

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**Efecto de la interacción entre microorganismos PGPR con Hongos
Formadores de Micorrizas Arbusculares para la promoción de
crecimiento vegetal en Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.)**

Presentada por:

LINDACELIA CELINA FLORES CHÁVEZ

TESIS PARA OPORTAR EL TITULO DE:

BIOLOGO

Lima – Perú

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la interacción entre microorganismos PGPR con Hongos
Formadores de Micorrizas Arbusculares para la promoción de
crecimiento vegetal en Aguaymanto (*Physalis peruviana L.*)**

Presentada por:

Lindacelia Celina Flores Chávez

Tesis para optar el Título de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente Jurado

Ph. D. Gretty Villena Chávez

PRESIDENTE

Mg. Mercedes Flores Pimentel

MIEMBRO

Mg. Sc. Braulio La Torre Martínez

MIEMBRO

Dra. Doris Zuñiga Dávila

PATROCINADORA

Biol. Katty Ogata Gutiérrez

CO-PATROCINADORA

Dedico esta tesis

A MIS QUERIDOS PADRES

MARIA TERESA, MARGARITA, OSCAR Y HELI

Por su amor y apoyo incondicional.

A MIS HERMANOS

OSCAR, MANOLO Y MARIA TERESA

Por sus enseñanzas día a día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme fuerza, constancia y sabiduría para llegar hasta donde he llegado.

A quien patrocinó este trabajo, la Dra. Doris Zuñiga Dávila por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por ser fuente de enseñanza y un ejemplo de mujer en la ciencia.

A Katty Ogata Gutierrez, co-patrocinadora de este trabajo, por sus consejos, amistad, apoyo constante en la realización del presente trabajo y por ser ejemplo de perseverancia y dedicación.

A mi familia, por su amor y apoyo constante, porque gracias a ustedes soy la persona que se permitió lograr este triunfo. A mi mamá Teresa, por sus esfuerzos infinitos y siempre estar cerca a pesar de la distancia; a mi mamita Margarita, por su entrega y dedicación día a día; a mi papa Oscar, que en vida y aún después me enseñó a vivir con alegría cada día; a mi papa Hely, por sus llamadas semanales para alentarme a culminar este trabajo; a mi hermano Oscar, por enseñarme a vivir con pasión cada paso en mi vida; a mi hermano Manolo, por enseñarme a ser paciente y ver más allá de lo evidente; a mi hermana Maria Teresa, por siempre estar dispuesta a escucharme y alentarme.

A Augusto Blas Villanueva, mi compañero de vida, por su amor, comprensión, paciencia y sostenimiento que día a día me enrola a seguir adelante con fuerza, valor y confianza. Te amo.

A Carolina, Ricardo, Elena, Fiorella, Ana Claudia, Mónica e Italo, gracias por su amistad y apoyo incondicional en cada uno de los lindos momentos compartidos que nos permite seguir en el camino de la investigación.

Al Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), por su apoyo para el financiamiento del proyecto Procyt Concytec 2011. Biol 111-FDA/UNALM.

Un agradecimiento especial a cada una de las personas que me apoyaron en cada momento del desarrollo de este trabajo.

I. INDICE

II.	RESUMEN	1
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	Objetivo general.....	4
1.2	Objetivos específicos	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1	Aguaymanto (<i>Physalis peruviana L.</i>)	5
4.2	Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).....	8
4.3	Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) su interacción con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.	11
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1	Hipótesis planteada	14
5.2	Material Biológico	14
5.3	Materiales.....	14
5.4	Métodos	15
5.4.1	Muestreo de suelo y Aislamiento de bacterias diazótrofes y actinomicetos 15	
5.4.2	Caracterización morfológica	18
5.4.3	Evaluación de la capacidad PGPR de las cepas aisladas.....	19
5.4.4	Caracterización molecular	19
5.4.5	Ensayos en Aguaymanto a nivel de laboratorio	28
5.4.6	Producción del Inoculo de Micorrizas.....	29
5.4.7	Ensayo en invernadero.....	31
5.4.8	Análisis estadísticos.....	32
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1	Caracterización de campo “El chiquero” – La Molina	33
6.2	Aislamiento de bacterias diazótrofes y actinomicetos	34

6.3	Caracterización morfológica	35
6.4	Capacidad Promotora de crecimiento	38
6.5	Caracterización molecular de bacterias diazótrofes.....	49
6.6	Ensayo en plantas a nivel de laboratorio	52
6.6.1	Evaluación de la inoculación en la germinación de semillas de Aguaymanto	52
6.6.2	Evaluación de la inoculación en la emergencia y crecimiento de plantas de Aguaymanto	54
6.7	Ensayo de interacción de bacterias PGPR con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)	57
6.7.1	Cuantificación del porcentaje de colonización de HMA en raíces teñidas de aguaymanto del campo de muestreo.....	57
6.7.2	Evaluación de la interacción de bacterias PGPR con HMA en el crecimiento de aguaymanto a nivel de laboratorio.....	59
6.7.3	Evaluación de la interacción de bacterias PGPR con HMA en el crecimiento de aguaymanto a nivel de invernadero	60
VII.	CONCLUSIONES.....	71
VIII.	RECOMENDACIONES	73
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
X.	ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 A: Estudio realizado por Repo y Encina (2008). B: Clasificación de acuerdo a la madurez del Aguaymanto NTC 4580	7
Figura 2 Exportación de Aguaymanto en los últimos cinco años.	8
Figura 3 Secuencias del banco de genes (genbank, NCBI) y cepa en estudio.	26
Figura 4 . Alineamiento de las secuencias del banco de genes (genbank, NCBI) y cepa en estudio.....	27
Figura 5 Secuencias alineadas para la corrección de posibles errores.	27
Figura 6 Ejemplo de reconocimiento en el banco de cepas EzTaxon	28
Figura 7 Almácigos de Aguaymanto a nivel de laboratorio para su trasplante a ensayo en invernadero	32
Figura 8 Poblaciones microbianas de diazótrofos y Pseudomonas	34
Figura 9 Poblaciones microbianas mesófilas.....	34
Figura 10 Bacterias diazótroficas y actinomicetos aislados	38
Figura 11 Reacción colorimétrica de Salkowsky	40
Figura 12 Solubilización cualitativa de fosfato por cepas diazótroficas a los 6 días. A: Fosfato bicálcico. B: Fosfato tricálcico.	44
Figura 13 Agrupamiento de cepas diazótroficas por comportamientos similares para solubilizar fosfato bicálcico.....	45
Figura 14 Solubilización de fosfato bicálcico por grupos de cepas diazótroficas.....	46
Figura 15 Solubilización de fosfato bicálcico por grupos de cepas de actinomicetos .	46
Figura 16 Agrupamiento de cepas diazótroficas por comportamientos similares para solubilizar fosfato tricálcico.	48
Figura 17 Solubilización de fosfato tricálcico por grupos de cepas diazótroficas	48
Figura 18 Solubilización de fosfato tricálcico de cepas de actinomicetos	49
Figura 19 Geles de electroforesis de amplificación BOX-PCR, con cepas diazótroficas..	50
Figura 20 Secuenciamiento de cepas diazótroficas..	51
Figura 21 Germinación de Aguaymanto por efecto de cepas PGPR.....	52
Figura 22 Porcentaje de semillas de aguaymanto germinadas con presencia de pubescencia.....	53
Figura 23 Semillas pubescentes a los 5 días de germinación por efecto efectos de cepas PGPR.	54
Figura 24 Emergencia de las plántulas de aguaymanto por efecto de cepas PGP.....	55

Figura 25	Peso fresco de la raíz de plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR	55
Figura 26	Plantas de aguaymanto inoculadas con cepas PGPR	56
Figura 27	Raíces teñidas de Aguaymanto del campo “El chiquero” inoculado con cepas PGPR	59
Figura 28	Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR en interacción con Hongos formadores de micorrizas en etapa de Prefloración.	62
Figura 29	Efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto en invernadero a los seis meses del ensayo.	65
Figura 30	Formación de hifas y arbuscúlos en la infección de HMA en los tratamientos en interacción con Da29 y Aa7	67
Figura 31	Número de frutos por efecto de la interacción de cepas PGPR con HMA ...	68
Figura 32	Frutos de aguaymanto producidos por interacción de cepas PGPR con HMA.	69
Figura 33	Cantidad de Ac. Ascórbico por 100gr de fruto.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mezcla para reacciones de BOX – PCR.....	22
Tabla 2 Mezcla para reacciones de amplificación 16S.....	24
Tabla 3 Características del suelo muestreado.....	33
Tabla 4 Descripción morfológica de diazótrofos mesófilos aislados de la rizósfera de aguaymanto.....	35
Tabla 5 Descripción morfológica de actinomicetos mesófilos aislados de la rizósfera de aguaymanto.....	37
Tabla 6 Porcentaje de cepas diazótrofas y actinomicetos según su capacidad para producir ácido indol acético	40
Tabla 7 Porcentaje de cepas diazótrofas y actinomicetos según su capacidad para solubilizar fosfato bicálcico.....	41
Tabla 8 Halos de solubilización de fosfato bicálcico de cepas diazótrofas y actinomicetos.....	42
Tabla 9 Porcentaje de cepas diazótrofas y actinomicetos según su capacidad para solubilizar fosfato tricálcico	42
Tabla 10 Halos de solubilización de fosfato tricálcico de cepas diazótrofas y actinomicetos.....	43
Tabla 11 Peso fresco aéreo y altura de plantas de aguaymanto inoculadas con cepas PGPR	56
Tabla 12 Porcentaje de Infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR.....	58
Tabla 13 Efecto de la inoculación con HMA a los 15 días en condiciones de laboratorio	60
Tabla 14 Altura, Peso fresco aéreo y Peso seco aéreo en plantas de Aguaymanto en Prefloración	61
Tabla 15 Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR en interacción con Hongos formadores de micorrizas en etapa de Prefloración.	63
Tabla 16 Altura, Número de botones florales y flores de aguaymanto a los seis meses de ensayo.	64
Tabla 17 Peso fresco radicular y peso seco radicular por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto.....	66
Tabla 18 Porcentaje de Infección y Cantidad de esporas por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto.....	67
Tabla 19 Peso y Diámetro de los frutos producidos por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA	69

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 ANALISIS NUTRICIONALES EN ETAPA PREFLORACIÓN	87
ANEXO 2 ANALISIS ÁCIDO ASCÓRBICO FRUTOS AGUAYMANTO	89
ANEXO 3 ANALISIS ESTADÍSTICOS	90

II. RESUMEN

El aguaymanto, cultivo nativo del Perú, viene adquiriendo gran importancia a nivel internacional debido a su valor nutricional, destacándose su alto contenido de vitamina C y provitamina A. Sin embargo, los productores peruanos enfrentan grandes problemas al no alcanzar los niveles de producción y estándares de calidad requeridos por el mercado internacional; siendo así menos competitivos frente a otros países como Colombia y Sudáfrica; productores y exportadores por excelencia de este cultivo. Con el fin de mejorar el crecimiento de plantas de aguaymanto se emplearon inoculantes microbianos, aislados de este cultivo, en interacción con hongos formadores de micorrizas a nivel de invernadero. Se emplearon como inóculos bacterianos, la cepa diazótropa, Da29, y los actinomicetos Aa7 y Aa9; estas cepas fueron seleccionadas por presentar un buen potencial PGPR con una producción de ácido indolacético de 16.5, 17 y 7 $\mu\text{g/ml}$, solubilización de fosfato bicálcico de 2.27, 0.18 y 0.70 respectivamente, y solubilización de fosfato tricálcico de 1.10, 0.55 y 0.55 respectivamente, así como un efecto positivo en la germinación y crecimiento de plántulas de aguaymanto a nivel de laboratorio. El inóculo micorrícico se elaboró a partir de plantas trampa que obtuvieron un porcentaje de infección de 75 %. La cepa diazótropa Da29, relacionada con *Rahnella aqualitis* en un 99.71 % de similitud, inoculada en interacción con hongos micorrícicos promovió significativamente el crecimiento vegetal de las plantas en comparación al control sin inocular, asimismo tuvo un contenido de ácido ascórbico de 31.1g/100g de fruto. De los resultados obtenidos se puede concluir que los microorganismos con potencial PGPR aislados de la rizósfera de aguaymanto mejoran significativamente el crecimiento vegetal de este cultivo tanto al ser inoculados solos, como en interacción con los hongos formadores de micorrizas; siendo esta última relación bacteria-hongo más efectiva.

Palabras clave: PGPR, Hongos formadores de micorrizas arbusculares, Aguaymanto.

SUMMARY

Goldenberry, originally from Perú, is acquiring great international importance because of its nutritional value, underlining its high content of vitamin C and provitamin A. However, peruvian farmers face main problems to reach production levels and standards quality required by the international market, making it less competitive with other countries such as Colombia and South Africa, producers and exporters for excellence of this crop. In order to enhance the goldenberry growth microbial inoculants, isolated from the rhizosphere of this crop, interacting with mycorrhizal fungi were used at greenhouse. The bacterial inoculants used were the diazotroph Da29, and the actinomycetes Aa7 and Aa9, these strains were selected by presenting good potential for plant growth promoting with production of indole acetic acid of 16.5, 17 and 7 $\mu\text{g/ml}$, solubilization of dicalcium phosphate, 2.27, 0.18 and 0.70 respectively, and solubilization of tricalcium phosphate, 1.10, 0.55 and 0.55 respectively as well as a positive effect on germination and goldenberry seedling growth in vitro. The mycorrhizal inoculum was prepared from trap plants achieved a rate of infection of 75%. The diazotroph strain Da29, related to *Rahnella aqualitis* at 99.71% of similarity, inoculated interacting with mycorrhizal fungi significantly promoted plant growth of plants compared to the control without inoculation; also it had an ascorbic acid content of 31.1g/100g fruit. From the results it can be concluded that microorganisms with plant growth promoter potential isolated from the rhizosphere of goldenberry significantly improve plant growth of this crop to be inoculated both alone, and in interacting with mycorrhizal fungi; the latter being bacteria-fungus relationship more effective.

Keywords: Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Arbuscular mycorrhizal fungi, Goldenberry.

III. INTRODUCCIÓN

El aguaymanto, cultivo nativo del Perú, es cada vez más preferido en los mercados internacionales, por su valor nutricional, destacándose su alto contenido de vitamina C y provitamina A. Las exportaciones de este fruto han incrementado en un 900% en los últimos 5 años alcanzado un valor de 166, 77 mil Kg, para el año 2014, siendo el 50% de los envíos a Alemania y EEUU (SIICEX 2015). Sin embargo, los productores peruanos enfrentan grandes problemas al no alcanzar los niveles de producción y estándares de calidad requeridos por el mercado internacional, cabe resaltar que los frutos exportados en estado natural tienen mayores requisitos para su exportación; siendo así menos competitivos frente a otros países como Colombia y Sudáfrica; productores y exportadores por excelencia de este cultivo en el mundo.

Una alternativa para alcanzar la producción y calidad de fruto requeridos que nos permita mayor competitividad a nivel internacional es el uso de inoculantes en base a la interacción de bacterias rizosféricas y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), los cuales presentan capacidades benéficas para el desarrollo de este y otros cultivos. Las bacterias rizosféricas que han demostrado una capacidad promotora de crecimiento vegetal han sido denominados promotores de crecimiento vegetal (Santillana *et al.*, 2005). Asimismo se ha registrado un efecto sinérgico, con la presencia de ambos tipos de microorganismos, con incremento en el vigor y protección de la planta frente a patógenos (Barea *et al.*, 2005; Artursson *et al.*, 2006).

Es por estos motivos que el estudio de estos microorganismos, y su interacción, en la planta de aguaymanto es de suma importancia para obtener inoculantes que tengan efectos benéficos en cuanto al desarrollo vegetal del cultivo, permitiendo así el incremento de su tasa de producción y valor nutricional del fruto.

Con este fin, el objetivo de este trabajo es aumentar el crecimiento vegetal y la producción de aguaymanto mediante la interacción efectiva de microorganismos

promotores de crecimiento vegetal y hongos formadores de micorrizas arbusculares aislados de la rizósfera del mismo cultivo.

1.1 Objetivo general

Mejorar el crecimiento vegetal y producción del cultivo de aguaymanto mediante el uso de bacterias PGPR en interacción efectiva con hongos formadores de micorrizas arbusculares.

1.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar los grupos bacterianos diazótrofos y actinomicetos de la rizósfera del cultivo de Aguaymanto.
- Evaluar la diversidad de diazótrofos y realizar una identificación molecular utilizando el gen ARNr 16S.
- Evaluar la capacidad PGPR de los microorganismos aislados mediante la producción de Ácido Indol Acético y solubilización de fosfato inorgánico.
- Evaluar el efecto de la inoculación de aguaymanto en la interacción de PGPRs y hongos formadores de micorrizas arbusculares a nivel de invernadero.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.)

a. Morfología y crecimiento

De acuerdo con el Sistema de Clasificación Filogenética de Cronquist (1981), la clasificación del aguaymanto es:

Reino : Plantae

Subreino : Tracheobionta

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Asteridae

Orden : Solanales

Familia : Solanaceae

Género : *Physalis*

Especie : *Physalis Peruviana* L.

El aguaymanto pertenece a la familia Solanaceae es originario del Perú, donde es conocido como capulí y aguaymanto. Además, crece en Chile, Ecuador y Colombia como planta silvestre y semisilvestre, entre los 1500 a 3000 msnm. Es una planta perenne, arbustiva que normalmente crece hasta una altura de 1 a 1,5m (Fisher *et al.*, 2000). Actualmente, el aguaymanto se encuentra en casi todos el altiplano de los trópicos y en varias partes de los subtrópicos, incluyendo Malasia, China y el Caribe, entre otras (Dosert N. *et al.*, 2012). Este cultivo fue descrito por primera vez por

Linnaeus en 1753 y ha sido cultivado por muchas décadas a lo largo de los Andes Americanos. Sus ramas son acanaladas y a veces de color violáceo. Las hojas son alternas, densamente pubescentes, de base foliar cordada, lamina foliar aovada, de 6-13.5 cm de longitud y 4-10 m de ancho. Presenta flores dispuestas verticalmente y de corola amarilla de 1 – 1.8 cm de largo, 1.2 – 3 cm de ancho, con máculas púrpuras y un anillo denso de tricomas debajo de las máculas en la base de la corola. Los frutos son bayas de color naranja-amarillo de forma globosa y de 1.5-2 cm (Dosert N. *et al.*, 2012).

Puede soportar bajas temperaturas pero sufre daño irreparable por debajo de los 0° C, afectando su crecimiento si persisten temperaturas menores a 10° C (Sullivan *et al.*, 2005). Dado que esa especie crece y se cultiva en diversos lugares del mundo se le considera de fotoperiodo neutral. Debe contar con suficiente agua durante el desarrollo, no así durante la maduración de los frutos, precipitaciones entre 1000 y 2000 mm y humedad del aire de 70 – 80% son ideales para el crecimiento (Popova et al. 2010).

Esta planta puede crecer en suelos bien y mal drenados, con bajas demandas de nitrógeno (Popova et al. 2010; Sullivan *et al.* 2005). De acuerdo a Raghava R., 1987), este cultivo tiene mejores rendimientos en suelos que tienen bastante materia orgánica y son ligeramente ácidos hasta neutros, con un pH de 5.5 a 7.3. Asimismo en ensayos en invernadero se ha mostrado que esta planta es moderadamente tolerante a la salinidad, lo que representa un ajuste osmótico adaptativo de esta especie (Medina, 1998).

b. Valor nutricional

El aguaymanto es una planta medicinal ampliamente utilizada en medicina popular para el tratamiento del cáncer, como antipirético, antimicobacterianos, inmunomoduladores, y para el tratamiento de enfermedades como la malaria, asma, hepatitis, dermatitis, diurético y reumatismo (Perry, 1980; Pietro *et al.* 2000).

En estudios fitoquímicos del género *Physalis* se han encontrado la presencia de witanólidos, esteroides, alcaloides, glucósidos y flavonoides (Wu *et al.*, 2004). De acuerdo a los estudios realizados por Repo y Encina (2008) en Aguaymanto nativo peruano, se reportó que de acuerdo al estado de madurez la cantidad de ácido ascórbico varía de 3.23 – 51.65 mg/100g y 0.12 – 2.34 mg/100g de β -caroteno (Provitamina A), cabe resaltar que los estados de madurez fueron tomados de la norma técnica colombiana para las especificaciones de este fruto (NTC 4580) (Fig. 1).

A	Estado de madurez del Aguaymanto *					
	0	1	2-3	4	5	6
Contenido mg/100g						
Acido Ascórbico	3.23	12.89	28.55	35.90	45.23	51.65
β -caroteno	0.12	0.78	1.77	1.95	2.02	2.34

* Norma técnica Colombiana 4580

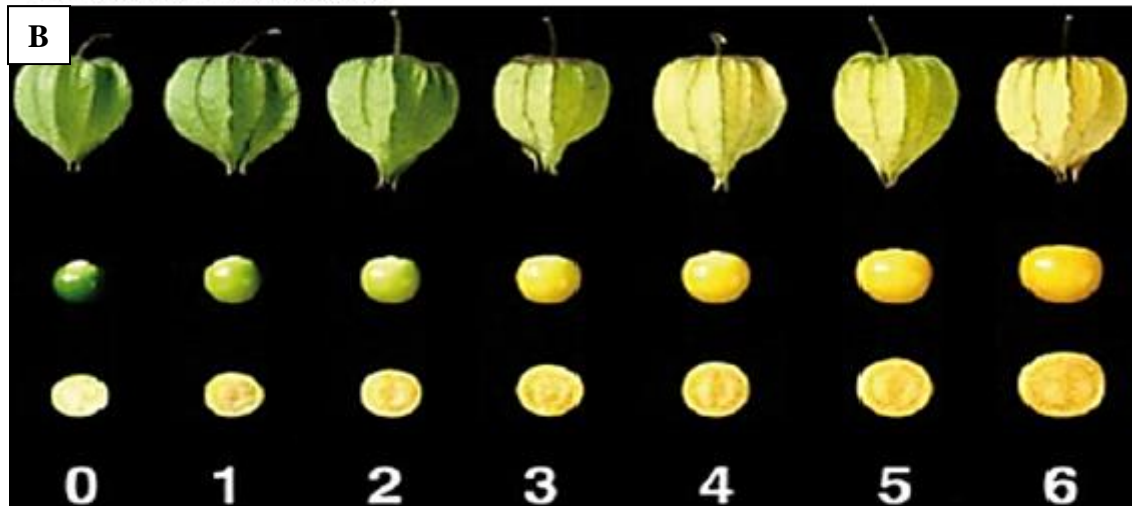


Figura 1 A: Estudio realizado por Repo y Encina (2008). B: Clasificación de acuerdo a la madurez del Aguaymanto NTC 4580

Extractos del fruto contienen diferentes ácidos fenólicos como el ácido clorógeno, felúrico, y cafeico; y flavonoides como la rutina, quercetina y kaenferol (Zavaleta *et al.* 2005; Muñoz *et al.* 2007). El zumo contiene altos contenidos de pectinasa, lo que disminuye los costos en la elaboración de mermeladas y similares (Brito, 2008). Campos *et al.* (2011) determinó que los extractos del fruto disminuyen significativamente las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos. Los flavonoides están asociados a notables efectos cardiovasculares, dentro de estos, los hipolipemiantes.

c. Producción

En Perú y Colombia, primer productor mundial de aguaymanto, seguido por Sudáfrica, no se han seleccionado variedades y solamente se conocen ecotipos o plantas procedentes de diferentes regiones, que se diferencian por el tamaño, el color y el sabor, la forma del cáliz y el porte de la planta (Dosert N. *et al.*, 2012).

En el Perú, el aguaymanto como cultivo se encuentra principalmente asociado a zonas (frías) méxicas, de las regiones andinas de Ancash, Huánuco, Junín, Ayacucho, Arequipa, Cajamarca y Cuzco (Sullivan *et al.* 2005).

Los principales mercados de exportación del Aguaymanto peruano son Estados Unidos y Europa, con un aproximadamente 50% del total. Por otro lado, los principales países productores y exportadores son Colombia y Sudáfrica, en el primer y segundo lugar respectivamente. La exportación peruana de aguaymanto está en aumento respecto a los años anteriores; del año 2010 (17.09 mil Kg) al año 2014 (166.77 mil Kg) hay un incremento de más de 900 % (SIICEX, 2015) (Fig. 2). Casi la mitad del volumen de estas exportaciones son en presentación deshidratada y un 16% en fresco, cabe resaltar que Colombia exporta principalmente fruto fresco. Es así que para estar al nivel de los exportadores por excelencia de este fruto es importante tener un manejo más efectivo en el cultivo de aguaymanto que permita una mayor producción y frutos frescos de alta calidad.



Figura 2 Exportación de Aguaymanto en los últimos cinco años. * Datos actualizados a julio del 2015 (SIICEX 2015).

4.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

El término rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR por sus siglas en inglés) fue definido por primera vez por Kloepper y Schroth en 1978 para describir a bacterias de vida libre o simbióticas habitantes del suelo que colonizan las raíces de las plantas y

pueden promover el crecimiento de las mismas por dos diferentes tipos de mecanismos (Glick, 1995): directos e indirectos.

Los mecanismos directos son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta. Dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxina, giberelinas y citoquininas. Adicionalmente, las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos (Bobadilla y Rincón, 2008). En contraste, los mecanismos indirectos comprenden la prevención de infecciones por parte de microorganismos fitopatógenos. Es así como entre los múltiples beneficios que estas bacterias otorgan a las plantas se encuentran el incremento de la germinación, colonización de raíces, estimulación del crecimiento de las plantas, control biológico, inducción de la resistencia a patógenos, producción de fitohormonas y mejoramiento en la asimilación de agua y nutrientes (Barka *et al.*, 2000).

Las bacterias PGPR deben cumplir tres características: (1) ser capaces de colonizar la raíz o la porción del suelo próxima a esta; (2) sobrevivir y multiplicarse en los microhábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad y (3) estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994). Algunas bacterias como *Azospirillum spp.* pueden penetrar la raíz y colonizar espacios intercelulares, aunque sin formar estructuras especializadas como en la asociación *Rhizobium*-Leguminosa (Franco, 2008).

Dentro de este grupo de bacterias se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan y Levanony, 1990; Okon y Lavandera, 1994; Tang, 1994).

Se ha comprobado la acción directa de las bacterias PGPR (Plant Growth Promoter Rhizobacter) que mostraron efectos positivos en semillas de frijol, pallar, haba, tomate, papa (Zúñiga, 2007a, b, c), así como en el cultivo nativo de maca, que además de mostrar efectos en el rendimiento, se observó una tendencia al incremento de ciertos

principios activos (Ogata, *et. al*, 2009). Otros autores observaron efectos significativos de las bacterias en cultivos de arroz (Sudha *et al*, 1999), azúcar (Cakmakci *et al*, 1999), trigo (Freitas, 2000), maíz (Pal, 1998), algodón (Yino *et al.*, 2008), entre muchos otros.

a. Dizótrofos de vida libre

La fijación de nitrógeno atmosférico es un proceso indispensable para el desarrollo de las plantas, el mismo que permite la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoácidos, entre otros. El proceso es llevado a cabo por ciertos microorganismos del suelo que se conocen como microorganismos fijadores de nitrógeno, también llamados Diazótrofos, mediado por el complejo enzimático llamado nitrogenasa (Baca *et al.*, 2000).

Las bacterias aerobias de vida libre fijadoras de N₂ más conocidas se encuentran formando parte de los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Glucanacetobacter* (Pedraza *et al.*, 2008; Unkovich M. *et al.*, 2008).

Estos microorganismos vienen siendo estudiados en diversos cultivos de interés agronómico dado la excelencia de sus resultados en la promoción del crecimiento. Las propiedades benéficas de los microorganismos Diazótrofos se han puesto de manifiesto en una gran variedad de hortalizas, gramíneas y granos (Zúñiga, 2007a, b, c; Mayea S. *et al.*, 1998; Firpo R. *et al.*, 2003; Curá J. *et al.*, 2005).

b. Actinomicetos

Estos microorganismos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. Constituyen 63 géneros que comprenden entre 20-60% de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.* 2004). Los géneros frecuentemente habitantes del suelo son *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*. (Martin, 1981).

Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, son heterótrofas por lo que pueden utilizar fuentes de carbono simples. Complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos.

Utilizan como fuente de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Leveau y Bouix, 2000). A pesar de su lento crecimiento tienen una vital importancia en la actividad microbiana del suelo, como es la mineralización del carbono y nitrógeno, y la descomposición de la materia orgánica. Los mecanismos antes descritos son posibles gracias a la diversidad de enzimas hidrolíticas, ligninolíticas y por la capacidad de degradar compuestos recalcitrantes presentes en la materia orgánica que es mineralizada en el suelo. (Sylvia, 1998).

Se ha descrito que estos microorganismos tienen capacidades promotoras de crecimiento vegetal como es la fijación de nitrógeno atmosférico, colonización de la rizosfera, biocontrol sobre hongos fitopatogenos, producción de sideróforos y producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal in vitro (Tokala et al. 2000). Asimismo recientemente se ha descrito que estos microorganismos presentaron un efecto positivo en el crecimiento vegetal de plantas de maca (Pérez W., 2012).

4.3 Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) su interacción con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

Las micorrizas son una asociación simbiótica mutualista entre raíces de plantas superiores y ciertos grupos de hongos del suelo. Esta simbiosis es benéfica ya que el hongo coloniza la corteza de la raíz para obtener carbono a partir de la planta hospedera, mientras le ayuda a la planta a tomar fósforo y otros nutrientes minerales del suelo (Serralde y Ramirez, 2004).

Las micorrizas se han clasificado en base a su estructura morfológica y modo de infección en dos tipos principales: ectomicorrizas y endomicorrizas. Este último es el tipo más extendidas en la naturaleza, cuya característica principal es que sus hifas penetran en el interior de las células de la epidermis de la raíz.

Dentro de las endomicorrizas se distinguen tres subgrupos: Ericoides, Orquidáceas y las Arbusculares, que son las más comunes entre especies de interés agronómico, aproximadamente entre 70 – 90% de estas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) se caracterizan por una ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células de la epidermis de la raíz y la formación de arbusculos

(estructuras con forma de árbol) (Franco M., 2008). El suborden Glomineae tiene 2 familias: Glomaceae que comprende los géneros *Glomus* y *Sclerocystis*, y Acaulosporaceae, que incluye 2 géneros: *Acaulospora* y *Entrophospora*. El suborden Gigasporineae tiene una sola familia: Gigasporaceae con 2 géneros: *Gigaspora* y *Scutellospora* (Blanco y Salas, 1997).

Entre las acciones mas importantes de las micorrizas arbusculares para el crecimiento de la planta se encuentran: (1) Mejoran el crecimiento de la planta debido a la producción de hormonas, vitaminas y otras sustancias fitoactivas; (2) tienen acción en el ciclo biogeoquímico de los nutrientes del suelo, de modo que incrementan la disponibilidad de estos para la planta; (3) protegen a la planta de estreses bióticos y abióticos, como salinidad, metales pesados, sequía, patógenos y entre otros. (Jeffries et al., 2003; Lum y Hirsch, 2003; Van der Heijden, 2004; Govindarajulu et al., 2005; Barea et al., 2005).

Por otro lado en los últimos años se ha introducido el término “mycorrhizahelper bacteria” (MHP) en “TansleyReview”: *Helper Bacteria: una nueva dimensión de la simbiosis micorrízica* (Garbaye. 1994), para definir a las bacterias que muestran un efecto sinérgico en coinoculación con hongos formadores de micorrizas. Este concepto es genérico, depende del tipo de simbiosis micorrízica pero no de la posición taxonómica de la bacteria.

En relación con las micorrizas arbusculares (MA), han sido descritos muchos ejemplos como en el caso del café donde se ha encontrado que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* incremento el área foliar y el crecimiento micelial (Rivera et al., 1997); asimismo en tomate se mejoró el rendimiento del cultivo y estado nutricional de la planta con la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* con *Glomus mosseae* (Hernández y Chailloux, 2004). Por otro lado ciertos actinomicetos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*) han sido identificados como bacterias que se asocian y mejoran el crecimiento micelial de hongos ectomicorrízicos (Burke et al., 2006), y hay referencia de efectos sinérgicos en la interacción de *Streptomyces sp.* Y *Thermobifida sp.* asociadas a *Glomus sp.* en cultivos de sorgo y trébol (Abdel-Fatah y Mohamedin, 2000; Franco, 2008). Por último así como se han descrito efectos promotores de crecimiento también se ha encontrado efecto sobre la tolerancia a estrés

hídrico en lechuga con la inoculación de *Bacillus megaterium* y *Glomus constrictum* (Marulanda, 2006).

En general, se conoce la capacidad de algunos microorganismos para influir en la formación y el funcionamiento de la simbiosis MA, mediante actividades de distinta índole como son: activación de propágulos inefectivos del hongo en estadios pre simbióticos (Azcon-Aguilar y Barea, 1996; Giovannetti *et al.*, 2002), formación de puntos de entrada en la raíz (Azcon-Aguilar *et al.*, 1986; Linderman, 1988; Vivas *et al.*, 2003) e incremento de la tasa de crecimiento (Mosse, 1959; Mayo *et al.*, 1986; Carpenter-Boggs *et al.*, 1995).

En adición a estos efectos producidos por la bacteria sobre los hongos MA, la micorriza a su vez, produce un impacto en la composición de comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2005). Este impacto puede ser retransmitido a través de la raíz de la planta porque el establecimiento de la micorriza ha demostrado cambiar la composición química de los exudados de la raíz y estas son a menudo fuente de alimento para las bacterias asociadas en la rizósfera (Azcon-Aguilar y Bago, 1994; Barea, 1997; Grvndler, 2000; Artursson *et al.*, 2006).

Los microorganismos rizosféricas han llegado a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de la MA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta (Barea *et al.*, 2005; Artursson *et al.*, 2006).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Hipótesis planteada

La aplicación de bacterias PGPR promotoras de crecimiento vegetal en interacción con hongos formadores de micorrizas arbusculares, mejoran el crecimiento vegetal y producción del cultivo de aguaymanto.

5.2 Material Biológico

Se utilizaron semillas de los frutos obtenidos en los campos de cultivo de Aguaymanto de Proyecto PROCYT325 – 2011 – CONCYTEC – OAJ.

5.3 Materiales

- Agitador mecánico orbital (*MRC*)
- Autoclave horizontal (*Barnstead*).
- Balanza analítica (*Sartorius*).
- Balanza de platillo (*OHAUS Scout ProSP202*).
- Beakers (*PIREX*).
- Bolsas de papel.
- Bolsas de polietileno.
- Bureta de 25 ml.
- Cámara de electroforesis (*CleaverScientificLtd*).
- Cámara fotográfica digital (*Sony CyberShot*).
- Congeladora de -20°C (*Whirlpool*).
- Congeladora de -80°C (*Sanyo*).
- Equipo de Baño María (*Memmert*).
- Espectrofotómetro (*Genesys6 – ThermoElectron Corp.*)
- Estereoscopio (*Leyca*).
- Estufa eléctrica de 28°C.
- Espectrofotómetro (*Genesys 6 – ThermoElectron Corp.*)
- Fotodocumentador de geles de electroforesis (*CleaverScientificLtd*).

- Kit de extracción de DNA (*AxyPrep*).
- Matraces Erlenmeyer.
- Microcentrífuga (*Sigma*).
- Micropipeta automática (*Nichipet EX*)
- Microscopio (*Leica DM750*)
- Placas Petri desechables 100 x 15''
- Pipetas graduadas.
- Potenciómetro (Hanna Instruments pH 211)
- Probetas.
- Refrigeradora (*Bosch*).
- Sistema de posicionamiento global (*GPS Garmin Etrex Vista*).
- Termociclador (*EppendorfAG 22331Hamburg*)
- Tubos de prueba 25 x 250 mm (*Pirex*).
- Cámara de frío 4 – 10°C (*LG*).
- Vórtex (*Gemmy UM-300*).

5.4 Métodos

5.4.1 Muestreo de suelo y Aislamiento de bacterias diazótroficas y actinomicetos

5.4.1.1 Muestreo de suelo y toma de muestras

Se tomaron muestras aleatorias de cuatro plantas de aguaymanto, de tamaño promedio con rizósfera y suelo circundante de aproximadamente 500 g, del campo denominado “El chiquero”.

Las muestras colectadas fueron colocadas en bolsas de cierre hermético nuevas y debidamente rotuladas. Estas fueron transportadas en un cooler con gel packs con la finalidad de mantener la temperatura de aproximadamente 4°C, hasta su procesamiento en el laboratorio.

5.4.1.2 Cuantificación de las poblaciones microbianas del suelo.

a. Preparación de diluciones

Para todos los análisis realizados se utilizó solución salina al 0.85%. La técnica se realizó según APHA Standard Methods (1998).

Bajo condiciones asépticas se colocó 10 g de cada una de las muestras sólidas y se adicionaron 90 ml del diluyente (solución salina 0.85 %), obteniéndose así la dilución 10^{-1} . Se agitó cuidadosamente las muestras por un periodo de un minuto aproximadamente. Se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se adicionará en tubo que contenía 9 ml del diluyente, obteniéndose una dilución de 10^{-2} , luego se homogenizó en el vortex. Este paso se repitió hasta la dilución conveniente y por el periodo de tiempo adecuado de acuerdo al grupo bacteriano estudiado.

b. Recuento de bacterias mesófilas aerobias y hongos

Las bacterias mesófilas se determinaron de acuerdo a los métodos citados por (APHA, 1992) incubándose las diluciones en medio Plate Count a 28°C durante 2 días. Por otro lado, para el recuento de mohos y levaduras se realizó de acuerdo a los métodos citados por (ICMSF, 2000) se incubó en Agar Ogy durante 5 días a temperatura ambiente. Finalmente, los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco (UFC/g).

c. Recuento de actinomicetos

Se sembró diluciones en medio almidón caseína suplementado con con Nistatina al 0.5% y se incubarán durante 7 días a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en número más probable por gramo de suelo seco (UFC/g).

d. Enumeración de Diazótrofos de vida libre

Se sembraron diluciones en caldo sin nitrógeno, considerándose 3 tubos por dilución y se incubaran a 28° C durante 14 días (Zapater, 1975). Se realizó el conteo de los tubos positivos de cada una de las diluciones observando viraje de color, turbidez y la

formación de un velo en la superficie del caldo, se expresa este conteo en NMP/g de suelo seco.

e. Enumeración de bacterias del género *Pseudomonas*

Para la cuantificación de colonias de poblaciones de *Pseudomonas spp.* Se sembraron las diluciones en caldo asparagina durante 7 días a 23 °C (APHA –AWWA-WEF, 1998), luego de los cuales se evaluó la fluorescencia (cámara de UV – 260 m). Los tubos positivos se sembraron con la ayuda de un asa de Khole, sobre la superficie del agar Cetrimide. Se incubó a 35 - 37 °C durante 24 horas. Los resultados se expresaron en número más probable por gramo de suelo seco (NMP/g).

f. Enumeración de bacterias del género *Bacillus*

Se realizó un pre tratamiento colocando la dilución 10^{-1} a 80°C por 20 minutos. Posteriormente las diluciones se sembraron en medio triptona glucosa (TGE) por 2 días a 28°C. Los resultados se expresaron en número más probable por gramo de suelo seco (UFC/g).

5.4.1.3 Aislamientos

a. Diazótrofos:

Se sembraron diluciones de 10^{-3} - 10^{-8} en caldo sin nitrógeno, considerándose 3 tubos por dilución y se incubaron a 28° C durante 14 días (Zapater, 1975). Se realizó el conteo de los tubos positivos de cada una de las diluciones observando viraje de color, turbidez y la formación de un velo en la superficie del caldo.

Se sembró una asada de los tubos positivos en placas con medio sin fuente de nitrógeno (Zapater, 1975) y se dejará incubando por un periodo de 24 a 48 horas. Una vez observado el crecimiento en placa se procederá a elegir las posibles colonias de bacterias diazótrofes teniendo en cuenta la morfología y aspecto de las colonias.

b. Actinomicetos:

Se sembrarán por extensión usando 0.1 ml de las diluciones 10^{-2} hasta 10^{-5} sobre placas petri con medio Almidón-Caseína suplementado con Nistatina al 0.5% para inhibir el crecimiento de hongos, las cuales se incubaron a 28 °C por 7 días. Después del período de incubación, se eligieron las colonias características de actinomicetos, realizándose reisolamientos de las colonias en placas petri con medio Almidón Caseína suplementado con Nistatina al 0.5% y siendo incubadas a 28 °C, hasta obtener colonias aisladas.

5.4.1.4 Conservación y reactivación de las cepas aisladas mediante técnica de criopreservación en glicerol

A partir de las cepas aisladas se realizaron cultivos en tubos conteniendo caldo Levadura-Manitol (4 ml) y se incubaron a 28° C durante 24 horas, para el caso de diazótrofos, y 5 días, para actinomicetos, hasta que se obtuvo una población de 10^8 UFC/ml, lo cual se corroboró realizando la medición de densidad óptica de acuerdo a la curva de crecimiento. Se dispensaron 0.5 ml de glicerol al 100%, para diazótrofos, y 25%, para actinomicetos, en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Luego se tomaron 1.5 ml de cada inóculo bien homogenizado (por repetición) y se vertieron sobre el glicerol. Las cepas se guardaron a -80° C (Simione, 1998).

5.4.2 Caracterización morfológica

- **Diazótrofos**

Se sembrara cada cepa sobre medio mineral sin nitrógeno incubándose por dos días a 28 ° C. Se describieron las colonias de acuerdo a su color, forma, tamaño, borde y viraje del medio.

- **Actinomicetos**

Las se observaron después de 10-15 días de incubación de las cepas crecidas en medio Almidón Caseína. Se tuvo en cuenta la textura de la colonia (pulverulenta o lisa), presencia y cantidad de esporas pudiendo ser nula, poca, regular y abundante (-, +, ++, +++), color de micelio base, color de micelio aéreo, producción de pigmentos difusibles y coloración del mismo (Pérez, 2012).

5.4.3 Evaluación de la capacidad PGPR de las cepas aisladas

5.4.3.1 Prueba de producción de Ácido Indol acético (AIA)

Para esta prueba se empleó la técnica colorimétrica descrita por Gordon y Weber (1950). Las cepas fueron sembradas en tubos con caldo levadura manitol (LMC) (4 ml) suplementado con L-triptofano 5 mM. Los tubos inoculados se incubaron a 28°C por un periodo de dos días hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/ml, para las diazótrofes, y 10^5 UFC/ml, para los actinomicetos, (la cual se obtuvo mediante la medición de la densidad óptica). Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 500 µL en un eppendorf y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Cada cepa contó con una repetición. Posteriormente, se tomaron 250 µL del sobrenadante y se colocaron en un tubo de ensayo. Se agregó 1 mL de reactivo de Salkowski a cada uno (1:4) de estos tubos y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluó el viraje de color de la solución a tonalidades rojizas y se midió en el espectrofotómetro a 530 nm. Se tomaron 250 µl del cultivo y se adicionaron a 1 ml del Reactivo de Salkowsky. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se evaluó el viraje de color de la solución a tonalidades rojizas a través de la medida de absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro y también se realizaron lecturas de densidad óptica a 600 nm para relacionar con crecimiento poblacional.

5.4.3.2 Prueba de solubilización de fosfato inorgánico

Las cepas fueron cultivadas en LMC a 28° C en agitación de 150 rpm hasta que se obtuvo una población de aproximadamente 10^8 UFC/ml, para las diazotrofes, y 10^5 UFC/ml, para los actinomicetos, la misma que se comprobó mediante la medición de la densidad óptica. Se tomaron 5 µl del cultivo y se colocaron en placas conteniendo medio National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) en fosfato bicálcico y tricálcico (Nautiyal, 1999). Las placas se incubaron por un periodo de 3 – 12 días a 28°C y se evaluó el crecimiento a través del tiempo. Las cepas que fueron positivas para esta prueba evidenciaron un halo transparente alrededor de las mismas.

5.4.4 Caracterización molecular

Se llevó a cabo en un ambiente de análisis molecular a una temperatura controlada de 21°C.

a. Extracción de ADN

Se realizó utilizando el kit Axy prep bacterial genomic DNA Miniprep kit (Axygen).

- Se colocó 1.5 ml del caldo LMC con las cepas crecidas (incubadas a 28°C) en tubos para microcentrífuga de 2 ml y se centrifugaron a 12000 g durante 2 minutos. Se descartó totalmente el sobrenadante cuidando de no perturbar el pellet, y este se resuspendió con 150 µl de buffer S conteniendo la RNasa A. Posteriormente se procedió a homogenizar, sin dejar flóculos
- Se agregaron 20 µl de lisozima y se homogenizó bien. Sólo las bacterias detectadas como Gram + se incubaron a 37°C por 30 minutos.
- Se le incorporó 30 µl de EDTA 0.25 M (pH=8). Se mezcló bien y se incubó inmediatamente en hielo por 5 minutos.
- Se añadieron 450 µl de buffer G–A, agitando luego en vórtex por 15 segundos. Posteriormente se llevó a baño de agua a 65°C por 10 minutos.
- Se agregaron 400 µl de buffer G–B, seguido de 1 ml de buffer DV (previamente enfriado a 4°C). Se homogenizó vigorosamente y se procedió a centrifugarlo a 12000 g por 2 minutos.
- Después de la formación de dos fases se procedió a extraer y descartar la fase superior (color azul). Se transfirió la fase inferior al interior de una columna de filtración colocada en un tubo para microcentrífuga de 2 ml, centrifugando a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó la columna de filtración adicionando al filtrado 400 µl de buffer BV.
- Se colocó una columna AxyPrep en otro tubo para microcentrífuga de 2 ml al cual se transfirió el filtrado anterior. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó el filtrado del tubo. A la columna anterior se le añadió 500 µL de buffer W1 y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregó 700 µl de buffer W2 y se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto. Adicionalmente se agregaron 700 µl de buffer W2 a la columna AxyPrep y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto para remover las sales, eliminando problemas potenciales en reacciones enzimáticas subsecuentes.

- Se descartó el filtrado y se colocó nuevamente la columna AxyPrep en el tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se procedió a centrifugarlo a 12000 g por 1 minuto.
- Se transfirió la columna AxyPrep a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio. Para eluir el DNA se agregaron 200 µl de eluente (previamente temperado a 60°C para aumentar la eficiencia de la elución), teniendo cuidado de verterlo al centro de la membrana. Se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente, para luego centrifugarlo a 12000 g por 1 minuto.
- Se almacenó las muestras de DNA a -20°C.

b. Verificación de la calidad de ADN extraído (Control de calidad)

Preparación del gel de agarosa 1 %

- Se pesaron de 0.75 g de agarosa y se mezcló con agua destilada (c.s.p. 75 ml). Se licuó en el horno microondas hasta la completa disolución de los cristales de agarosa.
- La preparación anterior, temperada entre 50 – 60°C, fue vertida en una bandeja electroforética de 15 x 10 cm, previamente nivelada. Se dejó solidificar, evitando la formación de burbujas.
- Luego de solidificar se retiraron las paredes de goma y el peine, teniendo cuidado de no dañar los pocillos de vertido de la muestra.
- Se transfirió la bandeja con el gel a la cámara de electroforesis.

Corrida de las muestras

- Se mezcló 1 µl de buffer de carga con 5 µl de la muestra.
- 1 µl de marcador molecular Lambda DNA se mezcló con 1 µl de buffer de carga y 4 µl de Agua mili Q.
- Se procedió a cargar la mezcla con una micropipeta de 1 – 10 µl, dispensando cada muestra en un pocillo del gel.
- Se cerró la cámara de electroforesis y se conectaron los cables en sus electrodos correspondientes.
- Se programó la fuente de poder a 80V por 60 minutos, iniciando la corrida.

Tinción del gel

- Concluido el tiempo de corrida, se trasladó cuidadosamente el gel a una bandeja de solución acuosa de bromuro de etidio (0.5 µg/ml), dejando reposar durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo anterior, se trasladó el gel a la bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 minutos para su lavado.
- Se colocó el gel sobre el transluminador, encendiendo la luz UV
- Se tomaron las fotografías correspondientes.

c. Amplificaciones BOX

Tabla 1 Mezcla para reacciones de BOX – PCR

Reactivos ([]_{stock})	Volumen (25 µL)
Buffer KCl (10X)	2.5
MgCl ₂ (25mM)	7
DMSO (100%)	2.5
dNTPs (100mM)	1.24
Primer BOX A1R(100pmol/mL)	0.2
Taq DNA Polimerasa (5U/µL)	0.4
DNA (µL)	5
Agua Milli-Q (µL)	c.s.p. 25,00

El análisis de los perfiles de bandas de la caja BOX se realizó de acuerdo a Versalovic *et al.* (1991). Se empleó el primer BOX A1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') para la amplificación BOX. La formulación de la mezcla requerida para una amplificación BOX fue de acuerdo a la tabla 1. De acuerdo con el volumen de muestras, se realizó un master mix, multiplicando todos los volúmenes requeridos por el número de muestras a ensayar más dos. Luego de

dispensar la mezcla obtenida, se procedió a colocar el volumen respectivo de DNA y agua Milli-Q (25 μ L de reacción).

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

Verificación de la amplificación mediante electroforesis

- Se preparó agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X y se vertió en una bandeja electroforética para gel de 15 x 15 cm, la cual fue dispuesta dentro de la cámara de electroforesis conteniendo la solución buffer mencionada anteriormente.
- Se mezcló 1 μ L del buffer de carga con 5 μ L del amplificado.
- Se utilizó como marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas), (1 μ L), el cual se mezcló con 1 μ L de buffer de carga y 4 μ L de agua Milli-Q.
- Se procedió al cargado de las muestras y los marcadores moleculares.
- Se cerró la cámara de electroforesis y se conectaron los cables en sus electrodos correspondientes.
- Se realizó el corrido electroforético de las muestras a 80 V por 180 min.
- El revelado se realizó de acuerdo a lo indicado en la verificación de ADN extraído en el punto anterior.

d. Amplificación 16S

En primer lugar deben agruparse los perfiles obtenidos con la amplificación BOX. Para este proceso el marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas) es una herramienta muy importante que permite la asociación de bandas comunes de acuerdo a su posición con respecto al marcador. Una vez realizada la agrupación, se eligieron representantes de cada grupo para el secuenciamiento del gen ribosomal 16S con el fin de secuenciarlo y determinar la identidad de las cepas ensayadas.

Dicho gen fue amplificado por medio de una reacción de PCR con los primers fD1 (5' – CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') y rD1 (5' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3'). Posteriormente se procedió a limpiar las secuencias obtenidas con el kit PCR Cleanup de Axygen. La PCR fue realizada en una mezcla de reacción de 25 μ L (Tabla 2) contenidos en tubos para PCR debidamente rotulados buscando bandas en común que muestren un mismo peso molecular. Dado el volumen de muestras, se realizó un master mix, multiplicando todos los volúmenes requeridos por el número de muestras a ensayar más dos. Luego de dispensar la mezcla obtenida, se procedió a colocar el volumen respectivo de ADN y agua Milli-Q (25 μ L de reacción).

El perfil de temperatura fue el siguiente: desnaturalización inicial a 93°C por 6 min; 30 ciclos de desnaturalización a 93°C por 45 segundos, annealing a 62°C 4 segundos y extensión a 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 5 min. La comprobación de la amplificación se hizo por electroforesis, cargando 5 μ l del amplificado en gel de agarosa al 1.5 % de 15 cm durante aproximadamente 3 horas a 80 voltios.

Tabla 2 Mezcla para reacciones de amplificación 16S

Reactivos (I _{stock})	Volumen (25 μ L)
Buffer KCl (10X)	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1.5
dNTPs (100mM)	0.2
Primer fD1(25pmol/mL)	0.5
Primer rD1(25pmol/mL)	0.5
Taq DNA Polimerasa (5U/ μ L)	0.1
DNA (μ L)	5
Agua Milli-Q (μ L)	c.s.p. 25,00

Verificación de la amplificación mediante electroforesis

- Se preparó agarosa al 1 % en buffer TBE 1X y se vertió en una bandeja electroforética para gel de 15 x 10 cm, la cual fue dispuesta dentro de la cámara de electroforesis conteniendo la misma solución buffer mencionada anteriormente.
- Se mezcló 1 μ L del buffer de carga(6X DNA Loadingdye, Fermentas) con 5 μ L del amplificado.
- Se utilizó como marcador molecular Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus (1 μ L), el cual se mezcló con 1 μ L de buffer de carga y 4 μ L de agua Milli-Q.
- Se procedió al cargado de las muestras y los marcadores moleculares.
- Se cerró la cámara de electroforesis y se conectaron los cables en sus electrodos correspondientes.
- Se realizó la corrida electroforética de las muestras a 60 V por 150 minaproximadamente hasta que la banda más oscura del buffer alcanzó la mitad del largo del gel.
- El revelado se realizó de acuerdo a lo indicado en la verificación de ADN extraído en el punto anterior.

Purificación del producto PCR

Se utilizó el Kit para purificación de DNA, AxyPrep PCR Cleanup Kit (AxygenScientific, Inc. – USA). Este kit emplea una solución especial que contiene una resina con alta selectividad y recuperación de fragmentos de DNA lineal, todo esto en combinación a una columna de PCR AxyPrep. Este kit está diseñado para purificar fragmentos de DNA mayores a 75 bp de reacciones de PCR y otras reacciones enzimáticas, con una recuperación esperada de 70 – 90 %. El procedimiento se detalla a continuación.

- Se agregó 100 μ l de buffer PCR – A a la muestra a purificar. Se utilizó el vortex brevemente para homogenizar el contenido.
- Se colocó una columna AxyPrep PCR en un tubo de microcentrifuga de 2 ml de capacidad. Se pipeteó la reacción anterior en la columna AxyPrep PCR. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó el filtrado del tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se devolvió la columna AxyPrep PCR al tubo.

- Se añadió 700µl de buffer W2 y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos.
- Se repitió el lavado con 400µl del buffer W2.
- Se transfirió la columna AxyPrep PCR a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml de capacidad. Para eluir el ADN se añadieron de 25 a 30 ul de eluente (precalentado a 65°C) teniendo cuidado de verterlo en el centro de la membrana. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.

e. Secuenciamiento

Para la identificación por secuenciamiento del gen ribosomal 16s, las muestras obtenidas fueron enviadas a Macro Gen Inc. (Seúl, Korea), laboratorio que brinda dicho servicio. Tras la llegada de los resultados se procedió a limpiar y unir las secuencias dadas por cada Primer (fD1 y rD1), esto se realizó mediante el empleo del programa BIOEDIT S y el banco de datos con el cual se obtuvieron las posibles especies fue adquirido por medio de la “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y EZ Taxon (<http://www.ezbiocloud.net>).

El programa BIOEDIT fue utilizado para alinear las secuencias de las muestras con secuencias de especies ya conocidas y detectar posibles errores en el cromatograma, ya que muchas veces este tiene bases solapadas o extras y la corrección ayuda a la definición de las posibles especies con mayor afinidad (Fig. 3 y 4).



Figura 3 Secuencias del banco de genes (genebank, NCBI) y cepa en estudio.

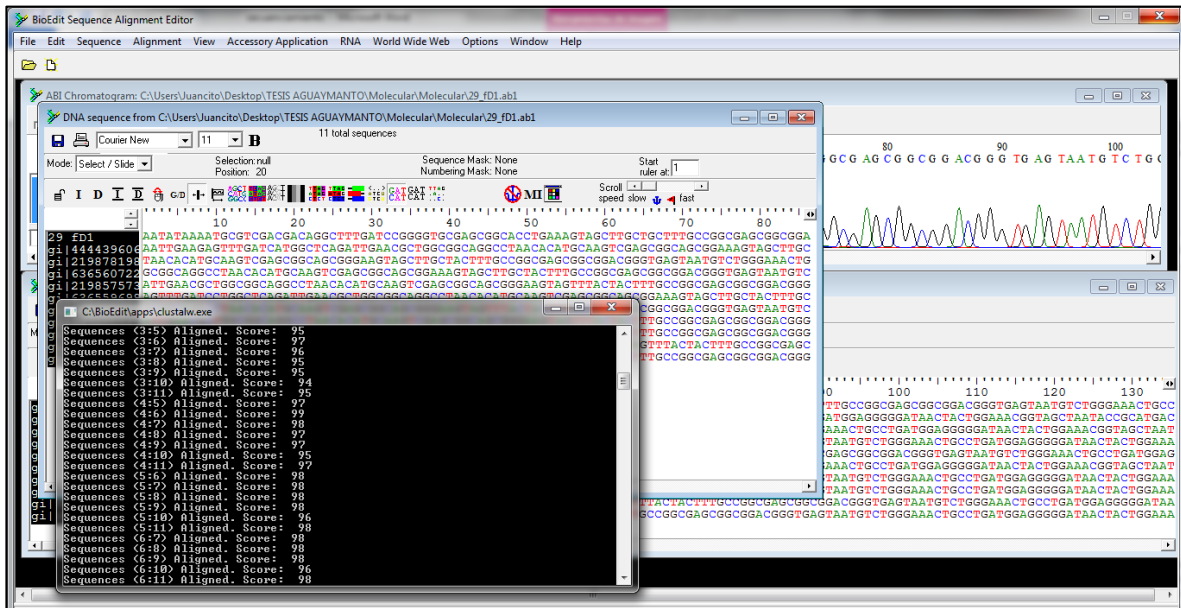


Figura 4 . Alineamiento de las secuencias del banco de genes (genebank, NCBI) y cepa en estudio.

Se aplicó el método estadístico ClustalW para la alineación de secuencias. La aplicación ClustalW permite alinear todas las secuencias en el archivo, permitiendo así la comparación entre estas (Fig. 3). Luego se alineaon las secuencias para la corrección de posibles errores (Fig. 5).

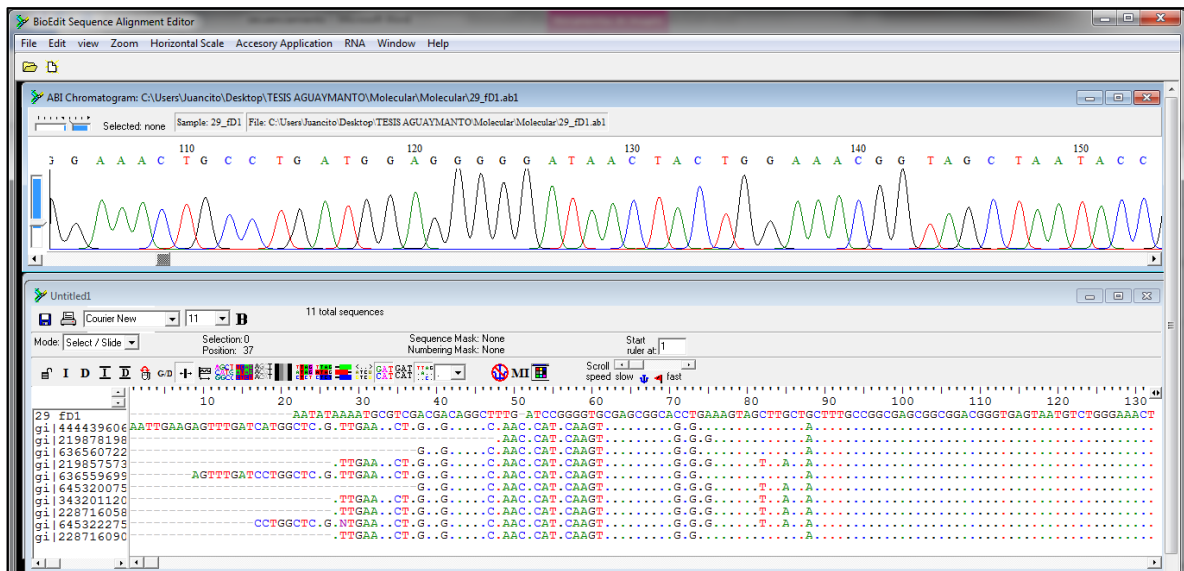


Figura 5 Secuencias alineadas para la corrección de posibles errores.

Una vez que se obtuvo la secuencia limpia se procedió a utilizar el banco de datos EZ Taxon para determinar las posibles especies y el porcentaje de similitud (Fig. 6).

Accession	Job Type	DB	Query (Click to view details)	Length (bp)	Closest match	Similarity (%)	Completeness (%)	Accession
	Identify	EzTaxon	Da15	1366	Rahnella aquatilis CIP 78.65(T)	99.71	100	CP003244
	Identify	EzTaxon	Da30	1398	Pseudomonas protegens CHA0(T)	99.93	100	CP003190
	Identify	EzTaxon	Da29	1368	Rahnella aquatilis CIP 78.65(T)	99.71	100	CP003244
	Identify	EzTaxon	Da27	1425	Stenotrophomonas rhizophila DSM 14405(T)	99.72	100	CP007597
	Identify	EzTaxon	Da26	1400	Rahnella aquatilis CIP 78.65(T)	99.50	100	CP003244
	Identify	EzTaxon	Da8	1445	Stenotrophomonas maltophilia MTCC 434(T)	99.17	100	JALV01000036

Figura 6 Ejemplo de reconocimiento en el banco de cepas EzTaxon

5.4.5 Ensayos en Aguaymanto a nivel de laboratorio

5.4.5.1 Preparación inóculo bacteriano

Se sembraron las cepas diazótroficas, Da 29 y Da30, en caldo levadura manitol (Zuñiga, 1998), los actinomicetos, Aa7 y Aa9, se sembraron en caldo ISP1. Se incubaron a 28°C por 24h los diazótroficos, y hasta por 7 días los actinomicetos. Posteriormente, con el propósito de verificar si se encontraban en fase exponencial se midió su D.O a 600nm y se realizaron también recuentos en placa de cada una de ellas (agar almidón caseína para los actinomicetos, y agar nutritivo para los diazótroficos).

5.4.5.2 Ensayo de germinación en placa

Se realizó la prueba de germinación siguiendo la metodología de CIAT, 1986. Se seleccionaron y posteriormente desinfectaron las semillas con alcohol al 70% por 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril, y posteriormente con lejía al 3% por 3 minutos, luego de lo cual se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril hasta que desapareció el olor de los desinfectantes. Las semillas se embebieron en los diferentes inóculos por espacio de 15 minutos. Posteriormente, se colocaron 25 semillas en cada placa Petri que contenía papel toalla absorbente y se añadió 3 ml de agua destilada estéril. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Se evaluó el porcentaje de germinación y presencia de pubescencia por un periodo de 10 días.

5.4.5.3 Ensayo de emergencia y crecimiento en plántulas

Se inocularon las semillas de maca con la metodología anteriormente mencionada en el acápite 5.4.5.2. Se utilizó sustrato de arena y se evaluó la emergencia, altura, peso fresco aéreo y peso fresco de la raíz a temperatura ambiente. El ensayo tuvo una duración de 2 meses. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones con 10 semillas cada uno. Para el crecimiento de las plántulas se realizó una re inoculación de 1 ml de las cepas bacterianas después de 20 días.

5.4.6 Producción del Inoculo de Micorrizas

5.4.6.1 Extracción y desinfección de esporas

Se tomaron muestras de raíces y de suelo de la rizósfera de plantas de aguaymanto, del campo “El Chiquero” de la Universidad Nacional Agraria La Molina, las cuales habían sido inoculadas con bacterias PGPR del laboratorio de Ecología microbiana y biotecnología Marino Tabusso (Azo16M2, ACT7, Ps42 y Bac3M2) . El aislamiento de las esporas se llevó a cabo siguiendo la metodología de tamizado húmedo y decantación (Genderman y Nicolson, 1963), modificada por Sieverding, (1991) utilizando el suelo de la rizósfera. Por último se tomó una alícuota de 1ml del tamizado para la observación microscópica, recuento y reconocimiento de esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares. Se reconocieron características según forma y color de acuerdo a lo descrito por Franco M. (2008). Las esporas recolectadas se desinfectaron utilizando cloramina T (2%) y estreptomina (0.5%) de acuerdo a la metodología propuesta por Utobo et al. (2011).

5.4.6.2 Producción del inoculo en plantas trampa

Se utilizó como planta hospedadora a *Trifolium pratense* en un sustrato de mezcla suelo:arena (1:1). Las plántulas se inocularan con las esporas recolectadas (subtitulo 5.4.6.1) y se dejaron crecer durante 3 meses. Luego de este tiempo se verificó la infección en la raíz y cantidad de esporas en el suelo, las mismas que fueron utilizadas para la producción del inóculo de acuerdo al subtitulo 5.4.6.1.

5.4.6.3 Tinción de raíces infectadas con hongos formadores de micorrizas

Para este proceso se usaron los protocolos modificados de Phillips y Hayman (1970), de acuerdo a los siguientes pasos:

Lavado de la muestra

Se realizó una limpieza minuciosa de las raíces de aguaymanto con agua corriente eliminando todas las impurezas, luego se seleccionaron las raíces secundarias y se cortaron en piezas de ± 2 cm de longitud

Clarificación

Se pesó 1 gramo de muestra y se adicionó KOH en diferentes concentraciones (10%) hasta que todas las raíces quedaron cubiertas. Se llevaron a una temperatura de 65°C por 2 horas. Luego se decantó la muestra y se procedió a lavar con agua destilada hasta que no se observó presencia del colorante.

Pre – Tinción

Se adicionó, HCl al 10% por 20 min, pasado el periodo de acidificación se procedió a decantar

Tinción y decoloración

Se agregó Azul de Tripán en Lactofenol [azul de tripano (0.05 g) en 100 mL de lactofenol (40 ml de ácido láctico, 20 g de fenol, 40 ml de agua destilada)] hasta cubrir las raíces, se llevó a una temperatura de 65°C por 15 minutos y se dejó reposar por 8 días y se lavó con lactoglicerol.

Observación

Se colocaron las raíces en placas de vidrio con unas gotas de ácido láctico, este último es utilizado para la decoloración y conservación de las raíces. Posteriormente, estas fueron observadas al microscopio óptico con el fin de identificar algunas de las principales estructuras de las micorrizas

Método campos de colonización

Para la cuantificación del porcentaje de colonización se utilizó el método de campos de colonización (Sieverding, 1983). Se tomó una lámina portaobjetos y trazaron líneas paralelas de forma longitudinal. Se cortaron las raíces teñidas en trozos de 1 a 2 cm, se colocaran paralelamente, añadiendo lactoglicerina o agua, y se cubrieron con cubreobjetos. Se observaron al microscopio a un objetivo de 40 X.

Se contaron los campos colonizados y no colonizados. Por último, se cuantificara el porcentaje de longitud de raíz colonizada (% LRC) según la siguiente formula:

$$\% \text{ LRC} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Campos colonizados}}{\text{N}^\circ \text{ total Campos observados}} * 100$$

5.4.7 Ensayo en invernadero

Se trasplantaron plántulas de aguaymanto (provenientes de almácigos, usando como sustrato el producto Sunshine Mezcla N°3) (Fig. 7) a macetas de 4kg, las cuales contenían una mezcla de suelo (35%), arena (35%) y compost (30%). Para este ensayo se evaluó la promoción del crecimiento de plantas de aguaymanto por la interacción de bacterias, diazotrofas y actinomicetos con demostrada capacidad PGPR in vitro, y hongos formadores de micorrizas arbusculares, aislados de la rizósfera de este mismo cultivo, asimismo se utilizó un tratamiento control solo con hongos formadores de micorrizas arbusculares y otro sin ninguna inoculación. Cada tratamiento tendrá cuatro repeticiones y su realizará un diseño completamente al azar (DCA).

Las plántulas se inocularon utilizando un inóculo de 25 esporas por gramo de suelo (Gómez-Vargas et al., 2011) cuando tenían aproximadamente tres hojas (3 semanas de crecimiento) y al momento de la siembra en las macetas (20 días posteriores) se inocularon las bacterias seleccionadas, con cultivos microbianos de 10^8 ufc/gr y 10^5 ufc/gr para diazótrofos y actinomicetos respectivamente, de acuerdo a la metodología propuesta por Davies *et al.* (2010). Los parámetros de crecimiento vegetativo que se evaluaron son: Altura, número de hojas, cantidad de macro y micronutrientes, longitud radicular, peso fresco aéreo, peso seco aéreo, peso fresco raíz, peso seco raíz, número de frutos, peso fruto, porcentaje de infección de micorrizas

arbusculares en raíces y número de esporas por gramo. Estos parámetros se midieron en las etapas de prefloración y cosecha.

Los análisis de nutrientes se realizaron en el Laboratorio de Análisis de suelos de la facultad de Agronomía, y el análisis de ácido ascórbico se realizó en el Laboratorio de Análisis físico-químicos de alimentos de la facultad de industrias alimentarias de acuerdo al método AOAC 967.21, ambos laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina.



Figura 7 Almácigos de Aguaymanto a nivel de laboratorio para su trasplante a ensayo en invernadero

5.4.8 Análisis estadísticos

Se utilizó el método de “Vecino más cercano” para agrupar las cepas solubilizadoras de fosfato de acuerdo a su comportamiento a lo largo del ensayo.

Para el análisis estadístico de los porcentajes de germinación y emergencia se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones de 25 semillas y 10 semillas respectivamente para cada ensayo. Las desviaciones estándar y los gráficos se realizaron con el programa Excel. Se realizó un análisis de variancia (ANOVA) y las mínimas diferencias con la prueba de Duncan de comparaciones múltiples. También se hicieron análisis de correlación entre las diferentes variables. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion. El diseño estadístico para los ensayos de invernadero fue un diseño completamente al azar (DBCA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de campo “El chiquero” – La Molina

El campo “El Chiquero” perteneciente a la Universidad Nacional Agraria La Molina está ubicado a 227 msnm. Las temperaturas ambientales registradas durante el muestreo variaron entre 12 y 20°C. En la tabla 3 se muestran las localizaciones exactas, obtenidas con un GPS (Etrex Vista Garmin).

Tabla 3 Características del suelo muestreado

Coordenadas	T. Suelo (°C)	T. Amb (°C)
18L 0287175	22.1	19.57
UTM 8663618		

Se realizó un análisis microbiológico del suelo de la rizosfera y suelo de Aguaymanto de donde se cuantificaron las poblaciones microbianas de los diferentes grupos cultivables (Fig. 8 y 9). Según Mahmood (2006), la diversidad de los microorganismos presentes en el suelo depende de diversos factores tales como la composición química, textura, disponibilidad de agua, entre otras características que intervienen en la disponibilidad de nutrientes, así como la tensión de oxígeno en las diferentes partículas que conforman el suelo, de ahí la importancia en conocer estos parámetros fisicoquímicos.

En las muestras se obtuvo una población de bacterias aerobias mesófilas entre 10^6 - 10^7 UFC/g suelo, mientras que tanto las poblaciones de actinomicetos y hongos se encontraron en un rango de 10^5 – 10^6 UFC/g suelo. Según Coyne (2000) existen entre 10^4 - 10^6 propágulos fúngicos por gramo de suelo. Un propágulo es cualquier parte del hongo, espora o hifa capaz de formar una nueva colonia de hongos. Así también, dicho

autor afirma que las poblaciones de actinomicetos varían entre 10^5 - 10^8 propágulos por gramo de suelo, estos datos coinciden con los obtenidos en este estudio.

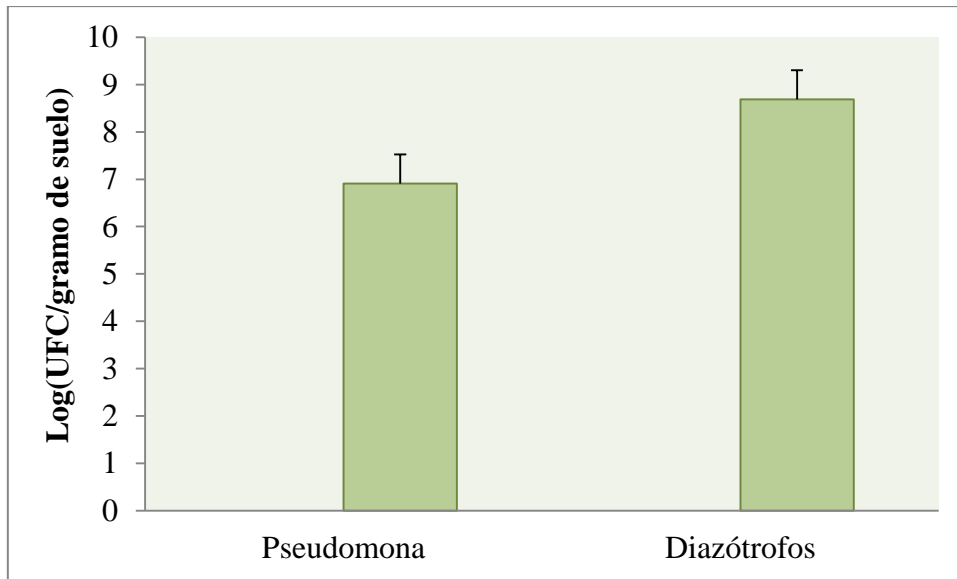


Figura 8 Poblaciones microbianas de diazótrofos y Pseudomonas

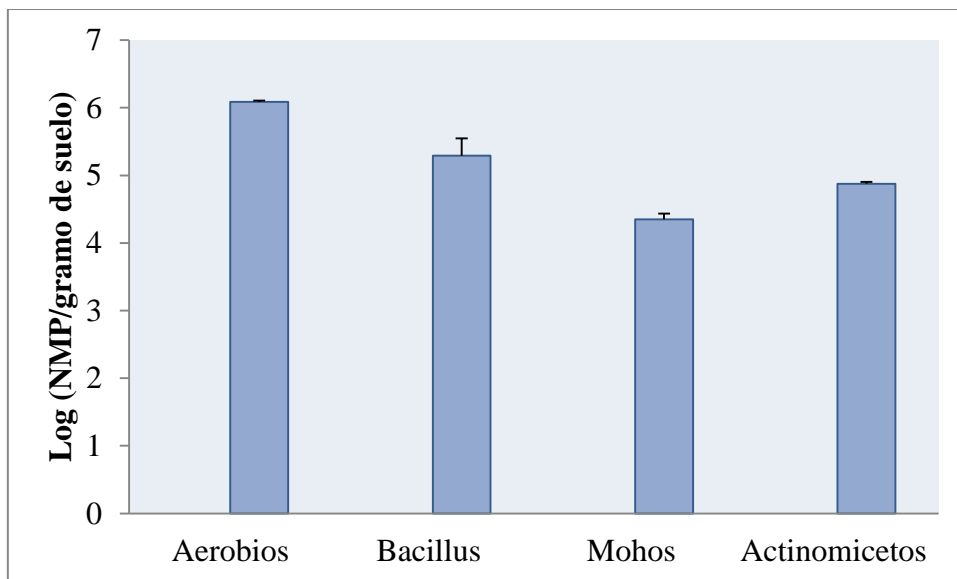


Figura 9 Poblaciones microbianas mesófilas

6.2 Aislamiento de bacterias diazótroficas y actinomicetos

Se realizó la selección de rizobacterias de interés mediante un aislamiento selectivo por medio de medios de cultivo diferenciales que permitieron la identificación de cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótroficas) y actinomicetos.

Se aislaron 30 diazótrofos mesófilos y 18 actinomicetos, de la rizósfera de aguaymanto. Esto se respalda por los estudios de Dakora y Phillips (2002) quienes afirman que la raíz de la planta genera un microclima adecuado para el desarrollo de los microorganismos. Esto se debe a que estas zonas presentan una alta concentración de exudados radiculares que los microorganismos que habitan en él emplean como fuente de sustratos; promoviendo a su vez la quimiotaxis de estos últimos hacia la rizósfera e inclusive hacia la misma raíz. Además, esta zona permite un mayor intercambio de oxígeno en el suelo.

6.3 Caracterización morfológica

Las cepas aisladas fueron caracterizadas morfológicamente. Las colonias de diazótrofos se presentaron en su mayoría transparentes, con bordes regulares, convexas y de apariencia similar a gotas de agua (Zúñiga et al., 1982). Por otro lado, se observó que algunas colonias acidificaron el medio mineral sin nitrógeno (MM); resultado que se evidenció con el viraje de color del medio de cultivo de verde a amarillo (Tabla 4 y Fig. 10).

Las colonias de los diazótrofos se presentaron principalmente incoloras y bastante mucosas. El 83% de estas cepas viraron el caldo mineral de color verde azulado oscuro a amarillo o a un verde más tenue. Esto se explica por producción de ácido por resultado del metabolismo de las cepas, lo que reduce el pH del medio y produce el cambio de coloración.

Tabla 4 Descripción morfológica de diazótrofos mesófilos aislados de la rizósfera de aguaymanto

Código	Tamaño	Color	Borde	Textura	Viraje MM
Da1	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	-
Da2	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da3	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	-
Da4	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	-
Da5	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	+

Da6	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	-
Da7	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da8	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	-
Da9	Mediana	Amarillento	Regular	Creмоса	+
Da10	Pequeña	Incoloro	Regular	Mucosa	+
Da11	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da12	Mediana	Azulado	Regular	Mucosa	++
Da13	Pequeña	Incoloro	Regular	Mucosa	+
Da14	Grande	Azulado	Regular	Mucosa	++
Da15	Pequeña	Incoloro	Regular	Mucosa	+
Da16	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	+
Da17	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da18	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da19	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da20	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da21	Pequeña	Amarillento	Regular	Creмоса	+
Da22	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da23	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da24	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da25	Grande	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da26	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da27	Pequeña	Amarillento	Regular	Mucosa	+
Da28	Pequeña	Incoloro	Regular	Mucosa	+
Da29	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++
Da30	Mediana	Incoloro	Regular	Mucosa	++

MM: Medio Mineral sin nitrógeno según Zapater (1975). Pequeña: 0-0.1cm; Mediana: 0.1-0.3cm; Grande: 0.3-0.5cm. ++: Viraje total; +: Viraje parcial

Las colonias de actinomicetos fueron caracterizadas según su textura, presencia de esporas, cantidad de esporas, color del micelio base, color del micelio aéreo, presencia de pigmento difusible (Tabla 5 y Fig. 10). Dos cepas mostraron pigmentos difusibles de colores rojo y rosado, Aa12 y Aa15 respectivamente. Asimismo se encontraron dos cepas de textura lisa que no presentaron micelio aéreo. Todas las cepas presentaron olor a suelo húmedo, esta característica es representativa de este grupo microbiano debido a la producción de geosmina (Prescott, 2002).

Tabla 5 Descripción morfológica de actinomicetos mesófilos aislados de la rizósfera de aguaymanto

Código	Textura	Presencia de esporas	Cantidad de esporas	Color micelio base	Color micelio aéreo	Pigmentos difusibles	Coloración del pigmento difusible
Aa1	Pulverulenta	Si	+++	Morado oscuro	Lila	No	-
Aa2	Pulverulenta	Si	+++	Crema	Plomo y blanco	No	-
Aa3	Pulverulenta	Si	+++	Morado oscuro	Plomo	No	-
Aa4	Pulverulenta	Si	++	Marrón	Blanco	No	-
Aa5	Pulverulenta	Si	++	Rosado	Blanco	No	-
Aa6	Pulverulenta	Si	++	Morado oscuro	Plomo	No	-
Aa7	Pulverulenta	Si	+++	Marrón	Plomo	No	-
Aa8	Lisa	No	-	Rosado	-	No	-
Aa9	Pulverulenta	Si	+	Crema	Blanco	No	-
Aa10	Pulverulenta	Si	+++	Marrón oscuro	Blanco	No	-
Aa11	Pulverulenta	Si	++	Verde oscuro	Blanco	No	-
Aa12	Pulverulenta	Si	+++	Rojo	Blanco	Si	Rojo
Aa13	Pulverulenta	Si	+++	Plomo	Verde	No	-
Aa14	Pulverulenta	Si	++	Blanco	Plomo oscuro	No	-
Aa15	Pulverulenta	Si	+++	Rosado intenso	Rosado claro	Si	Rosado
Aa16	Lisa	No	-	Plomo	-	No	-

Aa17	Pulverulenta	Si	++	Crema	Plomo	No	-
Aa18	Pulverulenta	Si	++	Amarillo	Plomo	No	-

+++ : Abundante; ++ : Regular; + : Poco

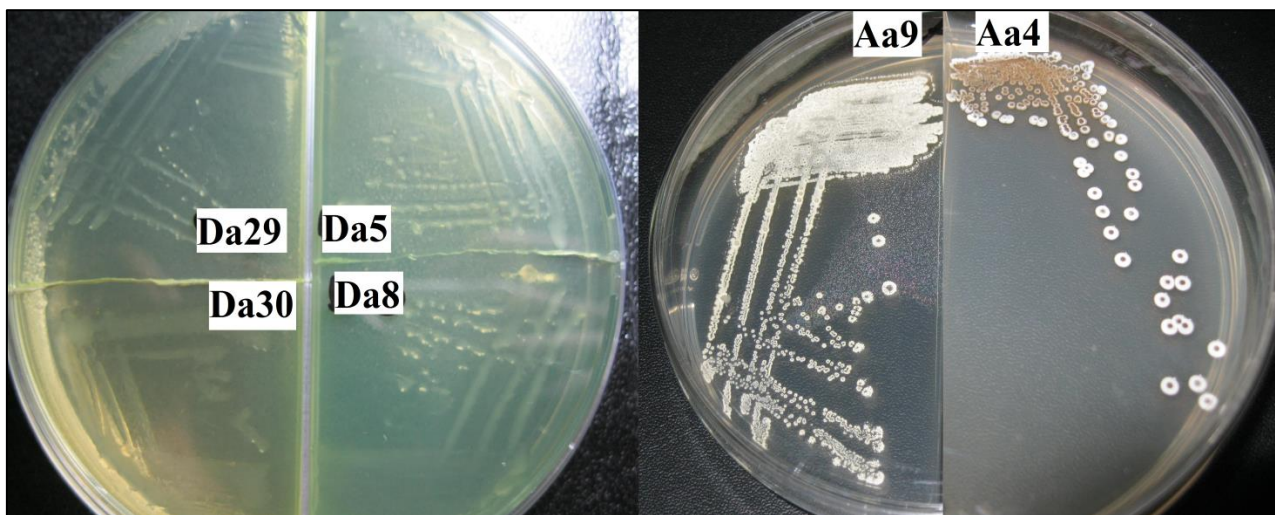


Figura 10 Bacterias diazótroficas y actinomicetos aislados

6.4 Capacidad Promotora de crecimiento

6.4.1 Producción de ácido indol acético (AIA)

La capacidad de síntesis de ácido indol acético (AIA) se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias del suelo y las asociadas a plantas (Verma *et al.*, 2001), siendo los géneros más estudiados *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Patten y Glick, 1996). Su importancia radica en una mejora en el crecimiento radicular de la planta, lo que ayuda a un establecimiento más rápido en el suelo incrementando su capacidad de obtener agua y nutrientes del medio (Patten y Glick, 2002). Se conoce que la auxina es capaz de promover la formación de raíces laterales y adventicias, lo que supone una ventaja competitiva para las plantas jóvenes; sin embargo, sus efectos dependen de su concentración, tipo de planta y microorganismo (Vestergard *et al.*, 2007). Es importante subrayar que está demostrado que bajas concentraciones de fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones inhiben y reducen la zona de alargamiento (Hernández, 2002).

La determinación de la concentración de auxina se llevó a cabo utilizando el reactivo de Salkowski, que permite la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas (Mayer, 1958). El AIA y sus precursores se caracterizan por generar un color rojizo al entrar en contacto con dicho reactivo, donde la intensidad de la coloración de la reacción es directamente proporcional a la cantidad producida de AIA o de alguno de sus precursores (Bricet *et al.*, 1991). La aparición del color rosa al fucsia se debe a una reacción oxidativa causada por el ácido y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cl del FeCl₃, presente en el reactivo de Salkowski. La concentración de AIA en cada cultivo se determinó al realizar una comparación con una curva estándar. Es importante señalar, que la técnica utilizada para la cuantificación de sustancias estimuladoras del crecimiento del tipo auxinas, puede presentar interferencias por la presencia de otros indoles. No obstante, es empleada por muchos autores para estos fines (Hernandez, 2002; Trujillo, 2005; Velazquez *et al.*, 1999).

Se evaluaron 30 cepas diazótrofes y 18 actinomicetos aislados de la rizósfera de aguaymanto. Se utilizó como control negativo el caldo de crecimiento estéril. De todas las cepas, 29 (96.66%) actinomicetos y 18 (100%) diazótrofes produjeron AIA (Tabla 6 y Fig. 11).

Ahmad *et al.*, (2005) afirma que los géneros de bacterias PGPR más asociados a la producción de AIA son *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*. En este estudio, se corroboró dicha afirmación al encontrarse que las bacterias diazótrofes mesófilas resultaron las mejores productoras de AIA: el 40% de las cepas diazótrofes produjeron concentraciones de AIA mayores a 70 µg/ml, así como también, el 22% de las cepas de actinomicetos produjeron valores de AIA superiores a 20 µg/ml. Las cepas que produjeron mayores concentraciones de AIA fueron la Da25 (81 µg/ml) y la Da26 (83.3 µg/ml). En el caso de los actinomicetos los valores más altos fueron de hasta 68.361 µg/ml (Aa5) y 53.582 µg/ml (Aa15). De acuerdo a los estudios realizados por Toloza (2014) se han reportado bacterias de los generos *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, aisladas de la rizosfera de aguaymanto con capacidad PGPR que presentaron valores de hasta 80 µg/ml y presentaron capacidades promotoras de crecimiento vegetal. Asimismo cabe resaltar que aunque las investigaciones sobre evaluación microbiana en la producción de AIA arroje valores alto o bajos si se comparan entre sí, está demostrado

que bajas concentraciones de fitohormonas son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones producen una inhibición (Hernández, 2002).

Tabla 6 Porcentaje de cepas diazótroficas y actinomicetos según su capacidad para producir ácido indol acético

Cepas	Producción de ácido indol acético ($\mu\text{g/ml}$)				
	Produce	P<5	5<p<10	10<p<20	p>20
<i>Actinomicetos</i>	100%	16.67%	33.33%	27.78%	22.22%
<i>Diazótrofos</i>	96.66%	6.67%	6.67%	16.67%	70%

p: producción de ácido indol acético en $\mu\text{g/ml}$

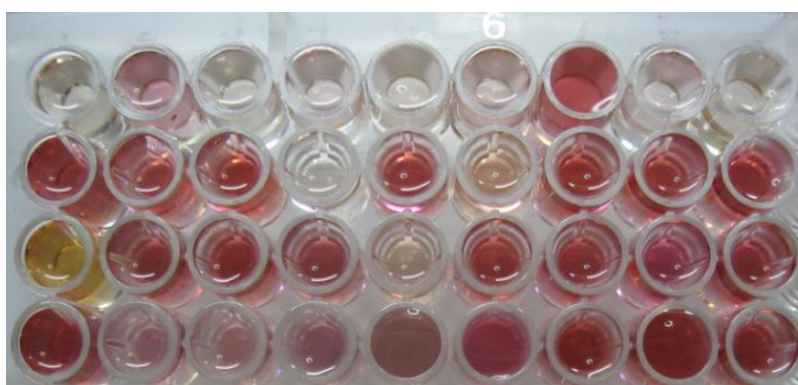


Figura 11 Reacción colorimétrica de Salkowsky

6.4.2 Solubilización de fosfato bicálcico y tricálcico

La mayor parte del fósforo presente en el suelo (50 a 80%) se encuentra en su forma orgánica, la que no puede ser utilizada directamente por la mayoría de las plantas (Richardson, 2001). La concentración de fósforo asimilable es muy baja, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg/kg. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo así su disponibilidad. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y, por lo tanto tampoco son aprovechables para las plantas (Alexander, 1980;

Atlas, 2002). Debido a esto, la capacidad de solubilización de fosfatos por una bacteria resulta una característica importante que significa un mejor aprovechamiento de las diversas fuentes de fósforo, uno de los nutrientes esenciales para la planta y que se encuentra generalmente inmovilizado en el suelo (Ramazan et. al., 2006).

Los mecanismos usados por las bacterias PGPR para solubilizar fosfatos son diversos, entre ellos se encuentran la producción de enzimas fosfatasas. Estas enzimas al ser liberadas por algunos microorganismos extracelularmente, catalizan una variedad de reacciones que liberan fosfatos de compuestos orgánicos hacia la solución del suelo (Osorio, 2000). Otro mecanismo es aquel mediado por ácidos orgánicos (Halder et al. 1990), pues los grupos carboxil e hidroxil presentes en los ácidos quelan los cationes unidos al fosfato y lo regresan a un estado soluble. El ácido glucónico y el ácido 2-quetoglucónico son los agentes más producidos por bacterias con habilidad para solubilizar fosfato (Yadav y Dadarwal, 1997).

De las 48 cepas que fueron sometidas a esta prueba, se obtuvo que el 63.33% de los diazótrofos y el 22.22% de los actinomicetos (Tabla 7) fueron capaces de solubilizar el medio NBRIP-bicálcico (Nautiyal, 1999) con presencia de halos de solubilización comprendidos entre los 0.65 cm (Aa7) y los 2.27 cm (Da27) (Tabla 8). Así también, se evaluó la acción solubilizadora de estas mismas cepas en el medio NBRIP-tricálcico, observándose resultados positivos en el 70% de cepas diazótroficas y el 22.22% de los actinomicetos (Tabla 9). En esta prueba se obtuvieron halos de solubilización de hasta 0.55 cm (Aa7 y Aa9) en el caso de los actinomicetos y 2.20 cm (Da2) en el caso de las bacterias diazótroficas (Tabla 10). Cabe resaltar que las mismas cepas de actinomicetos solubilizaron fosfato bicálcico y tricálcico.

Tabla 7 Porcentaje de cepas diazótroficas y actinomicetos según su capacidad para solubilizar fosfato bicálcico

Cepas	Solubilización de fosfato bicálcico			
	Solubiliza	0.5<h<1	1<h<1.5	h>1.5
<i>Actinomicetos</i>	22.22%	50%	50%	0%
<i>Diazótrofos</i>	63.33%	10%	13.33%	40%

h: halo de solubilización medido en cm

Tabla 8 Halos de solubilización de fosfato bicálcico de cepas diazótrofes y actinomicetos

Halos de solubilización (cm)							
<i>Diazótrofos</i>				<i>Actinomicetos</i>			
Cepas	Días			Cepas	Días		
	3	6	12		3	6	12
Da2	0.75 ± 0.00	1.35 ± 0.07	1.68 ± 0.04	Aa2	0.25 ± 0.05	0.45 ± 0.13	0.68 ± 0.16
Da7	0.40 ± 0.14	1.10 ± 0.00	1.35 ± 0.07	Aa5	0.35 ± 0.10	0.85 ± 0.30	1.30 ± 0.05
Da11	0.38 ± 0.39	1.20 ± 0.28	1.35 ± 0.21	Aa7	0.50 ± 0.09	0.68 ± 0.16	0.70 ± 0.18
Da12	0.38 ± 0.04	1.00 ± 0.00	1.28 ± 0.04	Aa9	0.77 ± 0.21	0.87 ± 0.16	1.18 ± 0.08
Da13	0.20 ± 0.21	0.65 ± 0.07	0.85 ± 0.28				
Da14	0.53 ± 0.53	1.40 ± 0.71	1.55 ± 0.78				
Da15	0.23 ± 0.25	0.55 ± 0.35	0.65 ± 0.57				
Da17	0.63 ± 0.39	1.40 ± 0.71	1.55 ± 0.78				
Da18	0.60 ± 0.71	1.03 ± 0.81	1.25 ± 0.92				
Da19	0.60 ± 0.57	1.40 ± 0.57	1.58 ± 0.46				
Da20	0.78 ± 0.25	1.25 ± 0.07	1.65 ± 0.35				
Da22	0.65 ± 0.35	1.25 ± 0.35	1.65 ± 0.49				
Da23	0.65 ± 0.35	1.40 ± 0.00	1.75 ± 0.35				
Da24	1.00 ± 0.00	1.45 ± 0.21	2.00 ± 0.28				
Da25	0.60 ± 0.14	1.55 ± 0.35	1.70 ± 0.42				
Da26	0.80 ± 0.00	1.75 ± 0.35	1.75 ± 0.35				
Da28	0.50 ± 0.00	0.70 ± 0.00	1.00 ± 0.00				
Da29	0.60 ± 0.14	1.70 ± 0.28	2.27 ± 0.38				
Da30	0.83 ± 0.11	1.80 ± 0.14	2.00 ± 0.00				

Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado.

Tabla 9 Porcentaje de cepas diazótrofes y actinomicetos según su capacidad para solubilizar fosfato tricálcico

Cepas	Solubilización de fosfato tricálcico				
	Solubiliza	h<0.5	0.5<h<1	1<h<1.5	h>1.5
<i>Diazotrofos</i>	70%	10%	10%	26.67%	23.33%
<i>Actinomicetos</i>	22.22%	50%	50%	0%	0%

h: halo de solubilización medido en cm

Tabla 10 Halos de solubilización de fosfato tricálcico de cepas diazótroficas y actinomicetos

Halos de solubilización (cm)							
<i>Diazótrofos</i>				<i>Actinomicetos</i>			
Cepas	Días			Cepas	Días		
	3	6	19		3	6	12
Da2	0.25 ± 0.07	0.30 ± 0.00	2.20 ± 0.28	Aa2	0.15 ± 0.00	0.23 ± 0.10	0.33 ± 0.18
Da5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.23 ± 0.11	Aa5	0.18 ± 0.06	0.25 ± 0.10	0.23 ± 0.14
Da7	0.35 ± 0.07	1.10 ± 0.00	1.65 ± 0.35	Aa7	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.55 ± 0.15
Da11	0.90 ± 0.14	1.40 ± 0.00	2.00 ± 0.28	Aa9	0.37 ± 0.33	0.48 ± 0.29	0.55 ± 0.22
Da12	0.90 ± 0.00	1.20 ± 0.14	1.23 ± 0.04				
Da13	0.00 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.65 ± 0.14				
Da14	0.00 ± 0.00	1.85 ± 0.07	1.85 ± 0.07				
Da15	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.21	0.95 ± 0.14				
Da17	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.21	1.10 ± 0.14				
Da18	0.00 ± 0.00	1.90 ± 0.00	1.88 ± 0.04				
Da19	0.00 ± 0.00	1.60 ± 0.00	1.73 ± 0.04				
Da20	0.00 ± 0.00	1.70 ± 0.14	1.70 ± 0.14				
Da21	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.07	0.20 ± 0.00				
Da22	0.00 ± 0.00	1.20 ± 0.35	1.20 ± 0.21				
Da23	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.14	1.05 ± 0.07				
Da24	0.00 ± 0.00	1.30 ± 0.00	1.30 ± 0.00				
Da25	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.07	0.80 ± 0.00				
Da26	0.00 ± 0.00	0.90 ± 0.00	1.30 ± 0.14				
Da28	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.20 ± 0.00				
Da29	0.00 ± 0.00	0.85 ± 0.35	1.10 ± 0.28				
Da30	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.00	1.10 ± 0.28				

Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado.

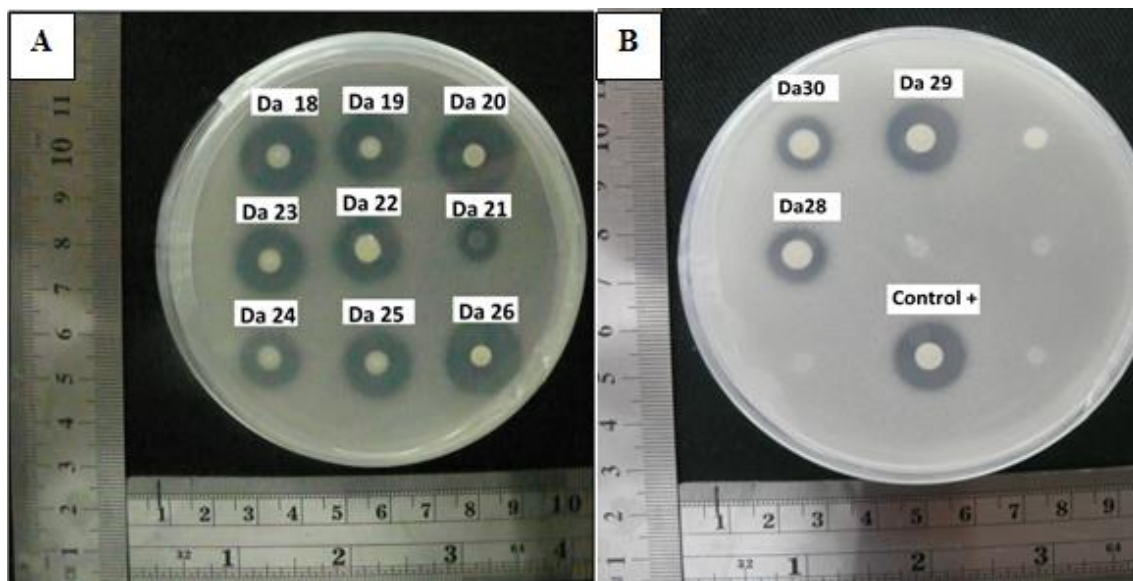


Figura 12 Solubilización cualitativa de fosfato por cepas diazótrofes a los 6 días.

A: Fosfato bicálcico. B: Fosfato tricalcico.

- **Solubilización de fosfato bicálcico**

Tal y como se puede apreciar en la tabla 7 y 8 en la prueba de solubilización de fosfato bicálcico varias cepas diazótrofes formaron halos de solubilización mayores a 1.5 cm. En ambos grupos de bacteria se observaron halos translucidos desde el inicio de su aparición. (Figura 12).

Durante el ensayo se observó que las cepas diazótrofes mostraban una capacidad más alta para solubilizar fosfatos en comparación con los actinomicetos. Esto concuerda con los reportados por Rico (2009) quien estudió la solubilización de fosfatos por parte de *Azotobacter* y actinomicetos, y concluyó que las cepas diazótrofes poseían una mayor capacidad de solubilización. Es importante resaltar que dicho autor midió la actividad fosfatasa de ambos grupos bacterianos.

Se utilizó el método estadístico del Vecino más cercano para agrupar a cepas diazótrofes de acuerdo a la dinámica de la solubilización de fosfato. Se encontraron tres grupos de comportamientos similares (Fig. 13). De acuerdo a la figura 14, los Grupos I y II tienen un incremento inicial similar de solubilización hasta el día seis, a partir del cual presentaron valores constantes. El grupo III presentó un incremento constante.

Las cepas de actinomicetos Aa2, Aa5 y Aa9 tuvieron incremento constante, por otro lado la cepa Aa7 tuvo un crecimiento rápido que en los últimos días fue ligero (Fig. 15).

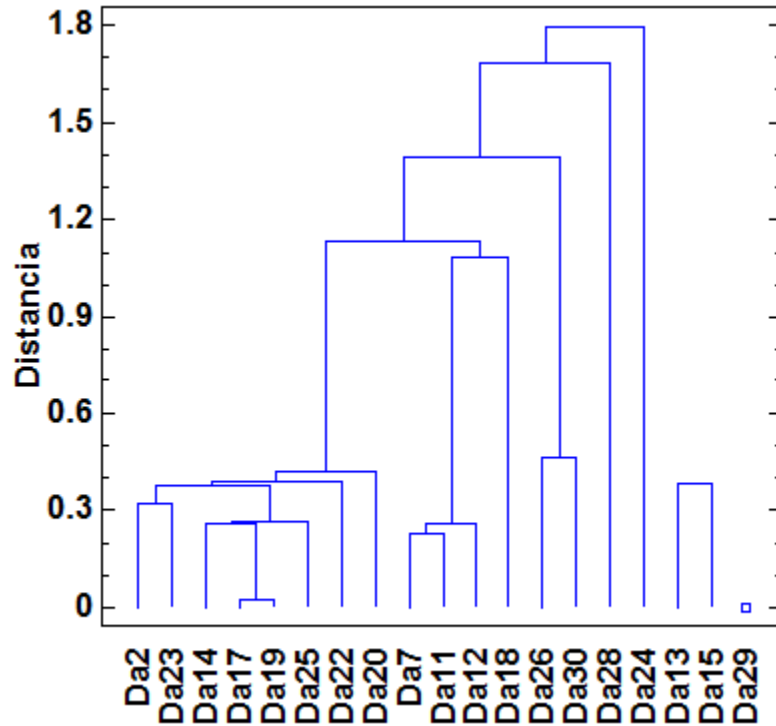


Figura 13 Agrupamiento de cepas diazótrofes por comportamientos similares para solubilizar fosfato bicalcico. De izquierda a derecha en la figura, Grupo I: Da2 – Da24; Grupo II: Da13 y Da15; Grupo III: Da29

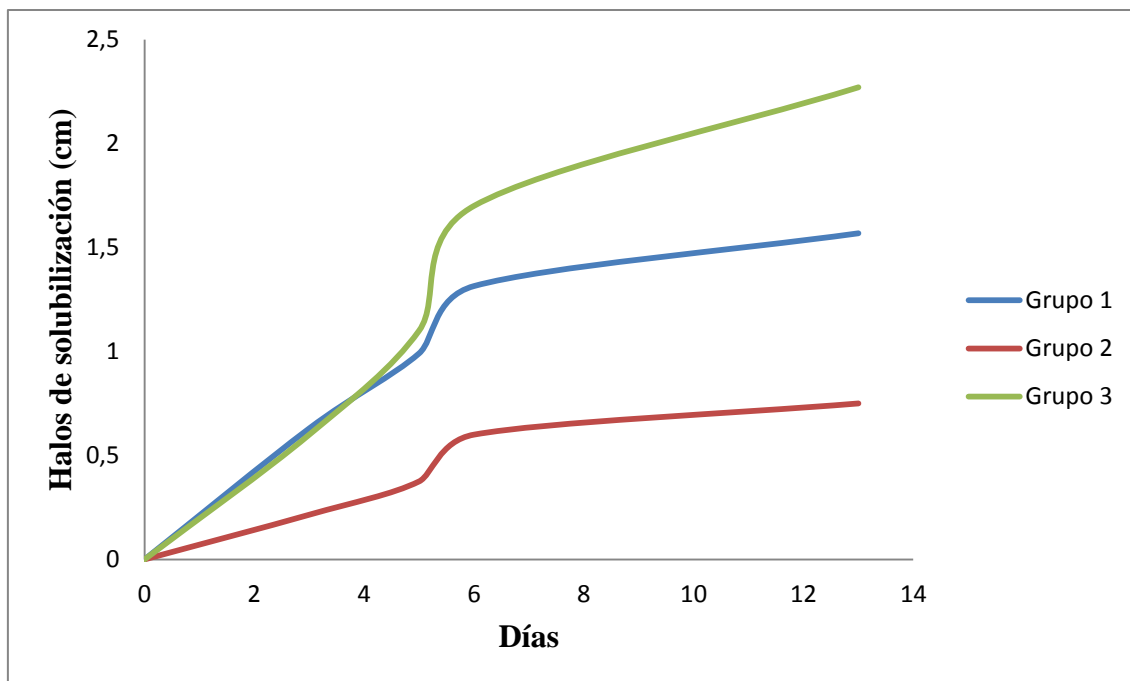


Figura 14 Solubilización de fosfato bicálcico por grupos de cepas diazótrofas

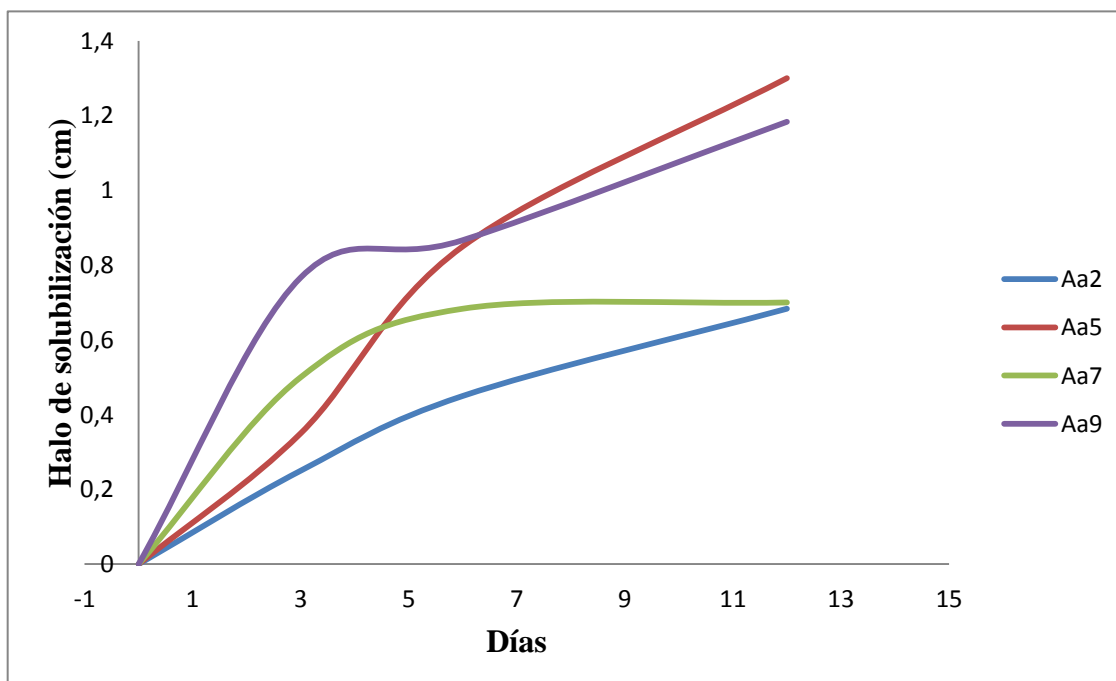


Figura 15 Solubilización de fosfato bicálcico por grupos de cepas de actinomicetos

- **Solubilización de fosfato tricálcico**

Como se puede apreciar en las tablas 8 y 9 los diazótrofos presentaron mayores valores de halos de solubilización. Cabe resaltar que las mismas cepas de actinomicetos solubilizaron fosfato bicálcico y tricálcico. En ambos grupos de bacteria se observaron halos translucidos desde el inicio de su aparición (Fig. 12).

De acuerdo al método “Vecino más cercano” se encontraron seis grupos (Fig. 16). De acuerdo a la figura 17 los grupos I, III, IV y V incrementaron la solubilización en el tercer día, mientras que el resto lo hizo a partir del quinto día. Los grupos I, III y V tuvieron una disminución de la solubilización, la misma que luego se incrementó, en el caso del grupo V fue ligero. El grupo VI tuvo una solubilización inicial alta que luego se mantuvo constante. El grupo IV tuvo un incremento constante que se volvió constante a partir del día 13. Por último el grupo II mantuvo los menores valores de manera constante.

En los actinomicetos se observó que las cepas Aa2, Aa7 y Aa9 presentaron un rápido incremento que en los últimos días incrementó ligeramente, asimismo la cepa Aa5 incrementó rápidamente la solubilización hasta el día cinco y posteriormente disminuyó (Fig. 18).

De acuerdo a lo observado algunos grupos microbianos disminuyeron su solubilización, en algunos casos este efecto se revirtió y en otros se mantuvo. Esto concuerda con lo reportado por Mikanova et al., 1997, quien reporta que algunos microorganismos exhiben represión de la actividad solubilizadora ante la presencia de fósforo soluble.

Existen diferentes mecanismos que se han descrito para la solubilización de fosfatos por microorganismos, es decir, la producción de ácidos orgánicos y la de fosfatas, los mismos que dependen del fósforo presente en el suelo, siendo esta la principal causa de los diversos comportamientos en la solubilización de fosfatos (Whitelaw, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002)

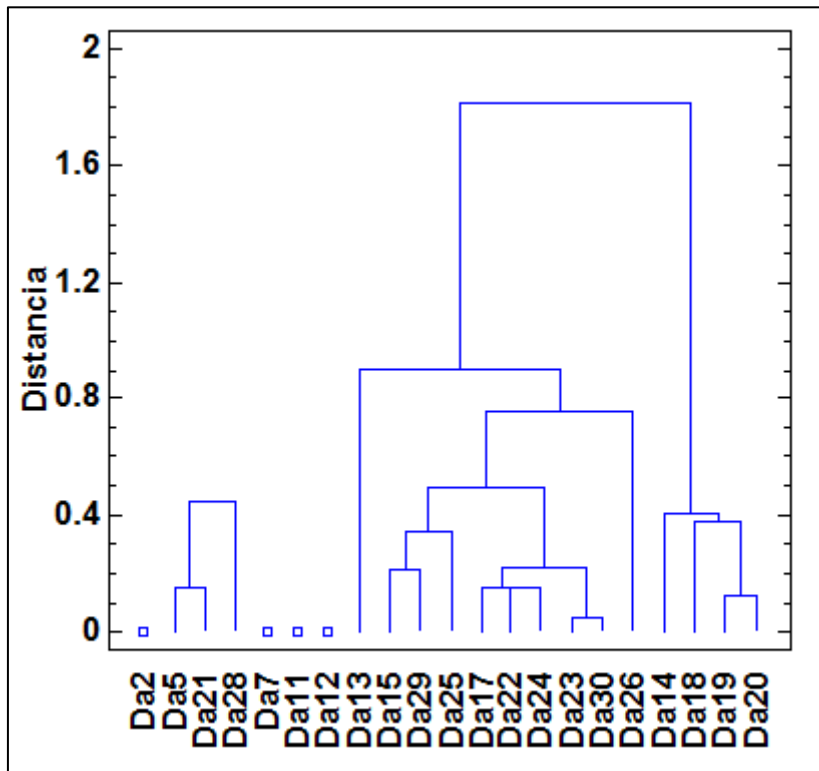


Figura 16 Agrupamiento de cepas diazótropas por comportamientos similares para solubilizar fosfato tricálcico. De izquierda a derecha en la figura, Grupo I: Da2; Grupo II: Da5-Da28; Grupo III: Da27; Grupo IV: Da11; Grupo V: Da12; Grupo VI: Da13 – Da20.

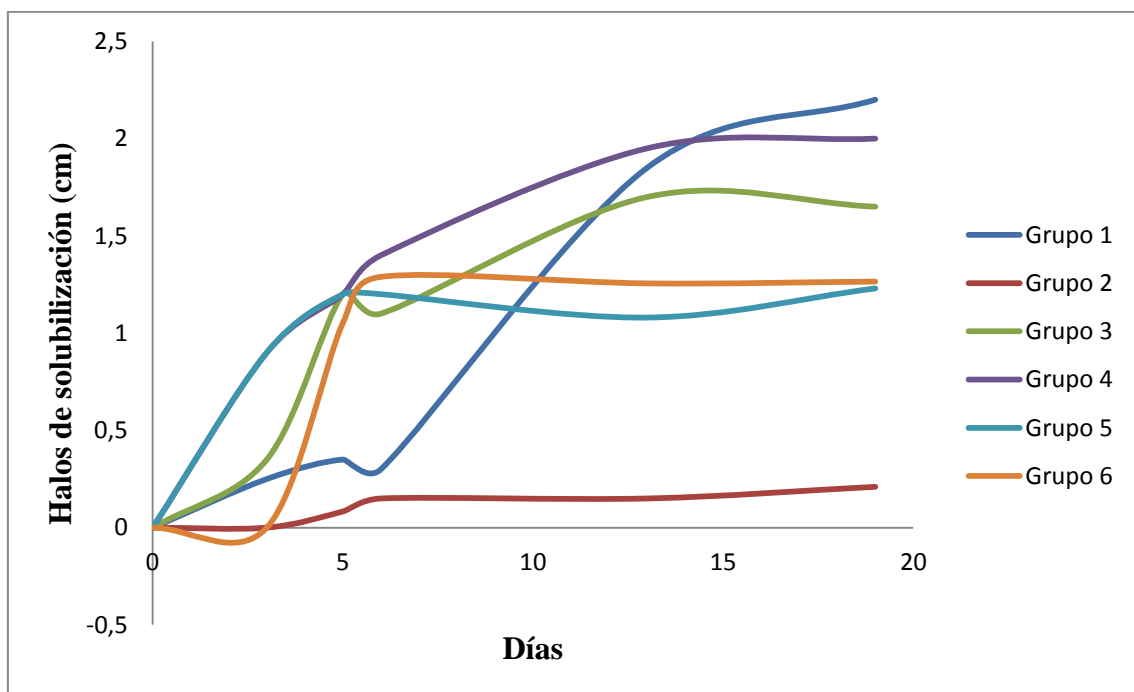


Figura 17 Solubilización de fosfato tricálcico por grupos de cepas diazótropas

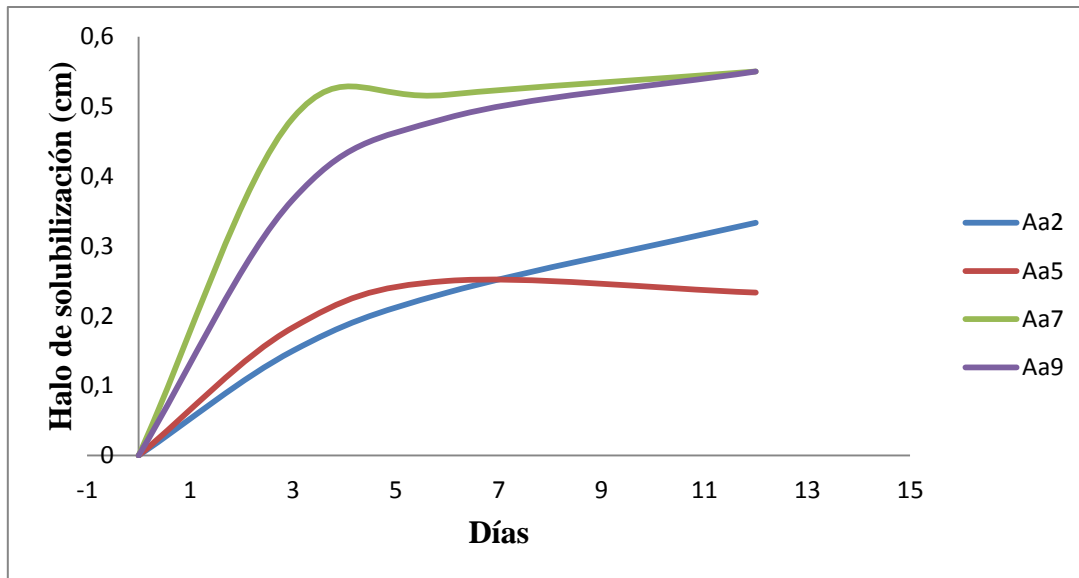


Figura 18 Solubilización de fosfato tricálcico de cepas de actinomicetos

6.5 Caracterización molecular de bacterias diazótrofas.

a. Caracterización

Esta prueba se realizó para los 30 diazótrofos aislados debido a que presentaron resultados con una dinámica variada para la producción de ácido indol acético y solubilización de fosfato. Para realizar una adecuada caracterización molecular que permitiera establecer relaciones filogenéticas entre sus respectivos grupos taxonómicos se extrajo el ADN de las cepas seleccionadas y se verificó la calidad del material genético extraído mediante electroforesis con el posterior revelado del gel de agarosa. Al obtenerse resultados positivos se prosiguió con la determinación de los perfiles BOX-PCR. De un total de 30 posibles cepas diazótrofas se obtuvieron 7 perfiles BOX diferentes (Fig. 19): A (Da3, Da6, Da1), B (Da30, Da13, Da28), C (Da26, Da22, Da17, Da12, Da20, Da14, Da25, Da18, Da19, Da11, Da24, Da5, Da7), D (Da27), E (Da 8, Da9) F (Da29) y G (Da15, Da23, Da2).

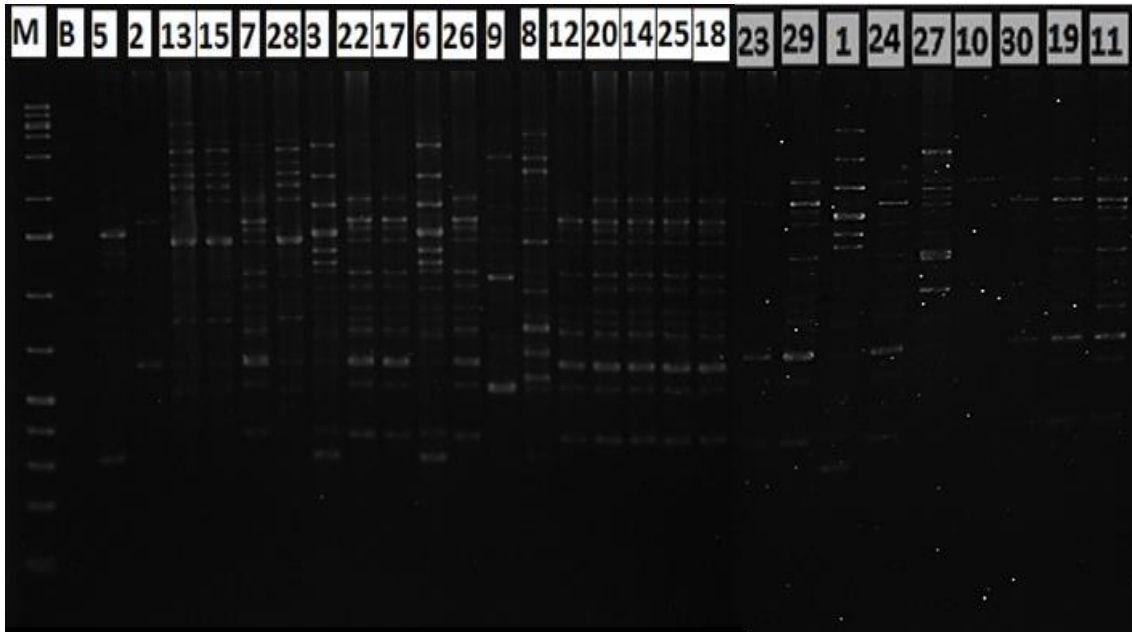


Figura 19 Geles de electroforesis de amplificación BOX-PCR, con cepas diazótrofes. M: Marcador de ADN 1Kb (Axygen), B: Blanco, Cepas diazótrofes numeradas Da 1 – 30.

b. Secuenciamiento

Las 30 cepas de diazótrofos ensayados se agruparon de acuerdo a los siete perfiles diferentes de amplificación BOX-PCR, se eligió una cepa representativa de cada perfil, las cuales fueron enviadas para su secuenciamiento del gen ribosomal 16S por Macro Gen Inc. (Seúl – Korea).

Luego del secuenciamiento realizado a las cepas diazótrofes se encontraron tres cepas relacionadas a la familia *Enterobacteriaceae*. Las cepas Da15, Da26 y Da29 presentaron un porcentaje de similitud de 99.50, 99.71, 99.71 respectivamente con *Rahnella aquatilis* (Fig. 20). Asimismo se encontró que las cepas Da8 y Da27 están relacionadas con la familia *Xanthomonadaceae*, y las cepas Da2 y Da30 con las familias *Rhizobiaceae* y *Pseudomonaceae* respectivamente.

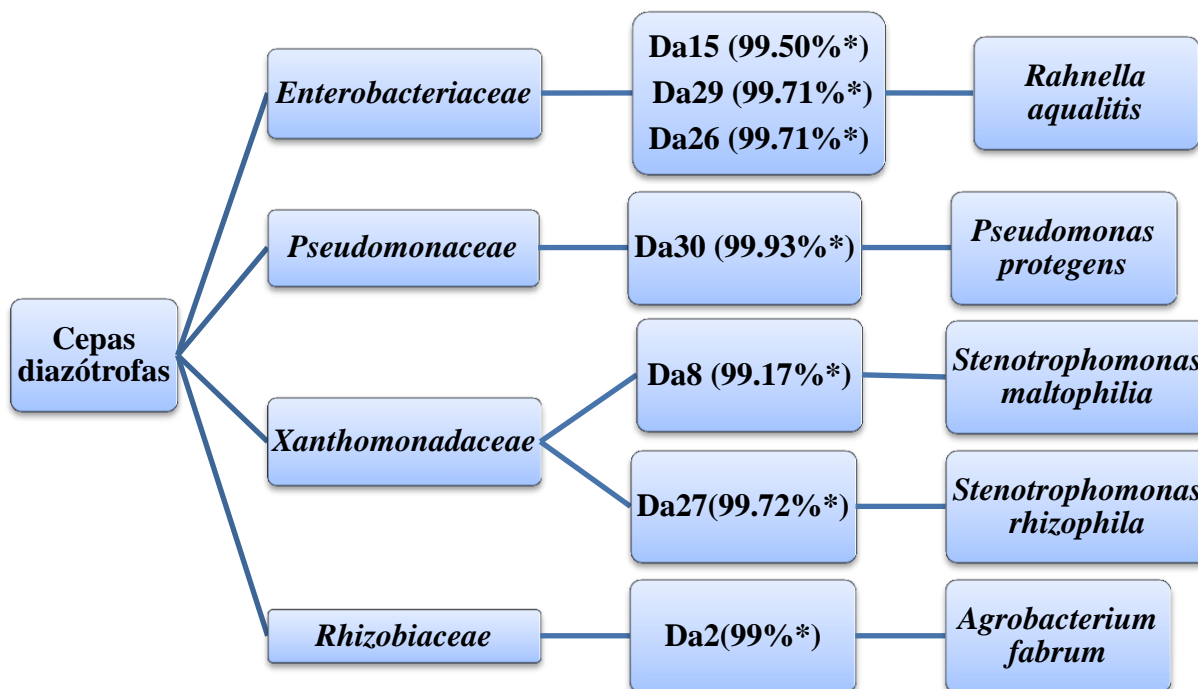


Figura 20 Secuenciamiento de cepas diazótfras. * Porcentaje de similitud.

Todas las bacterias encontradas han sido reportadas en la bibliografía como bacterias asociadas a la rizosfera de diversos cultivos de interés agronómico como ajonjolí, maíz, trigo, soya, lechuga, pimiento y arroz (Barraquío *et al.*, 2000). De acuerdo a los estudios realizados por Becerra *et al.* (2011) *Rahnella aqualitis* fue aislada de la rizosfera de *Physalis peruviana* y se demostró su capacidad de solubilización de fosfato con la finalidad de su desarrollo como bioinoculante y minimizar el uso de fertilizantes químicos. Asimismo de acuerdo a los estudios realizados por Hoda *et al.* (2005) y Chen *et al.* (2007) esta bacteria cuenta con una actividad inhibitoria del efecto contra las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos como *Xanthomonas campestris* *sv.* y *Agrobacterium fabrum*, en su inoculación desde semillas o en hojas y raíces. Cabe mencionar que en la bibliografía se reporta que *Rahnella aqualitis* presenta capacidades promotoras de crecimiento como producción de sideróforos, producción de ácido indól acético y actividad nitrogenasa (Samina *et al.*, 2010).

P. protegens está filogenéticamente relacionada con los complejos de especies de *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, y *P. syringae*. Se ha demostrado que esta bacteria produce compuestos que son activos contra diversos patógenos como el 2,4-

diacetilfloroglucinol (DAPG). (Ramette et al., 2011; Haas D. et al. 2005, Almario et al. 2013).

6.6 Ensayo en plantas a nivel de laboratorio

6.6.1 Evaluación de la inoculación en la germinación de semillas de Aguaymanto

Se seleccionaron dos cepas diazótrofes (Da29, Da30) y dos actinomicetos (Aa5 y Aa7) de acuerdo a los valores obtenidos en la producción de ácido indol acético y a la dinámica solubilización de fosfatos. La germinación se dio al quinto día de la instalación del ensayo. De las cepas analizadas la cepa Aa7 aumentó significativamente la germinación con respecto al control sin inocular en el día seis del ensayo, mostrando siempre una tendencia mayor al resto de los tratamientos, junto con la cepa Da29 (Fig. 21). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Galindo (2005) y Barreto et al. (2007) los cuales han reportado la actividad de estos grupos bacterianos como promotores de crecimiento vegetal y su efecto positivo en las etapas iniciales de la germinación de semillas de interés agrícola.

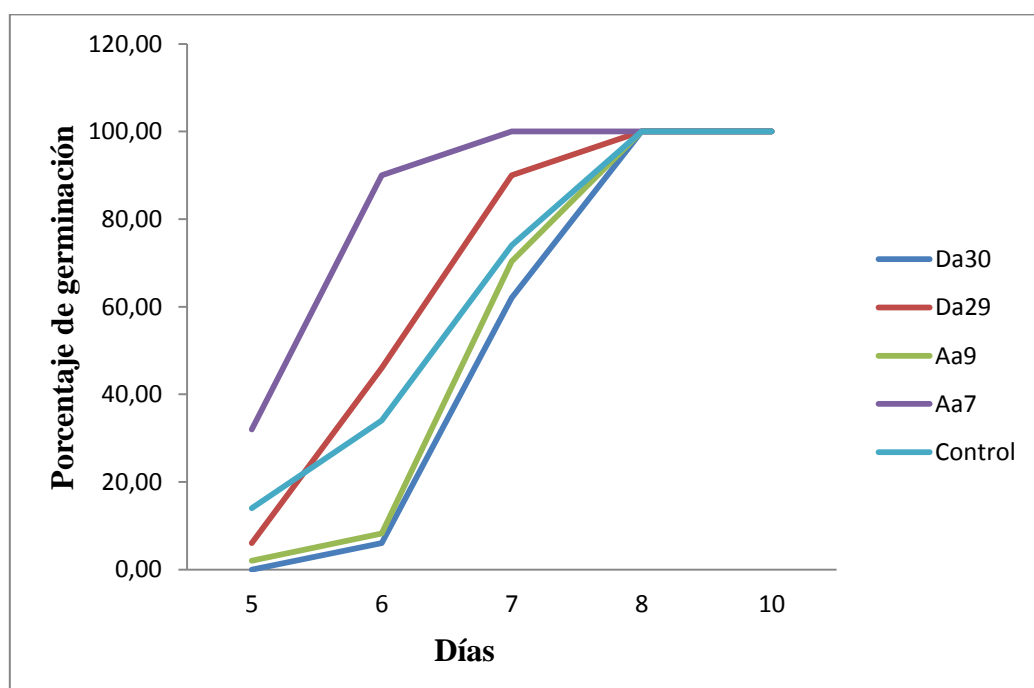


Figura 21 Germinación de Aguaymanto por efecto de cepas PGPR

Por otro lado se encontró que las cepas Da30 y Aa9 disminuyeron significativamente la germinación con respecto al control sin inocular en los días 5 y 6 de medición. Esto se

puede explicar de acuerdo al trabajo realizado por Carrillo-Castañeda et al. (2000), en el cual cepas con altos valores de producción de reguladores de crecimiento no tuvieron buenos resultados en el crecimiento vegetal. Es importante resaltar que altas concentraciones de metabolitos producidos por la bacteria no necesariamente aseguran una mejora en el crecimiento vegetal, ya que esto también depende del cultivo.

Durante el ensayo se evaluó la cantidad de semillas germinadas con presencia de pubescencia en la radícula. Es así como se evidenció pubescencia a un día del inicio de la germinación. La cepa Aa7 aumentó significativamente el número de semillas germinadas con presencia de pubescencia (Fig. 22). Al finalizar el ensayo se observaron las semillas pubescentes al estereoscopio observándose que las semillas inoculadas con la cepa Da29 presentaron cualitativamente mayor presencia de pelos pubescentes (presencia de pubescencia) en la radícula (Fig. 23). Diversos autores reportan que uno de los mecanismos de estimulación provocados por bacterias promotoras de crecimiento vegetal es a través de los reguladores de crecimiento, los cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, tal como se evidencia en los resultados del presente trabajo (Kloepper *et al.*, 1994; Barea et al., 2004)

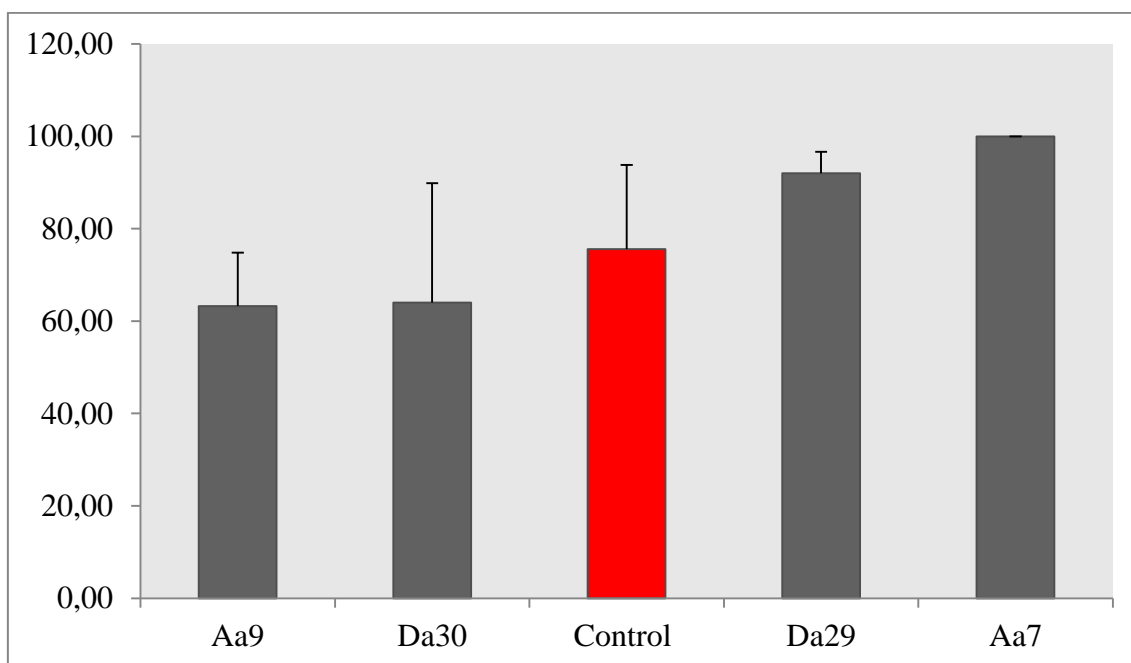


Figura 22 Porcentaje de semillas de aguaymanto germinadas con presencia de pubescencia

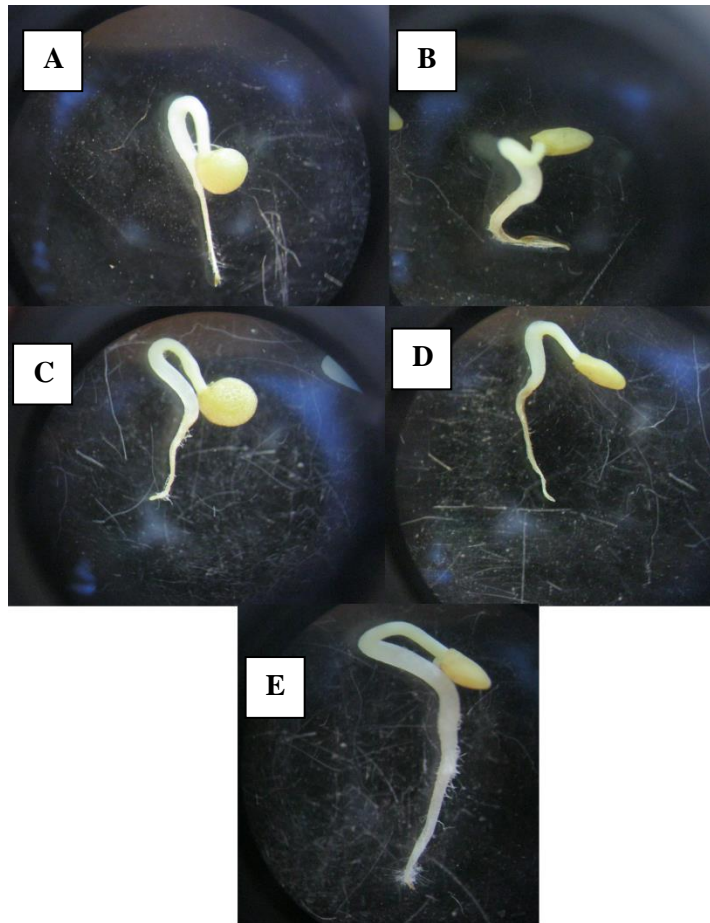


Figura 23 Semillas pubescentes a los 5 días de germinación por efecto efectos de cepas PGPR. A: Control; B: Aa7; C: Aa9; D: Da30; E: Da29

6.6.2 Evaluación de la inoculación en la emergencia y crecimiento de plantas de Aguaymanto

La emergencia se dio a los 13 días de instalado el ensayo. Todas las cepas inoculadas promovieron un incremento de la emergencia con respecto al control sin inocular, siendo las cepas Da29, Aa7 y Aa9 las que presentaron un efecto significativo (Fig. 24).

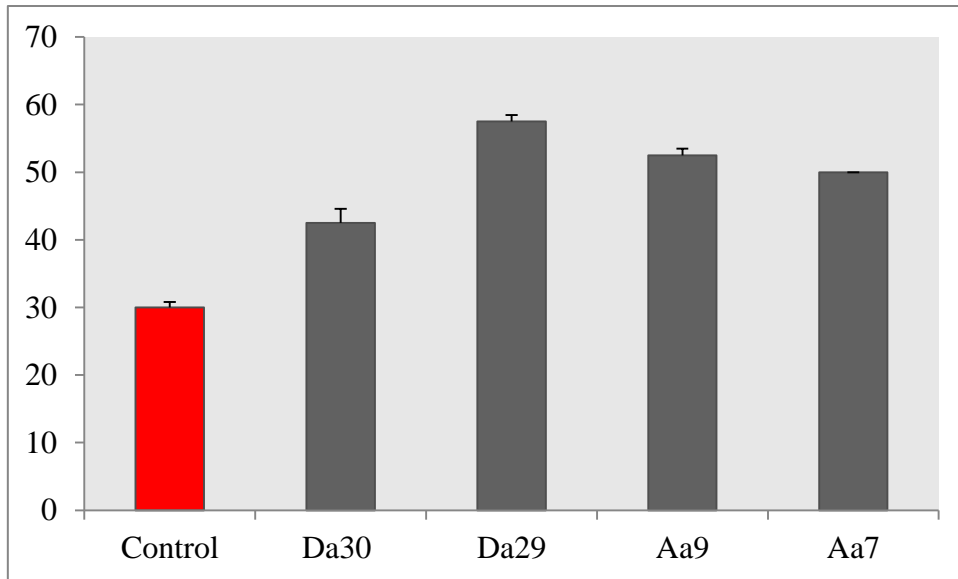


Figura 24 Emergencia de las plántulas de aguaymanto por efecto de cepas PGP

Durante el crecimiento de las plántulas de aguaymanto se pudo evidenciar que la cepa Da29 incrementó significativamente el peso fresco de la raíces en un 141% (Fig. 25). Asimismo se evaluaron otros parámetros como: Altura y peso fresco aéreo en donde no se encontraron resultados significativos, sin embargo las cepas inoculadas mostraron una tendencia incrementar estos parámetros con respecto al control sin inocular (Fig. 26; Tabla 11).

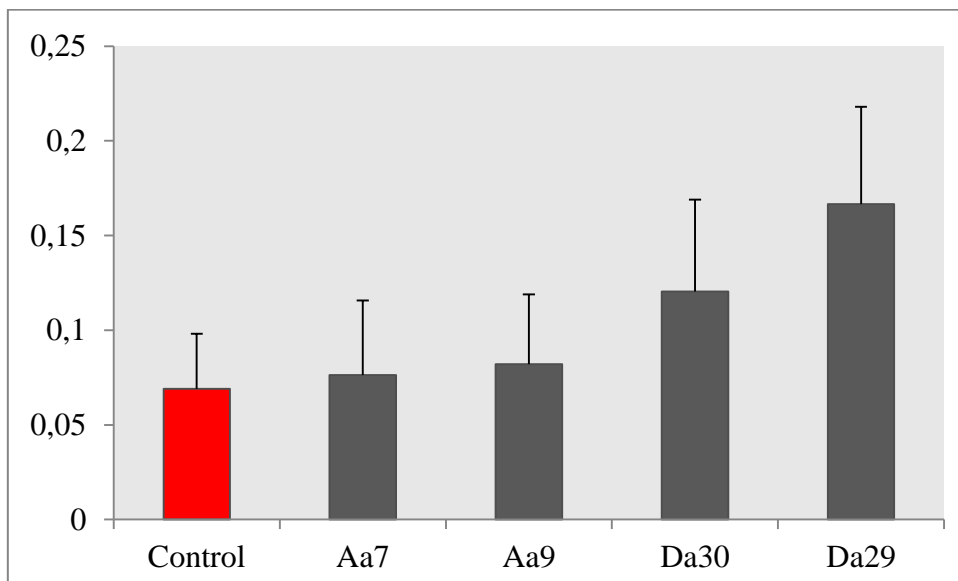


Figura 25 Peso fresco de la raíz de plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR

Tabla 11 Peso fresco aéreo y altura de plantas de aguaymanto inoculadas con cepas PGPR

Cepa	PFA	Altura
Da29	0.20 ± 0.03	7.44 ± 1.48
Da30	0.24 ± 0.21	6.56 ± 0.82
Aa7	0.22 ± 0.21	6.56 ± 0.63
Aa9	0.22 ± 0.18	8.25 ± 0.63
Control	0.04 ± 0.02	6.13 ± 0.96

Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado.

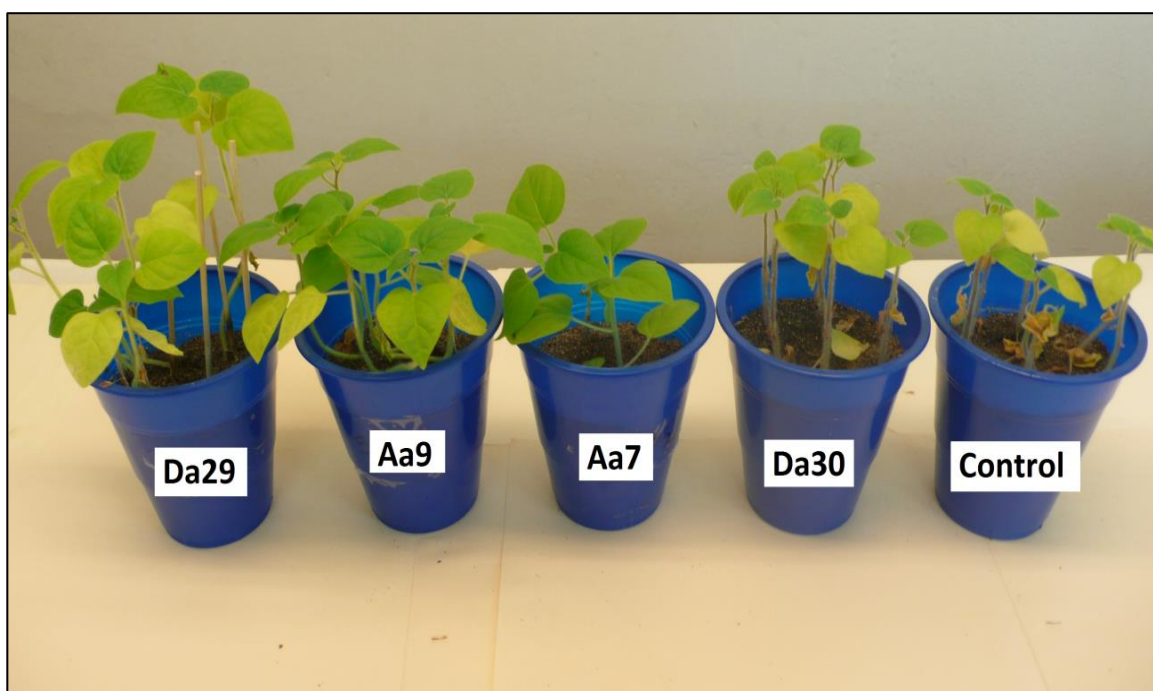


Figura 26 Plantas de aguaymanto inoculadas con cepas PGPR

6.7 Ensayo de interacción de bacterias PGPR con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)

6.7.1 Cuantificación del porcentaje de colonización de HMA en raíces teñidas de aguaymanto del campo de muestreo

Se evaluaron las raíces teñidas de aguaymanto y se les cuantificó el porcentaje de colonización de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA). Se utilizó el método de campos colonizados, tomándose como campo positivo en el que se reconocieran las estructuras típicas de HMA, como son: hifas, vesículas, arbusculos (Fig. 27).

Se observa que el tratamiento inoculado con la cepa Act7 mostró valores significativamente menores a aquellos del tratamiento control (Anexo). Esto coincide con lo reportado por Tarka y Frey-Klett (2008), quienes evaluaron que algunas asociaciones de bacterias PGPR con hongos formadores de micorrizas arbusculares pueden ser negativas para lograr una micorrización efectiva, lo cual podría deberse a una especificidad del hongo por los microorganismos con los que interactúa.

Por otro lado se encontró que el resto de tratamientos mostraron valores similares entre 66.7 – 77.7 % de porcentaje de colonización de HMA (Tabla 12). Reportes de porcentajes de colonización de hongos micorrícios en cultivos de la familia Solanaceae como el ají y el tomate se encontraron valores entre 36.6 - 41.9% y 40 – 50%, respectivamente. La diferencia de estos valores con los obtenidos en este trabajo puede ser debido al tipo de suelo, ya que la fertilización como la cantidad de fósforo presente en el suelo debe ser balanceada, de lo contrario tendría un efecto inverso en la micorrización (Hao y Lin, 1987; Furlan y Bernier-Cardou, 1988; Gryndler *et al.*, 1990).

Tabla 12 Porcentaje de Infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR

Tratamiento	Infección HMA (%)
Control	66.67 ± 0.98 ^b
Azo16M2	77.78 ± 0.96 ^b
ACT7	33.33 ± 0.27 ^a
Ps42	66.67 ± 0.55 ^b
Bac3M2	66.67 ± 0.63 ^b

Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de LSD (P=0.05).

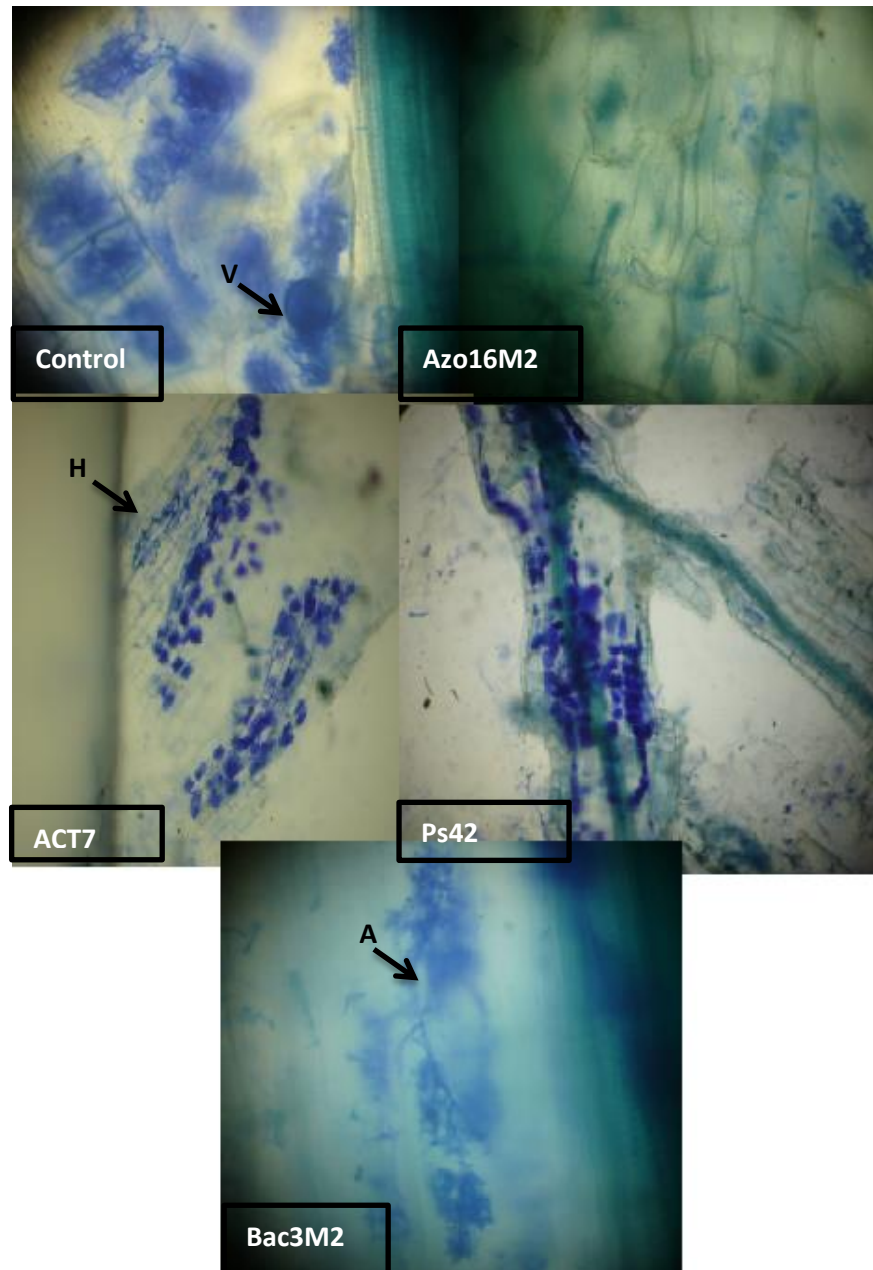


Figura 27 Raíces teñidas de Aguaymanto del campo “El chiquero” inoculado con cepas PGPR H: Hifas; A: Arbúsculos; V: Vesículas.

6.7.2 Evaluación de la interacción de bacterias PGPR con HMA en el crecimiento de aguaymanto a nivel de laboratorio

De acuerdo a lo indicado en la metodología se utilizó como planta trampa a *Trifolium pratense* para la producción del inóculo, ya que ésta es una especie de rápido crecimiento a nivel de laboratorio (Zuñiga, 2011) es ampliamente utilizada como planta hospedadora de hongos formadores de micorrizas arbusculares (Oehl et al., 2004; Rojas

2009). Se verificó la infección de hongos micorrícicos en las plantas trampa, mediante el método de campos de colonización propuesto por Sieverding, 1983, obteniendo un valor de 75%.

Se utilizó un inóculo de 25 esporas/ gramo de suelo en plántulas de aguaymanto de aproximadamente tres semanas de crecimiento. Luego de dos semanas se evaluó el efecto de su inoculación, previo a su trasplante a macetas en invernadero y su co-inoculación con las cepas PGPR seleccionadas. De acuerdo a la tabla 13 se observó un incremento significativamente positivo en la altura de las plántulas inoculadas con HMA con respecto al control sin inocular.

Tabla 13 Efecto de la inoculación con HMA a los 15 días en condiciones de laboratorio

Tratamiento	Altura
Control	4.24 ± 0.48 ^a
HMA	4.62 ± 0.50 ^b

Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de LSD (P=0.05). Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado

6.7.3 Evaluación de la interacción de bacterias PGPR con HMA en el crecimiento de aguaymanto a nivel de invernadero

Se seleccionaron las cepas Da29, Aa7 y Aa9 por el efecto obtenido en la germinación y crecimiento de plántulas de aguaymanto a nivel de laboratorio.

a. Evaluación en la prefloración

En esta etapa se realizó un deshiado de las plántulas en cada una de las macetas (Fig. 28). Se midieron la altura, peso fresco y peso seco. No se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, cabe resaltar que se pudieron observar ciertas tendencias en el comportamiento de las cepas PGPR en su inoculación con HMA. Es así como la inoculación de la cepa Da29 con HMA incrementó la altura, peso fresco y seco aéreo con respecto a la inoculación sin interacción y el tratamiento con HMA y el control sin inocular. Por otro lado las cepas Aa7 y Aa9 inoculadas en interacción con HMA incrementaron algunos de los parámetros mencionados. Cabe resaltar que todas las cepas inoculadas independientemente mostraron valores mayores de altura, pesos fresco y seco aéreo que el control sin inocular (Tabla 14).

Tabla 14 Altura, Peso fresco aéreo y Peso seco aéreo en plantas de Aguaymanto en Prefloración

Tratamientos	Altura	PFA	PSA
Control	19.79 ± 0.97	2.26 ± 1.79	0.25 ± 0.12
Da29	26.31 ± 1.71	3.99 ± 1.80	0.38 ± 0.11
Da29 – M	28.31 ± 2.57	4.69 ± 0.95	0.49 ± 0.13
Aa9	23.19 ± 1.68	3.00 ± 0.90	0.30 ± 0.17
Aa9 – M	22.95 ± 1.12	3.30 ± 0.53	0.31 ± 0.10
Aa7	21.75 ± 1.24	4.41 ± 0.87	0.57 ± 0.13
Aa7 – M	23.33 ± 1.81	4.21 ± 0.81	0.47 ± 0.11
M	23.76 ± 2.19	4.50 ± 1.32	0.59 ± 0.25

M: Inoculación con HMA. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. PSA: Peso seco aéreo, PFA: Peso seco aéreo

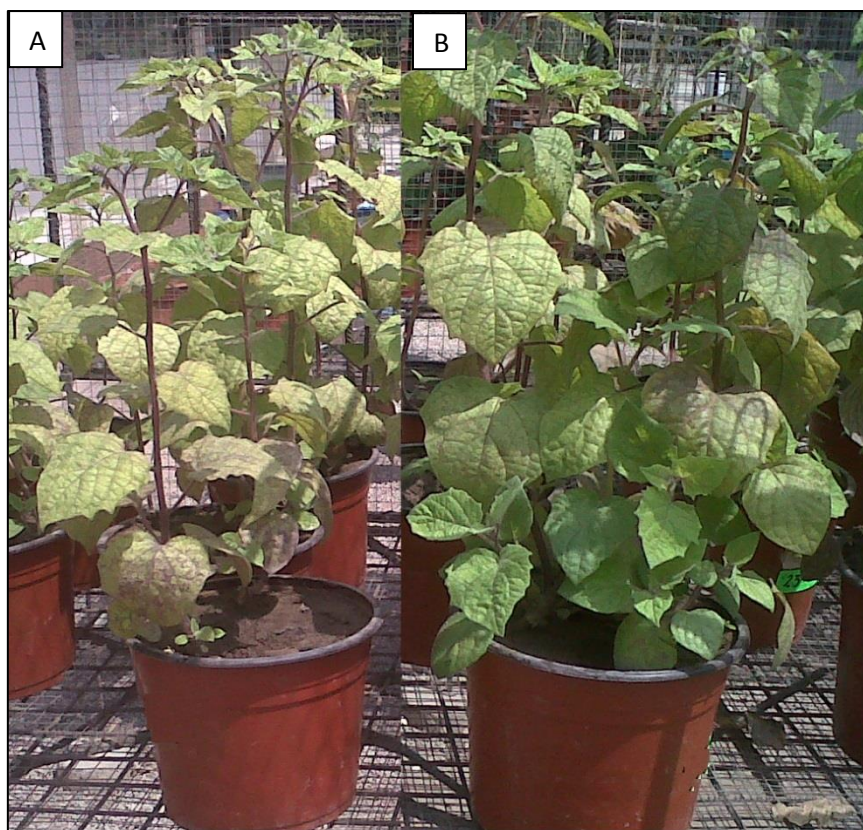


Figura 28 Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR en interacción con Hongos formadores de micorrizas en etapa de Prefloración. A: Da29; B: Da29-M

Se realizó un análisis de nutrientes de nitrógeno, fósforo y potasio en cada uno de los tratamientos evaluados. De acuerdo a los datos reportados en la tabla 15, las interacciones Aa9-M y Aa7-M incrementaron significativamente la cantidad de nitrógeno en un 14.9% y 19.4% respectivamente con respecto al control inoculado con HMA.

En cuanto al fósforo todos los tratamientos mostraron incrementos con respecto al control sin inocular, resaltando la cepa Aa7 que en interacción con HMA incrementó significativamente la concentración de este nutriente en un aproximadamente 20% con respecto al control sin inocular, al tratamiento con HMA y a la misma cepa sin interacción, por otro lado las cepas Da29 y Aa9 incrementaron significativamente este nutriente con respecto a los tratamientos de estas cepas en interacción con HMA.

El potasio presentó valores significativamente mayores en el tratamiento de la cepa Da29 sin interacción y el control sin inocular con respecto al resto de tratamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar que en el fósforo se obtuvo un mayor incremento en la concentración en las plantas de aguaymanto por efecto de los tratamientos de las cepas PGPR utilizadas con HMA; tal como ha sido reportado por Ordoñez (2009), en el que se utilizó como bacteria PGPR a *Pseudomonas fluorescens*. Lo anteriormente mencionado se explica debido a que en las raíces de plantas micorrizadas se incrementa la toma de fósforo, asimismo este nutriente se encuentra más disponible por efecto de las bacterias PGPR, siendo así este uno de los efectos en los que se evidencia el sinergismo por efecto de la interacción (Franco, 2008).

Tabla 15 Plantas de Aguaymanto inoculadas con cepas PGPR en interacción con Hongos formadores de micorrizas en etapa de Prefloración.

Tratamientos	N %	P %	K %	Fe (ppm)
Control	2.00 ± 0.10 ^{bcd}	0.20 ± 0.00 ^a	4.58 ± 0.32 ^c	322 ± 12.73 ^a
Da29	2.16 ± 0.08 ^d	0.24 ± 0.00 ^{de}	4.20 ± 0.14 ^{bc}	461 ± 5.66 ^b
Da29 - M	1.83 ± 0.10 ^{ab}	0.22 ± 0.00 ^{bc}	3.75 ± 0.14 ^a	532 ± 53.74 ^c
Aa9	1.88 ± 0.00 ^{bc}	0.27 ± 0.01 ^f	3.88 ± 0.18 ^a	717 ± 28.28 ^d
Aa9 - M	1.95 ± 0.06 ^{bc}	0.24 ± 0.01 ^{cd}	3.85 ± 0.14 ^{ab}	393 ± 6.36 ^b
Aa7	2.03 ± 0.10 ^{cd}	0.21 ± 0.01 ^{ab}	3.70 ± 0.21 ^a	310 ± 9.90 ^a
Aa7 - M	2.17 ± 0.10 ^d	0.26 ± 0.02 ^{ef}	3.80 ± 0.14 ^{ab}	405 ± 55.86 ^b
M	1.70 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.00 ^{ab}	3.70 ± 0.07 ^a	750 ± 11.31 ^d

Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de LSD (P=0.05). M: Inoculación con HMA. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por duplicado

b. Evaluación a los 6 meses (Cosecha)

La cosecha se realizó a los seis meses de instalado el ensayo, en esta etapa se realizó la medición de la altura, número de botones florales, número de flores, peso fresco y seco aéreo (Fig. 29). De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 16, las cepas Da29 y Aa9 inoculadas en interacción con HMA incrementaron los parámetros de altura, botones florales, flores, peso fresco y seco aéreo en comparación a sus respectivos tratamientos sin interacción. Por otro lado la cepa Aa7 presentó un efecto inverso, ya que al ser inoculada de manera independiente presentó valores mayores a los de la interacción con HMA. Cabe resaltar que todos los tratamientos evaluados presentaron un efecto positivo sobre los parámetros evaluados con respecto el control sin inocular.

Tabla 16 Altura, Número de botones florales y flores de aguaymanto a los seis meses de ensayo.

Tratamientos	Altura (cm)	N° Botones Florales	N° Flores	PFA	PSA
Control	43.70 ± 4.65	2 ± 0.96	1 ± 0.82	13.92 ± 6.56	2.13 ± 1.26
Da29	44.53 ± 4.88	3 ± 0.00	2 ± 0.00	16.34 ± 3.27	2.35 ± 0.32
Da29 - M	52.38 ± 2.63	4 ± 1.38	4 ± 1.00	18.91 ± 3.08	3.07 ± 0.62
Aa9	50.73 ± 4.56	3 ± 1.96	2 ± 0.58	19.76 ± 2.58	2.78 ± 0.30
Aa9 - M	45.80 ± 2.76	2 ± 1.38	4 ± 1.73	22.62 ± 4.41	3.85 ± 0.45
Aa7	50.98 ± 4.56	10 ± 1.63	3 ± 0.82	26.82 ± 2.63	3.60 ± 0.58
Aa7 - M	48.63 ± 4.45	5 ± 1.29	2 ± 0.82	19.02 ± 2.31	2.83 ± 0.44
M	47.70 ± 4.55	9 ± 1.77	2 ± 0.73	24.35 ± 2.80	3.37 ± 0.31

M: Inoculación con HMA. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. PFA: Peso fresco aéreo. PSA: Peso seco aéreo

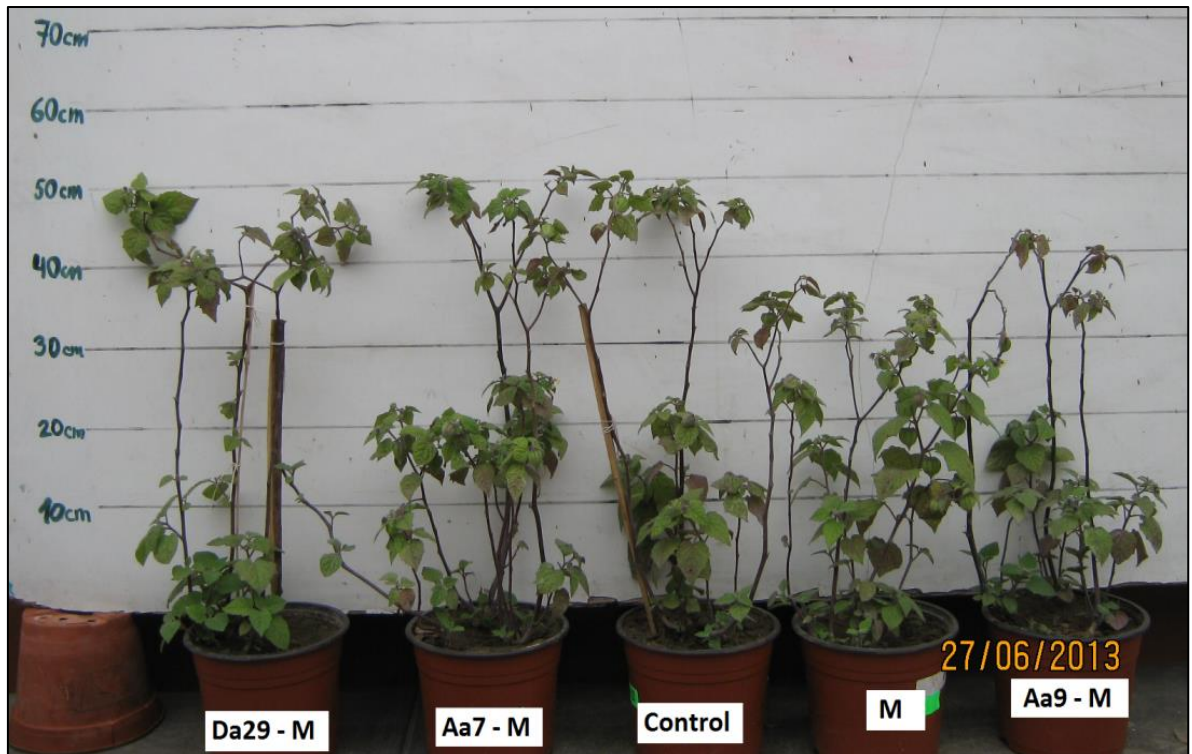


Figura 29 Efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto en invernadero a los seis meses del ensayo.

Finalmente se realizó la evaluación del peso fresco radicular y peso seco radicular, encontrándose que la cepa Aa7 incrementó significativamente este parámetro con respecto al tratamiento en interacción y a los controles con HMA y sin inocular. Por otro lado las cepas Da29 y Aa9 presentaron un incremento significativo con respecto al control sin inocular y valores similares en los tratamientos con interacción (Tabla 17). De estos resultados podemos inferir que el efecto en los parámetros aéreos es coherente con el reflejado en el desarrollo radicular.

Tabla 17 Peso fresco radicular y peso seco radicular por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto

Tratamientos	PFR	PSR
Control	4.37 ± 0.26 ^a	0.89 ± 0.64 ^a
Da29	9.93 ± 0.27 ^b	1.43 ± 0.26 ^{abc}
Da29 - M	8.38 ± 0.28 ^{ab}	1.38 ± 1.02 ^{abc}
Aa9	10.55 ± 0.24 ^b	1.60 ± 0.31 ^{bc}
Aa9 - M	10.70 ± 0.40 ^b	1.51 ± 1.29 ^{bc}
Aa7	16.24 ± 0.68 ^c	1.97 ± 0.67 ^c
Aa7 - M	9.50 ± 0.26 ^b	1.35 ± 0.33 ^{ab}
M	10.86 ± 0.61 ^b	1.50 ± 0.38 ^{bc}

Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de LSD (P=0.05). M: Inoculación con HMA. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado

c. Infección de Hongos formadores de micorrizas (HMA)

Al finalizar el ensayo se evaluó el porcentaje de infección y cantidad de esporas producidas por efecto de los tratamientos evaluados. Como se observa en la tabla 1, se encontró que los tratamientos inoculados con las cepas Aa7 y Aa9 en interacción con figura 30, HMA presentaron un incremento significativo del porcentaje de infección con respecto al control sin inocular, asimismo la cepa Da29 en interacción con HMA incrementó significativamente en un 500% el porcentaje de infección con respecto al tratamiento sin interacción. Por otro lado no se encontraron resultados significativos para la cantidad de esporas entre los distintos tratamientos, sin embargo todos presentaron valores superiores al control sin inocular. Los valores por los tratamientos en interacción obtenidos fueron mayores a los encontrados en campo (punto 6.7.1).

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Azcon-Aguilar y Barea (1997) quienes describieron que uno de los factores que afecta el establecimiento de los hongos micorrícicos es su interacción con otros microorganismos. De esta manera se explica el incremento de la colonización de los hongos micorrícicos en los tratamientos en interacción con respecto a los tratamientos solo con cepas PGPR.

Tabla 18 Porcentaje de Infección y Cantidad de esporas por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA en plantas de aguaymanto

Código	% Infección	Nº Esporas Total/ g
Control	30 ± 0.58 ^a	11.15 ± 1.03
Da29	30 ± 0.58 ^a	16.05 ± 2.74
Da29 - M	60 ± 0.82 ^{abc}	15.70 ± 2.58
Aa9	45 ± 0.58 ^{ab}	14.45 ± 2.38
Aa9 - M	80 ± 0.58 ^{bc}	16.63 ± 2.79
Aa7	55 ± 1.41 ^{abc}	14.03 ± 2.41
Aa7 - M	85 ± 2.22 ^c	16.88 ± 2.61
M	85 ± 1.63 ^c	14.18 ± 2.38

Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de LSD (P=0.05). M: Inoculación con HM. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado.

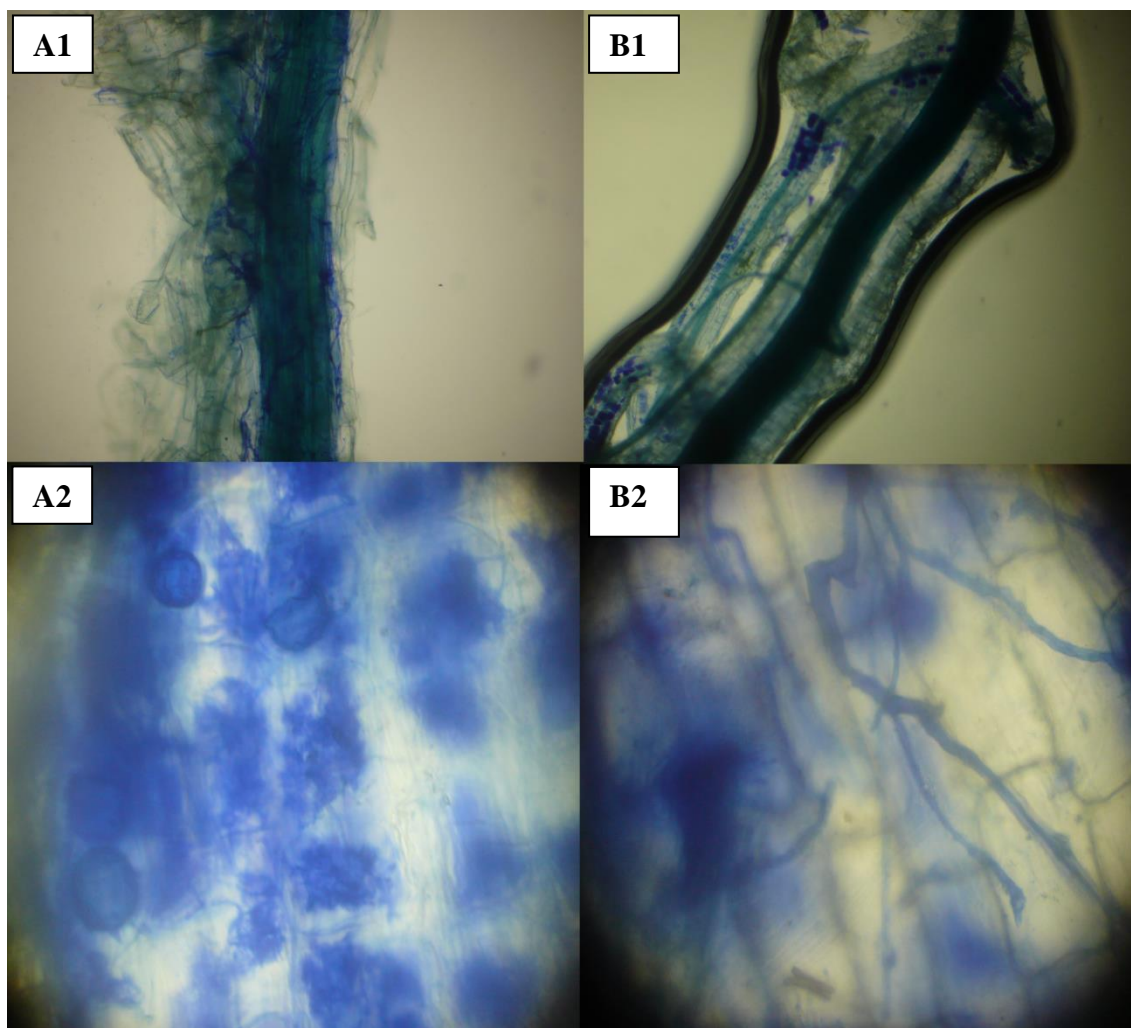


Figura 30 Formación de hifas y arbusculos en la infección de HMA en los tratamientos en interacción con Da29 (A) y Aa7 (B). A1 y B1 a 40 X; A2 y B2 a 100

d. Evaluación de la producción de frutos por influencia de la interacción de cepas PGPR con HMA

Se evaluó el número de frutos obtenidos por efecto de los tratamientos evaluados. Los frutos se observaron a partir del tercer mes del ensayo, reportándose en el tratamiento con HMA. De acuerdo a la producción de frutos se pudo encontrar que todos los tratamientos evaluados presentaron valores superiores al control sin inocular. La cepa Aa9 presentó un incremento significativo de 110% con respecto a su tratamiento en interacción con HMA. Por otro lado la inoculación de la cepa Aa7 en interacción con HMA presentó valores menores que el tratamiento sin interacción (Fig. 31).

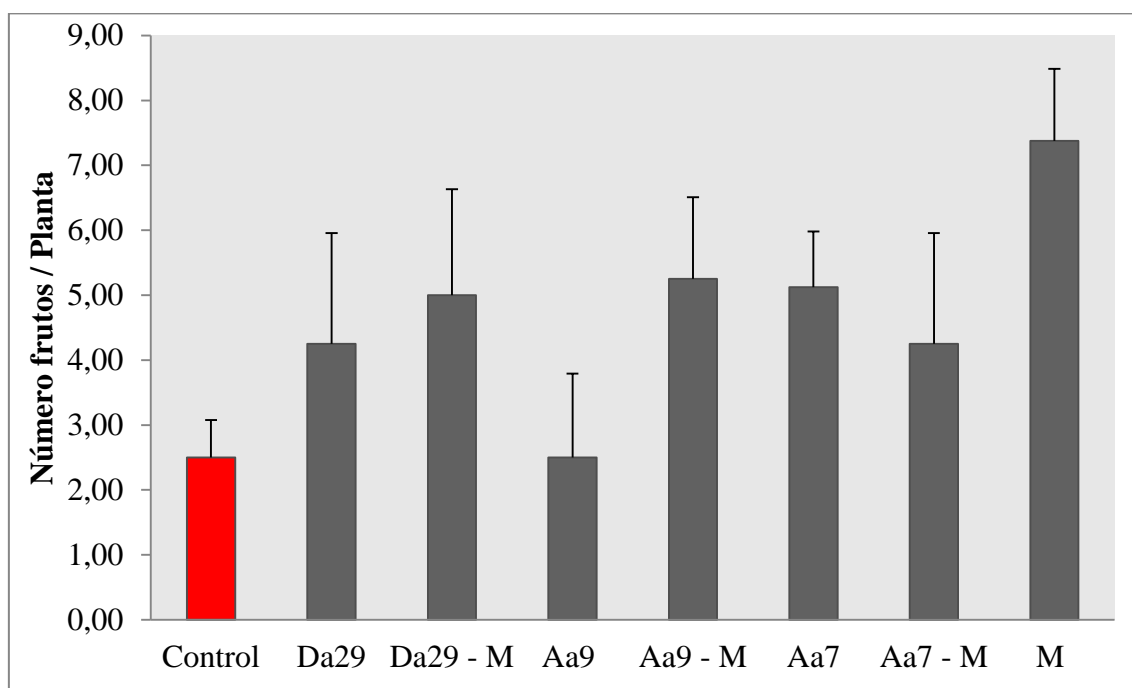


Figura 31 Número de frutos por efecto de la interacción de cepas PGPR con HMA

Asimismo se midió el diámetro y peso de los frutos obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados. Se pudo encontrar que todas las cepas evaluadas presentaron un incremento con respecto a los tratamientos en interacción y a los controles sin inocular y con HMA. Es así como se resalta el efecto de la cepa Da29 en interacción con HMA que presentó un incremento significativo de 86% y 39% para el peso y diámetro respectivamente con respecto al tratamiento sin interacción (Tabla 19, Fig. 32).

Por ultimo cabe mencionar que la cepa en interacción Da29 incrementó significativamente en un 640% el peso total fruto/ planta con respecto al control sin inocular. Esta misma tendencia se dio con respecto al tratamiento sin interacción y al tratamiento solo con HMA. De estos resultados se puede inferir la tendencia de que hay una interacción positiva de las bacterias PGPR empleadas con hongos formadores de micorrizas en aguaymanto.

Tabla 19 Peso y Diámetro de los frutos producidos por efecto de interacción de cepas PGPR con HMA

	Peso (g.) / Planta	Peso (g.) / Fruto	Diámetro (cm)
Control	0.65 ± 0.22 ^a	0.30 ± 0.07 ^a	0.55 ± 0.07 ^a
Da29	2.69 ± 0.96 ^{ab}	0.33 ± 0.10 ^a	0.60 ± 0.08 ^{ab}
Da29 - M	4.83 ± 0.70 ^{bc}	0.61 ± 0.16 ^b	0.76 ± 0.11 ^c
Aa9	5.16 ± 0.88 ^c	0.54 ± 0.08 ^b	0.78 ± 0.05 ^c
Aa9 -M	2.72 ± 0.24 ^{ab}	0.60 ± 0.11 ^b	0.76 ± 0.11 ^c
Aa7	5.09 ± 0.33 ^c	0.44 ± 0.07 ^{ab}	0.68 ± 0.05 ^{abc}
Aa7 - M	3.83 ± 0.47 ^{bc}	0.59 ± 0.05 ^b	0.78 ± 0.05 ^c
M	3.81 ± 0.50 ^{bc}	0.44 ± 0.23 ^{ab}	0.70 ± 0.14 ^{bc}

Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado

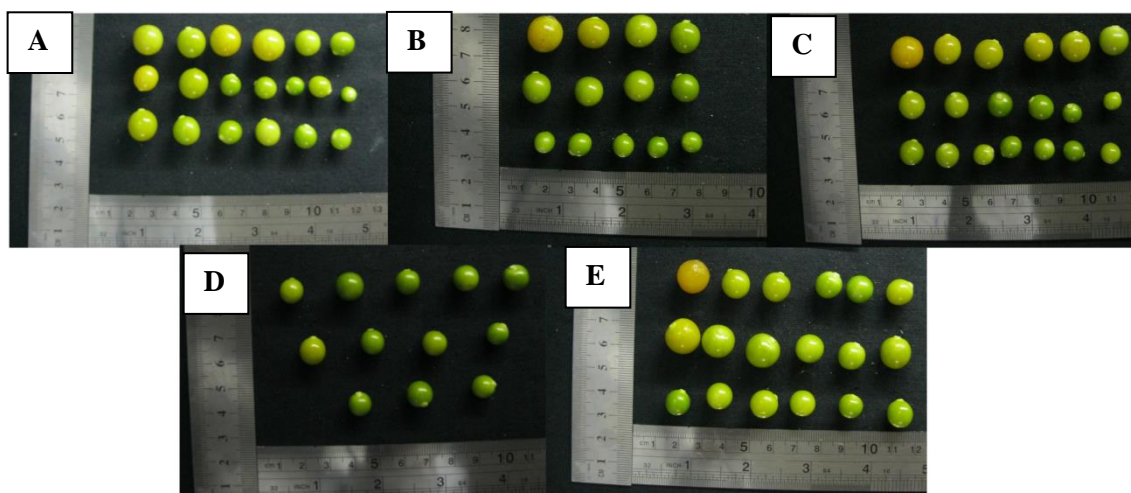


Figura 32 Frutos de aguaymanto producidos por interacción de cepas PGPR con HMA. A: Da29 - M; B: Aa9 – M; C: Aa7 - M; D: Control sin inocular; E: Control con HMA

e. Evaluación de la producción de ácido ascórbico en planas de aguaymanto por efecto de la interacción de PGPR con HMA

El aguaymanto es un fruto con un alto porcentaje de ácido ascórbico. Este ácido es de vital importancia debido a sus propiedades antioxidantes. Se midió la cantidad de ácido ascórbico en los frutos de la interacción Da29 y los controles en interacción con HMA y sin inocular. Se eligió esta interacción ya que de los resultados previamente obtenidos se puede desprender que hay un efecto sinérgico de la cepa Da29 en interacción con HMA. De acuerdo a los resultados presentados en la figura 33 se puede observar que la cepa Da29 en interacción con HMA presenta un incremento en la concentración de ácido ascórbico en los frutos producidos, asimismo la inoculación con HMA tuvo un efecto mayor. Cabe resaltar que el valor obtenido en este ensayo es correspondiente con el valor encontrado en el estudio realizado por Repo y Encina (2008), 28.51 mg/100g, realizado en aguaymantos nativos para la fase de maduración obtenida en el presente trabajo.

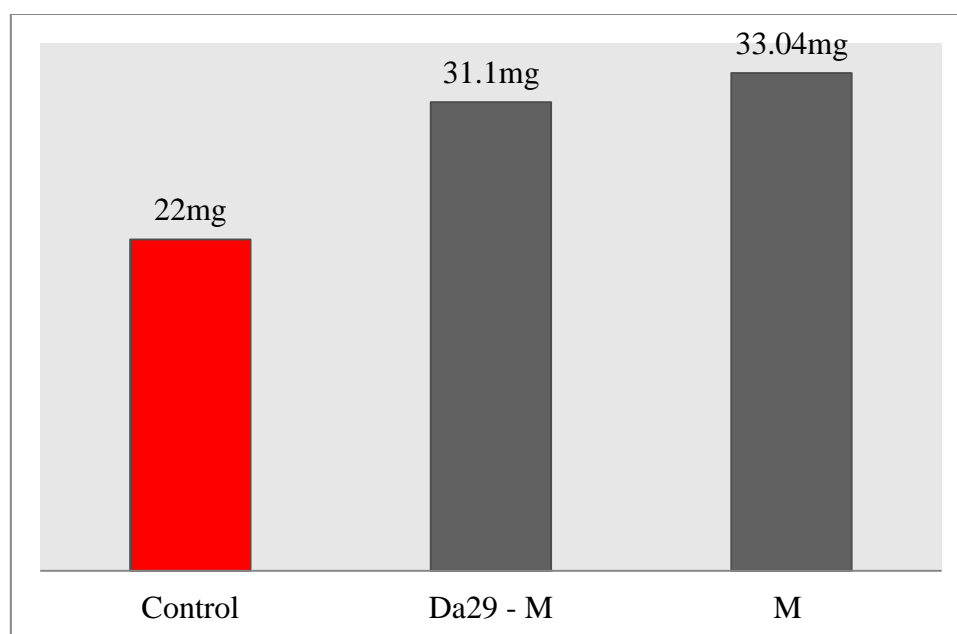


Figura 33 Cantidad de Ac. Ascórbico por 100gr de fruto. M: Inoculación con HMA

VII. CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 30 bacterias diazótrofes, de las cuales el 93.3% fueron mucosas e incoloras. Asimismo se aislaron 18 actinomicetos, de los cuales un 88.89% fueron pulverulentas con presencia de micelio aéreo, y un 11.11% presento pigmentos difusibles al medio virando el color del medio.
- De un total de 30 cepas de diazótrofes de vida libre se encontraron 7 perfiles BOX diferentes. Luego de realizar el secuenciamiento e identificación, de acuerdo a la secuencia ARN 16S, se encontraron 3 cepas relacionadas a *Rahnella aqualitis* (Da15, Da29 y Da26), 1 cepa relacionada a *Pseudomonas protegens* (Da30), 1 cepa relacionada a *Stenotrophomonas maltophilia* (Da8), 1 cepa relacionada a *Stenotrophomonas rhizophila* (Da27) y 1 cepa relacionada a *Agrobacterium fabrum* (Da2).
- En cuanto a la capacidad PGPR, se encontró que 19 de 30 cepas diazótrofes (67 %) produjeron de 2.98 a 81.78 ug/ml de AIA y 18 cepas de actinomicetos (100 %) produjeron de 4.34 a 68.36 ug/ml. Asimismo en la solubilización de fosfato 19 cepas diazótrofes (63 %) y 4 cepas de actinomicetos (22%) presentaron halos de 0.5 a 2.25 cm cuando se utilizó el medio bicálcico, 21 cepas diazótrofes (70 %) y 4 actinomicetos (22%) presentaron halos de solubilización entre 0.5 y 2 cm en medio tricálcico.
- En los ensayos a nivel de laboratorio, la cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29) y el actinomiceto Aa7 incrementaron el porcentaje de germinación y numero de semillas pubescentes. La cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29), y los actinomicetos Aa7 y Aa9 incrementaron significativamente el porcentaje de emergencia de las plantas de aguaymanto. Asimismo la cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29) incrementó significativamente, en un 141%, el peso fresco de las

raíces inoculadas con respecto al control sin inocular, este mismo efecto ocurrió en la altura y peso fresco aéreo, en un 21% y 400% respectivamente.

- En los ensayos a nivel de invernadero en la etapa de prefloración los tratamientos de la cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29) y el actinomiceto Aa7, ambas en interacción con hongos formadores de micorrizas arbusculares, incrementaron significativamente en un 10 y 30 por ciento, con respecto al control sin inocular, la cantidad de fósforo en las plantas. En la etapa de cosecha el actinomiceto Aa9, en interacción con hongos formadores de micorrizas arbusculares, incrementó significativamente el peso seco de la raíz (1.59g) con respecto al control sin inocular (0.89g).
- La cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29) y los actinomicetos Aa7 y Aa9, inoculados en interacción con hongos formadores de micorrizas incrementaron significativamente, hasta en un 650% (Da29 – M) en el peso total de los frutos por planta, un 103% (Da29-M) en el peso de un fruto y un 42% (Aa7-M) en el diámetro del fruto con respecto al control sin inocular. Asimismo la interacción micorrícica con la cepa relacionada a *Rahnella aqualitis* (Da29) incrementó la concentración de ácido ascórbico en un 41 % con respecto al control sin inocular.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar en análisis molecular de diversidad microbiana para las cepas de actinomicetos aislados, lo que permitirá una posterior identificación.
2. Evaluar un método cuantitativo de solubilización de fosfato en las cepas analizadas con la finalidad mejorar el análisis de los diversos comportamientos encontrados.
3. Determinar otras capacidades promotoras de crecimiento vegetal para los grupos bacterianos analizados como: compuestos volátiles, sideróforos, antibióticos, efecto antagonico contra hongos patógenos.
4. Realizar pruebas de interacción entre los grupos microbianos analizados y probar su efecto en consorcio con hongos formadores de micorrizas como promotores de crecimiento vegetal.
5. Realizar la caracterización molecular de los hongos formadores de micorrizas utilizados en el presente estudio
6. Evaluar otras formas de inoculación para la interacción entre bacterias PGPR y hongos formadores de micorrizas, con la finalidad de evaluar el método más efectivo para el efecto sinérgico.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Fatah G. y Mohamedin A. 2000. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brown scales. *Biology and Fertility of Soils* 32: 401-409.
2. Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editores. Mexico. pp.234-362.
3. Alexander, M. 1994. Introducción a la Microbiología de Suelos. Editor S. A. México p. 491.
4. Almario J., Prigent-Combaret C., Muller D., Moenne-Loccoz Y. 2013. Effect of caly mineralogy on iron bioavailability and rhizosphere transcription of 2,4-Diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in biocontrol *Pseudomonas protegens*. *Molecular Plant-Microbe interactions*. 26: 566-574.
5. Atlas, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4° Ed. Pearson Education S.A. Madrid, España. pp. 429-430.
6. APHA-AWWA-WPCF. 1998. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water. 20 ed. Washington DC.
7. Artursoon V. Finlay R. y Jansson J. 2005. Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology*. 7: 1952-1966.
8. Artursoon V. Finlay R. y Jansson J. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. 8: -10.
9. Azcón-Aguilar C. y Bago B. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting and undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En: Impact of

- ArbuscularMycorrhizal on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Gianinazzi S., Schuepp H. (eds). Editorial Birkhauser-Verlag, Basel. FR. pp 47-60.
10. Azcón-Aguilar C. y Barea J. 1986. Effect of soil microorganisms on formation of VA mycorrhizas. Transactions of the British Mycological Society. 84: 536-539.
 11. Azcón-Aguilar C., Barea J., 1996. Arbuscularmycorrhizal and biological control of soil-borne plant pathogens – An overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza. 6: 457-464.
 12. Baca, B., Soto, L., Pardo, M. 2000. Fijación Biológica del Nitrógeno. Rev Elementos 38: 43-49.
 13. Barea J. 1997. Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. En: Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects. Ogoshi A., Kobayashi L., Homma Y., Kodama F., Kondon N., Akino S. (eds). Editorial OCDE. Paris, FR. pp 150-158.
 14. Barea J., Pozo M., Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial cooperation in the rizosphere. Experimental Botany. 56: 1778-1784.
 15. Barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J. y Audran, J. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitisvinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters 186: 91–95.
 16. Barreto D., Valero N., Muñoz A., Peralta A. 2007. Germinación y crecimiento temprano de *Anacardium Excelsum*. Zonas áridas. 11(1).
 17. Barraquio, W.L., Segubre, E.M., Gonzalez, M.S., Verma, S.C., James, E.K., Ladha, J.K., Tripathi, A.K., 2000. Diazotrophic enterobacteria: what is their role in rhizosphere of rice? In: Ladha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. Los Banos, Philippines, pp. 93–118.
 18. Bashan Y., Levanony H. 1990. Current status of Azospirillum as a challenge for agricultura. Canadian Journal of Microbiology. 36: 591-608.
 19. Becerra J., Quintero D., Martínez M., Matiz A. 2011. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista colombiana de ciencias hortícolas. 5: 195-208.
 20. Blanco F., Salas E. 1997. Micorrizas en la agricultura: Contexto Mundial e Investigación realizada en Costa Rica. Agronomía Costarricense. 21(1): 55-67.

21. Bobadilla, C. y Rincón, S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfatos solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, CO.
22. Brito, B., Espin, S., Villacrés, E., Vaillant, F., Medina, G. y Arias, J. 2008. Uvilla: Características físicas y nutricionales de la fruta importante para la investigación y desarrollo de productos deshidratados, cristalizados y chips. En: INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) Plegable Divulgativo n. 295. Quito, EC.
23. Bricet, J., Bostock, R. y Silvestone, S. 1991. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 535-538.
24. Burke D., Kretzer A., Rygielwicz P., Topa M. 2006. Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: Influence of ectomycorrhizas and fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*. 57: 409-419.
25. Cakmakci, R., Kantar, F. y Algur, Ö. 1999. Sugar beet and barley yield in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. phosphaticum inoculation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162: 437- 442.
26. Campos, J., Bobadilla, D., Huamán, M. y Bazán, M. 2011. Efecto del extracto del fruto de *Physalis peruviana* "tomatillo" en *Mus musculus* var. swis con hiperlipidemia inducida. *Scientia Agropecuaria* 2(2): 83-89.
27. Carpenter-Boggs L., Loynachan T., Stahl P. 1995. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volátiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 1445-1451.
28. Carrillo-Castañeda G., Juárez J., Ruiz D., Muller R. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotecnología Aplicada*. 17: 171-176.
29. Chen F., Guo B., Wang J., Li Y., Wang H. 2007. Biological control of Grape Crown Gall by *Rahnella aqualitis* HX2. *Plant disease*. 91(8): 957-963.
30. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Manual de Evaluación, Selección y Manejo de sistemas Leguminosas-Rhizobium para el incremento de la fijación de nitrógeno. Vol. A, Teoría; Vol. B, Métodos. CIAT. Cali, Colombia.
31. Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo. Madrid, ES. 416 p.

32. Curá, J., Ribaudó, C., Gaetano, A. y Ghiglione, H. 2005. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas del desarrollo. Foro. 10- 13. Buenos Aires (Argentina): Universidad de Buenos Aires, Fac de Agronomía, Dpto química.
33. Dakora F. y Phillips D. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35-47.
34. Davies F, Calderón C., Huaman Z. 2005. Influence of Arbuscular Mycorrhizae Indigenous to Peru and Flavonoid on Growth, Yield, and leaf Elemental Concentration of “Yungay” Potatoes. *HortScience*. 40(2): 381-385.
35. Dosert N., Roque J., Cano A., La Torre M., Weigend M. 2012. Hojaiolog Botanica Aguaymanto. 1 Ed. Proyecto perúbiodiverso. Lima, Perú. Pp 3-9.
36. Ezziyyani M., Pérez C., Reuquena M., Ahmed A., Candela M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum L.*) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26: 61-68.
37. Firpo, R., Santos, D. y Peltzer, H. 2003. Inoculación de Trigo con *Azospirillum*: su efecto sobre el rendimiento ante distintas dosis de urea. Estación Experimental Paraná, Entre Ríos. Paraná (Argentina): Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Pp 8.
38. Fischer, G., Florez, V. y Sora, A. 2000. Producción, pos cosecha y exportación de la uchuva. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá, CO.
39. Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rhizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, ES. pp 261.
40. Freitas, J. de. 2000. Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticumaestivum*L. var. Norstar) inoculated with rhizobacteria. *Pedobiología* 44: 97-104.
41. Galindo T. 2005. Capacidad solubilizadora de fosfatos de microorganismos rizosféricos en dos manglares del Caribe colombiano. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, CO. pp 11-34.
42. Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimensión to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 128: 2: 197-210.
43. Gendermann J, Nicolson T. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogones* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235-244.

44. Giovannetti M., Sbrana C., Avio L. 2002. Arbuscularmycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. En: Mycorrhizal Technology in Agriculture. Gianinazzi S., Schuepp H., Barea J., Haselwandter K. (eds). FR. pp 49-58.
45. Glick, B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-177.
46. Gordon, S. & Weber, R. 1950. Colorimetric estimation of indolacetic acid. Division of Biological and Medical Research. Argonne National Laboratory. Chicago, Illinois.
47. Gomez-Vargas R, Bello-Bello D, Prada-Salcedo L, Rodriguez-Bocanegra M. Gomez-Mendez L, Franco-Correa M. 2011. Actinomicetos mineralizadores de fosfato involucrados en la interaccion radical de Glomussp. , Trebol Blanco. AgronomiaMesoamericana. 22(2): 317-327.
48. Gryndler M., Hrselova H. 1998. Effect of diazotrophic bacteria isolated from mycelium of arbuscularmycorrhizal fungi on colonization of maize root by *Glomusfistulosum*. BiologiaPlantarum. 41: 4: 617-621.
49. Govindarajulu M, Pfeffer P. Jin H, Abubaker J, Douds D, Allen J, Bucking H, Lammers P, Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscularmycorrhizal symbiosis. Nature 435: 819-823.
50. Gyaneshwar P., Kumar G., Parekh L., Poole P. 2002. Role of soil microorganism in improving P nutrition of plants. Plant Soil. 245:83-93.
51. Haas D., and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Review Microbiology 3:307-319.
52. Halder, A., Mishra, A. y Bhattacharyya, P. 1990. Solubilization of rock phosphate by Rhizobium and Bradyrhizobium. Journal of General and Applied Microbiology 36: 81-92.
53. Hernández, A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.). Tesis doctoral. Universidad de La Habana, CU.
54. Hernandez M, Chailloux M. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosfericas como alternative a la nutricion mineral del tomare. Cultivostropicales. 25: 2-9
55. Hoda H., El-Hendawy, Mohamed E., Osman, Noha M., Sorour. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* by *Rahnella Aqualitis*. Microbiological Research. 160:343-352.

56. Jeffries P., Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea J. 2003. The contribution of arbuscularmycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soil* 37:1-16.
57. Klopper, J. y Schroth, M. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria in radishes. En: *Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria*, INRA. Angers, FR. 2: 879-882.
58. Klopper J., Lifshitz R., Zablotowicz R. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*. 7:39-43.
59. Klopper J. 1994. Plant growth promotion rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/Plant Association* (Y. Okon, Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. Pp. 135-166.
60. Kormanik, P., and McGraw, A. 1987. Quantification of vesicular–arbuscular mycorrhizae in plant roots. En: *Methods and principles of mycorrhizal research*. Editorial Schenck. NC. pp 37-45.
61. Koske, R., and Gemma. J. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*. 92: 486-489.
62. Leveau JY, Bouix M. 2000. *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industria*. Acribia. España.
63. Linderman R. 1988. Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora –The rhizosphere effect. *Phytopathology*. 78: 366-371.
64. Mahmood, K., Yang, N., Kidhwar, Z., Rajputy, A., y Arijó, A. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *Journal of Zhejiang University Science* 7:459-466.
65. Marulanda A. 2000. Estudio de los mecanismos implicados en la Resistencia de las plantas a estreses osmóticos inducidos por microorganismos autóctonos promotores de crecimiento vegetal (Hongos micorrízicoarbusculares y bacterias). Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
66. Mayea, S., Carone, M., Novo, R., Boado, I., Silveira, E., Soria, M., Morales, Y. y Valiño, A. 1998. *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. 4 Ed. La Habana (Cuba). Pp 860.
67. Mayer, A. 1958. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature* 162 : 1670-1671.
68. Mayo K., Dvis R., Motta J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. *Mycologia*. 78: 426-431.

69. Martin A. 1981. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editores. Ciudad de México.
70. Medina D. 1998. Una nueva especie de *Physalis* (Solanaceae) de Perú. *Arnolda* 5(2): 211-213.
71. Mikanova, O; Kubat, J; Simon, T; Vorisek, K; Randova, D. 1997. Influence of soluble phosphate on P-solubilizing activity of bacteria. *Rostlinna-Vyroba-UZPI* 43:421-424.
72. Mosse B. 1959. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscularmycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society.* 42: 273-286.
73. Muñoz, A., Ramos, D., Alvarado, C. y Castañeda B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 73(3): 142-149.
74. Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 65-270.
75. Norma Técnica Colombiana 4580. Frutas fresas Uchuva Especificaciones.
76. Oehl F., Sieverding E., Mader P., Dubois D., Ineichen K., Boller T., Wiemken A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecología.* 138: 574-583.
77. Osorio, N. 2000. Aislamiento y evaluación in vitro de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelos tropicales. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia.. Bogotá.
78. Ogata, K., Arellano, C. y Zúñiga, D. 2009. Efecto de diferentes bacterias aisladas de la rizósfera de *Caesalpiniaspinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zonas Áridas* 12(1): 137-153.
79. Okon Y., Lavandera-Gonzales C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry.* 26; 12: 1591-1601.
80. Ordoñez Y. 2009. Interacción sinérgica entre hongos formadores de micorrizas arbusculares – *Pseudomonas fluorescens* y su relación en la nutrición vegetal del fósforo. Tesis de maestría en microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia.

81. Pal, S. 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil* 198: 169-177.
82. Patten, C. y Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
83. Patten, C., Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology* 68:379–380.
84. Pedraza, R. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *J. Food Microbiology*. 125: 25–35.
85. Perez W. 2012. Caracterización y evaluación de actinomicetos aislados de campos de cultivo de Maca (*Lepidiummeyerii*Walpers) como promotores de crecimiento vegetal. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
86. Perry L. M. 1980. Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses. The MIT Press, Cambridge. USA. pp 393
87. Phillips, J., Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of the infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158-161.
88. Pietro, R., Kashima, S., Sato D., Januario, A. y Franca, S. 2000. *Phytomedicine* 7: 335-338
89. Prescott, L. M. 2002. *Microbiology*. 5 Ed. Boston, USA. Pp 5254-528.
90. Popova A, Panayotov N, Kouzмова K. 2010. Evaluation of the Development of Cape Gooseberry (*Physalis Peruviana* L.) Plants under the Environmental Conditions of South Bulgaria.
91. Raghava RP, Murty YS. 1987 Studies on the floral biology of *Physalis peruviana* and: *angulata*. *Geobios New Rep*. 6. 47-50.
92. Ramette A, Frapolli M, Fischer-Le Saux M, Gruffaz C, Meyer JM, et al. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol* 34: 180–188
93. Ramazan, C., Dönmez, F., Aydin, A. y Sahin, F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth – promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(6): 1482-1487.

94. Repo R., Encina C. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista Sociedad Químicos del Perú*. 74(2): 108 – 124.
95. Richardson, A. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 897-906.
96. Rivera R., Fernandez F., Sanchez C., Bustamante C., Herrera R., Ochoa M. 1997. Efecto de la inoculación con hongos micorrizogenos VA y bacterias rizosfericas sobre el crecimiento de las posturas de cafeto. *Cultivos tropicales* 18(3): 15-23.
97. Rojas C. 2009. Ensayo experimental con microorganismos benéficos y su potencial uso en la implementación de los proyectos de restauración ecológica en el Distrito Capital. *Pérez Arbelaezia*. 19: 71-83.
98. Samina M., Deeba N., Lazarovits G. 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal Microbiological Biotechnology*. 20: 1614-1623.
99. SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología, PE). 2012. Datos históricos Estación Von Humboldt. Consultado 12 abr. 2012. Disponible en http://www.senamhi.gob.pe/main_mapa.php?t=dHi
100. Serralde, A. M., Ramirez, M. M. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*. 5 (1): 31-40.
101. Sieverding E. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems GTZ, Eschborn, Germany. Pp371.
102. SIICEX (Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior, PE). 2015. Evolución de las exportaciones del producto: aguaymanto. Consultado 20 de agosto 2015. Disponible en: <http://www.siicex.gob.pe/siicex/apb/ReporteProducto.aspx?psector=1025&preporte=prodmercvolu&pvalor=331080>
103. Simione, F. P. 1998. M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with NalgeNunc International Corp. Nalge Nunc.
104. Sudha, S., Jayakumar, R. y Sekar, V. 1999. Introduction and expression of the cry1 Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in cereal – associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Current Microbiology* 38: 163-167.


105. Sullivan JR, Shah VP, Chissoe W. 2005. Palynology and systematics of *Physalis* (Solanaceae). En: Keating RC, Hollowell V, Croat TB ed(s). A Festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. (Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden 104). Missouri Botanical Garden pp.287 - 300.
106. Sylvia DM. Principles and applicatios of soil microbiology. Prentice Hall. United States of America.
107. Tang W. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En: Improving Plan Productivity with Rhizosphere Bacteria. MH Ryder, PM Stephens, GD Bowen (eds). Division of Soils CSRIO, Adalaide, Australia. Pd 27-273.
108. Trujillo ID. 2005. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) con actividad promotora del crecimiento vegetal. Tesis en opción al Título Académico de Maestro en Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
109. Tokala K., Strap C., Jung D., Crawford L., Salove L., Deobald F., Bailey J., Morra J. 2000. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* and troll he pea plant (*Pisum sativum*). Applied and Eviromental Microbiology. 68:2161 – 2171.
110. Toloza D. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas con potencial antagonico para el control biológico de *Fusarium oxysporum* (Schelcht) en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Ciénega, Boyacá. 2014. Tesis de Mestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
111. Unkovich, M. y Baldock, J. 2008. Measurement of asymbiotic N2 fixation in Australian agriculture. Soil Biology & Biochem. 40: 2915– 2921.
112. Utobo E., Ogbodo E., Nwogbaga A. 2011. Techniques foe extraction and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi. Libyan Agriculture Research Center Journal Internation 2(2): 68-78.
113. Van der Heijden M. 2004. Arbuscularmycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. Ecology Letters 7: 293-303.
114. Velásquez M, Hernández A, Heydrich M, Hernández AN. Estudio de la interacción maíz *Burkholderia cepacia*. Rev Latinoamericana de Microbiología. 1999;41:17-23.

115. Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91: 127-141.
116. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19(24): 6823-6831.
117. Vestergård, M., Bjørlund, L., Henry, F. y Rønn, R. 2007. Decreasing prevalence of rhizosphere IAA producing and seedling root growth promoting bacteria with barley development irrespective of protozoan grazing regime. *Plant Soil* 295: 115-125.
118. Vivas A., I. Vörös, B. Biró, E. Campos, J.M. Barea, R. Azcón. 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscularmycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution* 126: 179-189.
119. Wu, S.; Lin, D. 2004. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Letters* 215: 199-208.
120. Yadav, K., Dadarwal, K. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. *Biotechnological Approches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*. pp. 293-308.
121. Yino, D., La Torre, C., Cépeda, S. y Zúñiga, D. 2008. Growth promoting effect of different bacteria in the germination of cotton (*Gossypium hirsutum*) Crop. III Conferencia Internacional Científico – Técnica “Biotecnología Alimentaria y Marina” Svetlogorsk, Kaliningrado, RU; 2-4 de Julio.
122. Wihtelaw M. 2000. Growth promotion of plantas inoculated for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*. 82:1198-1227.
123. Zapater, J. (1975). Evaluación en el maíz del coeficiente rizosfera-suelo (R/S), referidos a bacterias libres fijadoras de N₂ [nitrógeno]. *Anales Científicos (Perú)*. 13: 45-57.
124. Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, T., Alvarado, y C. y Loja, B. 2005. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revista Horizonte Médico*. 2(5): 29 – 38.


125. Zúñiga D. y Gutiérrez-Correa M. 1982. Dinámica poblacional de diazótrofos libres fijadores de nitrógeno en la rizosfera de Sicoys baderoa. *Zonas Áridas*. 2: 79-86.
126. Zúñiga, D. 2007a. Informe Final Técnico - Económico del proyecto: “Formulación y optimización de biofertilizantes para leguminosas de grano” Procyt 207-2005-CONCYTEC-OAJ. Lima, PE.
127. Zúñiga, D. 2007b. “Control de fitopatógenos del cultivo de papa por bacterias antagónicas aisladas de la rizósfera del mismo cultivo” PROCYT 350-2007-CONCYTEC-OAJ.
128. Zúñiga, D. 2007c. Leguminosas y producción de biofertilizantes en el Perú. En: *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica científica y empresarial*. Izaguirre, M., Labandera, C. y Sanjuán. J. (eds.) Imprenta Denad Internacional S. A. Montevideo, UY. pp. 61-67.
129. Zúñiga, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPR, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 40-50 pp.

X. ANEXOS

ANEXO 1 ANALISIS NUTRICIONALES EN ETAPA PREFLORACIÓN



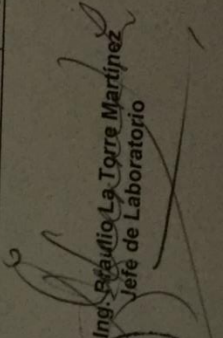
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES




INFORME DE ANALISIS FOLIAR

SOLICITANTE : KATTY OGATA GUTIERREZ
 PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
 MUESTRA DE : PLANTA DE AGUAYMANTO
 REFERENCIA : H.R. 39742
 FECHA : 12/04/2013

N. Lab	CLAVE DE CAMPO	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	S %	Na %	Zn ppm	Cu ppm	Mn ppm	Fe ppm	B ppm	M.S. %
2111	Da 29	2.21	0.24	4.30	1.24	0.63	0.37	0.21	69	16	38	465	189	10.93
2112	Da 29	2.10	0.24	4.10	1.24	0.64	0.41	0.25	70	19	37	457	200	10.93
2113	Da 29 M	1.90	0.22	3.65	1.22	0.66	0.50	0.20	53	12	36	484	112	12.89
2114	Da 29 M	1.76	0.22	3.65	1.18	0.52	0.49	0.20	52	11	39	570	136	12.89
2115	M	1.71	0.21	3.75	1.28	0.73	0.46	0.26	55	12	47	758	95	14.00
2116	M	1.68	0.21	3.65	1.27	0.66	0.46	0.25	56	13	43	742	104	14.00
2117	Control	1.93	0.20	4.35	1.44	0.88	0.36	0.21	46	11	39	313	128	11.35
2118	Control	2.07	0.20	4.80	1.49	1.01	0.36	0.24	49	10	33	331	149	11.35



Ing. Raúl La Torre Martínez
 Jefe de Laboratorio



Av. La Molina s/n Campus UNALM - Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe



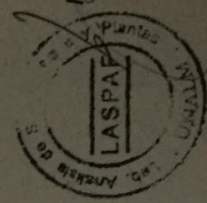
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS FOLIAR

SOLICITANTE : KATTY OGATA GUTIERREZ
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
MUESTRA DE : PLANTA DE AGUAYMANTO
REFERENCIA : H.R. 39742
FECHA : 12/04/2013

N. Lab.	CLAVE DE CAMPO	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Zn	Cu	Mn	Fe	B	M.S.
		%	%	%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%
2103	Aa 23	1.96	0.21	3.85	1.46	0.81	0.50	0.27	70	11	40	303	198	13.05
2104	Aa 23	2.10	0.20	3.55	1.37	0.75	0.49	0.32	69	10	39	317	176	13.05
2105	Aa 23 M	2.24	0.27	3.70	1.27	0.72	0.47	0.26	52	12	49	365	203	10.89
2106	Aa 23 M	2.10	0.24	3.90	1.28	0.76	0.43	0.25	50	13	50	444	242	10.89
2107	Aa 25	1.88	0.27	3.75	1.30	0.77	0.46	0.15	65	13	52	697	253	11.85
2108	Aa 25	1.88	0.26	4.00	1.29	0.76	0.46	0.15	61	12	48	737	218	11.85
2109	Aa 25 M	1.90	0.24	3.95	1.27	0.77	0.45	0.21	48	10	40	388	168	12.07
2110	Aa 25 M	1.99	0.23	4.05	1.23	0.68	0.43	0.22	42	10	41	397	216	12.07



Ing. Braulio La Torre Martínez
Jefe de Laboratorio

ANEXO 2 ANALISIS ÁCIDO ASCÓRBICO FRUTOS AGUAYMANTO

Facultad de Industrias Alimentarias Laboratorio de Análisis Físico-Químico de Alimentos

INFORME DE ENSAYOS

N° 20-09-13

Producto : Aguaymanto
Marca : S/M
Identificación de muestra : T1; T3; T8
Número de muestras : 01 de cada uno
Cantidad recibida : 30g aprox. Por muestra proporcionada por el solicitante
Forma de presentación : 01 bolsas de cada uno
Fecha de recepción : 21/08/2013
Ensayo solicitado : determinación de vitamina C.

Resultados:

N° de muestras	Ensayos	Resultados
<ul style="list-style-type: none">• T1• T3• T8	<ul style="list-style-type: none">• Determinación de vitamina C	22 .0mg Ac.Asc/100g muestra 31.1 mg Ac.Asc/100g muestra 33.04 mg Ac.Asc/100g muestra

Métodos utilizados en el laboratorio:

1. Determinación de Vitamina C según el método AOAC 967.21

Advertencia:

- El muestreo, las condiciones de muestreo hasta su ingreso a los Laboratorios de Análisis Físico-Químico de Alimentos -FIAL-UNALM son de responsabilidad del solicitante
- Los resultados son válidos sólo para la cantidad recibida

Fecha de realización de los ensayos: del 13/08/13 al 28/08/13

La Molina, 03 de Setiembre del 2013

.....
Ing. Mg Sc Carlos Elías Peñafiel
Jefe del Laboratorio de Análisis
Físico-Químico de Alimentos
FIAL-UNALM

ANEXO 3 ANALISIS ESTADÍSTICOS

- **Porcentaje de Infección de HMA en raíces de plantas de Aguaymanto inoculadas con bacterias PGPR.**

Tabla ANOVA para Porcentaje de Infección por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5519.56	4	1379.89	3.34	0.0383
Intra grupos	6204.13	15	413.609		
Total (Corr.)	11723.7	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Infección por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ACT7	4	27.775	x
Control	4	63.89	x
Bac3M2	4	69.445	x
Ps42	4	69.4475	x
Azo16M2	4	72.2225	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ACT7 - Azo16M2	*	-44.4475	30.6518
ACT7 - Bac3M2	*	-41.67	30.6518
ACT7 - Control	*	-36.115	30.6518
ACT7 - Ps42	*	-41.6725	30.6518
Azo16M2 - Bac3M2		2.7775	30.6518
Azo16M2 - Control		8.3325	30.6518
Azo16M2 - Ps42		2.775	30.6518
Bac3M2 - Control		5.555	30.6518
Bac3M2 - Ps42		-0.0025	30.6518
Control - Ps42		-5.5575	30.6518

* indica una diferencia significativa.

- **Germinación de semillas de Aguaymanto por efecto de cepas PGPR**

Tabla ANOVA para Germinación 5 días por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2538.61	4	634.653	6.98	0.0022
Intra grupos	1364.8	15	90.9865		
Total (Corr.)	3903.41	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Germinación 5 días por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Da30	4	0	X
Aa9	4	2.5625	X
Da29	4	8.0	XX
Control	4	17.0	XX
Aa7	4	31.0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa9	*	28.4375	14.3764
Aa7 - Control		14.0	14.3764
Aa7 - Da29	*	23.0	14.3764
Aa7 - Da30	*	31.0	14.3764
Aa9 - Control	*	-14.4375	14.3764
Aa9 - Da29		-5.4375	14.3764
Aa9 - Da30		2.5625	14.3764
Control - Da29		9.0	14.3764
Control - Da30	*	17.0	14.3764
Da29 - Da30		8.0	14.3764

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Germinación 6 día por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	15172.1	4	3793.01	9.27	0.0006
Intra grupos	6139.19	15	409.279		
Total (Corr.)	21311.2	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Germinación 6 día por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Aa9	4	13.125	X
Da30	4	15.0	X
Control	4	41.0	XX
Da29	4	47.0	X
Aa7	4	89.0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa9	*	75.875	30.4909
Aa7 - Control	*	48.0	30.4909
Aa7 - Da29	*	42.0	30.4909
Aa7 - Da30	*	74.0	30.4909
Aa9 - Control		-27.875	30.4909
Aa9 - Da29	*	-33.875	30.4909
Aa9 - Da30		-1.875	30.4909
Control - Da29		-6.0	30.4909
Control - Da30		26.0	30.4909
Da29 - Da30	*	32.0	30.4909

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Pubescencia 8 día por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4277.74	4	1069.44	4.62	0.0124
Intra grupos	3469.91	15	231.327		
Total (Corr.)	7747.65	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pubescencia 8 día por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Aa9	4	62.5825	X
Da30	4	65.375	X
Control	4	76.7925	XX
Da29	4	92.0	XX
Aa7	4	100.0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa9	*	37.4175	22.9231
Aa7 - Control	*	23.2075	22.9231
Aa7 - Da29		8.0	22.9231
Aa7 - Da30	*	34.625	22.9231
Aa9 - Control		-14.21	22.9231
Aa9 - Da29	*	-29.4175	22.9231
Aa9 - Da30		-2.7925	22.9231
Control - Da29		-15.2075	22.9231
Control - Da30		11.4175	22.9231
Da29 - Da30	*	26.625	22.9231

* indica una diferencia significativa.

• Emergencia de las plántulas de aguaymanto por efecto de cepas PGPR

Tabla ANOVA para Emergencia 13 días por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1830.0	4	457.5	3.39	0.0365
Intra grupos	2025.0	15	135.0		
Total (Corr.)	3855.0	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia 13 días por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	4	30.0	X
Da30	4	42.5	XX
Aa23	4	50.0	X
Aa25	4	52.5	X
Da29	4	57.5	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa23 - Aa25		-2.5	17.5117
Aa23 - C	*	20.0	17.5117
Aa23 - Da29		-7.5	17.5117
Aa23 - Da30		7.5	17.5117
Aa25 - C	*	22.5	17.5117
Aa25 - Da29		-5.0	17.5117
Aa25 - Da30		10.0	17.5117
C - Da29	*	-27.5	17.5117
C - Da30		-12.5	17.5117
Da29 - Da30		15.0	17.5117

* indica una diferencia significativa.

- **Crecimiento de plántulas de aguaymanto inoculadas con cepas PGPR**

Tabla ANOVA para PFR por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0266378	4	0.00665944	3.81	0.0248
Intra grupos	0.0262032	15	0.00174688		
Total (Corr.)	0.052841	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para PFR por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	0.0691	X
Aa7	4	0.0762625	X
Aa9	4	0.082	X
Da30	4	0.1205	XX
Da29	4	0.166625	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa9		-0.0057375	0.062993
Aa7 - Control		0.0071625	0.062993
Aa7 - Da29	*	-0.0903625	0.062993
Aa7 - Da30		-0.0442375	0.062993
Aa9 - Control		0.0129	0.062993
Aa9 - Da29	*	-0.084625	0.062993
Aa9 - Da30		-0.0385	0.062993
Control - Da29	*	-0.097525	0.062993
Control - Da30		-0.0514	0.062993
Da29 - Da30		0.046125	0.062993

* indica una diferencia significativa.

- **Efecto de inoculación HMA a los 15 días en plántulas de aguaymanto a nivel de laboratorio.**

Tabla ANOVA para Número de hojas por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.552288	1	0.552288	4.05	0.0527
Intra grupos	4.36601	32	0.136438		
Total (Corr.)	4.9183	33			

Pruebas de Múltiple Rangos para Número de hojas por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	17	4.4902	X
M	17	4.7451	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C - M		-0.254902	0.258069

* indica una diferencia significativa.

- **Efecto en la etapa de prefloración**

Tabla ANOVA para Altura M2 por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

Entre grupos	192.48	7	27.4971	1.39	0.2564
Intra grupos	476.148	24	19.8395		
Total (Corr.)	668.627	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Altura M2 por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	4	19.8	x
7	4	21.775	xx
9M	4	22.95	xxx
9	4	23.2	xxx
7M	4	23.375	xxx
M	4	23.775	xxx
29	4	26.325	xx
29M	4	28.325	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
29 - 29M		-2.0	6.50039
29 - 7		4.55	6.50039
29 - 7M		2.95	6.50039
29 - 9		3.125	6.50039
29 - 9M		3.375	6.50039
29 - C	*	6.525	6.50039
29 - M		2.55	6.50039
29M - 7	*	6.55	6.50039
29M - 7M		4.95	6.50039
29M - 9		5.125	6.50039
29M - 9M		5.375	6.50039
29M - C	*	8.525	6.50039
29M - M		4.55	6.50039
7 - 7M		-1.6	6.50039
7 - 9		-1.425	6.50039
7 - 9M		-1.175	6.50039
7 - C		1.975	6.50039
7 - M		-2.0	6.50039
7M - 9		0.175	6.50039
7M - 9M		0.425	6.50039
7M - C		3.575	6.50039
7M - M		-0.4	6.50039
9 - 9M		0.25	6.50039
9 - C		3.4	6.50039
9 - M		-0.575	6.50039
9M - C		3.15	6.50039
9M - M		-0.825	6.50039
C - M		-3.975	6.50039

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para PF por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10.2641	7	1.4663	1.01	0.4857
Intra grupos	11.5606	8	1.44507		
Total (Corr.)	21.8247	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PF por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	2	2.255	X
25	2	3.0	X
25M	2	3.295	X
29	2	3.985	X
23M	2	4.21	X
23	2	4.405	X
M	2	4.5	X
29M	2	4.69	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
23 - 23M		0.195	2.77208
23 - 25		1.405	2.77208
23 - 25M		1.11	2.77208
23 - 29		0.42	2.77208
23 - 29M		-0.285	2.77208
23 - C		2.15	2.77208
23 - M		-0.095	2.77208
23M - 25		1.21	2.77208
23M - 25M		0.915	2.77208
23M - 29		0.225	2.77208
23M - 29M		-0.48	2.77208
23M - C		1.955	2.77208
23M - M		-0.29	2.77208
25 - 25M		-0.295	2.77208
25 - 29		-0.985	2.77208
25 - 29M		-1.69	2.77208
25 - C		0.745	2.77208
25 - M		-1.5	2.77208
25M - 29		-0.69	2.77208
25M - 29M		-1.395	2.77208
25M - C		1.04	2.77208
25M - M		-1.205	2.77208
29 - 29M		-0.705	2.77208
29 - C		1.73	2.77208
29 - M		-0.515	2.77208
29M - C		2.435	2.77208
29M - M		0.19	2.77208
C - M		-2.245	2.77208

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para PS por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.235544	7	0.0336491	1.53	0.2818
Intra grupos	0.17615	8	0.0220188		
Total (Corr.)	0.411694	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para PS por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	2	0.245	X
25	2	0.3	XX
25M	2	0.31	XX
29	2	0.38	XX
23M	2	0.465	XX
29M	2	0.495	XX
23	2	0.57	XX
M	2	0.59	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
23 - 23M		0.105	0.342182
23 - 25		0.27	0.342182
23 - 25M		0.26	0.342182
23 - 29		0.19	0.342182
23 - 29M		0.075	0.342182
23 - C		0.325	0.342182
23 - M		-0.02	0.342182
23M - 25		0.165	0.342182
23M - 25M		0.155	0.342182
23M - 29		0.085	0.342182
23M - 29M		-0.03	0.342182
23M - C		0.22	0.342182
23M - M		-0.125	0.342182
25 - 25M		-0.01	0.342182
25 - 29		-0.08	0.342182
25 - 29M		-0.195	0.342182
25 - C		0.055	0.342182
25 - M		-0.29	0.342182
25M - 29		-0.07	0.342182
25M - 29M		-0.185	0.342182
25M - C		0.065	0.342182
25M - M		-0.28	0.342182
29 - 29M		-0.115	0.342182
29 - C		0.135	0.342182
29 - M		-0.21	0.342182
29M - C		0.25	0.342182
29M - M		-0.095	0.342182
C - M	*	-0.345	0.342182

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para K% por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.30687	7	0.186696	5.69	0.0128
Intra grupos	0.2625	8	0.0328125		
Total (Corr.)	1.56937	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para K% por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M	2	3.7	X
Aa7	2	3.7	X
Da29 - M	2	3.75	X
Aa7 - M	2	3.8	XX
Aa9 - M	2	3.85	XX
Aa9	2	3.875	XX
Da29	2	4.2	XX
Control	2	4.575	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		-0.1	0.417716
Aa7 - Aa9		-0.175	0.417716
Aa7 - Aa9 - M		-0.15	0.417716
Aa7 - Control	*	-0.875	0.417716
Aa7 - Da29	*	-0.5	0.417716
Aa7 - Da29 - M		-0.05	0.417716
Aa7 - M		0	0.417716
Aa7 - M - Aa9		-0.075	0.417716
Aa7 - M - Aa9 - M		-0.05	0.417716
Aa7 - M - Control	*	-0.775	0.417716
Aa7 - M - Da29		-0.4	0.417716
Aa7 - M - Da29 - M		0.05	0.417716

Aa7 - M - M		0.1	0.417716
Aa9 - Aa9 - M		0.025	0.417716
Aa9 - Control	*	-0.7	0.417716
Aa9 - Da29		-0.325	0.417716
Aa9 - Da29 - M		0.125	0.417716
Aa9 - M		0.175	0.417716
Aa9 - M - Control	*	-0.725	0.417716
Aa9 - M - Da29		-0.35	0.417716
Aa9 - M - Da29 - M		0.1	0.417716
Aa9 - M - M		0.15	0.417716
Control - Da29		0.375	0.417716
Control - Da29 - M	*	0.825	0.417716
Control - M	*	0.875	0.417716
Da29 - Da29 - M	*	0.45	0.417716
Da29 - M	*	0.5	0.417716
Da29 - M - M		0.05	0.417716

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para N% por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.364594	7	0.0520848	8.38	0.0038
Intra grupos	0.04975	8	0.00621875		
Total (Corr.)	0.414344	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para N% por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M	2	1.695	x
Da29 - M	2	1.83	xx
Aa9	2	1.88	xx
Aa9 - M	2	1.945	xx
Control	2	2.0	xxx
Aa7	2	2.03	xx
Da29	2	2.155	x
Aa7 - M	2	2.17	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		-0.14	0.18185
Aa7 - Aa9		0.15	0.18185
Aa7 - Aa9 - M		0.085	0.18185
Aa7 - Control		0.03	0.18185
Aa7 - Da29		-0.125	0.18185
Aa7 - Da29 - M	*	0.2	0.18185
Aa7 - M	*	0.335	0.18185
Aa7 - M - Aa9	*	0.29	0.18185
Aa7 - M - Aa9 - M	*	0.225	0.18185
Aa7 - M - Control		0.17	0.18185
Aa7 - M - Da29		0.015	0.18185
Aa7 - M - Da29 - M	*	0.34	0.18185
Aa7 - M - M	*	0.475	0.18185
Aa9 - Aa9 - M		-0.065	0.18185
Aa9 - Control		-0.12	0.18185
Aa9 - Da29	*	-0.275	0.18185
Aa9 - Da29 - M		0.05	0.18185
Aa9 - M	*	0.185	0.18185
Aa9 - M - Control		-0.055	0.18185
Aa9 - M - Da29	*	-0.21	0.18185
Aa9 - M - Da29 - M		0.115	0.18185
Aa9 - M - M	*	0.25	0.18185
Control - Da29		-0.155	0.18185

Control - Da29 - M		0.17	0.18185
Control - M	*	0.305	0.18185
Da29 - Da29 - M	*	0.325	0.18185
Da29 - M	*	0.46	0.18185
Da29 - M - M		0.135	0.18185

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para P% por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.007975	7	0.00113929	15.19	0.0005
Intra grupos	0.0006	8	0.000075		
Total (Corr.)	0.008575	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para P% por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	2	0.2	X
Aa7	2	0.205	XX
M	2	0.21	XX
Da29 - M	2	0.22	XX
Aa9 - M	2	0.235	XX
Da29	2	0.24	XX
Aa7 - M	2	0.255	XX
Aa9	2	0.265	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M	*	-0.05	0.0199706
Aa7 - Aa9	*	-0.06	0.0199706
Aa7 - Aa9 - M	*	-0.03	0.0199706
Aa7 - Control		0.005	0.0199706
Aa7 - Da29	*	-0.035	0.0199706
Aa7 - Da29 - M		-0.015	0.0199706
Aa7 - M		-0.005	0.0199706
Aa7 - M - Aa9		-0.01	0.0199706
Aa7 - M - Aa9 - M	*	0.02	0.0199706
Aa7 - M - Control	*	0.055	0.0199706
Aa7 - M - Da29		0.015	0.0199706
Aa7 - M - Da29 - M	*	0.035	0.0199706
Aa7 - M - M	*	0.045	0.0199706
Aa9 - Aa9 - M	*	0.03	0.0199706
Aa9 - Control	*	0.065	0.0199706
Aa9 - Da29	*	0.025	0.0199706
Aa9 - Da29 - M	*	0.045	0.0199706
Aa9 - M	*	0.055	0.0199706
Aa9 - M - Control	*	0.035	0.0199706
Aa9 - M - Da29		-0.005	0.0199706
Aa9 - M - Da29 - M		0.015	0.0199706
Aa9 - M - M	*	0.025	0.0199706
Control - Da29	*	-0.04	0.0199706
Control - Da29 - M	*	-0.02	0.0199706
Control - M		-0.01	0.0199706
Da29 - Da29 - M	*	0.02	0.0199706
Da29 - M	*	0.03	0.0199706
Da29 - M - M		0.01	0.0199706

* indica una diferencia significativa.

• **Etapa de cosecha (6 meses)**

Tabla ANOVA para PF AEREO por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	497.875	7	71.125	2.07	0.0868
Intra grupos	823.988	24	34.3328		
Total (Corr.)	1321.86	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para PF AEREO por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	4	13.9175	X
29	4	16.3425	XX
29M	4	18.9125	XXX
23M	4	19.0225	XXX
25	4	19.755	XXX
25M	4	22.6175	XX
M	4	24.3525	XX
23	4	26.8175	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
23 - 23M		7.795	8.55124
23 - 25		7.0625	8.55124
23 - 25M		4.2	8.55124
23 - 29	*	10.475	8.55124
23 - 29M		7.905	8.55124
23 - C	*	12.9	8.55124
23 - M		2.465	8.55124
23M - 25		-0.7325	8.55124
23M - 25M		-3.595	8.55124
23M - 29		2.68	8.55124
23M - 29M		0.11	8.55124
23M - C		5.105	8.55124
23M - M		-5.33	8.55124
25 - 25M		-2.8625	8.55124
25 - 29		3.4125	8.55124
25 - 29M		0.8425	8.55124
25 - C		5.8375	8.55124
25 - M		-4.5975	8.55124
25M - 29		6.275	8.55124
25M - 29M		3.705	8.55124
25M - C	*	8.7	8.55124
25M - M		-1.735	8.55124
29 - 29M		-2.57	8.55124
29 - C		2.425	8.55124
29 - M		-8.01	8.55124
29M - C		4.995	8.55124
29M - M		-5.44	8.55124
C - M	*	-10.435	8.55124

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para PS AEREO por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.96619	7	1.42374	2.28	0.0623
Intra grupos	14.9717	24	0.623821		
Total (Corr.)	24.9379	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para PS AEREO por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C	4	2.13	X
29	4	2.345	XX
25	4	2.7775	XXX
23M	4	2.8275	XXX
29M	4	3.0725	XXX
M	4	3.37	XX
23	4	3.605	X
25M	4	3.8475	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
23 - 23M		0.7775	1.15267
23 - 25		0.8275	1.15267
23 - 25M		-0.2425	1.15267
23 - 29	*	1.26	1.15267
23 - 29M		0.5325	1.15267
23 - C	*	1.475	1.15267
23 - M		0.235	1.15267
23M - 25		0.05	1.15267
23M - 25M		-1.02	1.15267
23M - 29		0.4825	1.15267
23M - 29M		-0.245	1.15267
23M - C		0.6975	1.15267
23M - M		-0.5425	1.15267
25 - 25M		-1.07	1.15267
25 - 29		0.4325	1.15267
25 - 29M		-0.295	1.15267
25 - C		0.6475	1.15267
25 - M		-0.5925	1.15267
25M - 29	*	1.5025	1.15267
25M - 29M		0.775	1.15267
25M - C	*	1.7175	1.15267
25M - M		0.4775	1.15267
29 - 29M		-0.7275	1.15267
29 - C		0.215	1.15267
29 - M		-1.025	1.15267
29M - C		0.9425	1.15267
29M - M		-0.2975	1.15267
C - M	*	-1.24	1.15267

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Botones Florales M6 por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	59.875	7	8.55357	1.12	0.3856
Intra grupos	184.0	24	7.66667		
Total (Corr.)	243.875	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Botones Florales M6 por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
9	4	1.75	X
C	4	2.25	XX
29M	4	2.5	XX
29	4	3.0	XX
9M	4	3.5	XX
7M	4	3.5	XX
7	4	4.75	XX
M	4	6.25	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-----------	------	------------	-------------

29 - 29M		0.5	4.04089
29 - 7		-1.75	4.04089
29 - 7M		-0.5	4.04089
29 - 9		1.25	4.04089
29 - 9M		-0.5	4.04089
29 - C		0.75	4.04089
29 - M		-3.25	4.04089
29M - 7		-2.25	4.04089
29M - 7M		-1.0	4.04089
29M - 9		0.75	4.04089
29M - 9M		-1.0	4.04089
29M - C		0.25	4.04089
29M - M		-3.75	4.04089
7 - 7M		1.25	4.04089
7 - 9		3.0	4.04089
7 - 9M		1.25	4.04089
7 - C		2.5	4.04089
7 - M		-1.5	4.04089
7M - 9		1.75	4.04089
7M - 9M		0	4.04089
7M - C		1.25	4.04089
7M - M		-2.75	4.04089
9 - 9M		-1.75	4.04089
9 - C		-0.5	4.04089
9 - M	*	-4.5	4.04089
9M - C		1.25	4.04089
9M - M		-2.75	4.04089
C - M		-4.0	4.04089

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para N° Flores M6 por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	28.6797	7	4.0971	1.81	0.1306
Intra grupos	54.1875	24	2.25781		
Total (Corr.)	82.8672	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para N° Flores M6 por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
29M	4	0.5	x
C	4	1.0	xx
M	4	1.5	xxx
9	4	1.5	xxx
29	4	2.0	xxx
7M	4	2.0	xxx
7	4	3.125	xx
9M	4	3.5	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
29 - 29M		1.5	2.1929
29 - 7		-1.125	2.1929
29 - 7M		0	2.1929
29 - 9		0.5	2.1929
29 - 9M		-1.5	2.1929
29 - C		1.0	2.1929
29 - M		0.5	2.1929
29M - 7	*	-2.625	2.1929
29M - 7M		-1.5	2.1929
29M - 9		-1.0	2.1929
29M - 9M	*	-3.0	2.1929

29M - C		-0.5	2.1929
29M - M		-1.0	2.1929
7 - 7M		1.125	2.1929
7 - 9		1.625	2.1929
7 - 9M		-0.375	2.1929
7 - C		2.125	2.1929
7 - M		1.625	2.1929
7M - 9		0.5	2.1929
7M - 9M		-1.5	2.1929
7M - C		1.0	2.1929
7M - M		0.5	2.1929
9 - 9M		-2.0	2.1929
9 - C		0.5	2.1929
9 - M		0	2.1929
9M - C	*	2.5	2.1929
9M - M		2.0	2.1929
C - M		-0.5	2.1929

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para % Infección por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14750,0	7	2107,14	3,42	0,0112
Intra grupos	14800,0	24	616,667		
Total (Corr.)	29550,0	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para % Infección por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
29	4	30,0	X
Control	4	30,0	X
9	4	45,0	XX
7	4	55,0	XXX
29M	4	60,0	XXX
9M	4	80,0	XX
M	4	85,0	X
7M	4	85,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
29 - 29M		-30,0	36,2409
29 - 7		-25,0	36,2409
29 - 7M	*	-55,0	36,2409
29 - 9		-15,0	36,2409
29 - 9M	*	-50,0	36,2409
29 - Control		0,0	36,2409
29 - M	*	-55,0	36,2409
29M - 7		5,0	36,2409
29M - 7M		-25,0	36,2409
29M - 9		15,0	36,2409
29M - 9M		-20,0	36,2409
29M - Control		30,0	36,2409
29M - M		-25,0	36,2409
7 - 7M		-30,0	36,2409
7 - 9		10,0	36,2409
7 - 9M		-25,0	36,2409
7 - Control		25,0	36,2409
7 - M		-30,0	36,2409
7M - 9	*	40,0	36,2409
7M - 9M		5,0	36,2409

7M - Control	*	55,0	36,2409
7M - M		0,0	36,2409
9 - 9M		-35,0	36,2409
9 - Control		15,0	36,2409
9 - M	*	-40,0	36,2409
9M - Control	*	50,0	36,2409
9M - M		-5,0	36,2409
Control - M	*	-55,0	36,2409

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Total Esporas por Código

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	97.5688	7	13.9384	0.64	0.7150
Intra grupos	518.94	24	21.6225		
Total (Corr.)	616.509	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Total Esporas por Código

Método: 95.0 porcentaje LSD

Código	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	11.15	X
Aa7	4	14.025	X
M	4	14.175	X
Aa9	4	14.45	X
Da29 - M	4	15.7	X
Da29	4	16.05	X
Aa9 - M	4	16.625	X
Aa7 - M	4	16.875	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		-2.85	6.78621
Aa7 - Aa9		-0.425	6.78621
Aa7 - Aa9 - M		-2.6	6.78621
Aa7 - Control		2.875	6.78621
Aa7 - Da29		-2.025	6.78621
Aa7 - Da29 - M		-1.675	6.78621
Aa7 - M		-0.15	6.78621
Aa7 - M - Aa9		2.425	6.78621
Aa7 - M - Aa9 - M		0.25	6.78621
Aa7 - M - Control		5.725	6.78621
Aa7 - M - Da29		0.825	6.78621
Aa7 - M - Da29 - M		1.175	6.78621
Aa7 - M - M		2.7	6.78621
Aa9 - Aa9 - M		-2.175	6.78621
Aa9 - Control		3.3	6.78621
Aa9 - Da29		-1.6	6.78621
Aa9 - Da29 - M		-1.25	6.78621
Aa9 - M		0.275	6.78621
Aa9 - M - Control		5.475	6.78621
Aa9 - M - Da29		0.575	6.78621
Aa9 - M - Da29 - M		0.925	6.78621
Aa9 - M - M		2.45	6.78621
Control - Da29		-4.9	6.78621
Control - Da29 - M		-4.55	6.78621
Control - M		-3.025	6.78621
Da29 - Da29 - M		0.35	6.78621
Da29 - M		1.875	6.78621
Da29 - M - M		1.525	6.78621

* indica una diferencia significativa.

- **Producción de frutos**

Tabla ANOVA para N° Frutos por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	70.3438	7	10.0491	5.73	0.0006
Intra grupos	42.125	24	1.75521		
Total (Corr.)	112.469	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para N° Frutos por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	2.5	X
Aa9	4	2.5	X
Da29	4	4.25	XX
Aa7 - M	4	4.25	XX
Da29 - M	4	5.0	X
Aa7	4	5.125	X
Aa9 - M	4	5.25	X
M	4	7.375	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		0.875	1.93348
Aa7 - Aa9	*	2.625	1.93348
Aa7 - Aa9 - M		-0.125	1.93348
Aa7 - Control	*	2.625	1.93348
Aa7 - Da29		0.875	1.93348
Aa7 - Da29 - M		0.125	1.93348
Aa7 - M	*	-2.25	1.93348
Aa7 - M - Aa9		1.75	1.93348
Aa7 - M - Aa9 - M		-1.0	1.93348
Aa7 - M - Control		1.75	1.93348
Aa7 - M - Da29		0	1.93348
Aa7 - M - Da29 - M		-0.75	1.93348
Aa7 - M - M	*	-3.125	1.93348
Aa9 - Aa9 - M	*	-2.75	1.93348
Aa9 - Control		0	1.93348
Aa9 - Da29		-1.75	1.93348
Aa9 - Da29 - M	*	-2.5	1.93348
Aa9 - M	*	-4.875	1.93348
Aa9 - M - Control	*	2.75	1.93348
Aa9 - M - Da29		1.0	1.93348
Aa9 - M - Da29 - M		0.25	1.93348
Aa9 - M - M	*	-2.125	1.93348
Control - Da29		-1.75	1.93348
Control - Da29 - M	*	-2.5	1.93348
Control - M	*	-4.875	1.93348
Da29 - Da29 - M		-0.75	1.93348
Da29 - M	*	-3.125	1.93348
Da29 - M - M	*	-2.375	1.93348

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Peso por Fruto por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.4316	7	0.0616571	4.13	0.0041
Intra grupos	0.35815	24	0.0149229		
Total (Corr.)	0.78975	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso por Fruto por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	0.2975	X
Da29	4	0.325	X
M	4	0.44	XX
Aa7	4	0.4425	XX
Aa9	4	0.545	X
Aa7 - M	4	0.59	X
Aa9 - M	4	0.605	X
Da29 - M	4	0.605	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		-0.1475	0.178279
Aa7 - Aa9		-0.1025	0.178279
Aa7 - Aa9 - M		-0.1625	0.178279
Aa7 - Control		0.145	0.178279
Aa7 - Da29		0.1175	0.178279
Aa7 - Da29 - M		-0.1625	0.178279
Aa7 - M		0.0025	0.178279
Aa7 - M - Aa9		0.045	0.178279
Aa7 - M - Aa9 - M		-0.015	0.178279
Aa7 - M - Control	*	0.2925	0.178279
Aa7 - M - Da29	*	0.265	0.178279
Aa7 - M - Da29 - M		-0.015	0.178279
Aa7 - M - M		0.15	0.178279
Aa9 - Aa9 - M		-0.06	0.178279
Aa9 - Control	*	0.2475	0.178279
Aa9 - Da29	*	0.22	0.178279
Aa9 - Da29 - M		-0.06	0.178279
Aa9 - M		0.105	0.178279
Aa9 - M - Control	*	0.3075	0.178279
Aa9 - M - Da29	*	0.28	0.178279
Aa9 - M - Da29 - M		0	0.178279
Aa9 - M - M		0.165	0.178279
Control - Da29		-0.0275	0.178279
Control - Da29 - M	*	-0.3075	0.178279
Control - M		-0.1425	0.178279
Da29 - Da29 - M	*	-0.28	0.178279
Da29 - M		-0.115	0.178279
Da29 - M - M		0.165	0.178279

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Peso por planta por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	66.0807	7	9.4401	4.07	0.0045
Intra grupos	55.6384	24	2.31827		
Total (Corr.)	121.719	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso por planta por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	0.652917	X
Da29	4	2.69083	XX
Aa9 - M	4	2.7225	XX
M	4	3.805	XX
Aa7 - M	4	3.83417	XX
Da29 - M	4	4.8275	XX
Aa7	4	5.08625	X
Aa9	4	5.1575	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		1.25208	2.22206
Aa7 - Aa9		-0.07125	2.22206
Aa7 - Aa9 - M	*	2.36375	2.22206
Aa7 - Control	*	4.43333	2.22206
Aa7 - Da29	*	2.39542	2.22206
Aa7 - Da29 - M		0.25875	2.22206
Aa7 - M		1.28125	2.22206
Aa7 - M - Aa9		-1.32333	2.22206
Aa7 - M - Aa9 - M		1.11167	2.22206
Aa7 - M - Control	*	3.18125	2.22206
Aa7 - M - Da29		1.14333	2.22206
Aa7 - M - Da29 - M		-0.993333	2.22206
Aa7 - M - M		0.0291667	2.22206
Aa9 - Aa9 - M	*	2.435	2.22206
Aa9 - Control	*	4.50458	2.22206
Aa9 - Da29	*	2.46667	2.22206
Aa9 - Da29 - M		0.33	2.22206
Aa9 - M		1.3525	2.22206
Aa9 - M - Control		2.06958	2.22206
Aa9 - M - Da29		0.0316667	2.22206
Aa9 - M - Da29 - M		-2.105	2.22206
Aa9 - M - M		-1.0825	2.22206
Control - Da29		-2.03792	2.22206
Control - Da29 - M	*	-4.17458	2.22206
Control - M	*	-3.15208	2.22206
Da29 - Da29 - M		-2.13667	2.22206
Da29 - M		-1.11417	2.22206
Da29 - M - M		1.0225	2.22206

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Diametro por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.20875	7	0.0298214	3.74	0.0071
Intra grupos	0.19125	24	0.00796875		
Total (Corr.)	0.4	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diametro por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	4	0.55	X
Da29	4	0.6	XX
Aa7	4	0.675	XXX
M	4	0.7	XX
Aa9 - M	4	0.7625	X
Da29 - M	4	0.7625	X
Aa9	4	0.775	X
Aa7 - M	4	0.775	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Aa7 - Aa7 - M		-0.1	0.130277
Aa7 - Aa9		-0.1	0.130277
Aa7 - Aa9 - M		-0.0875	0.130277
Aa7 - Control		0.125	0.130277
Aa7 - Da29		0.075	0.130277
Aa7 - Da29 - M		-0.0875	0.130277
Aa7 - M		-0.025	0.130277
Aa7 - M - Aa9		0	0.130277

Aa7 - M - Aa9 - M		0.0125	0.130277
Aa7 - M - Control	*	0.225	0.130277
Aa7 - M - Da29	*	0.175	0.130277
Aa7 - M - Da29 - M		0.0125	0.130277
Aa7 - M - M		0.075	0.130277
Aa9 - Aa9 - M		0.0125	0.130277
Aa9 - Control	*	0.225	0.130277
Aa9 - Da29	*	0.175	0.130277
Aa9 - Da29 - M		0.0125	0.130277
Aa9 - M		0.075	0.130277
Aa9 - M - Control	*	0.2125	0.130277
Aa9 - M - Da29	*	0.1625	0.130277
Aa9 - M - Da29 - M		0	0.130277
Aa9 - M - M		0.0625	0.130277
Control - Da29		-0.05	0.130277
Control - Da29 - M	*	-0.2125	0.130277
Control - M	*	-0.15	0.130277
Da29 - Da29 - M	*	-0.1625	0.130277
Da29 - M		-0.1	0.130277
Da29 - M - M		0.0625	0.130277

* indica una diferencia significativa.