

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN CON BASE EN RIZOBACTERIAS
PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DEL BANANO**

ANA MARIA VALENCIA HENAO

VICTORIA EUGENIA VALENCIA JARAMILLO

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2008.

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN CON BASE EN RIZOBACTERIAS
PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DEL BANANO**

ANA MARIA VALENCIA HENAO

VICTORIA EUGENIA VALENCIA JARAMILLO

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

**Asesora: MRes. Valeska Villegas
Ingeniera Química, MRes. Biotecnología Vegetal
Universidad EAFIT**

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN**

2008.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora de investigación Valeska Villegas E. por transmitirnos sus enseñanzas, por su orientación permanente, y por sus continuas críticas constructivas en el entorno del proyecto.

A los integrantes del Grupo de Investigación BIOQUIP, Laura Sierra, Marco Valenti y Melisa Sánchez por su apoyo en labores del proyecto.

A Sigifredo Cárdenas, y los demás directores de los Laboratorios de Ingeniería de Procesos, por su actitud siempre presta en las tareas del laboratorio y por compartirnos sus conocimientos en el área de biotecnología.

A Cenibanano de Augura, en especial a John Jairo Mira y Paola Rodríguez, por transmitirnos sus experiencias a través de consejos, para lograr el desarrollo del proyecto.

A Luisa Fernanda Posada por apoyar el desarrollo de la investigación a través de su buena voluntad y labor en el laboratorio.

A la Universidad EAFIT, por financiar esta iniciativa de investigación.

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 28 de abril de 2008

RESUMEN

El objetivo de esta investigación, consistió en desarrollar una bioformulación a base de rizobacterias del género *Pseudomonas* con el propósito de promover el crecimiento de las plantas de banano. Se realizó una evaluación previa de las mejores formulaciones a base de *Pseudomonas putida* UA44MR-1 y diferentes vehículos con el fin de valorar diversos medios de protección para las células bacteriales. Los vehículos evaluados hacen parte de cuatro categorías reportadas en la literatura: cápsulas poliméricas de alginato de sodio y alginato de sodio con ácido húmico, polvos de talco y caolín, gránulos de harina y líquidos con suspensión bacterial y agua. Todas las formulaciones fueron evaluadas en frijol variedad Calima desde semilla y plántula, comparando con testigos no inoculados, realizando una preselección de las dos mejores formulaciones. Las formulaciones de *P. putida* UA44MR-1 a base de harina y talco, fueron seleccionadas para ser evaluadas en las plantas de banano de la especie Musa AAA, cultivar Gran enano, Se observó que las dos formulaciones promovieron el crecimiento de la planta de banano en comparación con el testigo no inoculado durante los 3 primeros meses de evaluación. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad de las formulaciones en el tiempo, por medio del conteo viable de bacterias, encontrándose que el talco logró conservar la población bacteriana en mayor proporción que la harina.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 RIZOSFERA	16
2.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL COMO BIOFERTILIZANTES	17
2.2.1 Definición de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR	17
2.2.2 Relaciones entre PGPR biofertilizantes y sus hospederos: rizosférica y endofítica	18
2.2.4 Modo de acción de las PGPR biofertilizantes	19
2.2.5 Definición de Biofertilizantes	23
2.3 INOCULACIÓN DE BACTERIAS EN EL SUELO	23
2.3.1 Inoculantes de PGPR	24
2.3.2 Productos secos	28
2.3.3 Suspensiones líquidas	30
2.3.4 Selección de un inoculante	31
2.3.5 Inoculantes	33
2.3.6 Métodos de aplicación de bacterias al suelo	35
2.4 ANTECEDENTES DE TRABAJOS REALIZADOS CON RIZOBACTERIAS	36
2.4.1 Pruebas en diversos cultivos	36
2.4.2 Pruebas en Banano	38
3.1 MATERIALES	40
3.3 DISEÑO METODOLÓGICO	41

3.3.1 Ubicación:	41
3.3.2 Microorganismo:	42
3.3.4 Obtención de biomasa de <i>P. putida</i> UA44MR-1:	45
3.3.5 Determinación de biomasa.	45
3.3.6 Formulaciones	47
3.3.7 Evaluación de la viabilidad de las formulaciones:	51
3.3.8 Dosis:	52
3.3.9 Pruebas en frijol	53
3.3.10 Recuperación de bacterias en frijol:	55
3.3.11 Porcentaje de patogenicidad en las plantas de Banano:	56
3.3.12 Pruebas en banano:	56
3.3.13 Recuperación de bacterias en banano	58
3.3.14 Análisis estadístico.	59
4.1 CAPACIDADES BIOQUÍMICAS DE <i>P. putida</i> UA 44MR-1	60
4.1.1 Producción de ácido indol acético:	60
4.2.2 Degradación de quitina:	63
4.2 FORMACIÓN DE BIOMASA	65
4.3 PRUEBAS EN FRÍJOL:	66
4.3.1 Experimento 1. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, Alginato y Suspensión Bacterial con inoculaciones de $4,5 \cdot 10^7$, $1,8 \cdot 10^7$ y $9 \cdot 10^6$ UFC/g de sustrato	66
4.3.2 Experimento 2. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Alginato con Acido Húmico, Harina y Suspensión Bacterial con inoculaciones de $4,5 \cdot 10^7$, $1,8 \cdot 10^7$ y $9 \cdot 10^6$ UFC/g de sustrato	68
4.3.3 Experimento 3. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, Suspensión Bacterial con una concentración de $9 \cdot 10^6$ UFC/g de sustrato y su respectiva formulación sin bacteria para evaluar el efecto del vehiculo.	70

4.3.4 Experimento 4. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, harina y Suspensión Bacterial con concentraciones de $2,5 \cdot 10^6$, $2,5 \cdot 10^4$ y $2,5 \cdot 10^2$ UFC/g de sustrato y su respectiva formulación sin bacteria para evaluar el efecto del vehículo.	73
4.4 PRUEBAS EN BANANO	78
4.4.1 Prueba de patogenicidad:	78
4.4.2 Muestreo General:	79
4.4.3. Muestreo Destructivo:	82
CONCLUSIONES	97
REFERENCIAS	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de inoculantes para bacterias promotoras del crecimiento de plantas.....	26
Tabla 2. Características de un inoculante para bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR).....	28
Tabla 3. Formulaciones de inoculantes para PGPR	29
Tabla 4. Publicaciones de PGPR aplicadas en cultivos de Banano.....	40
Tabla 5. Estándares de curva de referencia para AIA.....	47
Tabla 6. Formulaciones con base en <i>P. putida</i> UA 44.....	49
Tabla 7. Dosis utilizadas en frijol y banano.....	53
Tabla 8. Experimentación en frijol.....	54
Tabla 9. Experimentación en banano.....	57
Tabla 10. Producción de AIA por <i>P. putida</i> UA 44.....	63
Tabla 11. Análisis de rangos múltiples para el Experimento 1.....	66
Tabla 12. Análisis de Rangos múltiples para el Experimento 2.....	69
Tabla 13. Análisis de rangos múltiples para el Experimento 3.....	72
Tabla 14. Análisis de Rangos Múltiples para el Experimento 4.....	76
Tabla 15. Porcentaje de platas vivas en prueba de patogenicidad.....	78
Tabla 16. Porcentaje de aumento en relación con el testigo en la masa seca aérea y subterránea de la planta de banano.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tinción Gram de <i>P. putida</i> UA 44.....	43
Figura 2. Crioviales por 25 perlas de porcelana.....	44
Figura 3. Proceso de producción de macro-perlas de alginato.....	52
Figura 4. Método de diluciones seriadas en placa.....	53
Figura 5. Mediciones de crecimiento en Fríjol.....	57
Figura 6. Medición de variables en banano.....	59
Figura 7. Muestreo destructivo en Banano.....	59
Figura 8. Curva de referencia para la determinación de AIA.....	62
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>P. putida</i> UA 44.....	67
Figura 10. Altura del pseudotallo de la planta de Banano.....	81
Figura 11. Diámetro del corno de la planta de banano.....	82
Figura 12. Porcentaje de aumento del pseudotallo.....	83
Figura 13. Porcentaje de aumento del diámetro del corno.....	84
Figura 14. Peso fresco de las diferentes partes de la planta de banano.....	85
Figura 15. Peso seco de las diferentes partes de la planta de banano.....	87
Figura 16. Porcentaje de participación en fresco para corno, raíz, hoja y pseudotallo.....	88
Figura 17. Porcentaje de participación en seco para corno, raíz, hoja y pseudotallo.....	90
Figura 18. Porcentaje de participación aérea y subterránea.....	92
Figura 19 Comparación de una planta de banano inoculada a) talco b) harina frente al testigo.....	93
Figura 20. Variabilidad en el tiempo a) talco b) harina.....	96

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: SALES MEDIO DE CULTIVO 3.....	118
ANEXO 2: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 1 (9 JULIO DE 2007).....	118
ANEXO 3: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 2 (23 JULIO DE 2007).....	120
ANEXO 4: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 3 (4 DE AGOSTO DE 2007).....	121
ANEXO 5: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 4 (24 DE SEPTIEMBRE DE 2007).....	123
ANEXO 6: PRUEBA EN BANANO MES 1 MUESTREO GENERAL.....	125
MUESTREO DESTRUCTIVO.....	126
ANEXO 7: PRUEBA EN BANANO MES 2 MUESTREO GENERAL.....	131
MUESTREO DESTRUCTIVO.....	132
ANEXO 8: PRUEBA EN BANANO MES 3 MUESTREO GENERAL.....	138
MUESTREO DESTRUCTIVO.....	139
ANEXO 9: PRUEBA EN BANANO MES 4 MUESTREO GENERAL.....	144
MUESTREO DESTRUCTIVO.....	145
ANEXO 10: FOTOGRAFÍAS.....	151

INTRODUCCIÓN

En el concierto internacional, el banano colombiano ha experimentado una pérdida de posicionamiento competitivo en el marco de un sobre abastecimiento de los mercados mundiales, con niveles próximos a la saturación especialmente en países desarrollados, como consecuencia del crecimiento de la oferta de competidores fuertes como Ecuador. Este detrimento obedece a diversos factores entre los que sobresalen la baja productividad por hectárea del cultivo y el deterioro en la calidad de la fruta, debido principalmente a los problemas administrativos y sanitarios (Sigatocas y Moko) en las plantaciones (Agrocadenas, 2006).

El principal productor de banano en el mundo es India con una participación en el mercado mundial del 23.8% con un incremento de 10.2 a 16.8 millones de toneladas. El segundo lugar está Brasil con una participación del 9.3%; su producción también se incrementó de 5.8 a 9.3 millones de toneladas. Colombia ocupa el puesto once dentro de la producción de esta fruta con una participación del 2.2% (Danies, 2005).

En el 2006 las hectáreas sembradas en banano en Colombia en el primer semestre ascendieron a 43,906; de igual manera para este mismo periodo las hectáreas sembradas en banano de exportación en las dos zonas productoras del país fueron 43,840. La productividad promedio es de 1,724 cajas por hectárea, menor a la observada el mismo período del 2005 cuando fue de 1,939 cajas/ha./año (Augura, 2006)

En relación al mercado de exportación, la cadena de banano ha logrado mantener su posición como exportadora neta, después del café y las flores, ocupando el tercer puesto a nivel mundial, con valores de exportaciones que han oscilado entre 400 y 444 millones de dólares desde 1991 (Martínez y Marín, 2006). Los problemas administrativos que enfrentan las fincas bananeras de la región de Urabá, se deben básicamente a la inseguridad en la zona, y han acarreado un descenso importante en los niveles de inversión en las plantaciones en labores como la fertilización y el control de drenajes, acentuando la baja en la productividad por hectárea y generando un impacto negativo en la calidad de la producción. La estabilidad política y social, en la zona de Urabá, son factores claves para el mejoramiento competitivo del sector (Agrocadenas, 2006).

Para éste y muchos otros problemas presentes en la agricultura colombiana y, en general, del mundo han surgido propuestas cada vez más prometedoras para el aumento en el rendimiento de la producción de los cultivos y el cuidado del medio ambiente que; entre éstas, la biotecnología propone el aprovechamiento de la capacidad que poseen algunas bacterias de promover o estimular el crecimiento de diferentes especies de plantas y cultivos a través de diferentes mecanismos de acción; dichas bacterias reciben el nombre de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs por sus siglas en ingles “Plant Growth Promotin Rizobacterias”, Kleoppe y Schroth, 1978).

En éste contexto, y concientes del potencial que representa la producción de Banano en Colombia, se le da continuidad a una investigación de Ramírez, 2005, de la Universidad Nacional de Colombia, en la que se publicó que la bacteria *P. putida*UA44MR-1 aislada de los suelos de cultivos bananeros de Urabá (Antioquia, Colombia), mostró rasgos o características de PGPR, como respuesta positiva en la producción de quitinasas, glucanasas y deaminasas, y en la posible producción de sideróforos (Ramírez, 2005).

Con dichos antecedentes, este proyecto se enfoca en la evaluación de diferentes vehículos para la producción de una formulación a base de la bacteria *P. putida*UA44MR-1, con el fin de producir una formulación viable y promotora de crecimiento una vez inoculada en plantas de banano cultivar Gran enano. Para lograr dicho objetivo, se realizaron ensayos previos con diferentes inoculaciones de formulaciones poliméricas, granuladas, en polvo y líquidas en semillas de frijol como planta indicadora de rápido crecimiento, seleccionando las mejores formulaciones y su respectiva dosis, para luego ser aplicada en plantas de banano. De ésta forma, en los ensayos directos con las plantas de banano, sólo se experimentaron las formulaciones con base en talco y harina con una sola dosis, haciendo un control de diferentes variables de crecimiento durante 4 meses.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un producto biotecnológico con base en rizobacterias del género *Pseudomonas* que promueva el crecimiento de las plantas de banano (Musa AAA) a nivel de invernadero.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de diferentes formulaciones con base en rizobacterias del género *Pseudomonas* sobre el desarrollo vegetal en una planta indicadora de rápido crecimiento bajo condiciones de invernadero.

Evaluar el efecto de diferentes formulaciones con base rizobacterias del género *Pseudomonas* sobre el desarrollo vegetal del banano bajo condiciones de invernadero.

Evaluar la viabilidad de las formulaciones desarrolladas en el tiempo con el fin de determinar su potencial comercializador.

2. MARCO TEÓRICO

Para reducir la pérdida de cultivos por enfermedades causadas por diferentes microorganismos, en la actualidad se utilizan pesticidas y fungicidas químicos, los cuales son efectivos, costosos y dañinos para el medio ambiente y el hombre. Por lo tanto, se ha creado la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas más ecológicas debido a las preocupaciones relacionadas con el ambiente y la salud de los humanos asociadas con el uso intensivo de químicos. Dicho enfoque, pretende mejorar la productividad agrícola y al mismo tiempo ser seguras para el entorno y la salud humana (Raj *et al.*, 2003)

En biotecnología, surgen cada vez más investigaciones para dar soluciones óptimas a los problemas mencionados, que son solo una pequeña muestra de problemas más específicos que traen grandes afecciones a la tierra y los cultivos. En relación a esto, los reportes sobre promoción de crecimiento y el efecto de la inoculación con rizobacterias en diversos cultivos han sido altamente documentados. En cereales y gramíneas se han observado aumentos en el crecimiento y en los rendimientos con diversas inoculaciones bacterianas. De Freitas (1992) donde se encontró que las bacterias *Pseudomonas* inoculadas en semillas de trigo de invierno, colonizaron las raíces de la planta y sobrevivieron en la tierra. Un ejemplo del incremento significativo en la materia seca de la planta es también reportado por de Freitas (2000), donde la inoculación de *E. cloacae*, *B. polymyxa*, *A. brasilense* y la mezcla de éstas, en semillas de trigo de invierno, generaron un aumento en el peso seco del tallo y la raíz, mayor que el presentado por el control no inoculado. De igual forma, se han encontrado buenos resultados con éstas formulaciones en cultivos de lechuga y pepino, como los publicados por

Amer y Utkhede (2000), quienes encontraron que las lechugas que fueron inoculadas con *Bacillus subtilis* en formulaciones de vermiculita y caolín mostraron pesos frescos superiores a los del control no inoculado, mientras que en las plantas de pepino que fueron inoculadas con *P. putida* en formulaciones de vermiculita y caldo bacteriano mostraron valores de altura de la planta, número de hojas y de flores y rendimiento de la fruta superiores a los obtenidos con las plantas no inoculadas.

2.1 RIZOSFERA

El uso inicial del término “rizosfera”, acuñado por Lorenz Hiltner en 1904, hacía referencia a la zona inmediatamente cercana a las raíces de la planta y que se veía mayormente afectada por las exudaciones de la misma (Hiltner, 1904 citado en Osorio, 2007).

Una definición de las características que diferencian la rizosfera de otros tipos de suelo, la hacen Bowen y Rovira (1999), quienes exponen que la rizosfera es el “suelo adyacente a las raíces que presenta un ambiente físico, químico y biológico diferente al resto del suelo” (Bowen y Rovira, 1999, citado en Ramírez 2006). En general, la rizosfera es un pequeñísimo espacio entre el suelo común y las raíces donde existe una relación de aprovechamiento mutuo entre las plantas y las bacterias, o microorganismos en general, que la rodean. Una enunciación muy reciente la hace Osorio (2007), quien define rizosfera como la porción de volumen de suelo, de aproximadamente 2 mm de espesor, inmediatamente afectada por las sustancias exudadas por las plantas a través de sus pelos radicales, como carbohidratos, aminoácidos, lípidos y vitaminas, estimulando los microorganismos del suelo (Osorio, 2007).

En la rizosfera, el pH es, usualmente, dos unidades menor que el resto del suelo, y esto se debe a varios factores como producción de CO₂ por el proceso de respiración, liberación de ácidos orgánicos por las raíces y los microbios, descomposición de materia orgánica y fijación de N₂ por la simbiosis entre la leguminosa y el rizobium (Marschner, 1997, citado en Osorio, 2007)

2.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL COMO BIOFERTILIZANTES

Muchos microorganismos son atraídos por los nutrientes exudados de las raíces de las plantas, efecto descrito inicialmente por Hiltner, 1904, quien observó un gran número y actividad de microorganismos alrededor de las raíces de las plantas. La rizosfera es colonizada más intensamente por microorganismos que otras regiones del suelo, y algunos de estos microorganismos no solo se benefician de la secreción de nutrientes de las plantas, sino que influyen benéficamente el crecimiento de las mismas, generando una estimulación para su crecimiento.

2.2.1 Definición de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR

Kleopfer y Schroth definieron en 1978 a un tipo de bacterias como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR (por sus siglas en inglés, que significan Plant Growth Promoting Rizobacteria), las cuales mostraron ser organismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. En años recientes se ha creado cierta controversia respecto de cuándo considerar a una rizobacteria como PGPR, por lo que se han establecido algunas características que definen a este grupo. Deben tener una elevada densidad poblacional en la

rizosfera después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo; poseer capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta; además, que puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos del suelo capaces de enfermar a las plantas; y por último, que no produzcan daño en el hombre. La aplicación de este tipo de rizobacterias ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa, desarrollo en sistemas radicales e incrementos de hasta 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, jitomate, trigo y soya, entre otros (Hernández y Escalona, 2003)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) representan una amplia variedad de bacterias del suelo, las cuales crecen en asociación con la planta hospedera, resultando en una estimulación del crecimiento de la planta hospedera. Las rizobacterias podrían catalogarse como biofertilizante, sin embargo este término es reciente y su definición todavía no es muy clara, ya que se refiere más comúnmente al uso de microorganismos del suelo que incrementan la habilidad y el consumo de nutrientes minerales por las plantas. Si esta fuera la definición estricta, no todas las PGPR podrían catalogarse como biofertilizantes, ya que algunas estimulan el crecimiento de las plantas por medio del control de organismos patogénicos

2.2.2 Relaciones entre PGPR biofertilizantes y sus hospederos: rizosférica y endofítica

Para que las PGPR tengan efectos benéficos en el crecimiento de las plantas a través del enriquecimiento de los nutrientes en el suelo de su planta hospedero,

debe existir obviamente una relación entre la PGPR y la planta hospedera. Estas relaciones se pueden clasificar en dos niveles:

2.2.3.1 Rizosféricas: En éste tipo de reacción, las PGPR pueden colonizar la rizósfera, la superficie de la raíz, o incluso los espacios intracelulares superficiales (McCulley, 2001). No cualquier bacteria puede colonizar éstas áreas. Por definición, la planta cambia la composición física y química del suelo en la rizósfera comparado con la mayor parte del suelo el cual puede afectar la habilidad de las PGPR para colonizar la rizósfera (Vessey, 2003).

2.2.3.2 Endofíticas: Las PGPR residen dentro de los espacios apoplásticos de la planta hospedera. Aunque existen algunas evidencias de endófitos que llegan a ocupar espacios intracelulares (An *et al.*, 2001). La mejor caracterización de simbiosis envuelve la colonización del hospedero por endófitos es la simbiosis leguminosa-rizobia. La quimo-atracción, adhesión, e infección de la microsimbionte y el desarrollo de nudos en las raíces que hospedan la bacteria son altamente complejos y altamente reguladores de procesos que han sido descritos en un número de artículos (Gualtieri y Bisseling, 2000; Spink, 2000). Depende la planta hospedera y el endófito, que una PGPR biofertilizante se pueda encontrar en todas las partes de la planta (semillas, raíces, tallos, frutas, etc.) (Vessey, 2003).

2.2.4 Modo de acción de las PGPR biofertilizantes

Las bacterias promotoras del crecimiento bacteriano pueden actuar sobre la planta de maneras diferentes, y éstas reciben diversas clasificaciones. En general, los mecanismos pueden dividirse en dos formas de acción: directa o indirectamente.

2.2.4.1 Mecanismos directos

2.2.4.1.1 Fijación de N₂ biológico: Muchas PGPR son diazótropos y aunque sus mecanismos no son suministrar ni fijar el nitrógeno del hospedero, se sugieren varias posibilidades (i) existe algo relacionado con la habilidad de fijar nitrógeno que hace que los organismos se adapten bien para vivir en la rizósfera (p.e., niveles de N mineral bajos debido a la absorción de la planta), (ii) lo que puede ser considerado como niveles insignificantes de fijación de N₂ (en términos agrícolas) puede ser actualmente benéfico para la planta hospedera, o (iii) investigadores comúnmente seleccionan la actividad de nitrogenasa o usan medios de cultivo adecuados para diazótropos cuando se trata de aislar PGPR (Vessey, 2003). Las condiciones rizosféricas favorecen la fijación de N₂ porque éste es llevado a cabo por bacterias heterotrópicas que usan componentes orgánicos como fuente de electrones para la reducción de N₂ (Osorio, 2007). Considerando que la fuente de carbono es un factor limitante para la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas, este podría ser útil en cultivos que excretan fotosintetasas en cantidades adecuadas, con el fin de una fijación de nitrógeno en la rizosfera (Ramírez y Mellado, 2000)

2.2.4.1.2 Solubilización de fosfatos y otros minerales: El fósforo es el segundo mineral más limitado durante el crecimiento de las plantas terrestres, a pesar de existir grandes reservas del mismo en el suelo (Stevenson y Cole, 1999). La baja disponibilidad de P para las plantas es debido a que se encuentra casi todo en formas insolubles y las plantas sólo lo pueden absorber de dos formas: iones monobásicos (H₂PO₄⁻) y dibásicos (H₂PO₄²⁻) (Glass, 1989). La bacteria solubilizadora de fosfatos es común en la rizósfera y la secreción de ácidos orgánicos y fosfatasas son métodos comunes para facilitar la conversión de formas insolubles de P a formas asequibles por las plantas (Kim *et al.*, 1998).

2.2.4.1.3 Producción de reguladores de crecimiento: Las bacterias que viven alrededor de las raíces, pueden promover el crecimiento de las plantas a través de la liberación de reguladores de crecimiento como las auxinas. El ácido indol acético (AIA) es producido a partir de triptófano, con intermediación de la indolacetamida, por diferentes bacterias entre estas algunas PGPR y está asociado con la promoción del crecimiento de raíces a través del establecimiento de las mismas en el suelo debido al desarrollo de pelos radicales como extensión de las raíces primarias (Cheryl y Glick, 2002). De ésta forma se generan ventajas para las nuevas plantas debido a que las raíces aumentan la habilidad de sustraer nutrientes del suelo logrando alcanzar los que están más distanciados y ampliando más sus límites de acceso.

A pesar de lo expuesto por Cheryl y Glick, 2002, otros autores como Kato *et al.*, 1999, han expuesto una gran limitación del AIA, debido a su oxidación enzimática a hidroximetil-2 indóxido y 3-metileno-2indóxido, con la consiguiente pérdida de actividad biológica (Mudt, 1967, citado en Kato *et al.*, 1999).

Por otro lado, Zahir *et al.*, 2004, y Van Loon y Bakker., 2003, proponen igualmente que el AIA puede generar efectos negativos sobre las plantas que tienen contacto con las bacterias que la producen en altas concentraciones, debido a la consiguiente promoción de la producción de etileno, el cual inhibe la elongación radical (Salisbury y Ross, 1994, citado en Ramírez, 2006).

2.2.4.2 Mecanismos indirectos

2.2.4.2.1 Mejoramiento de otras relaciones simbióticas benéficas del hospedero: Aunque la acción de una PGPR biopesticida genera un efecto antagónico frente a hongos patógenos, algunas veces las PGPR biofertilizantes aumentan el crecimiento de la planta de forma indirecta a través de la estimulación de relaciones entre planta hospedera y algún hongo rizosférico benéfico como la micorriza arbuscular (AM). Incluso las AM por sí solas son bien conocidas como

mejoradoras de consumo de varios nutrientes del suelo (especialmente fósforos) (Bethlenfalvay, 1993; Marschener, 1997; Ness y Vlek, 2000; Tobar, 1994). Las relaciones entre PGPR y AM no son siempre positivas; los resultados indican que algunas PGPR inoculadas pueden tener efectos negativos en la asociación mutualista entre las plantas hospedero y las AM (Germida y Walley, 1996; Walley y Germida, 1997).

2.2.4.2.2 Producción de sideróforos: La producción de sideróforos, además de la antibiosis, ha sido quizás uno de los mecanismos más intensamente estudiados en relación con el biocontrol (Handelsman y Stabb, 1996; Whipps, 2001; Van Loon *et al.*, 2003). Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, producidas por algunos microorganismos (hongos y bacterias) bajo condiciones limitadas de hierro, y que son capaces de quelatar Fe^{+3} (Neilands, 1981; Leong, 1986; Crowley, 2001). Su papel fundamental en la supresión de enfermedades ha sido reportado desde los primeros trabajos con PGPR's (Kloepper *et al.*, 1980; Loper, 1988).

2.4.2.3 Competencia y desplazamiento: La competencia entre microorganismos saprofiticos y patogénicos por materiales orgánicos liberados desde las raíces, o minerales como el hierro (discutido en el numeral anterior), puede reducir el crecimiento y/o actividad patogénica de los microorganismos causantes de enfermedades (Schippers *et al.*, 1987; Van Loon y Bakker, 2003). Existen varias investigaciones en las cuales se ha demostrado que la utilización de ciertos sustratos, como por ejemplo exudados radicales estimulantes de la germinación de esporas de patógenos, por parte de PGPR's, ayuda en la supresión de enfermedades (Van Loon *et al.*, 2003). Este rasgo a su vez está vinculado con el desplazamiento de ciertas poblaciones microbianas, patógenas o simplemente deletéreas, de la rizosfera por acción de PGPR's, lo cual es considerado un

mecanismo de acción eficiente (Kloepper y Schroth, 1981b; Schippers *et al.*, 1987).

La forma de acción de estas bacterias puede ser de manera independiente, si una misma rizobacteria expresa varios mecanismos de acción, o en asociación cuando diferentes rizobacterias en una misma rizósfera, pueden actuar en conjunto aportando cada una uno o varios de sus mecanismos. De esta forma una rizobacteria puede ayudar en la fijación de nitrógeno atmosférico y otra rizobacteria puede promover directamente el crecimiento de la planta a través de la producción de hormonas. Sin embargo, los efectos son complejos y acumulativos dependiendo de la interacción con las plantas, los patógenos, adversarios y factores ambientales (Schippers, 1992).

2.2.5 Definición de Biofertilizantes

La literatura científica es muy abierta en la interpretación del término biofertilizante, representando desde abonos orgánicos (Rao y Gill, 1995; Ventura y Ladha, 1997) hasta abonos animales (Abdel-Magid *et al.*, 1995) y extractos de plantas (Zodape, 2001). Vessey (2003), propone que el término biofertilizante sea definido como una sustancia la cual contiene microorganismos vivos los cuales, cuando son aplicados a semillas, superficies de plantas, o suelo, colonicen la rizosfera o el interior de la planta y promuevan el crecimiento a través del incremento de suministros o la habilidad de la planta de almacenar nutrientes primarios. Esta definición separa los biofertilizantes de los fertilizantes orgánicos (fertilizantes que contienen componentes orgánicos los cuales directamente incrementan la fertilidad del suelo).

2.3 INOCULACIÓN DE BACTERIAS EN EL SUELO

Durante varias décadas, las bacterias han sido aplicadas a los suelos para aumentar el crecimiento de las plantas ya sea desde la aplicación directa al suelo del cultivo, las raíces ó a las mismas semillas antes de ser sembradas, un proceso llamado bacterización (Brown, 1974; Date, 1970; Gaskins *et al.*, 1985, citado en Elsas y Heijnen, 1990). Incluso ahora, existe un interés en la aplicación de bacterias beneficiosas para el suelo, en particular debido a las extensas posibilidades de mejora que ofrece la biotecnología moderna. Entre los objetivos más importantes está el aumento en la simbiosis o la fijación de nitrógeno asociado (Alexander, 1984; Stacey y Upchurch, 1984, citado en Elsas y Heijnen, 1990), la promoción del crecimiento de las plantas a través de la producción de reguladores de crecimiento (Burr y Caesar 1984; Gaskins *et al.*, 1985; citado en van Elsas and Heijnen, 1990), control biológico de las enfermedades de las plantas y el suelo (Watrud *et al.*, 1985, citado en Elsas y Heijnen, 1990), control biológico de las enfermedades de las heladas (Okon y Hadar, 1987; citado en van Elsas and Heijnen, 1990), y la degradación de componentes xenobióticos (Brunner *et al.*, 1985; citado en van Elsas yHeijnen, 1990).

La inoculación de leguminosas con su misma rizobia simbiótica (Thompson, 1980, citado en Bashan, 1986), es una práctica mundial muy común desde hace varias décadas, llevada a cabo por dos métodos: (i) inoculación directa con el cultivo bacterial, sumergiendo las semillas en el medio de cultivo, dispersión de la bacteria con spray, o adicionando la bacteria directamente a los surcos de siembra, y (ii) usando inoculantes bacteriales en fases sólidas basadas en materiales orgánicos, incluidas partículas granulares orgánicas. Ambos métodos son económicos, de fácil uso y tienen una fácil preparación tanto para el sector industrial como agrícola (Bashan, 1986b).

2.3.1 Inoculantes de PGPR

La inmovilización de enzimas y otros tipos de macro-moléculas han sido usadas en muchos sistemas donde debe haber liberación de las mismas, con aplicaciones médicas e industriales. Sin embargo, estos sistemas han sido limitados por problemas como (i) cantidad limitada de material absorbente en sistemas de liberación, (ii) liberación incontrolada de las sustancias, (iii) surgimiento de sistemas de matrices no degradables, y (iv) pobre biocompatibilidad de las matrices (Sun y O'Shea, 1985)

Un “portador” es un vehículo para liberar las PGPR hacia el campo. Sin una formulación adecuada, muchas PGPR promisorias nunca llegarán al lugar deseado. Un portador o formulación universal no está aún disponible (Tabla 1). Un buen portador tiene una característica esencial: la capacidad para liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento adecuado (Tabla 2 y Tabla 3). La Turba es el portador o vehículo más común para rizobia y muchas PGPR; sin embargo, formulaciones más avanzadas basadas en polímeros como alginato y formulaciones líquidas en agua y aceites, han sido constantemente evaluadas. Puesto que la turba ha llegado a su máximo desarrollo potencial y aún presenta dificultades en la liberación de las bacterias, parece que el futuro está en la producción sintética de vehículos en forma de macro y micro-perlas o polvos como recubrimientos de semillas (Bashan, 2005).

Dependiendo de la diversidad del clima y las plantas objetivo, un simple microorganismo puede ser formulado en diferentes formas, que pueden ser divididas en dos grupos: líquido y sólido seco. Todas las formulaciones, sin embargo, deben ser prácticas y económicamente viables, deben mantener vivo al microorganismo durante el almacenamiento con pérdidas mínimas de potencia/actividad y no pueden perder o disminuir sus propiedades (Jones y Burges, 1998).

Tabla 1. Tipos de inoculantes para bacterias promotoras del crecimiento de plantas (Bashan, 2005).

CATEGORIA	MATERIALES
Suelos	Turba, carbón, arcillas y suelos inorgánicos
Materiales residuales de plantas	Compost, estiércol de granja, miel de soya, aceite de soya y maní, salvado de trigo, residuos de industrias azucareras, material residual de agricultura, compostaje de hongos gastados y desechos de plantas
Materiales Inertes	Vermiculita, perlita, rocas de fosfato, sulfato de calcio, poliacrilamida, polisacáridos (p.e: alginato y carragenina).
Cultivos microbianos liofilizados	Medios de cultivo y crioprotectores

Couch e Ignofo, 1981, establecieron que el mínimo de tiempo que pueden perdurar los biopesticidas es de 18 meses en las condiciones de almacenamiento (Couch e Ignofo, 1981, citado en Jones y Burges, 1998). La estabilidad de un biopesticida no se puede alterar químicamente pero se puede tratar antes de la formulación con agentes estabilizantes y con un apropiado almacenamiento (Jones y Burges, 1998). Para controlar la humedad se pueden usar materiales higroscópicos como el Sílica Gel. En el control de pH se pueden requerir soluciones buffer, ya que un óptimo pH puede aumentar la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento. (Date, 1970, citado en Jones y Burges, 1998). Para minimizar los niveles de contaminación es bueno utilizar inoculantes y sustratos grado alimentos, mantener el pH de la solución lejos o fuera del pH óptimo para los contaminantes (Sherman, 1985, citado en Jones y Burges, 1998). Se puede

adicionar un producto (antibiótico) que no permita el crecimiento de contaminantes (Jones y Burges, 1998)

Tabla 2. Características de un inoculante para bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) (Bashan, 2005).

CARACTERÍSTICA	GRADO DE IMPORTANCIA
Liberar un adecuado número de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento adecuado.	****
Proveer una liberación lenta de la bacteria en períodos largos de tiempo (o períodos cortos en caso de bacterias biocontroladoras).	****
Uniforme, de calidad constante.	***
Que pueda contener poblaciones de bacterias grandes y uniformes.	***
De fácil manejo para el granjero.	***
No tóxica en la naturaleza, que no cause polución ecológica.	**
Aplicable con la maquinaria agrícola estándar.	**
Tiempo de vida suficiente (1-2 años a temperatura ambiente).	**
Relativamente pequeña en volumen y sin condiciones de refrigeración	**
Material de bajo costo	*
Biodegradable por los organismos del suelo	*

Fácil de manipular las propiedades químicas en relación a los requerimientos de la PGPB	*
Seca y sintética	*
Aplicable para varios tipos de bacterias	*

**** Básico y/o Esencial,

*** Muy importante,

** Importante,

* Poco importante

Tabla 3. Formulaciones de inoculantes para PGPR (Bashan, 2005)

FORMA DE DISPERSION	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	POPULARIDAD DE USO
Polvos	Recubrimientos de semillas antes de la plantación. Los tamaños varían desde 0.075 hasta 0.25mm	Muy común
Polvos húmedos	Inoculante tipo polvo suspendido en un líquido (generalmente agua). Goteos de la suspensión en los surcos o inmersión de las semillas antes de la siembra	Poco común
Granulares	Aplicada directamente a los surcos junto con las semillas. El rango de los tamaños está entre 0.35 y 1.18 mm.	Común
Líquidos	Las semillas son sumergidas dentro del inoculante antes de ser sembradas, o una aplicación del inoculante con spray en las semillas. Luego de de estar secas las semillas son sembradas	Común

Existe un amplio rango de tipos de formulaciones sólidas y líquidas, los tipos principales usados para microorganismos han sido clasificados por Rhodes (1993)

en productos secos (polvos, gránulos y bloques) y suspensiones (base aceite o base agua y emulsiones) (Jones y Burges, 1998).

2.3.2 Productos secos

Una clasificación basada en el tamaño del agregado abarca polvos, gránulos y bloques, incluidos polvos mojables diseñados para ser adheridos a corrientes líquidas, normalmente agua, después de su aplicación.

Polvos basados en diluentes o vehículos inertes, tienen normalmente una capacidad de absorción baja, aportando un grano de partícula en un rango de 5-20 mm. Las partículas de tamaños menores a 10 mm son abrasivas e insecticidas, y aunque generan peligros de inhalación, las partículas pequeñas se adhieren mejor. Estas formulaciones contienen menos del 10% por peso del organismo (Jones y Burges, 1998).

2.3.2.1 Gránulos, cápsulas, pellets y bloques: Los gránulos rodean un rango de tamaño de 5-10 mm³, los pellets son menores a 10 mm³ y los bloques son un poco mayores a centímetros cúbicos. Como los polvos, estos productos contienen un vehículo inerte que retiene los organismos. Los vehículos incluyen minerales arcillosos, polímeros de almidón, fertilizantes secos y residuos de plantas terrestres. Típicamente, la concentración del organismo es de 15-20%, usualmente 15% (Ross y Lembi, 1985). Estos productos no presentan peligros de inhalación, no se dispersan en el viento y pueden ser medidos y pesados fácilmente, en contraste a los productos en polvo (Jones y Burges, 1998).

2.3.2.2 Polvos mojables: Estos abarcan los productos comerciales y polvos técnicos, mezclados con aditivos para hacerlos más estables durante el almacenamiento y más fácilmente diluibles en agua. Como con otras

formulaciones, el agua clorada debe ser evitada para no causar daños a los organismos. La mayoría de estos productos contienen polvos técnicos, llenadores, dispersantes y surfactantes. Los llenadores deben ser inertes e hidrofílicos para que se mezclen bien con el agua. Los dispersantes neutralizan las interacciones atractivas asegurando que las partículas del producto técnico no ataquen las otras y permitiendo que se suspendan uniformemente cuando sean colocadas en una columna de agua. El surfactante ayuda a reducir la tensión superficial entre el líquido y el sólido y permite que el líquido se disperse bien sobre toda la partícula (Jones y Burges, 1998).

2.3.3 Suspensiones líquidas

Este grupo de formulaciones usan líquidos como vehículos, usualmente agua o aceite, aunque los solventes también son posibles.

2.3.3.1 Suspensiones concentradas: Son esencialmente suspensiones de organismos en líquidos. Están formados por partículas, ingredientes suspendidos, dispersante, surfactante y la corriente líquida, sea aceite o agua. Este tipo de producto debe soportar pequeñas fuerzas como el ponerlas en almacenamiento, pero debe fluir libremente cuando es sometido a fuerzas mayores. Los dispersantes reducen la velocidad de sedimentación de sólidos, los surfactantes actúan como emulsificantes para ser hidrofílicos, lipofílicos o un estado intermedio entre estos dos (Jones y Burges, 1998). La formación de un concentrado por suspensión de polvo picado finamente y seco en aceite incrementa la sedimentación comparado con la suspensión en agua. Para usar aceites con pesticidas biológicos, los aceites vegetales son preferibles que los aceites minerales (Couch e Ignoffo, 1981, citado en Jones y Burges, 1998).

2.3.3.2 Emulsiones: Las emulsificaciones reducen la sedimentación de las partículas durante el almacenamiento y en tanques de riego. Surfactantes

apropiados son requeridos para la formación de una emulsión estable. Una vez formada la emulsión ésta debe ser mantenida estable teniendo en cuenta que su separación y mezclado pueden ocurrir a temperaturas extremas, al igual que se afecta con condiciones extremas de agua y pH (Jones y Burges, 1998).

2.3.3.3 Cápsulas: Para este caso el organismo está contenido en unas pequeñas cápsulas. Sher, 1977, lista 22 materiales usados comúnmente en encapsulaciones, incluidos gelatina, almidón, celulosa y varios tipos de polímeros. Las cápsulas proveen buena protección contra factores ambientales como la luz solar y algunos químicos (Sher, 1977, citado en Jones y Burges, 1998) y aumentan la supervivencia de la bacteria en el cultivo.

Dependiendo del material usado para la encapsulación, las paredes se rompen para liberar el microorganismo por machacamiento, presión interna, disolución o por hidrólisis, pero nunca por la acción de otros químicos o por dilución (Jones y Burges, 1998).

2.3.4 Selección de un inoculante

Los inoculantes bacteriales han sido desarrollados con diferentes propósitos. De acuerdo a Paau, 1998, una simple estrategia para desarrollar un adecuado inoculante de *Rizobia* es escoger una cepa nativa que sea dominante, competitiva y específica para la región geográfica. La modificación de ésta cepa nativa, la cual era todavía competitiva pero con mayores capacidades para fijar el nitrógeno, ha sido usada como inoculante en regiones de donde la cepa original fue aislada (Paau, 1989, citado en Van Elsas y Heijnen, 1990).

Para que los inoculantes bacterianos sean efectivos en el suelo, se deben ofrecer las condiciones óptimas para su supervivencia luego de la liberación. Se ha

obtenido una gran cantidad de información al introducir la bacteria en el suelo, en el laboratorio o en el campo. En algunos casos se ha observado, la disminución progresiva en el número de bacterias luego de su introducción, generando una especulación de que si la bacteria introducida en el suelo encuentra y entra en la protección de un micro-nicho puede sobrevivir en el medio (Van Elsas *et al.*, 1986; Heijnen *et al.*, 1988; Postma *et al.*, 1988, citados en Van Elsas y Heijnen, 1990). En general existen muchas teorías de factores que pueden influir fuertemente en la supervivencia de los microorganismos en el suelo, entre ellos pH, temperatura, estructura y textura del suelo, contenido de humedad, etc. y de igual forma muchos investigadores, también plantean maneras de mejorar dichas condiciones para prolongar la supervivencia de las bacterias y optimizar sus condiciones de vida de forma que no se vean afectadas las actividades metabólicas de interés.

Existe una gran brecha entre la mayoría de datos de la supervivencia de bacterias en el suelo, y los datos de los protocolos usados por la industria de los inoculantes (principalmente de rizobias) con respecto a la supervivencia bacteriana en varios materiales portadores. En general existe una ignorancia particular acerca de la supervivencia de las bacterias en los inoculantes durante la transición desde una protección relativa dada por el inoculante hasta las condiciones difíciles del suelo; la bacteria introducida puede estar expuesta a las condiciones del suelo, a la degradación del vehículo o a la perturbación del suelo (Van Elsas y Heijnen, 1990). En contraste, algunos vehículos (p.e., a base de turba o arcilla) pueden proveer un hábitat protector para el inóculo a través de la modificación de la estructura del suelo, y el potencial de supervivencia puede ser más alto. Además, una vez la estructura del suelo ha sido positivamente modificada, futuros inóculos pueden tener más éxito (Van Elsas y Heijnen, 1990).

Los inoculantes bacteriales pueden ser establecidos directamente en el suelo, o pueden ser inoculados en los tejidos de las plantas o sus semillas. La inoculación

directa al suelo puede ser preferida cuando la inoculación en los tejidos de la planta es nociva para el inóculo, debido a la presencia, por ejemplo, de componentes inhibidores o microorganismos antagónicos (Gindrat, 1979). Además, debido a circunstancias desfavorables (altas temperaturas) durante el almacenamiento del inóculo, estas pueden disminuir fuertemente el número de células viables en el material inoculante (Chao y Alexander, 1984 citado en van Elsas and Heijnen, 1990),). Los materiales portadores pueden ser usados tanto en la inoculación de semillas o tejidos como en suelo. Con la inoculación de semilla se usan materiales adhesivos los cuales aumentan el contacto entre la semilla y el portador y pueden proteger la bacteria de la desecación (Elegba y Rennie, 1984; citado en van Elsas and Heijnen, 1990).

La estrategia para escoger un inóculo es a veces importante para la efectividad del inoculante, probablemente porque el ambiente fisicoquímico en el cual las células bacteriales están contenidas son determinantes en su suerte y supervivencia. Los vehículos pueden ser usados tanto para semillas, tejidos o suelo y la inoculación en gran parte será similar. Thompson (1980) publicó los resultados de una de sus investigaciones en la que comparó inoculantes a base de agar, caldos, cultivos secos y polvos, encontrando que los materiales orgánicos en polvo, especialmente basados en turba, son los más efectivos como inoculantes de rizobia (Van Elsas y Heijnen, 1990).

2.3.5 Inoculantes

2.3.5.1 Formulaciones para micro-encapsulación con Alginato: El principal propósito de estas perlas es inmovilizar o entrapar el organismo de interés por un largo periodo de tiempo. Algunos reportes sugieren el uso de ciertos geles poliméricos para inmovilizar hongos y bacterias para ser usados como inoculantes agrícolas. Bashan es uno de los investigadores que más ha experimentado con Alginato y propuso en 1986a, un método de micro-encapsulación bastante

sencillo donde el contacto del Alginato con cloruro de calcio genera un intercambio de iones solidificando el Alginato y convirtiéndolo en pequeñas perlas que contienen a las bacterias (Bashan, 1986a). Este material y método propuestos por Bashan, han sido ampliamente estudiados por otros investigadores y algunos les han generado modificaciones con el fin de mejorar o variar la técnica; entre ellos están Young *et al.*, 2006, quienes encapsularon *Bacillus subtilis* en perlas de alginato enriquecidas con Acido Húmico aprovechando sus beneficios sobre los microorganismos y las plantas y las propiedades químicas que le permiten un fácil mezclado con el alginato sin alterar la reacción con el cloruro de calcio . De igual forma otros investigadores han trabajado este mismo material, entre ellos Trivedi *et al.*, 2005, quienes desarrollaron varias formulaciones a base de rizobacterias con las que pretendían evaluar la promoción del crecimiento, colonización de la rizosfera y viabilidad bajo almacenamiento, encontrando que el mayor número de bacterias inoculadas fueron recuperadas en el caso de las formulaciones a base de alginato, luego de 6 semanas de haber sido sembradas y la viabilidad de las formulaciones también fue máxima en las perlas de Alginato luego de 180 días de almacenamiento a 4°C (Trivedi, Pandey y Palni, 2005).

2.3.5.2 Formulaciones en polvo con talco y caolín: Los organismos pueden ser formulados en polvos concentrados secos o mojados para fácil almacenamiento, transporte y aplicación. Dependiendo de sus materiales componentes, esos polvos pueden ser aplicados al suelo de diferentes formas: (i) directamente al suelo sin futuras manipulaciones; (ii) suspendidos en agua u otros vehículos para aplicaciones en spray; o (iii) espolvoreados para liberar organismos sobre las semillas. El primer método, sin embargo, no es aconsejable bajo condiciones de posibles vientos (Van Elsas y Heijnen, 1990).

Los materiales talco y caolín han sido ampliamente estudiadas por diferentes investigadores como Vidhyasekaran *et al.*, 1997, quienes encontraron que una

formulación de *P. fluorecens* a base de talco fue efectiva, aún, después de 60 días de almacenamiento, mientras que las formulaciones a base de caolín, vermiculita y lignina tuvieron un periodo de vida útil más corto. Otro estudio realizado con base en una formulación con estos materiales y *B. subtilis* y *P. putida*, fue realizado por Amer y Utkhede, 2000, quienes evaluaron los efectos de varios vehículos sobre la germinación, crecimiento y rendimiento en cultivos de lechuga y pepino. En dicha investigación se encontró que la población de *B. subtilis* fue significativamente más alta en vermiculita, caolín y suspensión bacteriana; la germinación de las semillas de lechuga no se vio afectada por la vermiculita, el talco, caolín o la turba, y la de las semillas de pepino no se vio afectada por ninguno de los vehículos. De igual forma, los pesos más altos de lechuga y raíz frescas fueron observados en las plantas inoculadas con *B. subtilis* y vermiculita o caolín en comparación con el testigo no inoculado (Amer y Utkhede, 2000).

Una gran ventaja de estos materiales es su carácter mineral el cual provee un medio natural a la bacteria sin generarle estrés químico, además de tener texturas suaves, por lo que incluso son usadas en la industria cosmética y alimenticia. Estos polvos son muy malos conductores de calor de forma que pueden también proveerle a la bacteria un ambiente fresco.

Por otro lado, Dandurand *et al.*, 1994, probaron la capacidad de algunos minerales de aumentar la habilidad de supervivencia de las bacterias a la deshidratación, encontrando que los minerales que formaron menor tamaño de partícula en la formulación, p.e. vermiculita y zeolita, aumentaron más la supervivencia bacteriana que las formulaciones con mayor tamaño de partícula, como las formadas por talco y caolín.

2.3.5.3 Formulaciones granuladas con harina: Generalmente, los gránulos son fáciles de manejar y aplicar, y son menos industriales que los polvos. Estos son, sin embargo, más voluminosos y tienen altos costos en materiales, transporte y

almacenamiento. Los gránulos, secos y húmedos, son apropiados para aplicaciones en surcos y propagación. Algunos gránulos pueden ser fabricados de forma que ellos se desintegren en el momento en que haya suficiente humedad. Dichos gránulos, llamados dispersables con agua, son apropiados para aplicaciones en spray (Van Elsas y Heijnen, 1990).

2.3.6 Métodos de aplicación de bacterias al suelo

Las rizobacterias se pueden aplicar en diversas partes de la planta de manera combinada. Esto se hace que se maximice el efecto de promoción del crecimiento de la planta. Algunos de estos tratamientos de acuerdo con Nakkeeran *et al.*, 2002 son:

- Tratamiento a la semilla
- Inmersión de la semilla en una solución de Rizobacterias
- Aplicar al suelo
- Aplicar a las hojas
- Aplicar al fruto

Como se acaba de nombrar, existen muchos métodos, con éxito, de liberación de productos inoculantes en el suelo cerca de las raíces o la rizósfera. Para proteger las semillas y llegar al sistema radical, los inoculantes pueden ser alimentados directamente a la semilla antes de ser sembradas en el surco. Si las semillas por sí solas no son usadas como vehículo, el inoculante es normalmente aplicado en el surco, seguido de la siembra de la semilla. Los inoculantes granulares son aplicados a través de una unidad de ruda dentada con un piñón, desde determinada distancia una vez predeterminada la cantidad deseada a aplicar. La suspensión fluida puede ser aplicada con un simple sistema de irrigación suave (por goteo) o por dispersión con una bomba mecánica o eléctrica (Paau, 1998). Para aplicar los inoculantes en la rizosfera, la difusión con partículas granulares de esparcimiento o fumigación son los métodos más comunes. Estas aplicaciones

son normalmente seguidas de una labranza de la tierra para incorporar rápidamente el inoculante en el suelo, con el fin de proteger los microorganismos de la deshidratación y de la exposición a los nocivos rayos solares (Paau, 1998).

2.4 ANTECEDENTES DE TRABAJOS REALIZADOS CON RIZOBACTERIAS

2.4.1 Pruebas en diversos cultivos

En la actualidad se han reportado muchas investigaciones sobre las Rizobacterias como agentes promotores del crecimiento en plantas a través de métodos directos por medio de la producción de sustancias reguladoras de crecimiento (PGR's) (Zahir *et al.*, 2004), o por acción indirecta mediante el biocontrol de patógenos (Van Loon *et al.*, 1998; Whipps, 2001).

El trabajo de bacterización realizado con *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas* spp. ha sido estudiado por Cooper, 1959, y Mishustin y Naumova, 1962. Los resultados de la bacterización han sido extremadamente variables (Mishustin y Naumova, 1962; Burr y Caesar, 1984, citados en Elsas y Heijnen, 1990), en los cuales el mayor obstáculo ha sido el desarrollo de una tecnología inoculante efectiva. El mayor problema es que el suelo forma un ambiente completamente heterogéneo e impredecible para introducir organismos (Hattori y Hattori, 1976; Richards, 1987, citados en Elsas y Heijnen, 1990). La bacteria ya en el suelo puede tener luego grandes dificultades en encontrar un nicho adecuado para sobrevivir por largos periodos y en condiciones extremas (Van Elsas y Heijnen, 1990).

Dentro de los registros presentados, mostrando efecto benéfico por la inoculación de bacterias sobresale el señalado por Chen en 1996, y que es citado por Bowen y Rovira (1999) y Zahir *et al.*, (2004). Se resalta que en 1990 en China se inocularon PGPR, en un área de 3.3 millones de hectáreas en 18 provincias y

diversos cultivos, entre los cuales se tenían: trigo (con un incremento en producción de 8.5-16%), arroz (8.1-16%), maíz (6-11%), sorgo (5-10%), papa (15-19%), algodón (6-13%), canola (11-18%), frijol (7-16%), remolacha azucarera (15-20%), sandía (16-18%), maní (10-15%), y vegetales (13-35%) (Ramírez, 2006).

A nivel de biocontrol la mayor parte de los casos exitosos con PGPR's están relacionados con patógenos del suelo en diferentes cultivos, algunos de estos reportes están dados por supresión de *Fusarium* spp. atacando rábano (Leeman *et al.*, 1995a y 1995b), tomate (Duffy y Défago, 1997), garbanzos (Landa *et al.*, 2004), pepino (Liu *et al.*, 1995a), espárragos (Pérez y Leguizamón, 1998), clavel (Van Peer *et al.*, 1991) y banano (Smith *et al.*, 2003). Igualmente, Kloepper *et al.*, (1999) indican que, además de *Fusarium*, otros patógenos habitantes del suelo tales como *Aphanomyces* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Thielaviopsis basicola* y *Verticillium* spp., han sido afectados negativamente por la aplicación de PGPR's. (Ramírez, 2005)

2.4.2 Pruebas en Banano

En la búsqueda de información respecto a la promoción o estimulación del crecimiento de plantas con la inoculación de rizobacterias es muy común encontrar muchas de las investigaciones enfocadas al estudio de cultivos con maíz, trigo, tomate y lechuga, entre otros; pero no son muchas las publicaciones acerca de estudios con banano o especies parecidas. A pesar de esto, se logró encontrar algunos estudios provenientes de países como Costa Rica en su mayoría relacionados con el tratamiento de la Sigatoka negra los cuales se cita en la Tabla 4.

Tabla 4. Publicaciones de PGPR aplicadas en cultivos de Banano.

INVESTIGADOR	PROYECTO	RESULTADOS

González (1995) Costa Rica	Búsqueda de microorganismos antagónicos a <i>M. fijiensis</i> y evaluación de eficacia en invernadero y campo	M i c r o o r g a n i s m o s quitinolíticos con resultados de 84% en el control de Sigatoka
Gutiérrez (1996) Costa Rica	Inducción de resistencia a <i>M. fijiensis</i> y promoción de crecimiento con aplicación directa y en sustrato	Promoción del crecimiento en el área foliar y reducción del porcentaje de infección.
Patiño (2007) Costa Rica	Promoción del incremento de población nativa quitinolítica y glucanolítica con efectos directos sobre la <i>M. fijiensis</i>	Reducción de un 43 y 46% en los ciclos fungicidas convencionales

En Colombia, Ramírez, 2005, ha reportado un trabajo de investigación, en el cual realizó el aislamiento de cepas nativas de raíces de plantas de banano y plátano en cultivos de Urabá (Antioquia, Colombia) a las que se les evaluó la presencia de rasgos bioquímicos y fisiológicos asociados con biocontrol y promoción del crecimiento vegetal. En los resultados encontrados por Ramírez, varios aislados de bacterias en conjunto mostraron rasgos similares relacionados con biocontrol y promoción del crecimiento vegetal; de los aislados, 5 mostraron rasgos específicos de PGPR por lo que fueron evaluados en plantas de banano de forma individual y combinados sin mostrar, en ningún caso, síntomas de infección sobre los tejidos del vegetal. Uno de estos 5 aislados bacteriales, identificado como *P. putida* marcada como UA44, mostró una respuesta positiva en la posible producción de sideróforos y en la producción de quitinasas, glucanasas y deaminasas, las cuales son enzimas que permiten que la bacteria pueda degradar compuestos de la pared de patógenos fúngicos, pudiendo provocar la ruptura de la pared y la posterior lisis celular.

Posterior a esta investigación, la cepa nativa asilada fue modificada por Pérez, 2007, quien le indujo resistencia a Rifampicina a través del protocolo propuesto por Glandorf *et al.*, 1992, siendo ésta bacteria, la base de la presente investigación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- Agar Tripticasa de Soya (Merck)
- Caldo Tripticasa de Soya (Merck).
- Agua destilada
- Cristal violeta Merck
- Lugol
- Safranina
- Alcohol-cetona.
- Turba Canadiense (Sementes)
- Frijol Calima (Agrosemillas).
- Musa AAA (Banano) cultivar gran enano.
- Sustrato de Germinación 1 (Ecoflora).
- Talco (Protoquímica)
- Caolín (Protoquímica).
- Alginato de sodio (SIGMA)
- Harina de trigo –Grado alimento- (CORONA, Nacional de Chocolates)
- Tween 80
- Triple 15 (Nutrimon)
- Wuxal tapa negra (Bayer CropScience)
- Ácido sulfúrico (Merck)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Ácido Húmico (EXCELCHEM)
- Ácido Indol Acético

3.2 EQUIPOS

- Asa bacteriológica
- Autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T
- Balanza Adventurer™ OAUS con precisión 0.01 gr.
- Centrífuga universal marca Hettich
- Agitador orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC C1 Classic Series de 1 plg.
- Bomba peristáltica
- Espátula de Drigalski
- Espectrofotómetro Helios Gamma. UV-Visible (Cole Parmer).
- Horno Jeiotech OF-026
- Incubadora WTBinder
- Material volumétrico: beakers, erlemeyers, balones volumétricos, probetas, cajas Petri etc.
- Micropipeta 1 mL, 10 mL, 100 mL.
- Microscopio binocular marca Ecko
- Shaker New Brunswick Science
- Tubos eppendorff 2 mL, tubos falcon 20 mL y 45 mL.
- Bandejas 18 puestos

3.3 DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1 Ubicación:

Las fermentaciones, pruebas y análisis correspondientes a este trabajo, se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y en el invernadero de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín.

3.3.2 Microorganismo:

Se utilizó la rizobacteria *P. putida* UA 44MR-1 (Figura 1) resistente a rifampicina (Pérez, 2007). y conservada en TSB + 20% glicerol en crioviales con tapa rosca. La bacteria fue aislada del suelo bananero de Urabá – Antioquia por Cenibanano y modificada por mutación inducida a rifampicina por el grupo de Investigación de Control Biológico de la Universidad de Antioquia (Ramírez, 2005)

El microorganismo fue repicado adicionando 50 µL del criovial en TSA 50% con 100 ppm. de rifampicina, y esparciendo el volumen con una espátula de Driglaski previamente esterilizada. Las cajas Petri fueron incubadas por 4 días a 28°C en oscuridad y la biomasa obtenida fue recolectada en Criobanks por 25 perlas de porcelana (figura 2) y almacenadas a -10°C garantizando su composición bioquímica, morfológica y molecular, para la utilización en posteriores estudios.

Para generar las cepas de trabajo se tomó una perla del criovial con un asa de siembra y se extendió sobre la superficie de una caja Petri con TSA 50% y 100 ppm. de rifampicina incubada a 28 °C por 4 días y posteriormente refrigerada a 4 °C por períodos inferiores a un mes.

Todos los materiales y medios de cultivo fueron esterilizados en la autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T a 121 ° C por 15 minutos y 15 psig.

Figura 1: Tinción Gram de *P. putida* UA 44MR-1.

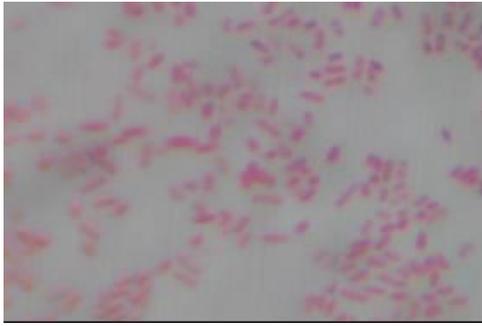


Figura 2. Crioviales por 25 perlas de porcelana



3.3.3 Capacidades bioquímicas.

3.3.3.1 Prueba de ácido indol acético (AIA): La prueba de producción de ácido indol acético (AIA) se realizó en condiciones *in vitro*, colocando dos colonias de *P. putida* UA 44MR-1 en 50 mL de TSB con 500 ug/mL de triptófano en un erlenmeyer de 250 mL, equivalentes a 0.4 g. de caldo Triptófano (compuesto por 1 g. de triptófano/ 16 g. de caldo). La fermentación se mantuvo por 48 h a 150 rpm y 28 °C. Finalmente la biomasa fue centrifugada a 4500 rpm por 15 minutos y 4 °C. Para la determinación del AIA se tomaron 2 mL del sobrenadante y se

mezclaron con un volumen igual de la solución de Salkowski (150mL de H₂SO₄ concentrado, 250 mL de Agua destilada, 7,5 mL de FeCl₃·6H₂O 0,5M). La mezcla fue agitada en vortex y se dejó reposar por 20 minutos. Al cabo de dicho tiempo, se determinó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro Helios Gamma. UV-Visible (Cole Parmer). Se realizaron dos ensayos con su duplicado respectivo, para determinar los indoles totales producidos.

Para determinar la concentración en ug/mL del sobrenadante se realizaron dos curvas de referencia preparando una solución stock de 1 mg/mL de AIA (0.1 g de AIA en 100 mL de etanol) la cual fue almacenada en el congelador. La primera se realizó con agua destilada y la solución stock. La segunda se realizó utilizando medio de cultivo TSB, en lugar de agua destilada y la solución stock; esto se efectuó con el fin de determinar si el medio de cultivo aportaba color a la medición. Las anteriores mezclas fueron medidas en espectrofotómetro a una longitud de onda 530 nm y se construyeron las curvas de calibración de concentración vs densidad óptica.

En la tabla 5. Se observa los estándares utilizados para la construcción de esta tabla de referencia.

Tabla 5. Estándares de curva de referencia para AIA.

AIA µg / mL	SOLUCIÓN
10	0.1 mL de solución stock + 9.9 mL de agua destilada estéril o medio de cultivo TSB.
20	0.2 mL de solución stock + 9.8 mL de agua destilada estéril o medio de cultivo TSB.
30	0.3 mL de solución stock + 9.7 mL de agua destilada estéril o medio de cultivo TSB.
40	0.4 mL de solución stock + 9.6 mL de agua destilada estéril

	o medio de cultivo TSB..
50	0.5 mL de solución stock + 9.5 mL de agua destilada estéril o medio de cultivo TSB..

3.3.3.2 Medición de la capacidad quitinolítica de las cepas: Para determinar la capacidad quitinolítica de la *P. putida* UA44MR-1 se emplearon tres medios sólidos con quitina coloidal. El medio 1 compuesto por 20 g/L de agar nutritivo con 8 g/L de quitina coloidal (Salazar, 2005.). El medio 2 compuesto por 15 g/L de Agar-agar con 8 g/L de quitina coloidal (Salazar, 2005; Hallman *et al.*, 1998.) y el medio 3 a base de sales con 8 g/L de quitina coloidal. Las sales de medio 3 se listan en el ANEXO 1.

3.3.4 Obtención de biomasa de *P. putida* UA44MR-1:

La preparación del pre inóculo se realizó en erlenmeyers de 250 mL con 40 mL de medio TSB, e inoculados con dos asadas de *P. putida* UA 44MR-1 provenientes de cajas Petri preparadas a partir del sistema de perlas. Los erlenmeyers fueron llevados a un agitador orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC C1 Classic Series de 1 plg a una temperatura de 28° C durante 24 horas.

La producción de biomasa de *P. putida* UA44MR-1 se llevó a cabo en un erlenmeyer de 1000 mL con 360 mL de TSB y 40 mL de pre inóculo (10% del volumen total), a 150 rpm, 28° C por 36 horas. La toma de muestras para la determinación de biomasa por peso seco, y densidad óptica a 600 nm se realizó cada 2 horas por duplicado, y las unidades formadoras de colonia (UFC) se determinaron en la fase estacionaria a las 33 horas por el método de dilución en placa.

Todos los materiales y medios de cultivo fueron esterilizados en la autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T a 121° C por 15 minutos y 15 psig.

3.3.5 Determinación de biomasa.

3.3.5.1 Peso seco: Para las mediciones de biomasa por peso seco se tomaron muestras de 1 mL del cultivo en eppendorfs de 2 mL previamente secados en la mufla a 50 °C durante 24 horas y pesados, se llevaron a la centrifuga durante 20 minutos a 14000 rpm y 4°C. Una vez se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se llevaron los eppendorfs a la mufla a 50 °C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se pesaron los eppendorfs y la diferencia entre el peso del eppendorf lleno y el eppendorf vacío corresponde al peso de la biomasa, según la siguiente ecuación 1:

Ecuación 1.

3.3.5.2 Densidad óptica: Para las mediciones de densidad óptica se tomaron muestras de 1 mL del cultivo en eppendorfs de 2 mL y se centrifugaron a 14000 rpm y 4 °C durante 20 minutos. Los pellets se re suspendieron en 1 mL de sulfato de magnesio 0.1 M y se leyó la OD en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

3.3.5.3 Determinación de UFC: El conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) determina el número de colonias de bacterias viables que se obtienen en la fermentación. Para el conteo de UFC, se tomaron muestras de 1 mL del erlenmeyer en la fase estacionaria, en condiciones de asepsia, en un tubo de ensayo previamente esterilizado. Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para realizar el método de dilución en placa. Se agregaron 100 μ L en cada caja Petri de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} La biomasa fue esparcida de manera circular sobre la superficie del agar usando una espátula de Drigalski y rotando la

caja Petri. Cada ensayo se realizó por duplicado en cajas Petri con TSA al 50%. Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C por 24 horas aproximadamente e invertidas para evitar que el vapor de agua condensado cayera sobre la superficie del medio. Posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias en aquellas diluciones en donde existieran entre 30 y 300 UFC por caja (Shuler y Kargi, 1992) y se realizó el cálculo de UFC/mL según la ecuación 2:

Ecuación 2.

- C: número de colonias en toda la caja Petri (UFC).
 D: factor de dilución
 V: volumen sembrado (mL)

3.3.6 Formulaciones

Las formulaciones desarrolladas se pueden observar en la tabla 6, en donde están tabuladas según su composición, estado líquido o sólido y cultivo de aplicación.

Tabla 6. Formulaciones con base en *P. putida* UA44 MR-1

FORMULACIÓN	COMPOSICIÓN	ESTADO	CULTIVO APLICADO
TALCO	<ul style="list-style-type: none"> • Talco • Carbonato de calcio • Carboximetil celulosa de sodio. • <i>P. putida</i> UA44MR-1 	SÓLIDA	FRIJOL BANANO

CAOLÍN	<ul style="list-style-type: none"> • Caolín • Carbonato de calcio • Carboximetil celulosa de sodio. • <i>P. putida</i> UA44MR-1 	SÓLIDA	FRIJOL
MACRO-PERLAS DE ALGINATO + ÁCIDO HÚMICO	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato de sodio • Acido Húmico • Cloruro de calcio • <i>P. putida</i> UA44 MR-1 	SÓLIDA	FRIJOL
MACRO-PERLAS DE ALGINATO	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato de sodio • Cloruro de Calcio • <i>P. putida</i> UA44MR-1 	SÓLIDA	FRIJOL
HARINA	<ul style="list-style-type: none"> • Harina • Agua + Tween 80 • Dextrosa • Aceite vegetal. • <i>P. putida</i> UA44MR-1 	SÓLIDA	FRIJOL BANANO
SUSPENSIÓN BACTERIAL	<ul style="list-style-type: none"> • Agua. • <i>P. putida</i> UA44MR-1 	LÍQUIDA	FRIJOL

3.3.6.1 Procesos de producción de las formulaciones: Para todos los procesos de producción de las formulaciones, la *P. putida* UA 44MR-1 fue obtenida según lo descrito en el numeral 5.3.3.

3.3.6.1.1 Talco y caolín: Las formulaciones con base en talco y caolín se realizaron según la metodología propuesta por (Vidhyasekaran y Muthamilan 1995).

La fermentación de *P. putida* UA44MR-1 de 36 horas de cultivo fue centrifugada en tubos falcon de 15 mL a 4500 rpm y 4 °C por 20 minutos y re-suspendida en agua destilada estéril en una relación 1:1. Por cada 400 mL de suspensión bacterial se utilizaron 1 kg de mineral (Talco o caolín), 15 g de CaCO₃ y 10 g de CMC.

El mineral y el carbonato fueron previamente mezclados y autoclavados a 121 °C y 15 psig por 1 hora, mientras que la CMC fue autoclavada bajo las mismas condiciones, pero en un recipiente diferente. Una vez estériles todos los materiales, la suspensión bacterial fue adicionada al mineral y al carbonato de calcio y mezclada bajo condiciones estériles. La mezcla fue extendida en una bandeja y secada a temperatura ambiente por dos días. Una vez seca se adicionó la cantidad de CMC respectiva.

3.3.6.1.2 Macro-perlas de alginato y ácido húmico: Las perlas de alginato fueron preparadas de acuerdo con el método publicado por Bashan (1986a) con algunas modificaciones propuestas por Young *et al.*, en el 2006 las cuales consisten en la adición de ácido húmico y glicerol a la formulación original.

Una mezcla de 25 mL de ácido húmico al 10% y 7.5 mL de glicerol al 30% fueron mezclados con una solución de alginato de sodio al 2% para obtener un volumen final de 250 mL. La fermentación de *P. putida* UA44MR-1 de 36 horas de cultivo fue centrifugada en tubos falcon de 15 mL a 4500 rpm y 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue re suspendido en la solución de alginato de sodio y ácido húmico en una relación 1:1. La mezcla fue bombeada a una solución de CaCl₂ 0.1 M con agitación constante por medio de un montaje esquematizado en la figura 4. Los tubos falcon, erlenmeyers y soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio fueron previamente esterilizados a 121 °C y 15 psig por 15 minutos. Una vez las gotas se sumergieron en la solución de cloruro de calcio se formaron las perlas por medio de la formación de alginato de

calcio (insoluble en agua). Con el fin de lograr endurecer las macro-perlas, estas permanecieron en la solución con agitación durante 3 horas (Bashan, 1986a).

Posteriormente la solución restante fue descartada y las perlas fueron enjuagadas dos veces con agua destilada estéril y almacenadas en una solución salina 0.85% w/v en frascos herméticamente cerrados.

3.3.6.1.3 Macro perlas de alginato: La fermentación de *P. putida* UA44MR-1 de 36 horas de cultivo fue centrifugada en tubos falcon de 15 mL a 4500 rpm y 4°C por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue re suspendido en una solución de alginato de sodio al 2% (w/v) en una relación 1:1. La mezcla fue bombeada a una solución de CaCl₂ 0.1 M con agitación constante por medio del montaje esquematizado en la figura 3. Los tubos falcon, erlenmeyers y soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio fueron previamente esterilizados a 121 °C y 15 psig por 15 minutos.

Figura 3. Proceso de producción de macro-perlas de alginato. a) fotografía del montaje, b) esquematización del montaje.

a



b

Bomba

Jeringa

CaCl₂

Alginato de sodio +

Una vez las gotas se sumergieron en la solución de cloruro de calcio se formaron las perlas por medio de la formación de alginato de calcio (insoluble en agua). Con el fin de lograr endurecer las macro perlas, estas permanecieron en la solución durante 3 horas (Bashan, 1986a)

Posteriormente la solución restante fue descartada y las perlas fueron enjuagadas dos veces con agua destilada estéril y almacenadas en una solución salina 0.85% w/v en frascos herméticamente cerrados.

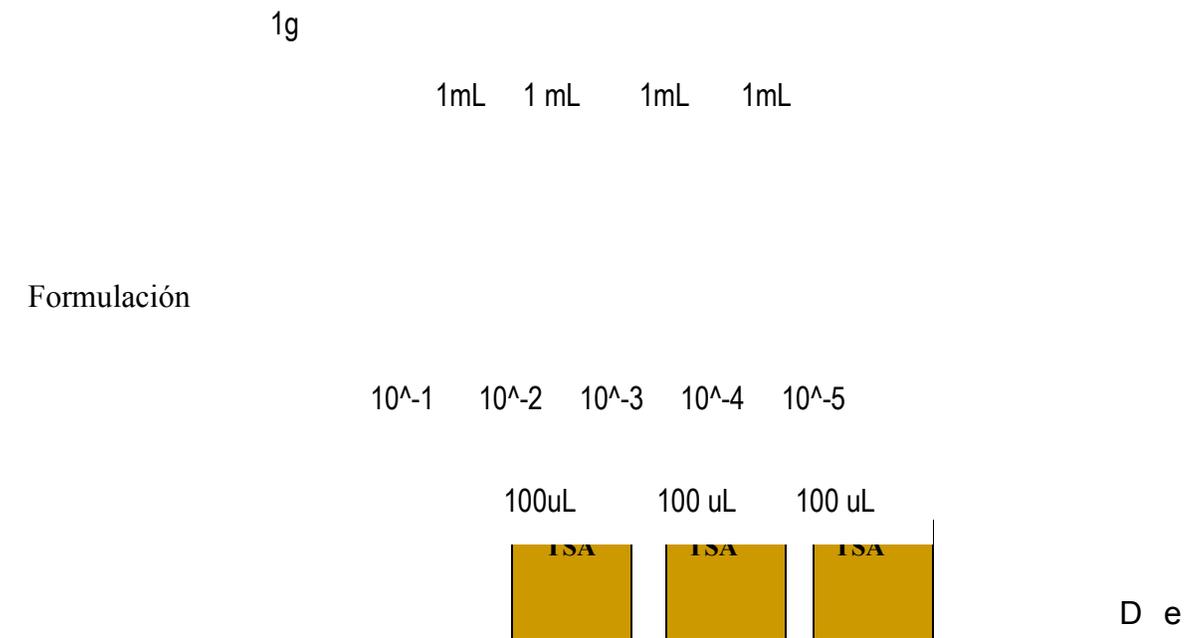
3.3.6.1.4 Harina: La fermentación de *P. putida* UA44MR-1 de 36 horas de cultivo fue centrifugada en tubos falcon de 15 mL a 4500 rpm y 4°C por 20 minutos y re-suspendida en una solución de Tween 80 al 0.05% en una relación 1:1. Por cada 400 mL de suspensión bacterial se utilizaron 750 g de harina de trigo, 200 g de dextrosa, 50 g de caolín mineral y 200 mL de aceite vegetal. La harina, la dextrosa y el caolín fueron mezclados previamente y esterilizados en un recipiente independiente del aceite vegetal. Adicionalmente, se esterilizaron jeringas de boquilla ancha. En condiciones estériles, se fueron mezclando lentamente las células re-suspendidas, el aceite y la mezcla de harina. La masa formada fue esparcida con las jeringas en una bandeja limpia y desinfectada para dejarla secar a temperatura ambiente.

3.3.6.1.5 Suspensión bacterial: La fermentación de *P. putida*UA44MR-1 de 36 horas de cultivo fue centrifugada en tubos falcon de 15 mL a 4500 rpm y 4°C por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue re-suspendido en agua destilada estéril.

3.3.7 Evaluación de la viabilidad de las formulaciones:

La viabilidad de las formulaciones se realizó mensualmente durante 3 meses. Las formulaciones fueron almacenadas a 4 °C y 22 °C y se determinó las UFC/g por el método de dilución en placa.

Figura 4. Método de diluciones seriadas en placa.



de cada formulación se tomó 1 g y se disolvió en 9 mL de buffer fosfato de potasio pH 7.0, se agitó por 30 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁵ (Figura 4) y se platearon 100 uL de las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁵ en TSA

al 50% más 100 ppm. de rifampicina. Las cajas Petri fueron incubadas a 28°C de 3 a 5 días para el conteo de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL)

3.3.8 Dosis:

Las dosis utilizadas durante la experimentación en frijol y en banano a nivel de invernadero, se pueden observar en la tabla 7.

Tabla 7. Dosis utilizadas en frijol y banano

FRÍJOL

DOSIS				
	1/10	18 g	4.5×10^7	8.1×10^9
	1/25	7.2 g	1.8×10^7	3.2×10^9
	1/50	3.6 g	9.0×10^6	1.6×10^9
	1/10	10 mL	2.5×10^6	2.5×10^7
	1/100	10 mL	2.5×10^4	2.5×10^5
	1/1000	10 mL	2.5×10^2	2.5×10^3

BANANO

	1/10	20 mL	$3,6 \times 10^5$	9×10^8
--	------	-------	-------------------	-----------------

3.3.9 Pruebas en frijol

Las pruebas de promoción de crecimiento se llevaron a cabo en la planta indicadora *Phaseolus vulgaris* variedad Calima de Agrosemillas Ltda. y con las formulaciones desarrolladas con base en *P. putida* UA 44MR-1.

La germinación de las semillas de frijol se realizó sumergiéndolas en agua por 1 hora y posteriormente fueron sembradas en Turba Canadiense en bandejas de 18 puestos, con tres semillas por puesto en el Invernadero de la Universidad EAFIT. Transcurridos 7 días se escogieron plantas de aproximadamente igual tamaño (longitud de tallo) y fueron trasplantadas en Turba Canadiense en bandejas de 18 puestos con una planta por puesto. Cada tratamiento consistió de 9 plantas y fueron inoculadas según el experimento establecido (Tabla 6).

Los experimentos llevados a cabo fueron 4, los cuales se pueden detallar en la Tabla 8

Tabla 8. Experimentación en frijol.

EXPERIMENTO	TRATAMIENTOS	INOCULACION
E1	T:Talco, C:Caolín, A:Macro-perlas de Alginato, S : Suspensión bacteriana, Te: Testigo negativo	4.5x10 ⁷ 1.8 x 10 ⁷ 9.0 x 10 ⁶
E2	T: Talco, AH : Alginato más ácido húmico, H: Harina, S: Suspensión bacteriana, Te: Testigo negativo	4.5x10 ⁷ 1.8 x 10 ⁷ 9.0 x 10 ⁶
E3	A:Macro-perlas de Alginato , AH : Alginato más ácido húmico , T: Talco, C: Caolín, S : Suspensión bacteriana,	9.0 x 10 ⁶

	Te: Testigo negativo, ASB:Macro-perlas de Alginato sin bacterias, AH : Alginato más ácido húmico sin bacterias, TSB: Talco sin bacterias, CSB: caolín sin bacterias,	
E4	T: Talco, C: Caolín, H: Harina, S : Suspensión bacterial, Te: Testigo negativo, TS: Talco sin bacterias, CS: caolín sin bacterias, HS: Harina sin bacterias	2.5 x 10 ⁶ 2.5 x 10 ⁴ 2.5 x 10 ²

A cada experimento se le realizaron las siguientes mediciones (Figura 5) para determinar la promoción de crecimiento:

- Longitud de tallo inicial y final: se determinó desde la base del tallo hasta el último vértice de la planta.
- Longitud de raíz inicial y final: longitud de la raíz más larga.
- Peso fresco del tallo y raíz: la medición se realizó en una balanza una vez cosechadas las plantas.
- Peso seco del tallo y raíz: el tallo y la raíz fueron secados a 35-40°C en el invernadero por 1 semana hasta obtener peso constante.

Figura 5. Mediciones de crecimiento en Frijol.

Long tallo

Peso aéreo

Peso radical



3.3.10 Recuperación de bacterias en frijol:

La recuperación de *P. putida* UA44MR-1 una vez cosechadas las plantas se realizó tomando dos plantas al azar de cada tratamiento y se almacenaron en bolsas plásticas debidamente marcadas y separadas en la nevera a 4 °C. El suelo rizosférico fue removido de las raíces en un recipiente estéril, y se pesaron las raíces de cada tratamiento (aproximadamente 5 g). Esta cantidad fue adicionada a 50 mL de buffer fosfato de potasio (pH 7.0) y se agitó fuertemente durante 30 minutos (Bashan *et al.*, 1993; Dandurand y Knudsen, 2002). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} y se sembraron 100 uL de las últimas dos diluciones en TSA 50% con 100 ppm. de rifampicina y por duplicado. Las cajas Petri fueron almacenadas a 28 °C por 3 a 5 días y se contabilizaron las colonias individuales para realizar el cálculo de UFC/gr raíz.

3.3.11 Porcentaje de patogenicidad en las plantas de Banano:

Este porcentaje se calculó comparando el número total de plantas vivas al principio de cada mes, frente al número de plantas que quedaron vivas al finalizar las pruebas del mes anterior.

3.3.12 Pruebas en banano:

Las plantas de banano “Gran enano” (*Musa AAA*) ya enraizadas y provenientes de la Universidad Católica de Oriente, fueron trasplantadas a suelo no estéril (2 tierra, 1 arena, $\frac{1}{2}$ orgánico) de ECOFLORA en bolsas de 5 kilos y regadas por aspersion cada día por medio.

Se llevó a cabo un ensayo con diferentes formulaciones con base en *P. putida* UA44 MR-1, el cual se describe en la tabla 9.

Tabla 9. Experimentación en banano.

FORMULACIONES	INOCULACIÓN		NÚMERO DE INOCULACIONES
Talco Harina	$3,6 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^8$	Inoculación mensual durante 4 meses

Durante dicho experimento se realizaron las siguientes mediciones de forma mensual (Figura 6):

- Altura de la planta: se tomó desde la base de la planta hasta el vértice formado entre la 1ª y la 2ª hoja completamente desarrollada.
- Diámetro de la planta: se tomó en la base del *pseudotallo* con un pie de rey.

Figura 6. Medición de variables en banano

Altura

Diámetro



Adicionalmente se realizó un muestreo destructivo para determinar el peso fresco y seco de los diferentes órganos: hojas, el pseudotallo, corno y raíz (figura 7).

Figura 7. Muestreo destructivo en Banano



Hojas Pseudotallo Cormo Raíz

El peso fresco tanto aéreo como el de la raíz se midió en una balanza electrónica registrando cada órgano de la planta por separado. Posteriormente se secaron las plantas en un horno a 60 °C durante 3 días para obtener el peso seco de cada órgano.

Las plantas fueron fertilizadas con 15-15-15 mensualmente adicionando 5 g/planta durante los dos primeros meses, y posteriormente con 2 g/planta durante los dos últimos meses. Adicionalmente, fueron fertilizadas con Wuxal tapa negra (1 mL Wuxal en 1 L agua) adicionando 3 aspersiones/planta semanalmente.

3.3.13 Recuperación de bacterias en banano

La recuperación de *P. putida* UA 44MR-1 se realizó de raíz, hojas, pseudotallo y cormo. Para la recuperación de bacterias de la raíz se realizó según la metodología propuesta por Ramírez (2005). Se tomaron 2 plantas al azar de cada tratamiento, y se almacenaron las raíces en bolsas plásticas por un día en la

nevera a 4 °C. Posteriormente se tomaron 10 g de raíz previamente sacudidas pero conservando el suelo rizosférico, y se adicionaron en un recipiente con 90 mL de buffer fosfato de potasio (pH 7.0) estéril (dilución 1/10). La mezcla fue agitada vigorosamente por 30 minutos y posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} para platear 100 uL de las dos últimas diluciones en TSA 50% con 150 ppm de rifampicina. Las cajas Petri fueron incubadas invertidas a 28 °C durante 3 a 5 días para realizar el conteo de UFC/g.

La recuperación de las hojas, pseudotallo y cormo se realizó con el fin de determinar el potencial endófito de *P. putida* UA 44MR-1 según la metodología propuesta por Chanway *et al.*, (2000). Para ello se tomaron 10 g aproximadamente de cada órgano y se lavaron con detergente comercial y agua para remover partículas sólidas. La desinfección se realizó con etanol al 70% por 1 minuto, luego con agua destilada estéril y finalmente con hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Los órganos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo. En un mortero estéril se molieron cada órgano por separado con 90 mL de buffer fosfato de potasio pH 7.0 y se embasaron en un erlenmeyer para colocar en agitación constante por 30 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} para platear 100 µL de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} en TSA al 50% con 150 ppm de rifampicina.

3.3.14 Análisis estadístico.

El procedimiento estadístico para las pruebas en frijol (E1, E2, E3 y E4) y banano consistió en un análisis de varianza unifactorial (formulación- inoculación y formulación, respectivamente) con un nivel de confianza del 95% para cada una de las variables de respuesta. Para cada una de los experimentos, se realizaron varias pruebas para determinar qué factores tenían efectos significativamente diferentes sobre las variables de respuesta. El método de DUNCAN, propuesto para estudios agronómicos (García-Villalpando *et al.*, 2001) y la prueba de rangos

múltiples permitieron identificar factores significativos entre las formulaciones. Para determinar distribución normal se utilizó la asimetría típica y Curtosis para determinar la concentración de los datos.

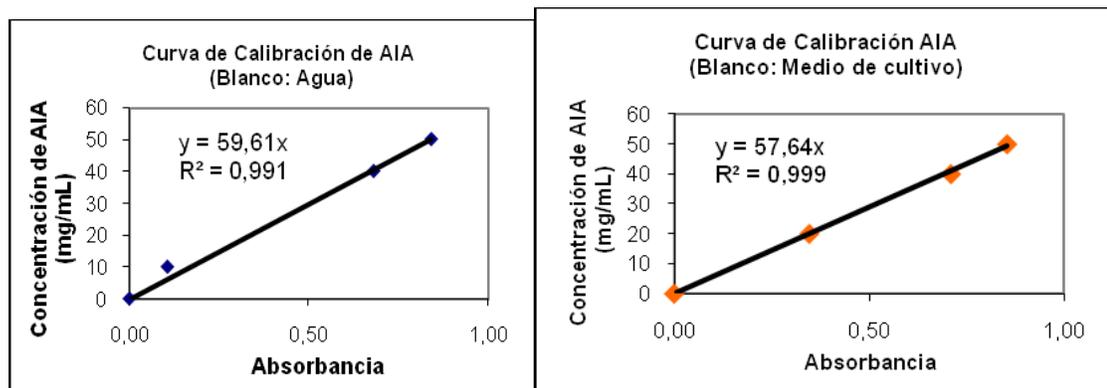
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 CAPACIDADES BIOQUÍMICAS DE *P. putida* UA 44MR-1

4.1.1 Producción de ácido indol acético:

La prueba de producción de ácido indol acético por parte de la *P. putida* UA 44 MR-1, cuantifica la cantidad de indoles totales contenidos en el medio de cultivo. Para poder cuantificar dichos indoles se realizaron dos curvas de calibración, utilizando diferentes blancos en el espectrofotómetro. Los resultados de éstas curvas se pueden ver en la Figura 8.

Figura 8. Curva de referencia para la determinación de AIA.



a. Curva con blanco: Agua

b. Curva con blanco: Medio de cultivo

En la figura **a**, se observa la curva de calibración que se realizó utilizando agua como blanco en el espectrofotómetro. El resultado obtenido, es una curva con una correlación de 0.991 y su respectiva ecuación, que permite determinar la cantidad de índoles (y) si se conoce su absorbancia (x). En la figura **b**. realizada utilizando medio de cultivo (TSB) como blanco, se obtuvo una correlación de 0.999, mejor que la anterior, y, de igual forma, la ecuación para cuantificar los índoles.

Al momento de medir los índoles totales contenidos en las muestras de la fermentación respecto a las ecuaciones obtenidas previamente, se encontró que, en los dos casos, la producción de ácidos indólicos fue positiva en niveles altos, encontrándose una gran diferencia entre ambos. Esto resultados se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 10. Producción de AIA por *P. putida* UA 44MR-1.

BLANCO	ABSORBANCIA	CONCENTRACION ppm
Blanco: Agua destila	0,992	54.71 ± 3.98
	0,882	
Blanco: Medio Cultivo TSB	0,706	40.74± 0.155
	0,702	

* ± error estándar

Al obtener diferentes resultados debido a las diferencias entre las curvas de calibración realizadas, se infiere que el medio de cultivo genera un ruido significativo en la medición, de forma que la ecuación que debe ser usada para cuantificar los índoles en las muestras de la fermentación de *P. putida* UA 44MR-1 debe ser la correspondiente a la Figura **8b**. De esta forma, la cantidad de índoles producidos por la *P. putida* UA 44MR-1 es de 40.74± 0.155 ppm.

Es de anotar que esta cantidad de indoles encontrados en las pruebas realizadas indican una alta producción por parte de la bacteria L de lo que probablemente es ácido indol acético, la cual es una hormona de crecimiento que favorece la elongación de las raíces.

Un resultado similar fue obtenido por Patten y Glick (2002) quienes evaluaron la producción de AIA de dos cepas, una silvestre y otra modificada de *P. putida* GR12-2, encontrando que a 500 ppm de triptófano la producción de AIA de la bacteria silvestre es de 32.7 ± 2.9 ppm. Con esta cepa, Patten y Glick también realizaron estudios en cultivos de canola donde la bacteria *P. putida* GR12-2 logró en un 35% la elongación de las raíces. La explicación de éste resultado es la activación de la enzima ACC sintetasa, gracias al AIA producido, la cual regula la producción de ACC (1-aminociclopropano 2-carboxylato), que es absorbida nuevamente por la bacteria y convertida en amoníaco y alfa cetobutirato, si ésta produce el ACC deaminaza, generando la elongación de las raíces (Glick *et al.*, 1998, Kloepper, 2003) ya que estos productos de la hidrólisis son usados por la bacteria como fuente de nitrógeno y carbono (Honma y Shimomura, 1984; citado en Ramírez y Mellado, 2000).

Sin embargo, puede presentarse otra ruta metabólica alterna a la presentada previamente, donde en lugar de estimular el crecimiento de las raíces, se genera una inhibición en el desarrollo de la planta. Si la bacteria no produce la ACC deaminaza, el ACC no es absorbido por la bacteria sino que la ACC oxidasa, producida por la planta, lo convierte en Etileno, el cual provoca la maduración de los frutos y la inhibición en la elongación de las raíces (Glick *et al.*, 1998).

Pruebas bioquímicas realizadas anteriormente a la *P. putida* UA44 por Ramírez (2005), indican que no hay producción de la enzima ACC deaminasa, revelando que el AIA producido por la bacteria probablemente podría ser convertido en etileno, ocasionando una reducción en el desarrollo de las plantas.

4.2.2 Degradación de quitina:

Para la prueba de producción de quitinasas por parte de la *P. putida* UA44MR-1, se obtuvieron resultados variados en los tres medios evaluados. La *P. putida* UA44MR-1 no mostró crecimiento ni formación de halo en los medios 2 ni 3, compuestos por agar-agar y quitina coloidal y algunas sales y quitina coloidal, respectivamente. La bacteria mostró crecimiento en el medio 1, compuesto por agar nutritivo y quitina coloidal, medio en el que puede crecer fácilmente la bacteria debido a su alto contenido de nutrientes y fuentes de carbono del agar nutritivo.

El propósito de sembrar la bacteria en éstos tres medios, era verificar su capacidad de transformar la quitina en fuente de carbono y otros nutrientes esenciales para su crecimiento, a través de la producción de quitinasas. De ésta forma, si la *P. putida* UA44 MR-1 crece o no en éstos medios, con diferentes limitaciones, quiere decir que si produce dichas enzimas; característica que le permite ser competitiva en un medio frente a otras bacterias que no tengan esta capacidad.

En este contexto, aunque la bacteria creció en el medio 1, no creció en los medios 2 ni 3. Esto significa que la bacteria pudo haber crecido en este ambiente gracias a la disponibilidad de fuente de carbono y demás nutrientes que le brinda el agar nutritivo sin usar específicamente la quitina del medio. A diferencia de esto, que la bacteria no haya crecido en los otros medios (2 y 3), los cuales tenían mayores limitaciones en cuanto a fuente de carbono y otros nutrientes, traduce que ésta no tuvo la habilidad de aprovechar la quitina como fuente principal para poder sobrevivir y desarrollarse.

Este resultado obtenido es opuesto lo encontrado por Ramírez, 2005, quien a través de pruebas similares observó que la bacteria silvestre mostró respuesta positiva en la degradación de quitina.

Teniendo en cuenta esto, es importante resaltar que una de las posibles razones para que la bacteria no produzca quitinasas, es la resistencia a la que fue inducida en laboratorio, contra rifampicina, consiguiéndose una posible alteración del metabolismo de la bacteria, y limitando indirectamente la producción de quitinasas.

Para corroborar este comportamiento de la bacteria, de una posible pérdida de la capacidad de producción de ACC, cabe citar los resultados obtenidos por Pérez, 2007, en el proceso de inducir resistencia a Rifampicina en la cepa *Burkholderia coenocepacia* UA72. En ésta investigación, Pérez encontró que diferentes mutaciones de la cepa silvestre mostraron variaciones en las capacidades de sideroforía y producción de ACC deaminasa; más concretamente se observa la disminución de las cepas 52, 54, 60 y 62, y el aumento en las cepas 7, 26, 32 y 42, en producción de sideróforos en comparación con la cepa silvestre (72) y, a diferencia de esto, la constante producción de ACC deaminasa por todas las cepas mutadas en comparación con la silvestre (Pérez, 2007).

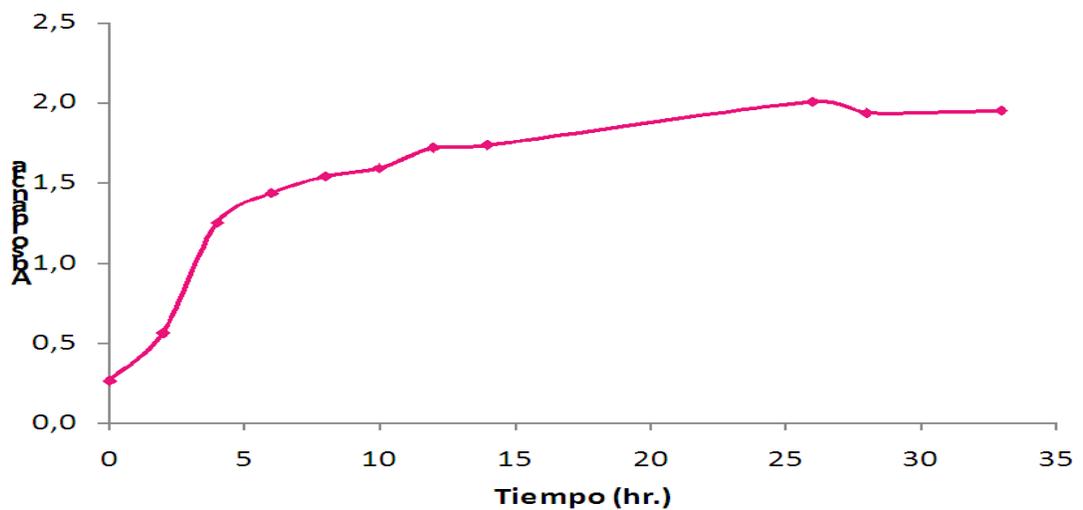
El hecho que una bacteria pierda determinada capacidad luego de haber sido sometida a un proceso de mutación inducido, ha sucedido en diferentes investigaciones donde las bacterias silvestres muestran determinados mecanismos de acción y luego de una modificación, la bacteria pierde o modifica alguno(s) de éstos mecanismos.. Un ejemplo de esto fue publicado por Patten y Glick, (2002), quienes estudiaron la capacidad de producción de ácido indolacético en presencia de triptofano por parte de 2 especies de *P. putida* GR12-2, una silvestre y una modificada por inducción de un Vector pJQ200,

encontrando producción de $32.7 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ de ácido indolacético por parte de la cepa silvestre y una cantidad mínima de 2 ± 0.3 del mismo por parte de la cepa modificada.

4.2 FORMACIÓN DE BIOMASA

Para evaluar la cinética de crecimiento de *P. putida* UA44 MR1 en medio de cultivo TSB, se realizó una fermentación y su duplicado, resultados que se pueden ver en la Figura 9:

Figura 9. Cinética de crecimiento de *P. putida* UA44 MR1



El crecimiento bacterial, mostrado en la figura 9, no presenta una fase de latencia debido a la pre-adaptación de la bacteria al medio de cultivo. La fase exponencial tiene una duración aproximada de 8 horas, con una fase de desaceleración y estacionaria que se prolonga hasta las 33 horas. Por el período de crecimiento evaluado no se observó la fase de muerte celular o decaimiento.

Una vez finalizada la fermentación (33 horas) se obtuvieron 4.5×10^8 UFC/mL y una concentración de biomasa de 2.44 ± 0.1 g/L.

En esta caracterización de la cinética de crecimiento se encontró que el punto de máxima producción, antes de que la bacteria comience su estado estacionario, es cuando la fermentación lleva alrededor de 15 horas, tiempo a partir del cual la densidad óptica se mantiene aproximadamente constante.

4.3 PRUEBAS EN FRÍJOL:

Las pruebas en frijol cultivar Calima, se realizaron con el fin de identificar la promoción de crecimiento generada por medio de la aplicación de formulaciones con base en *P. putida* UA44 MR-1.

4.3.1 Experimento 1. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, Alginato y Suspensión Bacterial con inoculaciones de $4,5 \times 10^7$, $1,8 \times 10^7$ y 9×10^6 UFC/g de sustrato

Con el fin de determinar las diferencias entre los tratamientos se realizó un análisis de rangos múltiples, cuyos resultados se pueden ver en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de rangos múltiples para el Experimento 1

FORMULACIÓN	Peso Tallo Fresco	Peso Raíz Fresca	Peso Tallo Seco	Peso Raíz Seca	Peso Total Seco
A 1/10	5,05^E	2,46^{AB}	0,74 ^{BC}	0,21 ^{ABC}	0,85 ^{AB}
A 1/25	4,53 ^{CDE}	2,28^A	0,73 ^{BC}	0,31 ^D	1,03 ^B
A 1/50	4,31 ^{BCD} E	3,44 ^{BCD}	0,74 ^{BC}	0,30 ^{CD}	1,03 ^B
T 1/10	3,33^A	2,28^A	0,55^A	0,15^A	0,70^A
T 1/25	4,36 ^{BCD} E	3,56 ^{BCD}	0,77 ^{BC}	0,26 ^{BCD}	1,03 ^B
T 1/50	3,80 ^{AB}	2,56 ^{ABC}	0,69 ^{BC}	0,19^{AB}	0,87 ^B
C 1/10	4,78 ^{CDE}	3,08 ^{ABC} D	0,72 ^{BC}	0,21 ^{ABC}	0,93 ^B
C 1/25	4,05 ^{BC}	3,79 ^D	0,75 ^{BC}	0,26 ^{BCD}	1,01 ^B
C 1/50	4,40 ^{BCD} E	3,01 ^{ABC} D	0,67 ^B	0,23 ^{ABC} D	0,90 ^B
S 1/10	4,82 ^{DE}	3,20 ^{ABC} D	0,77 ^{BC}	0,22 ^{ABC} D	1,00 ^B
S 1/25	4,56 ^{CDE}	2,47^{AB}	0,79 ^C	0,24 ^{ABC} D	1,04 ^B
S 1/50	4,88 ^{DE}	3,30 ^{ABC} D	0,79 ^C	0,21 ^{ABC} D	1,00 ^B
Te	4,25^{BCD}	3,61^{CD}	0,73^{BC}	0,27^{BCD}	0,99^B

*Abreviación de formulaciones: A: alginato, T: talco, C: caolín, S: suspensión bacteriana, Te: testigo. En azul: el testigo, en verde: datos inferiores significativamente al testigo, en rojo datos superiores significativamente al testigo,

En el pesos de tallo fresco la formulaciones de A 1/10 presento diferencias significativa por encima del testigo, mientras que el T 1/10 presento diferencias significativas siendo menor al testigo. Al analizar la variable de respuesta de peso de tallo seco encontramos que solo la formulación de T 1/10 continua presentando diferencias significativas por debajo del testigo y que ninguna arrojo datos superiores significativos a este. Es importante tener en cuenta que al momento de realizar la medición de los pesos en fresco las plantas presentan diferente contenido de agua, por tanto es la variable en seco la que tiene mayor relevancia, debido a que en este punto se ha eliminado la presencia de factor.

En el caso de peso de raíz fresca, peso de raíz seca, y peso total seco ninguna de las formulaciones generó promoción de crecimiento en términos significativos superando al testigo. Sin embargo se puede observar que las formulaciones A 1/10, A 1/25, T 1/10, S 1/25 y las formulaciones de T1/10 y T 1/50 fueron inferiores significativamente al testigo en peso de raíz fresca y peso de raíz seca respectivamente.

No existe una formulación que sobresalga sobre las demás, lo cual se puede evidenciar en la tabla 11, y en las diferencias significativas presentes entre ellas. Igualmente no se observa un patrón de comportamiento bajo los diferentes grados de dosificación, probablemente por la cercanía presente en las diferentes concentraciones de UFC (4.5×10^7 , 1.8×10^7 , 9.0×10^6).

Teniendo en cuenta el resultado anterior, es posible pensar en diferentes razones que justifiquen estos resultados. Uno de estos puede debe ser a la inoculación de la *P. putida* UA44MR-1, desde semilla, de forma que no hubo oportunidad de que la bacteria actuara sobre la germinación debido a que la semilla de frijol, está conformada por una cáscara que protege los cotiledones, encargados de distintos

tipos de reservas (proteínas, lípidos y azúcares), los cuales para este caso, son bastante grandes de forma que durante la germinación sólo se hace necesaria y suficiente la presencia de estos grandes reservorios de nutrientes y agua sin jugar ningún papel las bacterias inoculadas. Aunque no se encontraron investigaciones que comprueben o apoyen este resultado, si se puede ver que muchos de los experimentos publicados se han hecho a partir de semillas relativamente pequeñas, como trigo (de Freitas, 1992 y 2000), lechuga (Amer y Utkhede, 2000), rábano (Leeman *et al.*, 1995a y 1995b), tomate (Duffy y Défago, 1997, Guo *et al.*, 2003) garbanzos (Landa *et al.*, 2004), pepino (Liu *et al.*, 1995a) y espárragos (Pérez y Leguizamón, 1998), posiblemente debido al mismo factor contemplado anteriormente y por su importancia económica y comercial. Otros factores influyentes son el alto nivel de inoculación (4.5×10^7 , 1.8×10^7 , 9.0×10^6 UFC /g sustrato), el cual pudo haber ejercido efectos negativos sobre la germinación de las planta o que las condiciones fisicoquímicas que le ofrece los vehículos a la bacteria no son los adecuadas

4.3.2 Experimento 2. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Alginato con Acido Húmico, Harina y Suspensión Bacterial con inoculaciones de $4,5 \times 10^7$, $1,8 \times 10^7$ y 9×10^6 UFC/g de sustrato

Tabla 12. Análisis de Rangos múltiples para el Experimento 2

FORMULACIÓN	Peso Tallo Fresco	Peso Raíz Fresca	Peso Tallo Seco	Peso Raíz Seca	% Aumento de Tallo	Peso Total Seco

AH 1/10	7,12 ^{CD}	3,03 ^{ABC}	0,79 ^{BCD}	0,18 ^{AB}	122,91 ^{DE}	0,97 ^{BC} D
AH 1/25	7,63 ^D	3,46 ^{BCD}	0,80 ^{CD}	0,19 ^{AB}	124,00 ^{DE}	0,99 ^{BC} D
AH 1/50	7,28 ^{CD}	3,89 ^{CD}	0,83 ^{CD}	0,22 ^B	100,22 ^{BC} D	1,00 ^{CD}
T 1/10	6,15 ^{BC}	2,78 ^{ABC}	0,78 ^{BCD}	0,17 ^{AB}	113,88 ^{CD} E	0,95 ^{BC} D
T 1/25	5,45^B	3,43 ^{BCD}	0,74^{BC}	0,19 ^{AB}	105,63 ^{BC} DE	0,93 ^{BC}
T 1/50	6,22 ^{BC}	3,32 ^{ABC} D	0,79 ^{BCD}	0,20 ^{AB}	90,65 ^{ABC} D	0,98 ^{BC} D
H 1/10	3,51^A	2,17^A	0,48^A	0,15^A	74,25^{AB}	0,63^A
H 1/25	3,50^A	2,34^{AB}	0,48^A	0,15^A	59,10^A	0,62^A
H 1/50	5,14^B	2,96 ^{ABC}	0,64^B	0,17 ^{AB}	112,15 ^{CD} E	0,81^{AB}
S 1/10	7,43 ^D	4,45 ^D	0,93 ^D	0,23 ^B	139,02 ^E	1,16 ^D
S 1/25	6,17 ^{BC}	3,47 ^{BCD}	0,77 ^{BC}	0,18 ^{AB}	112,98 ^{CD} E	0,95 ^{BC} D
S 1/50	6,11 ^{BC}	3,64 ^{CD}	0,86 ^{CD}	0,21 ^{AB}	84,86 ^{ABC}	1,07 ^{CD}
Te	7,04^{CD}	3,86^{CD}	0,81^{CD}	0,22^B	120,26^{CD} E	1,03^{CD}

Abreviación de formulaciones: AH: alginato y ácido húmico, T: talco, H: harina, S: suspensión bacteriana, Te: testigo. En azul: el testigo, en verde: datos inferiores significativamente al testigo, en rojo: datos superiores significativamente al testigo,

En este experimento no se obtuvo resultados de promoción de crecimiento con diferencias significativas frente al testigo.

En las variables en peso fresco de tallo y peso fresco raíz en los tratamientos de T 1/25, H 1/10, H 1/25 Y H 1/50 y las formulaciones de H 1/10 y H 1/25 respectivamente, presentaron diferencias significativa inferiores al testigo. De igual manera las variables de peso seco del tallo y peso seco la raíz arrojaron los mismos resultados en las formulaciones anteriormente señaladas.

Los tratamientos evaluados no producen un efecto promotor en el crecimiento sobre las planta de frijol, lo cual puede deberse a las altas concentraciones de UFC (4.5×10^7 , 1.8×10^7 , 9.0×10^6 UFC/g sustrato) inoculadas en las plantas. Como se observa en la tabla 12 estas concentraciones bacteriales producen cierto efecto deletéreo en las plantas, puesto que al compararlas con el testigo siempre las demás formulaciones estaban por debajo del peso con diferencias significativas o por encima sin diferencias significativas.

En este caso, la inhibición del crecimiento posiblemente se deba a la producción de altas cantidades de AIA, el cual estimula la enzima ACC sintetasa llevándose acabo la ruta metabólica del etileno, ya que la totalidad de ACC producido no alcanza a ser convertido en amoniaco y en α -k butirato, evitando la prolongación de las raíces. (Kloepper, 2003; Zahir *et al.*, 2004, citados en Ramírez, 2008)

4.3.3 Experimento 3. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, Suspensión Bacterial con una concentración de 9×10^6 UFC/g de sustrato y su respectiva formulación sin bacteria para evaluar el efecto del vehiculo.

Con las pruebas anteriores se podrían inferir algunas causas del efecto deletéreo presente en las pruebas de promoción del crecimiento: el grado de dosificación, el vehículo o que la *P. putida* UA44MR-1 no genera simbiosis con la raíz de la planta indicadora usada. Por lo tanto, se decide realizar un tercer experimento para evaluar si el vehículo y los ayudantes de la formulación podrían generar algún efecto negativo sobre el frijol calima con una dosificación de 9×10^6 UFC/g suelo.

Con el fin de determinar las diferencias entre las formulaciones se realizó un análisis de rangos múltiples el cual se observa en la tabla 13.

Tabla 13. Análisis de rangos múltiples para el Experimento 3

FORMULACIÓN	Peso Tallo Fresco	Peso Raíz Fresca	Peso Tallo Seco	Peso Raíz Seca	Peso Total Seco
A 1/50	3,89 ^A	2,20 ABC	0,69 ^A	0,31 ^A	1,00 ^A
A SB 1/50	5,84^C	2,81^C	0,88 ^A	0,38 ^A	1,26 ^{ABC}
AH 1/50	4,29 ^{AB}	2,05 ^{AB}	0,81 ^A	0,38 ^A	1,19 ^{ABC}
AH SB 1/50	5,00^{BC}	2,69^{BC}	0,75 ^A	0,32 ^A	1,08 ^{AB}
C 1/50	4,40 ^{AB}	2,15 ABC	0,68 ^A	0,31 ^A	0,99 ^A
C SB 1/50	4,29 ^{AB}	2,01 ^{AB}	0,72 ^A	-	-
T 1/50	4,35 ^{AB}	2,23 ABC	0,89 ^A	0,38 ^A	1,27 ^{BC}
T SB 1/50	4,85^B	3,57^D	0,88 ^A	0,52^B	1,40^C
S 1/50	4,17 ^{AB}	2,01 ^{AB}	0,81 ^A	0,33 ^A	1,14 ^{ABC}
Te	3,85^A	1,52^A	0,75^A	0,38^A	1,13^{AB}

Abreviación de formulaciones: A; alginato, A SB: alginato sin bacterias, AH: alginato y ácido húmico, AH SB: alginato y ácido húmico sin bacterias C: caolín, C SB: caolín sin bacteria, T: talco, T SB talco sin bacteria, S: suspensión bacteriana, Te: testigo. En azul: el testigo, en verde: datos inferiores significativamente al testigo, en rojo datos superiores significativamente al testigo,

Al analizar los resultados del experimento 3, mostrados en la tabla 13, los pesos frescos del tallo y la raíz, mostraron los mismos resultados en cuanto a que ninguna de las formulaciones con contenido de bacterias mostró diferencias significativas frente al testigo. Por el contrario, todas las formulaciones sin bacterias, a excepción del C SB, mostraron superioridad frente al testigo, arrojando diferencias significativas en el peso fresco de tallo y peso fresco raíz, más no en sus equivalentes en el peso seco, a excepción del T SB 1/50 en el peso seco de raíz. Para el peso total seco, se evidencia que la única formulación con diferencias significativas superando el testigo es el T SB 1/50. Nuevamente se pudo evidenciar que la cantidad de agua presente en las plantas puede generar cambios significativos dudosos, que deben corroborarse con su variable correspondiente en peso seco.

Por lo anterior, podría inferirse que los vehículos de caolín, alginato y alginato más ácido húmico no ejercen promoción de crecimiento en la planta de frijol. Sin embargo, el talco sin bacterias presentó los mejores resultados, puesto que en todas las variables de respuesta, a excepción del peso seco del tallo, presentó diferencias significativas mayores. Estos datos, deben corroborarse con un nuevo experimento.

La concentración de bacterias utilizada para este experimento (9.0×10^6 UFC/g suelo) podría continuar siendo muy elevada. Esto se posiblemente incide en los resultados obtenidos, ya que los tratamientos que se evaluaron sin bacterias presentan mayor peso fresco, que sus equivalentes con *P. putida* UA 44MR-1, a excepción del caolín.

En los tres experimentos anteriormente mencionados, cuando aún no se estaba teniendo en cuenta el posible impacto de la concentración de las bacterias sobre las plantas, se encontró que con las inoculaciones, en el orden de 10^9 UFC/gr de

turba, se estaba generando una posible inhibición en el crecimiento de las plantas, debido a que en algunas variables evaluadas, más específicamente en el peso fresco y seco de la raíz, se encontró que el crecimiento de las plantas testigo no inoculadas era mayor que las plantas con concentraciones determinadas de *P. putida* UA44MR-1.

Esto se puede asociarse con la habilidad encontrada en la bacteria, de producir AIA, sustancia reconocida como hormona que produce un incremento marcado en el crecimiento vegetal (Van Loon y Bakker, 2003), pues paradójicamente también se ha reportado que altas concentraciones de ésta hormona pueden generar un efecto negativo en las plantas debido a la estimulación en la producción de etileno generando inhibición en la elongación radical (Zahir *et al.*, 2004). De ésta forma, la alta concentración de *P. putida* UA44MR-1 en las formulaciones inoculadas, proyecta una alta producción de la hormona AIA, y por ende la producción de etileno, provocando afecciones en el desarrollo de la raíz y evitando su elongación en la rizosfera de forma que los pelos radicales no están alcanzando los nutrientes más alejados y están siendo limitados por los nutrientes que se encuentran disponibles más cercanamente.

Con base en este concepto los siguientes experimentos en fríjol se realizaron con concentraciones menores de la bacteria en la formulación, a través de diluciones seriadas con agua, evaluando los efectos con menores cantidades de UFC/gr de turba (10^6 , 10^4 y 10^2 UFC/gr de turba), siguiendo el protocolo reportado por Bashan, 1986.

4.3.4 Experimento 4. Prueba en frijol con formulaciones en base de Talco, Caolín, harina y Suspensión Bacterial con concentraciones de $2,5 \cdot 10^6$, $2,5 \cdot 10^4$ y $2,5 \cdot 10^2$ UFC/g de sustrato y su respectiva formulación sin bacteria para evaluar el efecto del vehículo.

En este ensayo se realizaron inoculaciones de *P. putida* UA 44MR-1 de $2,5 \cdot 10^6$, $2,5 \cdot 10^4$ y $2,5 \cdot 10^2$ UFC/g de sustrato, denominadas como 1, 2 y 3 respectivamente, con el fin de identificar si una menor cantidad de bacterias podría generar una promoción de crecimiento en la planta de frijol calima. Adicionalmente, se evaluaron las formulaciones sin presencia de bacterias.

En la tabla 14 se resume el análisis de rangos múltiples que se realizó para el experimento 4

Tabla 14. Análisis de Rangos Múltiples para el Experimento 04

FORMULACION	P e s o T a l l o Fresco	P e s o R a í z Fresca	P e s o T a l l o Seco	P e s o r a í z Seca	P e s o T o t a l Seco	% Aumento en tallo
S 1	6,00E	1,68ABC D	0,64A	0,11A	0,75ABC	163,81FG
S 2	4,32BCD	1,30A	0,53A	0,13AB	0,66AB	162,68EFG
S 3	4,98D	2,04 CDEF	0,63A	0,14ABC	0,77ABC	116,97 ABCD
C 1	4,30BCD	2,41 EF G	0,61A	0,14AB	0,74ABC	143,28 CDEFG

C 2	4,31BCD	1 , 7 2 ABCD	0,50A	0 , 2 1 ABCD	0,71ABC	136,40CDEF G
C 3	4,88CD	2,12EF	0,64A	0,13AB	0,77ABC	1 3 1 , 7 2 BCDEFG
T 1	4,86CD	2,46 FG	0,63A	0,13AB	0,76ABC	168,27G
T 2	4,47BCD	1 , 9 8 BCDEF	0,58A	0,24CD	0,82ABC	162,87EFG
T 3	4,44BCD	1,54ABC D	0,61A	0,12A	0,74ABC	1 3 0 , 5 2 BCDEFG
H 1	4,08ABC	1,34A	0,53A	0,12A	0,65AB	119,83 ABCD
H 2	4,29ABC D	2,10EF	0,56A	0,16ABC D	0,72ABC	124,05BCDE
H 3	4,9CD	2,80G	0,64A	0,16ABC D	0,80ABC	1 3 2 , 1 0 BCDEFG
C SB 1	4,57BCD	1,48ABC D	0,63A	0,22BCD	0,85BC	1 2 7 , 0 3 BCDEF
C SB 2	3,99AB	1,42ABC	0,58A	0,16ABC D	0,74ABC	82,35A
C SB 3	4,29BCD	1,52ABC D	0,60A	0,14ABC D	0,74ABC	104,43ABC
T SB 1	5,00D	1,34AB	0,62A	0,24D	0,86C	1 3 8 , 4 8 CDEFG
T SB 2	4,17BCD	1,62ABC D	0,51A	0,15ABC D	0,66AB	119,40 ABCD
T SB 3	3,44A	1,29A	0,52A	0,13AB	0,65AB	92,38AB

H SB 1	4,45 ^{BCD}	1,93 ^{BCD} EF	0,61 ^A	0,14 ^{AB}	0,75 ^{ABC}	123,31 ^{BCD}
H SB 2	3,99 ^{AB}	1,95 ^{BCD} EF	0,50 ^A	0,14 ^{ABC}	0,64 ^A	118,24 ^{ABCD}
H SB 3	4,35 ^{BCD}	1,79 ^{ABC} DE	0,50 ^A	0,15 ^{ABC} D	0,65 ^A	147,48 ^{DEFG}
Te	5,05 ^D	1,63 ^{AB} CD	0,64 ^A	0,16 ^{ABC} D	0,80 ^{ABC}	122,05 ^{BCD}

*Abreviación de formulaciones: S 1: suspensión bacteriana inoculación 1, S 2: suspensión bacteriana inoculación 2, S 3: suspensión bacteriana inoculación 3 C 1: caolín inoculación 1, C 2: caolín inoculación 2, C 3: caolín inoculación 3, C SB 1: caolín sin bacteria inoculación 1, C SB 2: caolín sin bacteria inoculación 2, C SB 3: caolín sin bacteria inoculación 3, T 1: talco inoculación 1, T 2: talco inoculación 2, T 3: talco inoculación 3, T SB1: talco sin bacteria inoculación 1, T SB 2: talco sin bacteria inoculación 2, T SB 3: talco sin bacteria inoculación 3, H 1: Harina inoculación 1, H 2: Harina inoculación 2, H 3: Harina inoculación 3, H SB 1: Harina sin bacteria inoculación 1, H SB 2: Harina sin bacteria inoculación 2, H SB 3: Harina sin bacteria inoculación 3, Te: testigo. En azul: el testigo, en verde: datos inferiores significativamente al testigo, en rojo datos superiores significativamente al testigo.

La formulación S1 es significativamente mayor al testigo para la variable de peso tallo fresco. En la variable de peso fresco de la raíz las formulaciones con bacterias C 1, C 3, T 1, H 2 y H 3 presentaron pesos significativamente mayores al testigo, siendo la formulación de H3 la que presentó mayor valor. Por el contrario, en ninguna de las variables de respuesta de peso seco de tallo, peso seco raíz y peso total seco de la planta se observaron datos significativamente diferentes al testigo, teniendo en cuenta que estos son los datos de mayor relevancia.

La variable del porcentaje de aumento del tallo fue significativamente mayor para los tratamientos T 1, T 2, S 1 y S 2, siendo mayores los resultados con talco. Lo anterior indica que la formulación de talco con la inoculación de $2,5 \times 10^6$ UFC/g sustrato es la que mejores resultados presentó en la promoción del crecimiento de

las plantas como vehículo. Al comparar las formulaciones (Tabla 14) que contenían *P. putida* UA 44MR-1 con sus equivalentes sin bacterias se encontraron valores superiores para el porcentaje de aumento del tallo para todas las que contenían bacteria a excepción de la formulación de harina.

Nuevamente no se observa un patrón de comportamiento bajo los diferentes grados de dosificación.

Para este nuevo experimento podría decirse que al disminuir la producción de AIA a través de concentraciones menores de *P. putida* UA44MR-1 en las formulaciones, la respuesta en las plantas inoculadas con bacterias fue en ocasiones mejor que la respuesta del testigo no inoculado respecto a determinadas variables de crecimiento, como en el experimento 4, donde las formulaciones C1, C3, T1, H2 y H3 y S1, S2, T1 y T2, mostraron diferencias significativas superando al testigo en peso de raíz fresca y en porcentaje de aumento de tallo, respectivamente. Una respuesta muy similar fue encontrada por Bashan, 1986, quien publicó que el nivel óptimo de bacterias está entre 10^5 - 10^6 UFC/mL equivalente a 10^5 UFC/g de sustrato.

En los tratamientos sin contenido bacteriano, las formulaciones de C 2, T 3 y H SB 2 presentaron datos significativamente menores al testigo en la variable peso de tallo fresco. Para las demás variables de los tratamientos sin bacteria no se obtuvieron diferencias significativas ni por debajo ni por encima del testigo a excepción de C SB 2 el cual presentó diferencias significativas inferiores al testigo en el porcentaje de aumento del tallo.

En general, analizando la influencia de los vehículos sobre el crecimiento de las plantas, se encontró que las inoculadas con formulaciones sin contenido de *P. putida* UA44MR-1, fueron menores en todas las variables que las inoculadas con

la bacteria en los mismos vehículos, determinándose que talco, el caolín y harina no son la causa del aumento en el crecimiento de las plantas tratadas.

Un resultado similar es el obtenido por Amer y Utkhede, 2000, quienes desarrollaron diferentes formulaciones para ser aplicadas en lechuga y pepino, encontrando que la germinación de las semillas de lechuga no se vio afectada por los vehículos vermiculita, talco, caolín ni turba, comparados con el control (Amer y Uthede, 2000).

Las bajas o nulas promociones de crecimiento encontradas en los ensayos con fríjol, podrían relacionarse con una baja asociación o colonización de las bacterias a las raíces del fríjol, debido a que éstas fueron aisladas específicamente de suelos de plantas de banano. Adicionalmente, la *P. putida* UA44MR-1 podría no poseer la capacidad de competir con las bacterias que se desarrollaron en la turba canadiense, o más específicamente en el fríjol, de forma que perdieron sus habilidades como PGPR. Estas razones han sido bases usadas por varios investigadores quienes, aíslan diferentes bacterias de un suelo de cultivo, y cada aislado es evaluado en cultivos del mismo tipo de planta de forma que se pueden obtener resultados de los mecanismos expresados por cada bacteria pero en un sistema donde está comprobado que hay condiciones biológicas y/o químicas que facilitan la convivencia mutualista de planta y bacteria.

Sin ir muy lejos, un ejemplo de esto es acuñado por Aguilar y Sánchez, investigadores colombianos, quienes publicaron en 1998, los resultados de una investigación en tomate donde evaluaron el efecto nitro fijador de una bacteria que en pruebas previas incrementó el crecimiento y materia seca de ese cultivo. Aguilar y Sánchez encontraron que aunque la bacteria si aumentó los niveles de nitrógeno total en hojas, no basta la sola aplicación de la bacteria para obtener rendimientos comparables con la fertilización química (Aguilar y Sánchez, 1998).

Otro de estos casos es experimentado por Dey *et al.*, (2004), quienes prueban la promoción del crecimiento de maní, especie *Arachis hypogaea* L., con 9 aislados de PGPR diferentes, provenientes de 233 aislados bacteriales obtenidos de la rizosfera de este tipo de cultivo (Dey *et al.*, 2004). De igual forma, Alami *et al.*, 2000, seleccionaron entre varios aislados de la rizosfera de plantas de girasol, la bacteria con mayor capacidad de producción de exopolisacáridos, asociados con la promoción del crecimiento de plantas, y la inocularon desde semilla, encontrando un incremento en adhesión de las raíces al suelo, masa seca y macro-poros del suelo (Alami *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta la importancia de la presencia de un vehículo en la formulación para que proteja a la bacteria de las diversas condiciones del suelo, y según los resultados del experimento 4, la formulación de talco es la que mejores resultados presenta. Una gran ventaja adicional de este material, es que el talco es un mineral natural, químicamente se referencia como hidróxido silicato de magnesio cuya fórmula es $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$. (Nakkeeran *et al.*, 2005).

Por su parte la formulación a base de harina, está formada por proteína y gluten, las cuales pueden ser fuentes de carbono importante para las bacterias, generando competencia entre los microorganismos presentes en el suelo inoculado. A su vez esta formulación también contiene glúcidos, que no son solubles en agua dificultando su manipulación y la liberación de las bacterias cuando ésta es diluida para su aplicación.

4.4 PRUEBAS EN BANANO

Las formulaciones que se utilizaron para las pruebas que se realizaron en Banano Musa AAA, cultivar gran enano fueron talco y harina, seleccionadas con base a los mejores resultados obtenidos en frijol.

4.4.1 Prueba de patogenicidad:

El porcentaje de plantas que sobrevivieron después de inocularlas, en cada uno de los meses en los que se realizó el muestreo se observa en la tabla 15.

Tabla 15. Porcentaje de plantas vivas en prueba de patogenicidad

FORMULACIÓN	MES 1 %PLANTAS VIVAS	MES 2 %PLANTAS VIVAS	MES 3 %PLANTAS VIVAS	MES 4 %PLANTAS VIVAS
T	100,00	89,65	100,00	88,89
H	100,00	93,33	100,00	100,00
Te	100,00	90,00	76,47	100,00

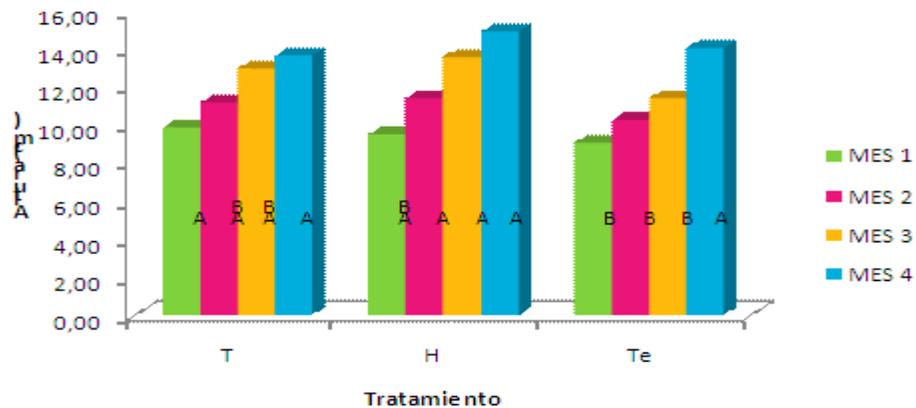
Abreviación de formulaciones: T: talco, H: harina, Te: testigo.

En la tabla 15, se observa que la población de plantas de banano Mussa AAA cultivar Gran Enano no presentan una reducción significativa al utilizar las formulaciones de talco y harina.

4.4.2 Muestreo General:

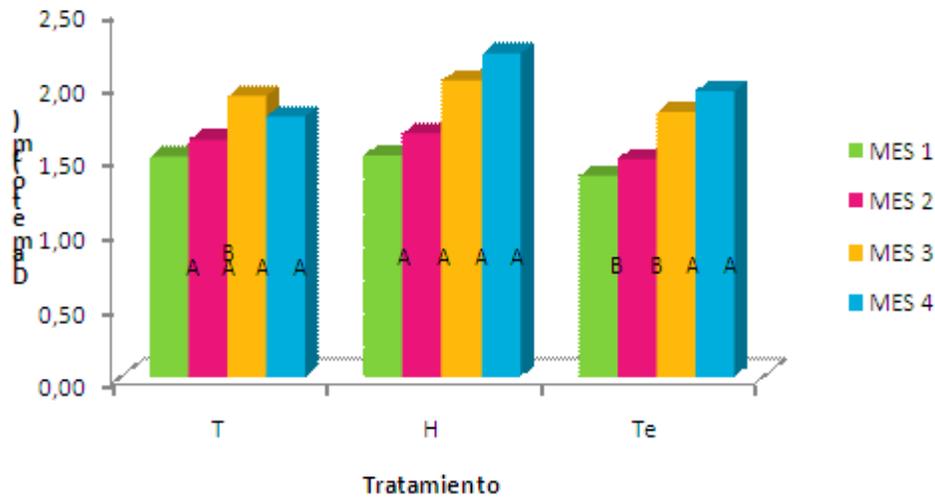
Con el fin de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de rangos múltiples, resultados que se pueden observar en las figuras 10, 11, 12 y 13.

Figura 10. Altura del pseudotallo de la planta de Banano.



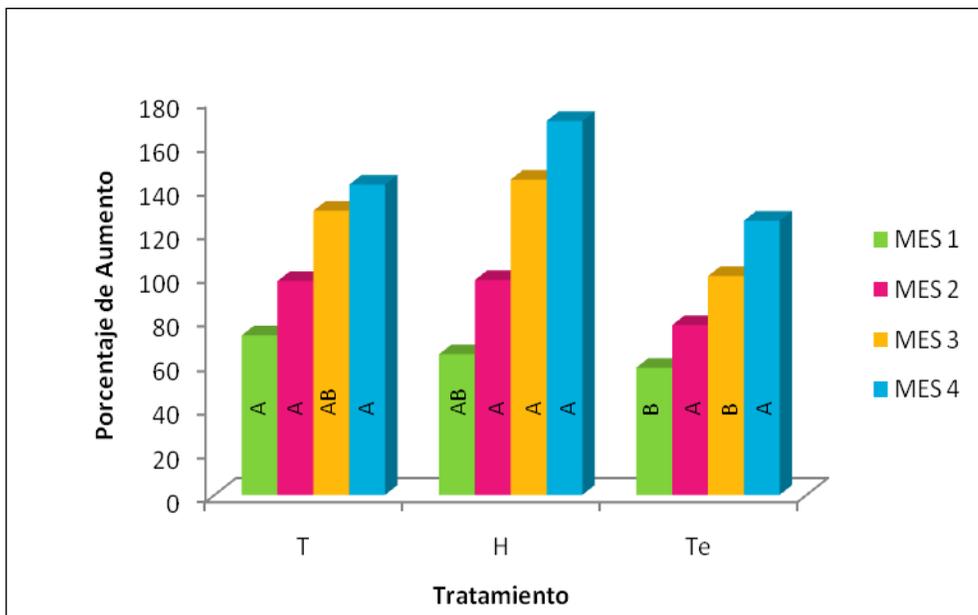
En la figura 10, se observa en el primer mes de evaluación, la altura del pseudotallo del talco fue significativamente superior al testigo, más no al tratamiento de harina. Por el contrario, en el segundo y tercer mes, la altura del pseudotallo de las plantas inoculadas con harina fue significativamente mayor al testigo más no a la inoculación con talco. Finalmente en el cuarto mes de evaluación no se hallaron diferencias significativas entre el testigo y las formulaciones de talco y harina. Por lo tanto se infiere que la formulación de harina arroja los mejores resultados en la promoción del crecimiento del pseudotallo.

Figura 11. Diámetro del corno de la planta de banano.



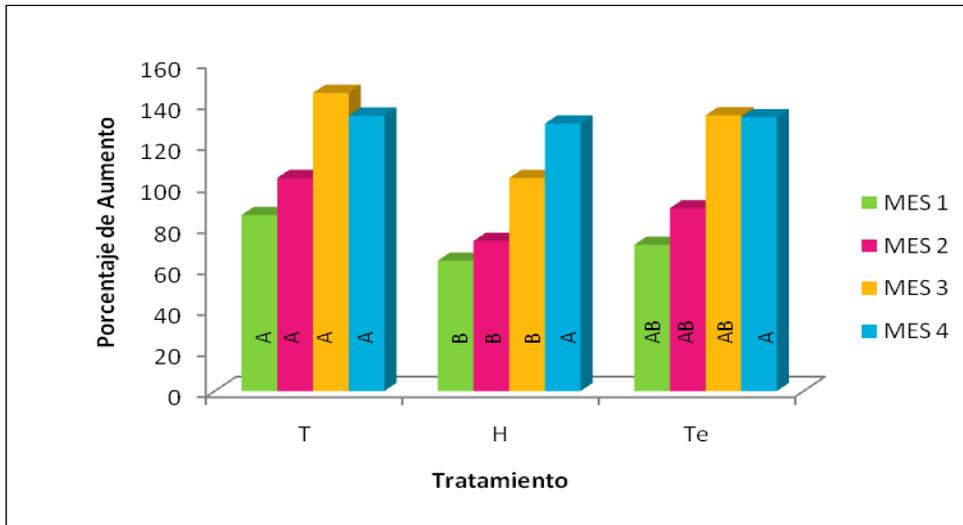
Respecto al diámetro del corno, según la figura 11, en el primer mes los tratamientos de harina y talco presentaron resultados significativos ($P < 0.05$) mayores al testigo. En el segundo mes, la formulación de harina presentó diferencias significativas superiores respecto al testigo. Para el tercer y cuarto mes no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. De ésta forma, el tratamiento de harina presenta los mejores resultados en el desarrollo del corno.

Figura 12. Porcentaje de aumento del pseudotallo.



El desempeño de las formulaciones evaluado para el porcentaje de aumento del pseudotallo se evidencia en la figura 12. Durante el primer mes, la formulación de talco incrementó significativamente el porcentaje de aumento del pseudotallo en comparación con el testigo pero no con harina, a diferencia de esto en el tercer mes la formulación de harina presenta diferencias significativas superiores al testigo, mas no al talco. En el segundo y cuarto mes no se hallaron diferencias entre los tratamientos al compararlos con el testigo no inoculado (figura 12). En esta variable, ninguna de los tratamientos sobresale en la promoción del crecimiento de la planta.

Figura 13. Porcentaje de aumento del diámetro del corno



En la figura 13, se observa que para los cuatro meses del experimento, las formulaciones no presentaron diferencias significativas frente al testigo. Las formulaciones de talco y harina presentaron diferencias significativas entre sí, siendo mayor el porcentaje de aumento del diámetro del corno para la formulación de talco en los meses 1, 2 y 3.

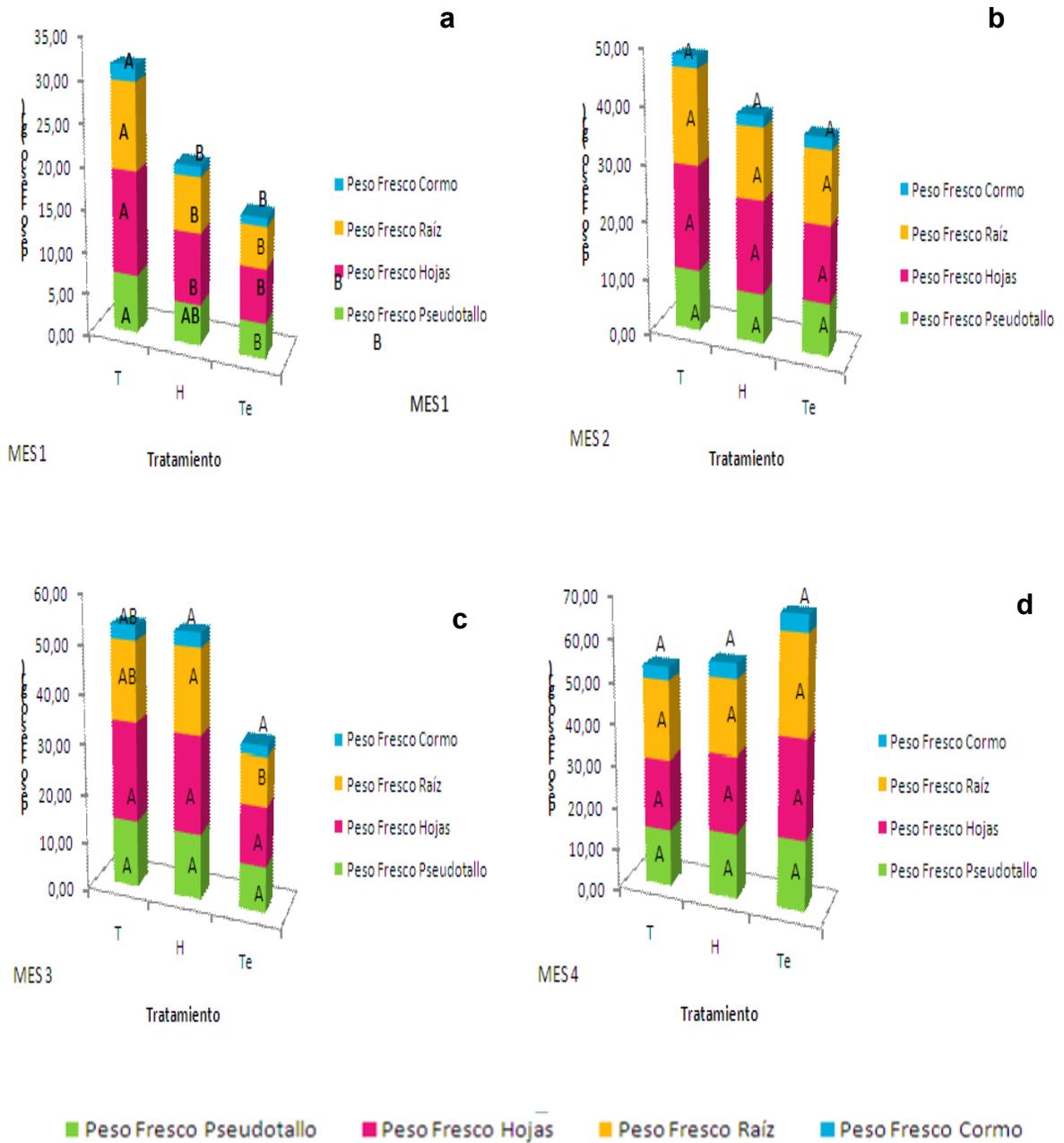
4.4.3. Muestreo Destructivo:

Se realizó un análisis de rangos múltiples con el fin de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para las diferentes variables de respuesta.

4.4.3.1 Peso fresco de pseudotallo, hojas, raíz y cormo

En la figura 14 se observan las variables de respuesta para el peso fresco de las diferentes partes de la planta en cada uno de los meses en los que se tomaron las muestras.

Figura 14. Peso fresco de las diferentes partes de la planta de banano. a) mes 1, b) mes 2, c) mes 3, d) mes 4

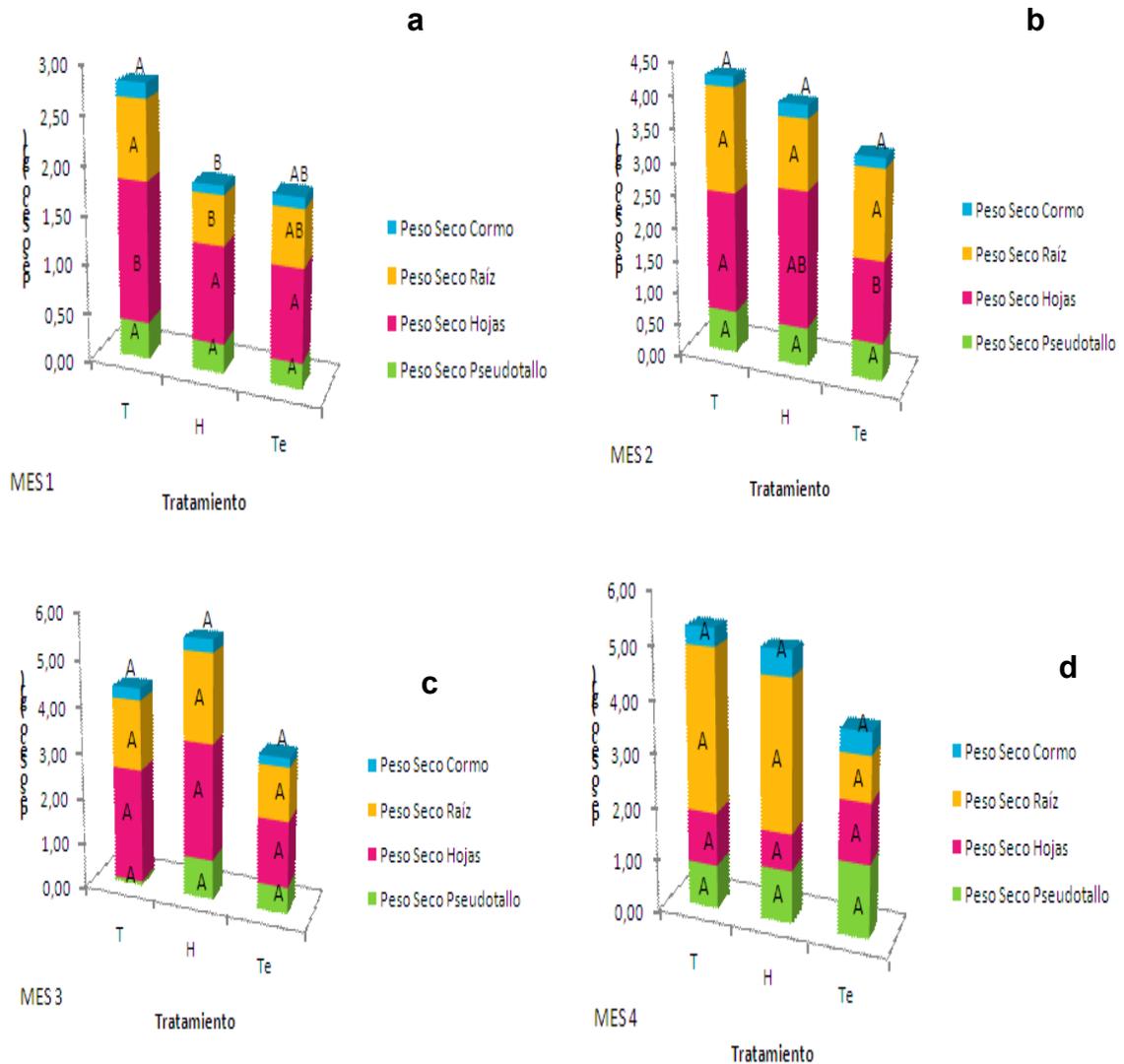


En el primer mes (Figura 14a), la formulación de talco presentó diferencias significativamente superiores al testigo en todas las variables de respuesta, sin ocurrir lo mismo con la formulación de harina. Por el contrario, para el segundo y cuarto mes (figura 14 b y d) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos sobre ninguna de las variables de respuesta al compararlas con el testigo. Al finalizar el tercer mes (figura 14c), únicamente la variable peso fresco de la raíz para la formulación de harina presentó diferencias significativas frente al testigo. Aunque el talco es el tratamiento que más sobresale en el primer mes, no hay resultados significativos en el resto del tiempo, por lo que no hay un tratamiento que sobresalga en el aumento de la biomasa, según los resultados en fresco.

4.4.3.2 Peso seco de pseutotallo, hojas, raíz y cormo:

En la figura 15 se observan las variables de respuesta para el peso seco de las diferentes partes de la planta en cada uno de los meses en los que se tomaron las muestras.

Figura 15. Peso seco de las diferentes partes de la planta de banano. a) mes 1, b) mes 2, c) mes 3, d) mes 4



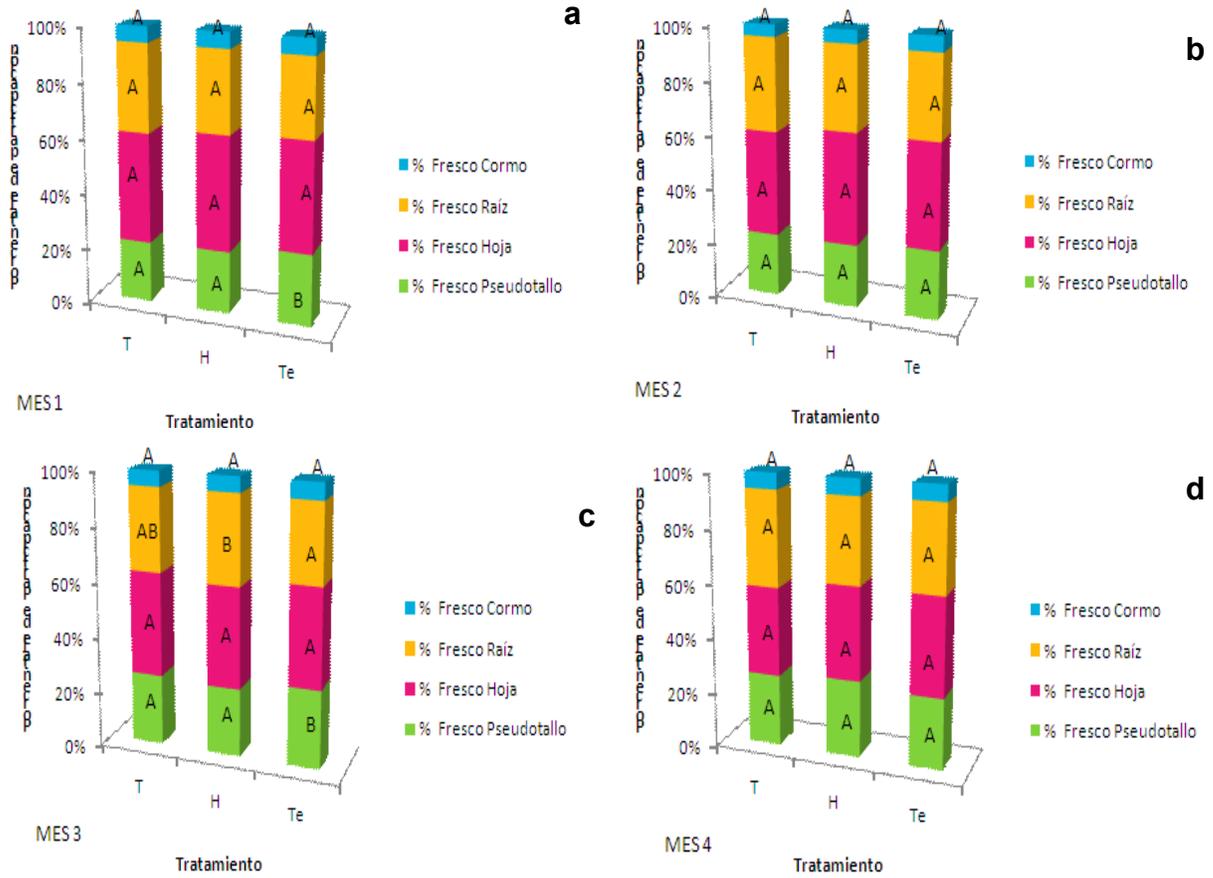
Analizando el peso seco de las hojas, se puede observar que la formulación de talco, en el primer y segundo mes de evaluación, fue significativamente superior al

testigo, sin embargo las demás variables (peso seco del cormo, peso seco de raíz y peso seco de pseudotallo) no presentaron diferencias significativas frente al testigo (figura 15 a y b). Finalmente en los últimos dos meses de evaluación, no se registraron diferencias significativas entre las variables de respuesta de peso seco (figura 33 c y d). Finalmente se corrobora, que sobresale el tratamiento de talco, debido a la estimulación del desarrollo de hojas en los dos primeros meses.

4.4.3.3 Porcentaje de participación en fresco

Los porcentajes de participación registrados en las variables de respuesta en peso fresco se registran en la figura 16.

Figura 16. Porcentaje de participación en fresco para el cormo, raíz, hoja y pseudotallo. a) mes 1, b) mes 2, c) mes 3, d) mes 4



Al finalizar el primer mes de evaluación, se presentaron menores porcentajes de participación en el peso fresco del pseudotallo para el talco y la harina en

comparación con el testigo, y en las demás variables no hay diferencias significativas (figura 16a).

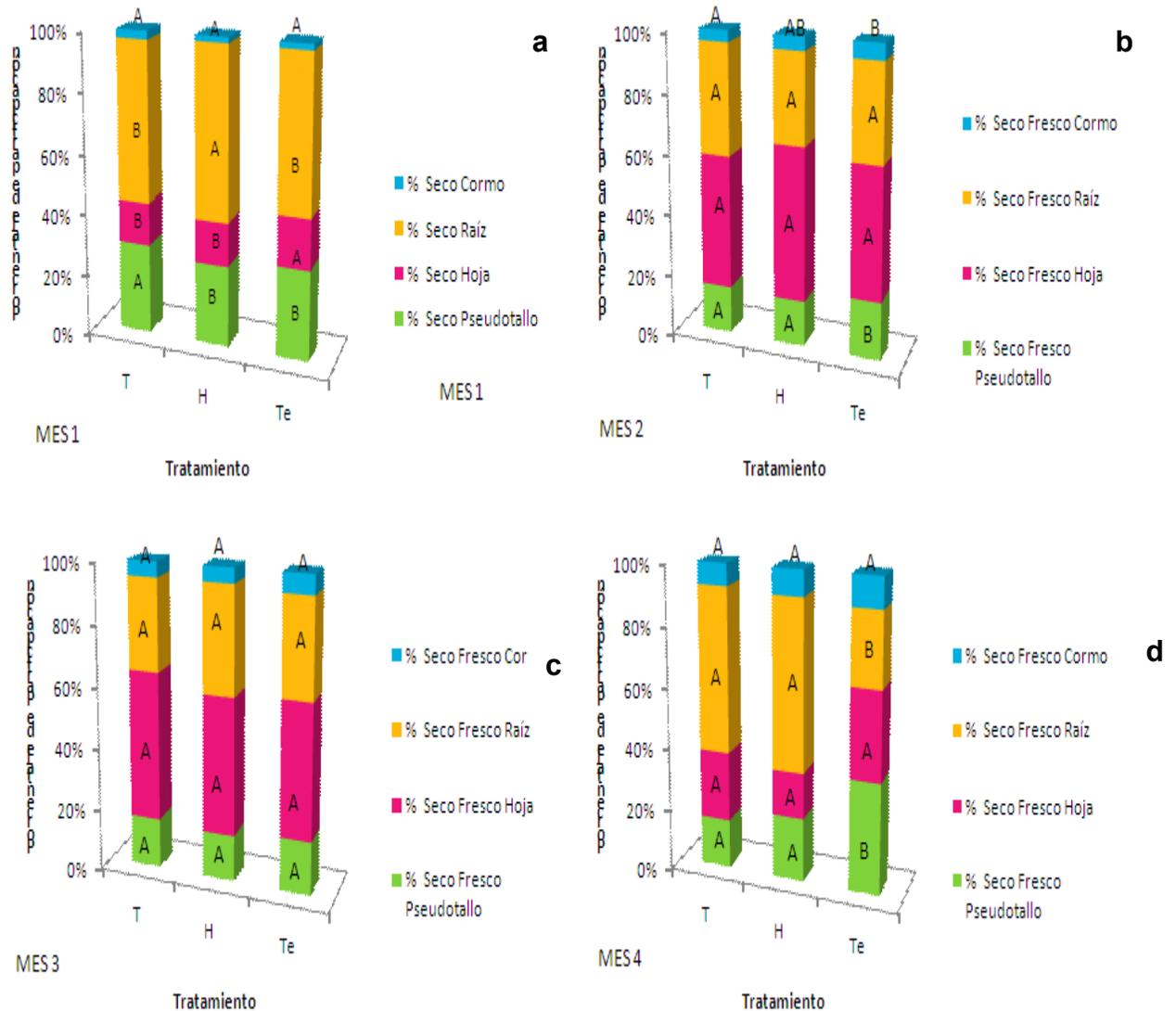
En el segundo y cuarto mes no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para el total de las variables de respuesta (figura 16 b y d).

Para el tercer mes, el porcentaje de participación del pseudotallo presenta diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, siendo mayor el porcentaje de participación del testigo y para el porcentaje de participación de la raíz, la formulación de harina arrojó resultados superiores valorados como significativos frente al testigo pero no frente a la formulación de talco. De ésta forma, la formulaición que sobresale es harina.

4.4.3.4 Porcentaje de participación en peso seco

Los porcentajes de participación resgistrados en las variables de respuesta en peso seco se registran en la figura 17.

Figura 17. Porcentaje de participación en peso seco para el cormo, raíz, hoja y pseudotallo. a) mes 1, b) mes 2, c) mes 3, d) mes 4



Al finalizar el primer mes, las variables de respuesta porcentaje de participación de pseudotallo, porcentaje de participación de hojas y porcentaje de participación de raíces presentan diferencias significativas. El porcentaje de participación del pseudotallo es mayor para la formulación de talco frente al testigo y al tratamiento de harina. El porcentaje de participación de las hojas fue menor en los

tratamientos de harina y talco que el testigo, y el porcentaje de participación de la raíz fue mayor para el tratamiento de harina que el testigo y el talco, ambos resultados con diferencias significativas. En el porcentaje de participación del corno no hay diferencias significativas entre los tratamientos ni frente al testigo.

Durante el segundo mes del experimento, el testigo fue mayor en los porcentajes de participación del pseudotallo y del corno, con diferencias significativas frente a las dos formulaciones y frente a talco respectivamente. Para el tercer mes, ninguna de las variables de respuesta presentó diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. En el cuarto mes el porcentaje de participación del pseudotallo fue mayor para el testigo, mientras que el porcentaje de participación en la raíz seca fue superior con las formulaciones de talco y harina.

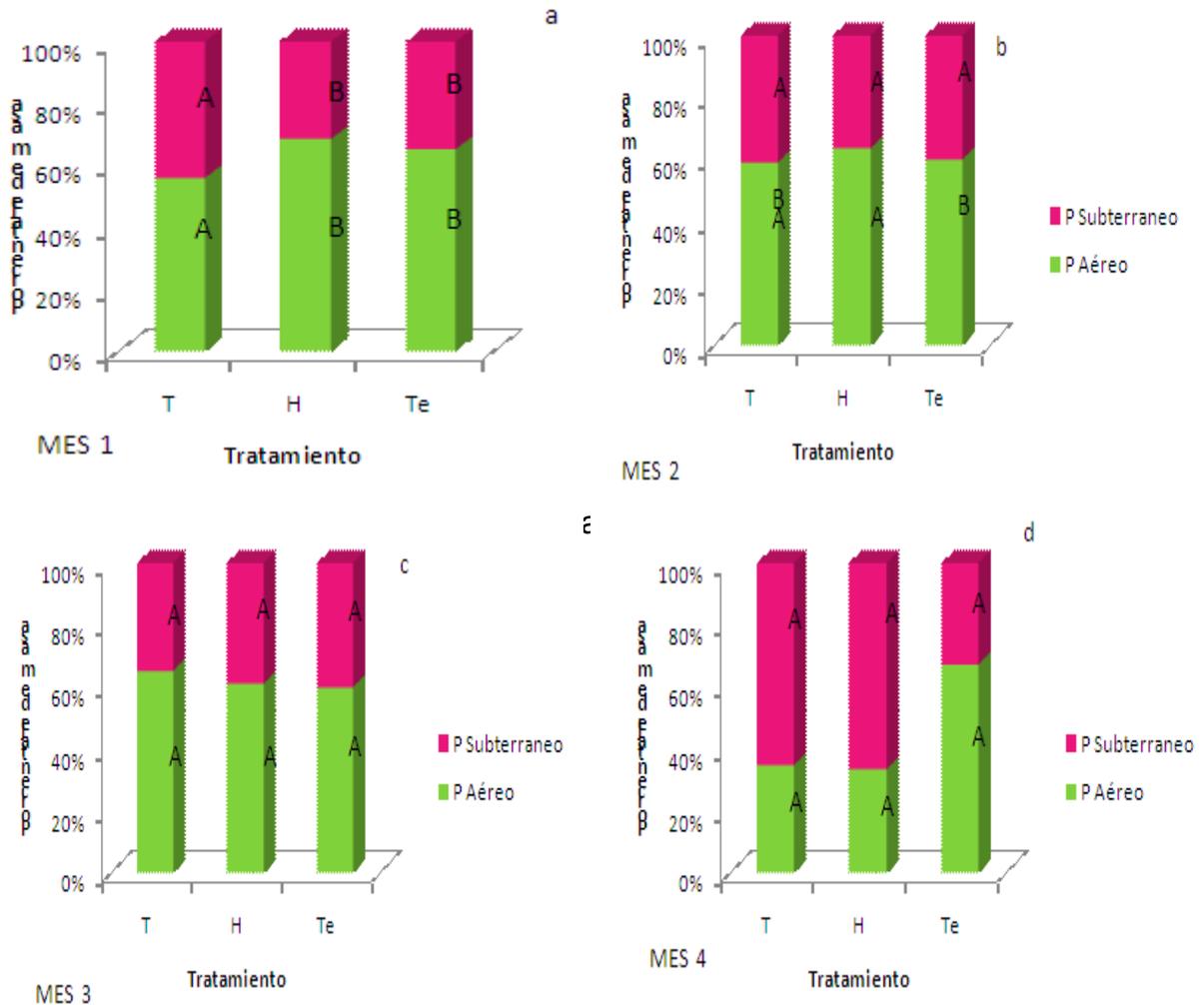
Al igual que en el primer mes, en el porcentaje de participación de corno no se presentaron diferencias significativas en el tercer ni cuarto mes.

En este contexto, las gráficas de los resultados obtenidos (figura 17), revelan que la formulación de harina es la que ejerce mayor promoción en el desarrollo radicular de las plantas de banano.

4.4.3.5 Porcentaje de participación aérea (hojas y pseudotallo) y subterránea (corno y raíz)

Los porcentajes de participación aérea y subterránea resgistrados en las variables de respuesta se registran en la figura 18.

Figura 18. Porcentaje de participación aérea (pseudotallo y hojas) y subterránea (raíz y cormo) a) mes 1, b) mes 2, c) mes 3, d) mes 4



aéreas y subterráneas en la Figura 18, se observaron diferencias significativas únicamente en los meses 1 y 2. Para el primer mes, el talco arroja mayor porcentaje de participación subterráneo (cormo y raíz) frente al testigo y la formulación de harina con diferencias significativas, contrario a lo sucedido con la participación aérea, donde la harina y el testigo superan significativamente al talco.

El hecho de que la formulación de talco promueva el desarrollo de la parte subterránea de las plantas de banano (mes 1), concuerda con la idea en la cual

se establecía la capacidad de la bacteria de estimular el crecimiento de las raíces a través de la producción de AIA en cantidades moderadas, dependiente de la concentración de bacterias inoculadas. A través de éste mecanismo, la bacteria *P. putida*UA44MR-1 estimula el desarrollo de la planta de banano debido al efecto generado por esta sustancia al promover el desarrollo de pelos radicales que aumentan los límites de consumo de nutrientes (Cheryl y Glick, 2002).

Aunque este resultado no es continuo durante todos los meses, es posible que este efecto lo exprese la plántula durante los primeros días de desarrollo y estabilización en el suelo de cultivo, siendo de gran importancia ya que es una etapa primordial para la futura estabilidad de la planta y su producción.

Del muestro general de las planta de banano llevadas a cabo durante cuatro meses, se obtuvieron resultados muy variados respecto a las dos formulaciones evaluadas. Durante el primer mes la mejor formulación parecía ser el talco, arrojando diferencias significativas frente al testigo en las variables de altura, diámetro y porcentaje de aumento en el tallo, pero en los meses dos y tres se presentaron diferencias significativas de harina superando al testigo y en ocasiones al talco en las mismas variables. Un caso similar ocurre con los efectos del *Bacillus genus* en plantas de banano sobre el diámetro y área foliar, que se incrementaron en un 20% respecto al control no inoculado (Jaizme-Vega *et al.*, 2004).

A diferencia del anterior, en el muestreo destructivo, los resultados son mucho más uniformes de forma que se presentan pocas diferencias significativas. En el primer mes ambas formulaciones superaron al testigo significativamente en casi todas las variables frescas, las cuales no se ven respaldadas en sus equivalentes en seco, dejando en evidencia que el contenido de humedad altera los resultados. A diferencia de esto en el mes 2 se observa una superioridad significativa del talco frente al testigo en el peso de las hojas secas, hecho que ocurre de manera

similar en los resultados reportados en Jaizme-Vega *et al*, 2004 donde el peso aéreo seco de la planta de Banano inoculada con *Bacillus spp*, supera al testigo con diferencias significativas (Jaizme-Vega *et al.*, 2004).

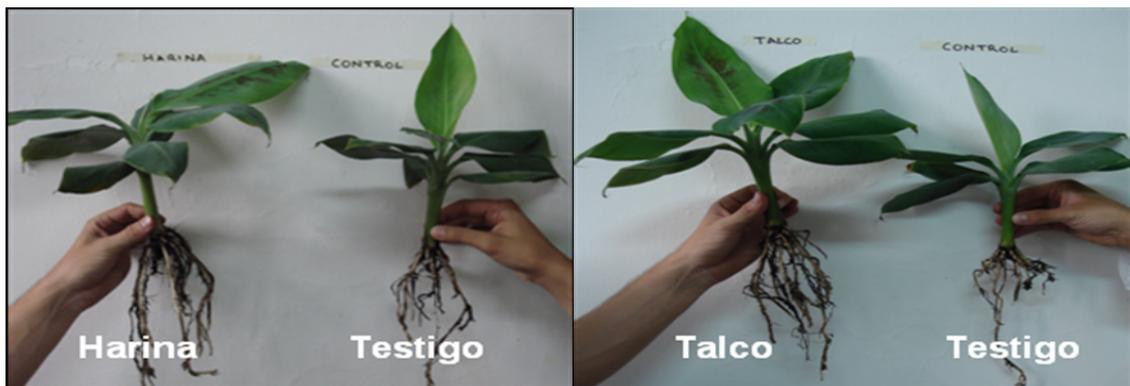
Tabla 16. Porcentaje de aumento con relación al testigo en la masa seca aérea y subterránea de las plantas de banano

VARIABLE	FORMULACION	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4
% Masa Aérea	T	47	38	33	-27
	H	1	48	36	-32
% Masa Subterránea	T	47	44	28	178
	H	-13	27	57	169

En rojo: Datos superiores al testigo. Abreviaciones: T:talco, H:harina

Para los porcentajes de participación de las partes se encuentran resultados paralelos de las formulaciones, es decir, que en esta medición, tanto harina como talco, ejercen efectos significativos sobre la promoción de raíz y pseudotallo, respectivamente. Lo mismo sucede con el porcentaje de masa subterránea y aérea, en los meses 1 y 2, respectivamente.

Figura 19. Comparación de una planta de banano inculcada a) Talco b) Harina frente al testigo



Por lo anterior, los resultados obtenidos con las formulaciones de banana, no permiten seleccionar a ninguna de las formulaciones como la más promotora del crecimiento de las plantas. En lugar de esto, se puede afirmar que cualquiera de los dos vehículos es adecuado para la producción de una formulación a base de *P. putida*UA44MR-1 que estimule de manera exitosa el crecimiento de las plantas de banana tal como se puede ver en la figura 19, y que un factor de escogencia más específico puede ser la evaluación de la viabilidad durante mayor tiempo y el estudio de costos de producción a mayor escala. Estos resultados positivos para

varias formulaciones han sucedido en diferentes investigaciones entre ellas las de Amer y Utkhede, 2000, Vidhyasdkaran *et al*, 1997, Vidhyasdkaran *et al*, 1997a , entre otros.

4.4.4 Recuperación de Bacterias del cultivo de Frijol y Banano

La recuperación de bacterias en los experimentos en frijol arrojó resultados muy variados, encontrándose bacterias resistentes a rifampicina, al igual que la cepa trabajada, en suelo y raíces, incluso, de las plantas testigo no inoculado. Una vez obtenido éste resultado en el primer experimento, se tomaron en cuenta medidas de control para evitar la contaminación de las plantas testigo durante la inoculación y de las muestras en la manipulación durante la siembra en laboratorio, pero a pesar de esto, los resultados siguieron mostrando contenido de dichas bacterias, posiblemente *P. putida*UA44MR-1, en plantas inoculadas y no inoculadas. La explicación de esto es la contaminación cruzada que se generó en el invernadero, donde posibles corrientes de viento, transportan bacterias inoculadas por todo el ambiente, contaminando posiblemente las plantas testigo.

Esta contaminación parece ser muy común, incluso ha sido estudiada por Bashan(1986), quien para evitarla propone usar capas de turba estéril sobre las plantas o semillas inoculadas con bacterias, con el fin de evitar la contaminación cruzada causada por corrientes de viento o por simple manipulación posterior al momento de aplicar las formulaciones.

No se pudieron recuperar bacterias de *P. putida* UA 44MR-1 de las raíces y suelos del cultivo de Banano *Mussa* AAA cultivar Gran enano y de Frijol Calima, durante los meses del experimento. A diferencia de los resultados obtenidos, Rekha *et al* (2006), reportan la recuperación en la rizosfera, rizoplano y en el interior de la raíz en los cultivos de lechuga de *P. putida* CC-FR2-4 y de *B. subtilis* CC - pg104, sin

especificar la cantidad de microorganismos recobrados. En otros estudios realizados por Dey *et al.*, 2004, después de la temporada de lluvia del 2000, evaluaron la competencia en la rizosfera de 6 PGPR resistentes a la rifampicina, las cuales fueron recuperadas, manteniendo una densidad de población bacteriana por encima de 10^{-5} UFC/gr en el suelo rizosférico y alrededor de 10^{-6} UFC/gr en la raíz de maní, después de 105 días.

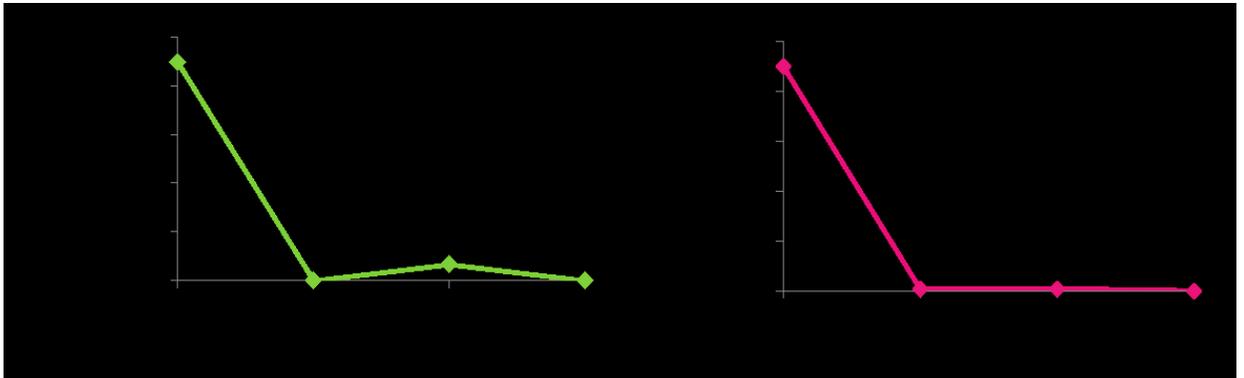
Pueden plantearse múltiples razones del porqué no se hallaron bacterias *P. putida* UA44 MR-1 en el suelo de las plantas de banano inoculadas; una de éstas es que las plantas sufrieron un posible lavado, es decir, que las bacterias inoculadas fueron, en su mayoría, arrastradas por el agua de riego, sin permitir que las bacterias cumplieran un periodo de tiempo suficiente para poderse establecer en las raíces de las plantas inoculadas. Otra razón, puede ser la muerte de las bacterias inoculadas debido a un efecto encontrado en el suelo de cultivo de las plantas (compuesto por arena, orgánico y tierra), el cual es un endurecimiento excesivo en todo el contenido de la bolsa, de forma que no había oxigenación y las condiciones eran extremas para la bacteria, generando la posible lisis celular. De igual forma, cabe anotar que, la recuperación de las bacterias se hizo en medio con rifampicina, y posiblemente la bacteria pudo haber perdido la resistencia inducida a este antibiótico, de forma que aunque sí se encontraron bacterias *P. putida* UA44 MR-1 en las raíces, éstas no pudieron haber crecido en el medio en que fueron sembradas las muestras.

4.4.5 Viabilidad de las formulaciones en el tiempo.

Las pruebas realizadas para verificar si los vehiculantes usados ayudan a la supervivencia de la bacteria, por un período de tiempo prolongado, muestran que la *P. putida* UA 44-MR1 en el tratamiento de talco y almacenado durante 90 días declina la población bacteriana de 10^8 a 10^6 UFC/g, manteniéndose desde el

primer mes hasta el tercero con 10^6 UFC/g, mientras que la formulación de harina presenta un disminución en densidad poblacional mayor, pasando de 10^8 UFC/g a 10^5 UFC/g. Esto se puede ver en la figura 20

Figura 20. Viabilidad de las formulaciones en el tiempo. A) Talco b) Harina



En la literatura se reporta la capacidad del talco de reducir la absorción de humedad y prevenir la formación de puentes de hidrogeno, lo que permite que se pueda almacenar por largos periodos (Nakkeeran *et al.*, 2005). A pesar de lo anterior, al parecer el talco como medio de retención de la cepa *P. putida* UA 44-MR1 no es lo suficientemente apropiado, al igual que la harina, ya que aparentemente no conservan lo suficiente la población bacteriana. Un resultado similar lo obtuvieron Amer y Utkhede, 2000, encontrando una reducción de la población de *P. putida* después de 15 y 45 días de almacenamiento a 0°C y 22°C en talco, alginato y salvado de avena, mientras que en vermiculita, salvado de harina, turba y cultivos bacterianos, la población bacteriana fue significativamente mayor (Amer y Utkhede, 2000). No se encontraron artículos donde se reporte la viabilidad en el tiempo de formulaciones con base en harina.

Una forma de mejorar esto lo plantean Kloepper y Schrot, 1981a, citados en Nakkeeran, 2002, quienes experimentaron con *P. fluorescens* en una formulación de talco y un 20% de goma Xanthum, encontrando que no se reduce la cantidad de microorganismos cuando ésta es almacenada durante dos meses a 4°C. Esta solución o la evaluación de otros materiales son importantes ya que otros estudios plantean periodos de almacenamiento mayores, con mejor conservación a nivel poblacional. Un ejemplo de esto indica que la población inicial de una formulación a base de talco y *P. fluorescens* con 37.5×10^7 UFC/g declinó a 1.3×10^7 UFC/g después de 8 meses de almacenamiento (Vidhyasekaran y Muthamilan, 1995).

CONCLUSIONES

En el primer mes de evaluación en plantas de banano, cultivar Gran enano, la formulación a base de talco aumentó la masa aérea de la planta superando significativamente al testigo y la formulación con base en harina.

Para el segundo mes las plantas de banano inoculadas con la formulación a base de harina aumentaron la masa subterránea superando significativamente al testigo pero no a la formulación de talco.

En los meses 3 y 4, las plantas de banano no mostraron diferencias valoradas como significativas en a la promoción de crecimiento aéreo ni subterráneo comparando las dos formulaciones y el testigo no inoculado.

La bacteria *P. putida* UA44 MR-1, no fue recuperada de las raíces de las plantas de banano, cultivar Gran enano, después de un mes de inoculadas durante 4 meses, probablemente por una baja estabilidad de la mutación en el suelo, o por una baja capacidad de colonización

La dosis de *P. putida* UA 44 MR-1 por gramo de suelo más adecuada para lograr una promoción de crecimiento en frijol Calima debe estar en el rango de 10^5 - 10^7 UFC/gr sustrato.

En la promoción de crecimiento en frijol calima, la formulación de harina superó al testigo en las dosificaciones 2 y 3 (con 2.5×10^4 y 2.5×10^2 UFC/g de sustrato respectivamente) en peso de raíz fresca; la de talco en las dosificaciones 1 y 2 (con 2.5×10^6 y 2.5×10^4 UFC/g de sustrato, respectivamente) en porcentaje de

aumento de tallo y la dosificación 1 para talco (con 2.5×10^6 UFC/g de sustrato) en peso de raíz fresca.

Los materiales evaluados en fríjol, para la inoculación de *P. putida* UA44 MR-1, mostraron las características de producción y manipulación de las formulaciones revelando, en este sentido, los mejores resultados con talco y harina como vehículos de retención para la bacteria.

La formulación de talco presenta la mejor viabilidad en la supervivencia de la bacteria conservando una concentración de la población bacteriana de 2.7×10^6 UFC/g mientras que la formulación de harina conserva sólo 2×10^6 UFC/g, durante los tres meses de almacenamiento. Estos valores equivalen a una reducción en la población bacteriana, en las formulaciones de talco y harina, de 99.4% y 99.96% respectivamente.

La bacteria *P. putida* UA44 MR-1 mostró una respuesta positiva en la prueba bioquímica de producción de indoles totales, con una concentración de $42.09 \pm 0,15$ ppm.

La cepa *P. putida* UA44 MR-1 inducida con resistencia a rifampicina, no presentó capacidad quitinolítica al ser cultivada en los medios de agar-agar con quitina y de algunas sales con quitina y, aunque, creció en el medio de agar nutritivo y quitina coloidal, esto no es garantía de la capacidad quitinolítica de la bacteria.

La productividad alcanzada por la cepa *P. Putida* UA44 MR1 después de 33 horas de fermentación, en shaker y ausencia de luz, fue de 2.44 ± 0.1 g/L. tiempo en el que se producen las formulaciones con un contenido bacteriano inicial equivalente a 4.5×10^8 UFC/g.

RECOMENDACIONES

Confirmar la producción de ACC deaminasa por parte de *P. putida* UA 44 MR-1 resistente a rifampicina, para compararla con la cepa nativa.

Utilizar otras plantas indicadoras de rápido crecimiento tales como tomate, arroz, maíz, y lechuga con el fin de verificar que la cepa *P. putida* UA44 MR-1 para determinar la capacidad de la bacteria como PGPR.

Realizar nuevamente los ensayos en plantas de banano cultivar Gran enano, para ratificar los resultados obtenidos en esta experimentación.

Realizar nuevos experimentos con otros cultivares de Banano, para así confirmar la capacidad promotora de crecimiento de la cepa de *P. putida* UA44, resistente a rifampicina.

Realizar un rastreo de *P. putida* UA 44 MR-1 y de bacterias totales en suelo rizosférico en pruebas con plantas de banano cultivar Gran enano, para identificar la pérdida de resistencia y/o incapacidad de colonización.

Efectuar pruebas de promoción de crecimiento con consorcios bacterianos donde se incluya la bacteria *P. putida* UA44 MR-1

Evaluar la viabilidad de las formulaciones por períodos mayores de tiempo y verificar si los mecanismos promotores de crecimiento se ven afectados por el tiempo de almacenamiento.

Realizar un estudio de costos sobre la producción de este tipo de formulaciones a gran escala, para determinar la viabilidad a nivel industrial.

REFERENCIAS

Abdel-Magid, H. M; Abdel-Aal S. I; Rabiw, R. K; y Sabrah, R. E. A. 1995. Chicken manure as a biofertilizer for wheat in the sandy soils of Saudi Arabia. *J. Arid Environ*: 29, pp 413-420.

Agrocadenas, 2006. La cadena del banano en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005 [online]. Observatorio de Competitividad Agrocadenas. Disponible en internet:

http://www.agrocadenas.gov.co/banano/banano_descripcion.htm

Aguilar, J.E y Sanchez de P, M.1998. Efecto de una rizobacteria nitro fijadora y niveles de fertilizante en el comportamiento agronómico del tomate *Lycopersicon esculentum var.* *Acta agronómica* Vol 48 pp.60-71

Alami, Y., Achouak, W., Marol, C. y Heulin T. 2000. Rizhosfere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an Exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from Sun flowers roots. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 3393-3398

Alexander, M. 1984. Ecology of *Rhizobium*. In: Alexander M (ed) Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. Plenum Press, New York, pp 39-50

Amer, G.A. y Ukhede, R.S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, pp. 809-816.

An, Q.L.; Yang, X.J.; Dong, Y.M.; Feng, L.J.; Kuang, B.J.; y Li, J.D. 2001 Using confocal laser scanning microscope to visualize de infection of rice roots by GFP-labelled *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic diazotroph. *Acta Bot. Sinica*: 43, pp 558-564.

Augura 2006. Coyuntura Bananera Colombiana. Disponible en internet: <http://www.augura.com.co/Coyunturas/Coyuntura%20bananera%20segundo%20semestre%202006.pdf>

Bashan, Y. 1986a. Alginate beads as Synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *App. Environ. Microbiology*: 51, pp 1089-1098.

Bashan, Y. 1986b. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on Wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 18, No. 3, pp. 297-301

Bashan, Y. y Bashan, L.E. 2005. Plant Growth Promoting Bacteria. *Encyclopedia of soils in the environment.* Vol. 1., pp. 103-115. 2200 p.

Bethlenfalvay G J 1993 Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis* 14, 413-425.

Brown M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathology* 12: 181-197.

Bowen G.F., Rovira A.D. 1999 the rizosphere and its management to improve plant grwth. Adv Agron 66 1-102

Brunner W, Sutherland FH, Focht DD 1985 Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation. J Environ Qual 14:324-328

Burr, T.J. and Caesar A. 1984. Beneficial plant bacteria. Crit. Rev Plant Sci 2: 1-20

Burr, T.J., Schrot, M.N., and Suslow, T. 1978. Increased potato yield by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. Phytopathology 68, 1377-1383

Camacho, A.J.C. 1997. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en Banano (*Musa sp*) y algunas observaciones sobre la gutación. Tesis Mag. Sc. Turrialba , CR, CATIE. 122 p.

Chanway, C.P., M. Shishido, J. Nairn, S. Jungwirth, J. Markham, G. Xiao y F.B. Holl. 2000. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. For. Ecol. Manage. 133: 81-88.

Chao, W.L. and Alexander, M. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. Appl Environ microbial 47: 94-97

Chen, Y., Mei, R., Lu S., Lui L., Kloepper J.W. 1996 The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In Utkhede, R.S. Gupta, V.K pp 165-176

Cheryl L. Patten y Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl Environ Microbiol.*; 68(8): 3795–3801

Cooper, R. 1959. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. *Soils Fertil* 22: 327-333

Couch, T. L. e Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogens. En: *Microbial Control o Pests and Plant Diseases 1970-1980* (ed. H. D. Burges), Academic Press, London, pp. 621-34

Crowley, D. 2001. Function of siderophores in the plant rhizosphere. En: Pinton, R.; Varanini, Z. y Nannipieri, P. (Eds). *The Rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker Inc., New York. pg 1-17.

Dandurand, L.M., Morra, M.J., Chaverra, M.H. y Orser, C.S. 1994. Survival of *Pseudomonas spp* in air-dried mineral powders. *Soil Biol. Biochem*, Vol. 26, No. 10, pp. 1423-1430.

Dandurand, L-M. C. y Knudsen, G.R. 2002. Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere. En: Hurst, Ch.J.; Crawford, R.L.; Knudsen, G.R.; McInerney, M.J. y Stetzenbach, L.D. (Eds). *Manual of environmental microbiology*. 2nd edition. ASM Press, Washington D.C. pg 516-526.

Danies, R. 2005. Sector Banano en Colombia 1995 – Marzo de 2005. Superintendenmcia de Sociedades Grupo de Estadística. Bogotá.

Date, R.A. 1970. Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. *Plant and soil*, 32, 703-25

De Freitas J.R. y Germida J.J. 1992. Growth Promotion of Winter Wheat by Fluorescent Pseudomonads under field conditions. Soil Biol. Biochemical Vol. 24 No 11 pp 1137-1146.

de Freitas, J.R. 2000. yield and N assimilation of winter wheat inoculated with rhizobacteria. Pedobiologia 44, 97-104

Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. y Chauhan, S.M. 2004. Growth promoting and yield enhancement of peanut by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological Research, 159, pp. 371-394

Duffy B.K. and Défago G. 1997. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. Phytopatology 87 pp 1250-1257

Elegba, M.S. and Rennie, R.J. 1984. Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybean. Can j Soil Sci 64: 631-636

García, J.A, Castillo, A., Ramírez, M.E., Rendón, G. y Larqué M.U. 2001. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, Hsu y Beachhofer para la selección de medias. Agrociencia 35: 79-86.

Gaskins, M.H., Albrecht, S.L., Hubbell, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. Agric Ecosyst Environ 12: 99-166

Germida J J and Walley F L 1996 Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. Bio. Fertil. Soils 23, 113-120

Gindrat, D. 1979. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds and soil with antagonist. In: Schippers B, Gams W (eds) Soil-borne plant pathogens. Academic Presss, New York, pp 537-551

Glass A D M 1989 Plant Nutrition: An Introduction to Current Concepts. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, USA. 234 pp.

Glandorf, D.C.M., Brand, I., Bakker, P.A.H.M. y Schippers B. 1992. Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and Soil*. 147: 135 -142.

Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68.

González, R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra en banano. Centro agronómico Tropical de investigación y enseñanza.

Gualtieri G and Bisseling T 2000 The evolution of nodulation. *Plant. Mol. Biol.* 42 181–194.

Gutiérrez, C.F.A. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis Mag. Sc. Turrialba , CR, CATIE. 91 p.

Handelsman, J. y Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.

Hallmann, J.; Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1998. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 551-560.

Hattori, T., and Hattori, R. 1976. The physical environment in soil microbiology to soil microorganisms. *CRC Crit Rev Microbiol* 4: 423-461

Heijnen, C.E., van Elsas, J.D., Kuikman, P.J., and van Veen, J.A. 1988. Dynamics of *Rhizobium leguminosarium* biovar *trifolii* introduced into soil; the effects of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Biol Biochem* 20: 483-488

Hernández Montiel, Luis G. y Escalona Aguilar Miguel A. 2003 Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. En: La Ciencia y el HOMBRE. Volumen XVI, No. 1

Hiltner L. 1904 Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft* 98: 59-78

Howie, W.J., and Suslow, T.V. 1991. Role of antibiotic biosynthesis in inhibition of *ythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomona fluorecens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399

Jaizme-Vega M.C., Rodrigue-Rromero A.S., Piñero Guerra M.S. 2004. Potential use of rizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated banana. *Fruits*, vol. 59 pp 83-90.

Jones Burges, Keith A . 1998. Technology of formulation and application. En: *Formulation of microbial biopesticides* (ed. H. D. Burges) pp 197-210

Kato, K., Fujii, S., Gong, Y., Tanaka, S., Katayama, M. y Kimoto, H. 1999. Synthesis of a-trifluoromethylated indoleacetic acid:a potential peroxidase-stable plant growth regulator. *Journal of Fluorine Chemistry* 99, 5-7

Kim K Y, Jordan D and McDonald G A 1998. Effect of phosphatesolubilizing bacteria and vesicular–arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 26, 79–87.

Kloepper, J.W.; Leong, J.; Teintze, M y Schroth, M.N. 1980a. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.

Kloepper, J.W., Schroth, M.N y Miller T.D., 1980b Effects of rizosphere colonization by plant growth promoting rizobacteria on patato plant development and yield. *Phytopathology* 70 pp 1078-1082

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Schroth, M.N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas of Science, Animal and Plant Science*. Inst. For Public information, Philadelphia, USA, pp 60-64.

Kloepper, J.W. & Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: *Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria*, INRA, v.2. pp. 879-882.

Kloepper, J.W. y Schroth, M.N. 1981a. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71: 642-644.

Kloepper, J.W. y Schroth, M.N. 1981b. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and displacement of root microflora. *Phytopathology* 71: 1020-1024.

Kloepper, J.W.; Rodríguez-Kabana, R.; Zehnder, G.W.; Murphy, J.F.; Sikora, E. y Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28: 21-26.

Kloepper, J.W. 2003. A review of mechanisms for plant growth Promotion by PGPR. 6th International PGPR Workshop, 5-10 October 2003.

Landa, B.B.; Navas-Corté, J.A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53: 341-352.

Leeman J. A. van Pelt, F. M. den Ouden, M. Heinsbroek¹, P. A. H. M. Bakker and B. Schippers. 1995a. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. Vol 101 No 6 pp 655-664.

Leeman M, Van Pelt, den Ouden FM, Heinsboek m, Bakker PAHM, Schippers B. 1995b. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of Radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85 pp 1021-1027

Leong, J. 1986. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 187-209.

Levy, E., Gough, F.J., Berlin, K.D., Guiana, P.M., and Smith, J.T. 1992. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathol* 41, 335-341

Liu, L.; Kloepper, J.W. y Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 695-698

Loper, J. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.

Marschner, H. 1997. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press. pp.889

McCully M E 2001 Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 983–990.

Mishustin, E.N. and Naumova, A.N. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. *Microbiologiya* 31: 543-555

Mudt, W.J. y Ann. New York Acad. Sci. 144 (1967) 118.

Nakkeeran, S. Dilanth, W.G., Zaki A. 2002. Plant Growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *PGPR Biocontrol and Biofertilization*, Chapter 10 pp 257-296

Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.

Ness R L L and Vlek P L G 2000 Mechanism of calcium and phosphate release from hydroxy-apatite by mycorrhizal hyphae. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 949–955.

Osorio, N.W. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant Nutrient Uptake. Facultad Nacional de Agricultura, Vol. 60, No. 1, pp. 3621-3643

Okon Y, Hadar YA 1987 Microbial inoculants as crop yield enhancers. CRC Crit Rev Biotechnol 6:61-85

Paau, A.S. 1998. Formulation of Beneficial organisms applied to soil. En: Formulation of Microbial Bipesticides (Ed. Burges) 7: 235-254.

Patiño H.L. 2002. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre la Sigatoka Negra en banano. Tesis Mag. MSc. Turrialba , CR, CATIE. 91 p.

Patiño, Bustamante y Salazar. 2007. Efecto de sustratos foliares sobre la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* morelet) en banano (*musa × paradisiaca* L.) Y plátano (*musa acuminata* colla). Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid

Pattison, T. 2003. Screening rhizobacteria for plant growth promotion and suppression of burrowing nematodes on banana. No publicado.

Patten, C y Glick B,R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. Applied and Environmental Microbiology. Vol.68 No 8 pp 3795-3801

Pérez, J.E. 2007. Selección de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de rizobacterias aisladas de banano y plátano. Universidad de Antioquia, Facultad de ciencias exactas y naturales.

Pérez-N., J.C. y Leguizamón-C., J.E. 1998. Interacciones entre micorrizas nativas, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y calcio, en el manejo de *Fusarium* spp. en espárragos. *Cenicafé* 49(3): 211-223.

Postma, J., van elsas, J.D., Govaert, J.M. and van Veen, J.A. 1988. The dynamics of *Rhizobium leguminosarium* biovar *trifolii* introduced into soil as determined by immunofluorescence and selective planting techniques. *FEMS Microbiol Ecol* 53: 251-260

Raj, S.N., Deepak, S.A., Basavaraju, P., Shetty, H.S., Reddy, M.S., and Kleopfer, J.W. 2003. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promoting and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection* 22, 579-588

Ramírez, C.A. 2005. Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Universidad Nacional Colombia, Facultad de ciencias exactas.

Ramírez, L.E. y Mellado, J. 2000. Bacterial biofertilizers. Cap. 5, pp.144-161

Ramírez, M. 2008. Rizobacterias asociadas a Crisantemo (*Dendrathera grandiflora*. *Tevelev*) con potencial para promover crecimiento vegetal. Universidad Antioquia, Facultad de ciencias y Exactas.

Rao D L N y Gill H S 1995 Biomass and biofertilizer production by *Sesbania cannabina* in alkaline soil. *Bioresource Tech.* 53, 169–172.

Rekha P.D., Wai- An Lai, Arun A.B., Young C.C. 2006. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas Putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg 104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology* pp 447-451.

Rhodes, D. J. 1993. Formulation of biological control agents. En: *Exploitation of Microorganisms* (ed. D. G. Jones), Chapman & Hall, London, pp. 411-39

Richards BN 1987 *The microbiology of terrestrial ecosystems.* Longman Science, Harlow

Ross, M. A. y Lemby, C. A. (1985) *Applied Leed Science* Macmillan, New York
Salisbury, F.B. 1994. The role of plant hormones. *In Plant-Environment Interactions.* Ed. R EWilkinson. pp. 39–81. Marcel Dekker, New York, USA.

Salisbury, F.B y Ross 1994 The role of plant hormones. *In Plant-environment interactions.* Ed R E Wilkininon pp 89-81 Marcel Dekker, New York, USA

Sher, H. B. 1977. Microcapsulated pesticides, En: *Controlled Release Pesticides.* ACS Symposium Series 53 (ed. H. B. Sher), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 126-44

Sherman K. E. 1985. Multiple virus interactions. En: *Viral Insecticides for Biological Control* (eds K. Maramorosh and K. E. Sherman), Academic Press, New York, p. 735

Stacey, G. 1985. The *Rhizobium* experience. In: Halvorson, H.O., Prammer, D., Rogul M (eds) Engineered bacteria in environment: Scientific issues. Am Soc Microbiol, Washington DC, pp 109-121

Stevenson F J and Cole M A 1999 Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients, 2nd Edition. Wiley, New York, USA. 427 pp.

Schippers, B.; Bakker, A.W. y Bakker, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 339-358.

Schippers, Leonarde - C, Gieffers, W., Salamini F. & Gebhardt, C. 1992. The R-gene conferring race - specific resistance to *Phytophthora infestans*. En: potato is located and potato chromosome V. Molecular and General Genetics. Vol. 283, p. 278 -283.

Smith, L.; Smith, M.; Hamill, S.; O'Keefe, D. y Galea, V. 2003. Improving plant vigour and resistance to *Fusarium* wilt of tissue-culture banana grown with bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. En: 2nd Internacional symposium on fusarium

Spaink H P 2000 Root inoculation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54, 257-288.

Sun A M and O'Shea G M. 1985. Microencapsulation of living cells- a long-term delivery system. Journal of Controlled Release, 2. 137-141.

Thangavelu, R.; Velazhehen, R. y Sathiamoorthy, S. 2003. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease. En: 2nd Internacional symposium on fusarium wilt on banana. Salvador de Bahía, 22-26 September, 2003. pg. 34.

Thomson, J.A. 1980. Production and quality control of legume inoculants, p. 489-533. In F.J. Bergersen (ed.), Methods of evaluating biological nitrogen fixation. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.

Ting, A.S.Y.; Meon, S.; Kadir, J.; Son, R y Gurmit, S. 2003. Potential role of endophytes in the biocontrol of Fusarium wilt. En: 2nd Internacional symposium on fusarium wilt on banana. Salvador de Bahía, 22-26 September, 2003. pg. 32.

Tisdale SL and Nelson WL 1975 Soil Fertility and Fertilizers, 3rd Edition. Macmillan Publishing, New York, USA. 694 pp.

Tobar R, Azcon R and Barea J M 1994 Improved nitrogen uptake and transport from 15N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. New Phytol. 26, 119–122.

Trapero-Casas , A., Kaiser, W.J., and Ingram, D.M. 1990. Ctról of Pythium seed rot and preemergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. Plant Dis 74, 563-569

Trivedi, P., Pandey, A. y Palni, L.M. 2005. Carrier based preparations of plant growth promoting bacterial inoculants suitable for use y cooler regions. World journal of Microbiology & biotechnology, 21, pp. 941-945.

Van Elsas J.D. Dijkstra A.F. Govaert J.M. Van Veen J.A. 1986 survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introducing into two soils of different texture in field microplots FEMS Microbiol Ecol 38 pp 151-160.

Van Elsas, J.D. and Heinen, C.E. 1990. Methods for the inoculation bacteria into soil: A review. *Biol Fertil Soils* 10: 127-133

Van Loon, L.C. y Bakker, P.A.H.M. 2003. Signalling in rhizobacteria – plant interaction. En: De Kroon, H. y Visser, E.J.W. (Eds). *Root Ecology*. Springer – Verlag, Berlin. pg 297 – 330.

Van Peer, R, Niemann, G.J., y Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728–734.

Ventura W and Ladha J K 1997 Sesbania phosphorus requirements when used as biofertilizer for long-term rice cultivation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 1240–244.

Vessey J. Kevin 2003. Plan growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plan and Soil* 255: 571-586

Vidhyasekaran, P., and Muthamilan, M. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79, 782-786.

Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K., and Vasumathi, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to Control Pigeopnea Wilt. *Biological Control.* 8, 166-171.

Vidhyasekaran, P., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., Subramanian, N. y Vasumathi, K. 1997a. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorecens* for control of rice blast. *Plant Pathology*, 46, pp. 291-297

Walley F L and Germida J J 1997 Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT4. Biol. Fertil. Soils 24, 365–371.

Watrud LS, Perlak FJ, Tran MT, Kusano K, Mayer E J, Miiler-Wideman MA, Obukowicz MG, Nelson DR, Kreitinger JP, Kaufman JR (1985) Cloning of the *Bacillus thuringiensis* subsp, *kurstaki* delta-endotoxin gene into *Pseudomonasfluorescens*: Molecular biology and ecology of an engineered microbial pesticide. In: Halvorson HO, Pramer O, Rogui M (eds) Engineered organisms in the environment: Scientific issues. Am Soc Microbiol, Washington DC, pp 40-46

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany (Roots Special Issue) 52: 487-511.

Young C.C., Rekha, P.D., Lai, W.A. y Arun, A.B. 2006. Encapsulation of plant growth promoting bacteria in Alginate beads enriched with Humic acid. Department of soil and environmental Sciences.

Zahir, Z., Arshad, M. and Frankenberger, Jr. T. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy, 81, 97-168.

Zodape, S.T. 2001. Seaweeds as a biofertilizer. J. Sci. Indust. Res. 60, 378–382.

ANEXO 1: Sales que componen el medio de cultivo 3

En g.L-1: nitrato de amonio (NH_4NO_3), 0.78; fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), 0.8; fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 0.2 ; sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.20; cloruro de calcio (CaCl_2), 0.06; cloruro de Sodio (NaCl), 0.10; molibdato de Sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.002; sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.00024; sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0.00004; sulfato de cobalto ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.010; sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 0.003; etilendiaminotetraacético sódico-férrico (Na_2FeEDTA), 0.028; ácido bórico (H_3BO_3), 0.005; agar, 15; biotina ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) y Ácido p-aminobenzoico ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$).

ANEXO 2: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 1 (9 JULIO DE 2007)

ANEXO 2-A: ANÁLISIS DE VARIANZA

	PESO TALLO FRESCO	PESO RAÍZ FRESCA	PESO TALLO SECO	PESO RAÍZ SECA	PESO TOTAL SECO
ASIMETRÍA TÍPICA	-1,7874	0,213	-1,0415	11,1421	-1,6114
CURTOSIS TIPIFICADA	0,7489	-1,2091	0,9042	27,2214	4,7079

ANEXO 2-B: PESO TALLO FRESCO

Tabla ANOVA para WTf según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	23,6472	12	1,9706	4,28	0,0000
Intra grupos	47,8443	104	0,460041		

Total (Corr.) 71,4915 116

ANEXO 2-C: PESO RAIZ FRESCA

Tabla ANOVA para WRf según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	31,2427	12	2,60356	2,53	0,0057	
Intra grupos	106,937	104	1,02824			
Total (Corr.)	138,179	116				

ANEXO 2-D: PESO TALLO SECO

Tabla ANOVA para WTs según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,45885	12	0,0382375	3,68	0,0001	
Intra grupos	1,07165	103	0,0104043			
Total (Corr.)	1,5305	115				

ANEXO 2-E: PESO RAIZ SECA

Tabla ANOVA para WRs según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,20282	12	0,0169017	2,12	0,0216	
Intra grupos	0,829694	104	0,00797783			
Total (Corr.)	1,03251	116				

ANEXO 2-G: PESO TOTAL SECO

Tabla ANOVA para W Total según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	1,06074	12	0,0883948	2,88	0,0018	
Intra grupos	3,19125	104	0,0306851			
Total (Corr.)	4,25199	116				

ANEXO 3: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL
ENSAYO 2 (23 JULIO DE 2007)

ANEXO 3-A: ANÁLISIS DE VARIANZA

	PESO TALLO FRESCO	PESO RAÍZ FRESCO	PESO TALLO SECO	PESO RAÍZ SECO	% AUMENTO DE TALLO	PESO TOTAL SECO
ASIMETRÍA TÍPICA	-1,75	-1,07	-1,43	-0,16	1,36	-1,13
C U R T O S I S TIPIFICADA	-0,33	-0,31	-0,40	-0,08	0,13	-0,38

ANEXO 3-B: PESO TALLO FRESCO

Tabla ANOVA para WTf según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	158,887	12	13,2406	14,43	0,0000	
Intra grupos	72,4823	79	0,917498			
Total (Corr.)	231,37	91				

ANEXO 3-C: PESO RAIZ FRESCA

Tabla ANOVA para WRf según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	34,9852	12	2,91543	3,10	0,0012	
Intra grupos	74,3574	79	0,941233			
Total (Corr.)	109,343	91				

ANEXO 3-D: PESO TALLO SECO

Tabla ANOVA para WTs según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,58385	12	0,131988	8,73	0,0000
Intra grupos	1,19387	79	0,0151123		
Total (Corr.)	2,77772	91			

ANEXO 3-E: PESO RAIZ SECA

Tabla ANOVA para WRs según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0644761	12	0,00537301	1,84	0,0548
Intra grupos	0,230085	79	0,00291247		
Total (Corr.)	0,294561	91			

ANEXO 3-F: PESO SECO TOTAL

Tabla ANOVA para W Total según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,21118	12	0,184265	6,59	0,0000
Intra grupos	2,2082	79	0,027952		
Total (Corr.)	4,41939	91			

ANEXO 3-G: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL TALLO

Tabla ANOVA para % AT según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	42268,3	12	3522,35	4,24	0,0000
Intra grupos	65658,3	79	831,117		
Total (Corr.)	107927,0	91			

**ANEXO 4: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL
ENSAYO 3 (4 DE AGOSTO DE 2007)**

ANEXO 4-A: ANÁLISIS DE VARIANZA

	P E S O T A L L O FRESCO	PESO RAÍZ FRESCA	P E S O T A L L O SECO	PESO RAÍZ SECA	P E S O T O T A L SECO
ASIMETRÍA TÍPICA	-0,8464	1,5815	-0,4441	4,145	-0,4275
CURTOSIS TIPIFICADA	0,4687	-0,0275	-0,7064	4,4676	0,0145

ANEXO 4-B: PESO DE TALLO FRESCO

Tabla ANOVA para WTF según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	21,7649	9	2,41832	3,82	0,0008
Intra grupos	35,4409	56	0,632873		
Total (Corr.)	57,2058	65			

ANEXO 4-C: PESO DE RAIZ FRESCA

Tabla ANOVA para WRF según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	19,9835	9	2,22039	6,80	0,0000
Intra grupos	18,2935	56	0,32667		
Total (Corr.)	38,277	65			

ANEXO 4-D: PESO DE TALLO SECO

Tabla ANOVA para WTs según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,378325	9	0,0420361	1,67	0,1174
Intra grupos	1,40691	56	0,0251233		
Total (Corr.)	1,78523	65			

ANEXO 4-E: PESO DE RAIZ SECA

Tabla ANOVA para WRs según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,235372	8	0,0294215	3,90	0,0012
Intra grupos	0,376726	50	0,00753452		
Total (Corr.)	0,612098	58			

ANEXO 4-F: PESO TOTAL SECO

Tabla ANOVA para WTot s según FORMULACIÓN

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,975862	8	0,121983	2,74	0,0136
Intra grupos	2,2232	50	0,0444639		
Total (Corr.)	3,19906	58			

ANEXO 5: ANALISIS ESTADÍSTICO UNIFACTORIAL ENSAYO 4 (24 DE SEPTIEMBRE DE 2007)

ANEXO 5-A: ANÁLISIS DE VARIANZA

	PESO TALLO FRESCO	PESO RAÍZ FRESCA	PESO TALLO SECO	PESO RAÍZ SECO	PESO TOTAL SECO	% AUMENTO TALLO
ASIMETRÍA TÍPICA	1,7589	3,9325	-0,5505	25,7562	-0,1392	3,817
CURTOSIS TIPIFICADA	0,2395	1,3978	-1,3785	88,9011	-0,6251	3,0607

ANEXO 5-B: PESO DE TALLO FRESCO

Tabla ANOVA para WTF según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	38,7054	21	1,84311	2,88	0,0001
Intra grupos	83,9141	131	0,640566		
Total (Corr.)	122,619	152			

ANEXO 5-C: PESO DE RAIZ FRESCA

Tabla ANOVA para WRF según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	24,7784	21	1,17992	4,48	0,0000
Intra grupos	34,4845	131	0,263241		
Total (Corr.)	59,2629	152			

ANEXO 5-D: PESO DE TALLO SECO

Tabla ANOVA para WTs según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,40681	21	0,0193719	1,27	0,2046
Intra grupos	1,99278	131	0,0152121		
Total (Corr.)	2,39959	152			

ANEXO 5-E: PESO DE RAIZ SECA

Tabla ANOVA para WRs según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,220456	21	0,0104979	1,68	0,0420
Intra grupos	0,819369	131	0,00625473		
Total (Corr.)	1,03982	152			

ANEXO 5-F: PESO TOTAL SECO

Tabla ANOVA para WTot s según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,626911	21	0,0298529	1,31	0,1814
Intra grupos	2,99025	131	0,0228263		
Total (Corr.)	3,61716	152			

ANEXO 5-G: PORCENTAJE DE AUMENTO EN TALLO

Tabla ANOVA para % AT según FORMULACION

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	72304,6	21	3443,08	3,57	0,0000
Intra grupos	126347,0	131	964,484		
Total (Corr.)	198652,0	152			

ANEXO 6: PRUEBA EN BANANO MES 1

MUESTREO GENERAL (MES 1):

ANEXO 6-A: ANÁLISIS DE LA VARIANZA

	ALTURA DEL PSEUDO-TALLO	DIÁMETRO DEL CORMO	% AUMENTO DEL PSEUDO-TALLO	% AUMENTO DEL DIÁMETRO
A S I M E T R Í A T Í P I C A	-1,69	-2,46	2,06	-0,89
C U R T O S I S T I P I F I C A D A	-0,22	0,21	1,07	0,01

ANEXO 6-B: ALTURA DEL TALLO

Tabla ANOVA para Altura Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	13,1961	2	6,59805	3,75	0,0265
Intra grupos	204,259	116	1,76085		
Total (Corr.)	217,455	118			

ANEXO 6-C: DIÁMETRO DEL CORMO

Tabla ANOVA para Diametro del Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,465165	2	0,232583	3,81	0,0249
Intra grupos	7,07808	116	0,0610179		
Total (Corr.)	7,54324	118			

ANEXO 6-D: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL TALLO

Tabla ANOVA para % Aumento Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4335,25	2	2167,62	4,40	0,0143
Intra grupos	57092,5	116	492,177		
Total (Corr.)	61427,8	118			

ANEXO 6-E: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL DIÁMETRO

Tabla ANOVA para % Aumento Diametro según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	10183,2	2	5091,59	5,91	0,0036
Intra grupos	99982,8	116	861,921		
Total (Corr.)	110166,0	118			

MUESTREO DESTRUCTIVO (MES 1)

ANEXO 6-F: ANÁLISIS DE VARIANZA

	P E S O F R E S C O P S E U D O - T A L L O	P E S O F R E S C O H O J A S	P E S O F R E S C O R A Í Z	P E S O F R E S C O C O R M O	P E S O S E C O P S E U D O - T A L L O	P E S O S E C O H O J A S	P E S O S E C O R A Í Z	P E S O S E C O C O R M O
ASIMETRÍA TÍPICA	1,40	0,61	1,26	1,07	0,60	0,79	1,32	1,44
CURTOSIS TIIFICADA	-0,31	-0,79	-0,14	-0,66	0,90	-0,74	0,04	-0,06
	% DE PARTICIPACIÓN F R E S C O P S E U D O T A L L O		% DE PARTICIPACIÓN F R E S C O H O J A		% DE PARTICIPACIÓN F R E S C O R A Í Z		% DE PARTICIPACIÓN C O R M O F R E S C O	
ASIMETRÍA TÍPICA	-0,01		-0,67		0,63		-0,11	
CURTOSIS TIIFICADA	-0,37		0,68		-0,62		-0,86	

	% DE PARTICIPACIÓN S E C O P S E U D O T A L L O	% DE PARTICIPACIÓN S E C O H O J A	% DE PARTICIPACIÓN S E C O R A Í Z	% DE PARTICIPACIÓN C O R M O S E C O
ASIMETRÍA TÍPICA	0,92	0,69	0,42	0,32
CURTOSIS TIIFICADA	-0,38	-0,70	-0,69	-0,72

ANEXO 6-F: PESO FRESCO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	34,8446	2	17,4223	3,72	0,0414
Intra grupos	98,3602	21	4,68382		
Total (Corr.)	133,205	23			

ANEXO 6-G: PESO FRESCO HOJA

Tabla ANOVA para W F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	147,565	2	73,7823	8,12	0,0024	
Intra grupos	190,921	21	9,09149			
Total (Corr.)	338,486	23				

ANEXO 6-H: PESO FRESCO RAÍZ

Tabla ANOVA para W F Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	131,718	2	65,859	6,53	0,0062	
Intra grupos	211,813	21	10,0863			
Total (Corr.)	343,531	23				

ANEXO 6-I: PESO FRESCO CORMO

Tabla ANOVA para W F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	3,43458	2	1,71729	5,50	0,0120	
Intra grupos	6,55843	21	0,312306			
Total (Corr.)	9,993	23				

ANEXO 6-J: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	81,9142	2	40,9571	4,20	0,0292	
Intra grupos	204,778	21	9,75131			
Total (Corr.)	286,692	23				

ANEXO 6-K: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	29,0626	2	14,5313	0,75	0,4857
Intra grupos	408,227	21	19,4394		
Total (Corr.)	437,289	23			

ANEXO 6-L: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % F Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	50,2402	2	25,1201	1,28	0,2986
Intra grupos	411,839	21	19,6114		
Total (Corr.)	462,079	23			

ANEXO 6-M: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,31322	2	0,15661	0,20	0,8207
Intra grupos	16,4924	21	0,785352		
Total (Corr.)	16,8056	23			

ANEXO 6-N: PESO SECO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0592333	2	0,0296167	2,43	0,1126
Intra grupos	0,25615	21	0,0121976		
Total (Corr.)	0,315383	23			

ANEXO 6-O: PESO SECO HOJAS

Tabla ANOVA para W S Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,20393	2	0,601963	4,35	0,0263
Intra grupos	2,90874	21	0,138511		
Total (Corr.)	4,11266	23			

ANEXO 6-P: PESO SECO RAÍZ

Tabla ANOVA para W S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,4996	2	0,2498	3,67	0,0429
Intra grupos	1,42836	21	0,0680173		
Total (Corr.)	1,92796	23			

ANEXO 6-Q: PESO SECO CORMO

Tabla ANOVA para W S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0188583	2	0,00942917	3,66	0,0431
Intra grupos	0,0540375	21	0,00257321		
Total (Corr.)	0,0728958	23			

ANEXO 6-R: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,62143	2	2,31072	4,03	0,0331
Intra grupos	12,0521	21	0,573908		
Total (Corr.)	16,6735	23			

ANEXO 6-S: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % S Hoja según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	26,374	2	13,187	4,05	0,0326
Intra grupos	68,4044	21	3,25735		
Total (Corr.)	94,7784	23			

ANEXO 6-T: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	121,035	2	60,5175	5,93	0,0091
Intra grupos	214,458	21	10,2123		
Total (Corr.)	335,493	23			

ANEXO 6-U: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	44,612	2	22,306	1,30	0,2926
Intra grupos	359,341	21	17,1115		
Total (Corr.)	403,953	23			

ANEXO 6-V: PESO SECO AÉREO

Tabla ANOVA para P Aereo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,74131	2	0,870654	3,82	0,0384
Intra grupos	4,78499	21	0,227857		
Total (Corr.)	6,5263	23			

ANEXO 6-W: PESO SECO SUBTERRÁNEO

Tabla ANOVA para P Subterráneo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,712258	2	0,356129	4,02	0,0333
Intra grupos	1,86113	21	0,088625		
Total (Corr.)	2,57338	23			

ANEXOS 7: PRUEBA EN BANANO MES 2

ANEXO 6-A: ANÁLISIS DE LA VARIANZA

	ALTURA DEL PSEUDOTALLO	DIÁMETRO DEL CORMO	% AUMENTO DEL PSEUDOTALLO	% AUMENTO DEL DIÁMETRO
ASIMETRÍA TÍPICA	1,86	0,70	3,57	-0,92
CURTOSIS TIPIFICADA	2,14	-0,79	3,71	0,07

ANEXO 7-B: ALTURA DEL TALLO

Tabla ANOVA para Altura Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	17,042	2	8,52102	2,40	0,0976
Intra grupos	255,218	72	3,54469		
Total (Corr.)	272,26	74			

ANEXO 7-C: DIÁMETRO DEL CORMO

Tabla ANOVA para Diametro del Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,393316	2	0,196658	2,78	0,0689
Intra grupos	5,09916	72	0,0708216		
Total (Corr.)	5,49247	74			

ANEXO 7-D: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL TALLO

Tabla ANOVA para % Aumento Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6417,46	2	3208,73	2,61	0,0804
Intra grupos	88480,5	72	1228,9		
Total (Corr.)	94897,9	74			

ANEXO 7-E: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL DIÁMETRO

Tabla ANOVA para % Aumento Diametro según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	12490,9	2	6245,43	4,86	0,0105
Intra grupos	92529,2	72	1285,13		
Total (Corr.)	105020,0	74			

MUESTREO DESTRUCTIVO (MES 2)

ANEXO 7-F: ANÁLISIS DE VARIANZA

	PESO FRESCO PSEUDO-TALLO	PESO FRESCO HOJAS	PESO FRESCO RAÍZ	PESO FRESCO CORMO	PESO SECO PSEUDO-TALLO	PESO SECO HOJAS	PESO SECO RAÍZ	PESO SECO CORMO
ASIMETRÍA TÍPICA	1,11	1,07	0,89	1,64	1,66	1,10	0,67	3,29
CURTOSIS TIPIFICADA	-0,11	-0,59	-0,43	0,00	0,54	-0,30	-1,41	3,06

	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO PSEUDOTALLO	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN CORMO FRESCO
ASIMETRÍA TÍPICA	-2,80	-0,72	-0,54	2,50
CURTOSIS TIPIFICADA	3,31	2,52	1,15	1,78

	% DE PARTICIPACIÓN SECO PSEUDOTALLO	% DE PARTICIPACIÓN SECO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN SECO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN CORMO SECO
ASIMETRÍA TÍPICA	-1,14	-2,77	0,34	2,50
CURTOSIS TIPIFICADA	0,65	2,91	0,33	1,33

ANEXO 7-F: PESO FRESCO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	20,3125	2	10,1562	1,01	0,3822
Intra grupos	201,199	20	10,0599		
Total (Corr.)	221,511	22			

ANEXO 7-G: PESO FRESCO HOJA

Tabla ANOVA para W F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	102,95	2	51,475	1,67	0,2133
Intra grupos	616,078	20	30,8039		
Total (Corr.)	719,028	22			

ANEXO 7-H: PESO FRESCO RAÍZ

Tabla ANOVA para W F Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	98,677	2	49,3385	1,18	0,3265
Intra grupos	833,117	20	41,6559		
Total (Corr.)	931,794	22			

ANEXO 7-I: PESO FRESCO CORMO

Tabla ANOVA para W F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0955377	2	0,0477688	0,07	0,9369
Intra grupos	14,5999	20	0,729996		
Total (Corr.)	14,6955	22			

ANEXO 7-J: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	26,7934	2	13,3967	1,27	0,3012	
Intra grupos	210,172	20	10,5086			
Total (Corr.)	236,965	22				

ANEXO 7-K: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	31,4197	2	15,7098	0,92	0,4137	
Intra grupos	340,549	20	17,0274			
Total (Corr.)	371,969	22				

ANEXO 7-L: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % F Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	64,6638	2	32,3319	1,31	0,2915	
Intra grupos	492,912	20	24,6456			
Total (Corr.)	557,576	22				

ANEXO 7-M: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	5,27801	2	2,639	2,33	0,1228	
Intra grupos	22,6242	20	1,13121			
Total (Corr.)	27,9022	22				

ANEXO 7-N: PESO SECO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,025915	2	0,0129575	0,38	0,6863
Intra grupos	0,675459	20	0,0337729		
Total (Corr.)	0,701374	22			

ANEXO 7-O: PESO SECO HOJAS

Tabla ANOVA para W S Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,94984	2	1,47492	4,42	0,0258
Intra grupos	6,67892	20	0,333946		
Total (Corr.)	9,62877	22			

ANEXO 7-P: PESO SECO RAÍZ

Tabla ANOVA para W S Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,12486	2	0,562429	1,15	0,3373
Intra grupos	9,79779	20	0,489889		
Total (Corr.)	10,9226	22			

ANEXO 7-Q: PESO SECO CORMO

Tabla ANOVA para W S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00902065	2	0,00451033	0,87	0,4355
Intra grupos	0,104075	20	0,00520375		
Total (Corr.)	0,113096	22			

ANEXO 7-R: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	77,2549	2	38,6274	5,54	0,0122	
Intra grupos	139,547	20	6,97733			
Total (Corr.)	216,801	22				

ANEXO 7-S: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % S Hoja según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	225,991	2	112,996	2,60	0,0991	
Intra grupos	869,141	20	43,4571			
Total (Corr.)	1095,13	22				

ANEXO 7-T: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	191,244	2	95,6219	1,53	0,2403	
Intra grupos	1247,94	20	62,3969			
Total (Corr.)	1439,18	22				

ANEXO 7-U: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	10,0433	2	5,02164	2,82	0,0835	
Intra grupos	35,6438	20	1,78219			
Total (Corr.)	45,6871	22				

ANEXO 7-V: PESO SECO AÉREO

Tabla ANOVA para P Aereo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3,28129	2	1,64064	3,36	0,0552
Intra grupos	9,76437	20	0,488218		
Total (Corr.)	13,0457	22			

ANEXO 7-W: PESO SECO SUBTERRÁNEO

Tabla ANOVA para P Subterraneo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,17233	2	0,586165	1,03	0,3744
Intra grupos	11,3557	20	0,567783		
Total (Corr.)	12,528	22			

ANEXO 8: PRUEBA EN BANANO MES 3

MUESTREO GENERAL (MES 3):

ANEXO 8-A: ANÁLISIS DE LA VARIANZA

	ALTURA DEL PSEUDO-TALLO	DIÁMETRO DEL CORMO	% AUMENTO DEL PSEUDO-TALLO	% AUMENTO DEL DIÁMETRO
ASIMETRÍA TÍPICA	2,23	1,71	2,92	0,21
CURTOSIS TIPIFICADA	1,07	0,01	1,28	0,60

ANEXO 8-B: ALTURA DEL TALLO

Tabla ANOVA para Altura Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	43,7069	2	21,8534	2,97	0,0610
Intra grupos	337,909	46	7,34584		
Total (Corr.)	381,616	48			

ANEXO 8-C: DIÁMETRO DEL CORMO

Tabla ANOVA para Diametro del Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,418159	2	0,20908	1,19	0,3135
Intra grupos	8,08449	46	0,17575		
Total (Corr.)	8,50265	48			

ANEXO 8-D: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL TALLO

Tabla ANOVA para % Aumento Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	17795,3	2	8897,63	4,00	0,0250
Intra grupos	102340,0	46	2224,79		
Total (Corr.)	120135,0	48			

ANEXO 8-E: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL DIÁMETRO

Tabla ANOVA para % Aumento Diametro según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	15268,1	2	7634,07	3,36	0,0436
Intra grupos	104609,0	46	2274,1		
Total (Corr.)	119877,0	48			

MUESTREO DESTRUCTIVO (MES 3)

	PESO FRESCO PSEUDO	PESO FRESCO HOJAS	PESO FRESCO RAÍZ	PESO FRESCO CORMO	PESO SECO PSEUDO	PESO SECO HOJAS	PESO SECO RAÍZ	PESO SECO CORMO

	TALLO				TALLO			
ASIMETRÍA TÍPICA	2,24	1,38	0,78	1,77	2,29	1,38	1,14	2,08
CURTOSIS TIPIFICADA	1,45	0,33	-0,32	1,09	1,62	0,16	0,65	1,54

ANEXO 8-F: ANÁLISIS DE VARIANZA

	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO PSEUDOTALLO	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN CORMO FRESCO
ASIMETRÍA TÍPICA	0,87	-1,00	1,23	1,45
CURTOSIS TIPIFICADA	1,37	0,49	0,86	-0,31

	% DE PARTICIPACIÓN SECO PSEUDOTALLO	% DE PARTICIPACIÓN SECO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN CORMO FRESCO
ASIMETRÍA TÍPICA	-2,02	0,43	1,14	4,60
CURTOSIS TIPIFICADA	1,34	-0,04	0,65	8,68

ANEXO 8-F: PESO FRESCO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	69,473	2	34,7365	1,25	0,3125
Intra grupos	473,775	17	27,8691		
Total (Corr.)	543,248	19			

ANEXO 8-G: PESO FRESCO HOJA

Tabla ANOVA para W F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	234,799	2	117,399	2,01	0,1642
Intra grupos	991,316	17	58,3127		
Total (Corr.)	1226,11	19			

ANEXO 8-H: PESO FRESCO RAÍZ

Tabla ANOVA para W F Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	190,788	2	95,3939	2,83	0,0871
Intra grupos	573,489	17	33,7346		
Total (Corr.)	764,276	19			

ANEXO 8-I: PESO FRESCO CORMO

Tabla ANOVA para W F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,15567	2	2,07783	2,32	0,1288
Intra grupos	15,2375	17	0,896325		
Total (Corr.)	19,3932	19			

ANEXO 8-J: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	44,2122	2	22,1061	4,81	0,0221
Intra grupos	78,1434	17	4,59667		
Total (Corr.)	122,356	19			

ANEXO 8-K: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8,90227	2	4,45113	0,70	0,5100
Intra grupos	107,994	17	6,35261		
Total (Corr.)	116,897	19			

ANEXO 8-L: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % F Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	43,5258	2	21,7629	2,47	0,1148
Intra grupos	150,064	17	8,8273		
Total (Corr.)	193,59	19			

ANEXO 8-M: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,00911	2	0,504556	0,59	0,5671
Intra grupos	14,6239	17	0,860232		
Total (Corr.)	15,6331	19			

ANEXO 8-N: PESO SECO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,265902	2	0,132951	1,02	0,3822
Intra grupos	2,21915	17	0,130538		
Total (Corr.)	2,48505	19			

ANEXO 8-O: PESO SECO HOJAS

Tabla ANOVA para W S Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,52282	2	2,26141	2,20	0,1416
Intra grupos	17,4922	17	1,02896		
Total (Corr.)	22,0151	19			

ANEXO 8-P: PESO SECO RAÍZ

Tabla ANOVA para W S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,8442	2	0,922102	2,37	0,1240
Intra grupos	6,62545	17	0,389732		
Total (Corr.)	8,46966	19			

ANEXO 8-Q: PESO SECO CORMO

Tabla ANOVA para W S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0220971	2	0,0110486	1,12	0,3503
Intra grupos	0,168223	17	0,00989546		
Total (Corr.)	0,19032	19			

ANEXO 8-R: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	18,3928	2	9,19642	2,33	0,1277
Intra grupos	67,1455	17	3,94974		
Total (Corr.)	85,5384	19			

ANEXO 8-S: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % S Hoja según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	77,7103	2	38,8551	1,26	0,3096
Intra grupos	525,427	17	30,9075		
Total (Corr.)	603,137	19			

ANEXO 8-T: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	99,1769	2	49,5885	1,07	0,3646
Intra grupos	786,879	17	46,287		
Total (Corr.)	886,056	19			

ANEXO 8-U: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,75757	2	3,37878	1,68	0,2150
Intra grupos	34,0937	17	2,00551		
Total (Corr.)	40,8513	19			

ANEXO 8-V: PESO SECO AÉREO

Tabla ANOVA para P Aereo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	7,17261	2	3,58631	2,04	0,1593
Intra grupos	31,6807	18	1,76004		
Total (Corr.)	38,8533	20			

ANEXO 8-W: PESO SECO SUBTERRÁNEO

Tabla ANOVA para P Sunterraneo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,1362	2	1,0681	2,32	0,1271
Intra grupos	8,29206	18	0,46067		
Total (Corr.)	10,4283	20			

ANEXO 9: PRUEBA EN BANANO MES 4

MUESTREO GENERAL (MES 4):

ANEXO 9-A: ANÁLISIS DE LA VARIANZA

	ALTURA DEL PSEUDOTALLO	DIÁMETRO DEL CORMO	% AUMENTO DEL PSEUDOTALLO	% AUMENTO DEL DIÁMETRO
A S I M E T R Í A TÍPICA	0,53	1,51	1,64	2,13
C U R T O S I S TIPIFICADA	-0,12	0,54	-0,20	0,88

ANEXO 9-B: ALTURA DEL TALLO

Tabla ANOVA para Altura Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,48384	2	3,24192	0,29	0,7504
Intra grupos	222,528	20	11,1264		
Total (Corr.)	229,012	22			

ANEXO 9-C: DIÁMETRO DEL CORMO

Tabla ANOVA para Diámetro del Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,704321	2	0,352161	1,11	0,3482
Intra grupos	6,32932	20	0,316466		
Total (Corr.)	7,03364	22			

ANEXO 9-D: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL TALLO

Tabla ANOVA para % Aumento Tallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	9013,26	2	4506,63	1,44	0,2596
Intra grupos	62432,1	20	3121,61		
Total (Corr.)	71445,4	22			

ANEXO 9-E: PORCENTAJE DE AUMENTO DEL DIÁMETRO

Tabla ANOVA para % Aumento Diámetro según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	65,8602	2	32,9301	0,01	0,9896
Intra grupos	62928,5	20	3146,42		
Total (Corr.)	62994,4	22			

MUESTREO DESTRUCTIVO (MES 4)

	PESO FRESCO PSEUDO-TALLO	PESO FRESCO HOJAS	PESO FRESCO RAÍZ	PESO FRESCO CORMO	PESO SECO PSEUDO-TALLO	PESO SECO HOJAS	PESO SECO RAÍZ	PESO SECO CORMO
ASIMETRÍA TÍPICA	0,84	1,19	1,87	0,70	0,76	1,48	2,74	2,06
CURTOSIS TIPIFICADA	-0,88	-0,37	0,48	-0,90	-0,95	-0,39	2,55	1,62

ANEXO 9-F: ANÁLISIS DE VARIANZA

	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO PSEUDO-TALLO	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN FRESCO CORMO
ASIMETRÍA TÍPICA	0,29	0,29	-0,47	1,43
CURTOSIS TIPIFICADA	-0,65	-0,47	-0,88	-0,18
	% DE PARTICIPACIÓN SECO PSEUDO-TALLO	% DE PARTICIPACIÓN SECO HOJA	% DE PARTICIPACIÓN SECO RAÍZ	% DE PARTICIPACIÓN SECO CORMO
ASIMETRÍA TÍPICA	1,47	2,35	-0,83	1,55
CURTOSIS TIPIFICADA	-0,16	1,07	-0,98	0,25

ANEXO 9-F: PESO FRESCO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	22,2586	2	11,1293	0,14	0,8668
Intra grupos	1078,94	14	77,067		
Total (Corr.)	1101,2	16			

ANEXO 9-G: PESO FRESCO HOJA

Tabla ANOVA para W F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	94,1066	2	47,0533	0,42	0,6673
Intra grupos	1581,62	14	112,973		
Total (Corr.)	1675,73	16			

ANEXO 9-H: PESO FRESCO RAÍZ

Tabla ANOVA para W F Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	94,4827	2	47,2414	0,25	0,7793
Intra grupos	2605,27	14	186,091		
Total (Corr.)	2699,75	16			

ANEXO 9-I: PESO FRESCO CORMO

Tabla ANOVA para W F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,52161	2	0,760804	0,14	0,8680
Intra grupos	74,5035	14	5,32168		
Total (Corr.)	76,0252	16			

ANEXO 9-J: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % F Seudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	17,3473	2	8,67364	0,52	0,6075
Intra grupos	235,058	14	16,7899		
Total (Corr.)	252,405	16			

ANEXO 9-K: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % F Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	27,4915	2	13,7458	0,58	0,5726
Intra grupos	331,623	14	23,6874		
Total (Corr.)	359,115	16			

ANEXO 9-L: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % F Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	47,3308	2	23,6654	0,46	0,6385	
Intra grupos	715,046	14	51,0747			
Total (Corr.)	762,377	16				

ANEXO 9-M: % DE PARTICIPACIÓN FRESCO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % F Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,130805	2	0,0654023	0,02	0,9774	
Intra grupos	40,0138	14	2,85813			
Total (Corr.)	40,1446	16				

ANEXO 9-N: PESO SECO PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para W S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,694826	2	0,347413	1,19	0,3319	
Intra grupos	4,07148	14	0,29082			
Total (Corr.)	4,76631	16				

ANEXO 9-O: PESO SECO HOJAS

Tabla ANOVA para W S Hojas según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,604506	2	0,302253	1,19	0,3344	
Intra grupos	3,56808	14	0,254863			
Total (Corr.)	4,17259	16				

ANEXO 9-P: PESO SECO RAÍZ

Tabla ANOVA para W S Raiz según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	13,958	2	6,97899	2,33	0,1334
Intra grupos	41,8671	14	2,99051		
Total (Corr.)	55,8251	16			

ANEXO 9-Q: PESO SECO CORMO

Tabla ANOVA para W S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0576168	2	0,0288084	0,24	0,7904
Intra grupos	1,6858	14	0,120414		
Total (Corr.)	1,74341	16			

ANEXO 9-R: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL PSEUDOTALLO

Tabla ANOVA para % S Pseudotallo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1003,06	2	501,529	5,98	0,0133
Intra grupos	1173,96	14	83,8543		
Total (Corr.)	2177,02	16			

ANEXO 9-S: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LAS HOJAS

Tabla ANOVA para % S Hoja según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	545,241	2	272,62	1,78	0,2052
Intra grupos	2147,48	14	153,391		
Total (Corr.)	2692,72	16			

ANEXO 9-T: % DE PARTICIPACIÓN SECO DE LA RAÍZ

Tabla ANOVA para % S Raíz según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	2827,21	2	1413,61	5,78	0,0148	
Intra grupos	3421,79	14	244,414			
Total (Corr.)	6249,01	16				

ANEXO 9-U: % DE PARTICIPACIÓN SECO DEL CORMO

Tabla ANOVA para % S Cormo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	17,7889	2	8,89444	0,40	0,6797	
Intra grupos	313,659	14	22,4042			
Total (Corr.)	331,448	16				

ANEXO 9-V: PESO SECO AÉREO

Tabla ANOVA para P Aéreo según Formulación

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	1,83538	2	0,917689	1,09	0,3634	
Intra grupos	11,7965	14	0,842604			
Total (Corr.)	13,6318	16				

ANEXO 9-W: PESO SECO SUBTERRÁNEO

Tabla ANOVA para P subterráneo según Formulación

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	14,0149	2	7,00743	1,82	0,1984
Intra grupos	53,9079	14	3,85056		
Total (Corr.)	67,9228	16			

ANEXO 10: FOTOGRAFÍAS

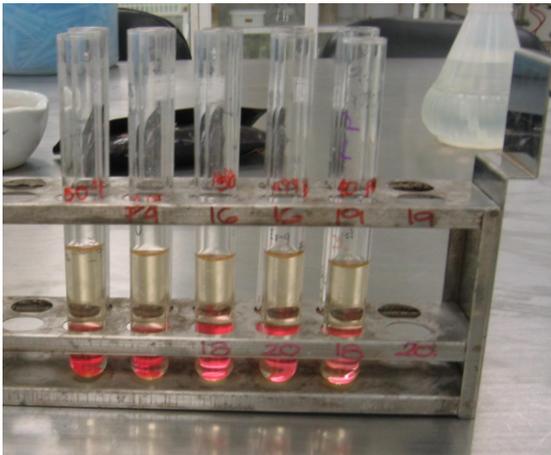
Ensayos en frijol Calima a nivel de invernadero



Ensayos en Banano Gran enano Musa AAA a nivel de invernadero



Curva de calibración de AIA



Micro-perlas de Alginato

