irregular	Seco	-
M5SUBE23	S2 - a	EMA	Mediano	Amorfo	Crema	Irregular	Cremoso	Poco definido
M5SUBE24	S5 - a	EMA	Pequeño	Convexo	Crema	Irregular	Seco	-
M5SUBE25	S6 - a	EMA	Grande	Circular / Amorfo	Beige	Irregular	Acuoso	-
M5SUBE26	S6 - b	EMA	Grande	Circular	Beige	Irregular	Acuoso	-
M5SUBE27	S6 - c	EMA	Grande	Circular / Amorfo	Beige	Irregular	Acuoso	-
M5SUBE37	S2 - b	EMANA	Pequeño	Circular	Crema	Regular	Seco	Convexo
M5SUBE38	S3 - a	EMANA	Mediano	Circular	Crema	Irregular	Cremoso	Centro difuso

«Continuación»

<b>Código</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Borde</b>	<b>Textura</b>	<b>Observaciones</b>
M5SUBE39	S5 - a	EMANA	Mediano	Circular	Crema	Irregular	Cremoso	Centro difuso
M5SUBE40	S6 - b	EMANA	Pequeño	Circular	Crema	Irregular	Seco	Centro amarill.
M5SUBE41	S7 - a	EMANA	Mediano	Circular	Crema	Irregular	Seco	Centro difuso
M5SUBE42	S8 - a	EMANA	Grande	Circular	Crema	Irregular	Seco	Centro difuso
M5SUBE44	S1 - a	EPA	Mediano	Convexo	Crema	Regular	Acuoso	-
M5SUBE45	S2 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE46	S3 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema traslúc.	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE47	S4 - a	EPA	Pequeño	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE48	S5 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE49	S6 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE50	S7 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M5SUBE51	S8 - a	EPA	Mediano	Circular	Crema	Regular	Acuoso	Bien definido
M3SUPS03	T3 - 1	-	Pequeño	Circular	Crema	Regular	Cremoso	-
M3SUPS04	T3 - 2	-	Mediano	Circular	Crema	Regular	Cremoso	-

(\*) Los primeros 15 códigos, corresponden a cepas provenientes de tubérculos de papas.

**ANEXO 2.** Poblaciones microbianas de suelos rizosféricos de papas amargas expresada en Log (UFC/g ) ó Log (NMP/g)\*

MUESTREO	COMUNIDAD	VARIEDAD	EMA	EMANA	ETA	ETANA	EPA	EPANA	ASR	AMV	MOH	LEV	ACTI	DIAZO*	PS*	CT*	CF*
1	1	1	5.792	3.505	3.114	1.431	5.519	4.663	2.892	7.732	4.944	3.041	3.780	8.079	5.000	3.415	1.000
1	1	1	4.708	2.763	1.973	1.672	4.663	3.940	3.903	7.146	4.806	3.362	3.628	5.380	5.000	3.000	0.000
1	1	2	5.398	2.255	2.778	1.230	5.934	5.279	5.556	6.663	4.568		3.710	7.708	3.230	2.415	1.000
1	1	2	5.204	4.813	3.398	1.204	4.398	4.255	3.146	7.079	4.940	4.881	3.427	7.079	4.633	4.342	0.602
1	1	3	5.176	3.342	2.591	1.204	5.748	5.447	4.415	7.079	5.342		3.694	6.114	2.380	3.447	0.602
1	2	1	5.146	3.462	3.431	2.362	5.322	5.362	3.820	6.491	4.672		3.196	7.000	4.892	3.653	0.000
1	2	1	5.176	3.398	2.954	2.362	5.041	4.663	4.000	7.301	4.681		3.879	7.041	6.079	2.415	0.000
1	2	2	4.255	2.531	3.732	2.079	4.964	4.204	3.863	7.041	4.799		3.631	6.924	6.079	2.653	0.000
1	2	2	4.869	1.968	3.255	2.342	4.908	3.820	3.869	6.623	4.886		3.571	6.114	4.415	3.000	0.000
1	2	3	5.732	3.580	3.255	2.771	5.079	4.447	4.724	6.633	4.949		3.265	6.447	3.041	3.690	1.041
2	1	1	5.146	2.544	3.279	2.623	4.732	3.903	2.079	7.813	4.633		4.613	6.114	4.255	3.041	0.000
2	1	1	5.491	5.041	2.255	2.826	4.813	4.556	2.380	7.591	4.716		5.580	6.114	4.041	3.041	0.000
2	1	2	5.591	4.613	2.964	3.176	4.949	4.114	2.568	7.204	4.114		5.230	5.041	4.230	2.322	0.477
2	1	2	5.204	4.114	2.973	2.230	3.851	4.964	2.663	7.568	4.851		4.643	6.079	5.079	1.968	0.000
2	1	3	5.322	4.398	2.204	3.875	5.415	4.756	2.602	6.763	4.851		4.380	5.279	3.279	3.041	0.602
2	1	3	4.633	4.204	3.380	3.322	5.000	4.653	3.079	7.415	4.869		5.505	3.778	3.322	2.322	0.000
2	2	1	5.230	4.699	3.301	2.279	4.919	4.633	2.771	7.716	4.973		4.991	5.415	2.964	2.380	0.000
2	2	1	5.230	3.633	3.114	2.362	5.041	5.255	2.964	7.362	4.778		4.732	5.477	3.255	2.079	0.000
2	2	2	5.146	4.380	3.279	2.591	4.342	4.380	2.556	7.041	4.771		4.380	5.146	3.663	1.875	0.000
2	2	2	5.519	4.716	3.380	2.633	4.929	5.000	2.255	7.580	4.869		5.204	6.114	5.114	2.380	0.000
2	2	3	4.041	4.301	2.301	2.279	4.279	5.799	2.204	7.568	4.748		5.462	4.204	3.663	1.362	0.000
2	2	3	4.505	4.398	3.491	3.204	4.462	4.929	2.857	6.732	4.556		3.544	6.114	5.398	3.041	0.000

Muestreo: (1) Enero del 2009, floración (2) Abril del 2009, tuberización (3) Mayo del 2009, cosecha

Comunidad: (1) Jallamilla, (2) Concahui.

Variedad: Suelo cultivado con papa (1) Occucuri blanco, (2) Locka, (3) Suelo sin cultivo.

«Continuación»

MUESTREO	COMUNIDAD	VARIEDAD	EMA	EMANA	ETA	ETANA	EPA	EPANA	ASR	AMV	MOH	LEV	ACTI	DIAZO*	PS*	CT*	CF*
3	1	1	4.492	3.974	2.780	2.612	4.138	3.828	2.293	7.520	4.895	3.492	5.668	7.376	4.337	0.477	0.000
3	1	1	5.261	4.238	2.633	2.235	4.738	3.235	2.392	7.900	4.928	4.286	5.674	7.392	5.072	0.477	0.000
3	1	2	5.218	4.095	3.521	2.817	4.798	4.404	2.519	8.011	4.805	5.404	5.542	7.404	5.041	5.083	0.000
3	1	2	4.736	4.213	3.631	2.210	4.439	4.399	1.338	7.918	4.605	4.876	5.870	8.338	5.079	5.079	0.000
3	1	3	0.000	5.039	2.710	2.125	4.287	4.224	3.048	7.039	4.949	5.312	5.700	8.011	3.379	4.233	0.000
3	1	3	0.000	4.195	2.579	1.390	4.308	3.758	2.483	6.214	2.867	4.369	5.298	5.244	1.244	3.022	0.000
3	2	1	4.876	4.344	2.186	1.072	4.562	3.562	3.332	7.392	5.353		5.633	7.633	4.207	3.985	0.000
3	2	1	3.176	4.491	2.465	1.594	5.041	4.806	2.465	7.322	4.953	3.828	6.107	7.412	3.226	2.652	0.000
3	2	2	4.743	4.760	3.057	1.554	4.182	4.097	3.554	7.243	4.669	5.115	5.792	7.990	2.990	2.881	0.000
3	2	2	4.474	4.775	2.421	1.775	4.453	4.360	2.059	7.766	4.672	4.314	6.046	7.013	2.934	0.477	0.000
3	2	3	4.325	4.400	2.241	0.978	4.127	3.568	2.862	6.592	4.881	3.978	5.731	6.626	4.200	4.200	0.000
3	2	3	4.547	4.129	2.547	1.745	4.272	3.963	2.573	6.861	5.307	4.506	4.792	6.205	1.904	0.477	0.000

Muestreo: (1) Enero del 2009, floración (2) Abril del 2009, tuberización (3) Mayo del 2009, cosecha

Comunidad: (1) Jallamilla, (2) Concahui.

Variedad: Suelo cultivado con papa (1) Occucuri blanco, (2) Locka, (3) Suelo sin cultivo.

### ANEXO 3. Análisis estadístico de las poblaciones microbianas en la rizósfera de papas amargas

#### EMA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	13.0115803	6.50579016	31.9113759	<b>2.61E-06</b>
Localidad	1	0.38499776	0.38499776	1.88844216	0.18832287
Variedad	2	8.44758671	4.22379336	20.7180149	<b>3.63E-05</b>
Muestreo:Localidad	2	3.43108657	1.71554328	8.41486511	<b>0.00318289</b>
Muestreo:Variedad	4	8.88705102	2.22176275	10.8979086	<b>0.00018505</b>
Localidad:Variedad	2	6.41309544	3.20654772	15.7283508	<b>0.00016695</b>
Muestreo:Localidad:Variedad	4	11.5250462	2.88126156	14.1327984	<b>4.06E-05</b>
Residuals	16	3.261929	0.20387056	NA	NA

#### EMANA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	9.58834735	4.79417368	9.53677071	<b>0.00187553</b>
Localidad	1	0.01126944	0.01126944	0.02241764	0.88285251
Variedad	2	0.22810912	0.11405456	0.2268821	0.79953542
Muestreo:Localidad	2	0.52300883	0.26150441	0.52019551	0.60412028
Muestreo:Variedad	4	0.8815529	0.22038822	0.43840547	0.77905218
Localidad:Variedad	2	0.45313574	0.22656787	0.45069828	0.64502883
Muestreo:Localidad:Variedad	4	1.55202974	0.38800744	0.77184061	0.55922226
Residuals	16	8.0432655	0.50270409	NA	NA

#### ETA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	0.65746953	0.32873477	1.5792491	0.2366291
Localidad	1	0.07978262	0.07978262	0.38327746	0.54456935
Variedad	2	1.41620113	0.70810057	3.40173081	0.05874266
Muestreo:Localidad	2	1.68131112	0.84065556	4.03852794	<b>0.03803057</b>
Muestreo:Variedad	4	0.25849835	0.06462459	0.31045795	0.86676732
Localidad:Variedad	2	0.10644233	0.05322117	0.25567566	0.77749735
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.18220069	0.04555017	0.21882403	0.92403643
Residuals	16	3.3305425	0.20815891	NA	NA

#### ETANA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	6.72482204	3.36241102	25.6516252	<b>1.02E-05</b>
Localidad	1	0.14235294	0.14235294	1.08600176	0.31285013
Variedad	2	0.06972576	0.03486288	0.26596675	0.76978716
Muestreo:Localidad	2	4.96319764	2.48159882	18.9319635	<b>6.06E-05</b>
Muestreo:Variedad	4	1.58749351	0.39687338	3.02772238	<b>0.04897694</b>
Localidad:Variedad	2	0.12448452	0.06224226	0.47484234	0.63047356
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.61441515	0.15360379	1.17183377	0.36011196
Residuals	16	2.0972775	0.13107984	NA	NA

**EPA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	2.77992652	1.38996326	7.71573567	<b>0.0045086</b>
Localidad	1	0.09603674	0.09603674	0.53310335	0.4758605
Variedad	2	0.23654796	0.11827398	0.6565431	0.53206407
Muestreo:Localidad	2	0.04599908	0.02299954	0.12767127	0.88103032
Muestreo:Variedad	4	0.50002752	0.12500688	0.69391765	0.60699298
Localidad:Variedad	2	0.76652286	0.38326143	2.12749787	0.15160119
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.40773483	0.10193371	0.56583765	0.69100456
Residuals	16	2.882345	0.18014656	NA	NA

**EPANA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	3.54482727	1.77241364	7.83752706	<b>0.00423859</b>
Localidad	1	0.17943824	0.17943824	0.79346716	0.38625283
Variedad	2	0.2675991	0.13379955	0.59165512	0.56507385
Muestreo:Localidad	2	0.73564983	0.36782492	1.62650392	0.22749464
Muestreo:Variedad	4	1.19943556	0.29985889	1.32596146	0.30283991
Localidad:Variedad	2	1.53315034	0.76657517	3.38975819	0.05923847
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.60209459	0.15052365	0.66560826	0.62501667
Residuals	16	3.618312	0.2261445	NA	NA

**ASR**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	14.6332609	7.31663044	18.673667	<b>6.55E-05</b>
Localidad	1	0.33442306	0.33442306	0.85352197	0.36928177
Variedad	2	0.70168432	0.35084216	0.89542717	0.42794251
Muestreo:Localidad	2	0.32379987	0.16189994	0.41320462	0.66838744
Muestreo:Variedad	4	0.82923903	0.20730976	0.52910057	0.71609525
Localidad:Variedad	2	0.70381907	0.35190954	0.89815135	0.42689551
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.81314774	0.20328694	0.51883344	0.72316437
Residuals	16	6.2690465	0.39181541	NA	NA

**AMV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	0.92855722	0.46427861	3.49298578	0.05511337
Localidad	1	0.33820238	0.33820238	2.54445518	0.1302422
Variedad	2	2.15201558	1.07600779	8.09531137	<b>0.00372499</b>
Muestreo:Localidad	2	0.10096603	0.05048302	0.37980742	0.68999762
Muestreo:Variedad	4	1.11427819	0.27856955	2.09580938	0.12891907
Localidad:Variedad	2	0.12951801	0.064759	0.48721236	0.62315968
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.20934083	0.05233521	0.39374231	0.81012492
Residuals	16	2.1266785	0.13291741	NA	NA

**MOH**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	0.11098655	0.05549328	0.32186044	0.7293844
Localidad	1	0.23622224	0.23622224	1.37008658	0.25893637
Variedad	2	0.14292979	0.07146489	0.41449566	0.66756748
Muestreo:Localidad	2	0.48458108	0.24229054	1.40528269	0.27399653
Muestreo:Variedad	4	0.68029165	0.17007291	0.98642117	0.44281331
Localidad:Variedad	2	0.04515579	0.02257789	0.13095155	0.87819085
Muestreo:Localidad:Variedad	4	1.02217965	0.25554491	1.4821579	0.2540684
Residuals	16	2.7586255	0.17241409	NA	NA

**LEV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	1	1.27980055	1.27980055	5.44230265	0.05841054
Localidad	1	0.2062	0.2062	0.87685759	0.38520567
Variedad	2	3.88524854	1.94262427	8.26093502	<b>0.01890777</b>
Muestreo:Variedad	1	0.14678526	0.14678526	0.62419868	0.45956785
Localidad:Variedad	2	0.116665	0.0583325	0.24805671	0.78793965
Residuals	6	1.4109475	0.23515792	NA	NA

**ACTI**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	23.6776126	11.8388063	42.1709265	<b>4.18E-07</b>
Localidad	1	0.11600576	0.11600576	0.4132233	0.52944312
Variedad	2	0.48784192	0.24392096	0.86886909	0.43830249
Muestreo:Localidad	2	0.16631222	0.08315611	0.29620978	0.74762204
Muestreo:Variedad	4	0.12539231	0.03134808	0.11166476	0.97661467
Localidad:Variedad	2	0.22789543	0.11394771	0.40589233	0.67305308
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.02122734	0.00530683	0.01890344	0.99922083
Residuals	16	4.4917415	0.28073384	NA	NA

**DIAZO**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	21.3401054	10.6700527	13.1490881	<b>0.00041917</b>
Localidad	1	0.08055956	0.08055956	0.09927643	0.75677171
Variedad	2	5.31049084	2.65524542	3.27215403	0.06436719
Muestreo:Localidad	2	0.05476446	0.02738223	0.0337441	0.9668875
Muestreo:Variedad	4	0.35379997	0.08844999	0.10900009	0.97762249
Localidad:Variedad	2	0.51993738	0.25996869	0.32036873	0.73043119
Muestreo:Localidad:Variedad	4	1.2989251	0.32473128	0.40017798	0.80566196
Residuals	16	12.983474	0.81146712	NA	NA

**PS**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	3.8533893	1.92669465	2.62895017	0.10299044
Localidad	1	0.00979203	0.00979203	0.0133611	0.90941561
Variedad	2	8.69777871	4.34888936	5.93400382	<b>0.01180626</b>
Muestreo:Localidad	2	3.64316504	1.82158252	2.48552601	0.11481486
Muestreo:Variedad	4	7.12610952	1.78152738	2.43087129	0.09015288
Localidad:Variedad	2	4.18834558	2.09417279	2.85747195	0.08687407
Muestreo:Localidad:Variedad	4	2.93163485	0.73290871	1.00004455	0.43618609
Residuals	16	11.726017	0.73287606	NA	NA

**CT**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	3.48075692	1.74037846	1.72801655	0.20918257
Localidad	1	1.66545956	1.66545956	1.6536298	0.21676494
Variedad	2	1.08674077	0.54337038	0.53951083	0.59327486
Muestreo:Localidad	2	0.19184392	0.09592196	0.09524063	0.90966565
Muestreo:Variedad	4	4.46411331	1.11602833	1.10810118	0.38675095
Localidad:Variedad	2	5.79047852	2.89523926	2.87467438	0.08578074
Muestreo:Localidad:Variedad	4	14.9150345	3.72875862	3.70227325	<b>0.02563637</b>
Residuals	16	16.114461	1.00715381	NA	NA

**CF**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestreo	2	1.06534682	0.53267341	9.74957866	<b>0.001703</b>
Localidad	1	0.30913424	0.30913424	5.65811713	<b>0.03017119</b>
Variedad	2	0.20341198	0.10170599	1.86153567	0.18757005
Muestreo:Localidad	2	0.25574275	0.12787137	2.3404435	0.12835316
Muestreo:Variedad	4	0.28637419	0.07159355	1.31038438	0.30819358
Localidad:Variedad	2	0.10562204	0.05281102	0.9666058	0.401509
Muestreo:Localidad:Variedad	4	0.46494572	0.11623643	2.12748789	0.12457756
Residuals	16	0.8741685	0.05463553	NA	NA

**ANEXO 4.** Poblaciones microbianas en tubérculos de papas amargas expresadas en Log (UFC/g )

COMUNIDAD	VARIEDAD	EMA	EMANA	ETA	ETANA	EPA	EPANA	SR	AMV	ANMV	APV	MOH	LEV	ENT
1	1	3.716	3.690	2.613	2.643	4.146	3.279	2.322	8.398	5.204	7.633	3.778	3.398	4.255
1	1	3.556	3.398	2.959	2.301	4.114	3.845	2.724	8.176	6.415	6.623	3.623	3.623	5.204
1	2	3.415	2.851	2.908	2.114	3.301	3.322	2.544	6.176	4.591	7.881	4.477	4.623	4.415
1	2	2.792	2.079	2.230	1.000	2.771	2.771	1.000	7.903	5.944	7.763	4.146	4.886	4.146
2	1	3.301	2.996	3.114	0.602	2.255	1.944	3.114	6.964	5.255	6.531	4.69	5.041	0.000
2	1	3.176	3.000	3.857	0.477	3.301	2.908	2.146	7.898	4.505	6.740	4.362	5.114	4.778
2	2	2.813	2.415	2.342	0.602	2.568	2.724	2.826	6.833	4.681	6.279	4.114	4.724	4.398
2	2	3.079	2.591	2.398	0.602	2.544	2.322	2.591	7.477	5.431	6.568	4.230	4.826	4.079

Comunidad: (1) Jallamilla, (2) Concahui.

Variedad: Suelo cultivado con papa (1) Occucuri blanco, (2) Locka, (3) Suelo sin cultivo.

**ANEXO 5.** Análisis estadístico de las poblaciones microbianas en tubérculos de papas amargas

**EMA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.1540125	0.1540125	2.76151584	0.1574464
Variedad	1	0.3403125	0.3403125	6.10196159	0.05651532
Residuals	5	0.278855	0.055771	NA	NA

**EMANA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.129032	0.129032	1.22503076	0.3187615
Variedad	1	1.238738	1.238738	11.7605877	<b>0.01864822</b>
Residuals	5	0.526648	0.1053296	NA	NA

**ETA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.12525013	0.12525013	0.64499175	0.45836913
Variedad	1	0.88777812	0.88777812	4.57172848	0.08551621
Residuals	5	0.97094363	0.19418873	NA	NA

**ETANA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	4.16882813	4.16882813	17.8989472	<b>0.00824261</b>
Variedad	1	0.36337813	0.36337813	1.56017127	0.26692929
Residuals	5	1.16454563	0.23290913	NA	NA

**EPA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	1.678112	1.678112	7.85265325	<b>0.03789252</b>
Variedad	1	0.865928	0.865928	4.052073	0.10026477
Residuals	5	1.0685	0.2137	NA	NA

**EPANA**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	1.37697013	1.37697013	6.58833204	0.05023159
Variedad	1	0.08757112	0.08757112	0.41899794	0.54597821
Residuals	5	1.04500663	0.20900133	NA	NA

**SR**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.54444613	0.54444613	1.28836786	0.3078135
Variedad	1	0.22612813	0.22612813	0.53510567	0.49729615
Residuals	5	2.11292963	0.42258593	NA	NA

**AMV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.27417012	0.27417012	0.52096685	0.50276162
Variedad	1	1.16052613	1.16052613	2.20518426	0.19767763
Residuals	5	2.63135863	0.52627172	NA	NA

**ANMV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.6509405	0.6509405	1.31831939	0.30284256
Variedad	1	0.066978	0.066978	0.13564741	0.72772585
Residuals	5	2.468827	0.4937654	NA	NA

**APV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	1.7879405	1.7879405	9.02060834	<b>0.02998079</b>
Variedad	1	0.116162	0.116162	0.58606643	0.47850417
Residuals	5	0.991031	0.1982062	NA	NA

**MOH**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	0.235298	0.235298	1.98421218	0.21798993
Variedad	1	0.0330245	0.0330245	0.27848777	0.62026505
Residuals	5	0.5929255	0.1185851	NA	NA

**LEV**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	1.26007813	1.26007813	4.98608533	0.07588292
Variedad	1	0.44321113	0.44321113	1.75377101	0.24270701
Residuals	5	1.26359463	0.25271893	NA	NA

**ENT**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Localidad	1	2.83815313	2.83815313	0.97239953	0.36936565
Variedad	1	0.98070013	0.98070013	0.33600454	0.58728126
Residuals	5	14.5935546	2.91871093	NA	NA

**ANEXO 6.** Evaluación de la biomasa fresca y seca de la parte aérea y radicular de semillas germinadas inoculadas con cepas microbianas

**ANOVA Multifactorial – PFAyPFR**

Variable dependiente: PFAyPFR

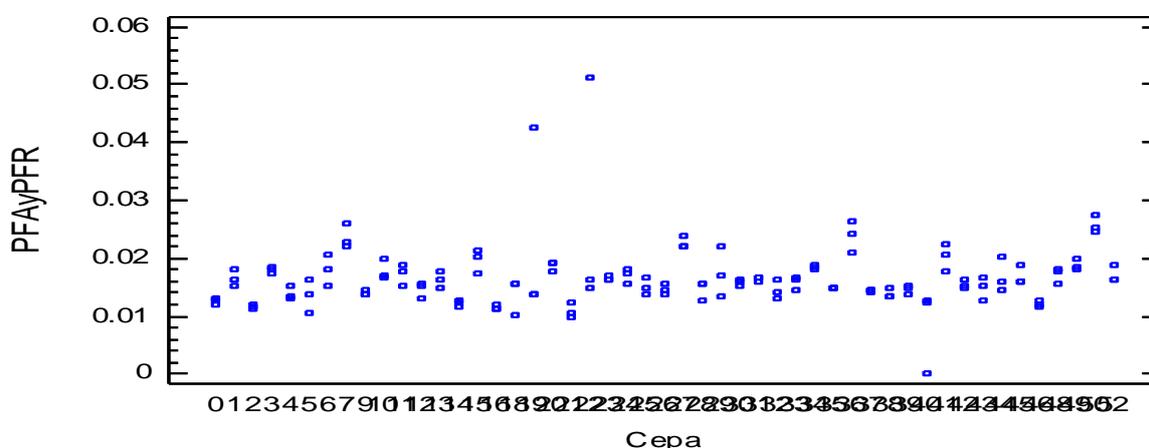
Factores: Cepa

Número de casos completos: 147

**El StatAdvisor**

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para PFAyPFR. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre PFAyPFR. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El Gráfico de Medias y la Gráfica de Interacciones le ayudarán a interpretar los efectos significativos. Los Gráficos de Residuos le ayudarán a juzgar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.

Dispersión por Código de Nivel



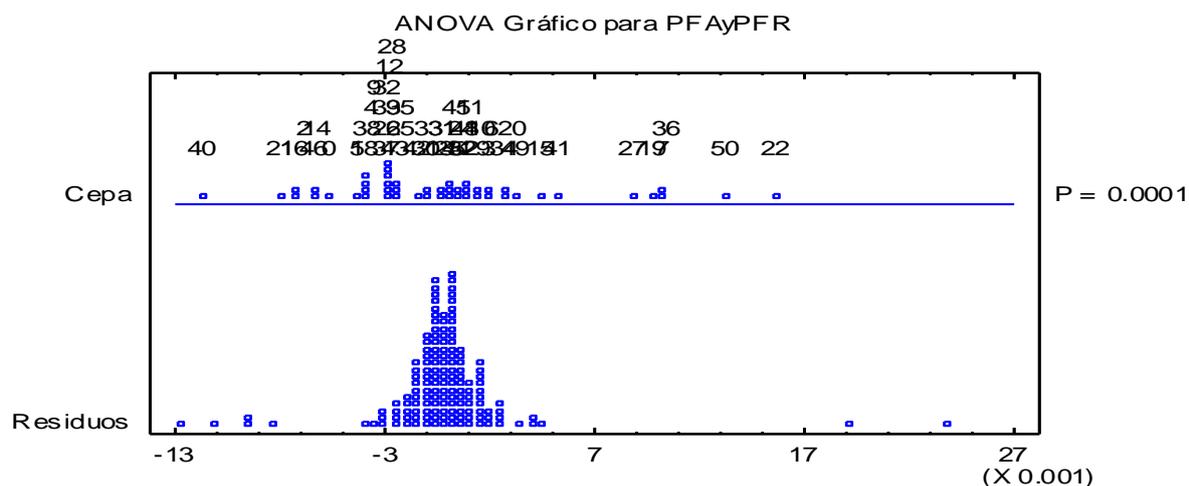
**Análisis de Varianza para PFAyPFR - Suma de Cuadrados Tipo III**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cepa	0.00212935	48	0.0000443614	2.49	0.0001
RESIDUOS	0.00174633	98	0.0000178197		
TOTAL (CORREGIDO)	0.00387568	146			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de PFAyPFR en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre PFAyPFR con un 95.0% de nivel de confianza.



**Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para PFAyPFR con intervalos de confianza del 95.0%**

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	147	0.0165599			
Cepa					
0	3	0.01262	0.00243719	0.00778346	0.0174565
1	3	0.0166433	0.00243719	0.0118068	0.0214799
2	3	0.0117833	0.00243719	0.0069468	0.0166199
3	3	0.01794	0.00243719	0.0131035	0.0227765
4	3	0.0140133	0.00243719	0.0091768	0.0188499
5	3	0.0134967	0.00243719	0.00866013	0.0183332
6	3	0.0179933	0.00243719	0.0131568	0.0228299
7	3	0.0237033	0.00243719	0.0188668	0.0285399
9	3	0.0140667	0.00243719	0.00923013	0.0189032
10	3	0.01775	0.00243719	0.0129135	0.0225865
11	3	0.0173067	0.00243719	0.0124701	0.0221432
12	3	0.01463	0.00243719	0.00979346	0.0194665
13	3	0.0162867	0.00243719	0.0114501	0.0211232
14	3	0.0122667	0.00243719	0.00743013	0.0171032
15	3	0.01971	0.00243719	0.0148735	0.0245465
16	3	0.0115067	0.00243719	0.00667013	0.0163432
18	3	0.0138367	0.00243719	0.00900013	0.0186732
19	3	0.02341	0.00243719	0.0185735	0.0282465
20	3	0.0187167	0.00243719	0.0138801	0.0235532
21	3	0.0109933	0.00243719	0.0061568	0.0158299
22	3	0.02748	0.00243719	0.0226435	0.0323165
23	3	0.01658	0.00243719	0.0117435	0.0214165
24	3	0.01706	0.00243719	0.0122235	0.0218965
25	3	0.0150333	0.00243719	0.0101968	0.0198699
26	3	0.0145467	0.00243719	0.00971013	0.0193832
27	3	0.0227367	0.00243719	0.0179001	0.0275732
28	3	0.0147133	0.00243719	0.0098768	0.0195499
29	3	0.01751	0.00243719	0.0126735	0.0223465
30	3	0.01585	0.00243719	0.0110135	0.0206865
31	3	0.0164633	0.00243719	0.0116268	0.0212999
32	3	0.0145967	0.00243719	0.00976013	0.0194332
33	3	0.01593	0.00243719	0.0110935	0.0207665

34	3	0.01849	0.00243719	0.0136535	0.0233265
35	3	0.01504	0.00243719	0.0102035	0.0198765
36	3	0.0239133	0.00243719	0.0190768	0.0287499
37	3	0.01451	0.00243719	0.00967346	0.0193465
38	3	0.0139133	0.00243719	0.0090768	0.0187499
39	3	0.0145833	0.00243719	0.0097468	0.0194199
40	3	0.00835333	0.00243719	0.0035168	0.0131899
41	3	0.0202267	0.00243719	0.0153901	0.0250632
42	3	0.0155533	0.00243719	0.0107168	0.0203899
43	3	0.01483	0.00243719	0.00999346	0.0196665
44	3	0.0168967	0.00243719	0.0120601	0.0217332
45	3	0.0168567	0.00243719	0.0120201	0.0216932
46	3	0.0120867	0.00243719	0.00725013	0.0169232
48	3	0.0171867	0.00243719	0.0123501	0.0220232
49	3	0.01883	0.00243719	0.0139935	0.0236665
50	3	0.0258033	0.00243719	0.0209668	0.0306399
52	3	0.0171867	0.00243719	0.0123501	0.0220232

### El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de PFAYPFR para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas del extremo derecho muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfico de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

### Pruebas de Múltiple Rangos para PFAYPFR por Ceba

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Ceba</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	3	0.00835333	0.00243719	X
21	3	0.0109933	0.00243719	XX
16	3	0.0115067	0.00243719	XXX
2	3	0.0117833	0.00243719	XXXX
46	3	0.0120867	0.00243719	XXXXX
14	3	0.0122667	0.00243719	XXXXX
0	3	0.01262	0.00243719	XXXXX
5	3	0.0134967	0.00243719	XXXXXXX
18	3	0.0138367	0.00243719	XXXXXXX
38	3	0.0139133	0.00243719	XXXXXXX
4	3	0.0140133	0.00243719	XXXXXXX
9	3	0.0140667	0.00243719	XXXXXXX
37	3	0.01451	0.00243719	XXXXXXX
26	3	0.0145467	0.00243719	XXXXXXX
39	3	0.0145833	0.00243719	XXXXXXX
32	3	0.0145967	0.00243719	XXXXXXX
12	3	0.01463	0.00243719	XXXXXXX
28	3	0.0147133	0.00243719	XXXXXXX
43	3	0.01483	0.00243719	XXXXXXX
25	3	0.0150333	0.00243719	XXXXXXX
35	3	0.01504	0.00243719	XXXXXXX
42	3	0.0155533	0.00243719	XXXXXX
30	3	0.01585	0.00243719	XXXXXX
33	3	0.01593	0.00243719	XXXXXXX
13	3	0.0162867	0.00243719	XXXXXXX
31	3	0.0164633	0.00243719	XXXXXXX

23	3	0.01658	0.00243719	XXXXXXXX
1	3	0.0166433	0.00243719	XXXXXXXX
45	3	0.0168567	0.00243719	XXXXXXXX
44	3	0.0168967	0.00243719	XXXXXXXX
24	3	0.01706	0.00243719	XXXXXXXX
52	3	0.0171867	0.00243719	XXXXXXXXXX
48	3	0.0171867	0.00243719	XXXXXXXXXX
11	3	0.0173067	0.00243719	XXXXXXXXXX
29	3	0.01751	0.00243719	XXXXXXXXXX
10	3	0.01775	0.00243719	XXXXXXXXXX
3	3	0.01794	0.00243719	XXXXXXXXXX
6	3	0.0179933	0.00243719	XXXXXXXXXX
34	3	0.01849	0.00243719	XXXXXXXX
20	3	0.0187167	0.00243719	XXXXXX
49	3	0.01883	0.00243719	XXXXXX
15	3	0.01971	0.00243719	XXXXXX
41	3	0.0202267	0.00243719	XXXXXX
27	3	0.0227367	0.00243719	XXXXXX
19	3	0.02341	0.00243719	XXXXX
7	3	0.0237033	0.00243719	XXXX
36	3	0.0239133	0.00243719	XXX
50	3	0.0258033	0.00243719	XX
22	3	0.02748	0.00243719	X

### ANOVA Multifactorial – PSAyPSR

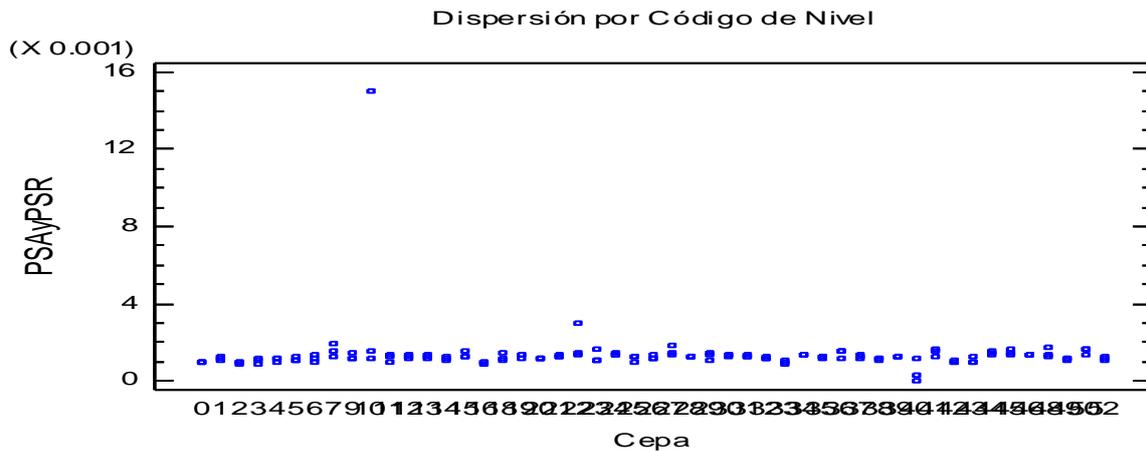
Variable dependiente: PSAyPSR

Factores: Cepa

Número de casos completos: 147

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para PSAyPSR. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar que factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre PSAyPSR. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuales medias son significativamente diferentes de otras. El Gráfico de Medias y la Gráfica de Interacciones le ayudarán a interpretar los efectos significativos. Los Gráficos de Residuos le ayudarán a juzgar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.



### Análisis de Varianza para PSayPSR - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cepa	0.0000708335	48	0.0000014757	1.13	0.3042
RESIDUOS	0.000128244	98	0.00000130862		
TOTAL (CORREGIDO)	0.000199078	146			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de PSayPSR en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre PSayPSR con un 95.0% de nivel de confianza.

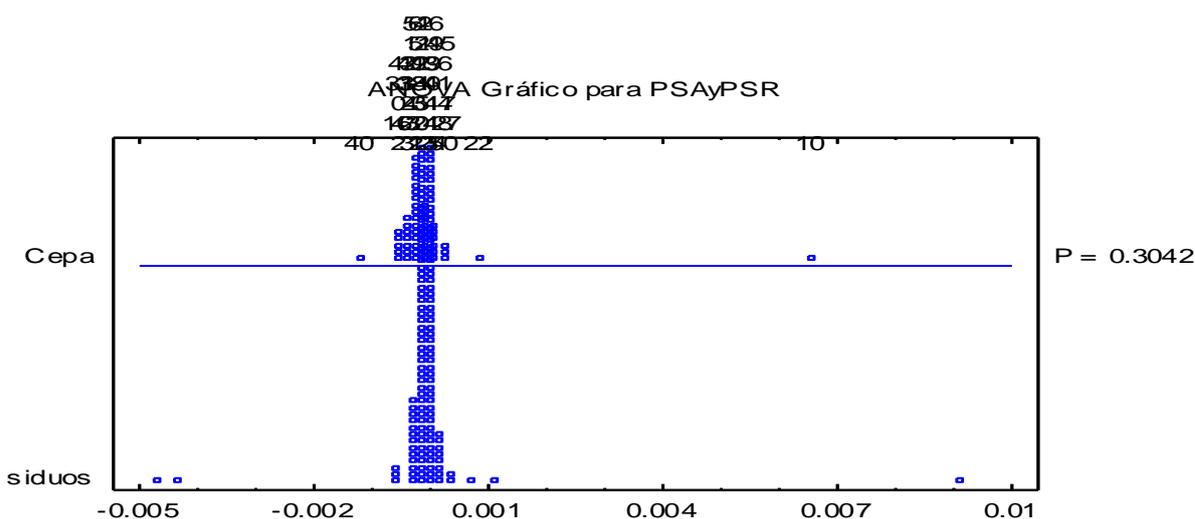


Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para PSayPSR con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	147	0.00135653			
<b>Cepa</b>					
0	3	0.000986667	0.000660459	-0.000323994	0.00229733
1	3	0.00118667	0.000660459	-0.000123994	0.00249733
2	3	0.000963333	0.000660459	-0.000347328	0.00227399
3	3	0.00107667	0.000660459	-0.000233994	0.00238733
4	3	0.00111333	0.000660459	-0.000197328	0.00242399
5	3	0.00116667	0.000660459	-0.000143994	0.00247733
6	3	0.00117	0.000660459	-0.000140661	0.00248066
7	3	0.00158	0.000660459	0.000269339	0.00289066
9	3	0.00125667	0.000660459		0.00256733
10	3	0.00594	0.000660459	0.00462934	0.00725066
11	3	0.00122	0.000660459	-0.000090661	0.00253066
12	3	0.00127667	0.000660459		0.00258733
13	3	0.00125667	0.000660459		0.00256733
14	3	0.00119	0.000660459	-0.000120661	0.00250066
15	3	0.00139333	0.000660459	0.0000826724	0.00270399

16	3	0.000986667	0.000660459	-0.000323994	0.00229733
18	3	0.00124667	0.000660459		0.00255733
19	3	0.00133333	0.000660459	0.0000226724	0.00264399
20	3	0.00119	0.000660459	-0.000120661	0.00250066
21	3	0.00130667	0.000660459		0.00261733
22	3	0.00194333	0.000660459	0.000632672	0.00325399
23	3	0.0013	0.000660459	-0.000010661	0.00261066
24	3	0.00140667	0.000660459	0.0000960057	0.00271733
25	3	0.00119	0.000660459	-0.000120661	0.00250066
26	3	0.00126	0.000660459	-0.000050661	0.00257066
27	3	0.00158	0.000660459	0.000269339	0.00289066
28	3	0.00127667	0.000660459		0.00258733
29	3	0.00134333	0.000660459	0.0000326724	0.00265399
30	3	0.00132	0.000660459		0.00263066
31	3	0.00131333	0.000660459		0.00262399
32	3	0.00119667	0.000660459	-0.000113994	0.00250733
33	3	0.00099	0.000660459	-0.000320661	0.00230066
34	3	0.00136333	0.000660459	0.0000526724	0.00267399
35	3	0.00124	0.000660459	-0.000070661	0.00255066
36	3	0.00147333	0.000660459	0.000162672	0.00278399
37	3	0.00128	0.000660459	-0.000030661	0.00259066
38	3	0.00113333	0.000660459	-0.000177328	0.00244399
39	3	0.00126	0.000660459	-0.000050661	0.00257066
40	3	0.0005	0.000660459	-0.000810661	0.00181066
41	3	0.00147	0.000660459	0.000159339	0.00278066
42	3	0.00102667	0.000660459	-0.000283994	0.00233733
43	3	0.00109	0.000660459	-0.000220661	0.00240066
44	3	0.00147	0.000660459	0.000159339	0.00278066
45	3	0.0015	0.000660459	0.000189339	0.00281066
46	3	0.00134667	0.000660459	0.0000360057	0.00265733
48	3	0.00146	0.000660459	0.000149339	0.00277066
49	3	0.00113333	0.000660459	-0.000177328	0.00244399
50	3	0.00154	0.000660459	0.000229339	0.00285066
52	3	0.00122333	0.000660459		0.00253399

### El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de PSAyPSR para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas del extremo derecho muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfico de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

### Pruebas de Múltiple Rangos para PSAyPSR por Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Cepa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	3	0.0005	0.000660459	X
2	3	0.000963333	0.000660459	X
16	3	0.000986667	0.000660459	X
0	3	0.000986667	0.000660459	X
33	3	0.00099	0.000660459	X
42	3	0.00102667	0.000660459	X
3	3	0.00107667	0.000660459	X

43	3	0.00109	0.000660459	X
4	3	0.00111333	0.000660459	X
38	3	0.00113333	0.000660459	X
49	3	0.00113333	0.000660459	X
5	3	0.00116667	0.000660459	X
6	3	0.00117	0.000660459	X
1	3	0.00118667	0.000660459	X
20	3	0.00119	0.000660459	X
25	3	0.00119	0.000660459	X
14	3	0.00119	0.000660459	X
32	3	0.00119667	0.000660459	X
11	3	0.00122	0.000660459	X
52	3	0.00122333	0.000660459	X
35	3	0.00124	0.000660459	X
18	3	0.00124667	0.000660459	X
9	3	0.00125667	0.000660459	X
13	3	0.00125667	0.000660459	X
39	3	0.00126	0.000660459	X
26	3	0.00126	0.000660459	X
12	3	0.00127667	0.000660459	X
28	3	0.00127667	0.000660459	X
37	3	0.00128	0.000660459	X
23	3	0.0013	0.000660459	X
21	3	0.00130667	0.000660459	X
31	3	0.00131333	0.000660459	X
30	3	0.00132	0.000660459	X
19	3	0.00133333	0.000660459	X
29	3	0.00134333	0.000660459	X
46	3	0.00134667	0.000660459	X
34	3	0.00136333	0.000660459	X
15	3	0.00139333	0.000660459	X
24	3	0.00140667	0.000660459	X
48	3	0.00146	0.000660459	X
44	3	0.00147	0.000660459	X
41	3	0.00147	0.000660459	X
36	3	0.00147333	0.000660459	X
45	3	0.0015	0.000660459	X
50	3	0.00154	0.000660459	X
27	3	0.00158	0.000660459	X
7	3	0.00158	0.000660459	X
22	3	0.00194333	0.000660459	X
10	3	0.00594	0.000660459	X