

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE PGPR
PSICROTOLERANTES EN PLANTAS QUINUA BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR FRÍO”**

Presentada por:

ALEXANDRA LUCÍA FLORIÁN SILVA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE PGPR
PSICROTOLERANTES EN PLANTAS QUINUA BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR FRÍO”**

Presentada por:

ALEXANDRA LUCÍA FLORIÁN SILVA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
PRESIDENTE

Ph. D. Gretty Villena Chávez
MIEMBRO

Dr. Ernesto Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Dra. Doris Zúñiga Dávila
ASESORA

Blgo. Katty Ogata Gutiérrez
CO-ASESORA

DEDICATORIA

A mis padres,

Richard e Yrma

Por su paciencia, amor y ánimos para lograr mis metas.

A mi hermana, Pamela

Por su apoyo incondicional y sus buenos consejos.

A mis abuelos, por todo su amor.

AGRADECIMIENTO

A mi patrocinadora, la Dra. Doris Zúñiga Dávila, quien me permitió desarrollar esta investigación en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología. Por su confianza, consejos y asesoría en el desarrollo de este trabajo.

A mi co-asesora Mg. Sc. Katty Ogata, líder del proyecto 105-2014 FONDECYT CONCYTEC. Por permitirme realizar este trabajo dentro de su equipo. Por los consejos y su gran paciencia para enseñarme y formarme como investigadora.

A mis padres y a mi hermana; por su amor incondicional, preocupación, apoyo, ánimos para continuar en este camino, consejos, paciencia y comprensión en los momentos más difíciles. A mi tía Cecilia por compartir conmigo risas, lágrimas y consejos para terminar la tesis. A mis abuelitas Dora y Elvira por su cariño y comprensión. Y a mi abuelito Félix, mi gran ejemplo, que desde el cielo me sigue dando todo su apoyo y amor.

Un agradecimiento especial a los biólogos Ricardo Santos, Minoru Matsubara, Elena Ramos y Claudia Valencia; por sus consejos tanto en lo profesional como en lo personal y su amistad.

Al Proyecto 105-2014 FONDECYT CONCYTEC: "Transcriptómica de los PGPRs tolerantes al estrés por frío y su efecto en la Expresión de Genes y Producción de Metabolitos en plantas de Quinoa" y a la Universidad Nacional Agraria La Molina por el financiamiento otorgado para desarrollar la tesis.

A Brenda, Raisa, Diana, Tatiana, Christian, y Hernán. Por acompañarme desde el inicio de este largo camino; por su amistad, consejos y esos ánimos que me ayudaron y sacaron sonrisas durante las horas libres, de trabajo y amanecidas.

A los asistentes de investigación, tesistas, practicantes y estudiantes de biología experimental por las largas horas de trabajo compartidas, experiencias, conocimientos, risas y tardes deportivas. Una página me queda corta para mencionar a cada uno de ustedes y enlistar los momentos compartidos... Gracias por hacer de mi estadía una experiencia enriquecedora.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. PUNO	3
2.1.1. Área Circunlacustre	3
2.1.2. Bacterias psicrófilas, psicrótrofas y psicrotolerantes.....	7
2.1.3. Bacterias PGPR	9
2.1.4. Capacidades promotoras de crecimiento	11
2.1.5. Quinoa <i>C. quinoa</i>	14
2.1.6. Mecanismos de adaptación de las plantas a las heladas	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. MATERIALES	24
3.1.1. Material biológico.....	24
3.1.2. Medios de cultivo y equipo de laboratorio	24
3.2. MÉTODOS.....	28
3.2.1. Lugar de muestreo	28
3.2.2. Lugar de procesamiento de muestras.....	28
3.2.3. Aislamiento de bacterias psicrotolerantes del suelo rizosférico de plantas de quinua.....	28
3.2.4. Conservación de cepas a -80°C	29
3.2.5. Producción de inóculos para la evaluación de la tolerancia al shock frío ...	29
3.2.6. Evaluación de la tolerancia al shock frío de bacterias PGPR.....	29
3.2.7. Caracterización fenotípica de las cepas	30
3.2.8. Caracterización fisiológica	31
3.2.9. Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal a nivel <i>in vitro</i>	31
3.2.10. Caracterización molecular	32
3.2.11. Análisis filogenético	35
3.2.12. Selección de cepas mediante el análisis de características fenotípicas y moleculares	36

3.2.13. Evaluación del efecto de las PGPR psicrótrofas sobre <i>C. quinoa</i> a nivel <i>in vitro</i>	37
3.2.14. Determinación del efecto de shock frío sobre la germinación de <i>C. quinoa</i> a nivel de semilla	39
3.2.15. Evaluación de las capacidades PGPR a nivel invernadero.....	39
3.2.16. Evaluación de la producción de metabolitos de las plantas inoculadas bajo condiciones de estrés frío.....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA MUESTRA DE SUELO..	43
4.2. AISLAMIENTO DE CEPAS PSICRÓTROFAS	43
4.3. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL SHOCK FRÍO DE BACTERIAS PGPR	44
4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS.....	44
4.4.1. Caracterización morfológica	44
4.4.2. Caracterización bioquímica	45
4.5. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.....	45
4.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR A NIVEL <i>in vitro</i>	47
4.7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	54
4.7.1. Calidad de ADN	54
4.7.2. Amplificación BOX-PCR.....	55
4.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	58
4.8.1. Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S.....	58
4.9. SELECCIÓN DE CEPAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES	64
4.10. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS PGPR PSICROTOLERANTES SOBRE <i>C. quinoa</i> A NIVEL <i>in vitro</i>	67
4.10.1. Evaluación de la calidad de semilla.....	67
4.10.2. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles sobre la germinación de <i>C. quinoa</i>	67
4.10.3. Evaluación de la germinación <i>in vitro</i> de semillas inoculadas de <i>C. quinoa</i>	68
4.11. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SHOCK DE FRÍO SOBRE LA GERMINACIÓN DE <i>C. quinoa</i> A NIVEL DE SEMILLA	69
4.12. EVALUACIÓN DE LAS CAPACIDADES PGPR A NIVEL	

INVERNADERO	70
4.12.1. Determinación del efecto de los inoculantes sobre la emergencia de <i>C. quinoa</i> en macetas	70
4.12.2. Evaluación a nivel invernadero de dos cepas psicotolerantes sobre <i>C. quinoa</i>	71
4.13. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE LAS PLANTAS INOCULADAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS FRÍO	72
4.13.1. Determinación del contenido de Prolina y Fenoles Totales	72
V. CONCLUSIONES.....	75
VI. RECOMENDACIONES.....	76
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
VIII. ANEXOS	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variedades comerciales de importancia en Perú.....	18
Tabla 2: Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en granos de quinua, cereales, frejol, carne, pescado, leche y la proteína patrón	20
Tabla 3: Concentraciones de reactivos para la amplificación BOX PCR.....	34
Tabla 4: Reactivos para la amplificación PCR-ADN Ribosomal 16S	35
Tabla 5: Crecimiento a tres diferentes temperaturas de cepas psicotolerantes	46
Tabla 6: Resultados obtenidos en la identificación mediante el banco EzBiocloud	59
Tabla 7: Evaluación del efecto PGPR sobre plantas de <i>C. quinoa</i> a los 32 días de desarrollo	71
Tabla 8: Evaluación del efecto PGPR sobre plantas de <i>C. quinoa</i> a los 2 meses de desarrollo	71
Tabla 9: Evaluación del efecto PGPR en el contenido de nutrientes en las variedades de quinua Kancolla y Hualhuas	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales productos potenciales de exportación de acuerdo a su nombre comercial 2016.	5
Figura 2: Rutas metabólicas de la síntesis de AIA.	12
Figura 3: Ciclo de biosíntesis bacteriana de prolina.	21
Figura 4: Ciclo de biosíntesis en plantas de prolina.	22
Figura 5: Ensayo de producción de AIA. Resultados tras la reacción con el reactivo de Salkowsky. A: Resultados obtenidos a 6 °C. B: Resultados obtenidos a 28 °C.	49
Figura 6: Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas aisladas. A y B: Cepas evaluadas a 6 °C en fosfato bicálcico y fosfato tricálcico respectivamente. C y D: Evaluación a 28 °C en fosfato bicálcico y fosfato tricálcico respectivamente.	51
Figura 7: Resultados de la evaluación de crecimiento en medio de cultivo sin.	52
Figura 8: Resultados de la evaluación de consumo de lactosa de algunas cepas evaluadas.	54
Figura 9: Gel de calidad de DNA. M: Marcador de ADN 1 Kb (Thermo Scientific); Los números representan a las cepas PQLMT con la misma secuencia numérica.	55
Figura 10: Gel de electroforesis de amplificación BOX-PCR. M: Marcador de ADN 1 Kb (Axygen); Los números representan a las cepas PQLMT con la misma secuencia numérica para los 3 geles. Se presenta el agrupamiento en la parte superior.	57
Figura 11: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rhizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).	61
Figura 12: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rhizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).	63
Figura 13: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rhizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los	

puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).....	64
Figura 14: Análisis UPGMA de las características fenotípicas PGPR: ácido indol acético y solubilización de fosfato. Método de agrupamiento: UPGMA; Coeficiente de Similaridad de Jaccard.	66
Figura 15: Porcentajes de germinación en <i>C. quinoa</i> bajo cuatro tratamientos.	68
Figura 16: Evaluación del efecto 3 temperaturas de shock frío sobre la germinación y desarrollo de semillas <i>C. quinoa</i> var Kancolla. A: Shock a -5°C. B: Shock a -6°C. C: Shock a -8°C. D: Observación al estereoscopio del efecto del shock a -5°C, izq.: shock, der.: sin shock. E: Semilla sometida al shock de frío -8°C	70
Figura 17: Evaluación del efecto de la inoculación y el shock frío sobre el contenido de prolina para dos variedades de quinua. Contenido de prolina expresado en mg/g peso tubo. S: Shock	73
Figura 18: Evaluación del efecto del inóculo y shock de frío sobre el contenido de fenoles totales en dos variedades de quinua. Valor de contenido de fenoles totales expresado en mg/g peso seco.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Caracterización macroscópica de las cepas aisladas de la E.E. Salcedo INIA.....	95
Anexo 2: Caracterización fisiológica de las cepas aisladas de la E.E. Salcedo-INIA ...	96
Anexo 3: Cuantificación de AIA a tres diferentes temperaturas de las de cepas aisladas de una muestra de suelo de quinua de INIA-Salcedo.	97
Anexo 4: Resultados de la prueba de germinación por compuestos volátiles	98
Anexo 5: Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles en la germinación de plantas <i>C. quinoa</i> var. Kancolla	100
Anexo 6: Resultados del Análisis de la muestra de suelo procedente de la EE-INIA Salcedo, Puno	102
Anexo 7: Resultados de los análisis estadísticos.....	103
Anexo 8: Formulación de medios de cultivo	109

RESUMEN

Diversos factores afectan directamente la actividad agropecuaria año a año, mermando el rendimiento de los cultivos. En Puno, el 70 por ciento de la superficie departamental está conformada por el Altiplano, laderas, áreas intermedias y la cordillera. La ocurrencia de heladas se da entre junio y julio. Existen microorganismos que se ubican en el suelo empleando distintos mecanismos de resistencia al shock frío para asegurar su supervivencia, interactuando en el proceso con las plantas del hábitat. La quinua es un cultivo capaz de crecer desde $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, su crecimiento óptimo se da entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad crioprotectora de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de la Estación Experimental INIA-Salcedo (Puno) sobre plántulas de quinua (*Chenopodium quinoa*). Se realizó el aislamiento de bacterias psicotolerantes luego de someter la muestra de suelo a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tres horas. Las cepas se caracterizaron fenotípicamente, molecularmente y en su capacidad de promover el crecimiento de plantas. En cuanto a la temperatura de crecimiento se observó un crecimiento óptimo a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la capacidad de crecer a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Respecto a las capacidades de promoción de crecimiento se evaluó la producción de ácido indolacético (AIA) a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se observó una relación directamente proporcional entre la temperatura y la concentración de AIA. En la evaluación de solubilización de fosfatos se observó que la solubilización fue favorable a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ tanto para fosfato bicálcico como tricálcico. Asimismo, se estudió la capacidad de producción de compuestos volátiles promotores del crecimiento de plántulas de quinua observando que las cepas PQLMT14, PQLMT18, PQLMT33 y PQLMT35 fueron superiores respecto al control. En la caracterización molecular se evaluó la diversidad mediante perfiles BOX-PCR y la identidad taxonómica mediante análisis de secuencias del gen ribosomal 16S PCR ADN Ribosomal, donde se obtuvo un total de 24 perfiles BOX. Se realizaron ensayos en planta, evaluándose la germinación *in vitro* con tres cepas seleccionadas siendo aplicadas en semillas de quinua var Kancolla encontrándose diferencias significativas. En la determinación de metabolitos de estrés se evidenció que tanto la prolina como el contenido de fenoles totales (EAG) fueron mayores luego del shock frío en ambas variedades.

Palabras clave: Shock frío, Quinua, metabolitos secundarios, PGPR.

ABSTRACT

Several factors directly affect agricultural activities year after year, reducing the yield of crops. In Puno, 70 percent of the departmental area it is formed by the Highlands, slopes, intermediate areas and the mountain range. The occurrence of frost occurs between June and July. In soil, there are some microorganisms capable to growth and resistance cold shock temperatures though different mechanism that led them ensure their survival, interacting in the process with the plants of the habitat. Quinoa is a crop capable of growing from -1 °C to 35 °C, however its optimal growth occurs between 15 °C to 25 °C. The objective of the present study was to determine the cryoprotective capacity of plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from the INIA-Salcedo Experimental Station (Puno) on quinoa seedlings (*Chenopodium quinoa*). Isolation of psychrotolerant bacteria was carried out after submitting the soil sample at -5 °C for three hours. The strains were characterized phenotypically, molecularly and on their ability to promote plant growth. Regarding the growth temperature, an optimum growth was observed at 28 °C and the ability to grow at 15 °C and 6 °C. About the growth promotion capacities, the production of indole-acetic acid (AIA) at 6 °C and 28 °C was evaluated, where a directly proportional relationship was observed between the temperature and the concentration of AIA. When the phosphate solubilization was evaluated, it was observed that the solubilization was favorable at 28 °C for both sources: dicalcium and tricalcium phosphate. Likewise, the production of volatile compounds for promoting the growth of quinoa seedlings was studied, observing that the strains PQLMT14, PQLMT18, PQLMT33 and PQLMT35 were superior with respect to the control. In the molecular characterization, diversity was evaluated by BOX-PCR profiles and taxonomic identity by means of sequence analysis of ribosomal DNA 16S PCR Ribosomal DNA, where a total of 24 BOX profiles were obtained. Plant tests were carried out, evaluating *in vitro* germination with three selected strains being applied in quinoa seeds var Kancolla that showed significant differences. On the determination of stress metabolites, it was evidenced that both: proline and total phenol content (SAE) were higher after the cold shock in both varieties.

Key words: Cold shock, Quinoa, secondary metabolites, PGPR.

I. INTRODUCCIÓN

Diversos factores afectan directamente la actividad agropecuaria año a año, mermando el rendimiento de los cultivos. Entre ellos se encuentran factores de estrés de tipo abiótico como la sequía, las heladas y la salinidad los cuales reducen drásticamente la calidad del cultivo y el rendimiento; este último pudiendo representar del 50 al 100 por ciento del total de la producción (Gusta, 2012). A nivel mundial, las heladas se presentan en más del 70 por ciento de los suelos (Carlos, 2010). Siendo Perú uno de los países afectados, éstas pueden ocasionar pérdidas que varían según la intensidad y el tipo de cultivo; tal y como se ha visto en cultivos de papa y maíz, donde se registraron pérdidas de 12.8 y 13.5 por ciento respectivamente en el 2007 (UNDP, 2013). Entre las regiones más afectadas por las heladas se encuentran: Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Puno, Moquegua, Pasco y Tacna (El Comercio, 2016).

Las cuantiosas pérdidas económicas por este evento climático afectan directamente en los ingresos y la estabilidad económica de los pequeños agricultores. Por ello, muchos especialistas en el área han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar sus efectos dividiéndolas en dos tipos; entre las estrategias pasivas: Selección del lugar de cultivo, selección y manejo del cultivo, manejo y nutrición del suelo, manejo de la cobertura del suelo, cercado del cultivo, etc. Y en cuanto a las estrategias activas: calentamiento por fogatas o calefacción, cobertura de cultivos con material aislante, circulación del aire con ventiladores, riego por aspersión, etc. (Alberta Government, 2015; MINAGRI, 2015).

En cuanto al uso de los fertilizantes orgánicos, encontramos un sin número de alternativas de diverso origen y composición. Sin embargo, todos cumplen un mismo objetivo: nutrir al cultivo durante todo el proceso de desarrollo. Los beneficios de una buena nutrición se ven reflejados no solo en un mayor rendimiento, sino, además, en una mayor capacidad de la planta de enfrentar enfermedades y problemas medio

ambientales, como las heladas (PRONAMACH, 2007). Por otra parte, el uso de bioestimulantes basados en bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), son una buena opción al momento de buscar estrategias de fertilización del cultivo (Das *et al.*, 2013). Estos microorganismos, participan en el desarrollo de la planta a través de la producción de fitohormonas (Shi *et al.*, 2017), solubilización de fósforo, disponibilidad de ciertos metales por la producción de quelatos, entre otros (Satyaprakash *et al.*, 2017; Radzki *et al.*, 2013). En cuanto a su uso a condiciones de estrés, se ha reportado el efecto benéfico de su aplicación durante eventos de sequía, salinidad, helada, etc. (Yang *et al.*, 2008; Kakar *et al.*, 2016). Asimismo se ha reportado que su uso ha logrado suplementar cerca del 25-50 por ciento de los fertilizantes químicos y sustituir cerca del 20 por ciento de estos (NP) además de incrementar la productividad del cultivo (Gupta *et al.*, 2017). Se presentan entonces como una alternativa atractiva frente a los químicos, no solo por ser una tecnología limpia, sino además por ser capaz de mantener y nutrir el suelo a largo plazo.

El objetivo principal de investigación de esta tesis fue determinar la capacidad crioprotectora de bacterias PGPR aisladas de la Estación Experimental INIA-Salcedo (Puno) sobre plántulas de *C. quinoa*; para lo cual se consideró el aislamiento de bacterias nativas de campos de cultivo de quinua producida en la E.E. INIA-Salcedo (Puno) resistentes a shock en frío, la caracterización fenotípica y bioquímica de las mismas, su caracterización a nivel molecular, la determinación de la capacidad PGPR de las cepas aisladas a través de las pruebas de producción de indoles, solubilización de fosfato y germinación *in vitro*, la estandarización de la metodología para evaluar la capacidad de resistencia al shock en frío a nivel *in vitro*, y la determinación de la concentración de metabolitos secundarios como prolina y fenoles totales en planta para determinar la capacidad crioprotectora de las PGPR. Todo ello formando parte de los objetivos específicos del proyecto de investigación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PUNO

La región Puno se encuentra en la zona sur oriental del Perú; y contiene las regiones naturales Quechua, Puna, Janca y Rupa Rupa (Pulgar, 2014). Con altitudes de 820 msnm (Lanlacuni Bajo) a 4725 msnm (San Antonio de Esquilache). Se encuentra al sureste del Perú, en la Meseta del Collao rodeada por la Cordillera Carabaya por el Norte y la Cordillera Occidental por el Sur Oeste. Aquí se encuentra el lago más alto del mundo (Titicaca). El 70 por ciento de la superficie departamental está conformada por el altiplano, laderas, áreas intermedias y la Cordillera de los Andes:

2.1.1. Área Circunlacustre

Se encuentra entre 3810 a 3900 m.s.n.m. Influenciada por el efecto termorregulador del Lago Titicaca, se genera un ambiente favorable para la actividad agropecuaria. Tiene un clima frío atemperado y seco con cambios térmicos bien marcados entre el día y la noche.

a. Área Intermedio o Altiplano

Se encuentra entre los 3900 a 4200 m.s.n.m. Es una zona con abundantes pastizales naturales. Ideal para el desarrollo de la actividad ganadera tanto de vacunos como de ovinos.

b. Área Cordillerana

Se encuentra en la zona superior a los 4200 m.s.n.m. Es un área ideal para la crianza de camélidos sudamericanos. En esta zona se encuentran las vicuñas, tarucas y suris.

c. Ceja de Selva

En ella se encuentra la Reserva del Tambopata Candamo. Representa el 25 por ciento del territorio, es poco habitada y está escasamente integrada a la economía departamental.

Presenta dos tipos de climas según la zona donde se encuentren; es así que en la región andina las temperaturas van de 1.4 a 13°C con características de un clima frío y seco; mientras que la selva se caracteriza por presentar un clima templado a cálido con temperaturas entre 15 a 22°C y precipitaciones de 1000 mm/año (MINCETUR, 2005). La ocurrencia de heladas se da entre junio y julio (invierno) en toda la zona sierra sur siendo Puno una de las regiones más afectadas, tal que por encima de los 2500 metros se detectan heladas más frecuentes, incluso llegando a ocurrir a lo largo del año (por encima de los 4500 m.s.n.m.) (SENAMHI, 2005). Los tipos de heladas características del altiplano, especialmente en la confluencia de las regiones Puno, Arequipa y Cusco son las heladas primaverales y otoñales estáticas o radiativas (SENAMHI, 2012).



Figura 1: Principales productos potenciales de exportación de acuerdo a su nombre comercial 2016.

FUENTE: SUNAT. Elaboración: PROMPERÚ

En cuanto a su actividad productiva, la región presenta una diversidad de productos potenciales de exportación entre los que se encuentra la quinua (Figura 1). Siendo así que, del total de la producción de la región, la quinua representó el 3.2 por ciento con

crecimiento exponencial año a año (5.2 por ciento en la campaña 2014-2015) (BCRP, 2015). Acerca de este cultivo, Puno es el primer productor de quinua a nivel nacional (2014 y 2015) representando el 47 por ciento de la producción nacional (IICA, 2015). En la campaña 2015-2016 el cultivo de la quinua tuvo una baja en el mercado internacional (Figura 2) por problemas de exceso de pesticidas; sin embargo estos problemas no se encontraron en los cultivos de la región.

La región Puno se caracteriza por ser una región con gran ocurrencia de heladas. Es así que por encima de los 3000 m.s.n.m. presenta 65 días al año de heladas; mientras que por encima de los 3300 metros el promedio sube a 115 días (SENAMHI, 2005). La helada, es un fenómeno meteorológico, el cual se presenta cuando las temperaturas ambientales cercanas al suelo descienden por debajo de los cero grados (PRONAMACHCS, 2007). Los periodos de duración varían según la zona y el tipo de helada. Así también, el efecto que tiene sobre las plantas es variable y dependerá de la sensibilidad de las mismas a las bajas temperaturas (PRONAMACHCS, 2007). Las heladas se clasifican en dos tipos, cada una con diferentes efectos sobre los cultivos (Pérez, 2016). Así tenemos; las heladas por advección o dinámicas, las cuales se producen por un frente de vientos fríos que provienen del sur Antártico (INDECI, 2008) y que mantienen una temperatura uniforme en toda la capa que contacta con el suelo; los cultivos se enfrían por contacto y los daños que sufren varían según la variedad, especie y etapa del desarrollo en el que se encuentre (Matías *et al.*, 2007). Por otra parte, se encuentran las heladas por radiación o estáticas, estas últimas ocurren a baja humedad del aire, o noches despejadas y sin viento. Se presentan debido a la rápida pérdida de calor del suelo en forma de irradiación produciéndose una “inversión térmica” (INDECI, 2008; INIA 2007). Los valles, cuencas y hondonadas son los lugares más propensos a sufrir este tipo de fenómeno (Matías *et al.*, 2007). La disminución de humedad relativa en el ambiente cercano a los cultivos trae como consecuencia la evaporación del agua, lo que conlleva al enfriamiento de las mismas (Matías *et al.*, 2007). Si bien son procesos diferentes, no es difícil encontrar zonas que presenten combinaciones de ambas condiciones (FAO, 2010). Otra forma de caracterizar las heladas es por la época en la que se presentan encontrando tres tipos: otoñales, primaverales e invernales (PRONAMACHCS, 2007). Así también, se pueden clasificar según el efecto que pueden ocasionar sobre las plantas teniendo así dos tipos: las

heladas blancas y las heladas negras. Respecto a esto último, dependerá del efecto que ocasionan en el cultivo: congelación interna (savia y agua en tejidos) o condensación y congelamiento del vapor de agua del ambiente (SENAMHI-FAO, 2010).

Actualmente; en el Perú, entre los fenómenos meteorológicos que ocasionan mayores pérdidas en la producción de quinua se encuentran las heladas, llegando a ocasionar pérdidas de hasta 62 por ciento en la producción (caso de Ayaviri-Puno, 2014) (RPP, 2014).

2.1.2. Bacterias psicrófilas, psicrótrofas y psicrotolerantes

En la naturaleza, existe una gran diversidad de microorganismos los cuales se encuentran adaptados a las condiciones de la zona que habitan. Uno de los factores que influye en su desarrollo es la temperatura. Bajo condiciones frías y según la capacidad de adaptación del microorganismo lo podremos clasificar en psicrófilos o psicrotolerantes.

En cuanto a lo que se refiere a microorganismos psicrófilos, se sabe que son capaces de crecer por debajo de los 5 °C y con temperaturas máximas de crecimiento de 20 °C. Frecuentemente son capaces de crecer a 10 °C (Hassan *et al.*, 2016). Se localizan en regiones permanentemente frías (Castillo *et al.*, 2005); las regiones polares y fondos marinos son un claro ejemplo de ello. Dentro de los géneros comúnmente encontrados están las bacterias quimioorganótrofas del género *Flavobacterium*, muchas procedentes de la Antártida. Sin embargo también se han aislado psicrófilas pertenecientes a especies como *Shewanella*, *Moritella*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Cytophaga* y *Bacteroides* (Nogi Y., 2011; Maruyama *et al.*, 2000). Una de las modificaciones principales que presentan este tipo de microorganismos, son el cambio en la estructura de la membrana celular, la cual presenta mayor contenido de ácidos grasos, con la que adquiere una mayor fluidez a bajas temperaturas. Así también, la presencia de enzimas capaces de trabajar a bajas temperaturas y proteínas tipo Csp (Cold Shock Protein) y Cap (Cold Acclimation Protein) le permiten un desarrollo adecuado tras el sometimiento a bajas temperaturas (Govindasamy *et al.* 2008; Khan y

Goel, 2014).

Por otra parte los psicrótrofos o psicrotolerantes (Ramle y Rahim, 2016), pueden desarrollarse a bajas temperaturas entre 0 a 7 °C, incluso por debajo de la temperatura óptima de crecimiento, sin embargo la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 20 a más (Govindasamy *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2005). Su distribución es amplia, pudiéndose aislar del suelo, aguas templadas, alimentos congelados, etc. Entre los grupos encontrados en condiciones a bajas temperaturas se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Exiguobacterium*, *Sphingomonas*, *Psychrobacter*, etc. (Yadav *et al.*, 2017)

Para todas las bacterias termófilas, mesófilas y psicrófilas, a bajas temperaturas, los cambios a nivel intracelular son drásticos tanto física como fisiológicamente. Las principales evidencias del estrés a shock frío son la disminución de la fluidez de la membrana, la deshidratación al interior de la célula, el incremento de solutos y formación de radicales libres, reducción de la eficiencia de la transcripción y traducción del mRNA por estabilización de las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, plegamiento ineficiente de algunas proteínas y bloqueo de la función del ribosoma (Phadtare, 2004; Bisht, 2013). Para contrarrestar dichos efectos, todas emplean distintos mecanismos de resistencia al shock frío según su fisiología. Entre las estrategias se encuentran: la reducción de la nucleación de hielo y control de la temperatura de congelación y forma de los cristales; síntesis de componentes crioprotectores (azúcares, aminoácidos libres, polioles, etc.) o enzimas citoplasmáticas de adaptación al frío capaces de desnaturalizarse rápidamente a temperaturas moderadas (Phadtare, 2004; Bisht *et al.*, 2013). Es así que la elevada concentración de sustancias poliméricas extracelulares a baja temperatura en algunas bacterias sugiere que juegan un rol importante en la protección contra la desecación o prevención de la misma en temperaturas de congelamiento. El transporte activo a condiciones de baja temperatura; además, es un claro indicio de la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir y desarrollarse en condiciones adversas en contraste a los microorganismos mesófilos. En el caso de los aminoácidos libres, estos actúan como chaperonas, previniendo la agregación celular de las proteínas durante el shock frío, evitando también un mal

plegamiento de las mismas, permitiendo así una correcta función de regulación de la fluidez de la membrana o correcta actividad de los centros activos de las enzimas; así como el mantenimiento de la solubilidad y carácter iónico de las proteínas (Bisht *et al.*, 2013). En relación a los compuestos prolina y glicina betaína son necesarios para la supervivencia y adaptación al frío de las células que la producen; tal como sucede con la trehalosa, la cual se ha demostrado juega un rol importante en el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular (Phadtare, 2004; Sano *et al.*, 1999 citados por Mishra *et al.*, 2010). Además de estos mecanismos de defensa, existe una de las respuestas más prominentes en defensa al shock frío que permite el mantenimiento interno en mayor grado: la inducción de proteínas de shock frío. En distintos estudios se ha descubierto que la capacidad de producir este tipo de proteínas de shock frío no es exclusiva de bacterias psicrófilas, son sintetizadas tanto en estas como en los otros dos grupos de microorganismos (termófilas y mesófilas) (Phadtare, 2004; Khan y Goel, 2014).

2.1.3. Bacterias PGPR

La rizósfera, es un nicho ecológico bastante estudiado que comprende el área circundante de las raíces de plantas (hasta más allá de 1 mm de ellas), el cual posee la población más alta de bacterias las cuales se encuentran influenciadas por los exudados radiculares (Lines, 2005). Debido a ello, las bacterias del suelo desarrollaron la capacidad de crecer rápido y producir una gran variedad de sustancias como fuentes de nutrientes. Además, poseen una versatilidad metabólica capaz de adaptarse y utilizar los exudados de las raíces para su desarrollo (Goswami *et al.*, 2016).

Por otro lado existe un conjunto de estas bacterias que poseen un efecto positivo en las plantas lo cual les permite vivir tanto asociadas a la planta como en “vida libre” y participar en su desarrollo (Sylvia *et al.*, 1998). A estas bacterias se las denomina Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980). En la actualidad, una bacteria de la rizósfera se le considera PGPR cuando es capaz de producir un efecto positivo en la planta tras la inoculación demostrando una gran capacidad competitiva sobre la comunidad existente. Asimismo, se cree que entre de la población total, solo entre el 2 a 5 por ciento de rizobacterias son PGPR (Goswami *et al.*, 2016).

Entre los mecanismos de acción de las PGPR se diferencian dos tipos:

- Directos:
 - Fijación de nitrógeno
 - Solubilización de fosfato (Anzuay *et al.*, 2013)
 - Producción fitohormonas: auxinas, citoquininas o giberelinas (Shi *et al.*, 2017; Ahemad y Kibret; 2014).

- Indirectos o de biocontrol
 - Producción de sideróforos (Mishra *et al.*, 2011)
 - Producción de quitinasas y glucanasas
 - Producción de antibióticos
 - Resistencia sistémica inducida
 - Producción de Exopolisacáridos (EPS)
 - Producción de HCN y Amoniaco
 - Modulación de los marcadores de estrés bajo estrés abiótico (Beneduzi *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012)
 - Producción de la enzima deaminasa ACC
 - Producción de compuestos orgánicos volátiles

Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del planeta; tal que podemos encontrar grupos de PGPR resistentes a altas concentraciones de salinidad, altas temperaturas, bajo porcentaje de humedad o bajas temperaturas capaces de asociarse a los cultivos y mantener su sistema funcionando sin problemas. Esta capacidad les ha permitido influir sobre los cultivos y en consecuencia se ha evidenciado un mayor rendimiento de estos incluso a temperaturas por debajo de los 15 °C (Selvakumar, 2007; Mishra *et al.*, 2011). En suelos altoandinos existen evidencias de la capacidad promotora de microorganismos psicrotolerantes en cultivos como papa (*Solanum tuberosum*), quinua, maca o pastos forrajeros como el trébol rojo (Calvo *et al.*, 2008; Liceta, 2016; Ogata *et al.*, 2016; Ghyselincx *et al.*, 2013; Ortiz, 2013).

Actualmente la información y precedentes sobre los beneficios del uso de las PGPR en

Chenopodium quinoa es muy escasa, tanto en los efectos sobre su desarrollo como en la inducción de resistencia a plagas o shock osmótico (Ortuño *et al.*, 2013). Por ello los estudios de estas bacterias en el cultivo de quinua son de gran importancia económica, ya que estos no son solo biofertilizantes orgánicos, sino que además se ha reportado que proveen una alternativa de crioprotección a las plantas frente a los efectos perjudiciales de las bajas temperaturas (Theocharis *et al.*, 2012).

2.1.4. Capacidades promotoras de crecimiento

a. Producción de Ácido Indolacético (AIA)

En 1930 se descubrió la auxina ácido 3-indolacético (IAA), fitohormona de gran importancia en el desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Es una hormona de crecimiento de plantas que posee la capacidad de estimular el crecimiento diferencial en respuesta a estímulos de luz. Si bien se descubrieron otro tipo de auxinas en las plantas, el AIA es mucho más abundante y fisiológicamente relevante en las plantas. Dentro de los procesos en los que participa se encuentran el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo, crecimiento longitudinal en coleótilos y secciones de tallos, respuestas defensivas, formación de raíces adventicias en hojas y tallos cortados y destaca su participación en la formación del xilema y la raíz (Taiz y Zeiger, 2006; Hernández-Mendoza *et al.*, 2010; Yamada, 1993). La producción de AIA se encuentra distribuida en el reino Plantae, sin embargo también se ha determinado su producción en bacterias y hongos. En cuanto a las bacterias juega un rol importante en su interacción con las plantas, definiéndola como simbiote o como fitopatógena (Yamada, 1993). Los efectos de la producción AIA bacteriano para la planta depende de la cantidad de AIA producido y la sensibilidad del tejido de la planta a los cambios en la concentración de AIA. (Hernández-Mendoza, 2010). Un efecto negativo producido por AIA en bacterias fitopatógenas pueden causar tumores, corona de agallas, retrasos en el crecimiento, desarrollo anormal, susceptibilidad a otras enfermedades o la muerte de la misma (Yamada, 1993; Hernández-Mendoza *et al.*, 2010).

Las vías de síntesis son diversas, reportándose cinco vías de síntesis dependientes de triptófano (Vega-Celedón *et al.*, 2016). La mayoría de los microorganismos llevan a cabo la vía de síntesis a partir del triptófano y el ácido indol pirúvico (IPA) y el indol 3 acetoaldehído (IAAld) como intermediarios (Taiz y Zeiger, 2006; Vega-Celedón *et al.*, 2016) (Figura 3).

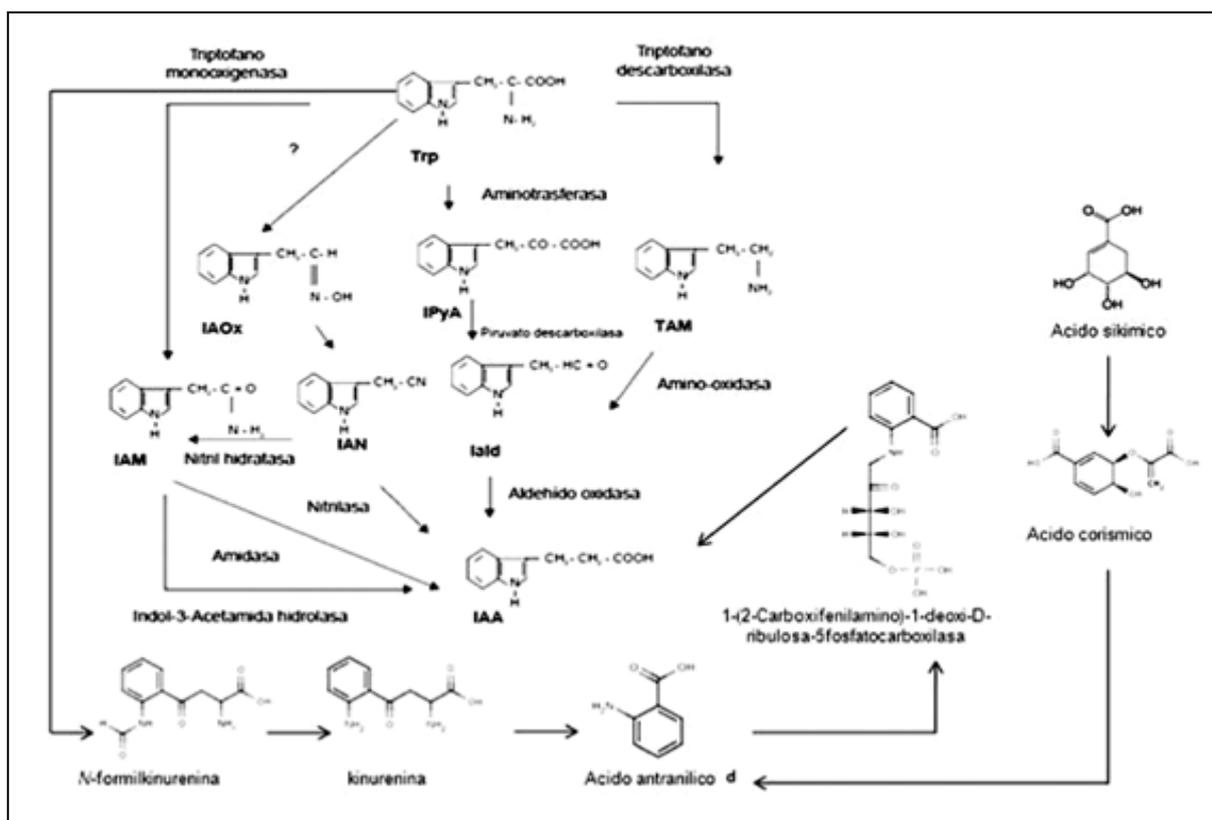


Figura 2: Rutas metabólicas de la síntesis de AIA.

FUENTE: Tomado de Hernández-Mendoza *et al.* (2010)

b. Solubilización de Fósforo

El fósforo es uno de los nutrientes más limitados y su disponibilidad depende de factores como el tipo de suelo, pH, vegetación, actividad microbiana y fertilización (Satyaprakash *et al.*, 2017). Este nutriente se puede obtener de diferentes fuentes, categorizándose en dos tipos fósforo inorgánico y orgánico.

El fósforo inorgánico se encuentra formando parte de minerales de calcio, hierro y aluminio originados por mecanismos de precipitación y su liberación es lenta (Beltrán, 2014). En cuanto al fósforo orgánico, se encuentra presente en la

materia orgánica, la cual se origina de los procesos de degradación microbiana. Además puede representar el 50 por ciento del fósforo insoluble total y se encuentra representado principalmente por fosfato de inositol y en menor proporción por ésteres de fosfato como los fosfolípidos de las membranas celulares (Beltrán, 2014).

Su importancia se debe a que participa en diversos procesos dentro del desarrollo de la planta, tales como el desarrollo de la raíz, el fortalecimiento del tallo y vástagos, la formación de flores y semillas, la producción y maduración de los cultivos, la fijación de N en leguminosas, la calidad del cultivo, la resistencia a las enfermedades de plantas, etc. (Beltrán, 2014).

La disponibilidad del fósforo depende principalmente de procesos fisicoquímicos y biológicos que se llevan a cabo en la solución del suelo. Por otra parte se sabe que la biodisponibilidad de P es muy baja debido a la alta reactividad de este con especies catiónicas de Al^{+3} y Fe^{+3} en suelos ácidos y de Ca^{+2} en suelos calcáreos o neutros (Satyaprakash *et al.*, 2017).

En ambientes naturales, algunos microorganismos de la rizósfera son capaces de transformar el P del suelo en formas disponibles para las plantas. A través de la descomposición, mineralización, almacén y liberación de nutrientes; los microorganismos impactan directamente sobre la fertilidad del suelo y el desarrollo de las plantas, los cuales a su vez liberan diversos compuestos y nutrientes para el desarrollo microbiano (Beltrán, 2014).

Dependiendo de la fuente de P los microorganismos son capaces de solubilizar o mineralizar el fósforo inorgánico u orgánico respectivamente. Los mecanismos de liberación de P son diversos y se activan principalmente por la limitación de P en suelo; aunque se ha reportado que el mecanismo principal se da a través de la liberación de ácidos orgánicos, los cuales tienen la capacidad de quelar los cationes unidos al fosfato a través de sus grupos hidroxilo o carboxilo (Khan, 2007; Beltrán, 2014).

El uso de enzimas como las fosfatasas ácidas representan un mecanismo enzimático por el cual gran parte de los microorganismos son capaces de mineralizar el fósforo orgánico. Por otra parte la liberación de H⁺ a la superficie en intercambio por toma de cationes o con la ayuda de la ATPasa podría constituir otra alternativa de solubilizar fosfatos minerales. Además se han considerado otros mecanismos como la producción de sustancias quelantes, producción de ácidos inorgánicos como ácido sulfhídrico, nítrico y carbónico. Sin embargo estos últimos resultan mínimamente efectivos debido a que no presentan la capacidad de quelar los metales (Rodríguez *et al.*, 1999; Beltrán, 2014).

De otro lado se ha determinado que las bacterias solubilizadoras de P son más efectivas en comparación a los hongos. Su habilidad les permite solubilizar compuestos tan insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato bicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica; encontrándose entre los géneros bacterianos a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* y *Erwinia*. (Khan *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 1999)

La diversidad microbiana las hace de un gran interés económico. No solo por su capacidad de solubilización de minerales, sino también que tras su aplicación el uso de fertilizantes en el suelo se puede llegar a reducir hasta en un 50 por ciento sin evidenciar una reducción significativa del rendimiento del cultivo (Rodríguez *et al.*, 1999)

2.1.5. Quinoa *C. quinoa*

a. Origen y Distribución

La quinoa es un cultivo domesticado originario de los Andes en Sudamérica. Su domesticación se dio hace miles de años por las primeras culturas pre-incas, civilizaciones antiguas de los Andes con más de 3000 a 5000 años de antigüedad las cuales habitaron las regiones del altiplano peruano y boliviano. Entre las

evidencias arqueológicas más antiguas de la domesticación de la quinua se reportan muestras de la zona de Ayacucho que datan de hace 5000 AC (Huaycho *et al.*, 2014; Uhle, 1919 citado por Tapia, 2014).

En cuanto a su origen se cree que son las razas aimara y quechua las responsables de su domesticación y aparición dado a que ambas razas poseen vocablos para describir a la quinua (Toro, 1960). Asimismo se considera la posibilidad de que la quinua tuvo cuatro parientes afines los cuales pudieron ser los responsables de su actual domesticación y evolución: *Ch. carnosolum*, *Ch. hircinum*, *Ch. incisum*, *Ch. petiolare*; sobretodo por encontrarse estas especies ampliamente distribuidas a lo largo de los Andes (Mujica y Jacobsen, 2006). Por ello se considera que el centro de origen y de diversificación de la quinua se encuentra entre el nudo de Pasco en Perú y la cuenca del lago Titicaca entre Perú y Bolivia sobre los 3800 m.s.n.m. (FAO y UNALM, 2016; Tapia, 2014).

Respecto a la distribución del cultivo, en la antigüedad por la actividad agrícola, el cultivo se expandió ampliamente desde Colombia hasta el norte de Argentina y el sur de Chile a lo largo de los valles interandinos (FAO, 2013; FAO y UNALM, 2016). Años más tarde el cultivo se desarrollaría principalmente en Ecuador, Perú y Bolivia siendo estos un centro de diversidad presentando un total de 18 razas cultivadas. En la actualidad, y con el anuncio del “Año Internacional de la Quinua” por parte de las Naciones Unidas, el cultivo se desarrolla en más de 70 países entre los que se encuentran Francia, Inglaterra, Kenia, India, México, Guatemala, Estados Unidos, Canadá, entre otros (FAO, 2013).

b. Descripción Botánica

Pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, género *Chenopodium* (Graf *et al.*, 2015). La quinua es una planta herbácea con rango de tamaños que dependen de la variedad. Es así que se observan plantas entre 1 a 1.8 metros de altura en las variedades del altiplano, y plantas entre 2 a 4 metros cuando son variedades provenientes de valles interandinos, el tallo es recto o ramificado y el color variable (Gómez y Eguiluz, 2011). Las semillas presentan un diámetro de 1.8 a

2.2 mm y son de colores variados (blanco, café, amarillo, rosada, gris, roja y negra) (MINCETUR, 2006). Además, puede adaptarse a una gran variedad de climas pudiendo crecer en zonas con humedad relativa de 40-88% y soportar temperaturas desde -4 a 38°C (FAO, 2013); y es capaz de crecer por encima de los 3500 m.s.n.m. (Jarvis *et al.*, 2017). El tamaño, color y sabor del grano varía según la variedad del mismo (MINCETUR, 2006).

c. Clasificación Taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub Clase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodiaceae

Género: *Chenopodium*

Sección: Chenopodia

Subsección: Cellulata

Especie: *C. quinoa* Willd.

d. Clasificación Agroecológica

Esta clasificación se basa en las características específicas propias del ambiente en que evolucionaron y fueron domesticadas (FAO y UNALM, 2016).

- **Quinuas a nivel del mar**

Se las encuentra en la zona de la costa de Chile. Se caracterizan por producir semillas transparentes de color crema (tipo chullpi). La altura de plantas comprende entre 1 a 1.4 m.

- **Quinuas de los valles**

Se encuentran en los valles interandinos comprendidos entre los 2500 a 3500 m.s.n.m. Las plantas pueden sobrepasar los 2.4 m de altura

- **Quinuas del Altiplano**

Desarrolladas en amplias planicies del Altiplano peruano-boliviano entre los

3600 y 4000 m.s.n.m., circundante al lago Titicaca. La altura de planta en un rango de 0.5 a 1.5 m.

- **Quinuas de los salares**

Desarrolladas en las altas planicies del sur de Bolivia conocidas como salares. La morfología de este grupo es similar a las quinuas del altiplano.

- **Quinuas de las yungas**

Adaptadas a las condiciones de las Yungas de Bolivia entre los 1500 a 2000 m.s.n.m. La altura de estas se encuentra entre los 2.2 m.

e. Importancia Económica

Debido a la gran adaptabilidad (plasticidad genética) de este cultivo, la producción de quinua en el Perú se extiende desde el nivel del mar hasta los 3900 metros de altitud soportando diversas condiciones abióticas (temperatura, pH, humedad, etc.). Puede desarrollarse en un amplio rango de acidez que va desde 6.0 hasta 8.5 de pH (Graf *et al.*, 2015). Dependiendo de la variedad, tolera climas calurosos-secos, templados, fríos y lluviosos-secos; lo cual permite que pueda crecer en temperaturas que van desde los 35 °C hasta -1°C durante los estadíos previos a la formación de la inflorescencia sin ver afectado su desarrollo. Sin embargo, para un óptimo crecimiento del cultivo, este debe desarrollarse entre los 18 °C a 25 °C según algunos autores (Valencia y Chamorro, 2003) o entre los 15 °C a 20 °C (FAO y UNALM, 2016). Además, la quinua es capaz de desarrollarse durante épocas de sequía en zonas con un nivel mínimo de precipitación anual de 200- 400 mm (Jacobsen *et al.*, 2003).

Por todo ello, las zonas de producción se concentran en 19 de 24 departamentos a lo largo de la costa y sierra del territorio peruano. Abarcando departamentos como Junín, Ayacucho, Cusco, Puno, Arequipa, entre otros. En la Tabla 1 se presenta las variedades comerciales más empleadas a lo largo del territorio peruano.

Tabla 1: Variedades comerciales de importancia en Perú

VARIEDADES COMERCIALES	RENDIMIENTO POTENCIAL Kg/Ha	Grano Color	Contenido Saponina	Contenido Proteína	Adaptación msnm
Kanccolla	3500	Blanco o rosado	Amarga		Altiplano
Blanca de July	2500	Blanco	Semi dulce		Altiplano
Witulla	1200-1800	Negro			Altiplano
Sajama	3000	Blanco y grande	Dulce		Altiplano
Chewewcca	3000	Blanco y grande	Dulce		Altiplano
Amarilla Maranganí	3500	Anaranjado	Amarga		Cusco
Blanca de Junín	2000-2800	Blanco	Semi dulce		Valles Interandinos
Blanca de Hualhuas	2500	Blanco	Semi dulce		Valles Interandinos
Rosada Huancayo	3000	Blanco	Semi dulce		Valles Interandinos
Quillahumán INIA	3500	Blanco-crema	Bajo		0 -3500
Salcedo INIA	Bueno	Blanco y grande	Dulce (0.014%)	14.50%	Valles y Costa
Illpa INIA	3100	Blanco y grande	Dulce (0.02%)	16.14%	Altiplano y Costa
INIA 415-Pasankalla	4500	Vino oscuro	Dulce	17.40%	Altiplano y Costa
INIA 420-Negra Ccollana	Bueno	Negro	Dulce (0.015%)	17.85%	Altiplano y Costa
INIA 427 - Amarilla Sacaca	3500	Amarillo anaranjado y grande	Alto	14.83%	Valle Interandino
INIA 431 – Altiplano	Bueno	Blanco y grande	Dulce	16.90%	Costa y Sierra

FUENTE: INIA, Díptico N° 1 Abril, 2013

Elaboración: Propia.

f. Variedades según distribución

- **Kancolla**

Se liberó en la región Puno en 1975. La variedad se adaptó a la zona agroecológica circunlacustre y suni del altiplano entre los 3800 y 3900 msnm con clima frío seco, precipitación pluvial de 450 a 600 mm, con temperaturas de 4 °C a 15°C, en suelos de textura franco y franco arenoso con pH de 5.5 a 8.0. Grano mediano de 1.6 a 1.9 mm de diámetro, de pericarpo color crema, alto contenido en saponina, periodo vegetativo 160 a 180 días (tardía), rendimiento promedio de grano 1.5 a 2 t/ha, tolerancia intermedia al mildiu, tolerante a bajas temperaturas, sequía y humedad.

- **Hualhuas**

Se liberó en la región Junín en 1975. Registrada con la clave UNC-H 20 B-74. La variedad se adaptó a varias localidades pertenecientes a la Cuenca del Mantaro, en condiciones ecológicas similares a la Estación Experimental Agropecuaria El Mantaro de la UNCP. Grano grande de 2.10 mm de diámetro, de pericarpo color crema, contenido medio de saponina, periodo vegetativo de 150 a 160 días, rendimiento promedio de grano 3.20 t/ha, susceptible a mildiu, recomendable para zonas tolerancia moderada a sequía, susceptible a baja temperatura y humedad.

g. Valor nutricional

Presenta un gran valor nutricional ya que cuenta con aminoácidos esenciales como la metionina y el triptófano; además contiene el doble de concentración de lisina en comparación a otros cereales y gramíneas (Tabla 2). Respecto a su contenido vitamínico y mineral, presenta vitaminas del complejo B, vitaminas C, E, tiamina, riboflavina, calcio, magnesio, cobre, fósforo, hierro y zinc (Repo *et al.*, 2003; FAO, 2013).

Tabla 2: Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en granos de quinua, cereales, frejol, carne, pescado, leche y la proteína patrón

Aminoácido	Quinua	Arroz	Cebada	Maíz	Trigo	Frejol	Carne	Pescado	Leche	Patrón
										FAO (G)
Arginina	7.3	6.9	4.8	4.2	4.5	6.2	6.4	5.6	3.7	-
Fenilalanina	4	5.09	5.2	4.7	4.8	5.4	4.1	3.7	1.4	6
Histidina	3.2	2.1	2.2	2.6	2	3.1	3.5		2.7	-
Isoleucina	4.9	4.1	3.8	4	4.2	4.5	5.2	5.1	10	4
Leucina	6.6	8.2	7	12.5	6.8	8.1	8.2	7.5	6.5	7
Lisina	6	3.8	3.6	2.9	2.6	7	8.7	8.8	7.9	5.5
Metionina	2.3	2.2	1.7	2	1.4	1.2	2.5	2.9	2.5	3.5
Treonina	3.7	3.8	3.5	3.8	2.8	3.9	4.4	4.3	4.7	4
Triptófano	0.9	1.1	1.4	0.7	1.2	1.1	1.2	1	1.4	1
Valina	4.5	6.1	5.5	5	4.4	5	5.5	5	7	5

FUENTE: Tomado de Gómez y Eguiluz (2011)

2.1.6. Mecanismos de adaptación de las plantas a las heladas

Todo organismo se encuentra adecuado a un ambiente determinado debido a los cambios y adaptaciones que ha adquirido tras muchos años de adaptación y evolución del sistema mismo. Esto sucede de igual manera para las plantas, las cuales se encuentran de forma estacionaria en un lugar determinado y con ello se ven forzadas a adaptarse a las condiciones ambientales que las rodean (Guy, 1999). Sin embargo, para las plantas de importancia agrícola el panorama es totalmente distinto. Dichos organismos se encuentran sometidos a distintas condiciones ambientales (salinidad, heladas, sequías, bajo contenido de nutrientes en suelo, etc.), las cuales deben afrontar para conseguir prosperar y llegar a la última etapa. En muchos casos, los cultivos llegan a adaptarse a más de un tipo de condición ambiental. Esto lleva a pensar que existe más de un mecanismo de adaptación que permite afrontar diversas situaciones, pero que comparten similares efectos sobre la planta. Tal es el caso de las heladas y las sequías, o las heladas y los shocks de calor; los cuales conllevan a una desecación celular y elevación de la osmolaridad. En diversos estudios se ha demostrado que muchos de los compuestos producidos en defensa a las sequías, se producen y secretan también en

situaciones de helada (Rezaei *et al.*, 2010; Theocharis *et al.*, 2012). Tal es el caso del ácido abscísico (ABA) el cual se produce tanto en sequías, golpes de calor y heladas (Zhu, 2016). Esto debido a un efecto en particular que se lleva a cabo en las tres situaciones: la desecación celular. Sin embargo, si bien la producción de ABA se da en las tres situaciones, no se debe considerar como iguales los mecanismos de acción frente a estos fenómenos, sino similares; ya que las proteínas que acompañan al ABA en la señalización difieren entre uno y otro efecto (Rejeb *et al.*, 2014).

a. Prolina

Aminoácido heterocíclico que forma parte del grupo de los no polares (Wedemeyer *et al.*, 2002). Contiene un grupo amina secundaria. Se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas en condiciones normales, sin embargo; en situaciones de estrés los niveles de prolina aumentan y actúa como un agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación (Parra, 2012). Así también, algunas plantas acumulan prolina en estado libre en respuestas a la salinidad, sequía y frío (Koç *et al.*, 2009).

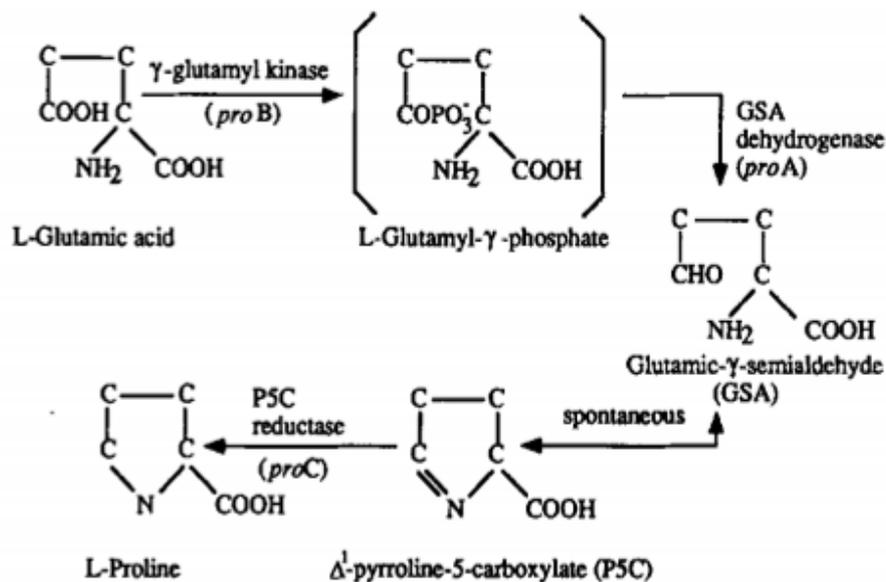


Figura 3: Ciclo de biosíntesis bacteriana de prolina.

FUENTE: Tomado de Delauney y Verma (1993)

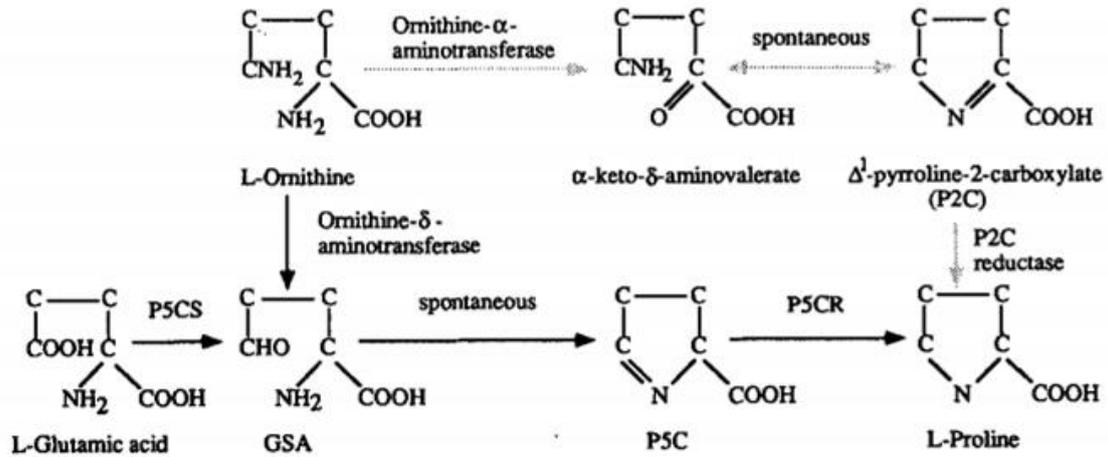


Figura 4: Ciclo de biosíntesis en plantas de prolina.

FUENTE: Tomado de Delauney y Verma (1993)

b. Compuestos Fenólicos

El estrés abiótico conduce a una serie de cambios moleculares, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que afectan adversamente la productividad y el desarrollo de los cultivos (Barka *et al.*, 2006). El resultado de estos cambios genera daños, los cuales se reflejan en la mayoría de los procesos metabólicos, y con ellos su rendimiento. Entre los factores que generan estrés abiótico se encuentran la salinidad, sequía, congelamiento e incremento de temperaturas por encima de lo óptimo (Rivero *et al.*, 2001; Król *et al.*, 2015).

En lo que refiere a bajas temperaturas, son el principal factor limitante de la productividad y la distribución espacial de varias especies. Sin embargo, existen plantas que son capaces de soportar el frío debido a que sufrieron un proceso de aclimatación al frío. Este proceso involucra cambios en la expresión de genes, estructuras celulares, contenido y composición de proteínas, azúcares, etc (Rivero *et al.*, 2001). Ante este tipo de estrés se induce la producción de compuestos fenólicos, los cuales constituyen un conjunto de metabolitos secundarios que actúan como un mecanismo de defensa de las plantas (Koc *et al.*, 2010). Poseen propiedades antioxidantes protegiendo a las células contra el efecto negativo de los ROS, la oxidación de los lípidos, la desnaturalización de proteínas y daño del ADN. Además de actuar en presencia de metales e incrementar la actividad oxidativa de las enzimas mejorando la resistencia de las

plantas a los factores de estrés (Weidner *et al.*, 2014). Su actividad depende de su estructura, concentración, potencial óxido reductor e hidrofiliidad. Además se reporta que la variedad y la especie también influyen en su contenido, siendo que las especies más tolerantes al congelamiento tienen un mayor contenido de compuestos fenólicos, una mejor capacidad de eliminación de radicales y un mayor poder reductor (Kól *et al.*, 2015; Rivero *et al.*, 2001; Weidner *et al.*, 2014).

Por otra parte, la producción de compuestos fenólicos puede verse inducida o reducida por la actividad de los microorganismos del suelo pudiendo duplicarse en tratamientos con inóculos que se encuentren afectados por un cambio de temperatura (Barka *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material biológico

a. Material vegetal

- Semillas de *C. quinoa* var. Kancolla (E.E. Illpa INIA-Puno).
- Semillas de *C. quinoa* var. Hualhuas (UNALM).

b. Bacterias

- Cepa LMTK32, aislada de la rizósfera de maca- Junín (Ortiz, 2013).
- Bacterias psicotolerantes aisladas de la rizósfera de quinua.

3.1.2. Medios de cultivo y equipo de laboratorio

a. Medios de cultivo

- Agar agua 0,5 por ciento
- Agar levadura-manitol
- Agar MacConkey
- Agar nutritivo
- Agarosa 1 por ciento
- Agar HP
- Caldo HP
- Caldo levadura-manitol
- Caldo nutritivo
- Medio Mineral sin Nitrógeno

- Medio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP)

b. Soluciones y reactivos

- Ácido acético glacial
- Ácido Sulfosalicílico 3 por ciento
- Ácido sulfúrico 98 por ciento
- Agua blanda
- Agua destilada
- Agua MilliQ
- Alcohol al 70 por ciento
- Alcohol al 96 por ciento
- Buffer de PCR + KCl 10X
- Buffer tris-borate-EDTA (TBE)
- Cloruro de magnesio MgCl₂ 25 mM
- Cristal violeta al 0.5 por ciento
- Decolorante Gram
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 100 por ciento
- GeneRule 1.5kb Plus DNA Ladder 50µg
- Glicerol
- Lejía al 3 por ciento
- Loading dye 6X
- Lugol
- Ninhidrina (Sigma Aldrich)
- Nitrógeno líquido
- Reactivo de Salkowski (Gordon y Weber, 1951)
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Safranina al 2.5 por ciento
- Solución de 10 pmol/µl de los primers rD1 y fD1
- Solución de 100 pmol/µl del primer BOX A1R
- Solución de carbonato de sodio al 20 por ciento
- Solución de dNTP 25 mM
- Solución de KOH al 3 por ciento

- Solución hidropónica A (La Molina)
- Solución hidropónica B (La Molina)
- Solución salina al 0.85 por ciento
- Taq polimerasa 5 unidades
- Tolueno (J.T. Baker)

c. Equipos y materiales de Laboratorio

- Agitador mecánico orbital (BioSan).
- Agitador mecánico orbital (MRC).
- Autoclave horizontal.
- Balanza de mesa (OHAUS OHR71MD6 RANGER 7000).
- Balanza de platillo (OHAUS Scout ProSP202).
- Bandejas de plástico.
- Beakers (PIREX).
- Bolsas de polietileno.
- Botellas de PVE.
- Botellas de vidrio
- Cámara climática (Mettler, Alemania)
- Cámara de electroforesis (Clever Scientific Ltd.)
- Cámara fotográfica digital (Leica).
- Congeladora de -20 °C (Frigidaire).
- Congeladora de -86 °C (Ilshin).
- Equipo de Baño María (MRS).
- Espectrofotómetro (Genesys 6 – Thermo Electron Corp.)
- Estereoscopio
- Fiolas 5,10 y 100ml
- Fotodocumentador de geles de electroforesis (Clever Scientific Ltd.)
- Fuente de alimentación para electroforesis (Biometra PS300T, PS 304 XL)
- Horno de secado.
- Horno microondas (Samsung).
- Kit de extracción de DNA (ThermoFisher).
- Matraces Erlenmeyer.

- Mechero Bunsen.
- Microcentrífuga (Sigma).
- Microcentrífuga refrigerada
- Micropipeta automática 0.5-10 AP (Axypet)
- Micropipeta automática 100-1000 AP (Axypet)
- Micropipeta automática 20-200 AP (Axypet)
- Micropipeta automática 2-20 AP (Axypet)
- Microscopio (Leica DM750)
- Microtubos 1,5 ml
- Microtubos 2 ml
- Pinzas de metal.
- Pipetas graduadas.
- Placas Petri desechables 90x15''
- Placas Petri vidrio 100 x 15''
- Potenciómetro (Hanna Instruments pH 211)
- Probetas.
- Propipeta 3 vías
- Refrigeradoras (Bosch)
- Regla de metal
- Sobres de papel.
- Termobloque
- Termociclador convencional (Eppendorf)
- Tips amarillos 20-200 μ l
- Tips azules 100-1000 μ l
- Tips blancos 0.5-10 μ l
- Tubos de prueba 25 x 250 mm con tapa (Pirex).
- Tubos pirex 12x150 mm con tapa (Pirex).
- Ultrasonido (Branson, USA)
- Vernier digital
- Vórtex (Gemmy UM-300).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Lugar de muestreo

Se realizó en el INIA sede Salcedo (Puno). Ubicado en Rinconada Salcedo s/n. Con coordenadas: Latitud Sur 15°52'52" y Longitud Oeste 70°00'08". Se tomó varias muestras del suelo de los campos de quinua uniéndolas en una única muestra representativa (muestra compuesta). La muestra se trasladó en un envase hermético de polipropileno con gel packs que mantuvieron la temperatura a 5 °C aproximadamente.

3.2.2. Lugar de procesamiento de muestras

La parte experimental de este estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología; mientras que los análisis de caracterización de suelos y contenido nutricional de suelo y plantas se realizaron como servicio en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (UNALM).

3.2.3. Aislamiento de bacterias psicrotolerantes del suelo rizosférico de plantas de quinua

Previo al procesamiento microbiológico, se tomó una porción de 100 g de la muestra y se sometió a un shock de frío por 3 horas a -5 °C en cámara climática (Mettler, Alemania). Finalizado el pre-tratamiento se realizó el recuento de microorganismos aerobios según la técnica APHA (1998) sobre medio Plate Count (PC) realizando diluciones sucesivas en solución salina (0.85 por ciento desde la dilución -1 hasta la -6 por duplicado. Las placas se incubaron a 6 °C en una congeladora automatizada (fabricación nacional) y se evaluó el crecimiento y pureza a las 48, 72 y 120 horas. Durante el periodo de incubación se seleccionaron las colonias bacterianas que presentaron características morfológicas predominantes en las placas. Las bacterias seleccionadas que presentaron dificultad en la purificación se trabajaron con el medio HP (Hynes *et al.*, 1985).

3.2.4. Conservación de cepas a -80°C

Las cepas purificadas fueron sembradas en caldo levadura manitol e incubadas por 24 horas a 28 °C y 150 rpm. Los inóculos se traspasaron a microtubos de 2 ml donde se adicionó glicerol (16%) como crioprotector. Las cepas se conservaron a -80°C en una ultracongeladora (Ilshin, Corea).

3.2.5. Producción de inóculos para la evaluación de la tolerancia al shock frío

Se reactivó la cepa LMTK32 (Ortiz, 2013) del banco de cepas del LEMYB en medio semi-selectivo LMA, y se incubó por 48 horas a 22 °C. Se cosechó la masa de las colonias en tubos con solución salina (0.85 por ciento llevando la concentración de los microorganismos a 0.8 de densidad óptica (D.O.) aproximadamente a 600nm y se realizaron recuentos en placa a las diluciones decimales -5, -6 y -7 (APHA, 1998) empleando solución salina (0.85 por ciento) como diluyente y medio LMA.

3.2.6. Evaluación de la tolerancia al shock frío de bacterias PGPR

Se inocularon 4 ml de la cepa LMTK32 a una concentración de 10^8 UFC/ml aproximadamente en dos frascos PET que contenían 20 g de arena estéril. Seguidamente, se sometió uno de los frascos a 5 horas de shock térmico en frío a -5 °C en cámara climática marca Memmert (Lindow *et al.*, 1982). Finalizado el tiempo de exposición se procedió al recuento de la cepa (APHA, 1998) en medio Plate Count desde la dilución decimal -1 hasta la -8 empleando solución salina (0.85 por ciento) como diluyente y se incubó por 48 horas a 22 °C. El segundo frasco consistió en un tratamiento control inoculado con la cepa LMTK32 (10^8 UFC/ml aproximadamente) sometido a 22 °C por 5 horas en cámara de incubación (fabricación nacional).

3.2.7. Caracterización fenotípica de las cepas

a. Caracterización morfológica

Las cepas aisladas fueron sembradas en agar levadura-manitol (LMA) e incubadas por 48 h a 28°C. Se procedió a evaluar las características macroscópicas de las colonias: forma, elevación, borde, color, superficie, transmisión de luz y consistencia (Pírez y Mota 2006).

b. Caracterización bioquímica

• Tinción Gram de las cepas aisladas

Se realizó una tinción Gram para determinar el grupo al que pertenecían las cepas aisladas. Para ello se incubaron en medio LMA a 28°C por 24 horas, tras lo cual se procedió a su fijación sobre láminas porta objetos que contenían alícuotas de solución salina al 0.85%. El proceso de tinción consistió en:

1. Agregar sobre las bacterias fijadas una alícuota de cristal violeta. Dejar actuar 30 s.
2. Enjuagar con agua destilada.
3. Adicionar una alícuota de lugol. Dejar actuar 30 s.
4. Enjuagar con agua destilada.
5. Proceder a lavar la lámina con decolorante Gram. 10-15 s.
6. Enjuagar el decolorante con agua destilada. Retirar el exceso de agua.
7. Aplicar el colorante de contraste safranina. Dejar actuar por 30 s.
8. Enjuagar con agua destilada. Dejar secar sobre papel toalla.
9. Observar al microscopio con aceite de inmersión.

• Prueba KOH

Se realizó el ensayo de KOH empleando cultivos frescos de las cepas en agar levadura- manitol. Se tomó una colonia de cada cepa y esta fue colocada sobre láminas porta objeto donde se agregó una alícuota de KOH (3 por ciento) (Anexo 8). La mezcla se homogenizó por un periodo de 30-60 segundos y se

evaluó la formación de un elemento viscoso o gomoso. La formación de este elemento tras el contacto con la solución se interpreta como una reacción positiva otorgando la característica de Gram negativa a la cepa en estudio (Buck, 1982).

3.2.8. Caracterización fisiológica

a. Crecimiento a diferentes temperaturas

Para caracterizar la capacidad psicotolerante de las cepas, se sembraron en caldo nutritivo hasta obtener una población aproximada de 10^8 UFC/ml aproximadamente. Se colocaron 4 μ l de caldo microbiano sobre las placas con medio sólido por cepa, colocándose un total de 6 cepas por placa. Se realizaron pruebas a tres temperaturas 6 °C, 15 °C y 28 °C por un período de 3 días. Se evaluó el efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas mediante la medición del diámetro de la colonia cada 24 horas. Cada tratamiento contó con 3 repeticiones por cepa.

3.2.9. Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal a nivel *in vitro*

a. Producción de ácido indol-acético (AIA)

La cuantificación de AIA se realizó siguiendo la metodología descrita por Zúñiga (2012). Las cepas aisladas fueron reactivadas en AN (agar nutritivo) y se sembraron en tubos con LMC (caldo levadura manitol) suplementado con L-triptófano, incubándose a 6 °C y 28 °C. Se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Posteriormente, se tomó 1 ml de los cultivos y se colocaron en microtubos de 1.5 ml de capacidad para proceder a centrifugarlos a 12000 rpm por 5 min. Se tomó una alícuota de 250 μ l de sobrenadante y se le adicionó 1 ml de reactivo de Salkowski en oscuridad. La mezcla se incubó por 30 min y se cuantificó en espectrofotómetro a 530 nm. La concentración de AIA en cada cultivo se determinó mediante el uso de una curva estándar. Los resultados se expresaron en μ g/ml.

b. Solubilización de sales de fosfato

Las cepas se sembraron en Caldo Nutritivo y se incubaron en agitación orbital a 180 rpm por 2 días. Se modificó la metodología propuesta por Zúñiga (2012), cambiando el estriado por la inoculación de las placas con 4 μ l de 10^7 - 10^8 UFC/ml de cada cepa en el medio basal NBRIP (Nautiyal, 1999) adicionando fosfato bicálcico o fosfato tricálcico como fuente de fósforo a pH 7. Las evaluaciones se agruparon en fuentes de fosfato y a dos temperaturas 6 °C y 28 °C y se realizaron por 25 días. Se identificaron como positivas las cepas que mostraron presencia de un halo transparente alrededor de la colonia, cuyo diámetro fue calculado restando el diámetro de la colonia.

c. Crecimiento en medio de cultivo sin nitrógeno

Con la finalidad de determinar si las cepas presentaban capacidad fijadora de nitrógeno, se sembraron las 43 cepas en medio mineral sólido sin fuente de nitrógeno adicionando además el colorante sensible a pH: azul de bromotimol. Se emplearon cepas frescas en medio mínimo y se incubaron a 28 °C \pm 2 por un periodo de 3 a 5 días dependiendo del tiempo de crecimiento de la bacteria (García, 2011) realizando un segundo pase para eliminar la posibilidad de un falso positivo.

• Determinación de la capacidad de consumo de lactosa

Entre los grupos diazotróficos anaerobios facultativos se encuentra la familia de las Enterobacteriaceae los cuales se encuentran asociados a diversos ambientes y dentro de estos, las plantas (García, 2011). El consumo de lactosa es característico en muchas bacterias de esta familia por lo que un estudio de ello aportó mayor información para los siguientes ensayos. Para evaluar la capacidad de las cepas de emplear lactosa como fuente de carbono, éstas se sembraron en agar MacConkey a 28 °C por 2 días Se consideraron positivas aquellas cepas que crecieron en el medio de cultivo (MacConkey, 1900).

3.2.10. Caracterización molecular

a. Extracción de ADN bacteriano

Para la obtención de ADN genómico se cultivaron las cepas en medio HP durante 12 h a 28 °C a 150 rpm. El proceso de extracción se realizó a través del kit GeneJet DNA Genomic Purification (Thermo Scientific) siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Colocar 2 ml de caldo de cultivo en microtubos rotulados. Centrifugar a 5000 g por 10 min. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 ml de solución de digestión. Adicionar 20 µl de proteinasa K. Homogenizar en vórtex hasta obtener una suspensión uniforme.
3. Incubar a 56 °C homogenizando ocasionalmente en vórtex hasta que las células se encuentren completamente lisadas (~30 min).
4. Adicionar 20 µl de RNAasa, homogenizar y dejar incubar a temperatura ambiente por 10 min.
5. Añadir 200 µl de solución lisis a la muestra. Homogenizar cerca de 15s hasta obtener una mezcla uniforme.
6. Agregar 400 µl de etanol al 50 por ciento, homogenizar con pipetor o vórtex.
7. Transferir el lisado a una columna GeneJet Genomic DNA Purification insertada en un tubo colector. Centrifugar la columna por 1 min a 6000 g. Descartar el tubo colector con la solución en su interior. Colocar la columna en un nuevo colector de 2 ml.
8. Adicionar 500 µl de Buffer de lavado I (diluido en etanol). Centrifugar a 8000 g por 1 min. Desechar el fluido contenido en el tubo colector y volver a unir el tubo colector con la columna.
9. Añadir 500 µl de Buffer de lavado II a 8000 g por 3 min. Descartar el tubo colector. Transferir la columna a un microtubo nuevo y estéril de 1.5 ml.
10. Agregar 100 µl de Buffer de elución al centro de la membrana de la columna para eluir el ADN genómico. Incubar por 2 min a temperatura ambiente. Luego centrifugar a 8000 g por 1 min.
11. Descartar la columna. Almacenar a -20°C.

b. Calidad de ADN extraído

La calidad del ADN extraído se verificó tanto cualitativa como cuantitativamente. En el primer caso se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento con 50 ml de buffer Tris-ácido bórico-EDTA 1X (TBE 1X) sobre una celda de dimensiones 15 x 10 cm. El gel solidificado fue colocado en el interior de una cámara electroforética con buffer TBE 1X. Cada gel de prueba (20 pocillos) se distribuyó de la siguiente manera: en el primer carril se colocó un marcador de peso molecular (1 µl de GeneRuler DNA 1 kb (ThermoScientific, USA) + 1 µl de buffer de carga loading dye 6X (Thermo Scientific)+ 4 µl agua MilliQ c.s.p.) y en los carriles restantes se colocó 19 muestras de ADN genómico. Para cada muestra se procedió a mezclar 5 µl del ADN extraído con 1 µl de buffer de carga loading dye 6X. La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V por 60 min. Para el revelado del gel al término de la corrida se empleó una solución acuosa de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. Posteriormente se transfirió el gel a una bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 min para su lavado. La presencia de bandas se evaluó a través de un foto-documentador de luz UV (Cleaver Scientific, Reino Unido). Para la verificación cuantitativa se tomó 1 µl del extracto y se introdujo en la lente del equipo Nanodrop 2000 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

c. Amplificación BOX-PCR

Se empleó el primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') para la amplificación BOX. La PCR se realizó para ambas amplificaciones en una mezcla de reacción de 25 µl, de acuerdo a lo siguiente:

Tabla 3: Concentraciones de reactivos para la amplificación BOX PCR

Reactivos	Volumen
Buffer KCl (10X)	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	7
DMSO (100%)	2.5
dNTPs (100 mM)	1.24
Primer BOX A1R (100 pmol/ml)	0.2

...continuación

Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l)	0.4
DNA	5
Agua Milli-Q	c.s.p. 25

El perfil de temperatura fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 6 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, annealing a 53 °C por 1 min y extensión a 65 °C por 8 min; y una extensión final a 65 °C por 16 min. La comprobación de la amplificación se realizó mediante electroforesis, cargando 5 μ l del amplificado en gel de agarosa al 1.5 % de 15 cm durante aproximadamente 3 h a 80 V.

El análisis de los perfiles de bandas BOX se realizó de acuerdo a lo propuesto por Versalovic *et al.* (1991).

3.2.11. Análisis filogenético

a. Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S

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

fD1: (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')

rD1: (5' -CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3')

Cada 25 μ l del volumen total de reacción PCR contendrá:

Tabla 4: Reactivos para la amplificación PCR-ADN Ribosomal 16S

Reactivos	Volumen
Buffer KCl (10X)	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.5
dNTPs (100 mM)	0.2
Primer fD1(25 pmol/mL)	0.5
...continuación	
Primer rD1(25 pmol/mL)	0.5
Taq DNA Polimerasa (5	0.1

U/ μ L)	
DNA	5
Agua Milli-Q	c.s.p. 25

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de PCR de polipropileno de 200 μ l y en un termociclador. El perfil de temperaturas consistió en lo siguiente: desnaturalización inicial (94 °C, 3 minutos); seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94 °C, 45 segundos), *annealing* (62 °C x 45 s) y extensión (72 °C, 2 minutos), y finalmente con una sola extensión final (72 °C, 5 minutos).

Los productos de la amplificación se examinaron empleando geles de electroforesis de agarosa al 1% de 15x10 cm en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X por 1 hora a 80V. Los productos obtenidos fueron purificados empleando el kit PureLink PCR Purification Kit (Thermo Scientific) y posteriormente enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN Inc. (Seúl, Corea del Sur).

b. Análisis de similitud y construcción de árboles filogenéticos

Se analizó y editó las secuencias resultantes usando el programa BioEdit (Hall, 1999); comparando las secuencias con la base de datos EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) y alinéandose entre ellas mediante el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Para la construcción de árboles filogenéticos, se empleó el método neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) usando el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), para el cálculo de las distancias se usó el modelo de dos parámetros de Kimura (1980). La robustez de los nodos de los árboles filogenéticos se midió empleando un análisis de bootstrap con 1000 réplicas.

3.2.12. Selección de cepas mediante el análisis de características fenotípicas y moleculares

Para los ensayos a nivel *in vitro* en plantas de *C. quinoa*, se decidió reducir el número de cepas a ensayar; seleccionando las mejores cepas en base a sus características PGPR. Por ello se decidió contrastar los resultados obtenidos en la caracterización PGPR y los análisis moleculares. Con los resultados obtenidos en los ensayos de AIA y

solubilización de fosfato a bajas temperaturas se generó una matriz binaria de presencia/ausencia (1/0) considerando solo los resultados a bajas temperaturas. Tras la generación de la matriz se procedió a generar un dendograma empleando para ello el programa NTSYS-PC 2.0 (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, ver. 2.0, Exeter Software, New York, USA). Se empleó el coeficiente de similaridad de Jaccard (J) y el método de reconstrucción UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) para la generación de grupos.

Finalmente se fijó un total de 4 tratamientos para la evaluación *in vitro* en plantas, de los cuales uno correspondió a una de las cepas obtenidas en el análisis de dendogramas, un control negativo estéril sin suplemento de nitrógeno, el tercer tratamiento consistió en un control sin inóculo suplementado con nitrógeno y el último en una cepa control (LMTK32).

3.2.13. Evaluación del efecto de las PGPR psicrótrofas sobre *C. quinoa* a nivel *in vitro*

a. Evaluación de la calidad de semilla

Para determinar la calidad de semilla se realizó una prueba de germinación. Por ello, se seleccionaron semillas buscando la uniformidad de las mismas en tamaño y color. El proceso de desinfección consistió en inmersiones en etanol al 70 por ciento e hipoclorito de sodio al 3 por ciento cada desinfectante se adicionó por separado en dos etapas durante 3 min cada uno y se empleó agua destilada estéril para retirarlo. Se retiró el líquido excedente y se sembraron las semillas en placas con agar agua (0.5 por ciento). Las semillas se llevaron a cámara de fotoperiodo la cual se programó con 12 horas de luz a 17 °C y 12 horas de oscuridad a 14 °C y la germinación se evaluó hora a hora tras 8 h de incubación.

b. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles PGPR sobre la

germinación de *C. quinoa*

En los ensayos *in vitro* se evaluaron 44 cepas y un control negativo (sin inóculo). Las cepas se estriaron en una placa partida (I-plate) que contenía medio LMA en una parte y agar agua (0.5 por ciento) en otra y se incubó por 24 h a 15 °C. Se procedió a desinfectar las semillas siguiendo el método mencionado en el control de calidad de semilla, seguidamente se colocaron en la otra mitad de la placa con agar agua. Todo el sistema se selló con parafilm y se incubó a 15 °C por 8 h en oscuridad. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a evaluar la velocidad de germinación hora a hora por un periodo de 8 horas. Las placas se incubaron por una semana en fotoperiodo (12 h luz/12 h oscuridad) a 15°C ± 3. Los parámetros de evaluación tras la cosecha de plantas fueron: porcentaje de germinación, peso fresco y peso seco.

c. Evaluación de la germinación *in vitro* de semillas inoculadas de *C. quinoa*

El proceso de desinfección se realizó siguiendo los pasos mencionados en el subtítulo en la prueba de viabilidad de semillas. Al término de la desinfección se retiró el exceso de agua para embeber las semillas con las suspensiones microbianas durante 15 min. Para la preparación de los inóculos se empleó como medio de trabajo caldo levadura-manitol a 22 °C por 48 horas llevándose la concentración de los inóculos a una D.O. de 0.6 o su equivalente a 10⁶ UFC/ml. Se consideró un tubo con caldo estéril como tratamiento control y para los tratamientos se tomó en cuenta tres cepas previamente seleccionadas del grupo aislados de la zona experimental Salcedo INIA-Puno. Culminado el tiempo, se retiró el exceso del inóculo de las semillas en placas Petri cubiertas de papel estéril. Finalmente, las semillas se colocaron en agar agua al 0.75 por ciento correspondiendo 25 semillas por placa (repetición) y se incubaron en oscuridad por un lapso de 8 horas a 18 °C. Se empleó como control un tubo estéril sin inóculo.

El ensayo se realizó con cuatro repeticiones por tratamiento; considerando dos variedades de quinua y cuatro inoculantes. Los resultados se expresaron en porcentaje de germinación (%G).

3.2.14. Determinación del efecto de shock frío sobre la germinación de *C. quinoa* a nivel de semilla

Para la evaluación de la tolerancia a shock frío se realizaron pruebas en la variedad Kancolla con tres temperaturas y tres tiempos diferentes cada una. Las temperaturas de incubación fueron -5, -6 y -8 °C a 4 horas. El proceso de desinfección se realizó igual que en la etapa de evaluación de calidad de semilla. Al término de la desinfección las semillas se sembraron en agar agar (0.5%) tras lo cual se trasladaron a cámara de fotoperiodo por 8 h, luego de ello se evaluó hora a hora las primeras 12 horas el porcentaje de germinación y la última medición se realizó al término de las 24 h de incubación. Se evaluó un segundo grupo control que se incubó directamente en cámara de fotoperiodo a 15 °C (12 h luz/12 h oscuridad).

3.2.15. Evaluación de las capacidades PGPR a nivel invernadero

a. Determinación del efecto de los inoculantes sobre la emergencia de *C. quinoa* en macetas

Para la preparación de semillas e inóculos se siguió las metodologías mencionadas en la prueba de viabilidad de semillas y germinación. Tras la desinfección las semillas se sembraron directamente en el suelo estéril. Se empleó la variedad Kancolla para el ensayo, considerándose 5 tratamientos; siendo los cuatro primeros tres cepas psicrotolerantes aisladas del suelo de Salcedo-Puno y una cepa control aislada de la región de Junín (LMTK32); el quinto tratamiento consistió en un tratamiento sin inóculo. Se empleó sustrato esterilizado a 121°C a 15 lb.

b. Evaluación a nivel invernadero de dos cepas psicrotolerantes sobre *C. quinoa*

El diseño experimental consistió en un modelo factorial en que los factores tomados en cuenta fueron variedad de semilla, presencia/ausencia shock frío, tipo de inóculo (2 variedades por 2 condiciones shock por 3 tipos de inóculo). La preparación de semillas e inóculos se realizó según lo descrito anteriormente.

Luego de la inoculación se sembraron 10 semillas por repetición, realizando un total de cuatro repeticiones por factor. Las dos variedades de *C. quinoa* utilizadas para los ensayos fueron una sensible al shock de frío (Hualhuas) y otra resistente (Kancolla). Además, se consideraron 3 tratamientos; siendo los dos primeros dos cepas psicotolerantes: una aislada del suelo de Salcedo-Puno (PQLMT01), la otra obtenida del banco de cepas del LEMYB aislada de la región de Junín (LMTK32) y el tercer tratamiento un control sin inóculo. Se empleó suelo estéril (autoclave 121 °C a 15 lb por 30 min en 3 días) como sustrato.

Los parámetros evaluados durante este ensayo fueron número de plantas emergidas, número de hojas (hasta los 15 días de desarrollo), peso fresco, peso seco y porcentaje de humedad; estos tres últimos parámetros se evaluaron al momento de la cosecha de las plantas para someterlas a shock frío (32 días de haber iniciado el ensayo) y a los 3 meses de desarrollo; considerándose además para esta última evaluación la determinación del contenido de nutrientes (N, P, K) de cada uno de los tratamientos.

3.2.16. Evaluación de la producción de metabolitos de las plantas inoculadas bajo condiciones de estrés frío

a. Instalación y mantenimiento de plantas de *C. quinoa* para shock de frío

Se instaló un sistema en macetas con un sustrato esterilizado a 121 °C a 15 lb. El proceso de desinfección e inoculación se realizaron según las metodologías mencionadas en los ensayos de viabilidad de semillas y evaluación del efecto de inoculantes en la germinación. Se incubaron las semillas por un periodo de 8 h a 15 °C para permitir su germinación; tras lo cual se escogieron un total de 100 semillas por tratamiento tomando como factor de selección la longitud de la raíz, la cual debía ser igual o mayor a 0.5cm. Cada maceta tuvo 25 semillas y se instalaron en un ambiente semi-controlado con temperaturas aproximadas de 14 °C (noche) y 18 °C (día) con periodos de luz de 12 h/día.

El riego se realizó con solución hidropónica La Molina de manera inter-diaria empleando 30 a 50 ml por planta de forma uniforme según la temperatura del día

y observación del suelo. A los 15 días de desarrollo de las plántulas se realizó el primer deshije y se colocó varillas de madera estériles como guías para ayudar al soporte aéreo. Una semana previa a la cosecha se deshijó por última vez dejando dos plantas por maceta, una de las cuales se reservó para medir las variables peso fresco y peso seco mientras la segunda planta se derivó para la cuantificación de metabolitos (prolina y fenoles totales).

b. Evaluación del efecto de shock frío en plantas de *C. quinoa*

Para la evaluación de shock de frío se consideró ausencia o presencia de shock para la formación de los grupos: El primer grupo (presencia de shock) se sometió a shock de frío en cámara climática (ICP 450, Memmert-Alemania) por 4h a -6 °C en tanto el grupo control (ausencia de shock) se mantuvo a 18 °C por 4h. El shock de frío se ejecutó en la segunda etapa fenológica de la quinua (35-45 días de desarrollo). Terminado el shock de frío se procedió a cosechar las plantas y a separarlas para la evaluación del contenido de prolina y fenoles totales. Parte de los parámetros evaluados fueron peso fresco y seco de la parte aérea, número de hojas y porcentaje de emergencia en todos los tratamientos desarrollados.

El muestreo de las plantas para las variables peso fresco y peso seco se realizó cortando la parte aérea desde la zona de crecimiento a nivel de suelo. La toma de muestras para la cuantificación de metabolitos para ambos casos se realizó en la segunda planta de la maceta, tomando una muestra compuesta de hojas colectadas de las zonas baja, media y alta. La muestra compuesta de hojas se deshidrató y conservó en nitrógeno líquido, empleando tubos de 2 ml para su reserva. Se conservó un aproximado de 0.1 g de muestra por tubo.

c. Determinación del contenido de prolina

Se siguió la metodología propuesta por Bates *et al.* (1973). Las muestras se trabajaron por separado homogenizando una a una con 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3por ciento (p/v). El residuo se separó por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. Se tomó 500 µl de extracto de hojas y se hizo reaccionar con 500 µl de ácido acético glacial y 500 µl de ninhidrina

(previamente preparada) a 100 °C por una hora. La reacción se detuvo en baño con hielo. El complejo cromóforo-prolina se extrajo con 2 ml de tolueno. El producto se agitó y se llevó a reposo bajo oscuridad por 4 horas. Finalmente, se cuantificó a 520nm en el espectrofotómetro Génesis 10 UV-Vis Thermo Scientific, usando L-prolina para la curva de calibración y tolueno como blanco. Los resultados fueron expresados en µg/g de peso fresco.

d. Determinación del contenido de fenoles totales

Se siguió la metodología propuesta por Koç *et al.* (2010). Se tomó una muestra de hojas y se les adicionó 500 µl de metanol acuoso al 80%. Todas las muestras se sometieron a un baño en ultrasonido (Branson, USA) por 30 min. Luego el extracto se centrifugó por 10 minutos a 10 000 g, mientras que el pellet fue resuspendido en metanol al 80% para realizar una segunda extracción. Para determinar el contenido total se empleó el método de Folin-Ciocalteu. Se tomó 100 µl del extracto a los cuales se adicionó 750 µl del reactivo Folin-Ciocalteu y se homogenizó por 30s y se dejó reposar por 5min en oscuridad. Luego de ello se adicionó a la mezcla 750 µl de solución de Na₂CO₃ (6%). Se dejó reposar por 2h a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 765 nm en el espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific. El contenido total fue expresado en mg/g de peso seco, usando ácido gálico para la curva estándar.

• Análisis de datos de shock frío

Los resultados obtenidos en la evaluación de shock de frío se evaluaron en un diseño factorial empleando el programa Statgraphics (Centurion), donde los factores considerados fueron tipo de inóculo, variedad de semillas, ausencia/presencia de shock. Cada maceta se consideró como una unidad experimental y se contó con cuatro repeticiones por combinación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA MUESTRA DE SUELO

El suelo de los campos de quinua fue colectado durante el mes de junio del año 2015 a partir de una muestra compuesta. La muestra provino de un suelo franco, ácido (pH 6.56), muy ligeramente salino (C.E. 0.43 dS/m), con concentración media de materia orgánica (2.45 por ciento), alto contenido de fósforo disponible (35.9 ppm), alto contenido de potasio disponible (35.2 ppm) y una capacidad de intercambio catiónico de 15.4; esto último evidenció un contenido bajo de nutrientes (Anexo 1, Anexo 6).

Con respecto a las condiciones climáticas durante el 2015, entre los meses de siembra y cosecha y el mes de muestreo (junio), se presentaron temperaturas mínimas entre 1.7°C y 2.3 °C respectivamente y temperaturas máximas entre 14 °C y 16.8 °C (SENAMHI, 2015). Esto favoreció el aislamiento de cepas psicrotolerantes, debido a que las condiciones climáticas favorecen e influyen en la permanencia de las poblaciones de interés (Inglis y Sagripanti, 2006).

4.2. AISLAMIENTO DE CEPAS PSICRÓTROFAS

Para la selección y aislamiento de bacterias psicrótrofas, luego del pre-tratamiento a la muestra de suelo y el aislamiento en placa Petri, se incubó a las mismas en cámara de frío con temperaturas entre 6 °C y 8 °C. Esto debido a que favorecen el desarrollo de los microorganismos capaces de adaptar su sistema a situaciones de estrés frío y mantenerse activas a bajas temperaturas; dado a que son capaces de mantener su funcionamiento básico, presentando cambios en secuencias genéticas, estructuras y ajustes fisiológicos (Sandle y Skinner, 2012).

Se logró aislar un total de 43 cepas psicrótrofas en la muestra. (Tabla 5) capaces de soportar el shock de frío.

4.3. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL SHOCK FRÍO DE BACTERIAS PGPR

De la evaluación de las condiciones de shock de frío, se apreció una baja poblacional luego del shock de frío (31.7×10^9 UFC/ml inicial versus 10.5×10^7 UFC/ml al final del shock). Sin embargo, esta no fue la que se esperaba para casos de condiciones extremas (una caída de 10^3 por lo menos), esto se puede explicar ya que las cepas estudiadas están relacionadas al género *Pseudomonas* que serían capaces de sobrevivir a shock de frío debido a su plasticidad de adaptación a temperaturas extremas (Mishra *et al.*, 2009a). Asimismo el corto periodo de exposición al shock pudo permitir una mayor supervivencia de la población.

Un microorganismo que se desarrolla a bajas temperaturas es capaz de cambiar su composición para adaptarse a las condiciones del ambiente, una evidencia de ello ampliamente documentada es la síntesis de ácidos grasos lo cual insensibiliza al organismo del shock frío y permite su supervivencia en el tiempo tras una restauración de las condiciones ambientales favorables (Yadav *et al.*, 2017; Králová, 2017).

4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS

4.4.1. Caracterización morfológica

A nivel macroscópico se observó que del total de cepas aisladas, los colores de colonia predominante fueron el blanco y amarillo con un porcentaje de 41.9 y 39.5 por ciento respectivamente, seguidos de las tonalidades crema y coral con 16.3 y 2.3 por ciento (una cepa) cada una. Por otra parte, se observó que el 23.3 por ciento eran de colonias opacas mientras que el 76.7 por ciento fueron de colonias traslúcidas. Así también, se pudo observar que las características con mayor presencia en las bacterias aisladas fueron: forma circular (46.5 por ciento), elevación convexa (90.7 por ciento), borde

entero (86 por ciento) y translúcido (76.6 por ciento); mientras que en la característica superficie se observó que hubo una distribución para brillante y rugosa de 69.8 por ciento y 30.2 por ciento respectivamente (Anexo 1).

4.4.2. Caracterización bioquímica

a. Tinción Gram

En la tinción Gram se realizó una segregación por características microscópicas observándose que del total de cepas, el 97.7 por ciento presentaron coloración rojiza propia de las bacterias Gram negativas tras la coloración con safranina, en tanto solo el 2.3 por ciento (PQLMT40) presentó coloración azul propia de las bacterias Gram positivas (Anexo 1, Anexo 2).

b. Prueba KOH

El objetivo de la prueba KOH al 3 por ciento fue el de ratificar los resultados de la tinción Gram. Se observó una relación directamente proporcional entre los resultados obtenidos en la prueba con los de tinción Gram. De las 43 cepas aisladas, solo el 2.3 por ciento resultó KOH negativo mientras que el 97.7 por ciento dio positivo a dicha prueba (Anexo 1, Anexo 2).

4.5. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

a. Crecimiento a diferentes temperaturas

Se evaluó el crecimiento de las bacterias a diferentes temperaturas (6 °C, 15 °C y 28 °C) (Tabla 7). Se observó que el 100 por ciento de cepas lograron desarrollarse a 6 °C manifestando diámetros de crecimiento entre 0.594 y 1.734 cm, donde las cepas PQLMT12, PQLMT26, PQLMT29 y PQLMT32 presentaron el mayor crecimiento con valores de 1.324, 1.734, 1.442 y 1.509cm respectivamente. A la temperatura de 15 °C, todas las cepas manifestaron crecimiento, siendo el 40.91 por ciento del total (18 cepas) las que mostraron el mayor crecimiento con valores entre 1.035 y >2.317 cm (PQLMT03, PQLMT04, PQLMT06, PQLMT08, PQLMT11, PQLMT12, PQLMT13,

PQLMT15, PQLMT16, PQLMT24, PQLMT25, PQLMT26, PQLMT28, PQLMT29, PQLMT30, PQLMT32, PQLMT36, PQLMT41), el 15.91 por ciento obtuvieron valores entre 0.81 y 0.937 cm de diámetro y el 43.18 por ciento restante entre 0.641 y 0.796 cm. Por otra parte, a 28 °C todas presentaron un buen crecimiento, siendo las cepas PQLMT15, PQLMT20, PQLMT25, PQLMT32 las que obtuvieron diámetros >2 cm el resto de cepas presentaron diámetros entre 0.513 y 1.903cm.

Ortiz *et al.* (2017) aislaron bacterias de la rizósfera de maca capaces de crecer a 6, 12, 22 y 28 °C, siendo clasificadas como bacterias del tipo psicrotólicas, ya que estas son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas siendo su óptima entre los 15 y 20 °C. Estos resultados fueron semejantes a los reportados en el presente trabajo por lo que se puede considerar a este grupo como psicrótrofo.

Tabla 5: Crecimiento a tres diferentes temperaturas de cepas psicotolerantes

Cepa	6°C			15°C			28°C		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
PQLMT01	0,563	0,614	0,623	0,595	0,652	0,667	0,632	0,662	0,677
PQLMT02	0,609	0,614	0,64	0,677	0,719	0,641	0,65	0,783	0,886
PQLMT03	0,583	0,747	0,848	0,99	1,079	1,117	0,688	0,957	1,014
PQLMT04	0,604	0,622	0,717	0,829	1,003	1,204	0,716	0,823	0,891
PQLMT05	0,606	0,617	0,661	0,675	0,731	0,78	0,624	0,707	0,771
PQLMT06	0,606	0,788	0,837	1,089	1,691	2,317	0,665	0,816	0,886
PQLMT07	0,598	0,617	0,668	0,68	0,732	0,78	0,609	0,66	0,719
PQLMT08	0,602	0,903	1,038	1,389	1,925	ND	0,631	1,554	1,587
PQLMT09	0,589	0,639	0,67	0,695	0,757	0,789	0,633	0,753	0,785
PQLMT10	0,561	0,598	0,617	0,573	0,6	0,644	0,598	0,623	0,633
PQLMT11	0,573	0,634	0,674	1,52	0,776	ND	0,67	0,791	0,804
PQLMT12	0,595	0,775	1,324	0,754	2,804	ND	0,703	1,259	1,851
PQLMT13	0,731	1,028	1,261	1,255	2,011	ND	0,893	1,831	1,903
PQLMT14	0,534	0,664	0,721	0,679	0,804	0,852	0,661	0,766	0,793
PQLMT15	0,559	0,928	1,078	1,741	1,882	ND	0,995	1,987	2,35
PQLMT16	0,589	0,647	0,993	1,203	1,843	ND	0,698	1,52	1,556
PQLMT17	0,602	0,632	0,677	0,787	0,857	0,918	0,7	0,925	0,976
PQLMT18	0,565	0,574	0,594	0,63	0,658	0,714	0,61	0,702	0,75
PQLMT19	0,562	0,596	0,654	0,735	0,774	0,854	0,606	0,803	0,908
PQLMT20	0,567	0,959	1,076	0,67	0,669	0,715	0,937	1,866	2,3
PQLMT21	0,575	0,638	0,64	0,651	0,705	0,762	0,609	0,651	0,672

...continuación

PQLMT22	0,622	0,656	0,681	0,688	0,821	0,937	0,655	0,764	0,878
PQLMT23	0,555	0,585	0,605	0,643	0,639	0,676	0,632	0,668	0,685
PQLMT24	0,567	0,644	0,683	0,907	0,979	1,035	0,717	1,223	1,288
PQLMT25	0,757	1,12	1,28	1,451	2,007	ND	0,921	2,109	2,206
PQLMT26	0,726	1,335	1,734	1,577	2,321	ND	0,822	0,983	1,013
PQLMT27	0,574	0,593	0,612	0,649	0,69	0,743	0,609	0,715	0,75
PQLMT28	0,596	0,779	0,805	1,096	1,469	ND	0,831	1,35	1,849
PQLMT29	0,593	0,972	1,442	1,504	2,251	ND	0,664	1,003	1,059
PQLMT30	0,547	0,585	0,611	0,938	1,226	1,449	0,582	1,375	1,881
PQLMT31	0,581	0,617	0,675	0,61	0,718	0,796	0,589	0,957	1,214
PQLMT32	0,6	1,163	1,509	1,995	2,762	ND	0,953	2,068	2,153
PQLMT33	0,615	0,643	0,689	0,684	0,749	0,812	0,688	0,74	0,888
PQLMT34	0,62	0,64	0,695	0,58	0,638	0,669	0,611	0,648	0,759
PQLMT35	0,618	0,647	0,713	0,689	0,689	0,712	0,624	0,691	0,775
PQLMT36	0,886	0,943	0,981	1,521	2,179	ND	0,764	1,273	1,327
PQLMT37	0,617	0,692	0,741	0,679	0,748	0,81	0,677	1,099	1,317
PQLMT38	0,622	0,68	0,729	0,644	0,619	0,703	0,638	0,823	0,858
PQLMT39	0,605	0,657	0,711	0,668	0,723	0,768	0,593	0,692	0,815
PQLMT40	0,521	0,59	0,657	0,536	0,599	0,641	0,508	0,513	0,513
PQLMT41	0,73	0,757	0,783	0,852	1,132	1,431	0,667	0,964	1,175
PQLMT42	0,553	0,635	0,7	0,627	0,679	0,734	0,617	0,699	0,802
PQLMT43	0,563	0,669	0,734	0,654	0,699	0,747	0,6	0,705	0,819
LMTK32	0,555	0,647	0,682	0,73	0,789	0,843	0,66	0,815	0,87

Resultados expresados en cm. ND: No determinado debido a su crecimiento irregular.

4.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR A NIVEL *in vitro*

a. Producción de ácido indol-acético (AIA)

La capacidad para producir AIA se evaluó mediante una prueba colorimétrica según la metodología propuesta por Zúñiga (2012). Los resultados demostraron que el 55.8 por ciento de ellas resultaron positivas para esta prueba cuando crecieron a 6 °C, obteniendo valores entre 0.1 y 8.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ de AIA siendo las cepas PQLMT03, PQLMT09 y PQLMT23 las que mostraron un mayor nivel de producción (8.1, 5.8 y 6.2 respectivamente). En tanto a 28 °C, el 48.8 por ciento fueron capaces de producir AIA en un intervalo entre 0.1 y 25.4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$; siendo las cepas PQLMT01, PQLMT03, PQLMT22, PQLMT37 y PQLMT41 las que produjeron los mayores valores entre 14.9 y 25.4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ aproximadamente. Se observó además una disminución directamente

proporcional con la caída de temperatura para la mayoría de cepas (Anexo 1, Anexo 3) (Figura 6).

La producción de fitohormonas durante el proceso de desarrollo de la planta es importante debido a su función como reguladores químicos. Se conocen cinco grupos principales: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico cada una con un mecanismo diferente de control (Taiz y Zeiger, 2006). Sin embargo, las plantas no son las únicas capaces de producir hormonas vegetales. Existe un grupo microbiano capaz de producir algunos tipos de hormonas conocidos como PGP, capaces de sintetizarlo incluso en situaciones de estrés abiótico (Sarkar *et al.*, 2017; Orhan, 2016; Mishra *et al.*, 2010; García *et al.*, 2017). Es por ello que su identificación provee una característica importante al examinar los roles fisiológicos o ecológicos de la cepa y su establecimiento o persistencia en la rizósfera (Cassán *et al.*, 2013). Entre el conjunto de fitohormonas sintetizadas se encuentra el ácido indol-3-acético como una de las de mayor interés tanto por su participación en la fitoestimulación como en la patogenicidad hacia la planta por agentes externos (Ahemad y Kibret, 2014). La capacidad de producción de AIA no se limita a un sólo género o a una sola condición de temperatura, siendo los casos de estudio en situaciones de estrés las de mayor interés.

Es así que estudios como los de Selvakumar *et al.* (2008a, b) en cepas de *Pantoea dispersa* y *Serratia marcescens* se reportan concentraciones de $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $8.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ al incubarse a 4°C y; concentraciones de $3.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $11.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ a 15°C , respectivamente. En *Exiguobacterium acetylicum* 1P se encontraron concentraciones de 10.4, 14.9 y $17.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ cuando se incubó a temperaturas de 4°C , 15°C y 30°C respectivamente (Selvakumar *et al.*, 2010). En cuanto al género *Pseudomonas*, este es un importante componente en la comunidad de la rizósfera y usualmente juega un rol importante en la promoción del desarrollo de las plantas. Esto se debe a su versatilidad metabólica, la cual hace posible desplegar un conjunto de PGP psicotolerantes provenientes de esta especie (Mishra *et al.*, 2010). Ensayos realizados por Selvakumar *et al.* (2011) evidenciaron concentraciones de AIA de $6.74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

$^{1}.\text{día}^{-1}$ y $12.58 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}.\text{día}^{-1}$ a 4°C y 15°C respectivamente para *Pseudomonas lurida*. Mishra *et al.* (2008, 2009a) por su parte reportan la capacidad de producir AIA en cepas de este género: PGERs17 y NARs9 bajo temperaturas de 4°C (1.4 y $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), 15°C (4.2 y $13 \mu\text{g}/\text{ml}$) y 28°C (13.2 y $21 \mu\text{g}/\text{ml}$). Subramanian *et al.* (2015), reportaron dos cepas del género *Pseudomonas* aisladas de los campos experimentales de Chungbuk capaces de producir AIA a 5°C en un rango de 0.3 a $16.39 \mu\text{g}/\text{ml}$. Si bien se evidenció la capacidad de producir AIA a bajas temperaturas, todos los estudios presentaron demostraron que la mayor producción se observó en temperaturas dentro del rango mesofílico (incluyendo el presente estudio). Los resultados obtenidos son directamente comparables con los resultados aquí presentados.

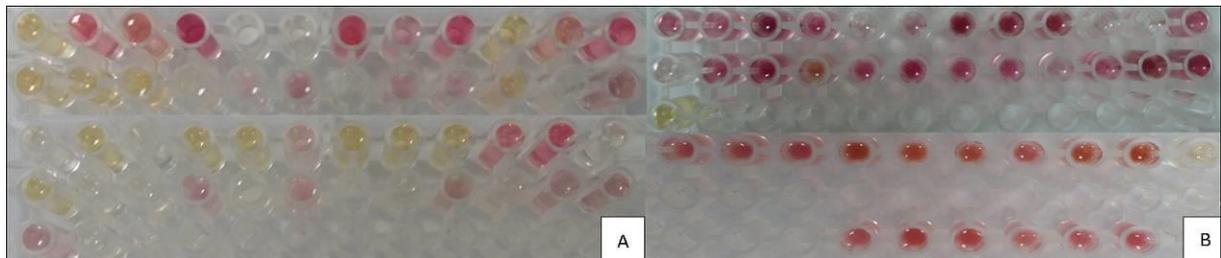


Figura 5: Ensayo de producción de AIA. Resultados tras la reacción con el reactivo de Salkowsky. A: Resultados obtenidos a 6°C . B: Resultados obtenidos a 28°C .

b. Solubilización de sales de fosfato

El fósforo (P) es uno de los nutrientes más limitantes para las plantas sólo después del nitrógeno. Se encuentra en abundancia en el suelo tanto en forma orgánica como inorgánica. Sin embargo su disponibilidad es baja. Esto se debe a que gran parte del fósforo se encuentra en formas insolubles. A pesar de ello, existen microorganismos capaces de solubilizarlo y hacerlo disponible a las plantas. Este proceso puede llevarse a cabo a través de diversos mecanismos, tales como la producción de enzimas o a través de metabolitos secundarios y está regulado principalmente por factores ambientales (Ahemad y Kibret, 2014).

Se evaluó la capacidad solubilizadora de sales de fosfato bicálcico y tricálcico de las diferentes cepas aisladas de los campos de cultivo de la zona EE Salcedo-INIA bajo dos condiciones de temperatura de cultivo (6°C y 28°C). De los 43

aislados, 13 cepas fueron capaces de crecer sobre medio tricálcico capaces de generar halos de solubilización a 6 °C, mientras que a 28 °C, 14 de estas mostraron actividad de solubilización.

Asimismo, el 58.14 por ciento del total de las cepas (25) lograron solubilizar fosfato bicálcico a 28 °C, y el 46.51 por ciento del total (20 cepas) fue capaz de solubilizar fosfato bicálcico a 6 °C. Cabe resaltar que las cepas presentaron mayor actividad a 28 °C, observándose con ello el efecto de las bajas temperaturas sobre el comportamiento psicrótrofo para dicha capacidad (Figura 7).

Del conjunto de bacterias presentes en el suelo que son capaces de solubilizar fosfatos, una gran parte de ellas emplean la producción de ácidos orgánicos como mecanismo principal de solubilización; tales como el ácido cítrico, láctico, malónico entre otros. Asimismo, existen cepas capaces de solubilizar por medio de ácidos inorgánicos siendo los más conocidos el ácido nítrico y sulfúrico. Sin embargo, el mecanismo es el mismo: descenso del pH circundante y en consecuencia la ruptura del complejo fosforado (Bobadilla & Rincón, 2008).

Reportes anteriores describen la capacidad de diversos grupos bacterianos de solubilizar fosfatos a diferentes temperaturas (Yadav *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2016). Estudios anteriores reportan la presencia de cepas psicrótrofas del género *Pseudomonas* provenientes de campos de cultivo de maca en la región de Junín capaces de solubilizar sales fosfato tricálcico, presentando halos de solubilización máximos de 2.5 y 4.5 mm a temperaturas de incubación de 12 °C y 6 °C respectivamente (Ortiz *et al.*, 2017). Pandey *et al.* (2006), reportaron halos de solubilización de fosfato de 16.3 mm a 4 °C y 18.5 mm a 21 °C en una cepa *Pseudomonas putida* (B0) aislada de la región sub-alpina de los Himalaya centrales. Los valores reportados son similares a los reportados en el presente estudio realizado a 6 °C, lo cual reafirma el potencial de las PGPR psicrófilas como inoculantes debido a su capacidad de mostrar actividad solubilizadora a bajas temperaturas.

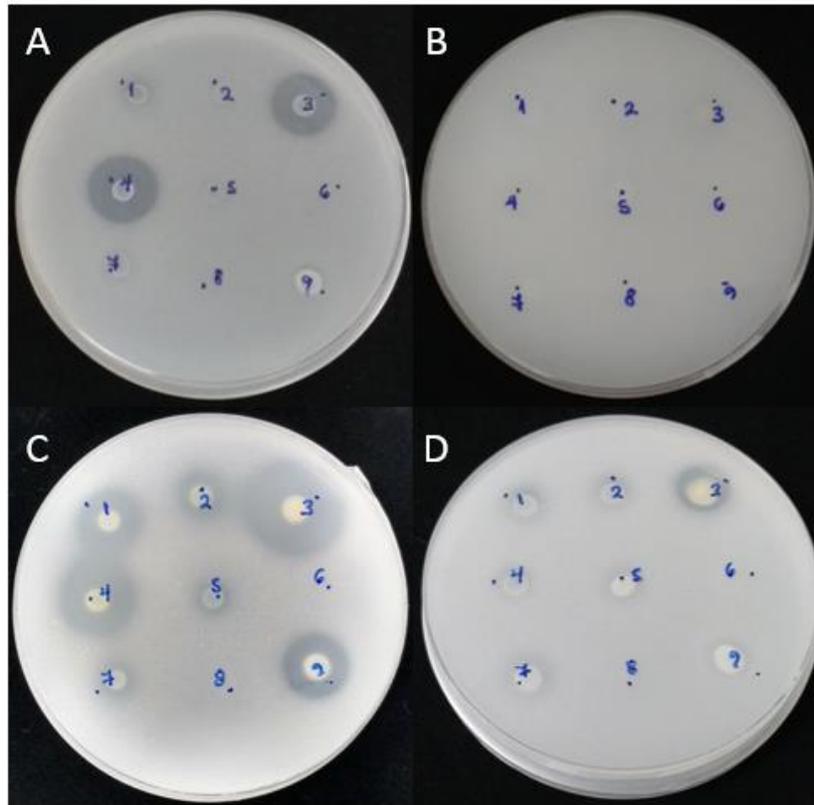


Figura 6: Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas aisladas. A y B: Cepas evaluadas a 6 °C en fosfato bicálcico y fosfato tricálcico respectivamente. C y D: Evaluación a 28 °C en fosfato bicálcico y fosfato tricálcico respectivamente.

c. Crecimiento en medio de cultivo sin nitrógeno

En el suelo, existen grupos de bacterias especializadas capaces no solo de promover el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas o la solubilización de minerales, también tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de generar una relación simbiótica con la planta (García, 2011).

Siendo la capacidad de crecer en medio de cultivo sin nitrógeno una característica de interés; se vio la importancia de evaluar dicha capacidad sobre las cepas (Figura 8). Tras la evaluación en placa Petri a 28 °C, se encontró que del conjunto de cepas evaluadas solo el 86.3 por ciento de las cepas crecieron óptimamente en medio mineral sin fuente de nitrógeno pasados los 3-5 días de incubación. En tanto el 9.8 por ciento del grupo no prosperó en dicho medio

(Anexo 1, Anexo 2).

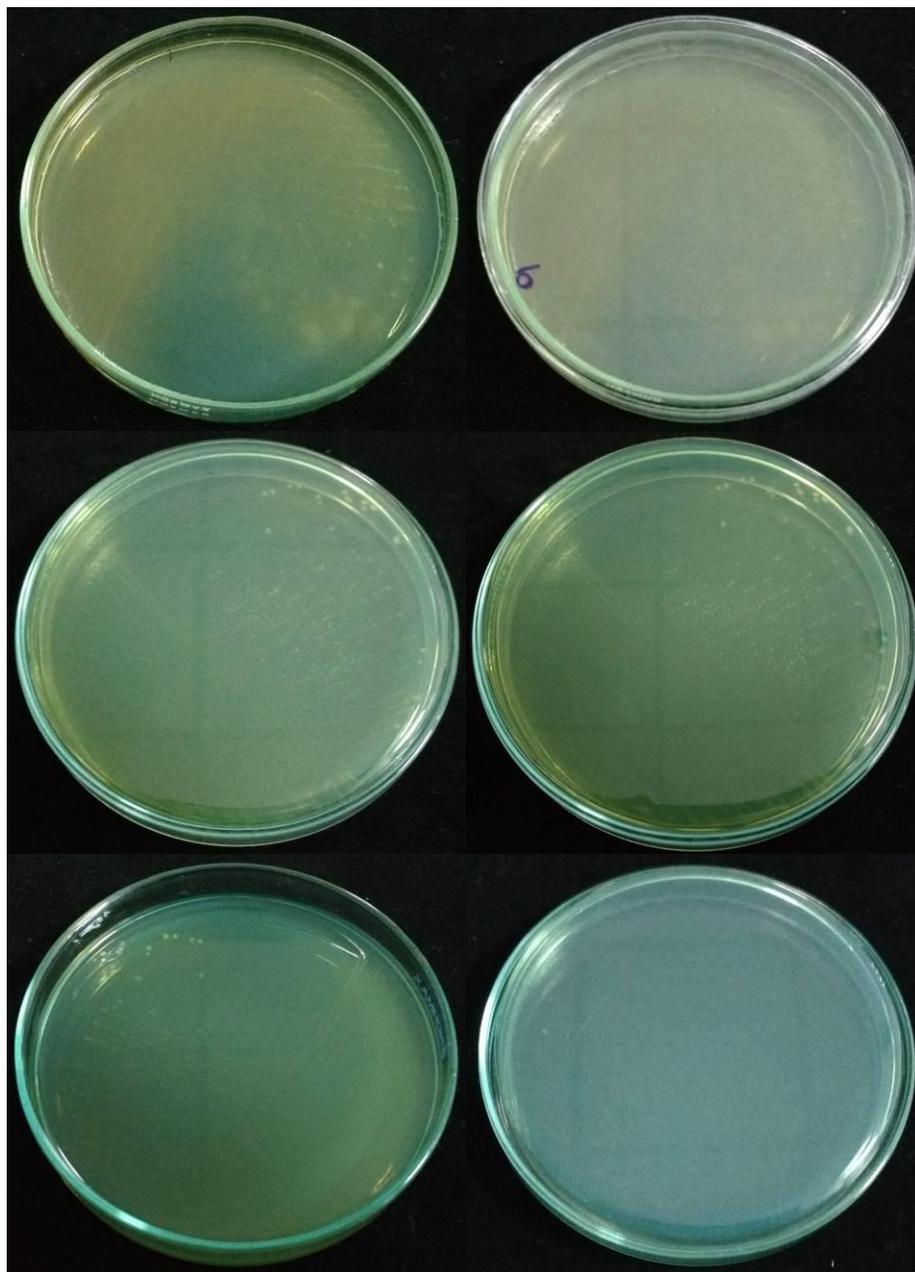


Figura 7: Resultados de la evaluación de crecimiento en medio de cultivo sin.

La capacidad de fijar nitrógeno por bacterias de vida libre ha sido ampliamente estudiada reportando diversos géneros bacterianos, entre ellos *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Kleibsella*, presentes en diferentes cultivos (Park *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2011). Debido a su capacidad se reportan efectos positivos tanto en el aspecto económico como en el medio ambiente (Li *et al.*, 2017).

Autores como Kumar *et al.* (2014) y Simon *et al.* (2014) describen la aparición de bacterias psicrotrofas en ambientes extremos capaces de fijar nitrógeno bajo temperaturas de crecimiento entre 4-10 °C y 10-42 °C respectivamente. Sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales.

d. Consumo de lactosa

La fermentación de lactosa por bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia Enterobacteriaceae con capacidad PGPR se ha visto reportado en varios estudios como los realizados por García, 2011 y Szentes *et al.*, 2011. En un interés por continuar caracterizando bioquímicamente las cepas aisladas se realizó el análisis de crecimiento en medio suplementado con lactosa como única fuente de carbono. Dentro del estudio realizado del total de cepas aisladas de la EE Salcedo-INIA, el 58.1 por ciento de cepas evaluadas resultaron lactosa positivo con coloraciones rosadas claras y oscuras (Figura 9) y el 41.9 por ciento dio negativo para esta prueba (Anexo 1, Anexo 2).

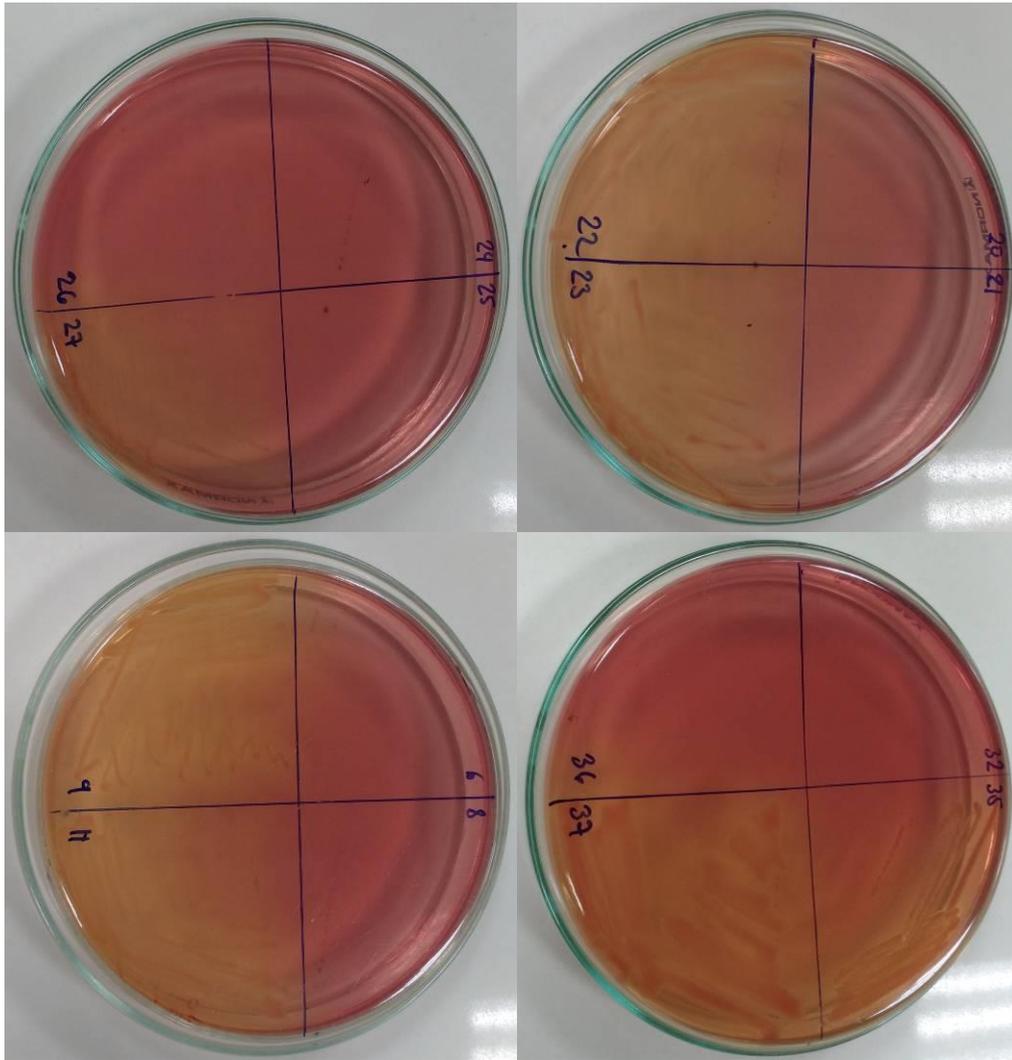


Figura 8: Resultados de la evaluación de consumo de lactosa de algunas cepas evaluadas.

4.7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

4.7.1. Calidad de ADN

Luego de la extracción de ADN se procedió a verificar la calidad de ADN extraído, para lo cual se realizó una electroforesis (Ortiz *et al.*, 2017). En la mayoría de los casos se observaron bandas con *smear* lo que indica un grado de degradación de ADN, sin embargo en la mayoría de los casos se observó una banda de alto peso molecular (Figura 10).

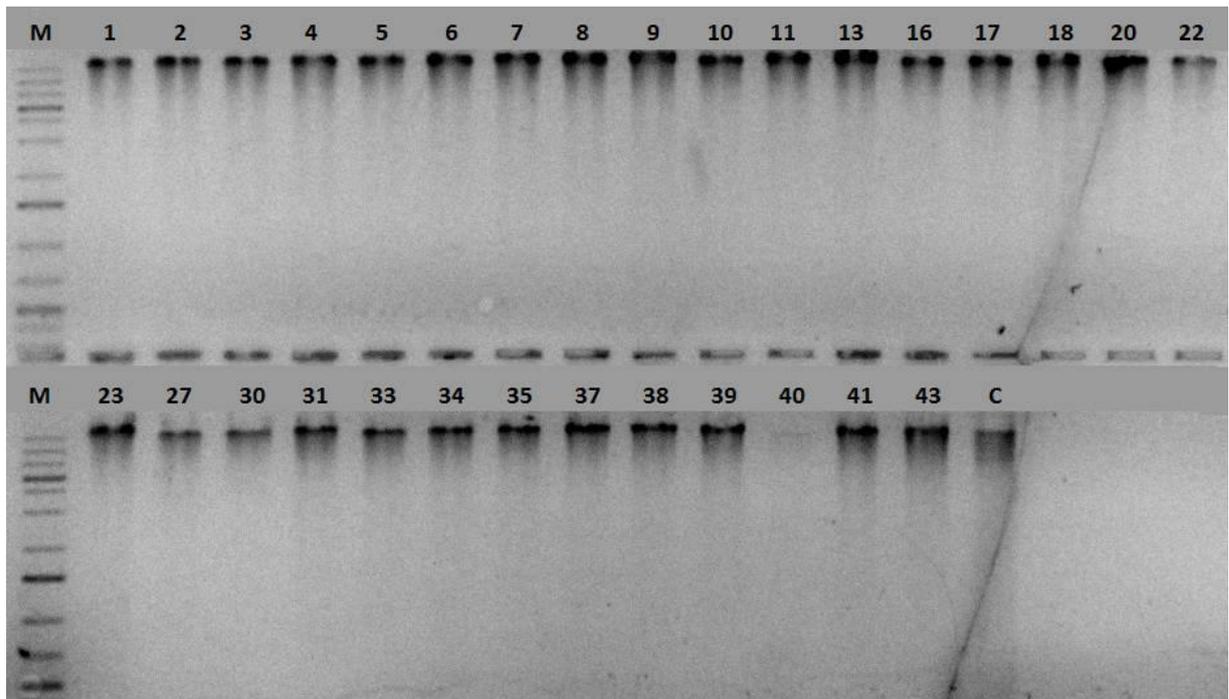


Figura 9: Gel de calidad de DNA. M: Marcador de ADN 1 Kb (Thermo Scientific); Los números representan a las cepas PQLMT con la misma secuencia numérica.

4.7.2. Amplificación BOX-PCR

La diversidad genética de las cepas aisladas de la muestra se analizaron empleando la técnica BOX-PCR (Versalovic *et al*, 1991), que toma en cuenta como sitios de alineación del primer a secuencias que son altamente conservadas y están presentes en múltiples copias en el genoma bacteriano (Lupski ; Weinstock, 1992). El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se encontró entre los 20 000 bp 200 bp. Las diferencias entre aislados fueron evaluadas visualmente basándose en los patrones de migración de las bandas de los productos amplificados.

Según el patrón de bandas se subdividió en perfiles BOX-PCR, según se muestra en la Figura 11. Se obtuvieron en total 24 perfiles BOX-PCR (nominados de la A a la W). El perfil B fue el que más se repitió en el conjunto de muestras (cepas: PQLMT2 y PQLMT19). Los grupos formados fueron: Grupo A: PQLMT01; Grupo B: PQLMT02, PQLMT20; Grupo C: PQLMT03, Grupo D: PQLMT04; Grupo E: PQLMT05; Grupo F: PQLMT08; Grupo G: PQLMT10; Grupo H: PQLMT11, PQLMT12; Grupo I: PQLMT15; Grupo J: PQLMT18; Grupo K: PQLMT19; Grupo L: PQLMT22; Grupo M:

PQLMT23; Grupo N: PQLMT24; Grupo Ñ: PQLMT28; Grupo O: PQLMT31; Grupo P: PQLMT34; Grupo Q: PQLMT35; Grupo R: PQLMT36; Grupo S: PQLMT38; Grupo T: PQLMT39; Grupo U: PQLMT40; Grupo V: PQLMT42; Grupo W: PQLMT44.

Por otra parte, del total de cepas evaluadas solo el 62.8 por ciento de ellas se logró observar en el gel de electroforesis en tanto que para el 37.2 por ciento las condiciones del proceso no fueron las suficientes para su amplificación. Se observó una correlación entre el grupo de muestras sin amplificar con sus características morfológicas. A pesar de no obtener los perfiles de las cepas PQLMT06, PQLMT08, PQLMT12, PQLMT13, PQLMT15, PQLMT16, PQLMT20, PQLMT24, PQLMT25, PQLMT26, PQLMT27, PQLMT28, PQLMT29, PQLMT31, PQLMT32, PQLMT36, PQLMT42; se logró identificar a un grupo de ellas en el ensayo del gen ribosomal 16S.

La cantidad de grupos obtenidos indicaría una gran diversidad de los psicrótrosos aislados, sin embargo fue necesario contrastar esta información con la obtenida en los análisis de identidad utilizando el gen ribosomal 16s (siguiente punto). El uso de la técnica de BOX-PCR permite la diferenciación de los aislados por grupos y entre sus variantes e incluso definir nuevas especies y subespecies como sucede con especies muy emparentadas (Marques, 2008). En casos de ausencia total de bandas, la razón estaría en el DNA degradado o presencia de contaminantes y en el caso de bandas muy tenues podría sospecharse que la temperatura de *annealing* no es la adecuada (Belkum y Hermans, 2001)

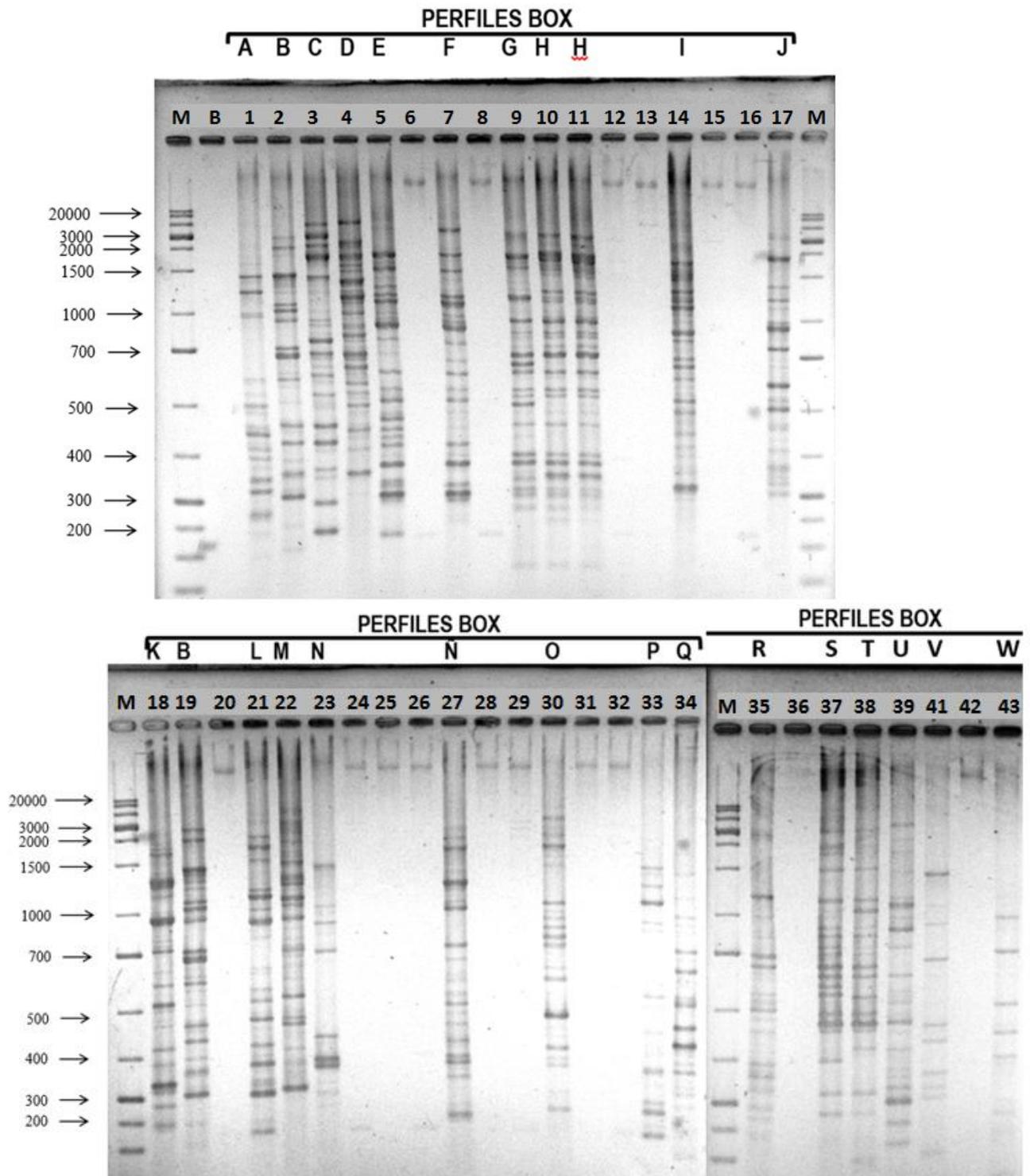


Figura 10: Gel de electroforesis de amplificación BOX-PCR. M: Marcador de ADN 1 Kb (Axygen); Los números representan a las cepas PQLMT con la misma secuencia numérica para los 3 geles. Se presenta el agrupamiento en la parte superior.

4.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

4.8.1. Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S

Se obtuvo un producto de tamaño variable por muestra de 1500 pb aproximadamente tras la amplificación de los oligonucleótidos fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991). Para el análisis de estas secuencias se editaron empleando el programa BioEdit, y se contrastaron con la base de datos disponible en EzBiocloud. Seguidamente, se emplearon las secuencias de las cepas tipo para el alineamiento múltiple y la posterior construcción del árbol filogenético de psicrótrofos. Los árboles filogenéticos NJ (Figuras 13, 14 y 15) evidenciaron que las cepas aisladas tuvieron una relación cercana con los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Kluyvera* o *Serratia*. Dentro del género *Pseudomonas*, la cepa PQLMT35 se relacionó con el grupo de *P. kilonensis*, las cepas PQLMT23 y PQLMT43 se relacionaron con el grupo *P. granadensis* y las cepas PQLMT18 y PQLMT27 con el grupo *P. reidholzensis*. Mientras que las cepas PQLMT14, PQLMT33, PQLMT04, PQLMT07, PQLMT05, PQLMT01, PQLMT22, PQLMT19, PQLMT17 se relacionaron con *P. corrugata*, *P. thivervalensis*, *P. simiae*, *P. mohnii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. helleri*, *P. helmanticensis* y *P. batumici*, respectivamente.

En tanto dentro del género *Flavobacterium*; la cepa PQLMT24 se relacionó con el grupo *F. chilense*, las cepas PQLMT08 y PQLMT16 con el grupo *F. xueshanense*, PQLMT36 con el grupo *F. hercynium*, la cepa PQLMT13 con el grupo *F. frigidimaris*, PQLMT29 y PQLMT32 con *F. piscis*, PQLMT06 con *F. saccharophilum* y las cepas PQLMT28 y PQLMT15 con el grupo de *F. pectnovorum*.

Por otra parte dentro de los géneros *Pantoea*, *Kluyvera* y *Serratia*; las cepas PQLMT03, PQLMT30, PQLMT09 se encuentran relacionadas con los grupos de *P. eucalypti*, *K. cryocrescens* y *S. quinivorans*.

Tabla 6: Resultados obtenidos en la identificación mediante el banco EzBiocloud

Muestra	Especie relacionada	N° acceso	% Similitud
PQLMT01	<i>Pseudomonas koreensis</i>	AF468452	99.85
PQLMT03	<i>Pantoea eucalypti</i>	EF688009	99.86
PQLMT04	<i>Pseudomonas paralactis</i>	KP756923	99.93
PQLMT05	<i>Pseudomonas jessenii</i>	NIWT01000013	99.91
PQLMT06	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	jgi.1107675	99.56
PQLMT07	<i>Pseudomonas umsogensis</i>	NIWU01000003	99.71
PQLMT08	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	jgi.1107675	99.12
PQLMT09	<i>Serratia quinivorans</i>	AJ279045	99.77
PQLMT13	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	jgi.1107675	99.33
PQLMT14	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	AJ936933	97.94
PQLMT15	<i>Flavobacterium collinsii</i>	HE612088	98.16
PQLMT16	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	jgi.1107675	97.74
PQLMT17	<i>Pseudomonas paralactis</i>	KP756923	99.03
PQLMT18	<i>Pseudomonas humanensis</i>	JX545210	99.77
PQLMT19	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	HG940537	99.78
PQLMT22	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	HG940537	99.65
PQLMT23	<i>Pseudomonas granadensis</i>	HG764746	99.86
PQLMT24	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	jgi.1107675	99.38
PQLMT27	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	JX545210	99.78
PQLMT28	<i>Flavobacterium panaciterrae</i>	JX233806	97.1
PQLMT29	<i>Flavobacterium collinsii</i>	HE612088	99.32
PQLMT30	<i>Kluyvera intermedia</i>	BCYS01000084	99.51
PQLMT32	<i>Flavobacterium collinsii</i>	HE612088	99.24
PQLMT33	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	EU391388	99.85
PQLMT35	<i>Pseudomonas mohnii</i>	FNRV01000001	99.37
PQLMT36	<i>Flavobacterium aquidurense</i>	jgi.1107986	99.15
PQLMT43	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	HG940537	98.21

La comparación de las secuencias genéticas 16S rRNA de los aislados con el banco de datos de EzTaxon demostraron que PQLMT01 está relacionada con *P. koreensis*; PQLMT03 con *Pantoea eucalypti*; PQLMT04 y PQLMT17 con *P. paralactis*; PQLMT05 con *P. jessenii*; PQLMT06, PQLMT08, PQLMT13, PQLMT16 y PQLMT24 con *F. saccharophilum*; PQLMT07 con *P. umsogensis*; PQLMT09 con *Serratia quinivorans*; PQLMT14 con *P. humanensis*; PQLMT15, PQLMT29 y PQLMT32 con *F. collinsii*; PQLMT19, PQLMT22 y PQLMT43 con *P. helmanticensis*; PQLMT23 con *P. granadensis*; PQLMT27 con *P. hunanensis*; PQLMT28 con *F. panaciterrae*; PQLMT30 con *Kluyvera intermedia*; PQLMT33 con *P. brassicacearum subsp. Neaurantiaca*;

PQLMT35 con *P. mohnii* y PQLMT36 con *F. aquidurensis*. Los valores de similitud de la mayoría de aislados fueron del 99% o más a excepción de las cepas PQLMT14, PQLMT15, PQLMT16, PQLMT28 y PQLMT43.

Pseudomonas es un género que usualmente se reporta como una PGPR demostrando una diversidad de características como producción de ácido indol-acético, solubilización de fosfato (Meena *et al.*, 2015), producción de sideróforos, producción de HCN (Mishra *et al.*, 2009), control biológico (Negi *et al.*, 2005), entre otros.

Cepas de las especies *P. koreensis*, *P. paralactis*, *P. jessenii*, *P. umsongensis*, *P. hunanensis*, *P. helmanticensis*, *P. granadensis*, *P. brassicacearum* subsp. *Neaurantiaca* y *P. mohnii* fueron inicialmente reportados en Corea (suelo agrícola), leche descompuesta, agua mineral, Corea (suelo agrícola), China (suelo contaminado con manganeso), España (suelo proveniente de bosques), España (suelo), Kiev/Ucrania (suelo agrícola), Alemania (sedimentos de ríos) respectivamente (Kwon *et al.*, 2003; Von Neubeck *et al.*, 2017; Verhille *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2015; Ivanova *et al.*, 2009 y Cámara *et al.*, 2007).

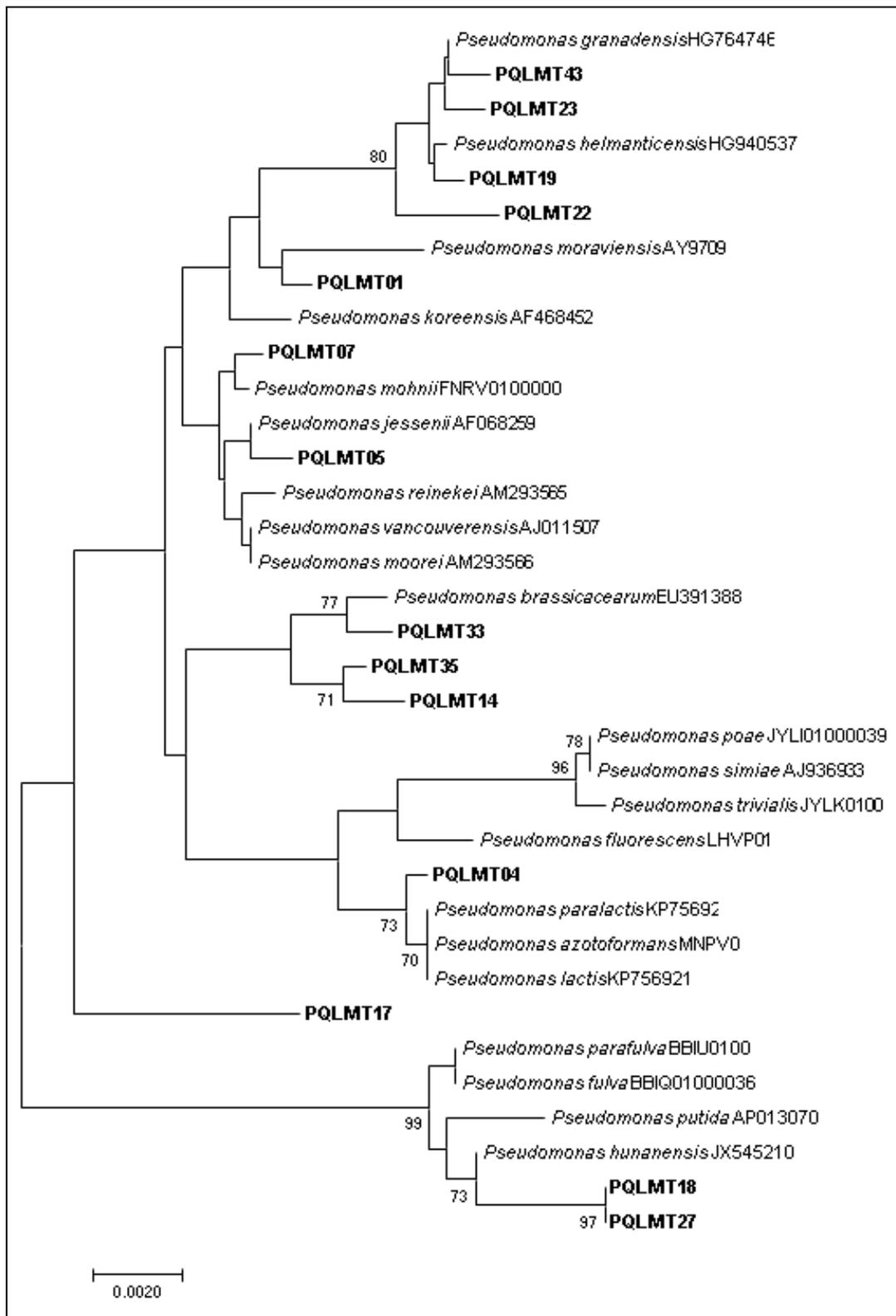


Figura 11: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).

Flavobacterium es un género reportado como una potencial PGPR tanto por su capacidad de promoción vegetal como su tolerancia al frío (Yadav *et al.*, 2015; Soltani *et al.*, 2010). Así también, es un grupo distribuido en más de un tipo de hábitat, pudiéndose encontrar en ecosistemas marinos o en suelos (Van Trappen *et al.*, 2003). Además; según la especie y sus características, *Flavobacterium* ha sido reportado tanto como un microorganismo benéfico de plantas (Soltani *et al.*, 2010) como un patógeno relacionado a peces y humanos (Van Trappen *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2013).

Kluyvera es un género de bacterias Gram negativas, catalasa positivas, capaces de crecer en agar MacConkey, y positivas para la prueba de indol. Su distribución es diversa pudiendo encontrar especímenes clínicos, de suelos, provenientes de agua o aguas residuales. Puede ocasionar infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (Farmer *et al.*, 1981). Sin embargo, se han encontrado especies capaces de promover el crecimiento de plantas.

Especies del género *Serratia* se han encontrado distribuidas en varias fuentes como el suelo, agua, animales y plantas (Ashelford *et al.*, 2002). Se ha reportado que poseen capacidades de incrementar el tamaño de plantas de maíz (Pan *et al.*, 1999), producir ácido indol acético, fijar nitrógeno y solubilizar fosfato (Guevara *et al.*, 2014).

Muchos géneros de la familia Enterobacteriaceae se han descrito como PGP, a pesar de que estos contuvieran especies reportadas como patógenos de plantas y humanos (Jha *et al.*, 2011). Son capaces de solubilizar fosfatos, producir hormonas, enzima deaminasa ACC, sideróforos, entre otras capacidades. (Gupta *et al.*, 2015; Ahemad y Kibret, 2014)

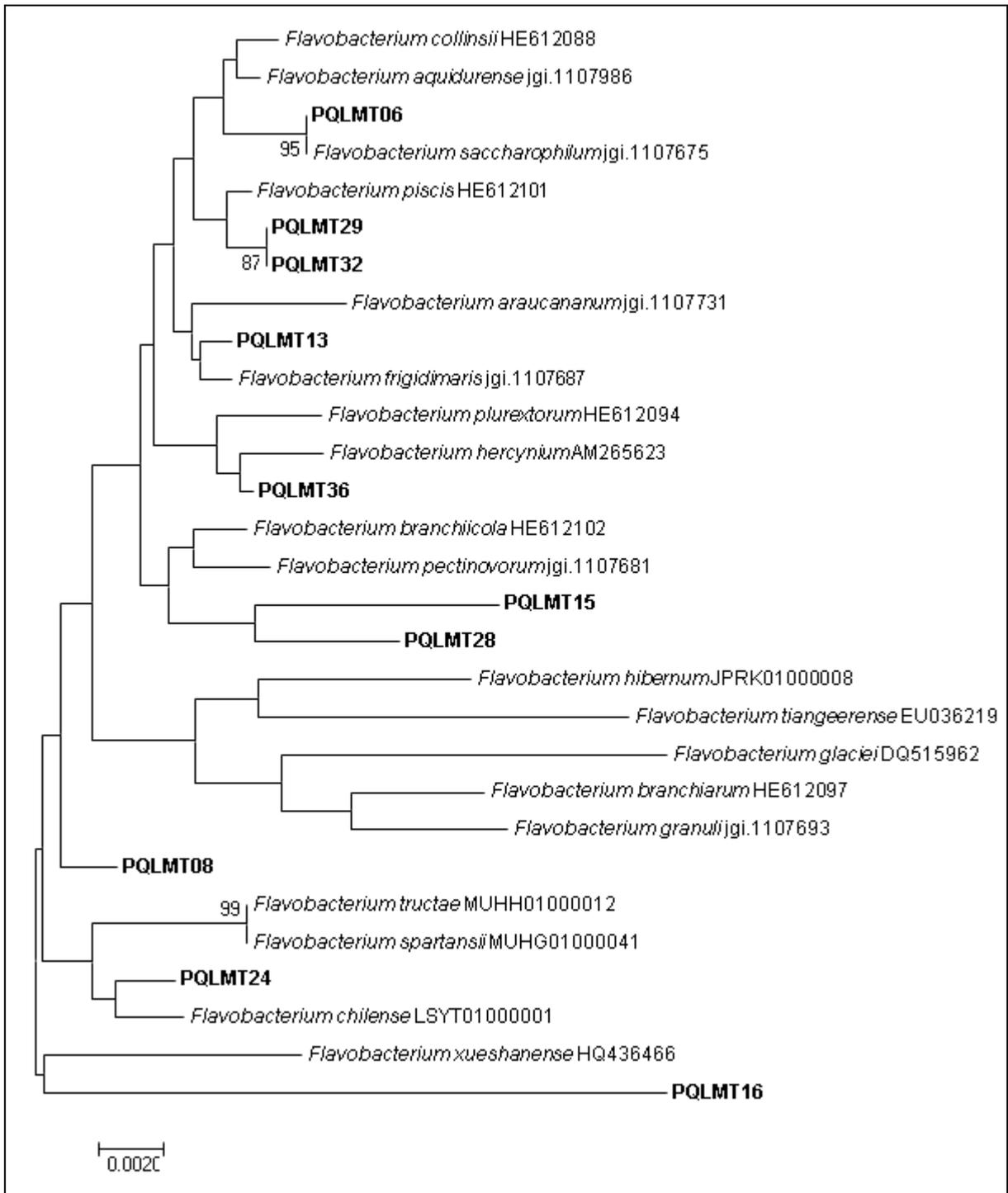


Figura 12: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).

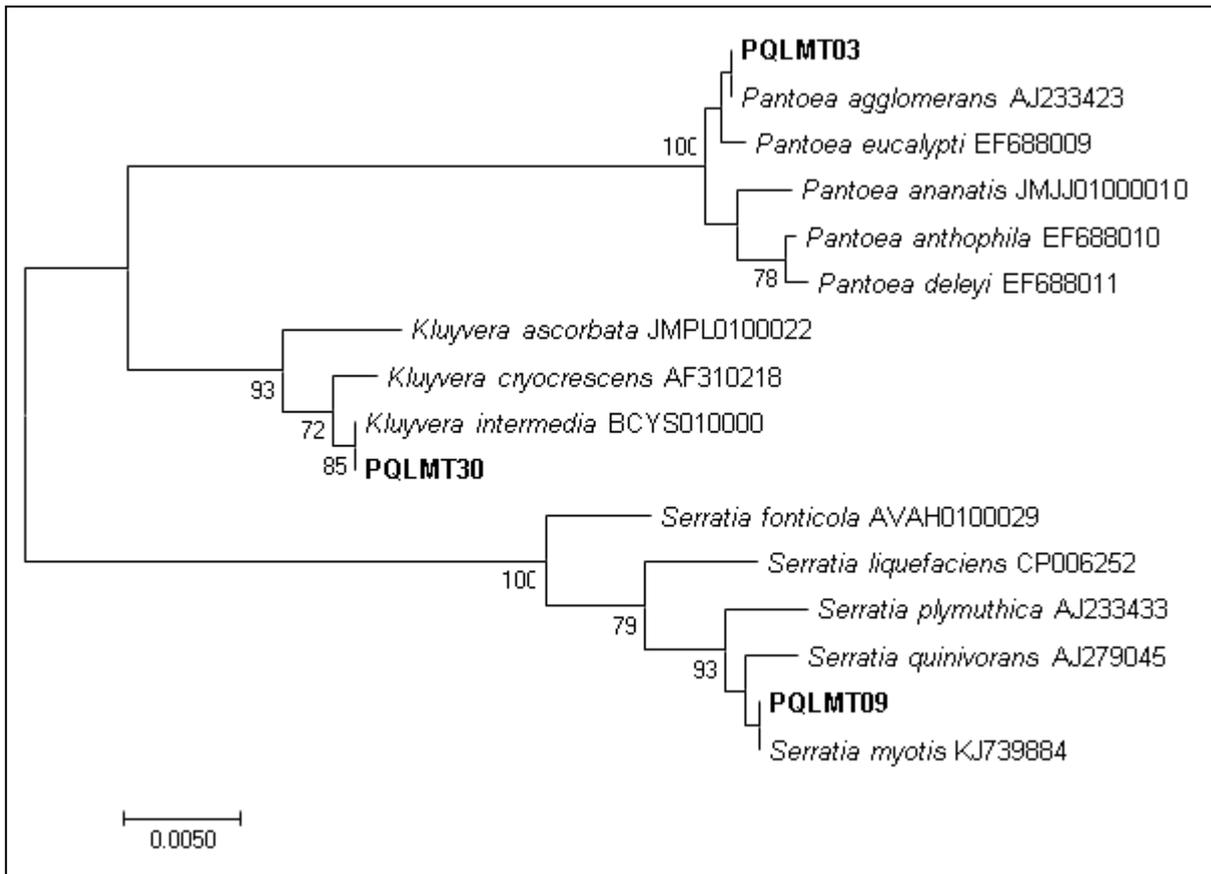


Figura 13: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rDNA de rhizobios. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).

4.9. SELECCIÓN DE CEPAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES

En el análisis UPGMA realizado en función de las características fenotípicas a las cepas aisladas de la E.E. Salcedo-INIA se tomaron en consideración las variables características PGPR: producción AIA, solubilización de fosfato tricálcico y fosfato bicálcico a 6 °C. Con ello se obtuvo el dendograma mostrado en la figura 5. A un 10 por ciento de similaridad, se observó una separación de las cepas en dos grandes grupos, el primer grupo presentaba a las cepas que poseían la capacidad de solubilizar sales de fosfato y el segundo grupo contuvo a las cepas que no presentaron dicha capacidad. A un 75 por ciento de similaridad se observó la formación de 15 grupos de cepas correspondiendo el primer grupo (Grupo I) al conjunto que presentaba las mejores

características fenotípicas de producción de AIA, SFT y SFB. Dentro de dicho grupo se encontraron las cepas PQLMT01, PQLMT03, PQLMT22 y PQLMT23.

Mediante esta agrupación se pudo seleccionar el conjunto de cepas con mejores características (Grupo I) que se procederían a contrastar con la información obtenida en el análisis molecular y seleccionar así una cepa para el ensayo de shock frío en macetas. A 75 por ciento de similaridad las cepas del grupo I (Figura 15) presentaron valores entre 25 y 57 $\mu\text{g/ml}$ de AIA, 74 y 232 por ciento de eficiencia de solubilización de fosfato bicálcico, y 44 y 191 por ciento de eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico

Si bien se deseaba estudiar cepas con las mejores características PGPR, se decidió evitar la selección de cepas relacionadas a especies reportadas con efectos de patogenicidad (plantas o humanos); por lo que al contrastar los resultados obtenidos en el dendograma con los análisis de secuencias y generación de árboles filogenéticos, se encontró que a 27 por ciento de similaridad el primer grupo contuvo a varias cepas con buenas características PGPR y que se encontraban relacionadas a varias especies del género *Pseudomonas* reportadas en la promoción de crecimiento vegetal (PQLMT01, PQLMT22, PQLMT33, PQLMT03, PQLMT23, PQLMT44, PQLMT09, PQLMT11). La cepa control LMTK32 no se consideró en el análisis debido a que su selección se debió a los resultados obtenidos en estudios anteriores (Ortiz, 2013; Liceta, 2015). Del conjunto de cepas se tomó la decisión de continuar algunos estudios tomando a las cepas PQLMT01, PQLMT18 y PQLMT35.

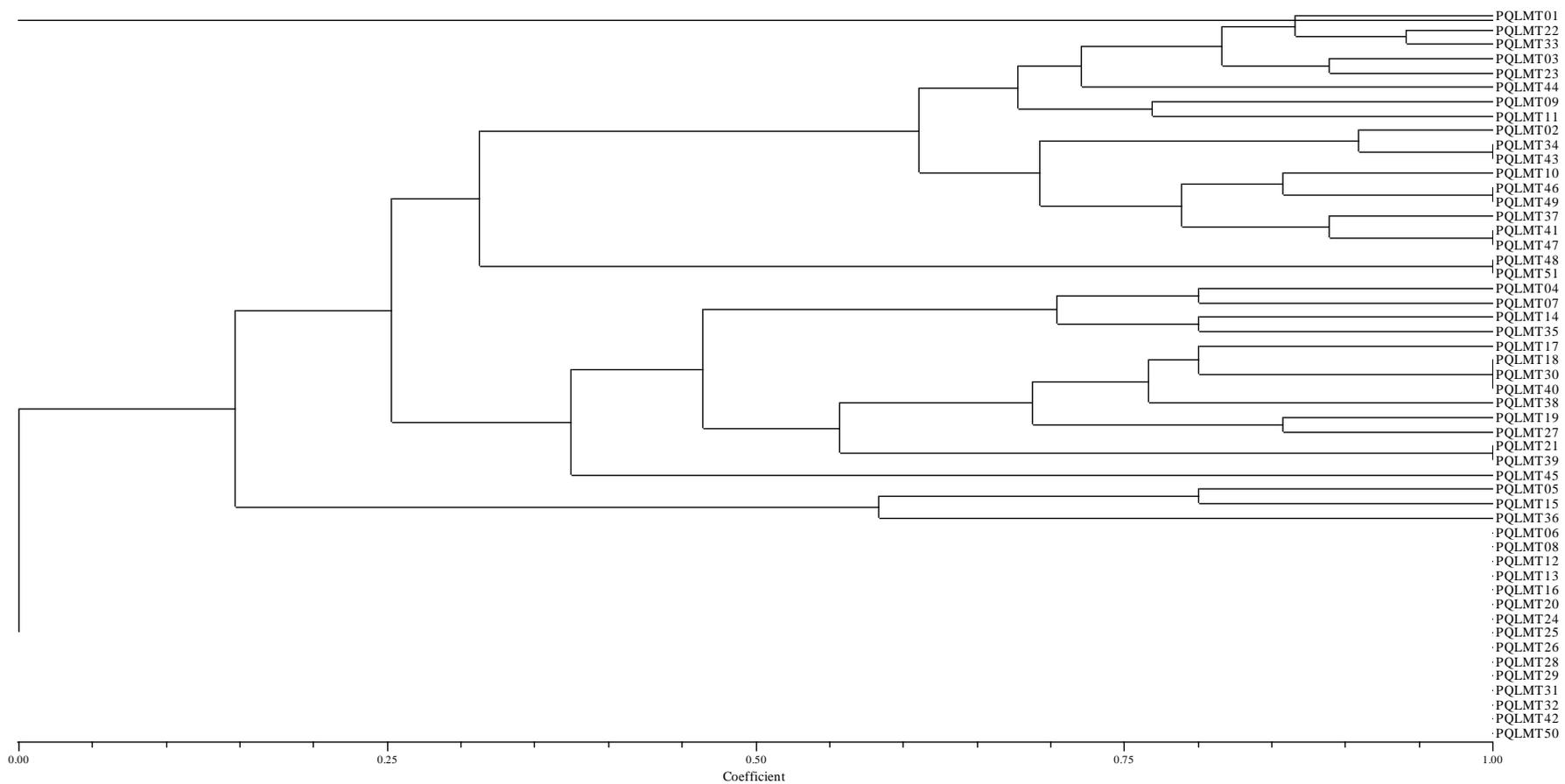


Figura 14: Análisis UPGMA de las características fenotípicas PGPR: ácido indol acético y solubilización de fosfato. Método de agrupamiento: UPGMA; Coeficiente de Similaridad de Jaccard.

4.10. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS PGPR PSICROTOLERANTES SOBRE *C. quinoa* A NIVEL *in vitro*

4.10.1. Evaluación de la calidad de semilla

Se evaluó la viabilidad de las semillas de las variedades Kancolla y Hualhuas. Los lotes empleados presentaron porcentajes de viabilidad del 80-90 por ciento y el tiempo de germinación estuvo alrededor de las 6-8 horas a una temperatura de 14 ± 2 °C

4.10.2. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles sobre la germinación de *C. quinoa*

En la determinación del porcentaje de germinación por acción indirecta de las cepas aisladas; las cepas provenientes de la E.E. Salcedo-INIA presentaron diferencias significativas (P value = 0.0000), siendo los tratamientos PQLMT33, PQLMT34, PQLMT35 y PQLMT36 los que mostraron ser superiores respecto al control sin inóculo (45.31 por ciento), con valores de 67.19 por ciento, 76.56 por ciento, 79.69 por ciento y 87.5 por ciento respectivamente. En cuanto al parámetro peso fresco las cepas PQLMT35, PQLMT33 y PQLMT18 resultaron ser significativamente diferentes y superiores respecto al control, el cual presentó un peso fresco de 0.29 g mientras que los tratamientos obtuvieron pesos de 0.34, 0.35 y 0.37g respectivamente. No se registraron diferencias significativas para el parámetro peso seco (Anexo 1, Anexo 4 y Anexo 5).

Durante la evaluación hora a hora se evidenció en la séptima medición que un mayor número de tratamientos lograron superar al control sin cepa (15 tratamientos en total). En tanto que a partir de la décima medición los tratamientos fueron asemejándose al control (Anexo 1, Anexo 5)

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) poseen la capacidad de estimular e incrementar el crecimiento de plantas y activar su sistema de defensa contra patógenos microbianos (Ryu, C. *et al.*; 2003). Entre los compuestos reportados como COV se encuentran el 2,3-butanediol, acetoina, 2-pentilfurano, dimetilhexadecilamina, entre

otros. Asimismo se ha reportado que algunos COV producen retrasos en la germinación o crecimiento e incluso la muerte (Bailly y Weisskopf, 2012).

Este efecto se pudo evidenciar en las cepas PQLMT21 y PQLMT23 que mostraron un retraso en la germinación respecto al control y al resto de tratamientos (Anexo 1, Anexo 5).

Asimismo se debe considerar que la producción de compuestos orgánicos volátiles genera un sistema de interacciones complejas microorganismo-planta que involucra tanto el contenido nutricional del cultivo en el sustrato probado, como el tipo de microorganismo que produce los COV (Bailly y Weisskopf, 2012).

4.10.3. Evaluación de la germinación *in vitro* de semillas inoculadas de *C. quinoa*

La germinación se llevó a cabo evaluando cada hora a partir de la octava hora de incubación. En la Figura 16 se observó el efecto de los tres tratamientos en el porcentaje de germinación de semillas, los cuales resultaron ser superiores respecto al control sin inóculo. Cabe mencionar que se observó este efecto a la séptima hora de evaluación. Cuando la evaluación se realizó a las 24 horas de incubación se observó que entre el 85 a 100 por ciento de las semillas inoculadas se encontraba germinada, incluyendo el control por lo cual no evidenció diferencias entre tratamientos en dicho momento.

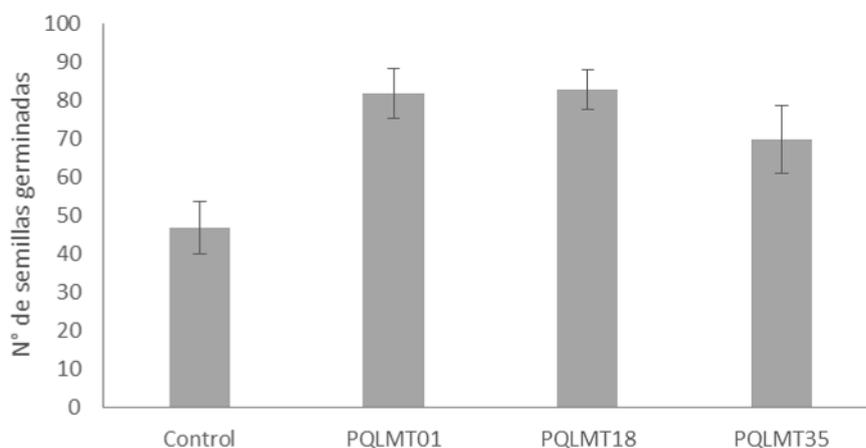


Figura 15: Porcentajes de germinación en *C. quinoa* bajo cuatro tratamientos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son comparables con los obtenidos por Mishra *et al.* (2009) donde reportaron incrementos en el porcentaje de germinación luego de la inoculación con una cepa perteneciente al género *Pseudomonas*.

4.11. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SHOCK DE FRÍO SOBRE LA GERMINACIÓN DE *C. quinoa* A NIVEL DE SEMILLA

Se evidenció un efecto del shock de frío en el tiempo de germinación donde los tratamientos sometidos a shock mostraron un retraso en la germinación en las tres temperaturas respecto al tratamiento control (Figura 17). Sin embargo, luego del shock las semillas se llevaron a fotoperiodo donde se observó que el proceso de germinación y el porcentaje de este no se vieron afectados llegando en muchos casos a observarse un 100 por ciento de semillas germinadas.

Bois *et al.* (2006) reportaron un decrecimiento de la germinación en distintas variedades de *C. quinoa* al evaluar el efecto de la temperatura sobre esta, donde el retraso obtenido fue entre 11 a 22 horas cuando las semillas fueron sometidas a 5 y 2 °C respectivamente. Así también mencionan que el efecto del frío no afecta el proceso de germinación, lo cual podría ser producto de la selección de variedades cultivadas de *C. quinoa*, las cuales son seleccionadas por su versatilidad.

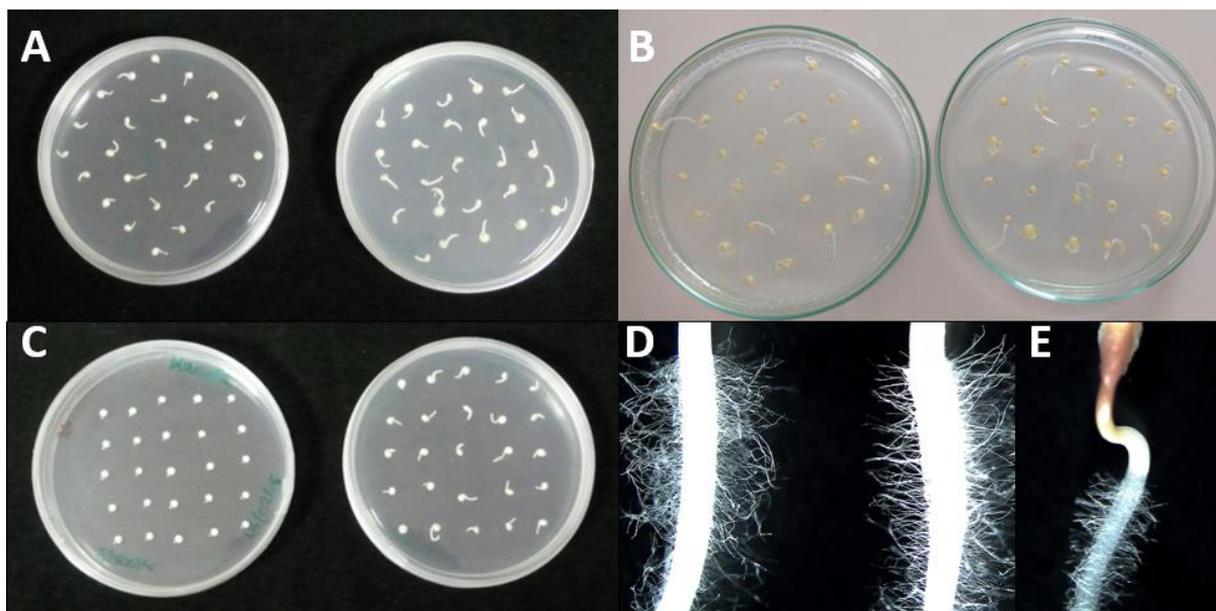


Figura 16: Evaluación del efecto 3 temperaturas de shock frío sobre la germinación y desarrollo de semillas *C. quinoa* var Kancolla. A: Shock a -5°C . B: Shock a -6°C . C: Shock a -8°C . D: Observación al estereoscopio del efecto del shock a -5°C , izq.: shock, der.: sin shock. E: Semilla sometida al shock de frío -8°C

Por otra parte se evidenció una diferencia en el desarrollo de la raíz y sus características presenciando vellosidades uniformes en las semillas control (sin shock) y un mayor engrosamiento (Figura 17, D y E) de las raíces. Sin embargo esto se debería a que el grupo control germinó mucho antes que los grupos sometidos a shock lo que le permitió un desarrollo normal y más rápido que el resto.

4.12. EVALUACIÓN DE LAS CAPACIDADES PGPR A NIVEL INVERNADERO

4.12.1. Determinación del efecto de los inoculantes sobre la emergencia de *C. quinoa* en macetas

En este ensayo se observó que la variedad Kancolla alcanzó un mejor porcentaje de emergencia para los tratamientos PQLTM01 (18 por ciento) y LMTK32 (15 por ciento) respecto al control sin inocular (12 por ciento) a los 3 días de instalado el ensayo.

4.12.2. Evaluación a nivel invernadero de dos cepas psicotolerantes sobre *C. quinoa*

Se observó un efecto de los inoculantes microbianos utilizados en los parámetros peso fresco y seco de la parte aérea a los 32 días. En cuanto a los inóculos PQLMT01 y LMTK32, estos fueron capaces de incrementar el peso fresco de las plantas de quinua de la variedad Kancolla respecto al control sin inocular. Además los resultados mostraron que la variedad Hualhuas inoculada con ambas cepas incrementaron el peso fresco y seco respecto al control. Cabe destacar que para ambas variedades, la cepa LMTK32 incrementó significativamente el peso fresco de la parte aérea (Tabla 7).

Tabla 7: Evaluación del efecto PGPR sobre plantas de *C. quinoa* a los 32 días de desarrollo

Tratamiento	Peso fresco	Peso seco
Kancolla	17.074 a	3.655 a
Kancolla_PQLMT01	24.49 b c d	4.718 b c
Kancolla_LMTK32	28.348 d	5.385 c
Hualhuas_PQLMT01	21.983 b	4.093 a b
Hualhuas	24.31 b c d	4.358 a b
Hualhuas_LMTK32	26.428 c d	5.018 b c

El resto de plantas fueron cosechadas 2 meses después de la primera evaluación; observándose que en la variedad Kancolla mostró diferencias significativas en las plantas inoculadas con la cepa PQLMT01 y LMTK32 tanto en peso fresco (24.5 y 28.3 g respectivamente) como en peso seco (4.7 y 5.4 g respectivamente) comparado al control sin inocular (17 y 3.7 g). En cuanto a la variedad Hualhuas se observó que existe una tendencia de la cepa LMTK32 en incrementar el peso fresco (26.4 g) y seco de la parte aérea (5 g), respecto al control (24.3 y 4.4 g) (Tabla 8).

Tabla 8: Evaluación del efecto PGPR sobre plantas de *C. quinoa* a los 2 meses de desarrollo

TRATAMIENTO	PESO FRESCO	PESO SECO
Kancolla	1.311 a	0.06 a
Kancolla_PQLMT01	1.715 a b c	0.078 a
Kancolla_LMTK32	2.279 c d	0.137 a b
Hualhuas	2.138 b c d	0.123 a b

...continuación

Hualhuas_PQLMT01	2.415	c d	0.144 a b
Hualhuas_LMTK32	4.346	e	0.235 c

Por otra parte, se evaluó el contenido de nutrientes de la parte aérea de ambas variedades de quinua, observándose un incremento en el contenido de nitrógeno en las plantas inoculadas en comparación a los controles sin inocular. Además los análisis registraron un incremento en el contenido de fósforo para ambas variedades cuando estas fueron inoculadas con la cepa PQLMT01 con respecto al control (Tabla 9). Asimismo, al evaluar los resultados obtenidos en el análisis del contenido de potasio, la variedad Kancolla inoculada con PQLMT01 y LMTK32 y Hualhuas inoculada con la cepa LMTK32 mostraron mayores porcentajes de dicho nutriente en comparación a sus respectivos controles (Tabla 9).

Tabla 9: Evaluación del efecto PGPR en el contenido de nutrientes en las variedades de quinua Kancolla y Hualhuas

Tratamiento	Nitrógeno (N%)	Fósforo (P%)	Potasio (K%)
K01	3.045b	0.465d	3.545d
K32	3.525d	0.375a	3.395c
KN-	2.835a	0.435c	2.585a
H01	3.575e	0.405b	3.345b
H32	3.635f	0.385a	3.745e
HN-	3.115c	0.375a	3.405c

4.13. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE LAS PLANTAS INOCULADAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS FRÍO

4.13.1. Determinación del contenido de Prolina y Fenoles Totales

La prolina es un aminoácido sensible a los efectos del estrés abiótico, sobre todo en situaciones de desecación, sequía y congelamiento (todas muy relacionadas al estrés hídrico de plantas) donde su principal función es evitar la pérdida de líquido dentro de la planta actuando como osmolito y fuente de nutrientes (Jacobsen *et al.*, 2005) por lo cual se convierte en un indicador directo de la resistencia al estrés.

Luego de la cuantificación de prolina se realizó un análisis estadístico en el cual se analizó el efecto del shock y el inoculante sobre el contenido del metabolito. Respecto a ello, se evidenció una diferencia significativa en la variedad Kancolla inoculada con la cepa PQLMT01 respecto al control. Observándose un incremento de este metabolito en todos los tratamientos sometidos al shock de frío, independientemente de la variedad (Figura 18).

Estos resultados fueron coherentes con lo reportado por Theocharis *et al.* (2012) y Jacobsen *et al.* (2005), quienes reportan incrementos en el contenido de prolina en cultivos de vid y quinua luego de ser sometidos a condiciones de frío bajo temperaturas de 4 y -4 °C respectivamente.

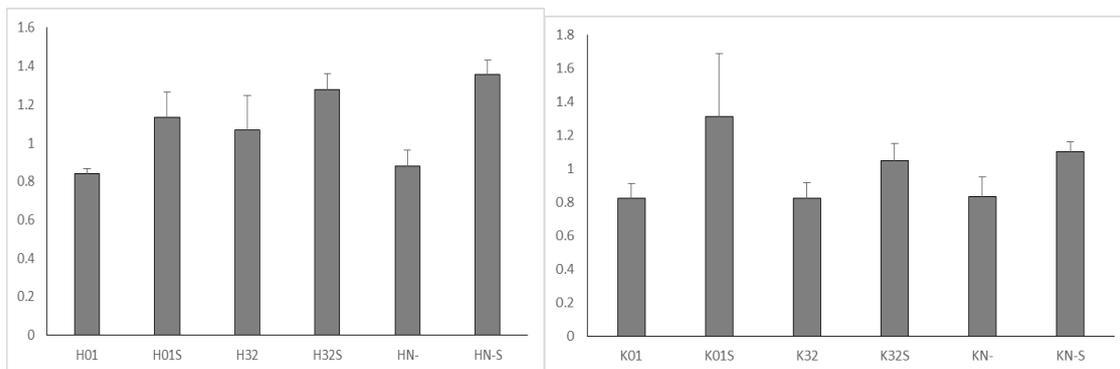


Figura 17: Evaluación del efecto de la inoculación y el shock frío sobre el contenido de prolina para dos variedades de quinua. Contenido de prolina expresado en mg/g peso tubo. S: Shock

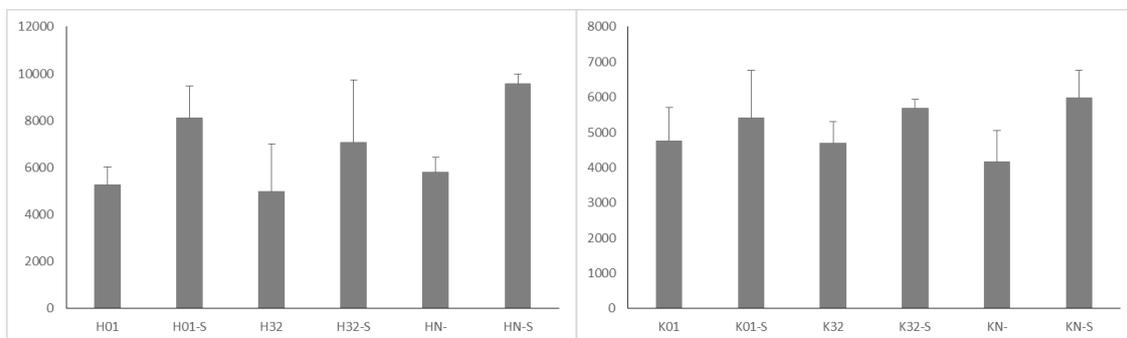


Figura 18: Evaluación del efecto del inóculo y shock de frío sobre el contenido de fenoles totales en dos variedades de quinua. Valor de contenido de fenoles totales expresado en mg/g peso seco.

Dentro de los mecanismos de defensa contra el estrés abiótico y biótico, los fenoles son uno de los compuestos más estudiados, sin embargo los mecanismos y productos genéticos que los regulan en sistemas de interacción planta-microorganismo no se encuentran aún muy bien establecidos (Ait Barka *et al.*, 2006)

Al analizar el contenido de fenoles totales no se encontraron diferencias entre los tratamientos, sin embargo se evidenció un incremento en todos los tratamientos luego de ser sometidos a shock frío para ambas variedades (Figura 23).

Un estímulo negativo como la caída de temperatura es capaz de estimular la producción de diversos metabolitos entre los que se encuentran los fenoles, prolina, azúcares, entre otros (Jacobsen *et al.*, 2005).

Un cultivo como la quinua es capaz de producir durante todo su desarrollo compuestos fenólicos antioxidantes (Graf *et al.*, 2015; Abderrahim *et al.*, 2015), incluso en situación donde el estrés es mínimo. Por lo cual el análisis de éste no es la mejor opción a tomar en cuenta como metabolito indicador de crioprotección.

Por otra parte la variedad del valle interandino, Hualhuas, se reporta como una variedad sensible a heladas, cuyo desarrollo se ve afectado a temperaturas bajas (FAO e INIA, 2013). Ello podría explicar la gran variabilidad del contenido de fenoles en planta, así como una interferencia del efecto de la planta respecto al efecto del microorganismo.

V. CONCLUSIONES

1. El shock frío ocasionó una baja poblacional de 10^2 respecto a la población inicial, por lo que el efecto del frío en dichas bacterias no fue drástico, pudiéndose considerar como tolerantes al frío.
2. Se aislaron un total de 43 cepas psicrótrofas en las muestras de suelo analizadas, capaces de resistir condiciones de shock frío.
3. Todas las cepas fueron capaces de crecer a 6, 15 y 28°C observándose que la mayoría de las cepas tiene un mayor crecimiento en diámetro a 15°C.
4. La caracterización molecular del total de cepas aisladas utilizando la técnica de BOX-PCR mostró 24 perfiles diferentes, evidenciándose así una buena diversidad de microorganismos psicotolerantes para las muestras analizadas.
5. El análisis del gen 16S rRNA mostró que las cepas aisladas estaban relacionadas con los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Kluyvera* y *Serratia*; siendo los más predominantes los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*.
6. Se observó que más del 50 por ciento de bacterias aisladas fueron positivas para las pruebas bioquímicas para PGPR como producción de AIA, Solubilización de fosfatos y al crecimiento en medio sin nitrógeno.
7. Se determinó la capacidad PGPR de las cepas PQLMT33, PQLMT34, PQLMT35 y PQLMT36 en la germinación de semillas por agentes volátiles, resultando significativamente superiores al control sin inóculo.
8. Las cepas PQLMT01, PQLMT18 y PQLMT35 mostraron una mejora en el porcentaje de germinación de quinua mayor al del control sin inóculo a las 7 h de instalado el ensayo.
9. El contenido de prolina fue superior en los tratamientos sometidos al shock frío en la variedad Kancolla y Hualhuas.
10. Los tratamientos inoculados con las cepas PQLMT01 y LMTK32 fueron superiores a los controles para la variable peso fresco en las variedades de quinua Kancolla y Hualhuas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Cuantificar el contenido de ácido indol acético mediante el uso de HPLC.
2. Evaluar la temperatura de shock de frío ideal para la evaluación del efecto de la temperatura sobre plántulas desarrolladas *In vitro* en sustrato de tierra de chacra.
3. Evaluar la supervivencia de las plántulas inoculadas y sin inocular tras el shock de frío.
4. Evaluar el efecto del shock de frío en los parámetros de planta como fruto, altura de planta, rendimiento, entre otros tras la aclimatación.
5. Realizar pruebas de campo a condiciones de heladas para evaluar el efecto de la inoculación de las bacterias PQLMT01 y LMTK32 en la resistencia de *C. quinoa*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abderrahim, F.; Huanatico, E.; Segura, R.; Arribas, S.; Gonzales, M.; Condezo-Hoyos, L. Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano. *Food Chemistry*. 183: 83-90
- Ahemad, M.; Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. 26 (1):1-20
- Anzuay, M.S.; Angelini, J.G.; Ludueña, L.; Fabra, A.; Taurian, T. 2013. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento de plantas de maní en ensayos en microcosmo. XXVIII Jornada Nacional de Maní (en línea). Argentina. Consultado 13 may 2015. Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/efecto-de-la-inoculacion-de-bacterias-solubilizadoras-de-fosfatos-sobre-el-crecimiento-de-plantas-de-mani-en-ensayos-en-microcosmo>
- Ashelford, K.; Fry, J.; Bailey, M.; Day, M. 2002. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinivora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:2281-2289
- Bailly, A.; Weisskopf, L. 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth. *Plant Signaling & Behavior*. 7(1): 1-7
- Bates L.S., Waldren R.P., Tears I.D. 1973. Rapid determination of free proline in water stress studies. *Plant and Soil*, 39:205–207

- BCRP. 2015. PUNO: Síntesis de Actividad Económica Enero 2015 (en línea). Consultado 15 jun 2015. Disponible en <http://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Puno/2015/sintesis-puno-01-2015.pdf>
- Beltrán, M. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15(1): 101-113
- Beneduzi, A.; Ambrosini, A.; Passaglia, L. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35(4): 1044-1051
- Bisht, S.; Joshi, G.; Haque, S.; Mishra, P. 2013. Cryotolerance strategies of Pseudomonads isolated from the rhizosphere of Himalayan plants. *Springer Plus* 2(1):667
- Cámara, B.; Strömpl, C.; Verbarq, S.; Spröer, C.; Pieper, D.; Tindall, B. 2007. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International Journal Syst Evol Microbiol*. 57(5): 923-931
- Carlos, G. 2010. Las Heladas en el Perú y el Mundo. Monografía (en línea). Perú. Consultado 15 jun 2015. Disponible en https://www.academia.edu/1770180/Las_heladas_en_el_Per%C3%BA_y_el_mundo
- Cassán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. 2013. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal Plant Growth Regul*. 33(2): 440-459
- Castillo, F.; Roldán, M.; Blasco, R.; Huertas, M.; Caballero, F.; Moreno, C.; Luque, M. 2005. *Biotechnología ambiental*. Editorial TÉBAR. Madrid, España. p. 381-385, 393-394

- Chun, J.; Lee, J.; Jung, Y.; Kim, M.; Kim, S.; Kim, B.; Lim, Y. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(10): 2259-2261

- Das, A.; Kumar, M.; Kumar, R. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): An Alternative of Chemical Fertilizer for Sustainable, Environment Friendly Agriculture. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 1(4): 21-23

- Delauney, A.; Verma, D. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4(2): 215-223

- El Comercio. 2016. Catorce regiones en estado de emergencia por heladas y friaje (en línea). Consultado 17 may 2018. Disponible en: <https://elcomercio.pe/peru/catorce-regiones-emergencia-heladas-friaje-208610>

- FAO y UNALM. 2016. Guía de Cultivo de la Quinoa. 121 pág. Lima, Perú.

- FAO. 2013. Descriptores para quinoa y sus parientes silvestres (en línea). Italia. Consultado 13 may 2015. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/018/aq658s/aq658s.pdf>

- FAO. 2013. Valor Nutricional (en línea). Italia. Consultado 13 may 2015. Disponible en <http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/>

- Farmer, J.; Fanning, G.; Huntley, G.; Holmes, B.; Hickman, F.; Richard, C.; Brenner, D. 1981. *Kluyvera*, a New (Redefined) Genus in the Family Enterobacteriaceae: Identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 13(5): 919-933

- Gao, J.; Li, B.; Wang, H.; Liu, Z. 2014. *Pseudomonas hunanensis* sp. nov., isolated from soil subjected to long-term manganese pollution. *Current Microbiology*. 69(1): 19-24

- García, J.; Maroniche, G.; Creus, C.; Suárez, R.; Ramirez, J.; Groppa, M. 2017. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*. 202:21-29

- Ghyselink, J; Velivelli, S; Heylen, K; O'Herlihy, E; Franco, J; Rojas, M; De Vos, P; Prestwich, B. 2013. Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: Screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Systematic and Applied Microbiology* 2(36):116-127

- Gómez P., L.; Eguiluz, A. 2011. Catálogo del Banco de Germoplasma de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Lima, Perú. UNALM: MINAM. 183 p.

- Gordon S.A. y Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26(1): 192-195

- Goswami, D.; Thakker, J.; Dhandhukia, C. 2016. Portraying mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1): 1-19

- Govindasamy, V.; Senthilkumar, M.; Kumar, U; Annapurna, K. 2008. Potential Microorganisms for Sustainable Agriculture. A Techno-commercial Perspective. Chapter 2: PGPR-Biotechnology for Management of Abiotic and Biotic Stresses in Crop Plants. Ed. Maheshwari, D.K.; Ed. Dubey, R.C. International Publishing House Pvt. Ltd. India, Nueva Delhi. 498 p.

- Graf, B.; Rojas-Silva, P.; Rojo, L.; Delatorre-Herrera, J.; Baldeón, M.; Raskin, I. 2015. Innovations in Health Value and Functional Food Development of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(4): 431-445

- Guevara, E.; Luna, M.; Octavio, P.; Iglesias, L.; Trigos, A.; Martínez, M. 2014. Effect of Rhizobacteria Indole producing on the Development of *Capsicum annuum* var. jalapeño M. *International Research Journal of Biological Sciences*. 3(10): 22-27

- Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal Microb Biochem Technol* 7: 096-102. doi:10.4172/1948-5948.1000188

- Gupta, S.; Kaushal, R.; Spehia, R.; Pathania, S.; Sharma, V. 2017. Productivity of *Capsicum* as Influenced by Conjoint Application of Isolated Indigenous PGPR and Chemical Fertilisers. *Journal of Plant Nutrition*. 40 (7): 921-927

- Guy, C. 1999. Molecular Responses of Plants to Cold Shock and Cold Acclimation. *Molecular Microbiology*. 1(2): 231-242

- Hall A., T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT (en línea). *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. Consultado el 2 ago 2015. Disponible en <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>

- Hassan, N.; Rafiq, M.; Hayat, M.; Shah, A.; Hasan, F. 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: A comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 15(2): 147-172

- Hernández-Mendoza, J.; Moreno-Medina, V.; Quiroz-Velásquez, J.; García-Olivares, J.; Mayek-Pérez, N. 2010. Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(1):57-63

- Hynes, M.; Simon, R.; Pühler, A. 1985. The Development of Plasmid-free Strains of *Agrobacterium tumefaciens* by Using Incompatibility with a *Rhizobium meliloti* Plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* 13, 99-105

- IICA. 2015. El mercado y la producción de quinua en el Perú/ IICA. Lima, Perú. 172 p. ISBN: 978-92-9248-602-0
- INDECI. 2008. Plan de Operaciones "Heladas 2007" Comité Regional Defensa Civil Puno (en línea). Consultado 13 jul. 2015. Disponible en http://www.indeci.gob.pe/planes_proy_prg/p_operativos/p_contingencia/2008/0_2_planes_cont_reg/12.pdf
- Inglis, T.; Sagripanti, J-L. 2006. Environmental Factors that affect the Survival and Persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11):6865-6875
- Ivanova, E.; Christen, R.; Bizet, C.; Clermont, D.; Motreff, L.; Bouchier, C.; Zhukova, N.; Crawford, R.; Kiprianova, E. 2009. *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 2476-2481
- Jarvis, D.; Shwen Ho, Y.; Lightfoot, D.; Schmöckel, S.; Li, Bo.; Borm, T.; Ohyanagi, H. et al. 2017. The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*. 542: 307-312
- Jha C.K., Aeron A., Patel B.V., Maheshwari D.K., Saraf M. 2011. *Enterobacter*: Role in Plant Growth Promotion. In: Maheshwari D. (Eds) *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses*. Springer, Berlín, Heidelberg
- Kakar, K.; Ren, X.; Nawaz, Z.; Cui, Z.; Li, B.; Xie, G.; Hassan, M.; Ali, E.; Sun, G. 2016. A consortium of rhizobacterial strains and biochemical growth elicitors improve cold and drought stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biology*. 18: 471-483
- Khan, A.; Jilani, G.; Akhtar, M.; Saqlan, S.; Rasheed, M. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Science*. 1(1): 48-58

- Khan, M.; Goel, R. 2014. Expression, Purification and In Silico studies of Cold Resistant Protein from Plant Growth Promoting *Ps fluorescens* Mutant CDPF1. *Current Biotechnology* 3: 266-272
- Khan, M.; Zaidi, A.; Wani, P. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture- A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 27(1): 29-43
- Kimura, M. 1980. A simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120
- Klopper, J; Leong, J.; Teintze, M. y Schroth, M. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286, 885-886
- Koç, E.; Islek, C.; Üstün, A. 2009. Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and Chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annum* L.) Varieties. *G.U. Journal of Science*. 23(1):1-6
- Králová, S. 2017. Role of fatty acids in cold adaptation of Antarctic psychrophilic *Flavobacterium* spp. *Systematic and Applied Microbiology*. 40(6): 329-333
- Król, A.; Amarowicz, R.; Weidner, S. 2015. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*. 189:97-104
- Kumar, S.; Suyal, D., Dhauni, N.; Bhoriyal, M.; Goel, R. 2014. Relative plant growth promoting potential of Himalayan Psychrotolerant *Pseudomonas jesenii* strain MP1 against native *Cicer arietinum* (L.), *Vigna mungo* (L.) Hepper; *Vigna radiata* (L.) Wilczek., *Cajanus cajan* (L.) Millsp. and *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *African Journal of Microbiology Research* 8(50): 3931-3943

- Kwon, S.; Kim, J.; Park, I.; Yoon, S.; Park, D.; Lim, C.; Go, S. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 21-27

- Li, H-B; Singh, R.; Singh, P.; Song, Q-Q.; Xing, Y-X.; Yang, L-T.; Li, Y-R. 2017. Genetic diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Frontiers in Microbiolog.* 8:1268

- Lines-Kelly, R. 2005. The rhizosphere. *Soil biology basics* (en línea). Consultado 9 feb 2016. Disponible en http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf

- Matías Ramirez, L.; Fuentes Mariles, O.; García Jiménez, F. 2007. Heladas. Serie Fascículos, 13. CENAPRED, D.F., MX.: 3-34

- Meena, R.; Singh, R.; Singh, N.; Meena, S.; Meena, V. 2015. Isolation of low temperature surviving plant growth -promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(4): 806-811

- MINCETUR. 2005. Región Puno (en línea). Consultado 10 may 2015. Disponible en <http://www.mincetur.gob.pe/newweb/portals/0/PUNO.pdf>

- MINCETUR. 2006. Plan Operativo de la quinua Región Puno (en línea). Consultado 10 may 2015. Disponible en http://www.dirceturpuno.gob.pe/wp-content/uploads/2011/05/pop_quinua.pdf

- Mishra, P.; Bisht, S.; Ruwari, P.; Selvakumar, G.; Joshi, G.; Bisht, J.; Bhatt, J.; Gupta, H. 2011. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonads* from NW Himalayas. *Archives of Microbiology*. DOI 10.1007/s00203-011-0693-x.

- Mishra, P.; Joshi, P.; Bisht, S.; Bisht, J.; Selvakumar, G. 2010. Cold tolerant Agriculturally Important Microorganisms. Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs 18. Maheshwari (Ed.). Springer. Alemania, Berlín.

- Mishra, P.; Mishra, S.; Bisht, S.; Selvakumar, G.; Kundu, S.; Bisht, J.; Gupta, H. 2009. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. *Biol Res.* 42: 305-313

- Mishra, P.; Mishra, S.; Selvakumar, G.; Bisht, S.; Bisht, J.; Kundu, S.; Gupta, H. 2008. Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Annals of Microbiology* 58(4):561-568

- Mishra, P.K.; Bisht, S.C.; Bisht, J.K.; Bhatt, J.C. 2012. Potential Microorganisms for Sustainable Agriculture. A Techno-commercial Perspective. Chapter 6: Cold-Tolerant PGPRs as Bioinoculants for Stress Management. Ed. Maheshwari, D.K.; Ed. Dubey, R.C. International Publishing House Pvt. Ltd. India, Nueva Delhi. 498 p.

- Nautiyal, CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270

- Negi, Y.; Garg, S.; Kumar, J. 2005. Cold-tolerant fluorescent *Pseudomonas* isolates from Garhwal Himalayas as potential plant growth promoting and biocontrol agents in pea. *Current Science* 89(12): 2151-2156

- Nogi, Y. 2011. *Extremophiles Handbook*. Capítulo 38: Taxonomy of Psychrophiles 777-792 Horikoshi, K.; Antranikian, G.; Bull, A.T.; Robb, F.T. and Stetter, K.O. (Ed) Japón. 608pp

- Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology*. 47: 621-627
- Ortiz P. 2013. Tesis para obtener el título de Biólogo. Estudio de bacterias psicrótrofas aisladas de la zona de Junín con capacidad PGPR y su uso como potenciales biorremediadoras de metales pesados en una planta forrajera. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. p. 161
- Ortiz, P.; Ogata, K.; Zúñiga, D. 2017. Evaluation of plant growth promoting activity and heavy meta tolerance of psychrotrophic bacteria ssociated with maca (*Lepidium meyenii* Walp.) rhizosphere. *Microbiology* 3(2): 279-292
- Ortuño, N.; Castillo, J.A.; Claros, M.; Navia, O.; Angulo, M.; Barja, D.; Gutiérrez, C. y Angulo, V. 2013. Enhancing the Sustainability of Quinoa Production and Soil Resilience by Using Bioproducts Made with Native Microorganisms. *Agronomy*. 3(4): 732-746
- Pan, B.; Bai, Y.; Leibovitch, S.; Smith, D. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*. 11: 179-186
- Pandey, A.; Trivedi, P.; Kumar, B.; Palni, L. 2006. Characterization of a Phosphate Solubilizing and Antagonistic Strain of *Pseudomonas putida* (B0) Isolated from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology* 53: 102-107
- Park, M.; Kim, C.; Yang, J.; Lee, H.; Shin, W.; Kim, S.; Sa, T. 2004. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133
- Parra, L. 2012. Efectos de distintos niveles de salinidad en especies halófilas en un saladar del Sud de Alicante. Tesis. Licenciatura Ciencias Ambientales.

- Pascual, J.; García, M.; Bilis, G.; Genilloud, O. 2015. *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejeda, almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain. 65(2): 625-632
- Phadtare, S. 2004. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. *Current Issues in Molecular Biology*. 6: 125-136
- Pérez, M.; Mota, M. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Capítulo 2: Morfología y estructura bacteriana (en línea). Uruguay. ULAD. Pág. 23. Consultado 3 abr 2015. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- PRONAMACHCS (Programa Nacional de Manejo de Cuencas Hidrográficas y Conservación de Suelos, PE) Gerencia de Organización y Gestión de Microcuencas. 2007. ¿Cómo defendernos contra las heladas?: ¿Cómo defendernos contra las heladas? Huancayo, Perú. 15 p.
- Pulgar Vidal, J. 2014. Las ocho regiones naturales del Perú: Primera parte (en línea). *Terra Brasilis* (Nova Série). 3: 1-17. Consultado 14 de ago. 2015. Disponible en <https://terrabrasilis.revues.org/1027>
- Radzki, W.; Gutierrez, F.J.; Algar, E.; Lucas, J.; García A.; Ramos, B. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*. 104: 321-330
- Ramírez, M.; Cuesta, M.; Flores, J.; Mulas, R.; Rivas, R.; Castro, J.; Brañas, J.; Mulas, D.; Gonzáles, F.; Velázquez, Peix, Á. 2014. *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. 64:2338-2345
- Ramírez, N.; Serrano, J.; Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37 (3): 56-71

- Ramle, Z.; Rahim, R. 2016. Psychrophilic Lipase from Arctic Bacterium. *Tropical Life Science Research*. 27(1):151-157
- Rejeb, I.; Pastor, V.; Mauch-Mani, B. 2014. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*. 3(4): 458-475
- Repo-Carrasco, R.; Espinoza, C.; Jacobsen, S. 2003. Nutritional value and use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Revisions International*. 19(1,2):179-189
- Rezaei, M.; Kaviani, B.; Kharabian, A. 2012. The effect of exogenous glycine betaine on yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merr] in two contrasting cultivars. *Plant Omics Journal*. 5(2):87-93
- Rivero, R.; Ruiz, J.; García, P.; López-Lefebvre, L.; Sánchez, E.; Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plan Science*. 160 (2): 315-321
- Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 17: 319-339
- RPP. 2014. Puno: pierden cultivos de papa y quinua por fuertes heladas (en línea). Consultado 21 may 2015. Disponible en <http://rpp.pe/peru/actualidad/puno-pierden-cultivos-de-papa-y-quinua-por-fuertes-heladas-noticia-671074>
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425
- Sandle, T.; Skinner, K. 2012. Study of psychrophilic and psychrotolerant microorganisms isolated in cold rooms used for pharmaceutical processing. *Journal of Applied Microbiology*. 114(4): 1166-1174

- Satyaprakash, M.; Nikitha, T.; Reddi, E.U.B.; Sadhana, B.; Satya S. 2017. Phosphorus and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(4): 2133-2144
- Selvakumar G; Mohan M.; Kundu, S.; Gupta, A.; Joshi, P.; Nazim, S.; Gupta, H. 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in Applied Microbiology* 46:171-175
- Selvakumar, G; Joshi, P.; Suyal, P.; Mishra, P.; Joshi, G.; Bisht, J.; Bhatt, J.; Gupta, H. 2011. *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC 9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. *World J. Microbiol Biotechnol.* 27: 1129-1135
- Selvakumar, G; Kundu, S., Joshi, P.; Nazim, S.; Gupta, A.; Mishra, P.; Gupta, H. 2008. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:955-960
- Selvakumar, G; Kundu, S.; Joshi, P.; Nazim, S.; Gupta, A.; Gupta, H. 2010. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian J Microbiol* 50: 50-56
- SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología). 2015. Datos Históricos (en línea). Lima, Perú. Consultado 11 ago. 2015. Disponible en <http://www.senamhi.gob.pe/?p=data-historica>
- SENAMHI. 2005b. Atlas de heladas. Convenio de Cooperación Técnica Institucional
- SENAMHI. 2012. Frecuencia de Heladas (T min $\leq 0^{\circ}\text{C}$) (en línea). Disponible en: http://www.senamhi.gob.pe/images/sig/dga_011.jpg

- SENAMHI-FAO, 2010. Atlas de Heladas en el Perú (en línea). Consultado 20 may 2015. Disponible en http://www.senamhi.gob.pe/main_down.php?ub=est&id=atlasHeladas
- Shi, T-Q.; Peng, H.; Zeng, S-Y.; Ji, R-Y.; Shi, K.; Huang, H.; Ji, X-J. 2017. Comentary: Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Bioengineered* 8(2): 124-128
- Silva, K.; Abrahao, R.; Silva, A.; Barberi, A.; de Souza, F. 2011. Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. *Sci. Agric.* 68(5): 518-525
- Simon, Z.; Mtei, K.; Gessesse, A.; Ndakidemi, P. 2014. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Rhizobia from Cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences* 5:4050-4067
- Snyder, R.L., Paw U, K.T. & Thompson, J.F. 1987. Passive Frost Protection of Trees and Vines (en línea). Consultado 7 jul 2015. Disponible en <https://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/21429e.pdf>
- Soltani, A.; Khavazi, K.; Asadi-Rahmani, H.; Omidvari, M.; Abaszadeh, P.; Mirhoseyni, H. 2010. Plant Growth Promoting Characteristics in Some *Flavobacterium* spp. Isolated from Soils of Iran. *Journal of Agricultural Science.* 2(4): 106-115
- Subramanian, P.; Mageswari, A.; Kim, K.; Lee, Y.; Sa, T. 2015. Psychrotolerant Endophytic *Pseudomonas* sp. Strains OB155 and OS261 Induced Chilling Resistance in Tomato Plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by Activation of Their Antioxidant Capacity. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 28(10): 1073-1081
- Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.T., Zuberer, E. 1998. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, London. 550 p.

- Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Volumen 2. Capítulo 19: AUXINAS
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729
- Theocharis, A.; Clément, C.; Barka, E. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235: 1091-1105
- Thompson, J.; Gibson, T.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25(24) 4876-4882
- United Nations Development Programme (UNDP), Bureau for Crisis Prevention and Recovery (BCPR). 2013. *Climate Risk Management for Agriculture in Peru: Focus on the Regions of Junin and Piura*. New York, USA.
- Valencia Ch.; S. 2003. Quinoa. En: Caballero B.: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Vol. 8. Academic Press, Amsterdam: 4895–4902
- Vega-Celedón, P.; Canchignia, H.; Gonzáles, M.; Seeger, M. 2016. Biosíntesis de Ácido Indol-3-Acético y Promoción del Crecimiento de Plantas por Bacterias. 37: 33-39
- Verhille, S.; Baida, N.; Dabboussi, F.; Izard, D.; Leclerc, H. 1999. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural mineral waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 22(1): 45-58
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19: 6823-6831

- Von Neubeck, M.; Huptas, C.; Glück, C.; Krewinkel, M.; Stoeckel, M.; Stressler, T.; Fischer, L.; Hinrichs, J.; Scherer, S.; Wenning, M. 2017. *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *Int J. Syst Evol Microbiol.* 67(6): 1656-1664

- Wedemeyer, W.; Welker, E. y Scheraga, A. 2002. Proline Cis-Trans Isomerization and Protein Folding. *Biochemistry* 41:14637-14644

- Weidner, S.; Chrzanowski, S.; Karamac, M.; Król, A. Badowiec, A.; Mostek, A.; Amarowicz, R. 2014. Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Abilities of Extracts from Germinating *Vitis californica* Seed Submitted to Cold Stress Conditions and Recovery after the Stress. *International Journal of Molecular Sciences.* 15 (9):16211-16225

- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173:697-703

- Yadav, A.; Sachan, S.; Verma, P.; Saxena, A. 2016. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from the cold desert of north western Indian Himalayas. 54: 142-150

- Yadav, A.; Sachan, S.; Verma, P.; Tyagi, S.; Kaushik, R.; Saxena A. 2015. Culturable diversity and functional annotation of psychrotrophic bacteria from cold desert of Leh Ladakh (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 31(1): 95-108

- Yadav, A.; Verma, P.; Kumar, V.; Sachan, S.; Saxena, A. 2017. Extreme Cold Environments: A Suitable Niche for selection of novel Psychrotrophic microbes for Biotechnological Applications. *Advances in Biotechnology & Microbiology* 2(2): 1-4

- Yamada, T. 1993. The Role of Auxin in Plant-Disease Development. *Annual Rev. Phytopathology.* 31: 253-273

- Yang, J.; Kloepper, J.; Ryu, C. 2008. Rhizosphere bacteria helps plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Science*. 14(1): 1-4

- Zhu, J-K. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. 167(2): 313-324

- Zúñiga, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Caracterización macroscópica de las cepas aisladas de la E.E. Salcedo
INIA

Código	Procedencia	Forma	Borde	Superficie	Apariencia	Textura	Color	Elevación
PQLMT01	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT02	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT03	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT04	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT05	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Rugosa	Opaco	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT06	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT07	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT08	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT09	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT10	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT11	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT12	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Irregular	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT13	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT14	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT15	E.E. SALCEDO-PUNO	Irregular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT16	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Irregular	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT17	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT18	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT19	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT20	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT21	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT22	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT23	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT24	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT25	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT26	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT27	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Irregular	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT28	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT29	E.E. SALCEDO-PUNO	Oval	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Acuminada
PQLMT30	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT31	E.E. SALCEDO-PUNO	Oval	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Acuminada
PQLMT32	E.E. SALCEDO-PUNO	Oval	Irregular	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Acuminada
PQLMT33	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Irregular	Rugosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT34	E.E. SALCEDO-PUNO	Puntiforme	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT35	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT36	E.E. SALCEDO-PUNO	Lobulada	Lobulada	Rugosa	Opaco	Cremosa	Amarillo	Plana
PQLMT37	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT38	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Crema	Convexa
PQLMT39	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT40	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Coral	Convexa
PQLMT41	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Blanco	Convexa
PQLMT42	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Traslúcido	Cremosa	Amarillo	Convexa
PQLMT43	E.E. SALCEDO-PUNO	Circular	Entero	Brillosa	Opaco	Cremosa	Crema	Convexa

Anexo 2: Caracterización fisiológica de las cepas aisladas de la E.E. Salcedo-INIA

Cepa	F.N.	Metabolismo de lactosa	Tinción Gram	KOH
PQLMT01	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT02	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT03	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT04	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT05	-	+	Negativo	Positivo
PQLMT06	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT07	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT08	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT09	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT10	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT11	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT12	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT13	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT14	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT15	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT16	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT17	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT18	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT19	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT20	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT21	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT22	-	+	Negativo	Positivo
PQLMT23	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT24	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT25	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT26	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT27	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT28	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT29	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT30	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT31	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT32	+	-	Negativo	Positivo
PQLMT33	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT34	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT35	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT36	-	-	Negativo	Positivo
PQLMT37	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT38	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT39	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT40	+	-	Positivo	Negativo

...continuación

PQLMT41	+	+	Negativo	Positivo
PQLMT42	-	-	Negativo	Positivo
PQLMT43	+	+	Negativo	Positivo

FN: Crecimiento en medio de cultivo sin nitrógeno. +: Positivo para la característica evaluada. -: Negativo para la característica evaluada. Resultados obtenidos a entre las 48 y 96h de crecimiento.

Anexo 3: Cuantificación de AIA a tres diferentes temperaturas de las de cepas aisladas de una muestra de suelo de quinua de INIA-Salcedo.

CEPA	AIA		
	6°C	18°C	28°C
PQLMT01	4	14,4	14,9
PQLMT02	2,3	10	14,0
PQLMT03	8,1	16	25,4
PQLMT04	0	0	0
PQLMT05	0	0	0,5
PQLMT06	0	0	0
PQLMT07	0	0	0
PQLMT08	0	0	0
PQLMT09	5,8	11	14,1
PQLMT10	1,1	12	13,0
PQLMT11	4,9	13	13,6
PQLMT12	0	0	0
PQLMT13	0,1	0	0
PQLMT14	0,9	0	0,6
PQLMT15	0	0	0
PQLMT16	0	0	0
PQLMT17	0	0	0
PQLMT18	1,5	2	0,9
PQLMT19	4,0	0,7	13,2
PQLMT20	0	0	0,1
PQLMT21	0,1	0	0
PQLMT22	3,7	8	15,0
PQLMT23	6,2	16	14,8
PQLMT24	0	0	0
PQLMT25	0	0	0
PQLMT26	0	0	0
PQLMT27	0	1	0,6
PQLMT28	0,1	0	0
PQLMT29	0	0	0
PQLMT30	1,9	1	3

...continuación

PQLMT31	0	0	0
PQLMT32	0	0	0
PQLMT33	0	7	14,8
PQLMT34	1,2	10	13,0
PQLMT35	1,1	2	7,3
PQLMT36	0	0	0
PQLMT37	0,2	10	15,4
PQLMT38	0	9	3,6
PQLMT39	0	0	0
PQLMT40	0	9	0
PQLMT41	0	0	16,2
PQLMT42	0	0	0
PQLMT43	1,6	9,8	14,6

Los resultados de los ensayos de AIA están expresados como $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$

Anexo 4: Resultados de la prueba de germinación por compuestos volátiles

Tratamiento	Peso Fresco Plántula (g)	Peso Seco Plántula (g)
CONTROL	0.287	0.022
LMTK32	0.306	0.025
PQLMT01	0.265	0.021
PQLMT02	0.237	0.024
PQLMT03	0.254	0.022
PQLMT04	0.29	0.022
PQLMT05	0.255	0.023
PQLMT06	0.237	0.019
PQLMT07	0.266	0.02
PQLMT08	0.24	0.023
PQLMT09	0.295	0.022
PQLMT10	0.321	0.024
PQLMT11	0.267	0.025
PQLMT12	0.317	0.023
PQLMT13	0.279	0.018
PQLMT14	0.337	0.024
PQLMT15	0.283	0.025
PQLMT16	0.271	0.025
PQLMT17	0.285	0.019
PQLMT18	0.366	0.023
PQLMT19	0.235	0.02
PQLMT20	0.245	0.017

...continuación

PQLMT21	0.205	0.015
PQLMT22	0.223	0.016
PQLMT23	0.221	0.015
PQLMT24	0.285	0.019
PQLMT25	0.267	0.019
PQLMT26	0.252	0.018
PQLMT27	0.233	0.016
PQLMT28	0.278	0.019
PQLMT29	0.201	0.014
PQLMT30	0.258	0.066
PQLMT31	0.302	0.021
PQLMT32	0.318	0.021
PQLMT33	0.349	0.024
PQLMT34	0.29	0.022
PQLMT35	0.342	0.024
PQLMT36	0.309	0.024
PQLMT37	0.281	0.022
PQLMT38	0.276	0.022
PQLMT39	0.28	0.022
PQLMT40	0.31	0.02
PQLMT41	0.291	0.023
PQLMT42	0.307	0.024
PQLMT43	0.269	0.021

Resultados expresados en gramos. Datos tomados a los siete días.

Anexo 5: Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles en la germinación de plantas *C. quinoa* var. Kancolla

Tratamiento	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 5	Hora 6	Hora 7	Hora 8	Hora 9	Hora 10	Hora 11	Hora 24
CONTROL	0	0.25	0.75	0.75	0.75	1	1.25	4.5	7.25	9.5	11.25	15.25
PQLMT01	0.25	0.25	0.25	0.5	1	1.75	2.25	3.5	6.25	8.5	12.75	15.75
PQLMT02	0.5	0.75	0.75	1.25	1.5	2.25	3.25	3.75	5.5	7.75	12.5	16
PQLMT03	0	0.25	0.5	0.75	1.25	2.5	3.25	4.25	6.25	8.5	12	15.25
PQLMT04	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.75	0.75	3.75	5.25	8	10.5	14.5
PQLMT05	0.5	0.5	0.75	0.75	1.25	1.75	2.5	4.25	6	7.25	9.5	15.25
PQLMT06	0	0	0	0	1	1.5	2.5	3.5	6.75	7.5	11.5	15
PQLMT07	0.25	0.5	1	1.5	2	3	3.25	6.5	8	9	10.5	14.75
PQLMT08	0.5	0.75	0.75	0.75	1	3	4	6.75	8.75	9.75	13	15.5
PQLMT09	0.5	0.75	1	1.25	1.5	2	3	4	4	6.75	10.5	14
PQLMT10	0.25	0.25	0.75	0.75	1	1.5	3.25	4.5	4.5	7	10.5	15
PQLMT11	0	0	0	0.5	0.75	1.5	3	4	4	6.5	10	14
PQLMT12	0.5	1.25	1.25	1.75	2.75	3.25	4.25	4.75	6.25	7.25	8.75	14
PQLMT13	0.25	0.5	0.5	0.75	0.75	1	1.25	4.5	8	11.5	12.25	15.25
PQLMT14	0.5	0.75	0.75	1.5	1.75	2.5	3.25	6	8.75	11.25	13	15.25
PQLMT15	0.5	0.5	0.75	1.25	1.5	2.25	3.25	4	5	6.75	7.75	14.75
PQLMT16	0.5	0.5	0.5	0.75	1.25	2.5	4.5	5	8	9.25	12.75	16
PQLMT17	0	0.25	0.5	1	1	1.5	2.75	6.5	8.5	10.25	12.25	15
PQLMT18	0	0.25	0.5	0.5	1	1.5	2.25	2.5	5.25	6.5	11	14.25
PQLMT19	0.5	0.5	0.75	1.25	2	3	4	5	6	7	8.25	15.5
PQLMT20	0	0	0	0.25	0.5	1	1	1.75	4	4.25	6	15.25
PQLMT21	0	0	0.25	0.5	0.5	0.75	2	1.5	2.25	3	4.5	14
PQLMT22	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	1.5	2	2.75	5	5.5	6.75	15
PQLMT23	0	0	0	0.25	0.25	1	1	1.75	2.5	2.75	4.75	14.5
PQLMT24	0.5	0.75	0.75	1.5	2.75	4.75	5	7.25	9.5	10	12	15.75
PQLMT25	0.25	0.5	1	1	2.75	4	5	7.5	8.5	10.25	12	15.25

...continuación

PQLMT26	0.25	0.75	1	0.25	2.5	3.25	4.5	6.5	8.5	10.75	11.5	15.75
PQLMT27	0.25	0.25	0.25	0.25	2.5	3.25	4	5	6.25	7.25	8.5	15.25
PQLMT28	0.25	0.5	0.5	0.75	1.75	3.25	4	6	6.25	9.75	11.5	15.25
PQLMT29	0	0	0.5	0.5	0.75	1.5	2.5	3	3.5	4	5.25	15
PQLMT30	0.25	0.5	1	1.25	2.25	3.25	4.5	7.75	9.5	11.75	12.25	15.25
PQLMT31	0.75	0.75	0.75	1.75	1.75	3.25	5	8.75	10	11.5	13	14.75
PQLMT32	0	0.5	0.75	1.75	2.25	4.25	5	8.25	10	12.5	12.75	14.75
PQLMT33	0.25	0.5	1	1.5	2	4	5.25	9.25	10.75	13.25	14	15.25
PQLMT34	1	1.25	1.5	2.25	2.5	4.25	6.75	10.25	12.25	13	13.75	15.25
PQLMT35	0.25	0.5	1	1.25	2.25	5	7.25	9.75	12.75	12.75	13.5	15.5
PQLMT36	1	1.75	2	2.5	3.25	5	6.25	9.75	14	15	15	16
PQLMT37	0.25	0.75	1.5	2.75	3.5	5	6.75	9.5	10.25	11.75	12.75	15.5
PQLMT38	0	0.5	1	1.25	2.5	3.25	4.75	5.5	7.25	8.25	11	16
PQLMT39	0.25	0.25	0.5	1.25	2	3.5	4.75	8.25	10.75	12.5	14.25	15.5
PQLMT40	0	0.25	0.5	1.25	1.5	2.75	4	5	8	8.25	11.75	14.25
PQLMT41	0	0.75	0.75	1.5	1.75	2.5	3.25	4.25	5.75	7.75	11.25	15.75
PQLMT42	0	0.5	1	2.25	3.5	4.25	5.25	8.75	10.5	12.25	14.25	15.25
PQLMT43	0	0.25	0.5	1.5	2	2.5	2.75	5.5	6	7.5	9.25	15

Promedios del recuento de la germinación en placa Petri en agar agua. Cada tratamiento constó en cuatro repeticiones.

Anexo 6: Resultados del Análisis de la muestra de suelo procediente de la EE-INIA Salcedo, Puno

pH	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes cambiabiles					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. de Bases	B ppm	Cu ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm
						Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺								
						meq/100g																	
6.56	0.43	0.00	2.45	35.9	352	48	32	20	Fr.	15.4	12.4	2.13	0.7	0.1	0.00	15.36	15.36	100	1.23	6.36	241	81.2	4.64

Anexo 7: Resultados de los análisis estadísticos

Resumen Estadístico para Emergencia

Trat_Emergen cia	Recuent o	Promedi o	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Control	4	7.0	0.816497	11.6642%	6.0	8.0	2.0
PQLMT01	4	7.0	0.816497	11.6642%	6.0	8.0	2.0
PQLMT18	4	5.0	4.08248	81.6497%	0.0	10.0	10.0
PQLMT35	4	7.25	1.25831	17.3559%	6.0	9.0	3.0
Total	16	6.5625	2.18994	33.3705%	0.0	10.0	10.0

Trat_Emergen cia	Sesgo Estandarizado	Curtois Estandarizada
Control	0.0	0.612372
PQLMT01	0.0	0.612372
PQLMT18	0.0	0.612372
PQLMT35	0.922101	0.909229
Total	-2.71571	4.2248

Tabla ANOVA para Emergencia por Trat_Emergencia

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	13.1875	3	4.39583	0.90	0.4706
Intra grupos	58.75	12	4.89583		
Total (Corr.)	71.9375	15			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Emergencia en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.897872, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Emergencia entre un nivel de Trat_Emergencia y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Resumen Estadístico para Primera evaluación

Trat_Emergenc ia2	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
H01	16	3.25	2.69568	82.9439%	0.0	7.0	7.0
H32	16	4.5625	3.05437	66.9451%	0.0	11.0	11.0
HN-	16	4.75	2.20605	46.4432%	1.0	8.0	7.0
K01	16	2.9375	3.08693	105.087%	0.0	8.0	8.0
K32	16	2.4375	2.73176	112.072%	0.0	8.0	8.0
KN-	16	1.9375	1.23659	63.8242%	0.0	4.0	4.0
Total	96	3.3125	2.71957	82.1002%	0.0	11.0	11.0

<i>Trat_Emergencia2</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
H01	-0.533533	-1.44284
H32	1.19642	0.117273
HN-	-0.173832	-0.900162
K01	0.8451	-1.21352
K32	1.33503	-0.382609
KN-	0.217437	-0.548114
Total	1.90774	-1.09767

Tabla ANOVA para Primera evaluación por Trat_Emergencia2

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	102.875	5	20.575	3.09	0.0128
Intra grupos	599.75	90	6.66389		
Total (Corr.)	702.625	95			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Primera evaluación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.08754, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Primera evaluación entre un nivel de Trat_Emergencia2 y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Primera evaluación por Trat_Emergencia2

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
KN-	16	1.9375	X
K32	16	2.4375	X
K01	16	2.9375	XX
H01	16	3.25	XX
H32	16	4.5625	X
HN-	16	4.75	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
H01 - H32		-1.3125	1.8132
H01 - HN-		-1.5	1.8132
H01 - K01		0.3125	1.8132
H01 - K32		0.8125	1.8132
H01 - KN-		1.3125	1.8132
H32 - HN-		-0.1875	1.8132
H32 - K01		1.625	1.8132

H32 - K32	*	2.125	1.8132
H32 - KN-	*	2.625	1.8132
HN- - K01		1.8125	1.8132
HN- - K32	*	2.3125	1.8132
HN- - KN-	*	2.8125	1.8132
K01 - K32		0.5	1.8132
K01 - KN-		1.0	1.8132
K32 - KN-		0.5	1.8132

* indica una diferencia significativa.

Resumen Estadístico para Segunda evaluación

<i>Trat_Emergencia2</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
H01	16	5.3125	2.44182	45.9637%	0.0	10.0	10.0
H32	16	5.6875	3.02696	53.2213%	2.0	13.0	11.0
HN-	16	6.75	1.77012	26.224%	5.0	10.0	5.0
K01	16	7.0625	2.7921	39.5342%	3.0	10.0	7.0
K32	16	7.5	3.70585	49.4113%	2.0	14.0	12.0
KN-	16	3.875	3.61248	93.2252%	1.0	16.0	15.0
Total	96	6.03125	3.14041	52.069%	0.0	16.0	16.0

<i>Trat_Emergencia2</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
H01	-0.113964	0.749946
H32	1.44602	0.639755
HN-	0.841214	-0.974829
K01	-0.668369	-1.29413
K32	0.56472	-0.646416
KN-	4.54319	7.45901
Total	2.5813	0.728969

Tabla ANOVA para Segunda evaluación por Trat_Emergencia2

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	144.344	5	28.8687	3.28	0.0091
Intra grupos	792.563	90	8.80625		
Total (Corr.)	936.906	95			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Segunda evaluación en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.27821, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Segunda evaluación entre un nivel de Trat_Emergencia2 y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas

de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Segunda evaluación por Trat_Emergencia2

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
KN-	16	3.875	X
H01	16	5.3125	XX
H32	16	5.6875	XXX
HN-	16	6.75	XX
K01	16	7.0625	XX
K32	16	7.5	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
H01 - H32		-0.375	2.08439
H01 - HN-		-1.4375	2.08439
H01 - K01		-1.75	2.08439
H01 - K32	*	-2.1875	2.08439
H01 - KN-		1.4375	2.08439
H32 - HN-		-1.0625	2.08439
H32 - K01		-1.375	2.08439
H32 - K32		-1.8125	2.08439
H32 - KN-		1.8125	2.08439
HN- - K01		-0.3125	2.08439
HN- - K32		-0.75	2.08439
HN- - KN-	*	2.875	2.08439
K01 - K32		-0.4375	2.08439
K01 - KN-	*	3.1875	2.08439
K32 - KN-	*	3.625	2.08439

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza para mg prolina/g peso seco - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	0.121273	1	0.121273	6.06	0.0187
B:INÓCULO	0.00627072	2	0.00313536	0.16	0.8556
C:Shock	1.34553	1	1.34553	67.24	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.219069	2	0.109535	5.47	0.0084
AC	0.000438625	1	0.000438625	0.02	0.8831
BC	0.0581159	2	0.0290579	1.45	0.2475
ABC	0.082436	2	0.041218	2.06	0.1422
RESIDUOS	0.720373	36	0.0200104		
TOTAL (CORREGIDO)	2.5535	47			

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

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de mg prolina/g peso seco 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 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre mg prolina/g peso seco con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para mg prolina/g peso seco con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	48	1.04288			
VARIEDAD					
HUALHUAS	24	1.09314	0.028875	1.03458	1.1517
KANCOLLA	24	0.992613	0.028875	0.934051	1.05117
INÓCULO					
LMTK32	16	1.05611	0.0353645	0.984384	1.12783
PQLMT01	16	1.02822	0.0353645	0.956496	1.09994
SIN INÓCULO	16	1.04431	0.0353645	0.972584	1.11603
Shock					
NO SHOCK	24	0.87545	0.028875	0.816889	0.934011
SHOCK	24	1.2103	0.028875	1.15174	1.26887
VARIEDAD por INÓCULO					
HUALHUAS,LMTK32	8	1.1745	0.050013	1.07307	1.27593
HUALHUAS,PQLMT01	8	0.986412	0.050013	0.884981	1.08784
HUALHUAS,SIN INÓCULO	8	1.11851	0.050013	1.01708	1.21994
KANCOLLA,LMTK32	8	0.937713	0.050013	0.836281	1.03914
KANCOLLA,PQLMT01	8	1.07003	0.050013	0.968594	1.17146
KANCOLLA,SIN INÓCULO	8	0.9701	0.050013	0.868669	1.07153
VARIEDAD por Shock					
HUALHUAS,NO SHOCK	12	0.922692	0.0408354	0.839873	1.00551
HUALHUAS,SHOCK	12	1.26359	0.0408354	1.18077	1.34641
KANCOLLA,NO SHOCK	12	0.828208	0.0408354	0.74539	0.911027
KANCOLLA,SHOCK	12	1.15702	0.0408354	1.0742	1.23983
INÓCULO por Shock					
LMTK32,NO SHOCK	8	0.937487	0.050013	0.836056	1.03892
LMTK32,SHOCK	8	1.17473	0.050013	1.07329	1.27616
PQLMT01,NO SHOCK	8	0.830963	0.050013	0.729531	0.932394
PQLMT01,SHOCK	8	1.22548	0.050013	1.12404	1.32691
SIN INÓCULO,NO SHOCK	8	0.8579	0.050013	0.756469	0.959331
SIN INÓCULO,SHOCK	8	1.23071	0.050013	1.12928	1.33214

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de mg prolina/g peso seco 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 de la extrema derecha 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.

Análisis de Varianza para mg EAG/g peso seco - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:VARIEDAD	22.6104	1	22.6104	10.10	0.0030
B:INÓCULO	13.4815	2	6.74077	3.01	0.0617
C:Shock	35.2366	1	35.2366	15.74	0.0003
INTERACCIONES					
AB	16.0903	2	8.04513	3.59	0.0377
AC	3.68682	1	3.68682	1.65	0.2075
BC	10.1521	2	5.07606	2.27	0.1181
ABC	5.84844	2	2.92422	1.31	0.2833
RESIDUOS	80.5749	36	2.23819		
TOTAL (CORREGIDO)	187.681	47			

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

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de mg EAG/g peso seco 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 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre mg EAG/g peso seco con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para EAG mg /g peso seco con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	48	5.80246			
VARIEDAD					
HUALHUAS	24	6.4888	0.305382	5.86945	7.10814
KANCOLLA	24	5.11613	0.305382	4.49679	5.73548
INÓCULO					
LMTK32	16	5.11416	0.374015	4.35562	5.87269
PQLMT01	16	5.88977	0.374015	5.13123	6.64831
SIN INÓCULO	16	6.40347	0.374015	5.64493	7.16201
Shock					
NO SHOCK	24	4.94567	0.305382	4.32633	5.56501
SHOCK	24	6.65926	0.305382	6.03991	7.2786
VARIEDAD por INÓCULO					
HUALHUAS,LMTK32	8	5.03809	0.528937	3.96535	6.11082
HUALHUAS,PQLMT01	8	6.69869	0.528937	5.62595	7.77142
HUALHUAS,SIN INÓCULO	8	7.72961	0.528937	6.65688	8.80235
KANCOLLA,LMTK32	8	5.19022	0.528937	4.11749	6.26296

KANCOLLA,PQLMT01	8	5.08085	0.528937	4.00811	6.15359
KANCOLLA,SIN INÓCULO	8	5.07733	0.528937	4.00459	6.15006
VARIEDAD por Shock					
HUALHUAS,NO SHOCK	12	5.35486	0.431875	4.47897	6.23074
HUALHUAS,SHOCK	12	7.62273	0.431875	6.74685	8.49862
KANCOLLA,NO SHOCK	12	4.53648	0.431875	3.6606	5.41237
KANCOLLA,SHOCK	12	5.69578	0.431875	4.8199	6.57167
INÓCULO por Shock					
LMTK32,NO SHOCK	8	4.83087	0.528937	3.75814	5.90361
LMTK32,SHOCK	8	5.39744	0.528937	4.3247	6.47017
PQLMT01,NO SHOCK	8	5.01186	0.528937	3.93913	6.0846
PQLMT01,SHOCK	8	6.76767	0.528937	5.69494	7.84041
SIN INÓCULO,NO SHOCK	8	4.99428	0.528937	3.92154	6.06701
SIN INÓCULO,SHOCK	8	7.81266	0.528937	6.73993	8.8854

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de mg EAG/g peso seco 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 de la extrema derecha 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.

Anexo 8: Formulación de medios de cultivo

Agar agua 0,5%

Reactivo	Para 1000ml
Agar-Agar	7.50g

Agar extracto de levadura-manitol

Reactivo	Para 1000mL
Manitol	10,00g
Extracto de levadura	0,50g
Hidrógeno Fosfato Dipotásico	0,50g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,10g
Cloruro de sodio	0,20g
Agar-Agar	15,00g
pH 7,0 ± 0,1	

Agar HP

Reactivo	Para 1000ml
Peptona	4g
Extracto de levadura	0.5g
Triptona	0.5g
CaCl ₂	0.2g
MgSO ₄	0.2g

Medio mineral

Stock	Compuesto	[stock]	[final] en el medio	Para 1000ml de medio
MM1	K ₂ HPO ₄	6.551%	0.06551%	10ml
	KH ₂ PO ₄	1.5 %	0.015%	
MM2	Cl ₃ Fe	0.034%	0.00034%	10ml
	Na ₂ MoO ₄	0.108%	0.00108%	
	2H ₂ O			
	NaCl	0.2%	0.002%	
MM3	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1%	0.001%	10ml
MM4	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2%	0.02%	10ml
SACAROSA				10g
MANITOL				10g
Azul de Bromotimol (0.5% en etanol 70%)				5ml
pH				7± 0.2

Solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 3%

Reactivo	Para 100ml
Hidróxido de potasio	3 g