

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA
ASOCIADA AL CULTIVO DE TARWI (*Lupinus mutabilis Sweet*)”**

Presentada por:

Lucero Huasasquiche Sarmiento

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA
ASOCIADA AL CULTIVO DE TARWI (*Lupinus mutabilis Sweet*)”**

Presentada por:

Lucero Huasasquiche Sarmiento

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
PRESIDENTE

M. Sc. Katty Ogata Gutiérrez
MIEMBRO

Dr. Félix Camarena Mayta
MIEMBRO

Mg. Sc. Patricia Moreno Díaz
ASESORA

Ph. D. Jorge Jiménez Dávalos
CO - ASESOR

Dedicado a los ángeles de mi familia:

Ademar, mi hermano mayor

Ángel y Augusto, mis abuelitos

y Arquímedes, mi tío.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Martín y Natalia, por haberme brindado siempre su apoyo incondicional en las decisiones de mi vida.

A mis hermanas Naomi y Rosita, por ayudarme cada día a ser una mejor hermana mayor.

A mi Ricardo, por enseñarme a amar y ser protagonista de mi felicidad.

A mi familia en general, tíos, tías, primos y primas, especialmente a Leonor, Luz, Norma, Lucho y Jesús por ayudarme de muchas maneras a mis hermanas y a mí desde pequeñas.

A mis dos abuelitas, ambas Rositas.

A mi asesora, Patricia Moreno, por ser no sólo una guía en la realización de este proyecto, sino también una amiga.

Al profesor Jorge Jiménez, por abrirme las puertas de su laboratorio sin condición alguna.

Al jurado calificador, por su tiempo e interés en ayudarme a presentar esta investigación de la mejor manera posible.

A las NCKL, por ser mis hermanas de corazón y alentarme siempre a seguir adelante.

A Pierina, por ser mi molinera favorita y acompañarme con alegrías durante toda la carrera.

A Nadine, por ser la mejor ayudante de tesis y una amiga de gran corazón.

A todos mis compañeros en el laboratorio del Programa de Cereales: en especial Ángel, Piero, Jose, Manuel, Cinthya, Leia, Geancarlo, Gastón, Eva, Giordara, Sra. Ruth, Sr. Williams, Sr. Luchito, porque de alguna u otra forma alegraron mis días en el laboratorio.

A la UNALM, por darme unos cinco inolvidables años y la dicha de ser molinera.

A la Oficina de Investigación de mi universidad, por el financiamiento brindado para esta investigación, en especial al Ing. Rafael Inga, por su enorme comprensión y amabilidad.

A todos aquellos que me faltaron mencionar pero estuvieron apoyándome a lo largo de mi carrera.

Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. LAS LEGUMINOSAS	3
2.1.1. Beneficios de las múltiples leguminosas	4
a) Las leguminosas como alimento funcional	4
b) Las leguminosas y el mantenimiento de la fertilidad del suelo	5
2.2. EL LUPINO (LUPINUS SPP.)	6
2.2.1. Toxicidad	6
2.2.2. El tarwi o lupino andino (Lupinus mutabilis Sweet.)	7
a) Clasificación taxonómica (Jacobsen y Mujica, 2006)	7
b) Descripción botánica	7
c) Distribución geográfica	8
d) Importancia económica de Lupinus mutabilis Sweet.	8
2.3. INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO	10
2.3.1. Los microorganismos endófitos	11
2.3.2. Promoting Growth Plant Rhizobacteria (PGPR)	12
a) Producción de Ácido Indol Acético	12
b) Solubilización de fosfato	13
c) Antagonismo contra patógenos	14
d) Producción de sideróforos	15
e) Fijación de nitrógeno atmosférico	16
2.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	17
2.4.1. Amplificación de elementos BOX	17
2.4.2. Secuenciamiento del gen ribosómico 16S	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. MATERIALES	19
3.1.1. Material Biológico	19

a) Material vegetal	19
b) Hongos y bacterias.....	19
3.1.2. Medios de cultivo.....	19
3.1.3. Reactivos y soluciones.....	20
3.1.4. Sustratos.....	21
3.1.5. Equipos de laboratorio e instrumentos.....	21
3.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	22
3.2.1. Población de estudio	22
3.2.2. Variables de estudio.....	22
3.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	23
3.4. OBSERVACIÓN DE MICORRIZAS	23
3.5. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	23
3.5.1. Aislamientos a partir de nódulos	23
a) Esterilización superficial	23
b) Siembra en medio de cultivo	24
3.5.2. Aislamiento a partir de rizósfera.....	24
3.5.3. Aislamiento a partir de raíces y tallos.....	24
a) Esterilización superficial y maceración.....	24
b) Siembra en medio de cultivo	25
3.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	25
3.6.1. Caracterización microscópica	25
3.6.2. Caracterización macroscópica	25
3.7. CUANTIFICACIÓN IN VITRO DE NITRÓGENO FIJADO.....	26
3.8. CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDADES PGPR	26
3.8.1. Prueba de producción de ácido indol acético (AIA).....	26
3.8.2. Prueba de solubilización de fosfato	27
3.8.3. Prueba de antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i>	27
3.8.4. Prueba de germinación in vitro.....	27
3.8.5. Prueba de producción de sideróforos.....	28
3.9. PRUEBA EN INVERNADERO.....	28
3.10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	29
3.10.1. Extracción de ADN.....	29
3.10.2. Amplificaciones BOX.....	30
3.10.3. Amplificación gen r16S	30

3.10.4. Purificación de producto PCR	31
3.10.5. Secuenciamiento de gen r16S	31
3.10.6. Construcción de árbol filogenético	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	33
4.2. OBSERVACIÓN DE MICORRIZAS	36
4.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	37
4.4. AISLAMIENTOS FÚNGICOS	39
4.4.1. Caracterización macroscópica	39
4.4.2. Prueba de antagonismo contra patógeno de tarwi e identificación microscópica	42
4.5. AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE RÁPIDO CRECIMIENTO	49
4.5.1. Caracterización por capacidades de promoción del crecimiento de plantas	49
a) Producción de ácido indol acético (AIA)	49
b) Solubilización de fosfato	51
c) Antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i>	53
d) Producción de sideróforos	54
4.5.2. Caracterización macroscópica y microscópica	56
4.5.3. Integración de las capacidades promotoras de crecimiento vegetal	59
4.5.4. Prueba de germinación in vitro	60
4.5.5. Prueba en invernadero	66
4.5.6. Prueba de fijación de nitrógeno in vitro.....	70
4.5.7. Caracterización molecular	71
a) Extracción de ADN	71
b) Amplificación BOX.....	72
c) Amplificación y purificación del gen ribosomal 16S	75
4.6. AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE LENTO CRECIMIENTO.....	81
4.6.1. Caracterización macroscópica	82
4.6.2. Prueba de fijación de nitrógeno in vitro.....	83
4.6.3. Caracterización molecular	84
a) Extracción de ADN	84
b) Amplificación BOX.....	85

V. CONCLUSIONES	89
VI. RECOMENDACIONES	90
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
VIII.ANEXOS.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de la composición del tarwi y la soya	9
Tabla 2: Aislamientos fúngicos provenientes de PC e IRD	37
Tabla 3: Aislamientos bacterianos de rápido crecimiento provenientes de PC e IRD.....	38
Tabla 4: Características macroscópicas de los aislamientos más frecuentes.....	39
Tabla 5: Cepas seleccionadas por producción de AIA (nivel 2 y 3)	51
Tabla 6: ERS en los aislados positivos para prueba de solubilización.....	53
Tabla 7: Porcentajes de inhibición de aislamientos de rápido crecimiento frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	54
Tabla 8: ERP de sideróforos por los aislados bacterianos de rápido crecimiento.....	56
Tabla 9: Caracterización macroscópica de los 36 aislados seleccionados	57
Tabla 10: Caracterización microscópica de los 36 aislados seleccionados	58
Tabla 11: Integración de los resultados en las pruebas PGPR	59
Tabla 12: Longitud de inflorescencia, peso fresco y peso seco de plántulas de tarwi	69
Tabla 13: Producción de amonio por aislados bacterianos de rápido crecimiento.....	71
Tabla 14: Concentraciones y purezas de ADN para aislados de rápido crecimiento.....	72
Tabla 15: Concentraciones y purezas de producto PCR para aislados de rápido crecimiento.....	75
Tabla 16: Distribución taxonómica de los aislamientos identificados	77
Tabla 17: Caracterización macroscópica de colonias de lento crecimiento	82
Tabla 18: Producción de ion amonio por aislados bacterianos de lento crecimiento.....	84
Tabla 19: Concentraciones y pureza de ADN para aislados bacterianos de lento crecimiento.....	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Planta de <i>Lupinus mutabilis</i>	7
Figura 2: Flujo de trabajo para la metodología de la investigación.....	32
Figura 3: Tratamientos de desinfección superficial.....	34
Figura 4: Tallos fistulosos y nódulos pleomórficos de <i>Lupinus mutabilis</i>	34
Figura 5: Puntos de recolección de las plantas de tarwi en el segundo muestreo	35
Figura 6: Puntos de recolección de plantas de tarwi en el tercer muestreo. En negro: rizósfera, tallos y raíces. En celeste: nódulos	36
Figura 7: Ausencia de micorrizas en las raíces de tarwi.....	37
Figura 8: Prueba de antagonismo de aislados fúngicos contra <i>Fusarium oxysporum</i>	42
Figura 9: Características de la cepa 134, en agar OGY y al microscopio (100X).....	43
Figura 10: Características de la cepa 131, en agar OGY y al microscopio (100X).....	43
Figura 11: Características de la cepa 96, en agar OGY y al microscopio (100X).....	44
Figura 12: Características de la cepa 99, en agar OGY y al microscopio (100X).....	44
Figura 13: Características de la cepa 40, en agar OGY y al microscopio (100X).....	45
Figura 14: Características de la cepa 43, en agar OGY y al microscopio (100X).....	45
Figura 15: Características de la cepa 103, en agar OGY y al microscopio (100X).....	46
Figura 16: Características de la cepa 47, en agar OGY y al microscopio (100X).....	46
Figura 17: Características de la cepa 105, en agar y al microscopio (100X)	47
Figura 18: Producción de AIA por aislados bacterianos de rápido crecimiento	50
Figura 19: Solubilización de fosfato tricálcico por los aislados bacterianos de rápido crecimiento.....	52
Figura 20: Antagonismo de aislados bacterianos contra <i>Fusarium oxysporum</i>	54
Figura 21. Producción de sideróforos por aislados bacterianos de rápido crecimiento.....	55
Figura 22: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 3 días después del sembrado	61
Figura 23: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 4 días después del sembrado	62
Figura 24: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 5 días después del sembrado	63

Figura 25: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 6 días después del sembrado	64
Figura 26: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 7 días después del sembrado	65
Figura 27: Gráfico de altura de plantas de tarwi vs. días después de la inoculación para los cuatro tratamientos	67
Figura 28: Efecto de la inoculación en la altura de plantas de tarwi	68
Figura 29: Frutos de <i>Lupinus mutabilis</i> observado en tratamiento TB05	68
Figura 30: Formación del compuesto de indofenol en el método de Berthelot.....	70
Figura 31: Perfiles BOX de aislados de rápido crecimiento. Carril 1-6: NR01 – NR06, carril 7: RB08, carril 8: TB01, carril 9: RB02, carril 10: RB10, carril 11: RB01, carril 12: TB05, carril 13: RB14, carril 14: RB22	73
Figura 32: Dendograma generado por la combinación de presencia/ausencia de bandas en los perfiles electroforéticos BOX para bacterias de rápido crecimiento. Método de agrupamiento: UPGMA. Coeficiente de similaridad: Jaccard.....	74
Figura 33: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARN perteneciente a la clase Betaproteobacteria	79
Figura 34: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARN perteneciente al phylum Firmicutes	80
Figura 35: Cepas de lento crecimiento	83
Figura 36: Perfiles BOX de bacterias de lento crecimiento	86
Figura 37: Dendograma generado por la combinación de presencia/ausencia de bandas en los perfiles electroforéticos BOX para bacterias de lento crecimiento. Método de agrupamiento: UPGMA. Coeficiente de similaridad: Jaccard.....	87

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Preparación de los medios de cultivo y reactivos empleados	111
Anexo 2: Procedimiento para preparar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio (Lara <i>et al.</i> , 2007).....	117
Anexo 3: Preparación de patrón de turbidez McFarland (Pasterán y Galas, 2008).....	119
Anexo 4: Campos para la recolección de las muestras.....	120
Anexo 5: Caracterización macroscópica de aislados fúngicos	121
Anexo 6: Prueba de antagonismo de aislados fúngicos contra <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	133
Anexo 7: Identificación microscópica de cepa fúngica 96.....	135
Anexo 8. Prueba de producción de AIA para aislados bacterianos de rápido crecimiento.....	136
Anexo 9. Prueba de antagonismo de aislados bacterianos rápidos contra <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	138
Anexo 10: Tinción Gram para aislados de rápido crecimiento	139
Anexo 11. Análisis estadístico para la prueba de germinación <i>in vitro</i>	142
Anexo 12. Colonias significativas para la prueba de germinación <i>in vitro</i>	145
Anexo 13: Análisis estadístico para la prueba de invernadero	146
Anexo 14. Regresión lineal para patrón de cloruro de amonio en la prueba de fijación de nitrógeno	151

RESUMEN

El lupino andino es una leguminosa nativa de la sierra peruana de gran importancia nutricional y cultural. Este cultivo tiene características ventajosas en el sector agrícola, probablemente debido a la microflora asociada con él. Sin embargo, hay pocos estudios que aborden la interrelación microorganismo - planta en el tarwi. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo establecer un estudio de referencia sobre los microorganismos simbioses de este cultivo. Se realizó un aislamiento de cepas de bacterias y hongos a partir de la rizósfera, raíces, tallos y nódulos de tarwi de dos regiones: La Molina y Jauja. Las cepas se caracterizaron por su producción de ácido indol acético (AIA), solubilización de fosfatos tricálcicos, producción de sideróforos, antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, fijación *in vitro* de nitrógeno y efecto sobre el crecimiento de plántulas de tarwi. Entre los aislamientos de hongos, el antagonista más activo fue la cepa N ° 131 con un porcentaje de inhibición del 74% contra el patógeno. Por observación microscópica, se identificó la cepa perteneciente al género *Aspergillus*. La prueba de producción AIA fue una evaluación inicial para reducir los aislamientos bacterianos. Luego, se evaluó la solubilización de fosfatos con una eficiencia de hasta 496.6% (RB10), la producción de sideróforos con una eficiencia de hasta 500% (RB08) y antagonismo contra *F. oxysporum* con un porcentaje de inhibición de hasta 49.3% (RB11). Las cepas bacterianas se identificaron mediante el análisis de secuenciamiento de 16S rRNA y el genotipado molecular mediante BOX-PCR, indicando que la mayoría pertenecía a la familia *Bacillaceae* del phylum Firmicutes. Finalmente, las semillas de tarwi se inocularon con la cepa RB01, TB05 y una mezcla RB10-RB14, para evaluar su efecto promotor de crecimiento vegetal. Las plántulas inoculadas con la cepa TB05 tuvieron mejores valores en términos de altura, con un aumento del 11% en comparación al control. Los resultados en esta investigación sugieren un potencial para desarrollar biofertilizantes a partir de estos microorganismos.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis*, PGPR, biofertilizantes.

ABSTRACT

Andean lupin is a native legume of the Peruvian highlands with a great nutritional and cultural importance. This crop has advantageous characteristics in the agricultural sector, probably due to the microflora associated with it. However, there are only few studies addressing the microorganism-plant interrelation in lupin. Thus, the present work aims to establish a baseline study about the symbiont microorganisms of this crop. An isolation of bacteria and fungi strains was carried out from the native rhizosphere, roots, stems and nodules of lupin crops from two regions: La Molina and Jauja. Strains were characterized for their production of indol acetic acid (IAA), solubilization of tricalcic phosphates, production of siderophores, antagonism against *Fusarium oxysporum*, *in vitro* fixation of nitrogen and effect on growth of tarwi seedlings. Among fungal isolations, the most active antagonist was strain N°131 with a percentage of inhibition of 74% against the pathogen. By microscopic observation, the strain was identified belonging to the genus *Aspergillus*. The IAA production test was an initial screening to reduce bacterial isolations. Then, phosphates solubilization was evaluated with an efficiency of up to 496.6% (RB10), the siderophores production with an efficiency of up to 500% (RB08) and antagonism against *F. oxysporum* with a percentage of inhibition of up to 49.3% (RB11). Bacterial strains were identified using sequence analysis of 16S rRNA and molecular genotyping by BOX-PCR, stating that majority belonged to the *Bacillaceae* family of the Firmicutes phylum. Finally, seeds from tarwi was inoculated with strain RB01, TB05 and a RB10-RB14 mix, in order to evaluate their plant growth promoting effect. Seedling inoculated with the TB05 strain had better values in terms of height, with an increase of 11% compared to the control. The results in this investigation suggest a potential to develop biofertilizers from these microorganisms.

Key words: *Lupinus mutabilis*, PGPR, biofertilizers.

I. INTRODUCCIÓN

El Lupino (*Lupinus mutabilis*, Sweet), también conocido como *tarwi* o *chocho* es una legumbre andina, domesticada por los pueblos indígenas del antiguo Perú. Es un cultivo originario de la sierra de Bolivia, Ecuador y Perú, con un alto contenido proteico y ácidos grasos. En el Perú se cultiva principalmente en las zonas de Cajamarca, Ancash, en el Valle del Mantaro, Ayacucho, Cuzco y Puno (Eastwood et al., 2008). Debido a su buen sabor, alto contenido proteico (Porrás-Saavedra et al., 2013), hierro y vitaminas, el consumo de esta leguminosa se ha incrementado en los últimos años como alternativa al consumo de soya, principalmente aquella de origen transgénico. Sin embargo, debido a la presencia de alcaloides, el tarwi tiene un sabor amargo en su semilla (Wink et al., 1995, Ganzera et al., 2010), por lo que se requiere de un proceso de lavado previo para su consumo, constituyendo una desventaja frente a otras leguminosas. Desde un enfoque industrial, el tarwi presenta alternativas como la producción de harina para alimentación humana, extracción de aceite comestible, industria farmacéutica de los alcaloides que se obtienen del desamargado del grano de tarwi como biocida en el control de ectoparásitos y parásitos intestinales de animales, en el control de plagas (Boza, 1981 mencionado por Camarena et al., 2012), entre otros. Muchos agricultores plantan el lupino como planta protectora que funciona como repelente contra herbívoros así como contra bacterias y hongos patógenos y es debido a este contenido de alcaloides. Existe también investigación que evidencia en humanos las propiedades terapéuticas del lupino para el control de los niveles de colesterol, diabetes e hipertensión (Guadagnucci et al., 2012, Fornasini et al., 2012).

El lupino tiene una excelente capacidad para el control de la erosión del suelo debido a su raíz pivotante vigorosa y ramificada que crece profundamente. Estudiando la interacción del cultivo con los microorganismos del suelo, se ha observado la presencia de una comunidad bacteriana asociada a su rizósfera con variaciones sujetas a las condiciones de cultivo, más que al momento fisiológico o especie de *Lupinus* estudiada (Lucas-García et al., 2000).

Al igual que otras leguminosas esta planta fija su propio nitrógeno con la presencia de bacterias del grupo *Rhizobium* que desarrollan en nódulos. La presencia de otros microorganismos endófitos asociados al cultivo también ha sido reportada, siendo la ocurrencia de micorrizas vesículo arbusculares muy variable y a veces escasa entre las especies estudiadas (O' Dell y Trappe, 1992, Oba et al., 2001). En algunas especies de *Lupinus* se han encontrado diferentes endófitos asociados a los nódulos, entre ellos, *Micromonospora*, una actinobacteria fijadora de nitrógeno coexistiendo con *Bradyrhizobium* (Trujillo et al., 2007), bacterias gram positivas del género *Paenibacillus* (Carro et al., 2014), y aislamientos de *Microvirga* y *Bosea* (Ardley et al., 2012; De Meyer y Willems, 2012). La ocurrencia de estas bacterias en nódulos de lupino así como en otras plantas leguminosas, lleva a plantearnos la necesidad de conocer el estado de la microbiota presente en *Lupinus mutabilis*, la cual puede estar brindando un efecto beneficioso a la planta de varias maneras, ya sea mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad protectora frente a patógenos, como fijadores de nitrógeno complementarios, o como promotores del crecimiento vegetal.

En base a lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo de investigación fue:

Aislar y caracterizar la microflora presente en rizósfera, raíces, tallos y nódulos del cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis*), observando la influencia en el crecimiento de éste.

Para tal fin los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar las cepas aisladas por sus capacidades PGPR tanto de la rizósfera como de tallos, raíces y nódulos.
- Analizar e identificar molecularmente a los aislados de rizósfera y endófitos no rizobiales asociados a *Lupinus mutabilis*.
- Evaluar la influencia de estos microorganismos en plántulas de *Lupinus mutabilis* bajo condiciones de invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LAS LEGUMINOSAS

Pertenecen a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, una de las familias botánicas más importantes en la flora tropical que incluye numerosas especies con una gran variedad de portes y formas de vida (Ceroni, 2003). Se han identificado más de 700 géneros y 19 000 especies en esta familia (Rodríguez, 2008); y uno de los géneros de mayor importancia es *Lupinus*, con alrededor de 200 especies en el continente americano y por lo tanto con mayor diversidad genética que las especies europeas (Barrera et al., 1996 mencionado por Camarena et al., 2012).

Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias: *Faboideae* que pueden ser árboles, arbustos y herbáceas; *Mimosoideae*, árboles pequeños y arbustos, y *Caesalpinioideae*, constituida por árboles (Strasburger, 2004 mencionado por Rodríguez, 2008).

El nombre de leguminosas les viene dado por el fruto, que recibe el nombre de legumbre. Este fruto consta de una vaina aplanada con una sola cámara que suele abrirse a lo largo de dos suturas, en las que se encuentran ubicadas longitudinalmente las semillas. Bajo la denominación genérica “leguminosas” se incluyen muchas especies de características similares, que se aprovechan de distintas maneras ya sea como grano seco, grano verde, forraje o aceite. Análisis estadísticos a nivel mundial consideran como leguminosas de grano a aquellas que son aprovechadas para consumo humano o animal (Rodríguez, 2008).

Desde 1945, la FAO organiza la compilación de estadísticas sobre producción y cultivos por países y regiones. En el caso de las legumbres, es difícil conocer de forma real los rendimientos de la producción, ya que, aunque se producen en todo el mundo, en algunos países presentan un cultivo familiar y una comercialización local, por lo que sus rendimientos son inciertos.

Un estudio realizado por la FAO sobre los mercados mundiales de legumbres, presentado en la Cuarta Conferencia Internacional de Investigaciones sobre Leguminosas Alimentarias celebrada en Nueva Delhi del 18 al 22 de octubre de 2005, se examinó la situación de los mercados internacionales de legumbres durante el período 1980-2004 y se analizaron algunos de los principales problemas a los que hace frente este importante sector alimentario, concluyendo principalmente que la producción mundial de legumbres ha aumentado desde 1980 y más aún en los países desarrollados debido a que la producción interna pudo mantenerse al ritmo del crecimiento demográfico y que en los países en desarrollo, la producción y el consumo de legumbres repercuten considerablemente en la seguridad alimentaria de los sectores más pobres de la población que dependen de los alimentos de origen vegetal para cubrir sus necesidades de proteínas y calorías. Recomiendan, por lo tanto, que se refuerce el desarrollo de nuevas variedades de legumbres y de tecnologías de cultivos mediante políticas adecuadas, programas de apoyo a la educación y capacitación de los agricultores, un suministro mejorado de insumos y crédito, y la promoción de canales de comercialización apropiados (FAO, 2005).

2.1.1. Beneficios de las múltiples leguminosas

a) Las leguminosas como alimento funcional

Desde su aparición en la tierra hace 60 millones de años, las leguminosas junto con los cereales y algunas frutas han sido la base esencial de la alimentación humana (Lavin et al., 2005 mencionado por Rodríguez, 2008). En el Perú, principalmente en las comunidades rurales de los Andes, la alimentación es a base de vegetales, predominando los tubérculos; los cuales son ricos en hidratos de carbono pero pobres en algunos de los aminoácidos esenciales. El consumo de granos (quinua, cañihua y kiwicha) y de leguminosas (tarwi y frijol) compensan las carencias de los tubérculos (Ayala, 2004).

Las semillas leguminosas son una fuente de proteína rica en lisina que se complementa muy bien con la proteína pobre en lisina de los cereales. Las cantidades proteicas en las leguminosas varía mucho según la especie, pero incluso las de menor contenido presentan, aproximadamente un valor tres veces superior al arroz (Gil, 2010). Las legumbres son la principal fuente de proteínas en la alimentación humana, ya que constituyen el único aporte de componentes nitrogenados en la dieta de los países en vías de desarrollo. Sin embargo, su valor nutricional es pobre comparado con las proteínas de origen animal debido a dos

factores principalmente: 1) las proteínas de leguminosas son limitantes en contenido de aminoácidos esenciales azufrados (metionina y cisteína) y 2) presentan inhibidores de proteasas que afectan la actividad de las proteasas digestivas. Se puede mejorar o superar estos factores durante la preparación culinaria de las legumbres, ya sea por calor (que inactiva a los inhibidores) o por complementación con otros alimentos que en conjunto incrementan la calidad nutritiva (Gil, 2010).

Por otro lado, estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de leguminosas reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Anderson y Major, 2002 mencionados por Girón-Calle et al., 2005). Es por ello que las leguminosas podrían ser consideradas alimentos funcionales desde el punto de vista de que su consumo va más allá del suministro de nutrientes, sino también supone un efecto positivo para la salud. Sin embargo, es necesario establecer mecanismo por los cuales las leguminosas disminuyen el riesgo de padecer enfermedades para que esas alegaciones puedan hacerse sobre una base sólida (Girón-Calle et al., 2005).

b) Las leguminosas y el mantenimiento de la fertilidad del suelo

Las leguminosas con sus nódulos y su poder de fijación simbiótica de nitrógeno, son especialmente adecuadas para cobertura o abono verde porque proporcionan gran cantidad de material verde de calidad. Este material enriquece el suelo con principios nutritivos y minerales, además de devolver el nitrógeno que extrae de la planta durante su crecimiento. Sumado a ello, el nitrógeno proporcionado por las leguminosas queda retenido en el suelo durante largos períodos y es difícil que sean arrastrados por agua de lluvia.

Es por ello que, agricultores de todo el mundo han incluido a las leguminosas en sus rotaciones de cultivo debido a esta capacidad fijadora en simbiosis con bacterias presentes en los nódulos. Esta práctica tradicional está basada en la observación empírica de que las leguminosas recuperan, mantienen o aumentan la fertilidad del suelo. Si un terreno se cultiva año tras año con una gramínea, la productividad irá disminuyendo y para restaurarla será preciso romper ese ciclo anual cultivando alguna leguminosa. La mayoría de las plantas ven limitado su crecimiento por la cantidad de nitrógeno combinado del suelo, pero no así las leguminosas. Además, el análisis de nitrógeno total demuestra que cuando las leguminosas crecen sobre suelos pobres en nitrógeno aumentan la cantidad de nitrógeno fijado en el suelo. Como la única fuente posible de este nitrógeno adicional es la atmósfera, científicos

demonstraron que las legumbres a diferencia de otras plantas pueden fijar nitrógeno atmosférico, siendo esta la base química para la práctica tradicional de rotación de cultivos.

2.2. EL LUPINO (*Lupinus spp.*)

La palabra *Lupinus* procede del término latino *Lupus*=lobo, haciendo referencia a su capacidad para utilizar nutrientes del suelo que no están disponibles para otras en plantas que crecen en el mismo lugar (Meredith, 1988 mencionado por Abadín, 2008). Esta capacidad, que les otorga una ventaja competitiva adicional a su capacidad de fijación de nitrógeno, es posible gracias a la exudación de ácidos orgánicos que movilizan los nutrientes por procesos de quelación (Gerke et al., 1994 mencionado por Rodríguez, 2008).

El género *Lupinus* se encuentra ampliamente distribuido en casi todo el mundo y se reconocen dos grandes grupos separados geográficamente, con especies en el Nuevo y en el Viejo Mundo. Incluye más de 600 especies nombradas, pero solo hay cerca de 300 reconocidas como tales (Eastwood y Hughes, 2008). En el nuevo mundo, donde se encuentra, desde Alaska hasta Argentina, está el mayor número de especies, con dos centros principales de diversidad. Uno en el oeste de Norte América (100 especies) y otro en los Andes (85 especies), todas silvestres con excepción de *Lupinus mutabilis* que ha sido domesticada desde el Imperio Inca, donde tuvo una importancia relevante reflejada en los vestigios de las tumbas y dibujos en cerámicas (Barney, 2011).

2.2.1. Toxicidad

El aprovechamiento de los lupinos en el mundo se ha limitado por la presencia de sustancias tóxicas, debido principalmente a que las semillas poseen en su estructura alcaloides quinolizidínicos, que le confieren cierto grado de toxicidad y un sabor fuertemente amargo (Schöneberger e Ildefonso, 1981 mencionado por Ortega-David et al., 2010). Estas sustancias proceden del metabolismo secundario y actúan como defensa de las plantas a la infección por bacterias y hongos y contra depredadores herbívoros. Sin embargo, impiden que la semilla sin tratamiento pueda ser aprovechada para consumo (Butler, et al., 1996). Las investigaciones se han ocupado en eliminar dichas sustancias, esencialmente con un enfoque agronómico y en segundo plano con enfoque industrial (Gross et al., 1982 mencionado por Ortega-David et al., 2010).

En el caso del *L. mutabilis*, el mejoramiento agrícola no ha tenido grandes repercusiones ya que esto ha provocado la pérdida de sus características de resistencia. Actualmente el lupino andino se detoxifica mediante sucesivos lavados con agua que eliminan estas sustancias hasta niveles que permiten su consumo (Jacobsen y Mujica, 2006).

2.2.2. El tarwi o lupino andino (*Lupinus mutabilis* Sweet.)

a) Clasificación taxonómica (Jacobsen y Mujica, 2006)

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Clase: Dicotiledónea

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Tribu: Genisteas

Género: *Lupinus*

Especie: *Lupinus mutabilis* Sweet

b) Descripción botánica

El tarwi es una especie generalmente anual, de crecimiento erecto que puede alcanzar desde 0.8 m hasta más de dos metros en las plantas más altas. La raíz se caracteriza por ser bastante gruesa y pivotante. Se presencia también en las raíces un gran número de nódulos. Las hojas tienen forma de láminas de tipo digitado con un número variable de folíolos de 5 a 12, oblongos. La inflorescencia es un racimo terminal con flores dispuestas en forma verticilada. Cada flor mide alrededor de 1.2 cm de longitud y tiene la forma típica de las faboideas, es decir, la corola con cinco pétalos, uno el estandarte, dos la quilla y dos las alas (Figura 1).



Figura 1: Planta de *Lupinus mutabilis*

FUENTE: Krees, H. (2009)

El nombre asignado a esta especie de *Lupinus* como “mutabilis”, proviene precisamente de los cambios que ocurren en la coloración de la inflorescencia durante las diferentes fases de crecimiento. El fruto está constituido por una vaina, algo dehiscente; las semillas se acomodan en la vaina en una hilera, su tamaño varía de 4 hasta 15 mm (Tapia y Fries, 2007).

c) Distribución geográfica

En el continente americano existen dos centros de mayor concentración de las especies del género *Lupinus*, estos son: California en los Estados Unidos que constituye un centro de distribución en cuanto a número de especies y su diversidad, y el otro centro son los Andes Centrales, desde el sur de Colombia hasta Bolivia, donde se siembra en pequeñas parcelas. Estas se ubican en las partes medias (2200 – 3500 msnm) de los valles interandinos; el valle del Mantaro, el valle de Vilcanota (Cusco), Ayacucho y Abancay en Perú (Tapia y Fries, 2007).

Gade (1975), en sus estudios de la agricultura en el valle de Vilcanota (Cusco) opina que la principal causa que ha desencadenado la declinación del cultivo de tarwi es que no ha podido competir con otras leguminosas importadas. Esta desventaja, sin embargo, no es cierta en el aspecto agronómico, pues el tarwi se adapta a diferentes climas de los Andes donde puede llegar a tener rendimientos entre 1500 y 2500 kg por hectárea. La relegación se debe a que la semilla tiene un fuerte sabor amargo debido a un grupo de alcaloides presentes en todo el grano y que necesitan ser eliminados antes de consumir.

d) Importancia económica de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Se cultiva tradicionalmente en los Andes desde los 1500 msnm, encontrándose en Perú, Colombia, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Chile y Argentina. Sus semillas son usadas en la alimentación humana, ya que esta especie ocupa uno de los primeros lugares entre los alimentos nativos con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial. Su contenido proteico es incluso superior al de la soya (Castañeda et al., 2008) Sin embargo, el grano requiere un tratamiento previo para su consumo, siendo necesario eliminar las sustancias antinutricionales que contiene y que le permiten a la planta disponer de defensas naturales contra el ataque de insectos (Jacobsen y Mujica, 2006). Entre los antinutricionales, el ácido fítico es uno de los principales factores asociados con problemas de digestibilidad y contaminación. Es un poderoso agente quelante de cationes minerales como potasio, magnesio, hierro y zinc, con los cuales forma las llamadas sales de fitina o fitato. Éste es el

aspecto negativo del ácido fítico, ya que secuestra nutrientes necesarios para la dieta. Aunque en plantas está ampliamente distribuido entre los tejidos, se acumula principalmente en las semillas (Aravena *et al.*, 2010). Científicos en el Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA) están tratando de identificar los genes involucrados en la síntesis de ácido fítico, con el fin de encontrar variabilidad genética al contenido de este compuesto. Al existir variabilidad, y que además sea heredable, puede utilizarse para generar plantas con menor contenido de ácido fítico (Aravena *et al.*, 2010).

Su importancia también radica en la elevada cantidad de aceite que contienen sus semillas, por ello es considerada como la soya de los Andes (Jacobsen y Mujica, 2006). El mercado mundial de proteínas vegetales es actualmente dominado por la producción de soya. Por tanto, diferentes países han investigado sobre otras especies que puedan reemplazarla con el fin de reducir la dependencia (ILC, 2005). Se han estudiado varias alternativas vegetales promisorias con las que se pueda llegar a suplir esta creciente demanda. Una de estas alternativas son los lupinos (Tabla 1), plantas que están distribuidas en todo el mundo y cuyas cualidades las hacen de interés para la industria alimentaria.

Tabla 1: Comparación de la composición del tarwi y la soya

Componente (g/100g)	Tarwi	Soya
Proteína	44.3	33.4
Grasa	16.5	16.4
Carbohidratos	28.2	35.5
Fibra	7.1	5.7
Ceniza	3.3	5.5
Humedad	7.7	9.2

FUENTE: Jacobsen y Mujica (2006)

Al igual que otras leguminosas, el tarwi (*Lupinus mutabilis*) fija nitrógeno atmosférico en cantidades apreciables de 100 kg/ha, restituyendo la fertilidad del suelo cultivada en el área andina desde épocas preincaicas.

Su cultivo y consumo del grano paulatinamente están siendo disminuidos en los países andinos, sobretodo en Colombia, Argentina y Chile, no solo por falta de difusión de las formas de uso, sino también por el desinterés de las instituciones encargadas de promover su consumo y cultivo, a pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores adversos climáticos en las zonas donde se siembra (Jacobsen y Mujica, 2006).

En el Perú, se han realizado pocos estudios sobre la demanda de tarwi. Uno de ellos se basó en la producción y utilización de los cultivos andinos en el Cusco. Estos análisis revelaron que existe un patrón cultural más influenciado por los hábitos de la familia de origen que determina el tipo de alimento elegido. Por ejemplo, las habas, arverjas y tarwi son producidas en los Andes y típicas de los platillos regionales del Cusco, pero con la migración de la costa y de otros países llegó el hábito de comer la lenteja, el pallar, el frijol costeño, etc. La dieta moderna en el Perú para los últimos 40 años está reemplazando estos cultivos andinos por cultivos de origen americano, que también son ricos en proteínas, pero no logran alcanzar el valor nutritivo del tarwi (Fano y Benavides, 1992). Sumado a ello, la comercialización de estos cultivos es realizada por mujeres campesinas ubicadas en los alrededores de mercados y vendidos en “montones”, mientras que los frijoles y las lentejas se venden por kilos en puestos establecidos en los mercados o autoservicios, a precios realmente elevados (Fano y Benavides, 1992).

2.3. INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles (Cano, 2011). A principios del siglo XX, Hiltner (1904) introdujo el término rizósfera para describir la zona del suelo influenciada por el desarrollo de las raíces, las cuales inducen la proliferación de microorganismos. Las actividades metabólicas de tales poblaciones, estimuladas en la rizósfera tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Barea y Azcon-Aguilar, 1982 mencionado por Medina, 2006).

Aunque entre los componentes microbianos del suelo hay que considerar bacterias, hongos, algas, nematodos, protozoos y virus, la inmensa mayoría de los estudios sobre organismos

del suelo se refieren, principalmente a hongos y bacterias (Bowen y Rovira, 1999 mencionado por Medina, 2006).

En el caso de las bacterias, a aquellas que son beneficiosas para el crecimiento vegetal y son de vida libre se les ha denominado PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper, 1993). Las PGPR influyen de forma directa en el crecimiento de la planta, a través de la síntesis de distintos compuestos o indirectamente, evitando o previniendo el ataque de organismos patógenos. Los mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por parte de estas bacterias son la movilización de nutrientes (Zboinska et al., 1992), producción de fitohormonas (Bothe et al., 1992 mencionado por Rodríguez, 2008), formación de sideróforos (Leong, 1986) y producción de antibióticos y antimicóticos (Haas et al., 1991).

2.3.1. Los microorganismos endófitos

El término hace referencia a los microorganismos que colonizan los tejidos internos de las plantas superiores sin causar daño o enfermedad aparente en la planta, más bien otorgándole beneficios mediante la producción de metabolitos de importancia y otros. Hasta el año 2001 todas las bacterias conocidas involucradas en la simbiosis de los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas estuvieron restringidas a las α -proteobacterias *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Actualmente se cuentan con muchos reportes acerca de otros géneros presentes y coexistentes con los diazotrofos en leguminosas, puede mencionarse a *Burkholderia* y *Cupriavidus* en nódulos de Mimosa (Barrett y Parker, 2006) *Herbaspirillum lusinatum* en nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Valverde et al., 2003), *Microvirga lupini*, *Microvirga lotononidis* y *Microvirga zambiensis* asociados a las leguminosas nativas *Listia angolensis* y *Lupinus texensis* (Ardley et al., 2012), *Micromonospora* en nódulos de Medicago sativa (Martínez-Hidalgo et al., 2014), siendo observada en la mayor parte de los casos la capacidad fijadora de nitrógeno o una función complementaria de este proceso con estos endófitos. En *Lupinus* también se han descrito especies endófitas presentes en los nódulos como *Paenibacillus lupini* en *L. albus* (Carro et al., 2014), *Bosea lupinis* una alfa proteobacteria asociada con *L. polyphyllus* (De Meyer y Willems, 2012), *Cohnella lupini* en *L. albus* (Flores-Félix et al., 2014), *Kribbella lupini*, *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis*, actinobacterias aisladas a partir de nódulos de *Lupinus angustifolius* (Trujillo et al., 2006, Trujillo et al., 2007, Trujillo et al., 2010), estos y otros autores han relacionado al género *Micromonospora* como un co-

simbionte para la fijación biológica del nitrógeno, con actividad protectora contra patógenos y como promotor del crecimiento vegetal. El género *Lupinus* es comúnmente considerada una leguminosa no hospedera de hongos micorrizógenos, sin embargo, existen reportes de su colonización en algunas especies (Oba et al., 2001). En *Lupinus mutabilis* (tarwi), no existen a la fecha estudios de endófitos no rizobiales presentes en los nódulos o en otros tejidos de la planta, si bien se documenta la naturaleza de sus exudados y la capacidad de solubilización de la roca fosfatada (Cifuentes et al., 2001, Pearse et al., 2006), actividades que pueden estar asociadas a una microflora de importancia.

2.3.2. Promoting Growth Plant Rhizobacteria (PGPR)

El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) fue introducido por primera vez por Kloepper y Schroth (1978), para describir las rizobacterias que inducen eficientemente el crecimiento de las plantas e incrementan su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. Los mecanismos mediante los cuales estas bacterias actúan sobre el crecimiento vegetal son cada vez más estudiados, por lo que ha surgido un amplio rango de posibilidades que incluye efectos directos e indirectos. La influencia directa incluye la producción de fitohormonas como, por ejemplo, de ácido Indol-acético (Patten y Glick, 2002), también de ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico; o bien la capacidad de producir la enzima 1-amino-ciclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa, que reduce el nivel de etileno en las raíces. Además, los mecanismos directos incluyen la solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno (Dobbelaere *et al.*, 2003). Los efectos indirectos incluyen la acción de agentes como biocontrol de patógenos, producción de sideróforos, β 1,3- glucanasas (Cattelan *et al.*, 1999), antibióticos, pigmentos fluorescentes (Pal *et al.*, 2001), entre otros. En nuestro estudio, se evaluaron a las cepas aisladas de rizósfera, raíces y tallos por su capacidad de producción de AIA, solubilización de fosfatos, antagonismo contra patógeno de tarwi y producción de sideróforos, mientras que, a las cepas aisladas de nódulos se evaluaron por su capacidad de fijación de nitrógeno *in vitro*.

a) Producción de Ácido Indol Acético

Las auxinas son ácidos débiles derivados del indol, consideradas los mayores reguladores del crecimiento vegetal, ya que se encuentran involucradas en diferentes procesos metabólicos (Rodríguez y Hernández, 2009). De ellas, el ácido indol-acético es una de las más activas fisiológicamente (Mohite, 2013), pues ayuda en la producción de raíces con

mayor longitud e incremento en el número de pelos radiculares y raíces laterales, las cuales están envueltas en la toma de nutrientes (Datta y Basu, 2000), además de inhibir o retrasar el proceso de abscisión de las hojas y promover la floración y fructificación (Mohite, 2013). Se ha demostrado que puede ser sintetizado por especies de bacterias, hongos y algas (Rodríguez y Hernández, 2009). La biosíntesis de esta auxina tiene como precursor al aminoácido triptófano, sin embargo, mutantes auxótrofos de triptófano mostraron evidencia de una ruta de síntesis independiente en la que se utiliza el indol o indol-glicerol como precursor (Tudzinzki y Sharon, 2002 mencionados por Rodríguez y Hernández, 2009).

La determinación del AIA se llevó a cabo utilizando el reactivo de Salkowski, que permite la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas (Mayer, 1958 mencionado por Lara *et al.*, 2011); cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración que va desde el rosa claro a intenso proporcional a la concentración del AIA presente. El uso de esta técnica es una opción importante para la determinación cualitativa y semi-cualitativa de la presencia de la hormona en el sobrenadante de cultivos bacterianos (Mohite, 2013).

b) Solubilización de fosfato

El fósforo, después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por las plantas y microorganismos, sin embargo, en el suelo es un factor limitante del desarrollo vegetal (Fernández *et al.*, 2005). Dentro de las funciones que se le ha atribuido se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía, además de formar parte de macromoléculas tales como los ácidos nucleicos y fosfolípidos (Tejera *et al.*, 2013). Pese a ser abundante en el planeta, las formas en las que se acumula no suelen ser disponibles para las plantas (Probanza, 2012). Ellas deben absorberlo del suelo, en el que se encuentra a muy bajas concentraciones (normalmente entre 5 y 30 mg/kg⁻¹) (Fernández *et al.*, 2005). Este índice se debe a que el fósforo soluble sufre varias reacciones con iones de calcio, hierro o aluminio que inducen a su precipitación o fijación (Anzuay *et al.*, 2016), disminuyendo su disponibilidad para los vegetales. Una gran porción de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo de forma inasequible para el cultivo (Rengel y Marschner, 2005). En este contexto, se puede predecir que aquellos microorganismos que presenten la capacidad de solubilizar el fósforo sean una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas y en consecuencia, actuar como promotores de crecimiento vegetal.

Existen diferentes métodos para seleccionar microorganismos solubilizadores de fósforo inorgánico. Cada criterio presenta sus ventajas y desventajas. Si bien se ha demostrado que la selección a partir de la formación del halo de solubilización no es una técnica infalible, tampoco la concentración de fósforo detectada en cultivo líquido lo es (Rodríguez y Fraga, 1999). Gyaneshwar *et al.* (2002), recomiendan que es mejor adoptar técnicas de selección de cepas a partir de ensayos que reflejen la capacidad amortiguadora de pH del suelo. De todas formas, sólo las pruebas en campo determinan si la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico *in vitro* tiene efecto sobre el desarrollo vegetal.

c) Antagonismo contra patógenos

Los microorganismos patógenos que afectan la salud de las plantas son una importante amenaza crónica para la producción de alimentos y la estabilidad del ecosistema. Cuando la producción agrícola se intensificó, los productores se volvieron más dependientes de agroquímicos como un método relativamente confiable de protección a los cultivos (Compant *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso creciente de esos insumos químicos causa a largo plazo efectos negativos, como la resistencia de patógenos a los químicos aplicados y el impacto ambiental consecuente (Gerhardson, 2002). Sin mencionar, el aumento de costo de los pesticidas a lo largo del tiempo y la lista de enfermedades cuyas soluciones químicas son pocas, ineficaces o inexistentes (Gerhardson, 2002). Es así, que el control biológico por medio de microorganismos se ha propuesto como una forma alternativa o complementaria al uso de agroquímicos en la agricultura.

Existe un grupo de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos, cuya acción puede ser aprovechada para el control biológico de patógenos vegetales (Fernández-Larrea, 2001). Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas microbianos, los que incluyen al crecimiento microbial por (1) producción de antibióticos difusibles, compuestos orgánicos volátiles, toxinas y biosurfactantes (antibiosis), (2) competición por colonización de espacio y nutrientes, (3) competición por minerales, por ejemplo, la toma de hierro a través de la producción de sideróforos o un sistema eficiente de captación de sideróforos, (4) degradación de factores de patogenicidad como las toxinas, el (5) parasitismo (Berg, 2009) y la (6) inducción de resistencia (Fernández-Larrea, 2001). En el caso de bacterias, las del grupo *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* han sido consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de raíces. Kin *et al.* (1997) mencionado por Fernández-Larrea (2001) señaló mayor

potencialidad del género *Bacillus* sobre *Pseudomonas fluorescens* al encontrar mayor emergencia y control de patógenos de trigo usando cepas de *Bacillus*. La identificación de diferentes mecanismos de acción facilita la combinación de cepas, bacterias con bacterias o bacterias con hongos, para atacar a los patógenos con un espectro más amplio de microbios.

En el caso del lupino, todas las especies cultivadas son afectadas por enfermedades parasitarias. Las prácticas de control preventivo que se realizan incluyen a la rotación de cultivos, manejo del rastrojo, desinfección de semilla, y empleo de una variedad tolerante, cuando éstas últimas existen. El uso de fungicidas foliares, frecuentes en otros cultivos, por lo general no son una opción conveniente en lupino (Galdames, 2016). Un estudio realizado en Chile, mencionan que las principales enfermedades parasitarias que atacan a este cultivo son: la antracnosis (*Colletotrichum lupini*), mancha café pudrición radical (*Pleiochaeta setosa*), pie negro (*Ascochyta sp.*) y fusariosis (*Fusarium sp.*) (Galdames, 2016).

d) Producción de sideróforos

En la rizósfera, el hierro es uno de los cuatro elementos más importantes; su forma soluble (Fe^{+2}), y por ende aprovechable para la nutrición, se encuentra en un rango de <0.1 a 25 ppm (Vicente *et al.*, 2015). Estas condiciones escasas de hierro libre son atribuidas a su rápida oxidación (Loaces, 2011), encontrándose en el suelo como silicatos de ferromagnesio, hidróxidos u óxidos insolubles (Aguado *et al.*, 2012). Para resolver este problema, muchos organismos que incluyen bacterias, hongos y plantas, producen pequeñas moléculas de alta afinidad por el hierro llamadas sideróforos que actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a Fe^{+2} (Aguado *et al.*, 2012). Los complejos que forman los sideróforos con el hierro en el suelo son asimilados eficientemente por los cultivos y se ha demostrado que la concentración de este complejo es en ocasiones lo suficientemente alta para beneficiar la nutrición de las plantas (Crowley *et al.* 1987 mencionado por Aguado *et al.* 2012). Por otra parte, se ha propuesto también que tales compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizósferico, impidiendo que sea disponible para los fitopatógenos del cultivo (Santoyo *et al.*, 2009). Es así, que las bacterias capaces de producir sideróforos pueden contribuir de manera directa e indirecta al crecimiento vegetal.

Se evaluó semi-cualitativamente la capacidad de producir sideróforos mediante la técnica de Cromo azurol sulfonato (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987). Este método químico aprovecha

la propiedad de que el compuesto formado por CAS-Fe(III)-HDTMA, al perder el Fe(III) pasa de color azul a naranja. Cuando la bacteria crece en medio CAS, la disponibilidad del hierro disminuye drásticamente para ellas, pues se encuentra quelado al CAS. Para tomarlo ellas pueden sintetizar estas moléculas denominadas sideróforos, las cuales presentan mucha mayor afinidad por el Fe(III) que el mismo CAS y lo atrapan del complejo quedando como resultado la formación de un halo naranja-amarillo (Sánchez, 2011).

e) Fijación de nitrógeno atmosférico

El nitrógeno es un nutrimento esencial para el desarrollo de las plantas, pues forma parte de macromoléculas como la clorofila, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Lupi *et al.*, 2013 mencionado por Martínez *et al.*, 2017). En la atmósfera se encuentra como N₂, forma que no es fácilmente asimilable por las plantas debido a que el triple enlace que une sus átomos es muy difícil de romper (Lara *et al.*, 2007). La única forma de poder aprovecharlo es mediante el proceso metabólico conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), el cual asegura la disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas naturales (Zuberer, 1998 mencionado por Lara *et al.*, 2007). La FBN, después de la fotosíntesis, constituye la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera (Tejera *et al.*, 2011).

Curiosamente, este proceso crucial sólo puede llevarlo a cabo unos pocos grupos de microorganismos, todos procariotas (Boddey *et al.*, 2003 mencionado por Tejera *et al.*, 2011), los cuales están distribuidos prácticamente en todas las ramas de Archaea y Bacteria (Young, 1992 mencionado por Tejera *et al.*, 2011). A estos microorganismos se les conoce como fijadores de nitrógeno o diazótrofos, quienes tienen la capacidad de convertir el nitrógeno molecular en amoníaco por medio de la enzima nitrogenasa. Se conocen dos variantes en estos organismos: los fijadores simbióticos que fijan nitrógeno en asociación con la planta; y los asimbióticos, que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio, aprovechados por los vegetales (Bano y Iqbal, 2016 mencionado por Martínez *et al.*, 2017). Algunas bacterias diazótroficas pueden promover el crecimiento de plantas mediante la síntesis y la liberación de algunas sustancias promotoras del crecimiento vegetal como fitohormonas. La eficiencia diazótrofica ha demostrado un gran potencial para la explotación agrícola. Los resultados de investigaciones de inoculantes microbianos han originado altos rendimientos de cultivos como arroz, maíz, frijol, tomate, etc. (Meunchang *et al.*, 2005 mencionado por Lara *et al.*, 2007).

2.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

2.4.1. Amplificación de elementos BOX

Se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en PCR, las cuales mediante la generación de perfiles de ADN permiten agrupar, a la vez que establecen diferencias entre dos cepas cercanamente relacionadas (Rademaker *et al.*, 2005).

Los perfiles moleculares se obtienen por métodos como la rep-PCR, en la que se amplifican regiones repetitivas a lo largo de todo el genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1991). Dentro de esta técnica encontramos a tres tipos, los cuales aparecen en la bibliografía como REP-PCR (PCR sobre elementos palindrómicos extragénicos reiterativos), ERIC-PCR (PCR sobre elementos consenso intergénicos reiterativos de enterobacterias) y BOX-PCR (PCR sobre elementos box), dependiendo del tipo de cebador que se esté usando. En nuestro estudio se analizaron las cepas mediante sus perfiles BOX.

Martín *et al.* (1992) mencionado por Rodríguez (2008) describió en un inicio tres subunidades para los elementos box: boxA, boxB y boxC, sin embargo, se encontró que sólo boxA aparecía altamente conservada en las bacterias (Versalovic *et al.*, 1994). La técnica de BOX-PCR ha sido utilizada en el estudio de poblaciones endófitas de tarwi (Rodríguez 2008), en la evaluación de la diversidad genotípica de bacterias simbióticas de pallar (Matsubara, 2010), también ha sido útil en la caracterización de bacterias rizosféricas de chontaduro (Patiño y Sánchez, 2012), entre otros.

2.4.2. Secuenciamiento del gen ribosómico 16S

El operón ADN_r, *rrn*, es una entidad genética de amplio interés por encontrarse tanto en organismos procariontas como eucariotas (Valverde 2003). La utilidad de la secuencia del ADN_r como herramienta taxonómica ha sido ampliamente demostrada en bacterias, pues se ha llegado a redefinir relaciones filogenéticas que anteriormente eran dependientes del metabolismo celular (Young *et al.*, 2001). Dentro de este operón, se encuentra el ADN_r 16S, quien además de tener regiones altamente conservadas para el estudio de las relaciones entre taxones distantes, contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies (Goebel *et al.*, 1987 mencionado por Valverde 2003). Es por ello que la clasificación actual de las bacterias se basa en el gen ribosómico 16S (*rrs*), pues gracias a su

análisis se ha podido agrupar a las bacterias en diferentes phyla, clases, órdenes, familias, géneros y especies (Woese, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material Biológico

a) Material vegetal

- Semillas de *Lactuca sativa*.
- Semillas de *Lupinus mutabilis* var. Andenes

b) Hongos y bacterias

- Cepas de diferentes géneros de bacterias y hongos aisladas de campos de cultivo de tarwi del IRD-UNALM Huancayo y del Programa de Cereales-UNALM.
- Cepa de *Bacillus* BAC15MB.
- Cepa de *Fusarium oxysporum*

3.1.2. Medios de cultivo

- Caldo Manitol suplementado con triptófano 5 mM
- Medio AN (Agar nutritivo)
- Medio CAS (Cromoazurol S)
- Medio CZAPEK
- Medio LMA (Manitol Levadura)
- Medio NBRIP
- Medio OGY suplementado con cloranfenicol
- Medio PDA

La preparación de los medios de cultivo se explica a detalle en el Anexo 1.

3.1.3. Reactivos y soluciones

- Alcohol isoamílico
- Agarosa
- Agua estéril
- Agua libre de nucleasas
- AIA (Ácido Indol Acético)
- Bicloruro de Mercurio 0.1% - 2.5%
- Bromuro de etidio
- Buffer de PCR
- Buffer TSE, TAE y TE
- Cloroformo
- Cloruro de amonio
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de potasio 2M
- Cloruro de sodio 0.85% - 5M
- CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
- Etanol 75° - 96°
- Fenol
- Isopropanol
- Kit de purificación de productos PCR (Thermo Scientific)
- Nitroprusiato de sodio 0.5%
- Primer BOX A1R (Amplificación BOX)
- Primer fD1 y rD1 (Amplificación gen r16S)
- Proteinasa K 20mg/ml
- Reactivo Salkowski
- SDS 10%
- Silica Gel
- Solución alcohólica de fenol 10%
- Solución oxidante
- Taq polimerasa

La preparación de las soluciones se explica con mayor detalle en el Anexo 1.

3.1.4. Sustratos

- Vermiculita
- Arena

3.1.5. Equipos de laboratorio e instrumentos

- Asa de platino
- Agitador magnético (HEIDOLPH MR3001)
- Autoclave (K GEMMY INDUSTRIAL)
- Balanza analítica
- Bisturí
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de electroforesis
- Campana de extracción
- Congeladora -26°C
- Espectrofotómetro (UV/VIS T80+)
- Fuente de poder
- Jeringas
- Macetas
- Matraces Erlenmeyer (PIREX)
- Microcentrífuga (HETTICH Zentrifugen)
- Micropipetas 20, 200 y 1 000 ul
- Microscopio
- Morteros
- Nanofotómetro (IMPLEN NP80)
- Placas Petri
- Potenciómetro
- Termociclador (BIORAD T100)
- Termomixer (EPPENDORF)
- Transiluminador UV
- Vasos precipitados (PIREX)
- Vórtex (HEIDOLPH REAXtop)

3.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación es experimental aplicada, ya que se evaluó la capacidad promotora de crecimiento vegetal de los aislamientos bacterianos realizando pruebas bioquímicas, de germinación y efecto de algunas cepas bajo condiciones de invernadero. También se midió el efecto antagónico de las cepas frente al hongo *Fusarium* sp., mediante la determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial. Fue una investigación de tipo observacional porque se describió si hay o no hay actividad promotora de crecimiento por parte de los aislamientos, además de su capacidad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*.

3.2.1. Población de estudio

La población de estudio fueron los aislamientos obtenidos de muestras de raíces, tallos, nódulos y suelo rizósferico de cultivos localizados en el Programa de Cereales-UNALM y en el IRD-UNALM en Jauja.

3.2.2. Variables de estudio

Para la prueba de producción de Ácido Indol-acético (Gordon y Weber, 1950) se midió la intensidad de coloración rojiza-fucsia con el Reactivo de Salkowski, una variable cuantitativa discreta. Para la prueba de solubilización de fosfato (Nautiyal, 1999) se midió el diámetro de los halos transparentes formados alrededor de las colonias, la cual es una variable cuantitativa continua. Para la prueba de producción de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987) se midió el diámetro de los halos amarillo-naranja alrededor de las colonias, la cual es una variable cuantitativa continua. Para la prueba de actividad antagónica (Zúñiga, 2007) se midió el radio del hongo influenciado por el crecimiento bacteriano, el cual es una variable cuantitativa continua. Para la prueba de fijación de nitrógeno *in vitro* (Lara *et al.*, 2007)), se midió la absorbancia proporcional a la concentración de nitrógeno fijado como amonio, la cual es una variable cuantitativa continua. Para la determinación de la acción promotora de crecimiento en la germinación de semillas se midió el porcentaje de germinación, variable cuantitativa continua. Para la medición de la acción promotora de crecimiento de los aislamientos en el crecimiento de plántulas se midieron las siguientes variables: altura de la planta, longitud de inflorescencia, peso fresco y peso seco, las cuales son variables cuantitativas continuas.

3.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de rizósfera, raíces, tallos y nódulos del cultivo de tarwi se recolectaron de los campos cultivados de IRD-Sierra de la UNALM y del campo sembrado en el Programa de Cereales. El procedimiento se llevó a cabo delimitando superficies de 20 cm² en la base de la planta, y la extracción se realizó de forma manual considerando 10 - 30 cm de profundidad (Schoebitz, 2006).

Se consiguieron los nódulos cavando cuidadosamente alrededor de la raíz principal y se escogieron aproximadamente 5 nódulos vivos por planta para ser transferidos inmediatamente a un frasco con sílica gel seco, comenzando el proceso de desecamiento.

3.4. OBSERVACIÓN DE MICORRIZAS

Para la tinción de raíces, se sumergieron en KOH 10% y se calentaron a 90°C por una hora, hasta observar que tomaban un color blanco casi translúcido. Posteriormente se lavaron con agua y se acidificaron con HCl 1% por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se sumergieron en azul de tripano al 0.05% a 90°C por 10 minutos, las raíces no fueron enjuagadas luego de la acidificación. Se retiró el colorante, se lavó y se dejó reposar en glicerol (Phillips y Hayman, 1970). Al día siguiente se montaron en láminas portaobjetos para ser observadas al microscopio con aumento 100X. La presencia de vesículas azules en las raíces nos indica que éstas se encuentran micorrizadas.

3.5. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.5.1. Aislamientos a partir de nódulos

Los nódulos fueron previamente hidratados y desinfectados, permitiéndonos realizar el aislamiento de acuerdo a protocolos ya establecidos (Vincent, 1975).

a) Esterilización superficial

Bajo condiciones de asepsia los nódulos seleccionados fueron colocados en placas Petri conteniendo agua estéril para hidratarlos, agitándolos con fuerza a fin de eliminar impurezas de su superficie. Se dejaron en agua estéril hasta el día siguiente para su desinfección. La esterilización se realizó sumergiéndolos en una solución de bicloruro de mercurio 2.5% durante 2 minutos, agitando constantemente con una bagueta esterilizada con alcohol.

Pasado este tiempo, se quitaron los restos de bicloruro enjuagando los nódulos 5 veces con agua destilada estéril (Rodríguez, 2008).

b) Siembra en medio de cultivo

Los nódulos así preparados fueron triturados en un mortero estéril añadiendo unas gotas de solución salina 0.85% para facilitar la maceración. El triturado se sembró en placas Petri con medio de cultivo agar manitol levadura LMA y se incubaron las placas a 28°C durante tres semanas (Rodríguez, 2008). Para purificar las cepas se subcultivaron en medio CZAPEK. Se utilizaron nódulos esterilizados sin triturar para el control de la desinfección superficial.

3.5.2. Aislamiento a partir de rizósfera

Se tomaron 10 gramos del suelo rizósferico y se adicionaron a un matraz de 250 ml que contenía 90 ml de solución salina (NaCl 0.85%). Luego de homogenizar vigorosamente se realizaron diluciones seriadas y se inoculó 0.1 ml de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (siembra por superficie), en placas con medio OGY (suplementado con cloranfenicol) y en placas con medio AN (Ramírez et al., 1992). Las placas fueron incubadas a 30 y 35°C, respectivamente.

3.5.3. Aislamiento a partir de raíces y tallos

a) Esterilización superficial y maceración

Raíces y tallos de *Lupinus mutabilis* fueron lavados en chorro de agua constante para eliminar impurezas y luego fueron cortados en segmentos de 4 cm aproximadamente. Para la esterilización superficial, se realizó una prueba inicial de desinfección para observar con cual se obtenía mejores resultados. El primer proceso de desinfección fue el mismo aplicado en nódulos. Primero se remojaron *overnight* en agua estéril, luego fueron agitados constantemente en solución de bicloruro de mercurio 2.5% y por último enjuagados 5 veces en agua destilada estéril (Rodríguez, 2008). El segundo proceso consistía en un enjuague de las raíces y tallos en una solución de etanol al 75% durante tres minutos, y luego en una solución de hipoclorito de sodio (lejía comercial) al 3% durante 90 segundos (González, 2015). Una vez obtenido los explantes esterilizados, el material procesado se colocó en un mortero estéril y se maceró agregando 30 ml de solución salina NaCl 0.85% (Claros y Ortuño, 2013). En el caso de los tallos, se tuvo que emplear un bisturí para poder rasgarlos en trozos muy pequeños y luego triturarlos, ya que tenían una consistencia bastante dura.

b) Siembra en medio de cultivo

Se agregaron otros 60 ml de solución salina estéril NaCl 0.85% y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} – 10^{-6} ; de las cuales las últimas cuatro fueron utilizadas para cultivar las bacterias y hongos endófitos en medio AN y OGY, respectivamente. Las placas se incubaron a 28°C por aproximadamente 72 horas (Claros y Ortuño, 2013). Una vez crecidas las colonias se aislaron tubos con los mismos medios de cultivo, para posteriores pruebas y caracterización

3.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

3.6.1. Caracterización microscópica

Las cepas de bacterias que fueron aisladas se sembraron en medio de cultivo AN y se incubaron a 28°C por 16 horas. Transcurrido este tiempo se extrajo una colonia aislada con un asa de *Kolle* y se procedió a fijarla en un portaobjeto previamente preparado con una gota de agua. Se realizó una tinción Gram para determinar la forma de la bacteria y su coloración gram. Para la observación de las bacterias se utilizó un microscopio óptico y el objetivo de 100X.

En el caso de los hongos, se sembró las colonias en cámara húmeda durante cinco días, y se tiñó las estructuras fúngicas con azul de metileno. Para su observación se utilizó un microscopio óptico y el objetivo de 40X

3.6.2. Caracterización macroscópica

Las características de crecimiento a nivel macroscópico se observaron luego de 1 día de incubación en el caso de las cepas bacterianas crecidas en medio AN; y luego de 5 días, para el caso de cepas fúngicas crecidas en medio OGY. Se tuvo en cuenta la forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme), elevación (plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada), margen (entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso, rizado), color (para el caso de bacterias: blanca, beige, translúcida; para el caso de hongos: los colores que presentan en los bordes y al centro de la colonia).

3.7. CUANTIFICACIÓN *in vitro* DE NITRÓGENO FIJADO

Se realizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito, descrito por Lara et al. (2007) y Cadena y Martínez (2011). Cada cepa proveniente de la siembra en placas de nódulos, fue cultivada en LMA por 24 horas. Luego fueron inoculadas en tubos 15 x 150 mm conteniendo 3 ml de LMC y se incubaron a temperatura ambiente, por 72 horas en agitación constante (200 rpm). Pasado este tiempo, se agregaron 9 ml de KCl 2M y se agitaron a 150 rpm durante 1 hora. Se dejó reposar una hora adicional y se tomó 10 ml del sobrenadante para luego centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución, se añadieron 0.4 ml de solución alcohólica de fenol 10%, 0.4 ml de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 1 ml de solución oxidante. Se homogenizó y se dejó reposar durante 1 hora. La positividad de la fijación de nitrógeno *in vitro* se observó mediante una coloración azul y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro de luz visible a 633 nm. Las concentraciones de nitrógeno fijado como amonio fueron calculadas en una recta patrón obtenida de diluciones sucesivas a partir de una solución madre de 100 ppm de cloruro de amonio (Anexo 2).

3.8. CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDADES PGPR

3.8.1. 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 con una concentración aproximada de 10^8 ufc/ml, estándar N° 0.5 según la escala de McFarland (McFarland, 1970), en tubos con 4 ml de caldo LMC suplementado con L-triptófano 5 mM. La preparación del patrón de turbidez de McFarland se detalla en el Anexo 3. Para control positivo, se empleó el medio LMC con adición de AIA y control negativo, únicamente el caldo. Los tubos inoculados se incubaron en oscuridad a 28°C por un período de 5 días. Lara *et al.* 2011 menciona que la relación reactivo-muestra 2:1 es la que presenta mejor sensibilidad para la determinación de las concentraciones de AIA producidas por las bacterias aisladas, es por ello que para la evaluación se tomó 100 μ l del cultivo y se adicionó 200 μ l 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.

Para poder desarrollar las pruebas siguientes, fue requerido disminuir el número de cepas a estudiar y por consiguiente se tuvo que realizar una selección previa de las mismas. De esta manera, la selección se realizó por tamizaje de la primera prueba PGPR: producción de AIA.

Aquellas que resultaron positivas para esta prueba continuaron siendo estudiadas en los siguientes ensayos.

3.8.2. Prueba de solubilización de fosfato

Las cepas fueron sembradas en medio LMA e incubadas a 28°C. Se tomó una asada de la biomasa de cada cepa y se sembró en el centro de las placas conteniendo medio NBRIP. Las placas fueron incubadas por un período de 5 días a 28°C. Como control negativo se utilizó una cepa de *Bacillus* que no solubilizaba fosfato. Las cepas positivas para esta prueba evidenciaron un halo transparente alrededor de las mismas (Nautiyal, 1999). Se midió el diámetro del halo interdiariamente hasta observar una solubilización constante y se calculó la eficiencia relativa de solubilización entre las bacterias de la siguiente manera:

$$ERS = \frac{\text{Diámetro de solubilización}}{\text{Diámetro de crecimiento}} \times 100$$

3.8.3. Prueba de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*

Esta prueba fue la única que se realizó para los hongos aislados. Todas las cepas fueron sembradas mediante en placas con medio PDA y se incubaron a 28°C durante 24 horas en el caso de las bacterias y 4 días para el caso de los hongos. Luego con ayuda de un bisturí se cortaron fragmentos cuadrados de aproximadamente 1 cm² del micelio de hongo patógeno (*Fusarium oxysporum*.) crecido en medio PDA (Zúñiga, 2007). Dicho fragmento del hongo patógeno se colocó dentro de la placa en la que se encontraban sembradas y crecidas las cepas. Se dejó crecer a 18 °C durante cinco días. Se observó el crecimiento de la estructura miceliar o, de lo contrario, su inhibición. Como control se sembró en medio PDA al hongo sin presencia de bacteria, considerando su radio como “crecimiento libre”. Las cepas que inhibieron el crecimiento del micelio fueron consideradas como positivas y se midió el radio del hongo cada 3 días durante 15 días, considerándolo como “crecimiento influenciado”. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\%Inhibición = \frac{\text{crecimiento libre} - \text{crecimiento influenciado}}{\text{crecimiento libre}} \times 100$$

3.8.4. Prueba de germinación *in vitro*

Se seleccionaron las cepas que resultaron positivas a las pruebas de producción de AIA, solubilización de fosfato y producción de sideróforos, y con ellas se realizó la prueba de germinación. Estas cepas fueron sembradas en AN a 28°C durante 24 horas y luego se

propagaron en caldo nutritivo en incubadora con agitación rotatoria a 200 rpm durante cuatro días hasta obtener una concentración de 10^9 ufc/mL⁻¹, de acuerdo con la escala de McFarland (McFarland, 1970). Se evaluó la capacidad promotora de la germinación de las cepas bacterianas en semillas de lechuga. En placas Petri, se colocó una capa de algodón cubierta por papel filtro estéril y se humedeció con 5 ml de agua destilada estéril. En cada placa se colocaron 10 semillas de lechuga, previamente desinfectadas con HgCl₂ 0.1% durante 10 minutos, se inoculó con 0.1 ml de la suspensión bacteriana por semilla. Simultáneamente se instaló un testigo (inocular) al cual sólo se le agregó caldo nutritivo, cada tratamiento tuvo 3 repeticiones. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25°C evaluando hasta los 8 días después de la siembra (dds) (Díaz *et al.*, 2001). Todas las actividades se realizaron en cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia; y las observaciones se realizaron sin destapar las placas. Se evaluaron dos estadíos principales: R: emergencia de radícula e hipocotilo, H: aparición de hojas cotiledonares y primeras hojas verdaderas.

3.8.5. Prueba de producción de sideróforos

La producción de sideróforos fue determinada en medio CAS siguiendo el método de Schwyn y Neilands (1987). Las cepas bacterianas (con 24 horas después de la siembra) fueron cultivadas en medio CAS e incubadas a 28°C durante 4 o 6 días. La formación de un halo naranja a amarillo alrededor de las colonias confirmó la producción de sideróforos por la cepa. Se midió el diámetro de los halos a los 6 días de incubación y se evaluó la eficiencia relativa de producción.

$$ERP = \frac{\text{Diámetro de producción}}{\text{Diámetro de crecimiento}} \times 100$$

3.9. PRUEBA EN INVERNADERO

Se instaló un ensayo en macetas con brotes de semilla de tarwi, en el invernadero del Programa de Cereales, UNALM. Los mejores brotes fueron seleccionados para luego realizar el desbrote. Los brotes removidos se colocaron en una bandeja con sustrato estéril húmedo, mezcla de vermiculita y arena (1:2).

Para observar el efecto de las cepas en el crecimiento de una planta, se trasplantó los brotes ya enraizados en las macetas, luego de dos semanas. En ese momento se realizó la inoculación.

Se trabajó con 1 tratamiento fijo: Control AN, cada una de las cepas utilizadas constituyó un tratamiento adicional. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones (macetas), y en cada repetición se sembró un brote de tarwi. Se inoculó cada maceta con 3 ml del tratamiento respectivo a una concentración aproximada de 10^8 ufc/ml. Durante el ensayo se realizaron semanalmente evaluaciones de la altura de planta. Transcurridas 6 semanas se evaluó, peso fresco y seco de foliolos, tallo y raíces. El diseño estadístico fue Diseño Completamente al Azar (DCA) (Kohashikawa, 2010).

3.10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Los ensayos de caracterización molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Programa de Cereales y se realizaron únicamente para las cepas que fueron seleccionadas luego del tamizaje bioquímico.

3.10.1. Extracción de ADN

Se realizó el protocolo de extracción según Ausubel 1998: En un tubo de 1.7 ml se añadió 1.5 ml de caldo nutritivo con bacteria incubada durante 18 horas a 37°C. Este tubo se centrifugó en frío a 14000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó dos veces el pellet de bacteria añadiendo 1 ml de buffer TSE 1X y centrifugando a 14000 rpm durante 3 minutos. A continuación se agregó 567 μ l, de buffer TE 1X, se disolvió el pellet con la micropipeta y se añadió 30 μ l de SDS 10% y 3 μ l de proteinasa K 20 mg/ml, obteniendo así una concentración de proteinasa K 100 μ g/ml en 0.5% de SDS. Luego de homogenizar el tubo por inversión se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se añadió 100 μ l de NaCl 5M y 80 μ l de CTAB 10X- NaCl 0.7M, homogenizando la mezcla por pipeteo e incubando a 65°C durante 10 minutos. Después se agregó 700 μ l de CI (cloroformo-alcohol isoamílico 49:1), se homogenizó por inversión y se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió con micropipeta la fase acuosa (fase superior) que se formó luego del centrifugado a otro tubo de 1.7 ml y se añadió igual volumen de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:25:1). Se homogenizó por inversión y se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se transfirió la fase acuosa a otro tubo de 1.7 ml. A este tubo se le añadió isopropanol en un 75% (por cada 100 μ l de volumen transferido se agrega 75 μ l de alcohol). Se colocó el eppendorf a -20°C *overnight*. Al día siguiente se centrifugó a 15 000 rpm durante 25 minutos. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado de no desprender el pellet de ADN, se lavó dos veces

añadiendo etanol 75% y una última lavada con etanol absoluto. Por último se dejó evaporar el alcohol durante unos minutos y se disolvió el pellet en 30 µl de agua libre de nucleasas, incubando a 65°C durante 15 minutos. Las muestras de ADN fueron almacenadas a -26°C.

La calidad y concentración de ADN se midió en un nanofotómetro. El cociente A260/A280 nos indicó la pureza del ADN, considerando una muestra pura dentro del rango de 1.8 a 2.0.

3.10.2. Amplificaciones BOX

El análisis de los perfiles de bandas BOX fue modificado del protocolo descrito por Versalovic et al., (1991). Se empleó el primer BOX A1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'). El volumen final de la reacción fue de 20 µl, de acuerdo lo siguiente: buffer de PCR +KCl–MgCl₂ al 1X, DMSO al 7.5%, de MgCl₂ 2.5 mM, mix de nucleótidos 0.25 mM, 20 pmoles de cebador, 2 U de *Taq* polimerasa y 1.5 µl de la muestra (dilución 1:10). El perfil de temperatura fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 50°C por 1 minuto y extensión a 65°C por 8 minutos y una extensión final a 65°C por 16 minutos.

Los productos de la amplificación fueron examinados mediante electroforesis, cargando 5 µl del amplificado en gel de agarosa al 1.5% con buffer de corrida TAE 1X, durante aproximadamente 3 horas a 80 V.

3.10.3. Amplificación gen r16S

Los primers empleados serán: fD1 (5' – CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') Y rD1 (5' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3'). El volumen final de la reacción fue de 30 µl que contenían: buffer de PCR +(NH₄)₂SO₄ – MgCl₂ al 1X, MgCl₂ 1.25 mM, mix de nucleótidos 0.2 mM, 12 pmoles de cada primer, 1.25 U *Taq* polimerasa y 2.4 µl de muestra (dilución 1:100). El perfil de temperatura se modificó a partir de Kohashikawa, 2010: desnaturalización inicial a 93°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 93°C por 45 segundos, annealing a 62°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de la amplificación fueron examinados mediante electroforesis, cargando 5 μ l del amplificado en gel de agarosa al 1.5% con buffer de corrida TAE 1X, durante 1.5 horas a 80 V.

3.10.4. Purificación de producto PCR

Los productos PCR obtenidos de la amplificación del gen r16S fueron posteriormente purificados debido a que se mandaron a secuenciar. Se utilizó el kit de ThermoScientific “GeneJET PCR Purification kit”, cuyo procedimiento se detalla a continuación: Se añadió buffer de unión en igual volumen que el producto y se homogenizó por pipeteo. Si la solución tomaba un color amarillo, el pH era el indicado, de lo contrario se añadía 10 μ l de acetato de sodio 3M. Se transfirió luego la solución a una columna de purificación, y se centrifugó durante 1 minuto, eliminando el contenido en el tubo. Luego, se añadió 700 μ l de buffer de lavado a la columna de purificación y se centrifugó por 1 minuto. Se descartó el contenido y nuevamente se centrifugó por 1 minuto, para eliminar cualquier residuo de buffer de lavado. Por último se transfirió la columna a un tubo de 1.7 ml, se añadió 35 μ l de buffer de elución y se centrifugó por 1 minuto. Los productos purificados fueron observados en gel de agarosa 2% y almacenados a -26°C.

3.10.5. Secuenciamiento de gen r16S

El secuenciamiento del gen r16S de las cepas seleccionadas fue realizado por la empresa MacroGen. Asimismo, se realizó la comparación de secuencias con bases de datos públicos en la página web del Centro Internacional de la Información Biológica (NCBI) empleando el algoritmo BLAST. Para la limpieza de secuencias y alineamiento con secuencias de cepas tipo, se emplearon los programas ChromasLite y BioEdit (Kohashikawa, 2010).

3.10.6. Construcción de árbol filogenético

La construcción del árbol se realizó utilizando el programa Mega 6. La matriz de distancias evolutiva fue realizada con el modelo evolutivo Jukes y Cantor (Thompson et al., 1994) y el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987)

En la figura 2 se presenta un diagrama resumen de la metodología descrita anteriormente, visualizando así de mejor manera las pruebas que se realizaron para los distintos grupos de microorganismos (hongos y bacterias).

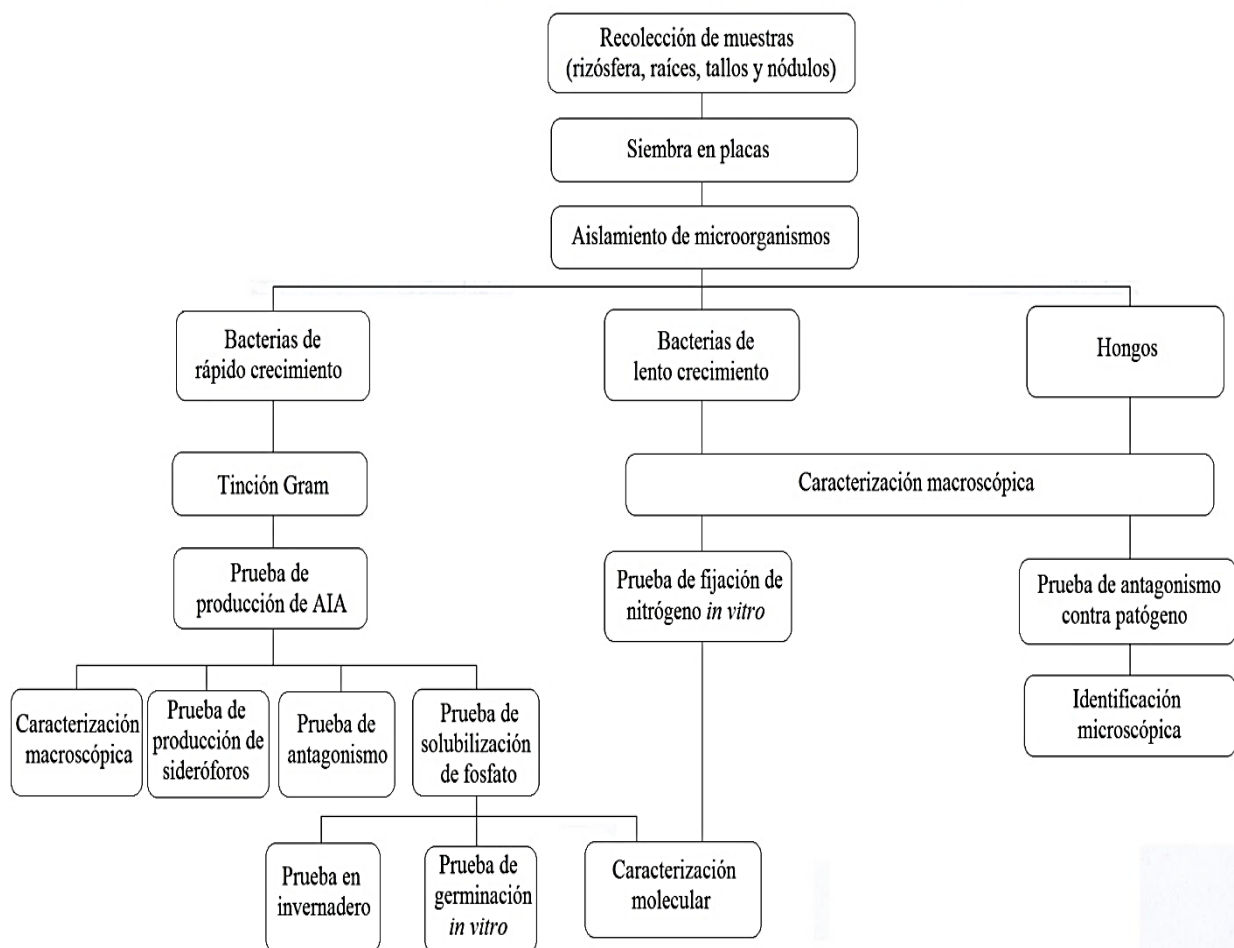


Figura 2: Flujo de trabajo para la metodología de la investigación

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se realizaron en total tres muestreos: dos en el campo de tarwi del Programa de Cereales en la UNALM a y un último en el campo del IRD-Jauja de la UNALM a $11^{\circ}51'22''\text{S}$ y $75^{\circ}23'38''\text{O}$. El primero fue un muestreo preliminar para definir el tratamiento de desinfección más eficiente y determinar cuáles eran las diluciones adecuadas para el posterior aislamiento. Se realizó una batería de diluciones sucesivas hasta 10^{-8} , de las cuales sólo se sembraron en placa a partir de la dilución 10^{-3} . Se observó que tanto para la siembra de bacterias como la de hongos, las diluciones más adecuadas fueron 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , ya que en las últimas dos no hubo crecimiento microbiano. Estas diluciones seleccionadas coinciden con estudios realizados en aislamientos de microorganismos como Schoebitz, (2006), quien aisló rizobacterias a partir de diluciones 10^{-4} y 10^{-5} ; Franco (2008), quien aisló actinomicetos a partir de diluciones de 10^{-4} a 10^{-8} ; Salazar y Ordoñez (2013) quienes también aislaron actinomicetos a partir de diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , entre otros.

En cuanto al tratamiento de desinfección, se aplicó el mismo proceso para nódulos, raíces y tallos, ya que las placas controles cuyas muestras fueron tratadas con una solución de bicloruro de mercurio al 2.5% no mostraron crecimiento microbiano (Figura 3a), en comparación a cuando fueron tratadas con una solución de etanol 75% e hipoclorito de sodio 3% (Figura 3b). Esto puede deberse a la morfología de tallos y nódulos de *Lupinus mutabilis* (Figura 4). La especie presenta tallos fistulosos (Lezama, 2010), es decir, hueco en su interior, y al sumergirse en la solución desinfectante, ésta no puede llegar a toda la superficie de manera homogénea; mientras que los nódulos son pleomórficos (Lezama, 2010), es decir, toman distintas formas estructurales, además de ser rugosos y con muchos pliegues superficiales, por ende se necesita una solución más concentrada y potente para la desinfección.

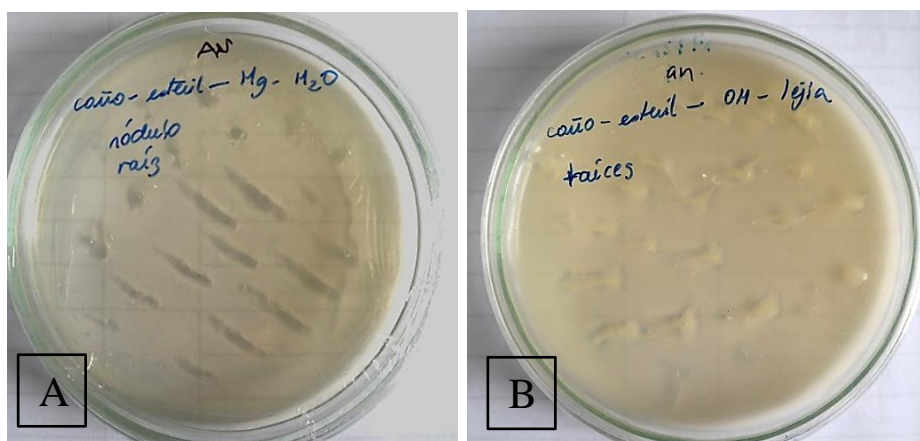


Figura 3: Tratamientos de desinfección superficial



Figura 4: Tallos fistulosos y nódulos pleomórficos de *Lupinus mutabilis*

El segundo muestreo se realizó en el campo de *Lupinus mutabilis* var. Andenes del Programa de Cereales- UNALM (Anexo 4), durante el mes de enero del año 2016. Se fijaron cinco puntos dentro del campo y en cada uno de ellos se recolectó dos plantas de tarwi, obteniendo así un total de diez plantas, pero sólo cinco muestras de rizósfera, tallos, raíces y nódulos, ya que fueron agrupadas de dos en dos para la siembra en placas (Figura 5).

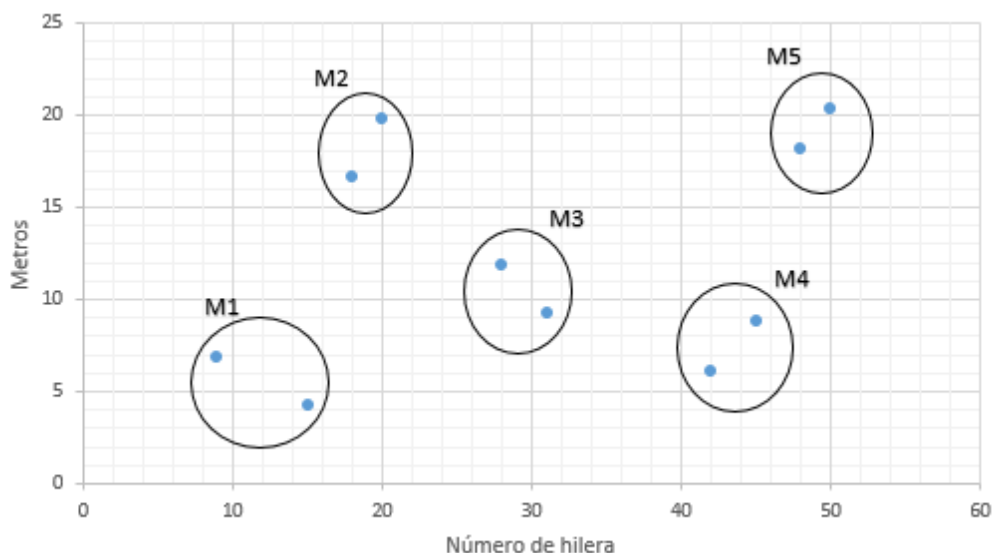


Figura 5: Puntos de recolección de las plantas de tarwi en el segundo muestreo

El tercer muestreo se realizó en el campo de *Lupinus mutabilis* var. Andenes del IRD-Jauja de la UNALM (Anexo 4), durante el mes de febrero del año 2016. Al ser este campo de mayor área, se seleccionaron ocho puntos dentro de éste y en cada uno de ellos se recolectó tres plantas de tarwi, obteniendo un total de 24 plantas. A diferencia del anterior muestreo, aquí las plantas fueron agrupadas de cinco en cinco para obtener cinco muestras y sólo en el caso de nódulos, se tomaron los grupos de tres para obtener 8 muestras (Figura 6).

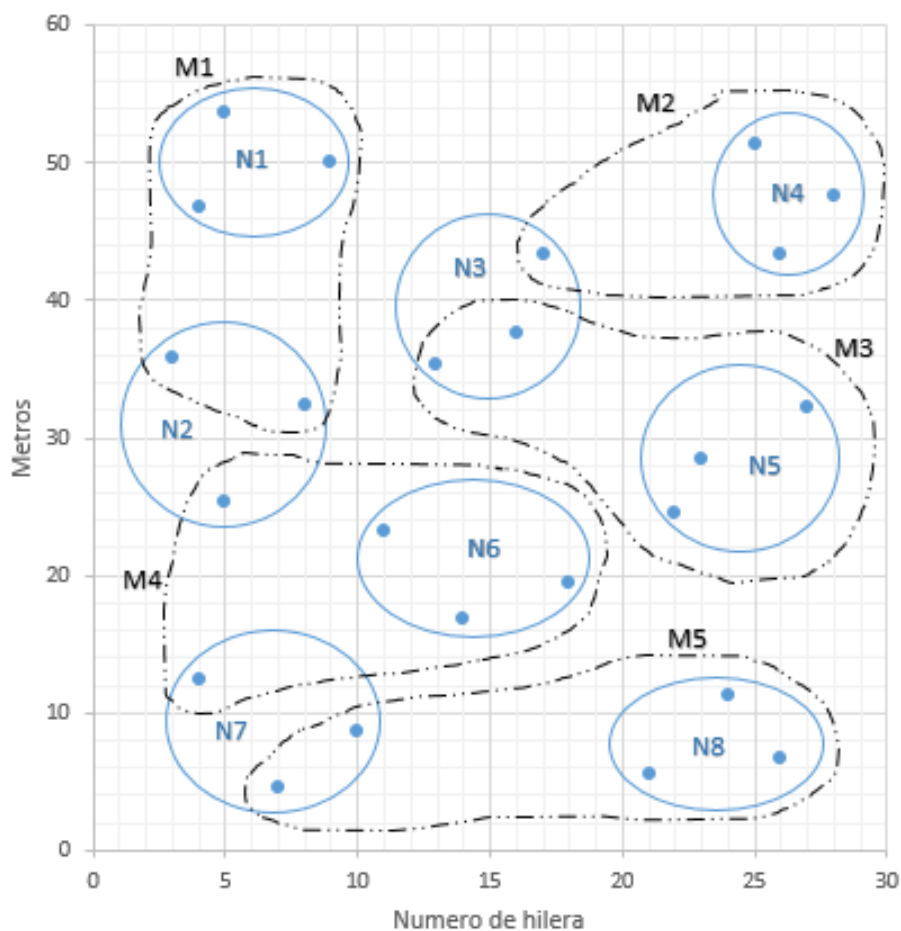


Figura 6: Puntos de recolección de plantas de tarwi en el tercer muestreo. En negro: rizósfera, tallos y raíces. En celeste: nódulos

4.2. OBSERVACIÓN DE MICORRIZAS

Las micorrizas son asociaciones entre la mayoría de las plantas existentes y los hongos benéficos, que incrementan el volumen de la raíz y por tanto, permiten una mayor exploración de la rizósfera (Noda, 2009). De todas las interacciones conocidas que se establecen entre plantas y microorganismos, las más conocidas e importantes (tanto por su extensión como por su interés económico y biotecnológico) son las micorrizas y los nódulos fijadores de nitrógeno (De la Vega, 2010). En nuestro estudio no se encontraron micorrizas en las raíces de *Lupinus mutabilis*, ni para el campo “PC” ni para “IRD” (Figura 7a,7b). Tal y como menciona de la Vega, 2010, los lupinos son una de las pocas leguminosas que no forman micorrizas, por lo que presentar raíces proteoides es fundamental para extender su sistema radicular.

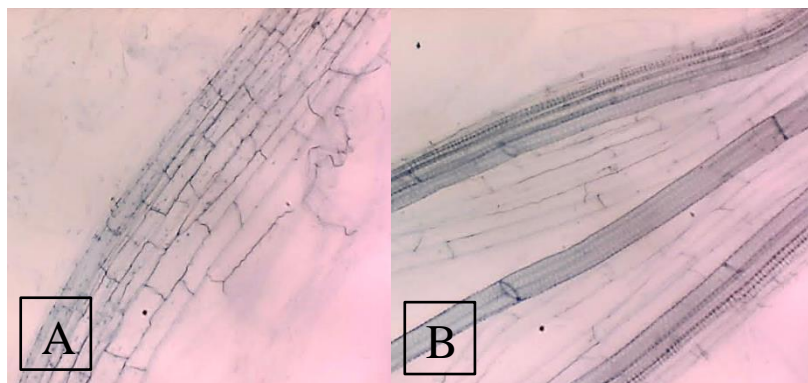


Figura 7: Ausencia de micorrizas en las raíces de tarwi

4.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Se realizaron en total 342 aislamientos a partir del segundo y tercer muestreo (denominados en adelante como “PC” e “IRD”, respectivamente): 143 cepas de hongos y 199 cepas de bacterias, de la cuales, 9 fueron bacterias de crecimiento lento (más de siete días).

La evaluación de cepas fúngicas se realizó cinco días después de la siembra en placas. El 97.9% de los aislamientos de cepas de hongos eran provenientes de las muestras de rizósfera, y de ellas el 60% provenían del campo de IRD-Jauja y el 40% del campo del Programa de Cereales. El 2.1% de los aislamientos provenían de las muestras de raíces. No se encontraron hongos en las placas provenientes de tallos, en ninguno de los dos campos (Tabla 2).

Tabla 2: Aislamientos fúngicos provenientes de PC e IRD

	PC	IRD	Total
Rizósfera	56	84	140
Raíces	1	2	3
Tallos	0	0	0
Total	57	86	143

La evaluación de colonias bacterianas se realizó un día después de la siembra. El 67.9% de los aislamientos bacterianos fueron provenientes del IRD-Jauja, mientras que sólo el 32.1% provenía del Programa de cereales-UNALM. En ambos casos, la mayoría de cepas fueron aisladas a partir de rizósfera; 64.3% en el campo de “IRD” y 75.4% en “PC”. En cuanto a las muestras de raíces y tallos, la situación difiere para cada campo, en el “PC”, se obtuvo mayor cantidad de cepas a partir de raíces en comparación a tallos, y en el caso de “IRD”, la cantidad de aislamientos entre raíces y tallos fueron similares (Tabla 3). Todas estas cepas

mostraron un crecimiento rápido (24 horas), sin embargo, se encontraron también bacterias de crecimiento lento únicamente en las muestras de nódulos. Nueve colonias de lentas fueron aisladas: 4 de “PC” y 5 de “IRD”. A pesar que se observaron muchas más cepas lentas en las placas de “IRD”, sólo pudieron ser evaluadas cinco, ya que las demás no lograron crecer en agar CZAPEK.

Tabla 3: Aislamientos bacterianos de rápido crecimiento provenientes de PC e IRD

	PC	IRD	Total
Rizósfera	46	83	129
Raíces	11	18	29
Tallos	2	24	26
Nódulos	2	4	6
Total	61	129	190

En el Perú aún no se tiene información abundante sobre los endófitos en *Lupinus mutabilis*, los estudios más cercanos a microorganismos simbiotes en esta especie se han realizado en algunas del mismo género: *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* principalmente, y sobre bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de nódulos, por lo que existe muy poca información sobre la diversidad simbiote en tallos, raíces y rizósfera de *L. mutabilis*. Este estudio nos permitirá dilucidar al menos, en parte, una primera visión de la diversidad microbiana que existe, no sólo en nódulos, sino también en raíces, tallos y rizósfera.

En el aislamiento de estos microorganismos, se observó que la mayor cantidad de aislados provinieron de rizósfera y esto es debido a que ellos interactúan en esta zona con las plantas, encontrando un ambiente favorable en ella por la cantidad de nutrientes. Es así que, la concentración de microorganismos en torno a las raíces, o rizósfera, es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990 mencionado por Rodríguez, 2008).

A pesar de que no haya estudios de endófitos en tallos y raíces de *Lupinus*, se han realizado investigaciones sobre ellos en otras plantas, una de ellas el trigo (Coombs y Franco, 2003). Conn *et al.* (2008), mencionaron que la presencia de estos microorganismos en el interior de la planta le confieren ciertas ventajas contra hongos patógenos y Sardi, *et al.* (1992), encontraron endófitas que promovían la protección natural de la planta.

En el caso de hongos, sólo se obtuvieron tres aislamientos de hongos, por lo que se debería profundizar más el estudio en estos microorganismos, ya que se han encontrado en *Lupinus*

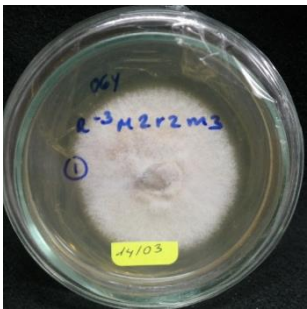
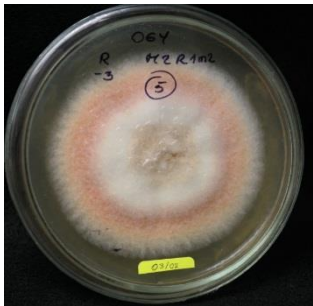
angustifolius, hongos endosimbiontes con gran importancia económica, puesto que producen toxinas que terminan dañando al ganado y ocasiona grandes pérdidas (Gamboa-Gaitán, 2006). Todo ello nos indica que es importante analizar también qué características presentan los microorganismos encontrados en raíces y tallos de tarwi.

4.4. AISLAMIENTOS FÚNGICOS





4.4.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica se realizó para todos los aislamientos de hongos obtenidos, ya que el 100% fue evaluado en la prueba de antagonismo contra un patógeno de tarwi. Se agruparon las cepas de hongos de acuerdo a características similares (textura, cantidad de micelio y color) entre ellas y se contabilizó la cantidad de aislamientos logrados en cada sección. Las características más frecuentes se muestran en la tabla 4. La descripción y caracterización detallada de las colonias fúngicas crecidas en medio de cultivo OGY, se encuentra en el Anexo 5.


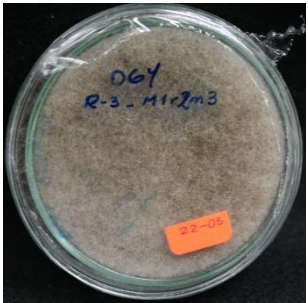
Tabla 4: Características macroscópicas de los aislamientos más frecuentes

Características (Textura, micelio, color anverso)	Imagen	Nº de cepas	Aislamientos
Textura aterciopelada con micelio escaso y de color blanco		37	14, 22, 25, 26, 30, 41, 42, 49, 53, 65, 66, 69, 70, 82, 83, 84, 86, 88, 90, 92, 93, 97, 100, 106, 107, 108, 110, 111, 112, 115, 116, 117, 119, 120, 126, 129, 139
Textura algodonosa con micelio escaso y de color naranja-amarillo		11	1, 5, 16, 17, 20, 43, 46, 60, 79, 81, 87

Continuación...

Características (Textura, micelio, color anverso)	Imagen	N° de cepas	Aislamientos
Textura algodonosa con micelio escaso y de color blanco		11	15, 40, 64, 76, 91, 94, 98, 105, 109, 118, 140
Textura algodonosa con micelio abundante y de color blanco		9	12, 18, 29, 32, 35, 38, 45, 63, 121
Textura aterciopelada con micelio escaso y de color blanco- verde		6	48, 123, 124, 128, 136, 137
Textura aterciopelada con micelio escaso y de color blanco- naranja		5	52, 61, 62, 73, 135

Continuación...

Características (Textura, micelio, color anverso)	Imagen	N° de cepas	Aislamientos
Textura membranosa con micelio escaso y de color crema		5	51, 85, 95, 104, 127
Textura aterciopelada con pliegues y micelio escaso y de color verde		4	71, 74, 132, 133
Textura algodonosa con micelio abundante y de color blanco parduzco		3	7, 39, 58

La presencia y distribución tanto de hongos como de bacterias en el suelo es influenciada por condiciones ambientales, edáficas, tipos de vegetación, prácticas de cultivo, etc. (Dick, 1992). Un estudio de hongos benéficos asociados a rizósfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K.) en Colombia, encontró que los niveles poblacionales de los géneros de hongos fueron variables según la intensidad de precipitación en los sitios de estudio (Riascos *et al.*, 2011). Los aislamientos observados en este trabajo sugieren una mayor diversidad de hongos asociados a *Lupinus* bajo las condiciones del campo IRD, sin embargo, se requeriría un estudio más profundo sobre la dinámica poblacional en ambos campos para confirmarlo.

En cuanto a la estructura miceliar, de los 143 aislamientos, el 98% fueron hongos filamentosos, este resultado concuerda con lo consignado en la literatura. Según Mayea y colaboradores en 1991, Giri y colaboradores en 2005, los géneros más comunes en los suelos, son *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Rhizotocnia*, todos ellos pertenecen al grupo de hongos filamentosos.

4.4.2. Prueba de antagonismo contra patógeno de tarwi e identificación microscópica

De las 143 cepas fúngicas aisladas, sólo nueve presentaron algún mecanismo de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, ya que impidieron el crecimiento longitudinal del hongo, formando un halo de inhibición donde se pudo medir el radio del patógeno con crecimiento influenciado. Los porcentajes de inhibición se encontraron en un rango de 38 a 74%, siendo este último proveniente de la cepa R-5_422 (cepa n°134, Figura 8a). En cuanto al campo del que fueron aisladas, se observó que de estas nueve cepas antagonicas, mostraron mayor capacidad antagonica las que fueron aisladas del campo "PC" en comparación con "IRD". En el Anexo 6 se detalla los resultados para esta prueba.

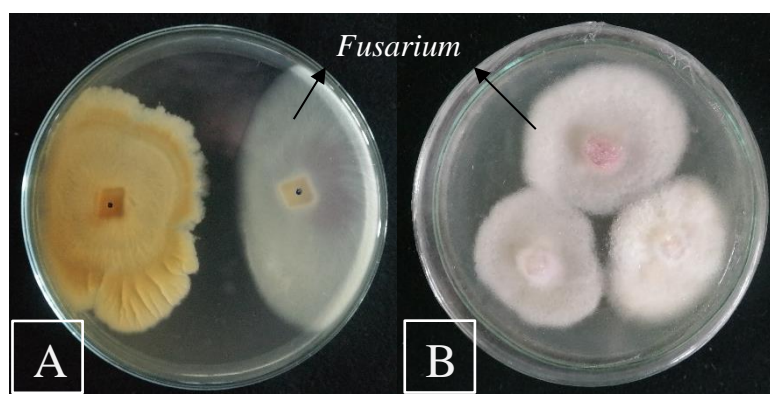


Figura 8: Prueba de antagonismo de aislados fúngicos contra *Fusarium oxysporum*

Las nueve cepas que resultaron antagonicas se observaron al microscopio luego de sembrarlas en cámara húmeda y teñirlas con azul de metilo. Se identificaron a nivel de género siete de ellas, pues los dos restantes no mostraron alguna estructura vegetativa conocida que permita su identificación.

- **Cepa N° 134 – R-5_422: *Aspergillus terreus***

Colonia de textura aterciopelada a arenosa, color marrón en el centro y blanco en los bordes cuando es joven, pero totalmente marrón cuando crece (Figura 9a). Llega a medir 4 cm de diámetro a los seis días de incubación a 30°C en agar OGY y presenta un ligero pigmento amarillo en este medio. A 100X se observan conidióforos vesiculares con la cabeza en forma de abanico levemente columnares (Figura 9b). Estas características nos indicarían que probablemente se trate del hongo *Aspergillus terreus*.

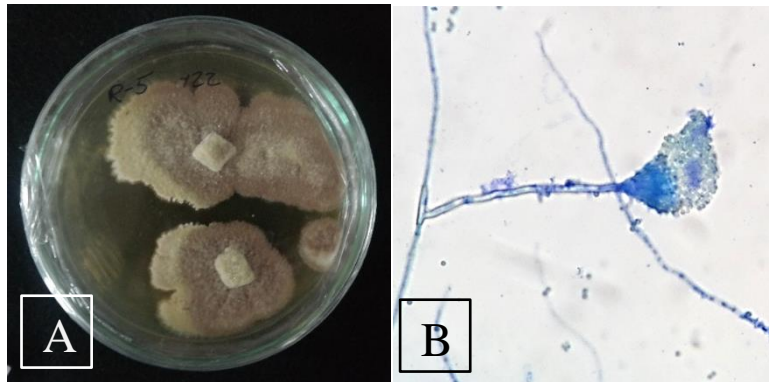


Figura 9: Características de la cepa 134, en agar OGY y al microscopio (100X)

- **Cepa N° 131 – R-5_322_1: *Aspergillus terreus***

Colonia de textura aterciopelada, color marrón claro y bordes blancos. De forma irregular y margen lobulado (Figura 10a). Alcanza 3 cm de diámetro a los 6 días de incubación a 30°C en medio de cultivo OGY. A 100 X se observaron conidióforos con cabezuela levemente columnar y fiálides dispuestas en forma radial (Figura 10b). Estas características nos indicarían que probablemente se trata del hongo *Aspergillus terreus*.

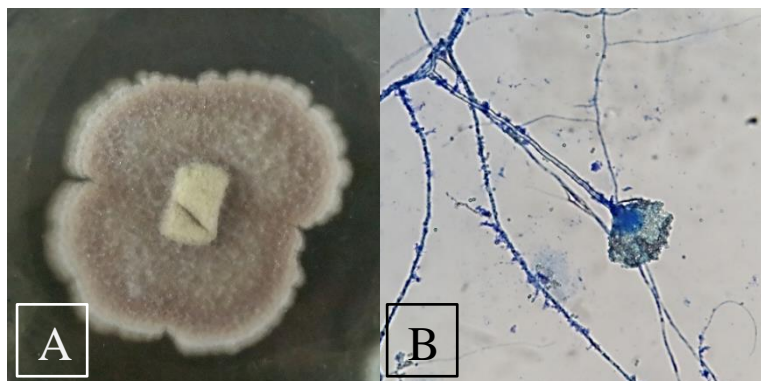


Figura 10: Características de la cepa 131, en agar OGY y al microscopio (100X)

- **Cepa N° 96 – R-4_332:** *Penicillium citrinum*

Colonia puntiforme de textura aterciopelada a veces pulverulenta, micelio escaso y de color verde oscuro con borde blanco (Figura 11a). Su margen es erosionado. A 100X se observaron conidióforos con fiálides organizadas en forma típica (llamadas “penicilli” o pincel) y conidias redondas, unicelulares y formando cadenas no ramificadas (Figura 11b). Además, las fiálides tenían forma de cilindro, lo que nos hace descartar que esta cepa pertenezca al género *Paecilomyces*. Por lo tanto, esta estructura vegetativa es representativa del género *Penicillium*. Para identificar hasta nivel de especie, esta muestra se mandó a analizar al departamento de Fitopatología de la UNALM, determinándose que se trataba de la especie *Penicillium citrinum* (Anexo 7).

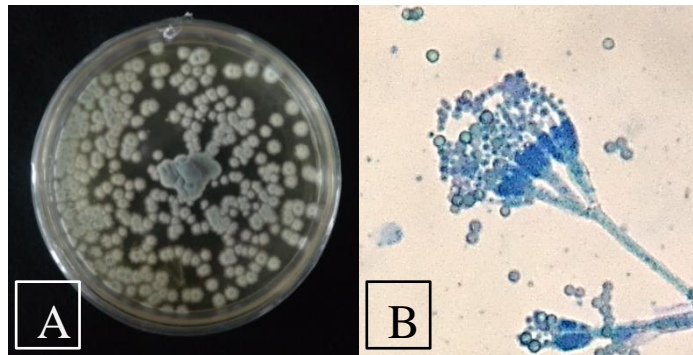


Figura 11: Características de la cepa 96, en agar OGY y al microscopio (100X)

- **Cepa N° 99 – R-4_412:** *Penicillium sp.*

Colonia puntiforme de textura aterciopelada y color verde claro y ligero borde blanco. Tiene una elevación convexa y micelio escaso (Figura 12a). El margen de la colonia es entero. A 100X se observaron conidióforos con fiálides organizadas en forma de “penicilli” (Figura 12b). Esta estructura nos confirma que la cepa N°99 pertenece al género *Penicillium*.

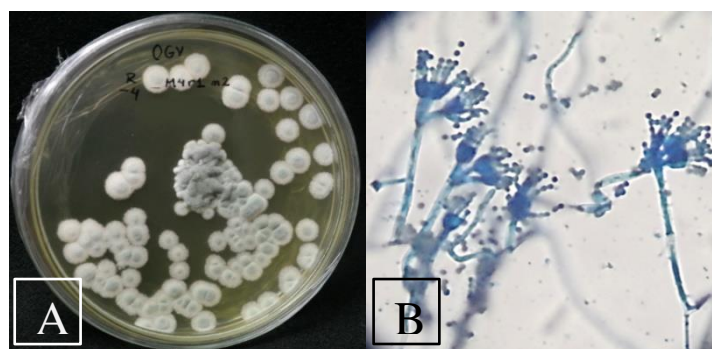


Figura 12: Características de la cepa 99, en agar OGY y al microscopio (100X)

- **Cepa N° 40 – R-3_333_5**

Colonia filamentosa de textura algodonosa y color blanco. Presenta micelio blanco escaso y un borde filamentoso. No se observa producción de pigmentos en medio OGY (Figura 13a). No se observó una estructura vegetativa que nos permite la identificación del género de esta especie (Figura 13b).

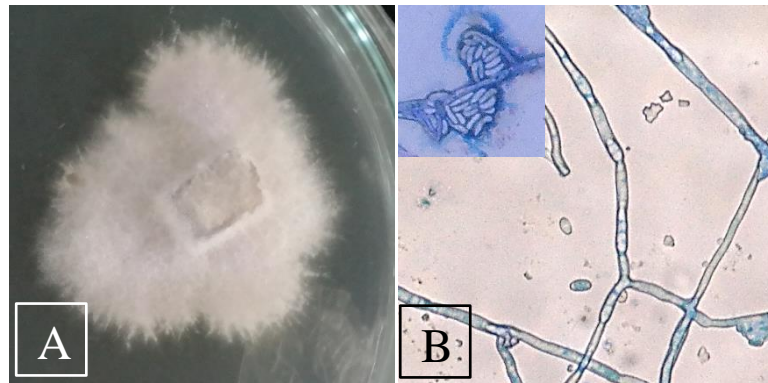


Figura 13: Características de la cepa 40, en agar OGY y al microscopio (100X)

- **Cepa N° 43 – R-3_413_11**

Colonia de textura algodonosa y color blanco con zonas ligeramente naranja. Alcanza un diámetro de 4 cm a los seis días de incubación en agar OGY a 30°C (Figura 14a). Se observaron macroconidios con 2 o 3 células. No se observaron estructuras vegetativas representativas de algún género (Figura 14b).

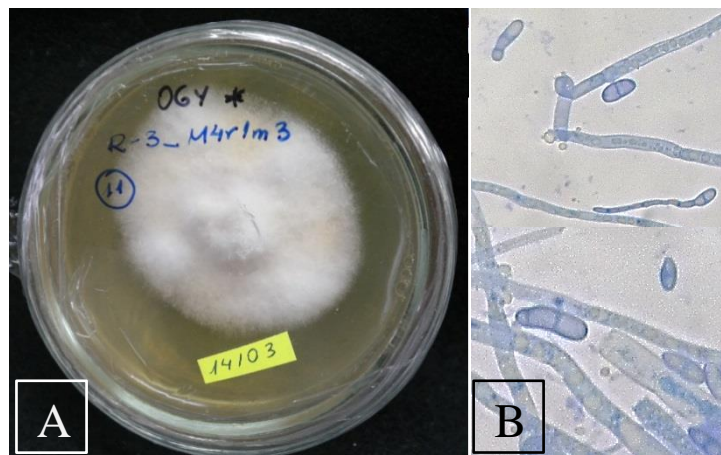


Figura 14: Características de la cepa 43, en agar y al microscopio (100X)

- Cepa N° 103 – R-4_422: *Aspergillus sp*

Colonia de textura aterciopelada y pulverulenta de color verde (Figura 15a). Llega a medir 3.5 cm de diámetro a los seis días de incubación a 30°C en medio de cultivo OGY. Presenta estructura vegetativa del género *Aspergillus* (Figura 15b).



Figura 15: Características de la cepa 103, en agar OGY y al microscopio (100X)

- Cepa N° 47 – R-3_413_1: *Aspergillus sp*

Estas colonias crecen lentamente en agar OGY a 30°C, alcanzando solo 2 cm a los seis días de incubación. Presenta una textura algodonosa de color blanco-crema a café-amarillo (Figura 16a). Presenta estructura vegetativa del género *Aspergillus* (Figura 16b).

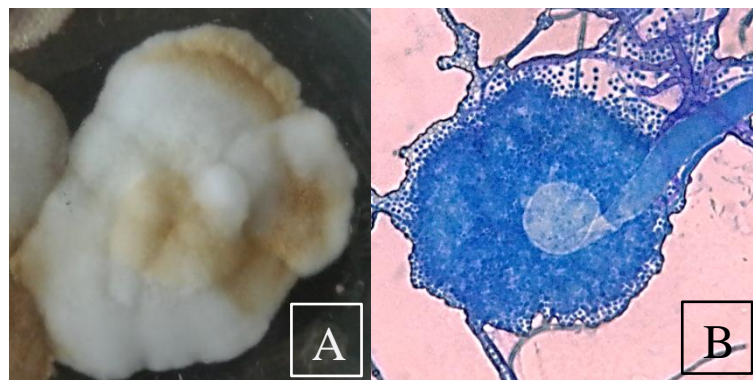


Figura 16: Características de la cepa 47, en agar OGY y al microscopio (100X)

- Cepa N° 105 – R-4_423: *Aspergillus sp.*

Colonia algodonosa de color blanco (Figura 17a). Alcanza 4 cm a los seis días de incubación en medio de cultivo OGY a 30°C. Presenta estructura vegetativa del género *Aspergillus* (Figura 17b).

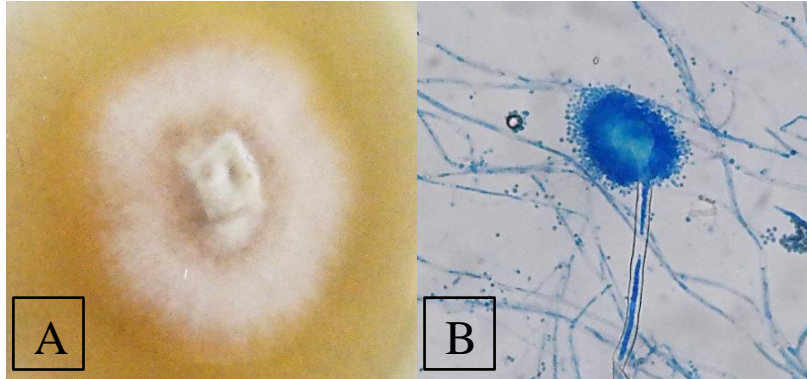


Figura 17: Características de la cepa 105, en agar y al microscopio (100X)

Se observa que las cepas antagonicas pertenecieron en su mayoría a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, todas aisladas de la rizósfera. No se puede afirmar que estos géneros dominaron la zona rizosférica de *Lupinus mutabilis*, pues no se identificaron todos los aislamientos, sin embargo, estudios afirman que en zonas áridas los hongos característicos están representados por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Flanagan 1981 mencionado por Samaniego y Chew 2007) y de forma más específica estos géneros han sido encontrados asociados a la rizósfera de otras especies de interés agrícola, como el ajo (Quiroz *et al.*, 2008), el tomate (Jarvis, 1998 mencionado por Roselló, 2003), hortalizas (Zago *et al.*, 2007), entre otros.

Las características macroscópicas y microscópicas que se observaron en el hongo con mayor porcentaje de inhibición concuerdan con Arias y Piñeros (2008), en su estudio de hongos filamentosos en suelo de páramo, quienes describen a las colonias de *Aspergillus terreus* como aterciopeladas, de color rosado parduzco que alcanzan un diámetro de 3.5- 5 cm en 7 días. Presentan exudado incoloro y producen un pigmento amarillo difusible en el medio, permitiéndonos sugerir a la cepa N° 131 y 134 como *Aspergillus terreus*, mayor antagonista (71-74%) en este estudio, seguido de *Penicillium citrinum* con un 64% de inhibición.

La capacidad antagonica de especies del género *Aspergillus* frente a fitopatógenos como *Fusarium* (Quiroz *et al.*, 2008, Anil Kumar y Rajkumar, 2014), *Penicillium* (Quiroz *et al.*,

2008), *Macrophomina phaseolina* (Ullah *et al.*, 2010 mencionado por Pérez *et al.*, 2014), entre otros, es ampliamente reportada. Quiroz *et al.* 2008 indican que *Aspergillus* muestra mecanismos antagónicos de competencia por espacio y producción de sustancias antibióticas denotadas por el cambio de coloración en el medio de cultivo.

Por su parte, *Aspergillus terreus* también ha sido encontrado como antagonista de *Fusarium oxysporum*. Dawood y Mohamed (2015), estudiaron tres aislamientos de *A. terreus* como control biológico de *F. oxysporum* por interacción dual y encontraron que éste fue inhibido hasta un 89%. Bashar y Chakma (2014), evaluaron el efecto de siete hongos de suelo en el crecimiento de *F. oxysporum* mediante tres pruebas: interacción dual, inhibición por producción de metabolitos volátiles y no volátiles. Ellos observaron que *A. terreus* inhibió el crecimiento radial del patógeno en un 53.33% en la primera prueba, en la segunda no mostró un fuerte antagonismo pues sólo inhibió un 19%, mientras que en la última prueba logró hasta un 83.33% de inhibición, similar al porcentaje logrado por *Trichoderma harzianum*, hongo antagonista muy reportado. Con ello se puede sugerir que *A. terreus* presenta un mecanismo de acción antagónica mediante la competencia por nutrientes (interacción dual) y producción de sustancias antibióticas (metabolitos no volátiles), lo cual es respaldado por lo descrito anteriormente en el estudio de Quiroz *et al.* (2008). Resultados similares han sido obtenidos por otros investigadores como Melo *et al.*, (2006), quien reportó a *Aspergillus terreus* como control biológico potencial de *S. sclerotiorum*, pues mostró fuerte actividad parasítica esporulando profusamente sobre los esclerocios y años más tarde, Adia y Taghreed, (2014) mostraron la eficacia del hongo contra patógenos como *Rhizotocnia* y *Penicillium*.

Algunas especies del género *Penicillium* también han mostrado antagonismo frente a conocidos patógenos como *Phytophthora infestans* en el cultivo de tomate (Vera *et al.*, 1999) y *Macrophomina phaseolina* (Cherkupally *et al.*, 2016). Respecto al hongo *Penicillium citrinum*, éste ha sido catalogado como un patógeno indefinido, es decir, un microorganismo que, sin ser considerado normalmente como fitopatógeno, puede llegar a inhibir el crecimiento de la planta (Hyakumachi y Kubota, 2004). En un estudio de zinnia se reportó que *P. citrinum* llegó a disminuir el desarrollo vegetal en un 36% (Yuen y Schroth, 1986). Sin embargo, científicos han evaluado también la capacidad antagónica de este hongo. Alwathnani *et al.* (2012), evaluaron el potencial de control biológico de algunos antagonistas locales frente a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* y sus resultados del ensayo *in vitro* revelaron

que *P. citrinum* inhibió el crecimiento del patógeno en un 59%. Junto a otras pruebas, concluyen que este hongo tiene gran potencial de ser usado como agente de control biológico. Dwivedi y Enespa, 2013 obtuvieron también resultados similares, a través de la técnica *poisoned food* observaron que *P. citrinum* inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en un 67.54%. Estos resultados respaldan lo observado en nuestro estudio: la inhibición en un 64% del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* por parte de *P. citrinum*.

Es importante conocer que hongos antagonistas con altos niveles de biocontrol *in vitro* pueden no mostrar resultados similares *in vivo* debido a las condiciones ambientales y la competencia con otros microorganismos (Alwathnani *et al.* 2012). Se sugiere realizar estudios posteriores en condiciones de campo.

4.5. AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE RÁPIDO CRECIMIENTO

Se aislaron 190 cepas de rápido crecimiento (24 horas) provenientes en su mayoría de rizósfera. Todas ellas (a excepción de las provenientes de nódulos, que sólo se estudiaron por su capacidad para fijar nitrógeno *in vitro*) fueron evaluadas en un primer momento por su producción de ácido indol-acético, seleccionando solo las mejores para las futuras pruebas, es por ello que la caracterización macroscópica y microscópica en este grupo de bacterias se realizó luego de la prueba de AIA.

4.5.1. Caracterización por capacidades de promoción del crecimiento de plantas

a) Producción de ácido indol acético (AIA)

En nuestro estudio, este análisis se realizó de forma semi-cualitativa (Figura 18a), estableciendo, según las tonalidades observadas en los resultados, tres niveles de producción de hormona: bajo, medio y alto; a los cuales, se les asignó valores del 1 al 3, respectivamente (Figura 18b). El reactivo de Salkowski fue elaborado con ácido sulfúrico y se utilizó la relación reactivo–muestra 2:1, tal y como lo realizó Lara *et al.*, 2011 en su investigación. Además, se adicionó triptófano al medio de cultivo por ser el precursor de la biosíntesis de la auxina.

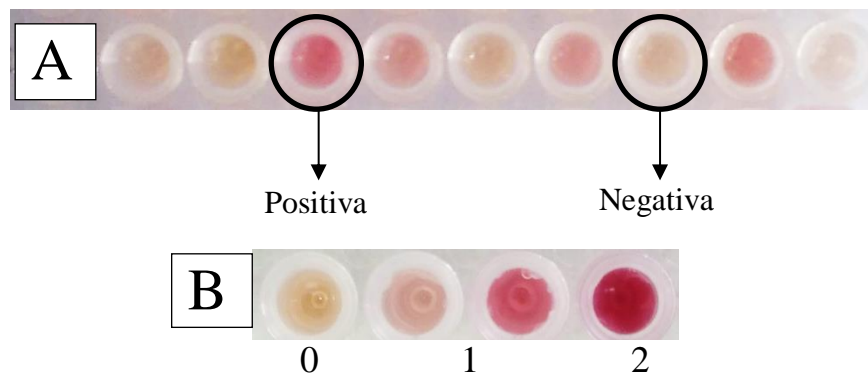


Figura 18: Producción de AIA por aislados bacterianos de rápido crecimiento

En la presente investigación se evaluó la producción de esta hormona en 184 microorganismos aislados, encontrándose que 66 produjeron la auxina, y de ese grupo sólo 36 mostraron una concentración de valor 2 y 3, las cuales fueron consideradas para las siguientes pruebas PGPR. Los resultados mostraron que de las seleccionadas, el 83% perteneció al campo IRD, lo que podría sugerir una diversidad microbiana más eficiente con las condiciones de ese campo. Además, sólo 3 cepas obtuvieron el valor máximo: RB06, RB14 y RB21 (Tabla 5), todas ellas pertenecientes a rizósfera. Un estudio de endófitos en papa encontró que aislados rizósfericos mostraron altos valores de producción de AIA, sin embargo, la mayor producción provino de un aislado de raíz (Soler *et al.*, 2012), resultado que no concuerda con el nuestro, debido tal vez a la poca cantidad de aislamientos de raíces que se obtuvo en este estudio. Respecto a su coloración Gram, se encontró que sólo 8 cepas positivas de AIA fueron Gram positivas, esto se respalda por muchos estudios que afirman que los microorganismos productores de AIA en su mayoría son gram-negativos (Datta y Basu, 2000) y sólo algunos gram positivos pertenecientes al género *Bacillus* producen esta fitohormona (Wahyudi *et al.*, 2011). Algunas investigaciones han demostrado que bajas concentraciones de fitohormona (menores a 1 μM) son capaces de estimular el crecimiento vegetal (García *et al.*, 2005 mencionado por Rodríguez y Hernández, 2009) y altas concentraciones pueden llegar a inhibir el elongamiento (Silva, 1998). En este estudio no se realizó una determinación cuantitativa de esta naturaleza.

Se les asignó una nueva codificación a las cepas bacterianas positivas para facilitar los posteriores análisis. El nuevo código indica la parte de la planta de donde fue aislado (N: nódulos, R: rizósfera, RA: raíces, T: tallos), la letra B indicando que son bacterias y por último un número consecutivo. En la tabla 5 se muestran los 36 aislados seleccionados y sus respectivos códigos.

Tabla 5: Cepas seleccionadas por producción de AIA (nivel 2 y 3)

Aislado bacteriano	Código	Nivel asignado	Aislado bacteriano	Código	Nivel asignado
R-3_313	RB01	2	R-6_313	RB19	2
R-3_523	RB02	2	R-6_313_1	RB20	2
R-4_232	RB03	2	R-6_323	RB21	3
R-4_432	RB04	2	R-6_423	RB22	2
R-4_512	RB05	2	R-6_413_1	RB23	2
R-4_513	RB06	3	R-6_423_1	RB24	2
R-5_233	RB07	2	R-6_433	RB25	2
R-5_313	RB08	2	R-6_513_2	RB26	2
R-5_322	RB09	2	R-6_523	RB27	2
R-5_323	RB10	2	R-6_533_3	RB28	2
R-5_523	RB11	2	Ra-3_222	RAB01	2
R-5_533	RB12	2	Ra-6_232	RAB02	2
R-5_533_1	RB13	2	T-3_423	TB01	2
R-6_133_2	RB14	3	T-4_413	TB02	2
R-6_213	RB15	2	T-4_423	TB03	2
R-6_213_1	RB16	2	T-5_413	TB04	2
R-6_223_1	RB17	2	T-5_423	TB05	2
R-6_233	RB18	2	T-5_533	TB06	2

El resultado de los 184 aislados bacterianos para esta prueba se detalla en el Anexo 8

b) Solubilización de fosfato

En nuestro estudio, la determinación cualitativa de solubilización de fosfato tricálcico se llevó a cabo por siembra directa en medio de cultivo NBRIP y la positividad de las cepas se observó por la formación de un halo transparente alrededor de ellas (Figura 19b). Como resultado esperado, el control negativo BAC15 MB no formó un halo (Figura 19a).

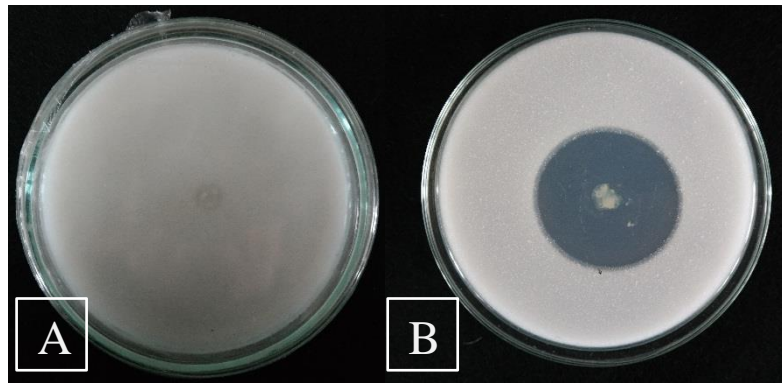


Figura 19: Solubilización de fosfato tricálcico por los aislados bacterianos de rápido crecimiento

De las 36 aislados evaluados, ocho mostraron la capacidad de hacer disponible el fósforo a partir de fosfato tricálcico. Patiño y Sánchez (2012) encontraron que 22 de sus aislamientos provenientes de rizósfera de chontaduro poseían la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, sin embargo, sólo 7 de ellas conservaron esa capacidad a lo largo del tiempo. Esto lo comprobaron mediante una prueba de estabilidad fenotípica. Respecto al campo del que fueron aisladas, las ocho cepas provienen del campo IRD, lo que sugeriría nuevamente una relación de las condiciones en ese campo y la eficiencia en las capacidades PGPR de la microflora. La variabilidad en los microorganismos solubilizadores puede darse por muchas causas: Kucey *et al.* (1989) señalaron que esta variación se debe al clima y a la historia del cultivo, mientras que Kobus (1962) mencionado por Fernández *et al.* (2005) indica que la diferencia en el número de solubilizadores está influenciada por el tipo de suelo y los cultivos, más que por las características físicas y químicas del mismo.

De los ocho positivos, dos fueron endófitos aislados de tallo, mientras que los restantes pertenecían a rizósfera. Goldstein (1994) mencionado por Tejera *et al* (2013) señala que las rizobacterias, al encontrarse en un ambiente donde la mayor cantidad de fosfatos se encuentra insoluble, tendrían que haber evolucionado hacia la utilización de esta fuente de nutrientes en las condiciones en que normalmente se encuentran en el suelo, con lo que se explicaría que esta capacidad de solubilización sea más frecuente en ellas.

Las cepas alcanzaron un halo constante a los 20 días del sembrado y los valores de ERS se encontraron en un rango de 172% a 496% (Tabla 6), éste último proveniente de la cepa RB10 (2.30 cm de solubilización). Estos resultados fueron mayores a los encontrados por Ortiz (2012), en su estudio de bacterias aisladas de rizósfera de maca, donde obtuvo una ERS máxima de 128.37% a 22°C, 152% a 12°C y 160% a 6°C; y por Vilchez (2017), en sus rizobacterias de frijol, cuyo máximo diámetro de solubilización fue de 1 cm. Se observó

también que la ERS y el halo de solubilización no presentan una relación directa, pues la cepa que obtuvo menor halo fue RB22, pero no obtuvo la menor ERS. En el caso de RB10 sí coincidió que su diámetro de halo y ERS fueron los mayores.

Tabla 6: ERS en los aislados positivos para prueba de solubilización

Aislado bacteriano	DS	DB	E%
RB01	2.68	0.58	462.1
RB02	2.37	0.62	382.3
RB08	2.6	0.75	346.7
RB10	2.88	0.58	496.6
RB14	1.62	0.94	172.3
RB22	1.25	0.63	198.4
TB01	2.31	0.92	251.1
TB05	2.7	0.93	290.3

Estos resultados demuestran la capacidad de las bacterias aisladas para transformar el fosfato insoluble en una forma disponible para el cultivo y con ello, el potencial uso de estas cepas para la elaboración de inoculantes.

c) Antagonismo contra *Fusarium oxysporum*

En esta investigación, se realizó un enfrentamiento dual entre el patógeno *Fusarium oxysporum* y las 36 cepas seleccionadas, pues se le considera un método práctico para la selección inicial de supuestos antagonistas (Chan *et al.*, 2003). El mecanismo de acción evaluado en este ensayo fue el efecto inhibitorio por medio de metabolitos producidos por las bacterias, es por ello que la cepa en estudio se siembra con 24 horas de anticipación. De los 36 aislados, diez mostraron resultados positivos en esta prueba, pero cinco de ellos mostraron valores mayores a BAC15 MB (Figura 20a, tabla 7), que obtuvo un 32.36% de inhibición al patógeno. El mayor antagonista fue de RB11 con un 49.37% (Figura 20b). Estos resultados son menores a lo observado por autores como Trujillo *et al.* (2007), quien encontró rizobacterias en arroz que inhibieron a *Fusarium oxysporum* en valores cercanos a 100% y Adame *et al.* (2009), quien obtuvo un valor de inhibición del 96% con uno de sus aislados rizosféricos en vainilla. Toloza (2014) aisló endófitos de raíz y rizósfera de uchuva, encontrando mayor cantidad de antagonistas en los endófitos de raíz; en nuestro estudio sólo

había dos bacterias endófitas de raíz entre las 36 seleccionadas, y de ellas una mostró fuerte actividad antagonica frente a *Fusarium*.

Tabla 7: Porcentajes de inhibición de aislamientos de rápido crecimiento frente a *Fusarium oxysporum*

Cepa	%inhibición
BAC15MB	32.37
RB03	23.24
RB05	17.01
RB08	10.79
RB10	29.05
RB11	49.38
RB15	28.22
RB23	46.06
RB24	48.13
RB26	33.20
RAB02	36.51

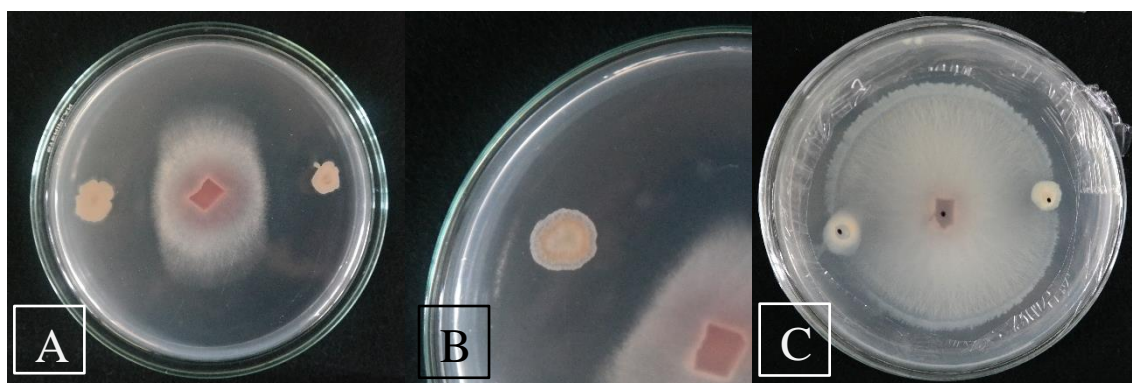


Figura 20: Antagonismo de aislados bacterianos contra *Fusarium oxysporum*

En cuanto al campo del que fueron aisladas, a diferencia de los aislados fúngicos, se observó que, de estas diez cepas antagonicas, las que fueron aisladas del campo “IRD” mostraron mayor capacidad antagonica que los aislados del campo “PC”.

En el Anexo 9 se muestran los radios de inhibición producidos por cada aislado bacteriano.

d) Producción de sideróforos

De las 36 cepas evaluadas, la mayoría resultó positiva, a excepción de RAB02 (Figura 21c). De modo general, se observó que BAC15 MB producía sideróforos (Figura 21a), pero en pocas cantidades, ya que 24 de los aislados superaron su valor de eficiencia. La mayor producción de sideróforos provino del aislado RB08 con un valor de ERP de 500% (Tabla

8) y un halo de aproximadamente 4 cm (Figura 21b), resultados que superó a lo encontrado por autores como Tortora *et al.* (2007), quienes aislaron cepas de *Azospirillum* en frutilla y Sánchez (2011), quien aisló bacterias PGPR en tomate. Ellos obtuvieron diámetros de producción máximos de 2.38 cm y 1.7 cm, respectivamente. En cuanto al lugar de procedencia, no se observó que un campo predominara sobre el otro, tanto PC como IRD mostraron altas y bajas eficiencias. Cuando se relaciona esos resultados con la prueba de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, se observa que si bien no hay una relación directa (los aislados con mayores valores de eficiencia relativa de producción no son los más antagonicos), todas las cepas llegan a producir sideróforos, lo que indicaría que estas bacterias podrían usar la producción de estos metabolitos quelantes como método para inhibir a *Fusarium oxysporum*. Hebbar *et al.* 1998 lograron suprimir los síntomas provocados por *Fusarium* en maíz, mediante la aplicación de una cepa de *Burkholderia cepacea*, indicando que en este efecto podrían estar involucrados diferentes mecanismos como la producción de sideróforos y la inducción de resistencia en la planta.

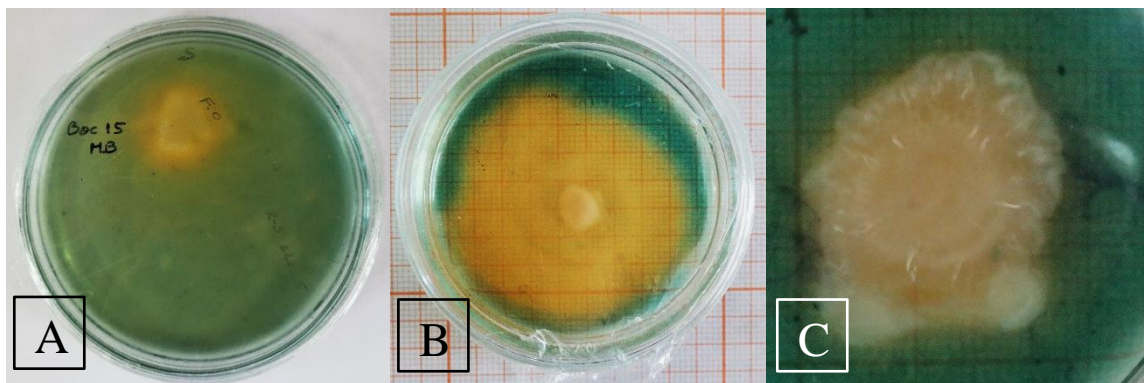


Figura 21. Producción de sideróforos por aislados bacterianos de rápido crecimiento

Tabla 8: ERP de sideróforos por los aislados bacterianos de rápido crecimiento

Aislado Bacteriano	DP (cm)	DB (cm)	ERP	Aislado Bacteriano	DP (cm)	DB (cm)	ERP
BAC15 MB	1.5	1.1	136.4	RB19	1.8	0.8	216.3
RB01	1.1	0.9	122.2	RB20	2.7	2.4	112.5
RB02	3.2	1.1	290.9	RB21	2.4	1.1	210.5
RB03	5.0	2.2	227.3	RB22	1.9	1.1	175.9
RB04	2.0	1.1	188.3	RB23	2.1	1.8	116.7
RB05	3.9	1.1	354.5	RB24	3.7	3.4	108.8
RB06	2.7	1.1	250.4	RB25	2.5	1.3	194.9
RB07	5.0	2.5	200.0	RB26	1.6	1.3	119.8
RB08	4.0	0.8	500.0	RB27	4.2	2.5	166.4
RB09	1.6	0.9	169.1	RB28	2.5	2.3	108.7
RB10	3.4	2.3	147.8	RAB01	4.4	3.6	122.2
RB11	2.0	1.2	167.9	RAB02	2.3	2.3	100.0
RB12	2.8	2.5	112.0	TB01	4.6	4.2	109.5
RB13	3.8	0.8	475.0	TB02	2.1	1.5	140.0
RB14	2.3	0.7	318.1	TB03	3.8	3.5	108.6
RB15	1.8	1.1	163.6	TB04	5.0	1.2	416.7
RB16	3.4	1.3	261.5	TB05	3.2	2.3	139.1
RB17	2.8	1.4	200.0	TB06	5.0	4.1	122.0
RB18	5.0	2.4	212.8				

DP: diámetro de producción de sideróforos, DB: diámetro crecimiento bacteriano

Algunas investigaciones indican que el potencial de promoción de crecimiento es mayor en endófitos comparados con rizobacterias (Sessitsch *et al.*, 2004), principalmente en el control biológico de patógenos, por lo que se sugiere realizar más aislamientos de endófitos de tarwi, y estudiar sus capacidades PGPR.

4.5.2. Caracterización macroscópica y microscópica

Se realizó la caracterización macroscópica a las 36 colonias seleccionadas luego de la prueba de producción de AIA, y también a las 6 colonias de rápido crecimiento aisladas de nódulos. En la tabla 9 se muestran las características observadas a las 24 horas de incubación a 35°C en medio de cultivo AN.

Tabla 9: Caracterización macroscópica de los 36 aislados seleccionados

Aislado bacteriano	Campo	Forma	Elevación	Margen	Color
RB01	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB02	IRD	puntiforme	plana	ondulado	crema-blanco
RB03	PC	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB04	PC	puntiforme	plana	erosionado	crema-blanco
RB05	PC	irregular	plana	entero	crema-blanco
RB06	IRD	puntiforme	plana	entero	crema-blanco
RB07	IRD	irregular	plana	lobulado	crema-blanco
RB08	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-translúcido
RB09	PC	puntiforme	plana	entero	crema-blanco
RB10	IRD	puntiforme	convexa	entero	crema-translúcido
RB11	IRD	puntiforme	convexa	entero	crema-blanco
RB12	IRD	puntiforme	elevada	ondulado	crema-translúcido
RB13	IRD	irregular	plana	lobulado	crema-blanco
RB14	IRD	irregular	plana	filamentosa	crema-blanco
RB15	IRD	puntiforme	plana	entero	crema-translúcido
RB16	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB17	IRD	puntiforme	plana	entero	crema-blanco
RB18	IRD	irregular	plana	entero	crema-translúcido
RB19	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB20	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB21	IRD	fusiforme	plana	entero	crema-blanco
RB22	IRD	filamentosa	plana	ondulado	crema-blanco
RB23	IRD	puntiforme	plana	erosionado	crema-blanco
RB24	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RB25	IRD	circular	plana	entero	crema-blanco
RB26	IRD	rizoide	plana	erosionado	crema-blanco
RB27	IRD	puntiforme	convexa	entero	crema-blanco
RB28	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-blanco
RAB01	PC	irregular	plana	entero	beige
RAB02	PC	irregular	elevado	ondulado	crema-blanco
TB01	IRD	puntiforme	plana	ondulado	crema-translúcido
TB02	IRD	puntiforme	plana	ondulado	crema-translúcido
TB03	IRD	irregular	plana	entero	crema-blanco
TB04	IRD	filamentosa	plana	erosionado	crema-blanco

Continuación...

Aislado bacteriano	Campo	Forma	Elevación	Margen	Color
TB05	IRD	irregular	plana	entero	crema-translúcido
TB06	IRD	irregular	plana	ondulado	crema-translúcido
NR01	IRD	puntiforme	plana	entero	blanco
NR02	IRD	puntiforme	plana	entero	crema-translúcido
NR03	IRD	filamentosa	plana	erosionado	beige
NR04	PC	irregular	Convexa	lobulado	crema-blanco
NR05	IRD	irregular	Plana	filamentosa	crema-translúcido
NR06	PC	irregular	convexa	entero	blanco

La caracterización microscópica consistió en la coloración que las cepas presentaron frente a la tinción Gram, para los 190 aislados, y la forma de la bacteria observada en el microscopio, únicamente para las 36 seleccionadas; observando así, que el 83% de éstas fueron bacilos y cocobacilos gram-negativos. Al respecto, Rodríguez (2002) menciona que los microorganismos que casi invariablemente ocupan el mayor porcentaje de la rizósfera son los bacilos cortos gram-negativos. En la tabla 10 se muestran los resultados de las 36 cepas seleccionadas y los 6 aislamientos de nódulos.

Tabla 10: Caracterización microscópica de los 36 aislados seleccionados

Aislado bacteriano	Tinción Gram	Forma	Aislado bacteriano	Tinción Gram	Forma
RB01	negativo	bacilo	RB22	positiva	bacilo
RB02	positivo	cocobacilo	RB23	negativo	bacilo
RB03	negativo	cocobacilo	RB24	negativo	cocobacilo
RB04	positivo	cocobacilo	RB25	negativo	bacilo
RB05	positivo	bacilo	RB26	positivo	bacilo
RB06	negativo	cocobacilo	RB27	negativo	bacilo
RB07	negativo	cocobacilo	RB28	negativo	cocobacilo
RB08	negativo	bacilo	RAB01	negativo	coco
RB09	negativo	coco	RAB02	negativo	cocobacilo
RB10	negativo	cocobacilo	TB01	negativo	coco
RB11	negativo	bacilo	TB02	negativo	cocobacilo
RB12	negativo	cocobacilo	TB03	negativo	cocobacilo
RB13	negativo	cocobacilo	TB04	negativo	cocobacilo
RB14	positivo	bacilo	TB05	negativo	bacilo

Continuación

Aislado bacteriano	Tinción Gram	Forma	Aislado bacteriano	Tinción Gram	Forma
RB15	negativo	bacilo	TB06	negativo	cocobacilo
RB16	negativo	cocobacilo	NR01	positivo	bacilo
RB17	negativo	cocobacilo	NR02	positivo	bacilo
RB18	negativo	cocobacilo	NR03	positivo	cocobacilo
RB19	positivo	cocobacilo	NR04	negativo	bacilo
RB20	positivo	bacilo	NR05	positivo	cocobacilo
RB21	negativo	cocobacilo	NR06	negativo	bacilo

Los resultados la Tinción Gram para las 190 cepas bacterianas se detallan en el Anexo 10.

4.5.3. Integración de las capacidades promotoras de crecimiento vegetal

En la tabla 11 se resumen los resultados de las 36 cepas seleccionadas para las pruebas PGPR. Se consideró a la producción de AIA y solubilización de fosfato como las capacidades principales para la elección de las cepas que serían evaluadas en la prueba de germinación *in vitro* y en invernadero. Para la producción de AIA, se sabe que las 36 producían esta auxina, ya que gracias a esa capacidad fueron elegidas, sin embargo, se distinguió con una “x” en aquellas que tuvieron los mayores niveles de AIA (nivel 3), mientras que, en la prueba de solubilización, se marcó con una “x” a aquellas que resultaron positivas, distinguiendo la de mayor y menor eficiencia.

Tabla 11: Integración de los resultados en las pruebas PGPR

Aislados	Capacidades PGPR				Germinación <i>in vitro</i>
	Producción AIA	Solubilización de fosfato	Antagonismo	Producción sideróforos	
RB01		X		X	X
RB02		X		X	X
RB03			X	X	
RB04				X	
RB05	X		X	X	
RB06	X			X	
RB07				X	
RB08		X	X	X	X
RB09				X	
RB10		Mayor ERS	X	X	X

Continuación...

Aislados	Producción AIA	Solubilización de fosfato	Antagonismo	Producción sideróforos	Germinación <i>in vitro</i>
RB11			X	X	
RB12				X	
RB13				X	
RB14	X	Menor ERS		X	X
RB15				X	
RB16				X	
RB17				X	
RB18				X	
RB19				X	
RB20				X	
RB21	X			X	
RB22		X		X	X
RB23			X	X	
RB24			X	X	
RB25				X	
RB26			X	X	
RB27				X	
RB28				X	
RAB01				X	
RAB02			X		
TB01		X		X	X
TB02				X	
TB03				X	
TB04				X	
TB05		X		X	X
TB06				X	

Se seleccionó para la prueba de germinación *in vitro* a todas aquellas que presentaban las dos primeras capacidades simultáneamente, teniendo así los 8 aislados positivos para la solubilización.

4.5.4. Prueba de germinación *in vitro*

El tratamiento de semillas con inoculantes microbianos ha sido empleado para promover y acelerar la germinación (Ortiz, 2012). Estos inoculantes están constituidos por microorganismos con características aprovechables para el desarrollo de los cultivos, las que comúnmente conocemos como PGPR. Entre los distintos mecanismos de acción que poseen estas bacterias, se encuentra la capacidad de producir metabolitos fisiológicamente activos que estimulan el crecimiento vegetal, tales como auxinas, giberelinas y citoquininas (Torres

et al., 2003). Vázquez y Torres (1995) mencionados por Torres et al. (2003) señalan que estas sustancias juegan un importante rol en la interrupción del letargo seminal, lo cual trae consigo una predisposición prematura de la germinación.

En nuestro estudio se realizó una prueba de germinación en semillas de lechuga, teniendo como tratamientos individuales a las ocho cepas que resultaron positivas para la producción de AIA y solubilización de fosfatos. Como control negativo se usó caldo nutritivo sin inocular. La temperatura escogida para este ensayo fue de 21°C en una cámara de crecimiento. Se analizaron tanto los valores de semillas con radícula y semillas germinadas con hojas cotiledonares, sin embargo, los análisis estadísticos de comparación sólo se consideraron para estas últimas, cuyos porcentajes en cada tratamiento se muestran en los gráficos como serie “H”.

Considerando sólo aquellas semillas que presentaban hojas cotiledonares (serie H) se observó un incremento en el porcentaje de germinación a los 3 dds, por parte de los aislados RB10, RB01, RB22 y RB08, siendo significativo éste último (Anexo 11), el cual obtuvo un 63% de germinación comparado con un 20% obtenido por el control (Figura 22). Se observó también que TB05 obtuvo mayor germinación que el control, pero gran parte de sus semillas no lograron formar hojas cotiledonares y sólo creció la radícula (serie R), por lo que no se las consideró en el conteo.

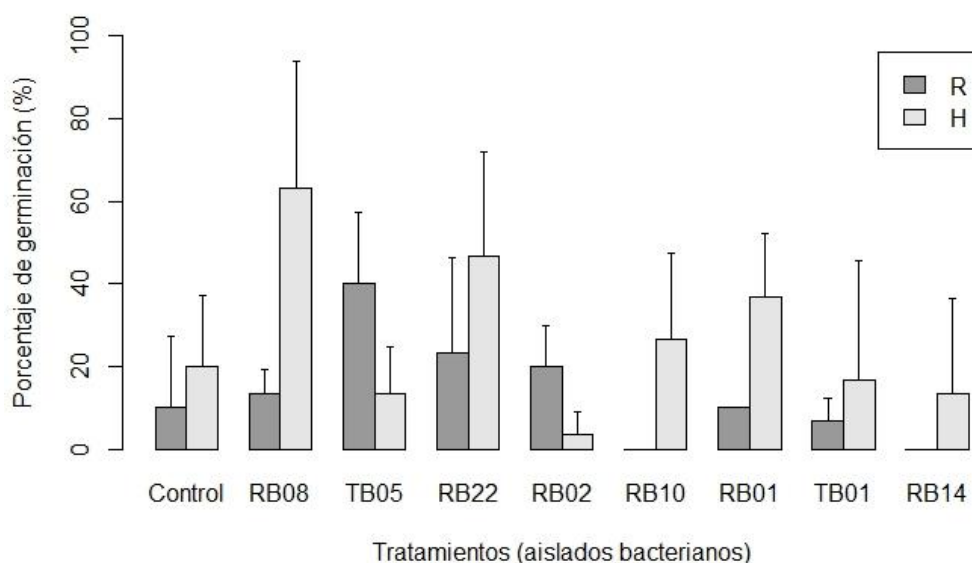


Figura 22: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 3 días después del sembrado

A los 4 días después del sembrado (dds), se observó que las cepas RB08, RB22 y RB01 mantenían la superioridad con porcentajes 70%, 67% y 43% en comparación con el control que obtuvo un 27% de semillas germinadas, también se puede destacar que, si bien la cepa TB05 demoró más en formar hojas cotiledonares, a los 4 dds aumentó su porcentaje a 50% superando también al control (Figura 23). Sin embargo, la cepa RB10, quien se encontraba en un inicio superior, no mostró ningún incremento y se mantuvo igual que el control. Los únicos porcentajes significativos fueron los de RB08 y RB22 (Anexo 11). Para el caso de semillas con radícula, se observó que TB01 y RB14 son las cepas que más demoraron en la germinación pues ni formaban radícula y menos hojas cotiledonares.

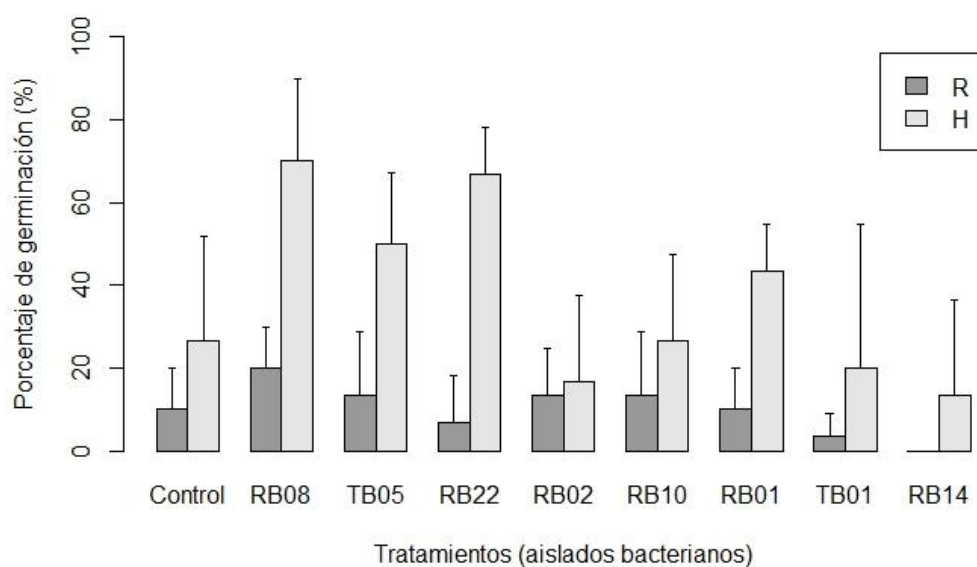


Figura 23: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 4 días después del sembrado

A los 5 dds, RB10 vuelve a incrementar su porcentaje de semillas con hojas cotiledonares (43%), superando al control (33%), mientras que RB22, RB08, RB01 y TB05 siguen manteniéndose por encima del control con valores de 76%, 73, 53% y 50%, respectivamente (Figura 24). A pesar de ello, ninguno de los tratamientos fue significativo a los 5 días después del sembrado (Anexo 11).

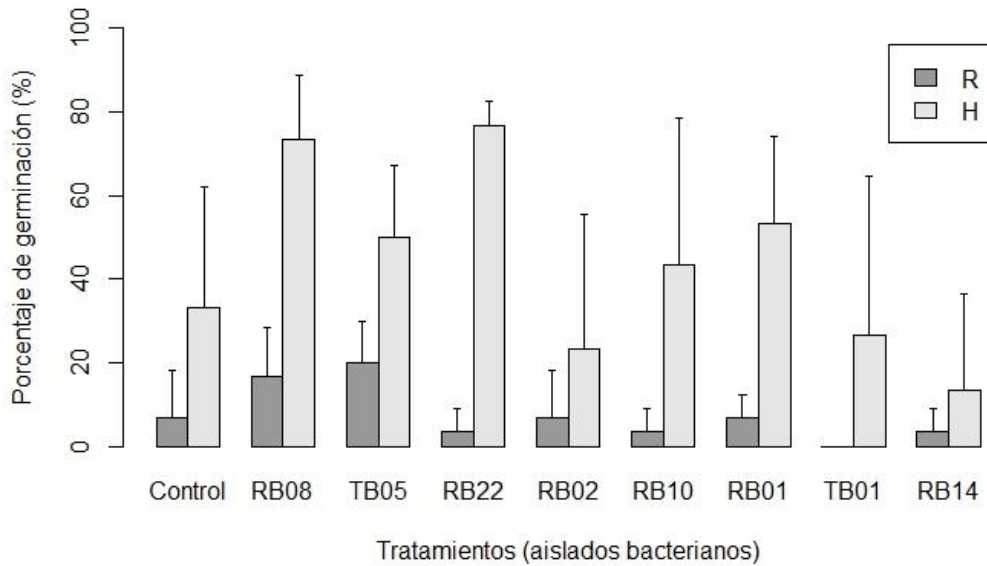


Figura 24: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 5 días después del sembrado

A los 6 dds, los aislados RB08 (90%) y RB22 (80%) logran porcentajes significativos (Anexo 11) respecto al control (33%), sin embargo, RB01, TB05 y RB10 siguen superiores al testigo (Figura 25). Se observa también que a este tiempo de incubación, RB14 logra aumentar su porcentaje de semillas con radícula, aunque no alcancen a formar hojas cotiledonares aún.

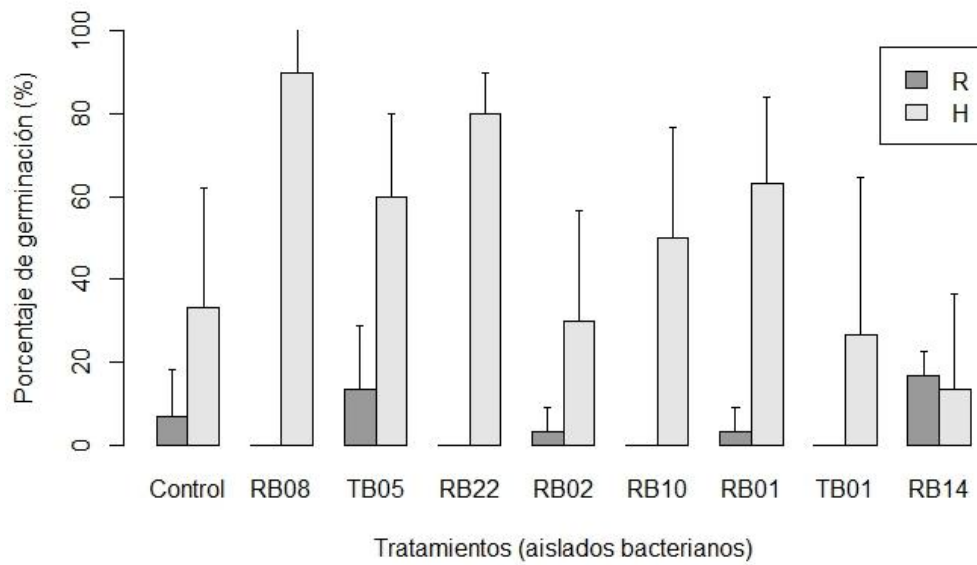


Figura 25: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 6 días después del sembrado

Finalmente, se realizó una última evaluación a los 7 dds, en donde las cepas RB08, RB22, TB05, RB01 y RB10 mostraron valores entre 56 y 90%, superiores al control que sólo alcanzó un 37% de germinación (Figura 26). Los aislados RB08, RB22 y TB05 son los únicos que mostraron significancia (Anexo 11). Se puede destacar que estas tres cepas, a pesar de no mostrar los mayores valores en las capacidades PGPR, lograron los mayores porcentajes de germinación (Anexo12).

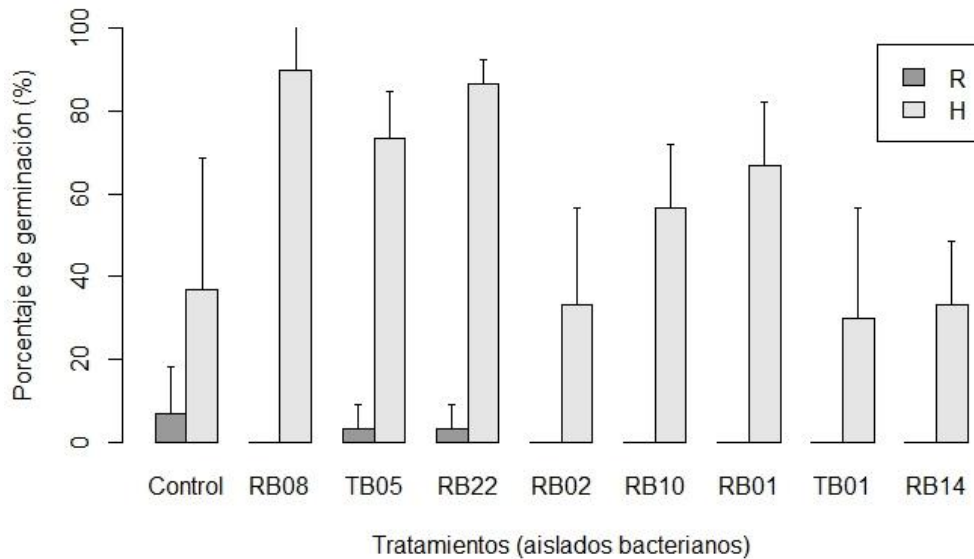


Figura 26: Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de lechuga a los 7 días después del sembrado

Los resultados obtenidos al finalizar la prueba mostraron que las cepas RB08, RB22 y TB05 mostraron valores significativos en la germinación. Es interesante resaltar que estas cepas no fueron las que mostraron los mayores valores de producción de AIA y solubilización de fosfato, a diferencia de RB14, quien no dio buenos resultados en la germinación teniendo el valor más alto de producción AIA. Esto podría deberse a lo mencionado anteriormente: concentraciones altas de hormonas pueden llegar a reducir o inhibir el desarrollo vegetal.

En esta prueba se logró un incremento del 53% en la germinación, lo cual se asemeja a los resultados de Díaz *et al.*, 2001, quien encontró un efecto benéfico del 57% en la germinación de semillas de lechuga con una de sus cepas. Luna *et al.*, 2013 realizó su prueba de germinación en semillas de tomate y obtuvo un incremento de 6% con dos de sus aislados, similar a los resultados de Lagunas *et al.*, 2001. La germinación depende de la viabilidad del embrión y de la ruptura del letargo generado por las condiciones ambientales (en el caso del tipo de semillas con tales características), es en este último caso en el que puede incidir las bacterias PGPR (Luna *et al.*, 2013). Las diferencias presentadas entre las respuestas de cada especie vegetal y las cepas inoculadas, se dan principalmente por las interacciones generadas entre ambos (Ogata *et al.*, 2008).

4.5.5. Prueba en invernadero

El empleo de biofertilizantes con base en rizobacterias promotoras del crecimiento, constituye una alternativa biotecnológica para mejorar la producción de especies de interés hortícola (Luna et al., 2013) y cada día, cobra mayor auge a nivel mundial. Esto debido a que los fertilizantes químicos a largo plazo poseen efectos negativos, principalmente de contaminación para el suelo, plantas y animales.

Para la prueba en invernadero, se formaron tres inóculos (tratamientos) a partir de las ocho cepas, el primero formado por una mezcla de la cepa más productora de AIA y la cepa más solubilizadora de fosfato (RB14 y RB10, respectivamente), el segundo inóculo constituido por el aislado proveniente de rizósfera que tenía que segundo valor más alto de solubilización (RB01) y el tercero constituido por el aislado proveniente de tallo con porcentaje de germinación significativo (TB05).

En este ensayo se evaluó la altura de las plántulas al inicio de la inoculación y a los 10, 17, 24, 35 y 42 días después de realizar la inoculación (Figura 27). Al inicio de la inoculación, la altura no era significativa en ningún tratamiento (Anexo 13), comprobando que las plántulas eran homogéneas para todos los aislados.

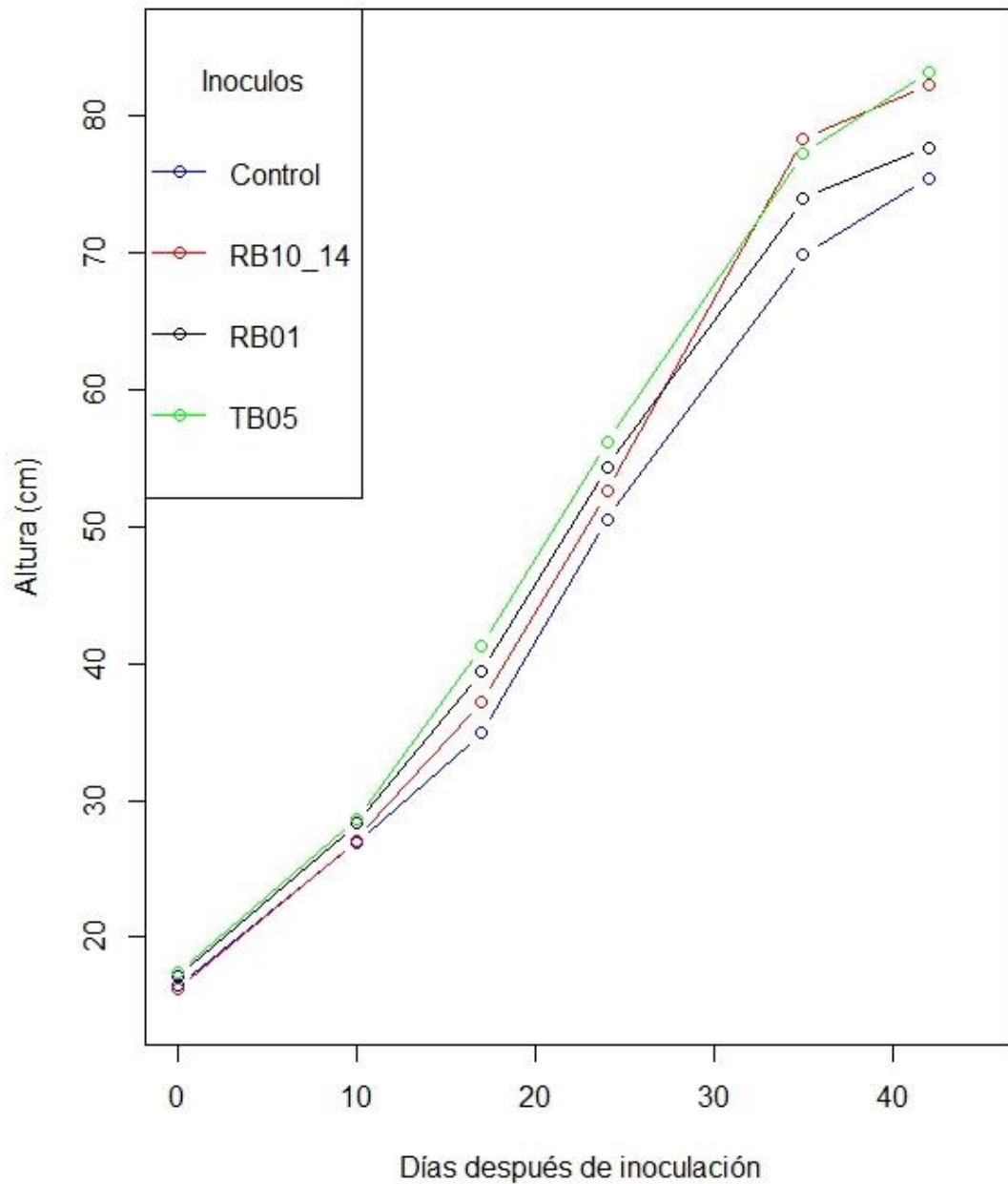


Figura 27: Gráfico de altura de plantas de tarwi vs. días después de la inoculación para los cuatro tratamientos

A los 10 dds, ninguno de los tratamientos mostró significancia para la altura de las plántulas, sin embargo, todos los aislados presentaron valores superiores al control. A los 17 dds, se observó que los tratamientos eran significativos y superiores con respecto al control, sin embargo, esta situación no se mantuvo, pues a los 24 dds, el único aislado significativo fue TB05, con un promedio de altura de 56.22 cm. A pesar de que a los 32 dds, TB05 y RB10/14 mostraron valores significativos, finalmente el único que se mantuvo superior y con significancia a los 42 dds fue TB05 (Anexo 13), con un valor promedio de altura de 83.22

cm, comparado con 75 cm en el control (Figura 28). Cabe resaltar que sólo en el tratamiento TB05 se observaron plántulas con fruto a los 42 dds (Figura 29).

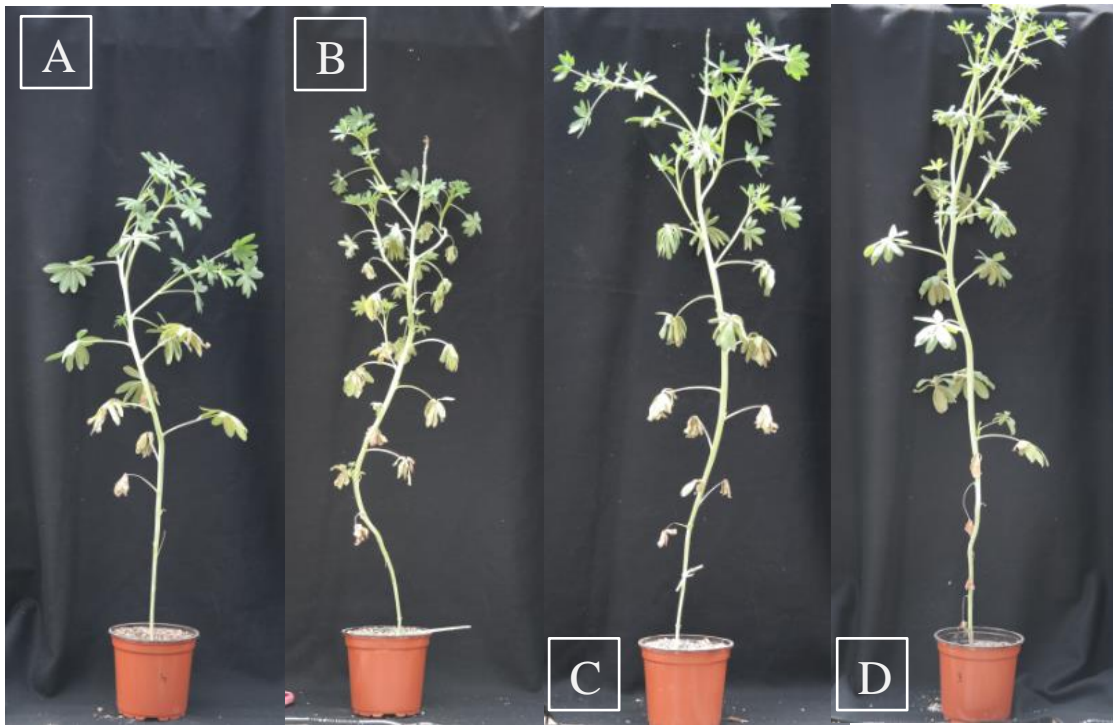


Figura 28: Efecto de la inoculación en la altura de plantas de tarwi



Figura 29: Frutos de *Lupinus mutabilis* observado en tratamiento TB05

El tamaño de la inflorescencia en las plántulas también fue evaluado en dos ocasiones. A los 24 dds se observó que los tratamientos mostraron inflorescencias de mayor longitud que el control, pero solo TB05 logró valores significativos con un promedio de 19.1 mm en comparación al testigo quien obtuvo un promedio de 13.7 mm. A los 35 dds, el inóculo mixto (RB10/14) logra el mayor promedio de longitud (61.8 mm), sin embargo, ninguno de los

tratamientos mostró significancia respecto al control (Anexo 13), cuyo valor promedio de longitud fue 41.7 mm (Tabla 12).

Al finalizar el ensayo en invernadero, se evaluó el peso fresco y seco de las plántulas de tarwi. En ambos casos, el inóculo TB05 mostró los mayores valores de peso, sin embargo, no se encontró significancia entre los promedios con respecto al control (Anexo 13). Se puede resaltar, además, que sólo en el peso seco, los otros tratamientos mostraron también valores superiores al control (Tabla 12).

Tabla 12: Longitud de inflorescencia, peso fresco y peso seco de plántulas de tarwi

Tratamiento	Longitud de inflorescencia (mm)		Peso fresco (g)	Peso seco (g)
	24 dds	35 dds		
Control	13.75	41.77	40.45	6.27
RB10/14	17.26	61.68	40.25	6.41
RB01	15.45	58.11	39.87	6.85
TB05	19.15	53.49	51.52	8.14

En este ensayo de invernadero, se observó que los tres inóculos incrementaron la altura de planta respecto al control, pero sólo TB05 mostró significancia estadística al finalizar la prueba. Este efecto de inoculación también fue reportado por Alsina *et al.* (2008), al utilizar un aislamiento de colección, un aislamiento comercial y testigo sin inocular, obteniendo como resultado un efecto diferenciado por parte de los aislamientos, en la altura de planta hasta la etapa de floración. También se obtuvieron valores mayores a los del control en el tamaño de inflorescencia, peso fresco y seco de las plántulas; y aunque no presentaron significancia, nos da una perspectiva de investigación sobre estas bacterias y su efecto en el crecimiento de tarwi. El tratamiento TB05 fue el único que formó frutos (dato no evaluado por ausencia de resultados en los otros tratamientos), y es un aislado endófito proveniente de los tallos de *Lupinus mutabilis*. Al respecto, Rosenblueth y Martínez (2006) mencionados por Soler *et al.* (2012) mencionan que la capacidad de las bacterias de colonizar tejidos internos de las plantas puede conferirles una ventaja ecológica sobre las bacterias que solo pueden colonizar tejidos epifitos. No se ha establecido como la planta se beneficia más de un endófito que de una rizobacteria y no es claro que población de microorganismos promueve más el crecimiento de las plantas, pero sin duda TB05 es un tratamiento con potencial de ser utilizado como bioinoculante.

Tabla 13: Producción de amonio por aislados bacterianos de rápido crecimiento

Aislado bacteriano	Absorbancia	Señal corregida	Concentración ión amonio (mg/l)
NR01	2.411	2.083	8.4669
NR02	1.764	1.436	5.7934
NR03	1.476	1.148	4.6033
NR04	1.468	1.14	4.5702
NR05	1.819	1.491	6.0207
NR06	2.31	1.982	8.0496

Al leer las absorbancias en el espectrofotómetro, los mayores valores fueron obtenidos de NR01 y NR06, con 2.4 y 2.31 de absorbancia, sin embargo, por ser mayores a 2, no se consideraron confiables ambos resultados. Es así que el valor más alto obtenido fue de la cepa NR05 con una concentración de 6 mg/l de ión amonio. Esta concentración de amonio es relativamente mayor a la obtenida por Lara *et al.* 2007, 5.2 y 4.6 mg/l, proveniente de sus cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum*, respectivamente. Esqueche y Quispe 2017 también realizaron la prueba de Berthelot en sus aislados de *Azotobacter*, pero obtuvo concentraciones mucho mayores a las nuestras, sus valores oscilaron de 3 a 34 ppm. Se observa, de modo general, que los valores encontrados en nuestros aislados de nódulos se encuentran en el rango de fijación realizada por *Azotobacter* y *Azospirillum*, dos géneros comúnmente conocidos como fijadores de nitrógeno, junto a *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Martínez, 1999 mencionado por Lara *et al.*, 2007)

La evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas aisladas, medidas indirectamente a través de la cuantificación del ión amonio, permitió encontrar microorganismos con potencial uso como inoculantes. Sin embargo, se necesitan más pruebas *in vitro* y en campo, para determinar realmente su efectividad.

4.5.7. Caracterización molecular

a) Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a las ocho cepas finales y a las seis colonias aisladas de nódulos. Los valores de concentración y pureza obtenidos (Tabla 14) se encuentran en el rango de 1.8 a 2, y aunque RB10 y NR02 tuvieron 1.6 de pureza, se les considero aceptable pues luego serían purificados.

Tabla 14: Concentraciones y purezas de ADN para aislados de rápido crecimiento

Aislado bacteriano	Concentración (µg/ul)	Pureza 260/280	Aislado bacteriano	Concentración (µg/ul)	Pureza 260/280
RB01	67.3	1.9	TB05	83.3	1.9
RB02	48.3	2	NR01	46.1	1.9
RB08	41.9	1.9	NR02	12.6	1.6
RB10	21.1	1.6	NR03	51.35	1.9
RB14	286.75	2	NR04	20	1.8
RB22	51.1	1.9	NR05	16.75	1.8
TB01	61.55	1.9	NR06	19.3	1.8

b) Amplificación BOX

La Figura 31 muestra los patrones electroforéticos obtenidos mediante la técnica BOX-PCR. Se puede apreciar que los perfiles de las 14 bacterias presentan una buena distribución y concentración de las bandas a lo largo del gel. Este análisis permite observar un mínimo de 5 bandas (RB08) hasta 11 bandas para las cepas NR03, NR04 y NR06, con tamaños moleculares que oscilaron entre valores superiores a 0.1 kb y hasta 1.4 kb.

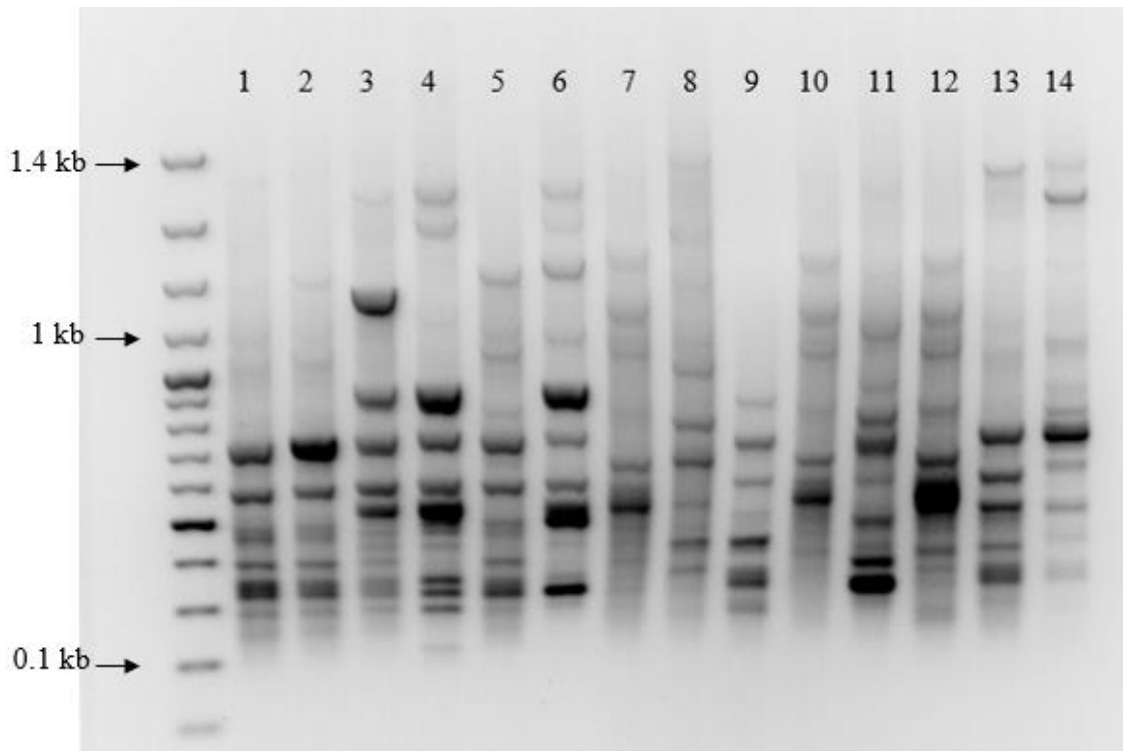


Figura 31: Perfiles BOX de aislados de rápido crecimiento. Carril 1-6: NR01 – NR06, carril 7: RB08, carril 8: TB01, carril 9: RB02, carril 10: RB10, carril 11: RB01, carril 12: TB05, carril 13: RB14, carril 14: RB22

Los perfiles electroforéticos se analizaron mediante el software R, a través de la similaridad entre las cepas aisladas por presencia/ausencia de bandas. Utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Jaccard, se obtuvo el dendograma mostrado en la Figura 32.

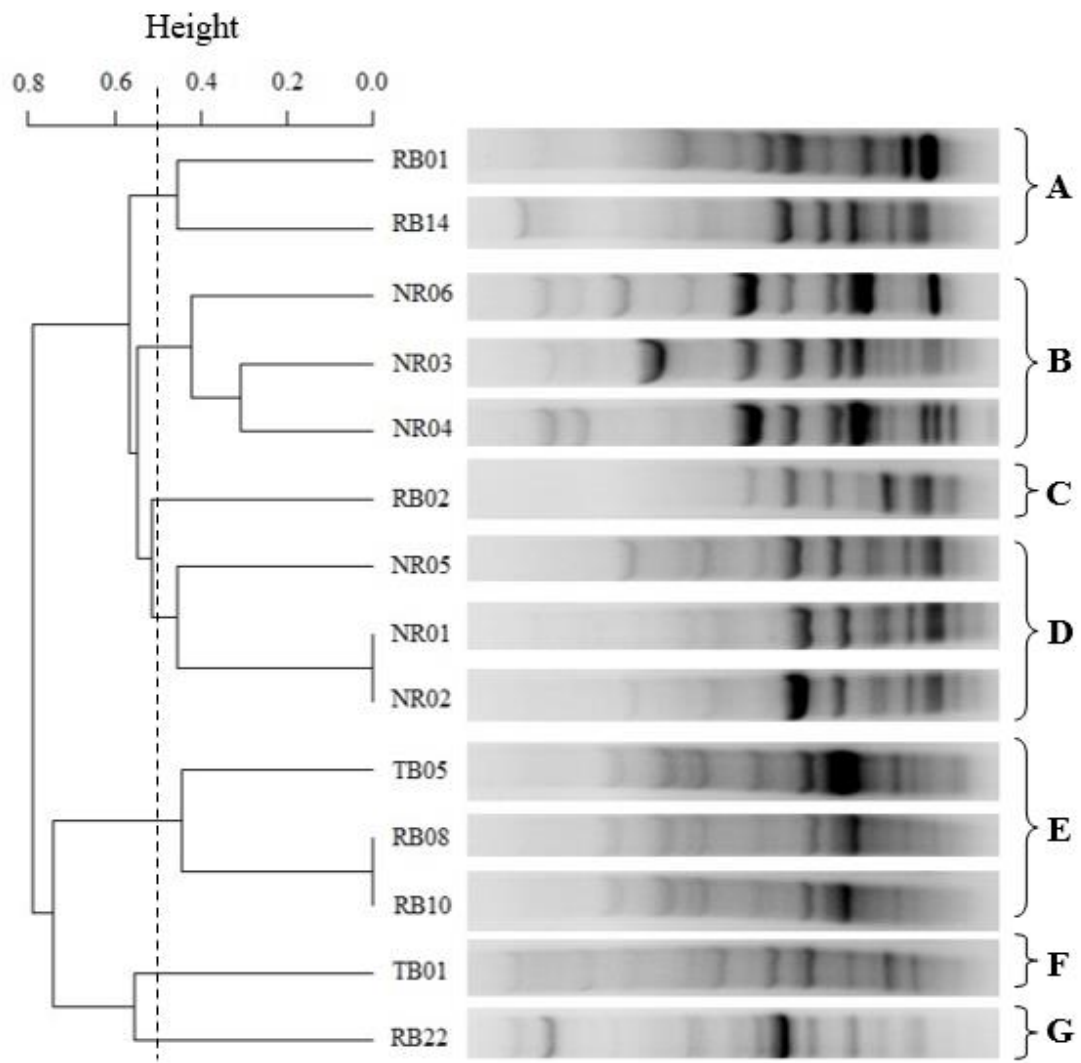


Figura 32: Dendrograma generado por la combinación de presencia/ausencia de bandas en los perfiles electroforéticos BOX para bacterias de rápido crecimiento. Método de agrupamiento: UPGMA. Coeficiente de similitud: Jaccard

Utilizando un porcentaje de similitud de 50%, se puede observar que las cepas se distribuyen en 7 grupos distintos (nombrados con las letras A hasta la G). El dendrograma también permite apreciar que algunas cepas se agrupan de manera conjunta en el árbol de acuerdo a su procedencia. Los grupos B y D, estuvieron conformados cada uno con tres cepas, pero todos ellos aislados de nódulos. Los grupos C, F y G sólo estaban conformados por una cepa, RB02, TB01 y RB22, respectivamente.

Con estos resultados se puede afirmar que las cepas muestran distintas huellas moleculares, indicándonos una alta diversidad genética entre los aislados. Resultados similares fueron obtenidos por Matsubara (2010), quien utilizando la técnica BOX-PCR encontró una alta diversidad genotípica en sus simbiontes de pallar. Es por ello que, realizó también ERIC-PCR y REP-PCR para así poder discriminar sus clones de cepas y agruparlas en distintos grupos. Patiño y Sánchez, 2012 indicaron que el perfil BOX-PCR de sus cepas evidenció la ocurrencia de diversidad intraespecífica, indetectable con el secuenciamiento del ADNr 16S, concluyendo necesaria la utilización de esta técnica en el análisis de la diversidad microbiana asociada a la rizósfera de los cultivos.

c) Amplificación y purificación del gen ribosomal 16S

En este trabajo, la amplificación del gen ribosómico 16S empleando los cebadores fD1 y rD1 generó un solo producto de PCR con un tamaño aproximado de 1500 pb. Luego se purificaron estos productos con el kit #K0701 de Thermo Scientific, obteniendo las concentraciones adecuadas para el servicio de secuenciamiento ofrecido por Macrogen. En la tabla 15 se muestran las purezas y concentraciones, luego de la purificación.

Tabla 15: Concentraciones y purezas de producto PCR para aislados de rápido crecimiento

Aislado bacteriano	Concentración (µg/ul)	Pureza 260/280	Aislado bacteriano	Concentración (µg/ul)	Pureza 260/280
RB01	22.7	1.7	TB05	126.6	1.9
RB02	85.9	1.9	NR01	95.6	1.9
RB08	109.0	1.9	NR02	74.2	1.8
RB10	104.4	1.9	NR03	76.6	1.8
RB14	80.3	1.9	NR04	60.5	1.8
RB22	52.1	1.9	NR05	56.2	1.8
TB01	36.9	1.8	NR06	52.9	1.9

Como resultado del secuenciamiento se recibieron secuencias de cada uno con aproximadamente 1000 pb. Al realizar el alineamiento, con el software Mega 7.0, las secuencias *forward* y *reverse* se complementaban en 400-500 pb observándose algunos *gaps* entre ellas. Adicionalmente y a modo de prueba, se realizó el envío del gen R16S de la cepa NR01 en forma de plásmido para su secuenciamiento, y al analizar los resultados, las secuencias *forward* y *reverse* coincidieron en un 100%, sin *gaps*. Este proceso no se pudo realizar en las 13 cepas restantes por motivos de tiempo y económicos, pero sugiere ser el

método más adecuado para el secuenciamiento del gen R16S en estas bacterias. Para el análisis filogenético se tomó en cuenta esas regiones complementarias de aproximadamente 400-500 pb.

Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea) de GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los porcentajes de similitud obtenidos entre los aislados y las cepas tipo más próximas oscilan de 98 a 100%, a excepción de NR06 y RB10, quienes presentaron 95 y 96%, respectivamente. Estos valores muy bajos de similitud nos indican que estas bacterias pueden representar especies no descritas aún (Barquero, 2014). Stackebrandt *et al.* (2002) sugiere tener en cuenta otras técnicas como la secuenciación de genes de codifiquen funciones metabólicas, una alternativa para describir nuevas especies.

De los 14 aislados, sólo uno pertenecía al phylum Proteobacteria y los 13 restantes fueron clasificados en el phylum Firmicutes. La cepa RB01, única del phylum Proteobacteria, fue clasificada en la clase beta Proteobacteria, más concretamente en el género *Achromobacter* de la familia *Alcaligenaceae*, siendo la especie *Achromobacter marplatensis* la más próxima a RB01 con un 99% de similitud.

Todas las cepas que se encontraron en el phylum Firmicutes pertenecían a la clase Bacilli . Dentro de ellas, nueve se clasificaron en el género *Bacillus*. La especie *Bacillus cereus* fue la más próxima a NR01 y RB14; NR02 y NR05 se encontraron cercanos a la especie *Bacillus pumilus*; NR04 fue más próxima a *Bacillus liqueniformis* , esta especie también se encontró relacionada a NR06 pero con un porcentaje bajo de similitud; *Bacillus aryabhatai* fue la más próxima a NR03; *Bacillus circulans* a RB10 y finalmente *Bacillus toyonensis* a RB02.

Dos cepas fueron clasificadas dentro del género *Lysinibacillus*. La especie más próxima a RB08 y TB05 fue *Lysinibacillus macroides*. El aislado RB22 se encontró dentro del género *Paenibacillus* y la especie más próxima a ella fue *Paenibacillus polymyxa*, mientras que TB01 se clasificó en el género *Enterococcus* y su especie más cercana fue *Enterococcus mundtii*.

La tabla 16 muestra los taxones en el que se clasificó cada aislado bacteriano y sus porcentajes de similitud con las cepas más próximas. De modo general, se obtuvieron 5 géneros y 10 especies.

Tabla 16: Distribución taxonómica de los aislamientos identificados

Clase	Orden	Familia	Especie más próxima	Cepa	%
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	NR01	100
				RB14	99
			<i>Bacillus pumilus</i>	NR02	98
				NR05	99
			<i>Bacillus liqueniformis</i>	NR04	99
				NR06	95
			<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR03	98
		<i>Bacillus toyonensis</i>	RB02	99	
		<i>Bacillus circulans</i>	RB10	96	
		<i>Planococcaceae</i>	<i>Lysinibacillus macroides</i>	RB08	99
TB05	100				
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	RB22	99		
<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>	TB01	98	
<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter marplatensis</i>	RB01	99

Los géneros encontrados en esta investigación han sido reportados con anterioridad en trabajos como el de Liceta (2015) en sus aislamientos de rizósfera de quinuay Barquero (2014) en sus aislados de raíces de alubia y pimiento. Especies de *Paenibacillus* fueron encontradas asociadas a rizósfera de diferentes cultivos (Coelho *et al.* 2008), Calvo y Zuñiga (2010) aislaron especies de *Bacillus* en rizósfera de papa y Oliva (2015) logró aislar especies de *Bacillus* en rizósfera de *Lupinus mutabilis* para demostrar su potencial como control biológico.

Achromobacter marplatensis debe su nombre a la ciudad de Argentina de Mar de Plata, en donde fue aislada a partir de suelos contaminados con pentaclorofenoles (Gomila *et al.*, 2011). Se ha reportado que participa positivamente en diferentes actividades bióticas en el suelo que mejoran el crecimiento de la planta a través de la disponibilidad de nutrientes para el cultivo y la producción de reguladores de crecimiento (Wu *et al.*, 2014 mencionado por Abdel *et al.*, 2017).

Bacillus cereus ha sido reportado como potencial desencadenante de resistencia sistémica inducida (ISR), exhibiendo una reducción significativa en la gravedad de enfermedades en diversos huéspedes (Kloepper *et al* 2004 mencionado por Kumar *et al.* 2011). Su capacidad de suprimir patógenos de plantas es ampliamente reconocida (Kumar *et al.*, 2011).

Bacillus pumilus también ha sido reportado al igual que *Bacillus cereus* produciendo importantes reducciones en la incidencia o gravedad de distintas enfermedades en prueba de campo o invernadero de cultivo tales como tomate, pimiento, melón, tabaco, pepino, entre otros (Kloepper *et al* 2004 mencionado por Kumar *et al.*, 2011)

Bacillus liqueniformis ha sido reportada como potencial biofertilizante en la India. En presencia de suelo suplementado con NaCl 50 mM, las plantas de cacahuate tratadas con *B. licheniformis* mostraron un aumento en la biomasa fresca, longitud total y longitud de raíz (Goswami *et al.* 2014).

Bacillus aryabhatai incrementa la solubilización de metales como el zinc, reduciendo la contaminación en medios con este metal. Además, se ha reportado que al inocularse en plantas de soya incrementó el peso seco de plantas y raíces (Ramesh *et al.*, 2014 mencionado por Liceta 2015).

Bacillus toyonensis es también encontrado asociado a rizósfera de cultivos. Rahmoune *et al.* 2016 observó que plantas de *Arabidopsis thaliana* y dos especies de *Datura* incrementaron su crecimiento cuando fueron inoculadas con una cepa de *B. toyonensis*.

Bacillus circulans fue reportado en un estudio de rizósfera de manzana como potencial biofertilizante, pues posee capacidades de solubilización de fosfato, producción de AIA, actividad de ACC desaminasa, actividad nitrogenasa, producción de sideróforos, entre otras (Mehta *et al.*, 2013).

Lysinibacillus macroides fue encontrado también en rizósfera de quinua en el estudio de Liceta (2015). Como tal no es muy reportado en actividades de crecimiento vegetal, sin embargo, el género *Lysinibacillus* sí lo es (Sgroy *et al.*, 2009; Barquero 2014). En nuestro estudio fue esta cepa la que obtuvo los mejores resultados en la inoculación en plantas de tarwi.

Paenibacillus polymyxa es uno de los más famosos PGPR utilizados como agentes de biocontrol efectivos (Raza *et al.* 2008). E *et al* (2017) demostró que la inoculación de esta bacteria podría potencialmente beneficiar el crecimiento vegetal alterando la composición de proteínas en la raíz del hospedero.

Enterococcus mundtii no ha sido reportado como una bacteria PGPR. Se le conoce más por la mundticina, un péptido antimicrobiano de amplio espectro producido por este microorganismo (Bennik *et al.*, 1998).

Con las secuencias de ADN de cada uno de los aislados se elaboró dos árboles filogenéticos de acuerdo a los dos phylum encontrados. Para ello se utilizó el programa Mega 7.0, con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 basándose en 1000 réplicas.

El árbol filogenético que se muestra en la figura 33 pertenece a la clase Betaproteobacteria del phylum Proteobacteria, nos indica que RB01 se encuentra más relacionado con *Achromobacter marplatensis* B2, tal y como se observó en el blast por medio de NCBI.

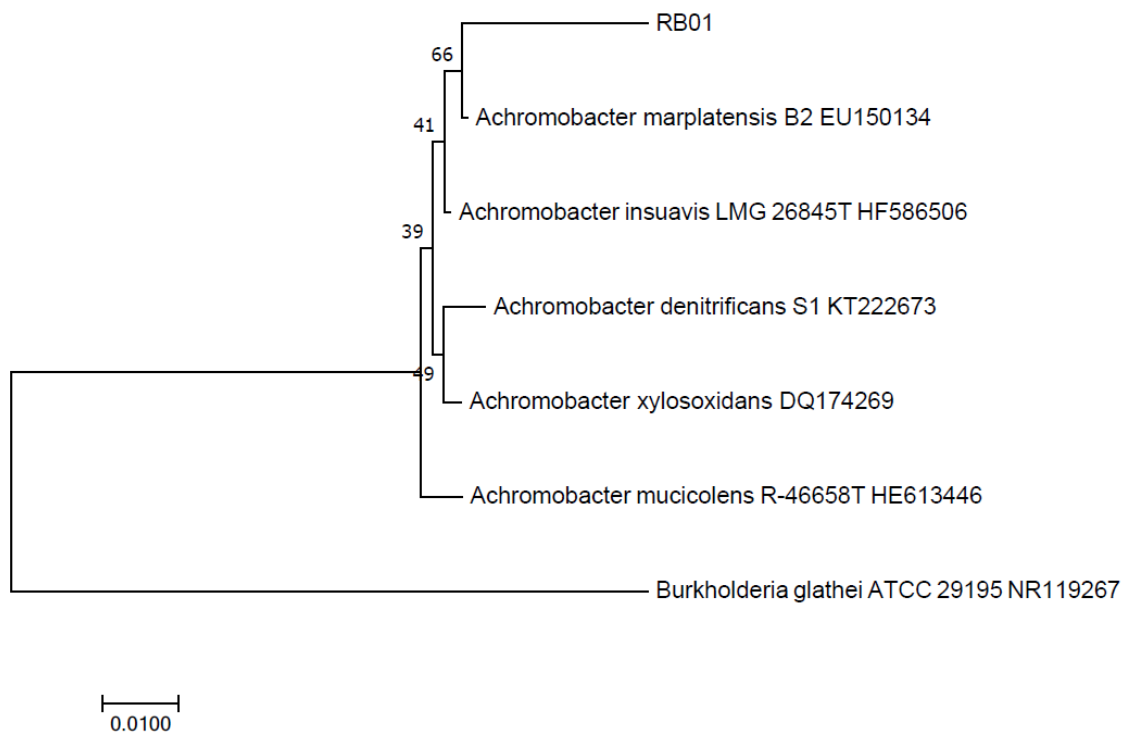


Figura 33: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARN perteneciente a la clase Betaproteobacteria

En la figura 34 se muestra el árbol filogenético para el phylum Firmicutes. Se puede observar que todos los aislados, a excepción de NR06 y RB10, se encuentran relacionados a las cepas con las que se identificó en el blast anteriormente. El bajo porcentaje de similitud confirma que NR06 y RB10 no se encuentran muy relacionados a *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus circulans*, como nos mostró el Blast. RB10 se encuentra más próximo a *Bacillus cereus* y *B. toyonensis*; mientras que NR06 a *Bacillus circulans*.

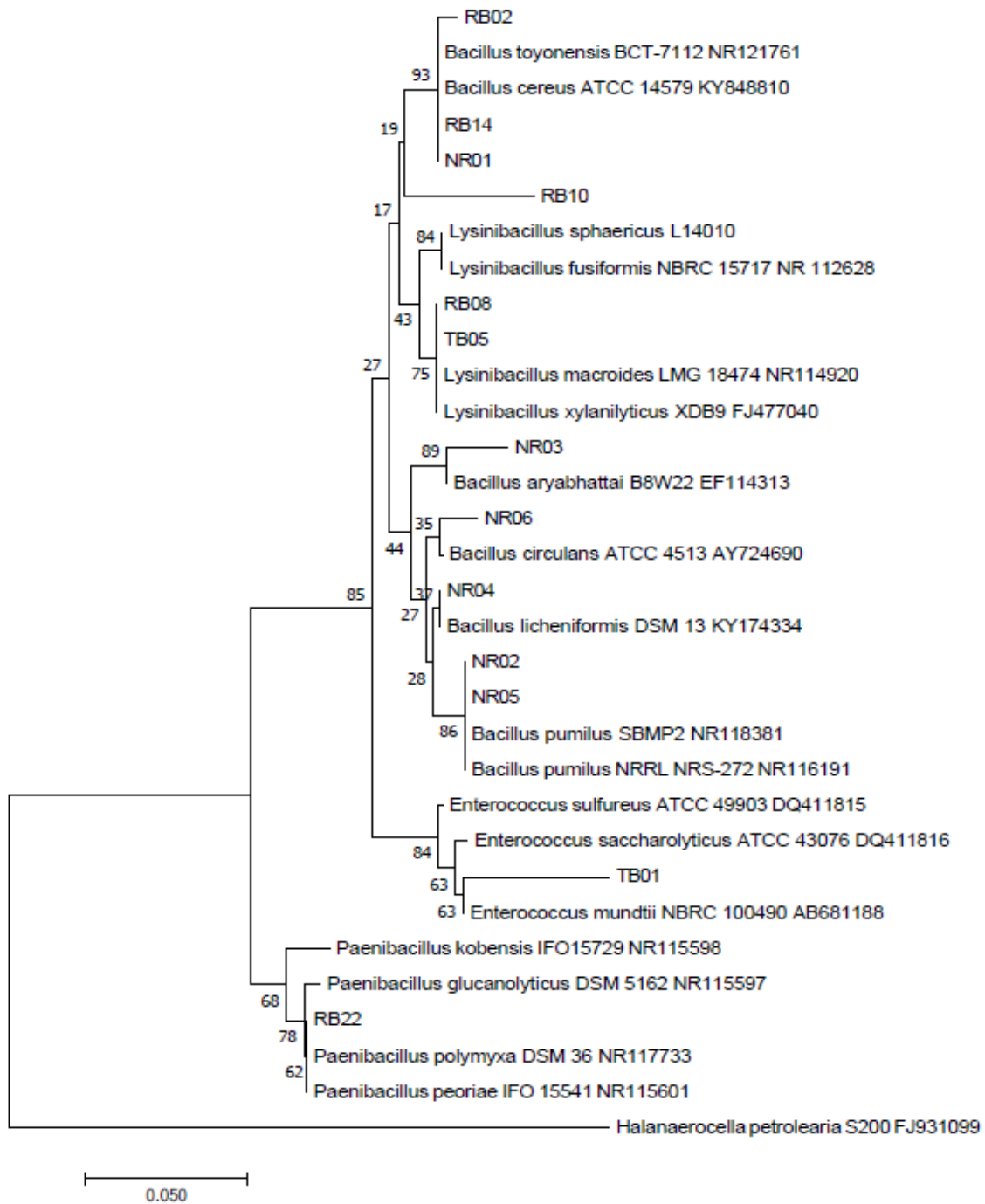


Figura 34: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARN perteneciente al phylum Firmicutes

Por otro parte, al comparar los resultados con el dendograma generado por BOX-PCR, observamos que cepas clasificadas igualmente según el secuenciamiento del gen R16S, no muestran perfiles iguales en el BOX-PCR. Esto sucede en el caso de NR02-NR05, que mostraron relación con *Bacillus pumilus* y NR06-NR04 que se clasificaron como *Bacillus liqueniformis* presentaron similares perfiles pues se encontraban en el mismo grupo, pero no eran idénticos, lo que sugiere la correspondencia a distintas cepas de la misma especie. NR01 y RB14 también se clasificaron ambas como *Bacillus cereus*, pero se encontraron en distintos grupos de perfiles BOX, sugiriendo a una de ellas como diferente a esta especie o relacionada a ésta.

Se puede observar que el uso del gen 16S ARN permite tener una aproximación de la identidad molecular de las cepas, pero en algunos casos no genera la suficiente información para poder establecer la especie. Ramírez-Bahena *et al.* (2009) secuenciaron otros genes altamente conservados como *rpoB*, *recA*, *glnII*, y la región intergénica 16S-23S (ITS) para así dilucidar mejor las identidades moleculares.

4.6. AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE LENTO CRECIMIENTO

Se consideraron de cepas de lento crecimiento pues a diferencia del primer grupo de bacterias que crecían en 24 horas, este grupo crecía en aproximadamente 7 días.

Por la forma y el tipo de crecimiento que presentaron estas bacterias, consideramos que podrían tratarse de las actinobacterias. Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram-positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados (Franco, 2008). Son frecuentemente descritos como organismos de crecimiento lento que no compiten eficientemente con bacterias y hongos de rápido crecimiento (Franco 2008). Entre los géneros más conocidos de actinomicetos encontramos a *Frankia*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, entre otros. Particularmente se han descrito actividades que pueden catalogar a los actinomicetos como promotoras de crecimiento vegetal. Entre estas actividades cabe destacar la solubilización de fósforo, la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno atmosférico, y capacidad antagonista contra patógenos (Kloepper, 2009 mencionado por Salazar y Ordoñez, 2013), siendo los principales productores de antibióticos. En esta investigación, sólo se evaluó su capacidad para fijar nitrógeno *in vitro*, pues fueron encontrados únicamente en los nódulos de tarwi.

4.6.1. Caracterización macroscópica

Se observaron 14 colonias bacterianas de lento crecimiento provenientes del campo “IRD” y sólo 5 de “PC”, sin embargo, no todas lograron crecer al momento de aislarlas en medio de cultivo CZAPEK, es por ello que la caracterización macroscópica se realizó a las 9 cepas que lograron desarrollarse en medio de cultivo. Todas ellas fueron evaluadas en la prueba de fijación de nitrógeno *in vitro*.

En la tabla 17 se muestran las características de las colonias de lento crecimiento.

Tabla 17: Caracterización macroscópica de colonias de lento crecimiento

N°	Cepa	Código	Campo	Textura	Color	Forma
1	N0_713	NL01	IRD	cremosa	negro	irregular
2	N0_432	NL02	PC	seca pulverulenta	blanco	circular
3	N0_412	NL03	PC	seca adherida al agar	morado	puntiforme
4	N-1_122	NL04	PC	cremosa	anaranjado	irregular
5	N-1_133	NL05	IRD	cremosa	marrón	puntiforme
6	N-1_723_1	NL06	IRD	seca adherida al agar	negro	irregular
7	N-1_523	NL07	IRD	cremosa	verde oscuro	puntiforme
8	N-1_523	NL08	IRD	cremosa	negro	irregular
9	N-1_412	NL09	PC	seca adherida al agar	marrón	irregular

En la figura 35, se muestra algunas cepas aisladas de “PC” y de “IRD”.

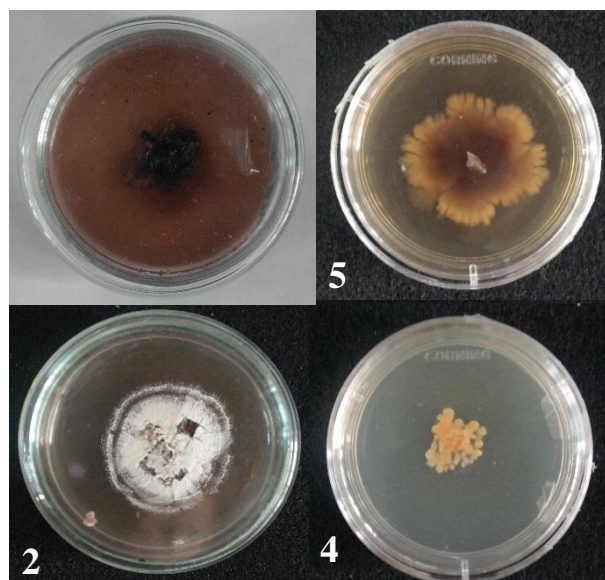


Figura 35: Cepas de lento crecimiento

Como se indicó anteriormente, los actinomicetos son de crecimiento lento y requieren de una o dos semanas de incubación. Las colonias de algunos géneros que se desarrollan sobre la superficie del agar pueden tener una consistencia firme y se adhieren fuertemente al sustrato solidificado, tal y como se observó en los aislamientos de esta investigación, mientras que en otros géneros la superficie es pulverulenta, al igual que el aislado NL02 (Franco, 2008).

4.6.2. Prueba de fijación de nitrógeno *in vitro*

Esta prueba se realizó simultáneamente para bacterias de lento y rápido crecimiento, es por ello que se calculó las concentraciones del ion amonio con el mismo patrón hallado anteriormente: $y=0.242x + 0.034$.

En la tabla 18 se muestra los valores de la concentración del ión amonio NH_4 (mg/l) producidos por las diferentes bacterias. Los valores también fueron corregidos restando el blanco de suelo; por ello, el valor mostrado se refiere al amonio producido de la actividad microbiana específica.

Tabla 18: Producción de ion amonio por aislados bacterianos de lento crecimiento

Aislado bacteriano	Absorbancia	Señal corregida	Concentración ión amonio (mg/l)
NL01	0.609	0.281	1.0207
NL02	0.614	0.286	1.0413
NL03	0.891	0.563	2.1860
NL04	0.895	0.567	2.2025
NL05	0.513	0.185	0.6240
NL06	1.530	1.202	4.8264
NL07	1.329	1.001	3.9959
NL08	1.318	0.99	3.9504
NL09	0.502	0.174	0.5785

La fijación biológica del nitrógeno se da únicamente en algunos tipos de algas cianofíceas, hongos y bacterias, destacando principalmente a los Actinomicetos del género *Frankia* y *Streptomyces* (Correa, 2000 mencionado por Salazar y Ordoñez, 2013)

Se observó que las concentraciones del ion amonio fueron menores a las encontradas en bacterias de rápido crecimiento, sin embargo, se encuentran en el rango de fijación realizada por *Azotobacter* y *Azospirillum*. La mayor concentración de amonio provino de la cepa NL06. No se encuentra muy reportado la fijación de nitrógeno *in vitro* por medio de la prueba Berthelot en actinomicetos. Generalmente se estudia directamente la actividad nitrogenasa en las cepas o la fijación mediante cromatografía de gases.

4.6.3. Caracterización molecular

a) Extracción de ADN

Se realizó el mismo protocolo de extracción de ADN utilizado anteriormente con una variación inicial: se colocó una porción de 5 x 5 mm de bacteria en un mortero estéril y se trituró con nitrógeno líquido. Luego se añadió la bacteria triturada a un tubo eppendorf, se agregó el buffer de lavado y se continuó con el protocolo descrito anteriormente. Este paso adicional se realizó debido a la consistencia dura de estas cepas.

En la tabla 19 se muestran los valores de concentración y pureza obtenidos.

Tabla 19: Concentraciones y pureza de ADN para aislados bacterianos de lento crecimiento

Aislado bacteriano	Concentración (µg/ul)	Pureza 260/280
NL01	144.15	1.7
NL02	9.55	1.8
NL03	17	1.7
NL04	43	1.7
NL05	17	1.6
NL06	58	1.8
NL07	25	1.7
NL08	55	1.8
NL09	56	1.6

Al realizar la PCR, sólo se obtuvieron resultados en la amplificación BOX, más no se observaron bandas en la amplificación del gen R16S, es por ello que para esta última se optó por el servicio completo de secuenciamiento ofrecido por Macrogen (extracción + amplificación + secuenciamiento).

b) Amplificación BOX

La figura 36, muestra los patrones electroforéticos obtenidos mediante la técnica BOX-PCR. Se puede apreciar que los perfiles de estas bacterias aisladas de nódulos (a excepción de NL01 que no presentó bandas) presentan una buena distribución de las bandas a lo largo del gel, sin embargo, son muy tenues debido a la concentración inicial en la extracción. Este análisis permite observar un mínimo de 6 bandas (NL04 y NL06) hasta 10 bandas para la cepa NL08, con tamaños moleculares que oscilaron entre valores superiores a 0.2 kb y hasta 2 kb.

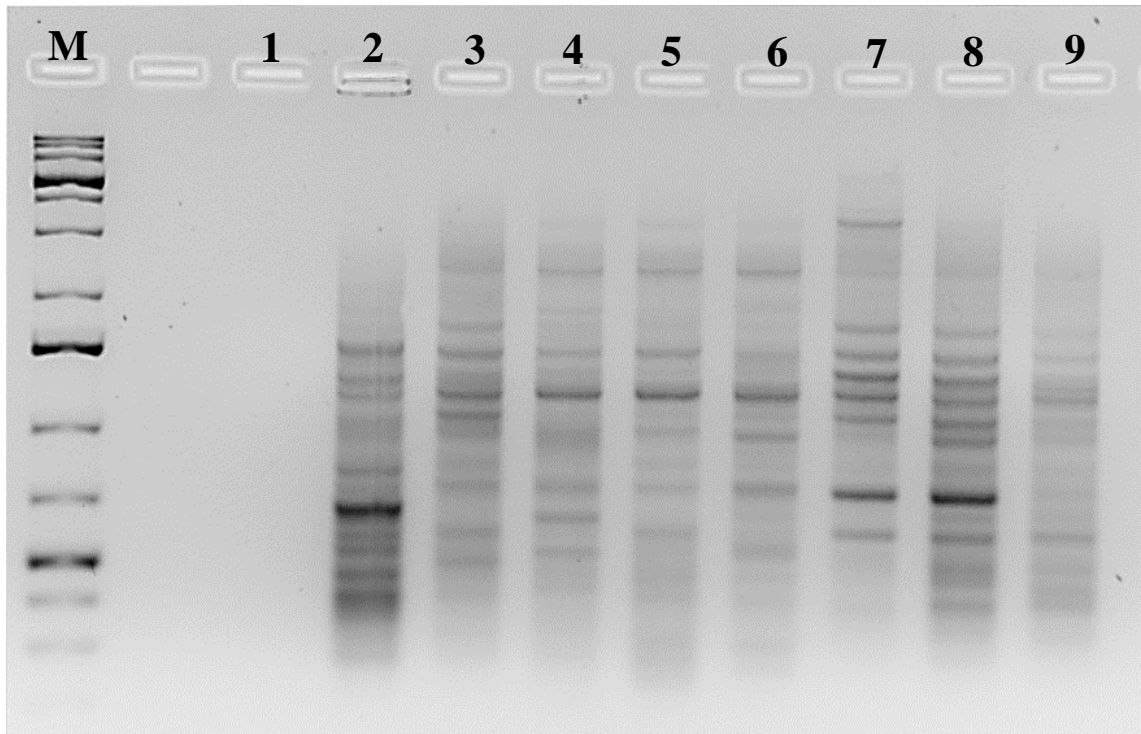


Figura 36: Perfiles BOX de bacterias de lento crecimiento

Los perfiles electroforéticos se analizaron mediante el software R, a través de la similitud entre las cepas aisladas por presencia/ausencia de bandas. Utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Jaccard, se obtuvo el dendograma mostrado en la figura 37.

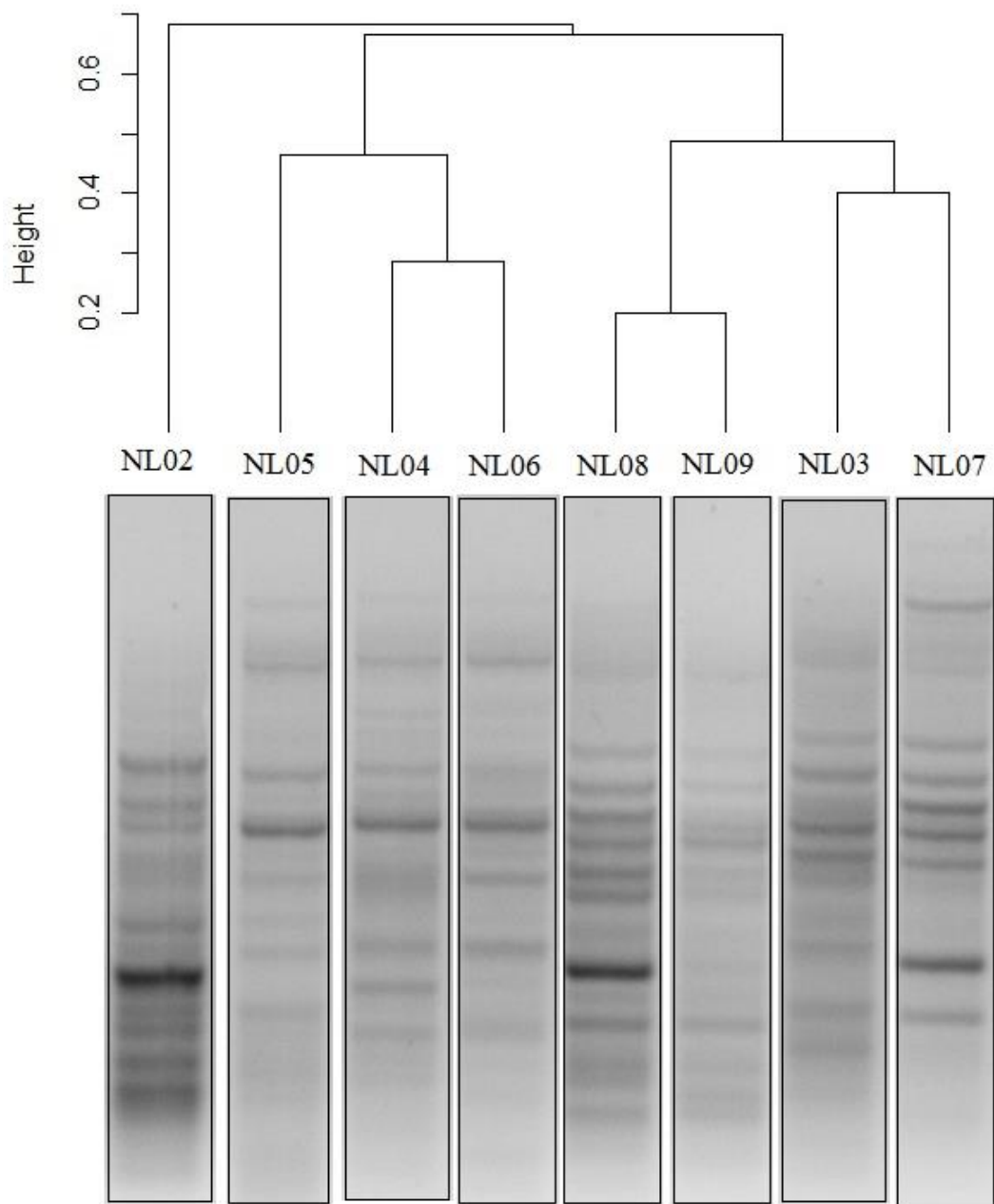


Figura 37: Dendrograma generado por la combinación de presencia/ausencia de bandas en los perfiles electroforéticos BOX para bacterias de lento crecimiento. Método de agrupamiento: UPGMA. Coeficiente de similaridad: Jaccard

Utilizando un porcentaje de similitud de 50%, se puede observar que las cepas se distribuyen en tres grupos distintos. Además el dendrograma permite apreciar que se aislaron cepas

relacionadas filogenéticamente tanto del campo “PC” como del campo ”IRD”, ya que en los grupos formados se encuentran cepas de ambos campos, ordenadas en pareja.

El proceso de extracción de ADN y amplificación del gen R16S para su secuenciamiento fue realizado por la empresa Macrogen. Tres de las nueve colonias, las cuales presentaron mejor crecimiento en agar CZAPEK (debido a los requerimientos para el servicio completo de secuenciamiento): NL01, NL02 y NL04, fueron secuenciadas. Se obtuvieron tres géneros para estas cepas: NL01 perteneciente a *Clostridium*, NL02 perteneciente a *Streptomyces* y NL04 perteneciente a *Bacillus*. Comparando las características macroscópicas de estas cepas con los resultados obtenidos en la investigación, se concluye que sólo para NL02 la identificación molecular fue válida, pues este aislado presenta todas las características del género *Streptomyces*.

V. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se aislaron 143 cepas fúngicas y 199 cepas bacterianas a partir de nódulos, raíces, tallos y rizósfera provenientes del campo de tarwi del Programa de Cereales- UNALM y del IRD-Jauja de la misma universidad.
- Nueve cepas fúngicas mostraron antagonismo frente a *Fusarium oxysporum*, de las cuales, el mayor porcentaje de inhibición observado fue de 74% y provino del aislado R-5_422 (Nº 134), identificado microscópicamente como *Aspergillus*. Para las cepas bacterianas, el tamizaje inicial nos permitió seleccionar a 36 aislados. Éstos fueron evaluados luego por otras capacidades PGPR, destacándose la cepa RB10 con la mayor eficiencia relativa de solubilización de fosfato tricálcico, 496%; la cepa RB11 con el mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium oxysporum*, 49.3% y la cepa RB08 con la mayor eficiencia relativa de producción de sideróforos, 500%.
- Se caracterizaron molecularmente las 6 cepas bacterianas aisladas de nódulos y a las 8 cepas bacterianas que mostraron producción de AIA y solubilización de fosfato simultáneamente, identificando que la mayoría perteneció al género *Bacillus*. Se encontró también especies de los géneros *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* y *Enterococcus*.
- En el ensayo de invernadero, se encontró que el inóculo TB05 logró un incremento del 11% en la altura de planta a los 42 dds. Se observó también que los tratamientos obtuvieron valores superiores al control en peso seco de la plántula y longitud de inflorescencia

VI. RECOMENDACIONES

- Confirmar los aislados endófitos en otros campos de *Lupinus mutabilis* y estudiar su rol en la planta.
- Evaluar las capacidades PGPR mediante otros ensayos, tales como cuantificación de fosfato en medio líquido, estabilidad fenotípica de solubilización, cuantificación por espectrofotometría de AIA y actividad de la nitrogenasa.
- Evaluar la capacidad antagónica de las cepas frente a otros patógenos de *Lupinus mutabilis* como *Colletotrichum sp.* (antracnosis), *Ascochyta sp.* (mancha anular) y *Uromyces lupini* (roya).
- Determinar otras capacidades PGPR (compuestos volátiles, antibióticos, enzimas, fitohormonas) y correlacionarlas junto con las estudiadas en esta investigación, para establecer cuáles serían las que presenten mayor potencial en estudios de invernadero y campo.
- Realizar el secuenciamiento del gen ribosómico 16S por medio del envío en forma de plásmido.
- Secuencias otros genes como *rpoB*, *recA*, *glnII* y *dnaK* y la región intergénica 16S-23S (ITS) para poder dilucidar mejor la relación filogenética de las cepas.
- Realizar ensayos de campo en diferentes regiones de nuestro país, con distintas condiciones climáticas para evaluar el comportamiento de las cepas y su efecto beneficioso en el crecimiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadín, J. 2008. Agricultura Sostenible en los Andes tropicales: importancia de la materia orgánica en la conservación de la fertilidad del suelo. Tesis Ph.D. Universidad Santiago de Compostela. 155 p.
2. Abdel-Rahman, H.M., Salem, A.A., Moustafa, M.M.A. 2017. A novice *Achromobacter* sp. EMCC1936 strain acts as a plant-growth-promoting agent. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(61):3-15
3. Adame, J., Luna, M., Trigos, A.R. 2009. Bacterias antagonistas de hongos fitopatógenos asociadas a la raíz de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agricultura sostenible* 6:29-35
4. Adia, F., Taghreed, S. 2014. Production, optimization, characterization of antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology* 13(14): 1567- 1578
5. Aguado, G.A., Moreno, B., Jiménez, B., García, E., Preciado, R. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y los fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1):9-21
6. Alsina, I., Steinberga, V., Ansevia, A., Dubova, L., Liepina, L. 2008. The Evaluation of effectiveness of *Rhizobium lupini* strains. *Agronomijas Vestis (Latvian Journal of Agronomy)* (10):193-197
7. Alwathnani, H.A., Perveen, K., Tahmaz, R., Alhaqbani, S. 2012. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. *African Journal of Microbiology Research* 6(2):312-319

8. Anil Kumar, R., Rajkumar, H.G. 2014. Antagonistic effect of rhizospheric *Aspergillus* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *International Journal of Chemical and Analytical Science* 5(1):39-42.
9. Anzuay, M., Angelini, J., Ludueña, L., Fabra, A., Taurian, T. 2016. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento de plantas de maní en ensayos en microcosmos. Artículo presentado a la 30 Jornada Nacional del Maní. Centro de Ingenieros Agrónomos General Cabrera y Zona.
10. Aravena, G., Amiard, V., Parra, L., Mora, P., Salvo, H., Maureira, I. 2010. Mejoramiento del lupino amarillo para alimentación animal: Avances genéticos reducirán el antinutricional ácido fítico. *INIA Tierra Adentro* (90):10-13
11. Ardley, J.K., Parker, M.A., De Meyer, S.E., Trengove, R.D., O'Hara, G.W., Reeve, W.G., Yates, R.J., Dilworth, M.J., Willems, A., Howieson, J.G. 2012. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (62):2579–2588
12. Arias, E.D., Piñeros, P.A. 2008. Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde. Tesis Lic. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 151 p.
13. Ausubel, F.M. 1998. *Current Protocols in molecular biology*.
14. Ayala, G. 2004. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana (7). In: J. Seminario (ed.). *Raíces Andinas: contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)*. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación. Lima, Perú. p. 101-112.

15. Barney, V.E. 2011. Biodiversidad y Ecogeografía del Género *Lupinus* l. (*Leguminosae*) en Colombia. Tesis Mg. Sc. Ciencias Biológicas línea Recursos Fitogenéticos. Universidad Nacional de Colombia- Palmira.
16. Barquero, M. 2014. Caracterización y selección de bacterias y hongos micorrícicos aislados en raíces de alubia y pimiento, en la provincia de León, para el desarrollo de biofertilizantes. Tesis Ph. D. Universidad de Salamanca. 203 p.
17. Barrett, C.F., Parker, M.A. 2006. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. Applied Environmental Microbiology 72:1198-1206
18. Bashar, M.A., Chakma, M. 2014. *In vitro* control of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* the causative agent of brinjal wilt. Journal of Biological Sciences 23(1):53-60
19. Bennik, M.H.J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L., Smid, E.J. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. Biochimica et BioPhysica Acta 1373:47-58
20. Berg, G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiological Biotechnology 84:11-18
21. Butler, W.H., Ford, G.P., Creasy, D.M. 1996. A 90-day feeding study of lupin (*Lupinus angustifolius*) flour spiked with lupin alkaloids in the rat. Food and Chemical Toxicology 34:531-536.
22. Cadena, S., Martínez, B. 2011. Caracterización de cepas de *Pseudomonas* spp. y su efecto en la germinación y emergencia de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque. Tesis Lic. Lambayeque, Perú. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

23. Calvo, P., Zuñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1):32-39
24. Camarena, F., Huaranga, A., Jiménez J., Mostacero, E. 2012. Revalorización de un cultivo subutilizado: chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). 1 ed: Universidad Nacional Agraria La Molina – Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica CONCYTEC. 222 p.
25. Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 14(2):15-31.
26. Carro, L., Flores, J.D., Ramírez, M.H., García, P., Martínez, P., Igual, J.M., Tejedor, C., Peix, A., Velázquez, E. 2014. *Paenibacillus lupini* sp. isolated from nodules of *Lupinus albus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (64): 3028–3033
27. Castañeda, B., Manrique, R., Gamarra, F., Muñoz, A., Ramos, F., Lizaraso, F., Martínez, J. 2008. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet. (chocho o tarwi). *Acta Medica Peruana* 25(4): 210 – 215.
28. Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J.1999. Screening for plant growth rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*. 63:1670-1680.
29. Ceroni, A. 2003. Distribución de las leguminosas de la parte alta de la cuenca La Gallega. Morropón. Piura. *Ecología Aplicada*. 2(1):9-13.
30. Chan, Y., McCormick, W.A., Seifert, K.A. 2003. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Canada Journal Microbiology* 49:253-262

31. Cherkupally, R., Amballa, H., Reddy, B.H. 2016. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* and *Penicillium* species against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Annals of Biological Research* 7(9): 34-38
32. Cifuentes, A.R., Núñez, R., Espinosa, V., Alcántar, G. 2001. Asociación Lupino-Maíz en la nutrición fosfatada en un andosol. *TERRA* 19(2):141-154.
33. Claros, M., Ortuño, N. 2013. Aislamiento y caracterización funcional de bacterias endófitas en el cultivo de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). In: Vargas, M (ed.). 2013. Congreso Científico de la Quinoa (Memorias). La Paz, Bolivia. p. 465- 474.
34. Coelho, M.R., De Vos, M., Carneiro, N.P., Marriel, I.E., Paiva, E., Seldin, L. 2008. Diversity of the *nifH* genes pools in the rizhosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting level of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol. Lett.* 279:15-22
35. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9):4951-59
36. Conn, V.M., Walker, A.R., Franco, C.M. 2008. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21:208-18
37. Coombs, J.T., Franco, C.M. 2003. Isolation and Identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5603-5608
38. Datta, C., Basu, P. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub *Cajanus cojan*. *Microbiological Research.* 155:123-127
39. Dawood, E.S., Mohamed, A.A. 2015. Isolation and screening of different chitinolytic mycoflora isolated from sudanese soil for biological control of *Fusarium oxysporum*. *Asian Journal of Agriculture and food sciences* 3(4): 412-18

40. De la Vega, P.A. 2010. Distribución, caracterización e importancia ecológica de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus*. Tesis Ph. D. Universidad de Salamanca. 309 p.
41. De Meyer, S.E., Willens, A. 2012. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. Nov., *Bosea lathyri* sp.nov. and *Bosea robiniae* sp.nov., isolated from legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2505–2510.
42. Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J.J., Alcántar, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19(4): 327-335
43. Dick, R.P. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 40: 25-36.
44. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 22(2): 107-49
45. Dwivedi, S.K., Enespa, S. 2013. *In vitro* efficacy of some fungal antagonists against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causing brinjal and tomato wilt. *International journal of Biological & Pharmaceutical Research.* 4(1):46-52.
46. E, Y., Yuan, J., Yang, F., Wang, L, Ma, J., Li, J, Pu, X., Raza, W., Huang, Q., Shen, Q. 2017. PGPR strain *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 potentially benefits watermelon growth by re-shaping root protein expression. *AMB Express* 7(104): 1-12
47. Eastwood, R.J., Drummond, C.S., Schifino-Wittmann, M.T., Hughes, C.E. 2008. Diversity and evolutionary history of *Lupins*-insights new phylogenies. In: Palta, JA y Burger, JB (Eds) “*Lupins for Health and Wealth*”. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
48. Eastwood, R.J., Hughes, C.E. 2008. Origins of domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes.. In: Palta, JA y Burger JB (Eds.) *Lupins for Health & Wealth*, Proceedings

12th International Lupin Conference, Fremantle, Australia, International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. p. 373-379.

49. Esqueche, A.S., Quispe, G.A. 2017. Caracterización de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de rizoplasma y rizosfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimientos de plantas. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
50. FAO. 2005. Perspectivas alimentarias. Sistema mundial de información y alerta sobre la agricultura y alimentación (SMIA) N° 4
51. Fano, H., Benavides, M. 1992. Los cultivos andinos en perspectiva. Producción y utilización en el Cusco. Lima, Perú: Centro de Estudios “Bartolomé de las Casas” – Centro Internacional de la Papa (CIP). p. 71 – 98.
52. Fernández, L.A., Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelo de la región sojera. *Ciencia del Suelo*. 23 (1): 31 – 37
53. Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de plagas (Costa Rica)* 62: 96-100
54. Flores-Félix, J.D., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.H. Tejedor, C., Igual, J.M., Peix, A., Velázquez, E. 2014. *Cohnella lupini* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Lupinus albus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 83–87.
55. Fornasini, M., Castro, J., Villacres, E., Narvaez, L., Villamar, M., Baldeon, M.E. 2012. Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutr Hosp.* 27(2):425-433 Ecuador.
56. Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Ph. D. Universidad de Granada. 229 p.

57. Gade, D. 1975. Plants, man and the land in the Vilcanota valley of Peru. *Biogeographica*. (6).
58. Galdames, R. 2016. Enfermedades parasitarias de lupino en Chile. In: Mera, M (ed.). *Lupino dulce y amargo producción en Chile*. Temuco, Chile, INIA. p. 76-90
59. Gamboa-Gaitan. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas.
60. Ganzera, M., Krüger, A., Wink, M. 2010. Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53:1231-1235.
61. Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20:338–343.
62. Gil, A. 2010. *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad nutritiva de los alimentos*. 2 ed. Editorial Medica Panamericana. 786 p.
63. Giri, B., Houg, P., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A. 2005. Microbial diversity in soils. *Soil Biology* 3:19-55
64. Girón-Calle, J., Pedroche, J., Yust, M., Alaiz, M., Vioque, J., Millán, F. 2005. Actividad Biológica de aislados proteicos de garbanzo. In: Girón-Calle J, Pedroche J, Rodríguez JM y Millán F. (eds.). *Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial*. Universidad de Sevilla. p 459-464.
65. Gomila, M., Tvrzova, L., Teshim, A., Sedlacek, I., Gonzales-Escalona, N., Zdrahal, Z., Sedo, O., Gonzales, F., Bennasar, A., Moore, E., Lalucat, J., Murialdo, S. 2011. *Achromobacter marplatensis* sp. nov., isolated from pentachlorophenol- contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology*. 61: 2231 - 2237.

66. González, A. 2015. Aislamiento e Identificación de hongos endofitos de la especie *Piper aduncum* (piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas. Universidad Tecnológica de Pereira
67. Gordon, S.A., Weber, R.P. 1950. Colorimetric estimation of Indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26(1): 192 - 195
68. Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel P., Thakker, J.N. 2013. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus liqueniformis* A2. *Microbiological Research* 169: 66-75
69. Guadagnucci, G., Paschoal, J., José da Cruz, R., Nascimento, P.H., Gomes, J.A. 2012. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry* 132(3):1521-1526.
70. Gyaneshwar, P., Kumar, G., Parekh, L.J., Poole, P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant soil*. 245:83-93
71. Haas D., Keel C., Laville J., Maurhofer M., Oberhansli T., Schnider U., Voisard C., Wuthrich B., Defago G. 1991. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain ChaO involved in the suppression of root diseases. En: Hennecke H, Verma DPS (eds.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. p.450 – 456.
72. Hebbar K.P., Martel M.H., Heulin T. 1998. Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia* Eur. J. Plant. Pathol. 104:29-36.
73. Hiltner L. 1904. Über neuerer erfahrung und problema auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtung der grundung und brache. *Arb. Deutsch. Landwirt. Ges.* 98: 59-78
74. Hyakumachi M., Kubota M. 2004. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor, en *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications* (ed. Arora DK). Pp. 101-110

75. ILC (International Lupin Conference). 2005. Feed & Food, Grain specific cations and suppliers.
76. Jacobsen S.E., Mujica A. 2006. El Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés. Botánica Económica de los Andes Centrales 28: 458-482.
77. Kanda J. 1995. Determination of ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPPS). Water Research, 29, 2746-2750.
78. Kloepper J.W. 1993 Plant Growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Metting FB (Ed.), Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker Inc., NY, USA. 255-274 pp.
79. Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de Pathologie Végétale et Phyto-Bactériologie (Ed.), Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II. Gilbert-Clarey, Tours, France, pp. 879-882.
80. Kress H. 2009. Base de datos de flores, árboles y hojas (fotografía). Tomado de: <https://www.henriettes-herb.com>. Revisado: 06/12/2017
81. Kucey R.M.N., Janzen H.H., Leggett M.E. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in Agronomy 42:199-228
82. Kumar A., Prakash A., Johri B.N. 2011. *Bacillus* as a PGPR in crop ecosystem. In: D.K. Maheshwari (ed.) Bacteria in Agrobiolgy: Crop ecosystems. Capitulo 2:37-59
83. Lagunas L.J., Zavaleta M.E., Osada K.S., Aranda O.S., Luna R.I., Vaquera H.H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Mex. Fitopat. 19:57-65.

84. Lara C., Oviedo L., Betancur C. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia trop* 29(2):187 – 194
85. Lara C., Villalba M., Oviedo L. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9:6-14.
86. Leong J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plants pathogens. *Ann. Rev. Phytophatol.* 24: 187-209
87. Lezama P.B. 2010. Las especies de lupinus L. (Fabaceae) y de sus simbiontes en el distrito de Corongo - Ancash.
88. Liceta M. 2015. Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* y *Bacillus* provenientes de la rizósfera de diferentes variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su uso como potenciales promotoras del crecimiento vegetal. Universidad Nacional Agraria La Molina.
89. Loaces I. 2011. Caracterización de bacterias endófitas productoras de sideróforos en arroz (*Oryza sativa*). Universidad de la República.
90. Louden B., Haarmann D., Lynne A. 2011. Use of blue agar CAS Assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & Biology education.* 12(1), 51-53
91. Lucas-García, J.A., Probanza A., Ramos B., Barrientos M.L., Gutiérrez Mañero F.J. 2000. Changes in the bacterial communities structure of the rhizosphere of four wild *Lupinus* species from flowering to fruiting. *Orsis* (15): 7-25.
92. Luna L., Martínez R.A., Hernández M., Arvizu S.M., Pacheco J.R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 36(1):63-69
93. Martínez-Hidalgo P., Galindo-Villardón P., Trujillo M.E., Igual J.M., Martínez-Molina E. 2014. *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Scientific Reports* 4: 6389.

94. Matsubara J.M. 2010. Diversidad fenotípica y molecular de bacterias simbióticas del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en el valle de supe - Barranca. Universidad Nacional Agraria La Molina. Peru.
95. Mayea S., Novo R., Valiño A. 1991. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación.
96. McFarland J. 1970. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. pp. 435-437.
97. Medina A. 2006. Estudio de la interacción entre inoculantes microbianos y residuos agroindustriales biotransformados para su uso en estrategias de revegetación y bioremediación. Tesis PhD. Universidad de Granada.
98. Mehta P., Walia A., Kulshrestha S., Chauhan A., Shirkot C.K. 2013. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. Journal Basic Microbiology. 53:1-12
99. Melo I.S., Faull J.L., Nascimento R.S. 2006. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. Brazilian Journal of microbiology 37:417-419
100. Mohite B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. Journal of soil Science and Plant Nutrition. 13(3): 638-649
101. Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 170(1):265-270
102. Noda Y. 2009. Las micorrizas: una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. Pastos y forrajes 32(2)

103. Oba H., Tawaraya K., Wagatsuma T. 2001. Arbuscular Mycorrhizal Colonization in *Lupinus* and Related Genera. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 47(4):685-694.
104. O'Dell T.E., Trappe J.M. 1992. Root endophytes of lupin and some other legumes in Northwestern USA. *New Phytologist* 122: 479-485.
105. Ogata K., Arellano C., Zuñiga D. 2008. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zonas Áridas* 12(1): 137-153
106. Oliva C.E. 2015. Caracterización del potencial biológico de *Bacillus* spp. y sus metabolitos para el control de *Colletotrichum acutatum* causante de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis*) en las provincias de chimborazo y cotopaxi. Universidad de las Américas.
107. Ortega-David E., Rodríguez A., David A., Zamora-Burbano A. 2010. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica* 59 (1): 111-118
108. Ortiz C.P. 2012. Estudio de bacterias psicrótrofas aisladas de la zona de Junín con capacidad PGPR y su uso como potenciales biorremediadoras de metales pesados en una planta forrajera. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú
109. Pal K.K., Tilak K.V.B.R., Saxena A.K., Dey R., Singh C.S. 2001. Suppression of maize root disease caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 156(3): 209-23
110. Pasterán F., Galas M. 2008. Manual de procedimientos. Sensibilidad a los antimicrobianos en salmonella, *Shigella* y *E.coli*.
111. Patiño C., Sánchez M. 2012. Aislamiento e Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos habitantes de la rizósfera de chontaduro. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 10 (2): 177-187

112. Patten C.L., Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8): 3795-801
113. Pearse S.J., Veneklaas E.J., Cawthray G.R., Bolland M.D.A., Lambers H. 2006. Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant Soil* 288: 127–139.
114. Pérez G.E., Librán M.C., Rivera L.I., Alameda M. 2014. Identificación de hongos presentes en biosólido municipal compostado y la turba. *J. Agric.* 98(2):179-193
115. Phillips J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161
116. Probanza A. 2012. La rizósfera: un "criptoecosistema" vital. Aspectos básicos y aplicados. Universidad CEU San Pablo.
117. Quiroz V.F., Ferrera R., Alarcón A., Lara M.E. 2008. An antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo del ajo. *Revista Mexicana de micología* 26: 27-34
118. Rademaker J.L., Aarts J.H., Vinuesa P. 2005. Molecular typing of environmental isolates. EN: Mark Osborn and Cindy Smith (eds) *Molecular Microbial Ecology*. Capitulo 4:97-134 pp.
119. Rahmoune B., Morsli A., Khelifi M., Khelifi L., Strueh M., Erban A., Kopka J., Prell J., van Dongen J. 2016. Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of plant interactions*. 12(1):1-6

120. Ramírez G.R.M., Luna M.B., Mejía Ch.A., Velázquez M.O., Tsuzuki R.G., Vierna G.L., Müggenburg I. 1992. En: Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM.
121. Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodríguez-Navarro D., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Willems A., Velázquez E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. & *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodule of *Pachyrhizus erosus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1929-1934
122. Raza W., Wang Y., Shen Q.R. 2008. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics hydrolytic enzymes and hazard assessment. J Plant Physiol 90:419-430
123. Rengel Z., Marschner P. 2005. Nutrient Availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. New Phytologist. 168: 305-312
124. Riascos D., Sarria G.A., Varon de Agudelo F., Gómez A., Mosquera A.T. 2011. Reconocimiento de hongos con potencial asociados a la rizósfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K.) en la región Pacífico del Valle del Cauca, Colombia.
125. Rodríguez M.R. 2008. Análisis de la población bacteriana endófito presente en nódulos de Lupinus: Interacción y localización *in situ*. Tesis PhD. Salamanca: Universidad de Salamanca.
126. Rodríguez C.V., Hernández M.J.M. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana*L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
127. Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17: 319-339
128. Rodríguez V.J. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofíticos contra *Rhizotocnia solani* un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú

129. Roselló J.L. 2003. Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Universidad Politécnica de Valencia.
130. Salazar A.M., Ordoñez C.A. 2013. Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo de jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.
131. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
132. Samaniego J.A., Chew Y. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferentes condiciones agrícolas en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78(2):383-390
133. Sánchez D.B. 2011. Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum* var. Sofía) bajo invernadero. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
134. Santoyo G., Valencia E., Orozco M., Peña J.J., Farias R. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28(1): 53-60
135. Sardi P., Saracchi M., Quaroni Q., Petrolini B., Borgonovi G.E., Merli S. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from Surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2691-2693
136. Schoebitz M.I. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) Tesis Lic. en Ciencias Agrarias. Chile, Universidad Austral de Chile. 62 p.

137. Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47-56
138. Sessitsch A., Reiter B., Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50(4):239-249
139. Sgroy V., Cassan F., Masciarelli O., Del Papa M., Lagares A., Luna V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbial and cell physiology.* 85(2):371-81
140. Silva M.A. 1998. Efecto de cuatro fitorreguladores en el crecimiento y rendimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.). Universidad Autónoma de León. Pp:19-21
141. Soler J., Posada L.F., Pérez J.C. 2012. Distribución diferencial de bacterias con potencial biocontrolador de *Spongospora subterranea* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). *Revista Facultad Nacional de Agronomía.* 65(1): 6337 – 6348
142. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kampfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rosselló R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
143. Tabatabai M.A. 1982. Soil enzymes. En: A.L. Page, R.H. Miller, y D.R. Kineey, editores, *Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties.* ASA-SSSA, Madison, EEUU. p. 903-947.
144. Tapia M.E., Fries A.M. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima

145. Tejera B., Rojas M., Heydrich M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de fitopatógenos. Revista CENIC, Ciencias Biológicas 42(3):131-138
146. Tejera B., Heydrich M., Rojas M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz. Agronomía Mesoamericana 24(2), 357-264
147. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680
148. Toloza D.L. 2014. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas con potencial antagonico para el control biologico de *Fusarium oxysporum* (Schlecht) en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en cienega, boyacá (Colombia). Universidad Nacional de Colombia.
149. Torres R., Pérez C., Suárez N. 2003. Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Centro Agrícola 30 (2):56-60
150. Tortora M.L., Salazar S.M., Díaz J.C., Guerrero M.F., Bellone C.H., Pedraza R.O. 2007. Actividad nitrogenasa y producción de sideróforos en cepas de *Azospirillum brasilense* aisladas de frutilla. Avances en la producción vegetal y animal del NOA. pp: 117-122
151. Trujillo I., Díaz A., Hernández A., Heydrich M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista de Protección Vegetal. 22(1): 41-46
152. Trujillo M.E., Alonso-Vega P., Rodríguez R., Carro L., Cerda E., Alonso P., Martínez-Molina E. 2010. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. The ISME Journal 4: 1265–1281.

153. Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Fernández-Molinero C., Schumann P., Martínez-Molina E. 2007. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (57): 2799–2804
154. Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Martínez-Molina E. 2006. *Kribella lupini* sp. nov., isolated from the roots of *Lupinus angustifolius* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 407-411.
155. Valverde A. 2003. Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Universidad de Salamanca.
156. Valverde A., Velázquez E., Gutiérrez C., Cervantes E., Ventosa A., Igual J.M. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1979–1983.
157. Vera G., Bustamante E., Shattock R. 1999. Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)* 51: 47-58
158. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831
159. Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5:25-40
160. Vilchez G.J. 2017. Capacidad antagonista y promotora de del crecimiento vegetal de rizobacterias aisladas del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú
161. Vicente F.J., Velasco J.L., Rubio I., Sáenz V.A., Olivares R. 2015. Obtención y optimización de sideróforos microbianos a partir de BPCV que permitan la asimilación

del hierro (II) en los cultivos con problemas de clorosis férrica. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, México

162. Vincent J. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Centro Regional de Ayuda Técnica. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 200 p.
163. Wahyudi A.T., Astuti R.P, Widyawati A., Meryandini A., Nawangsih A.A. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 3(2):34-40
164. Wink W., Meibner C., Witte L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*. 38(1): 139-153
165. Woese C.R. 2001. Translation: In retrospect and prospect. *RNA* (New York,N.Y.), 7(8), 1055-1067
166. Yuen G.Y., Schroth M.N. 1986. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. *Phytopathology* 76: 176-180
167. Zago L., Blume E., Briao M.F., Veiga M.G. 2007. Selecao de antagonistas fungicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciencia rural* 37(6): 1794-97
168. Zboinska E., Lejczak B., Kafarsi P. 1992. Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2993-2999
169. Zúñiga D.2007. Control de fitopatógenos del cultivo de papa por bacterias antagonicas aisladas de la rizósfera del mismo cultivo. Informe técnico final. Proyecto 163-2006-Concytec-OAJ

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Preparación de los medios de cultivo y reactivos empleados

a. Medios de cultivo

- **Medio AN (Agar nutritivo) y caldo nutritivo**

Componente	g/L
Extracto de levadura	3
Peptona	5
Cloruro de Sodio	5
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	15

Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1N. Para el caldo nutritivo, los componentes fueron los mismos pero se omitió la adición de agar.

- **Medio CAS (Louden *et al.*, 2011)**

Para este medio se prepararon dos componentes principales: una solución de tinte azul y la base del medio King B, las cuales fueron autoclavadas por separado. Ya en la cámara de flujo laminar, se añadió lentamente 100 ml del tinte azul a 1 L del medio King B.

Tinte Azul

Solución 1: Se disolvió 0.06 g de CAS (Cromoazurol S) en 50 ml de agua destilada.

Solución 2: Se disolvió 0.0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de HCl 10 mM.

Solución 3: Se disolvió 0.073 g de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) en 40 ml de agua destilada.

Se mezcló la solución 1 con la 2 y luego se añadió la solución 3. En ese momento se tornó a un color azul oscuro

Base de medio King B

Componente	g/L
Proteasa	20
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5
Fosfato hidrógeno dipotasio	1.5
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	20

Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1N.

- **Medio CZAPEK**

Componente	g/L
Cloruro de potasio	0.5
Fosfato hidrógeno dipotasio	1
Nitrato de sodio	2
Sacarosa	30
Sulfato ferroso	0.01
Sulfato de magnesio	0.5
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	15

Se ajustó el pH a 7.3 con NaOH 1N.

- **Medio LMA (Manitol-Levadura) y caldo LMC suplementado con triptófano 5 mM**

Componente	g/L
Manitol	10
Extracto de levadura	1
Fosfato hidrógeno dipotasio	0.5
Sulfato de magnesio	0.2
Cloruro de sodio	0.1
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	15

Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1 N. Para el caldo LMC, los componentes fueron los mismos pero se omitió la adición de agar, además se añadió triptófano directamente al caldo y se calentó para disolverlo (1.02 g de triptófano para 1 L de caldo).

- **Medio NBRIP (Tejera *et al.*, 2013)**

Componente	g/L
Glucosa	10
Fosfato de calcio	5
Cloruro de magnesio hexahidratado	5
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.25
Cloruro de potasio	0.2
Sulfato de amonio	0.1
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	15
Azul de bromofenol	0.025

Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N.

- **Medio OGY suplementado con cloranfenicol**

Componente	g/L
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 ml
Agar	15

Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N. Se adicionó 3 ml de cloranfenicol 50 mg/ml en el momento de plaquear, obteniendo una concentración de 150 ppm, adecuada para mantener los cultivos de hongos lejos de interferencias bacterianas (Riveros, 2001 mencionado por González, 2015).

- **Medio PDA (Papa dextrosa) suplementado con cloranfenicol**

Componente	g/L
Dextrosa	20
Papa (infusión de hervido)	800 ml
Agar	15

Se hirvió 200 gr de papa en 800 ml de agua destilada y se filtró el líquido, obteniendo así la infusión de hervido. Luego de la adición de dextrosa se enrasó con agua destilada hasta 1 L. y se ajustó pH a 5.5 con HCl 1N. Se adicionó 3 ml de cloranfenicol 50 mg/ml, luego de autoclavar.

b. Reactivos

- **Bicloruro de Mercurio 0.1% - 2.5%**

Se disolvió 0.1 g y 2.5 g de HgCl₂ cada uno en 100 ml de agua destilada, para la solución de 0.1% y 2.5%, respectivamente.

- **Buffer TAE 50X (40mM Tris-Base, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA)**

Se añadió 242 g de Tris Base y 18.61 g de EDTA en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Luego se agregó 57.1 ml de ácido acético glacial y se enrasó el volumen a 1 L. El pH fue de 6.8, generalmente no hay necesidad de ajustarlo.

- **Buffer TE 10X (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA)**

Se añadió 10.6 g de Tris-Cl y 3.94 g de EDTA en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Una vez disueltos, se enrasó a 1 L y se ajustó pH a 8.

- **Buffer TSE 10X (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA)**

Se añadió 5.8 g de NaCl, 10.6 g de Tris-Cl y 3.94 g de EDTA en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Luego se enrasó a 1 L. Se ajustó pH a 7.8.

- **Cloroformo-Alcohol isoamílico (49:1)**

Se adicionó 1 ml de alcohol isoamílico en 49 ml de cloroformo. Se almacenó en un recipiente oscuro a temperatura ambiente.

- **Cloruro de potasio 2M**
Se disolvió 149.12 g de KCl en 1 L de agua destilada.
- **Cloruro de sodio 0.85% - 5M**
Se agregó 0.85 g de NaCl en 100 ml obteniendo la solución salina de 0.85%.
Para la solución de 5M se añadió 14.6 g de NaCl en 50 ml.
- **CTAB 10% – NaCl 0.7 M**
Se disolvió 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua caliente, lentamente se añadió 10 g de CTAB con agitación. Si es necesario calentar 65°C para disolver. Se ajustó a un volumen final de 100 ml.
- **Fenol – Cloroformo – Alcohol isoamílico (25:24:1)**
Se agregó 25 ml de fenol, 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico en un recipiente oscuro. Se almacenó a temperatura ambiente.
- **Nitroprusiato de sodio 0.5%**
Se agregó 0.5 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua destilada.
- **Reactivo Salkowsky**
Se añadió 1 ml de FeCl₃ 5M a 50 ml de agua destilada. Una vez disuelto se agregó lentamente 30 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- **SDS 10%**
Se disolvió 100 g de SDS en 900 ml de agua estéril y se calentó a 80°C para disolver. Se ajustó el pH a 7.2 añadiendo gotas de HCl concentrado. Por último se ajustó el volumen a 1 L con agua destilada.
- **Solución alcohólica de fenol 10%**
Se agregó 10 ml de fenol concentrado en 90 ml de alcohol 97°.

- **Solución oxidante**

Se agregó 20 g de citrato de sodio, 1 g de hidróxido de sodio y 2 ml de hipoclorito de sodio (lejía comercial) en aproximadamente 50 ml de agua destilada. Una vez disueltos se enrasó a 100 ml.

Anexo 2: Procedimiento para preparar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio (Lara *et al.*, 2007)

a. Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol resultado de la reacción del ión amonio (NH_4) con los compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



b. Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH_4Cl

Para obtener la curva patrón se preparó una solución madre de 100 ppm de NH_4Cl , para lo cual se pesó 0.01 g de NH_4Cl y se disolvió en 100 ml de agua destilada. A partir de ella se realizaron las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución madre (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración de NH_4Cl (ppm)
1	0	10	0
2	0.2	9.8	2
3	0.4	9.6	4
4	0.6	9.4	6
5	0.8	9.2	8
6	1	9	10
7	1.5	8.5	15
8	2	8	20

c. Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, se agregó a cada tubo 0.4 ml de solución alcohólica de fenol 10%; 0.4 ml de nitroprusiato de sodio 0.5% y 1 ml de solución oxidante. Se homogenizó bien y se dejó en reposo durante una hora. Transcurrido este tiempo se observó una coloración que variaba de verde al azul intenso en función de la concentración de amonio. Se leyó la absorbancia en el espectrofómeto.

La ecuación de la recta se obtuvo mediante regresión lineal a partir de las absorbancias obtenidas en la lectura y las concentraciones ya conocidas. El coeficiente de correlación lineal (r^2) fue mayor que 0.9 lo que nos indicó una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

Anexo 3: Preparación de patrón de turbidez McFarland (Pasterán y Galas, 2008)

Una turbidez equivalente al 0.5 de McFarland representa aproximadamente 10^8 UFC/ml para bacterias de rápido crecimiento. Se verifica luego la densidad correcta usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debe ser 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 de McFarland.

a. Preparación de los estándares

Se prepararon dos soluciones a partir de las cuales se formaron los estándares: una solución de BaCl_2 al 1% y otra de H_2SO_4 1%. Los volúmenes para cada estándar se muestran en la siguiente tabla:

Estándar N°	Volumen (ml)		Equivalente en N° de bacterias /ml ($\times 10^8$)
	BaCl₂ 1%	H₂SO₄ 1%	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1	99	3
2	2	98	6
3	3	97	9
4	4	96	12
5	5	95	15
6	6	94	18
7	7	93	21
8	8	92	24
9	9	91	27
10	10	90	30

Anexo 4: Campos para la recolección de las muestras

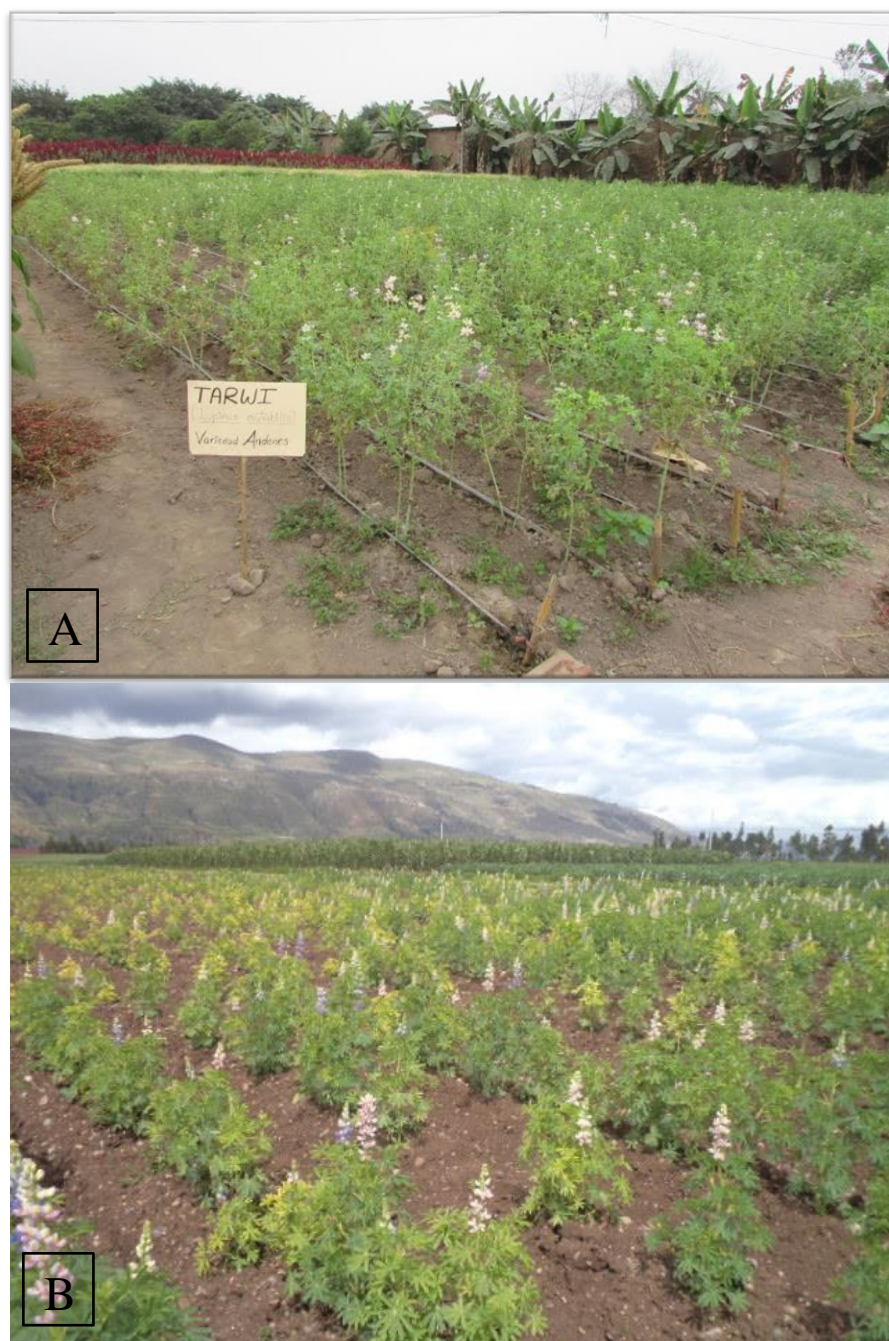


Figura. Campos muestreados de cultivo de *Lupinus mutabilis* var. Andenes. (A) Campo en el Programa de Cereales- UNALM. (B) Campo en el IRD-Huancayo

Anexo 5: Caracterización macroscópica de aislados fúngicos

Se le asignó un código a cada aislamiento, el cual denota el tipo de muestra de donde fue aislado (rizósfera “R”, raíces “Ra”, tallos “T” y nódulos “N”), la dilución, el número de muestra según las agrupaciones que se realizaron en la colecta de plantas, el número de repetición en la placa, el número de muestreo, y un número consecutivo para aquellas colonias distintas que aparecían dentro de una misma placa. Así, a modo de ejemplo, la cepa R-3_112_2, puede identificarse como aislada a partir de rizósfera en la dilución 10⁻³ de la muestra 1, en la repetición 1 del segundo muestreo (campo “PC”). El último número nos indica que en esa placa se encontró más de una cepa distinta y a ésta en modo particular se le codificó como cepa 2.

N°	Aislado fúngico	Campo	Colonia	Forma	Elevación	Margen	Textura	Micelio aéreo	Color	
									Anverso	Reverso
1	R-3_112_2	PC	Filamentosa	Circular	Pulvinada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo
2	R-3_112_3	PC	Filamentosa	Irregular	Plana	Filamentoso	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, bordes rosáceo (jóvenes) y verde (viejos)	Blanco-pardo
3	R-3_112_4	PC	Filamentosa	Irregular	Plana	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, bordes rosáceo (jóvenes) y verde (viejos)	Blanco-pardo
4	R-3_112_8	PC	Filamentosa	Circular	Plana	Erosionado	Pulverulenta	Escaso	Centro verde, borde blanco	Blanco-pardo
5	R-3_122_4	PC	Filamentosa	Circular	Pulvinada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde ligeramente naranja	Pardo
6	R-3_122_5	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde parduzco	Blanco-pardo
7	R-3_123	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco-pardo	Pardo

Continuación...

8	R-_123_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Centro naranja, borde blanco	Naranja
9	R-3_132	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Pulverulenta/ Algodonosa	Escaso	Centro amarillo, borde blanco	Pardo
10	R-_132_1	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Pulverulenta Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Blanco- pardo
11	R-_132_2	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Blanco	Pardo
12	R-_133_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
13	R- 3_133_6	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde verde	Pardo
14	R-3_133	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Crema- Pardo
15	R-_212_3	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
16	R-_212_5	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo- negro
17	R-_212_6	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Crema- negro
18	R-3_213	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
19	R-_222_1	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Filamentoso	Pulverulenta/ Algodonosa	Escaso	Centro gris- negro, borde blanco	Pardo
20	R-_222_2	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja- amarillo	Crema

Continuación...

21	R-3_222_5	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Centro blanco, borde naranja-amarillo	Pardo-negro
22	R-3_223_1	IRD	Filamentosa	Circular	Plana	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
23	R-3_223_10	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Crema	Pardo
24	R-3_223_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Pardo	Pardo
25	R-3_223_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
26	R-3_223_9	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
27	R-3_232_1	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Blanco	Pardo
28	R-3_232_2	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco-gris	Crema-morado
29	R-3_232_3	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Filamentoso	Algodonosa	Abundante	Blanco	Crema
30	R-3_233_2	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
31	R-3_312_4	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Granulosa	Escaso	Centro negro, borde blanco	Pardo
32	R-3_313_4	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Filamentoso	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
33	R-3_313_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Rizado	Aterciopelada	Escaso	Verde	Pardo
34	R-3_313	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Filamentoso	Pulverulenta	Escaso	Blanco	Crema
35	R-3_323_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
36	R-3_323_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Crema	Pardo
37	R-3_323	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Pulverulento	Escaso	Centro verde y borde verde oscuro	Pardo
38	R-3_333_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo

Continuación...

39	R-3_333_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco-pardo	Pardo
40	R-3_333_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Filamentoso	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
41	R-3_412_2	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Crema-Pardo
42	R-3_412_3	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
43	R-3_413_11	IRD	Filamentosa	Circular	Umbonada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro ligeramente naranja, borde blanco	Pardo
44	R-3_413_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro ligeramente rosado, borde blanco	Pardo
45	R-3_413_6	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
46	R-3_413_9	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro ligeramente naranja, borde blanco	Pardo
47	R-3_413_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada	Regular	Blanco	Crema
48	R-3_413_2	IRD	Filamentosa	Puntiforme	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Pardo
49	R-3_422	PC	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
50	R-3_422_3	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Granulosa	Escaso	Centro negro, borde blanco	Pardo
51	R-3_423_14	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Membranosa	Escaso	Crema	Pardo

Continuación...

52	R-3_423_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro ligeramente naranja, borde blanco	Pardo
53	R-3_423_9	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
54	R-3_432	PC	Filamentosa	Puntiforme	Elevada	Erosionado	Pulverulenta	Escaso	Blanco (jóvenes) y verde (viejos)	Pardo
55	R-3_433_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Pulverulenta/Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
56	R-3_512_1	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Pulverulenta/Algodonosa	Escaso	Centro negro, borde blanco	Crema
57	R-3_512_2	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Pulverulenta/Algodonosa	Escaso	Centro negro, borde blanco	Crema
58	R-3_513_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Filamentoso	Algodonosa	Abundante	Blanco-pardo	Pardo
59	R-3_522_4	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Gris	Pardo
60	R-3_523_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo
61	R-3_523_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro ligeramente naranja, borde blanco	Pardo
62	R-3_523_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo
63	R-3_532_2	PC	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
64	R-3_532_7	PC	Filamentosa	Circular	Pulvinada	Filamentoso	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
65	R-3_533_7	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo

Continuación...

66	R-3_533_9	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
67	R-4_112_2	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde parduzco	Blanco- pardo
68	R-4_112_3	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Pulverulenta	Escaso	Centro verde, borde blanco	Marrón
69	R-4_113_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
70	R-4_113_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
71	R-4_113_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada y con pliegues	Escaso	Verde	Pardo
72	R-4_113_4	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada y con pliegues	Escaso	Amarillo	Pardo
73	R-4_113_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Ligeramente naranja	Pardo
74	R-4_113_6	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada y con pliegues	Escaso	Verde	Pardo
75	R-4_113_7	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Verde oscuro	Pardo
76	R-4_122_1	PC	Filamentosa	Irregular	Umbonado	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Crema
77	R-4_132_2	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Granulosa	Escaso	Centro amarillo, borde blanco	Pardo
78	R-4_133	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Pardo	Pardo
79	R-4_212_1	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Crema

Continuación...

80	R-4_212_2	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Ondulado	Aterciopelada /Algodonosa	Escaso	Naranja-blanco	Pardo
81	R-4_213_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo
82	R-4_223_1	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
83	R-4_223_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
84	R-4_223_3	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
85	R-4_223_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Ondulado	Membranosa	Escaso	Crema	pardo
86	R-4_223_7	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
87	R-4_233_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Centro blanco, borde naranja	Pardo
88	R-4_233_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
89	R-4_312	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Granulosa	Escaso	Centro negro, borde blanco	Pardo
90	R-4_313_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
91	R-4_313_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Filamentoso	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
92	R-4_313_4	IRD	Filamentosa	Circular	Pulvinada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
93	R-4_313_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
94	R-4_322_1	PC	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
95	R-4_323_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Membranosa	Escaso	Crema	Pardo
96	R-4_332	PC	Filamentosa	Puntiforme	Convexa	Ondulado	Pulverulenta/ Aterciopelada	Escaso	Verde	Pardo
97	R-4_333_1	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
98	R-4_333_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo

Continuación...

99	R-4_412	PC	Filamentosa	Puntiforme	Convexa	Ondulado	Pulverulenta/ Aterciopelada	Escaso	Verde claro	Pardo
100	R-4 413_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
101	R-4 413_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Pulverulenta/ Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
102	R-4_413	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Pulverulenta/ Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Marrón
103	R-4_422	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Ondulado	Pulverulenta/ Aterciopelada	Escaso	Verde	Pardo
104	R-4 423_1	IRD	Levaduriforme	Irregular	Convexa	Ondulado	Membranosa	Escaso	Crema	Pardo
105	R-4_423	IRD	Filamentosa	Irregular	Plana	Ondulado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Crema- amarillo
106	R-4 433_1	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
107	R-4 433_5	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
108	R-4 433_6	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
109	R-4 433_7	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
110	R-4 433_8	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo

Continuación...

111	R-4 433_9	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
112	R-4 433_14	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
113	R-4 512_1	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Filamentoso	Pulverulenta	Escaso	Centro marrón, borde blanco	Pardo
114	R-4 522_1	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Centro amarillo, borde blanco	Pardo
115	R-4 522_2	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
116	R-4 523_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
117	R-4 523_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
118	R-4 523_3	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
119	R-4 523_4	IRD	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
120	R-4 523_5	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
121	R-4_533	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Abundante	Blanco	Pardo
122	R-5_122	PC	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Algodonosa	Moderado	Centro marrón, borde blanco	Pardo

Continuación...

123	R-5 122_1	PC	Filamentosa	Circular	Convexa	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro ligeramente verde, borde blanco	Pardo
124	R-5 122_2	PC	Filamentosa	Puntiforme	Convexa	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Pardo
125	R-5 212_1	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Aterciopelada/ Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
126	R-5 223_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
127	R-5 223_2	IRD	Levaduriforme	Irregular	Elevada	Ondulado	Membranosa	Escaso	Crema	Pardo
128	R-5_232	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Pardo
129	R-5 233_2	IRD	Filamentosa	Irregular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
130	R-5_312	PC	Filamentosa	Circular	Pulvinada	Ondulado	Algodonosa	Escaso	Centro marrón, borde blanco	Pardo
131	R-5 322_1	PC	Filamentosa	Irregular	Plana	Lobulado	Aterciopelada	Escaso	Centro marrón, borde blanco	Pardo
132	R-5 332_2	PC	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada y con pliegues	Escaso	Verde	Pardo

Continuación...

133	R-5_333	IRD	Filamentosa	Irregular	Umbonada	Ondulado	Aterciopelada y con pliegues	Escaso	Verde	Crema
134	R-5_422	PC	Filamentosa	Irregular	Plana	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro marrón, borde blanco	Pardo
135	R-5_533_1	IRD	Filamentosa	Irregular	Pulvinada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Centro naranja, borde blanco	Pardo
136	R-6_112	PC	Filamentosa	Puntiforme	Convexa	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Centro ligeramente verde, borde blanco	Pardo
137	R-6_132	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Centro verde, borde blanco	Pardo
138	R-6_233	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Filamentoso	Algodonosa	Moderado	Blanco	Pardo
139	R-6_312_1	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Ondulado	Aterciopelada	Escaso	Blanco	Pardo
140	R-6_312_2	PC	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Algodonosa	Escaso	Blanco	Pardo
141	Ra-3_713	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Pulverulenta/Aterciopelada	Moderado	Centro negro, borde blanco	Pardo
142	Ra-3_723	IRD	Filamentosa	Irregular	Convexa	Erosionado	Pulverulento	Moderado	Centro negro, borde blanco	Negro-pardo
143	Ra-5_222	PC	Filamentosa	Circular	Elevada	Erosionado	Aterciopelada	Escaso	Gris-negro	Negro


Anexo 6: Prueba de antagonismo de aislados fúngicos contra *Fusarium oxysporum*

Nº	Cepa	Inhibición (%)	Nº	Cepa	Inhibición (%)
1	R-3_112_2	-	35	R-3_323_1	-
2	R-3_112_3	-	36	R-3_323_3	-
3	R-3_112_4	-	37	R-3_323	-
4	R-3_112_8	-	38	R-3_333_2	-
5	R-3_122_4	-	39	R-3_333_3	-
6	R-3_122_5	-	40	R-3_333_5	60.0
7	R-3_123	-	41	R-3_412_2	-
8	R-3_123_1	-	42	R-3_412_3	-
9	R-3_132	-	43	R-3_413_11	57.1
10	R-3_132_1	-	44	R-3_413_5	-
11	R-3_132_2	-	45	R-3_413_6	-
12	R-3_133_1	-	46	R-3_413_9	-
13	R-3_133_6	-	47	R-3_413_1	46.1
14	R-3_133	-	48	R-3_413_2	-
15	R-3_212_3	-	49	R-3_422	-
16	R-3_212_5	-	50	R-3_422_3	-
17	R-3_212_6	-	51	R-3_423_14	-
18	R-3_213	-	52	R-3_423_3	-
19	R-3_222_1	-	53	R-3_423_9	-
20	R-3_222_2	-	54	R-3_432	-
21	R-3_222_5	-	55	R-3_433_2	-
22	R-3_223_1	-	56	R-3_512_1	-
23	R-3_223_10	-	57	R-3_512_2	-
24	R-3_223_2	-	58	R-3_513_2	-
25	R-3_223_3	-	59	R-3_522_4	-
26	R-3_223_9	-	60	R-3_523_1	-
27	R-3_232_1	-	61	R-3_523_3	-
28	R-3_232_2	-	62	R-3_523_5	-
29	R-3_232_3	-	63	R-3_532_2	-
30	R-3_233_2	-	64	R-3_532_7	-
31	R-3_312_4	-	65	R-3_533_7	-
32	R-3_313_4	-	66	R-3_533_9	-
33	R-3_313_1	-	67	R-4_112_2	-
34	R-3_313	-	68	R-4_112_3	-


Continuación...

N°	Cepa	Inhibición (%)	N°	Cepa	Inhibición (%)
69	R-4_113_1	-	107	R-4_433_5	-
70	R-4_113_2	-	108	R-4_433_6	-
71	R-4_113_3	-	109	R-4_433_7	-
72	R-4_113_4	-	110	R-4_433_8	-
73	R-4_113_5	-	111	R-4_433_9	-
74	R-4_113_6	-	112	R-4_433_14	-
75	R-4_113_7	-	113	R-4_512_1	-
76	R-4_122_1	-	114	R-4_522_1	-
77	R-4_132_2	-	115	R-4_522_2	-
78	R-4_133	-	116	R-4_523_1	-
79	R-4_212_1	-	117	R-4_523_2	-
80	R-4_212_2	-	118	R-4_523_3	-
81	R-4_213_3	-	119	R-4_523_4	-
82	R-4_223_1	-	120	R-4_523_5	-
83	R-4_223_2	-	121	R-4_533	-
84	R-4_223_3	-	122	R-5_122	-
85	R-4_223_5	-	123	R-5_122_1	-
86	R-4_223_7	-	124	R-5_122_2	-
87	R-4_233_1	-	125	R-5_212_1	-
88	R-4_233_2	-	126	R-5_223_1	-
89	R-4_312	-	127	R-5_223_2	-
90	R-4_313_1	-	128	R-5_232	-
91	R-4_313_2	-	129	R-5_233_2	-
92	R-4_313_4	-	130	R-5_312	-
93	R-4_313_5	-	131	R-5_322_1	70.0
94	R-4_322_1	-	132	R-5_332_2	-
95	R-4_323_2	-	133	R-5_333	-
96	R-4_332	64.0	134	R-5_422	74.0
97	R-4_333_1	-	135	R-5_533_1	-
98	R-4_333_2	-	136	R-6_112	-
99	R-4_412	61.0	137	R-6_132	-
100	R-4_413_1	-	138	R-6_233	-
101	R-4_413_2	-	139	R-6_312_1	-
102	R-4_413	-	140	R-6_312_2	-
103	R-4_422	57.1	141	Ra-3_713	-
104	R-4_423_1	-	142	Ra-3_723	-
105	R-4_423	38.5	143	Ra-5_222	-
106	R-4_433_1	-			

Anexo 7: Identificación microscópica de cepa fúngica 96



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA



Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe

La Molina, 03 de agosto de 2017

FI-AF 294-2017 LAC 046

JFT 289

Sra.

Dra. PATRICIA MORENO DIAZ DE SACO

Facultad de Ciencias UNALM

Lima

Presente.

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de una muestra de colonia de *Penicillium* aislado de suelo, procedente del Programa de Cereales UNALM, es el siguiente:

1. MÉTODO

Repique de la colonia de *Penicillium sp.* a medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa Agar), Agar Jugo V-8 (V-8) para obtención de colonias puras a 24°C. Examen macroscópico para caracterización de las colonias y examen microscópico para determinación de las características morfométricas de las estructuras fungosas formadas. Utilización de la bibliografía correspondiente para la identificación de la especie.

2. RESULTADOS

Después de 7 días de incubación a 24°C las colonias tuvieron las siguientes características culturales y morfológicas: En medio PDA forman colonias ligeramente hundidas, redondeadas, de color verde-azulado, y borde delgado de color blanco, con aspecto afelpado, abundante esporulación y con presencia de surcos radiales; envés de la colonia de color amarillo dorado; diámetro de la colonia igual a 13 mm. En medio V-8 las características culturales son parecidas a las formadas en medio PDA con la diferencia de que en lugar de surcos radiales se forman surcos concéntricos; diámetro de la colonia igual a 16 mm.

Hifas hialinas, septadas. Conidióforos, tabicados, hialinos, lisos, grandes de 134 μm (105 - 152) x 1.7 μm ; generalmente biverticilados a tetraverticilados. Métulas divergentes, lisas, de tamaño uniforme: 11.52 μm , (10.40 - 15.27) x 3.23 μm , en número de 3 a 5 por verticilo. Fiálides de forma ampuliformes, de tamaño uniforme: 8.31 μm (7.95 - 9.47), en número de 3 a 5 por métula. Conidias redondeadas, hialinas, abundantes de 2.37 μm (1.85 - 2.69); formando largas cadenas.

Las colonias a la madurez exudan microgotas de color amarillento. No forman esclerotes, ni cleistotecios.

Según las características observadas se ha determinado la siguiente especie:

Penicillium citrinum Thom. (1910)

3. REFERENCIAS

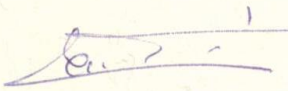
- Samson, R.A.; J. C. Frisvad; and O. Filtenborg. 2004. Introduction to Food – and Airborne Fungi. CBS. Utrecht, Netherland. 389 p.
- <http://www.mycobank.org>

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,

Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

LAC/hmg
c.c. Archivo


Mg. Sc. Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

135

Anexo 8. Prueba de producción de AIA para aislados bacterianos de rápido crecimiento

Nº	Aislado bacteriano	Producción de AIA	Nº	Aislado bacteriano	Producción de AIA
1	R-3_122	0	35	R-4_213_1	0
2	R-3_123_2	0	36	R-4_213_2	0
3	R-3_133	0	37	R-4_222_1	0
4	R-3_213_1	0	38	R-4_223	0
5	R-3_213_2	0	39	R-4_232	2
6	R-3_223	0	40	R-4_232_1	0
7	R-3_232_1	0	41	R-4_232_2	0
8	R-3_233_1	0	42	R-4_232_3	0
9	R-3_233_2	0	43	R-4_313	0
10	R-3_313	2	44	R-4_323	1
11	R-3_322_1	0	45	R-4_413	0
12	R-3_322_2	0	46	R-4_413_2	0
13	R-3_323	0	47	R-4_422_8	0
14	R-3_333_1	0	48	R-4_423_1	0
15	R-3_413	0	49	R-4_423_2	0
16	R-3_423	0	50	R-4_432	2
17	R-3_433	0	51	R-4_433	0
18	R-3_512	1	52	R-4_512	3
19	R-3_513	0	53	R-4_512_2	0
20	R-3_522	1	54	R-4_513	3
21	R-3_523	2	55	R-4_513_1	1
22	R-3_523_1	0	56	R-4_533_1	0
23	R-3_523_2	0	57	R-4_533_2	0
24	R-3_532	0	58	R-5_112_1	0
25	R-3_532_2	0	59	R-5_113	1
26	R-3_533	0	60	R-5_123	0
27	R-4_112_1	0	61	R-5_133	1
28	R-4_112_2	0	62	R-5_223	1
29	R-4_122	0	63	R-5_233	2
30	R-4_123	0	64	R-5_312_2	0
31	R-4_133	0	65	R-5_313	2
32	R-4_212_1	0	66	R-5_322	2
33	R-4_212_2	0	67	R-5_322_1	1
34	R-4_212_3	0	68	R-5_322_2	0

Continuación...

Nº	Aislado bacteriano	Producción de AIA	Nº	Aislado bacteriano	Producción de AIA
69	R-5_323	2	104	R-6_312_1	0
70	R-5_333_1	1	105	R-6_312_3	0
71	R-5_333_2	1	106	R-6_313	2
72	R-5_333_3	0	107	R-6_313_1	2
73	R-5_413_1	0	108	R-6_313_2	1
74	R-5_413_2	0	109	R-6_313_3	1
75	R-5_422_2	1	110	R-6_313_4	0
76	R-5_422_3	0	111	R-6_313_5	0
77	R-5_422_4	1	112	R-6_323	3
78	R-5_423_1	1	113	R-6_333	1
79	R-5_423_2	0	114	R-6_413_1	2
80	R-5_432_3	1	115	R-6_413_2	0
81	R-5_433	1	116	R-6_422	0
82	R-5_512_1	0	117	R-6_423	2
83	R-5_513	0	118	R-6_423_1	2
84	R-5_513_1	0	119	R-6_423_2	0
85	R-5_513_2	1	120	R-6_433	2
86	R-5_523	2	121	R-6_512	0
87	R-5_532	1	122	R-6_512_1	0
88	R-5_532_1	0	123	R-6_513_2	2
89	R-5_533	2	124	R-6_522_2	1
90	R-5_533_1	2	125	R-6_522_4	0
91	R-6_113	0	126	R-6_523	2
92	R-6_123	0	127	R-6_533_1	0
93	R-6_132	0	128	R-6_533_2	1
94	R-6_133_1	0	129	R-6_533_3	2
95	R-6_133_2	3	130	Ra-3_213	0
96	R-6_212	0	131	Ra-3_222	2
97	R-6_212_2	0	132	Ra-3_222_1	1
98	R-6_213	2	133	Ra-3_333	0
99	R-6_213_1	2	134	Ra-3_513	0
100	R-6_222_1	0	135	Ra-3_523_1	1
101	R-6_223_1	2	136	Ra-3_523_2	0
102	R-6_223_2	1	137	Ra-3_533_1	0
103	R-6_233	2	138	Ra-3_533_2	1

Anexo 9. Prueba de antagonismo de aislados bacterianos rápidos contra *Fusarium oxysporum*

Aislado bacteriano	Radio de crecimiento fúngico (cm)	Inhibición (%)	Aislado bacteriano	Radio de crecimiento fúngico (cm)	Inhibición (%)
Control	2.41	-	RB18	-	-
BAC15 MB	1.63	32.36	RB19	-	-
RB01	-	-	RB20	-	-
RB02	-	-	RB21	-	-
RB03	1.85	23.23	RB22	-	-
RB04	-	-	RB23	1.30	46.05
RB05	2.00	17.01	RB24	1.25	48.13
RB06	-	-	RB25	-	-
RB07	-	-	RB26	1.61	33.19
RB08	2.15	10.79	RB27	-	-
RB09	-	-	RB28	-	-
RB10	1.71	29.04	RAB01	-	-
RB11	1.22	49.37	RAB02	1.53	36.51
RB12	-	-	TB01	-	-
RB13	-	-	TB02	-	-
RB14	-	-	TB03	-	-
RB15	1.73	28.21	TB04	-	-
RB16	-	-	TB05	-	-
RB17	-	-	TB06	-	-

Anexo 10: Tinción Gram para aislados de rápido crecimiento

N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram	N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram
1	R-3_122	negativo	35	R-4_213_1	negativo
2	R-3_123_2	positivo	36	R-4_213_2	negativo
3	R-3_133	negativo	37	R-4_222_1	negativo
4	R-3_213_1	negativo	38	R-4_223	negativo
5	R-3_213_2	negativo	39	R-4_232	negativo
6	R-3_223	negativo	40	R-4_232_1	negativo
7	R-3_232_1	positivo	41	R-4_232_2	negativo
8	R-3_233_1	negativo	42	R-4_232_3	negativo
9	R-3_233_2	negativo	43	R-4_313	negativo
10	R-3_313	negativo	44	R-4_323	negativo
11	R-3_322_1	positivo	45	R-4_413	negativo
12	R-3_322_2	negativo	46	R-4_413_2	negativo
13	R-3_323	negativo	47	R-4_422_8	positivo
14	R-3_333_1	negativo	48	R-4_423_1	negativo
15	R-3_413	negativo	49	R-4_423_2	negativo
16	R-3_423	negativo	50	R-4_432	positivo
17	R-3_433	negativo	51	R-4_433	negativo
18	R-3_512	positivo	52	R-4_512	positivo
19	R-3_513	positivo	53	R-4_512_2	positivo
20	R-3_522	positivo	54	R-4_513	negativo
21	R-3_523	positivo	55	R-4_513_1	positivo
22	R-3_523_1	negativo	56	R-4_533_1	negativo
23	R-3_523_2	negativo	57	R-4_533_2	negativo
24	R-3_532	negativo	58	R-5_112_1	negativo
25	R-3_532_2	positivo	59	R-5_113	positivo
26	R-3_533	negativo	60	R-5_123	positivo
27	R-4_112_1	positivo	61	R-5_133	negativo
28	R-4_112_2	negativo	62	R-5_223	negativo
29	R-4_122	positivo	63	R-5_233	negativo
30	R-4_123	negativo	64	R-5_312_2	positivo
31	R-4_133	negativo	65	R-5_313	negativo
32	R-4_212_1	positivo	66	R-5_322	negativo
33	R-4_212_2	negativo	67	R-5_322_1	negativo
34	R-4_212_3	positivo	68	R-5_322_2	negativo

Continuación...

N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram	N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram
69	R-5_323	negativo	104	R-6_312_1	negativo
70	R-5_333_1	negativo	105	R-6_312_3	negativo
71	R-5_333_2	negativo	106	R-6_313	positivo
72	R-5_333_3	negativo	107	R-6_313_1	positivo
73	R-5_413_1	negativo	108	R-6_313_2	negativo
74	R-5_413_2	negativo	109	R-6_313_3	negativo
75	R-5_422_2	negativo	110	R-6_313_4	positivo
76	R-5_422_3	negativo	111	R-6_313_5	negativo
77	R-5_422_4	negativo	112	R-6_323	negativo
78	R-5_423_1	negativo	113	R-6_333	negativo
79	R-5_423_2	negativo	114	R-6_413_1	negativo
80	R-5_432_3	positivo	115	R-6_413_2	negativo
81	R-5_433	negativo	116	R-6_422	negativo
82	R-5_512_1	negativo	117	R-6_423	positivo
83	R-5_513	negativo	118	R-6_423_1	negativo
84	R-5_513_1	negativo	119	R-6_423_2	negativo
85	R-5_513_2	negativo	120	R-6_433	negativo
86	R-5_523	negativo	121	R-6_512	negativo
87	R-5_532	negativo	122	R-6_512_1	negativo
88	R-5_532_1	positivo	123	R-6_513_2	positivo
89	R-5_533	negativo	124	R-6_522_2	negativo
90	R-5_533_1	negativo	125	R-6_522_4	positivo
91	R-6_113	positivo	126	R-6_523	negativo
92	R-6_123	positivo	127	R-6_533_1	negativo
93	R-6_132	negativo	128	R-6_533_2	negativo
94	R-6_133_1	positivo	129	R-6_533_3	negativo
95	R-6_133_2	positivo	130	Ra-3_213	negativo
96	R-6_212	negativo	131	Ra-3_222	negativo
97	R-6_212_2	negativo	132	Ra-3_222_1	negativo
98	R-6_213	negativo	133	Ra-3_333	negativo
99	R-6_213_1	negativo	134	Ra-3_513	negativo
100	R-6_222_1	negativo	135	Ra-3_523_1	negativo
101	R-6_223_1	negativo	136	Ra-3_523_2	negativo
102	R-6_223_2	negativo	137	Ra-3_533_1	negativo
103	R-6_233	negativo	138	Ra-3_533_2	negativo

Continuación...

N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram	N°	Aislado bacteriano	Tinción Gram
139	Ra-4_213_1	negativo	165	T-3_433_1	negativo
140	Ra-4_213_2	negativo	166	T-3_433_2	negativo
141	Ra-4_222_1	negativo	167	T-3_433_3	negativo
142	Ra-4_222_3	negativo	168	T-4_323	positivo
143	Ra-4_222_2	negativo	169	T-4_413	negativo
144	Ra-4_312	positivo	170	T-4_423	negativo
145	Ra-4_523_1	negativo	171	T-4_423_1	negativo
146	Ra-4_523_2	negativo	172	T-4_433	negativo
147	Ra-5_132_1	negativo	173	T-5_122_1	negativo
148	Ra-5_132_2	positivo	174	T-5_122_2	negativo
149	Ra-5_212_2	negativo	175	T-5_223	negativo
150	Ra-5_213	negativo	176	T-5_413	negativo
151	Ra-5_223	negativo	177	T-5_413_1	negativo
152	Ra-5_313	negativo	178	T-5_423	negativo
153	Ra-5_323	negativo	179	T-5_433	negativo
154	Ra-5_323_1	negativo	180	T-5_533	negativo
155	Ra-5_423	positivo	181	T-6_113	positivo
156	Ra-6_213	positivo	182	T-6_123	negativo
157	Ra-6_222	positivo	183	T-6_413	positivo
158	Ra-6_232	negativo	184	T-6_423	negativo
159	T-3_113	negativo	185	N0_122	negativo
160	T-3_223	negativo	186	N0_413	positivo
161	T-3_233	negativo	187	N0_432	negativo
162	T-3_333	negativo	188	N0_733	positivo
163	T-3_423	negativo	189	N-1_113	positivo
164	T-3_423_1	negativo	190	N-1_133	positivo

Sombreado: Colonias seleccionadas para futuras pruebas

Anexo 11. Análisis estadístico para la prueba de germinación *in vitro*

- Variable: Porcentaje de germinación de semillas de lechuga.
- Evaluaciones: 3, 4, 5, 6 y 7 días después de la siembra.

3 días después del sembrado

Tabla ANOVA para porcentaje de germinación por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Aislado	8	8667	1083.3	2.398	0.0588 .
Residuales	18	8133	451.9		

Prueba de múltiples rangos para porcentaje de germinación por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB08	63.33	a
RB22	46.67	ab
RB01	36.67	abc
RB10	26.67	bc
Control	20.00	bc
TB01	16.67	bc
RB14	13.33	bc
TB05	13.33	bc
RB02	3.33	c

4 días después del sembrado

Tabla ANOVA para porcentaje de germinación por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Aislado	8	10963	1370.4	2.937	0.0275 *
Residuales	18	8400	466.7		

Prueba de múltiples rangos para porcentaje de germinación por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB08	70.00	a
RB22	66.67	a
TB05	50.00	ab
RB01	43.33	ab
Control	26.67	b
RB10	26.67	b
TB01	20.00	b
RB02	16.67	b
RB14	13.33	b

5 días después del sembrado

Tabla ANOVA para porcentaje de germinación por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Aislado	8	11496	1437.0	2.132	0.0869 .
Residuales	18	12133	674.1		

Prueba de múltiples rangos para porcentaje de germinación por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB22	76.67	a
RB08	73.33	a
RB01	53.33	ab
TB05	50.00	ab
RB10	43.33	ab
Control	33.33	ab
TB01	26.67	b
RB02	23.33	b
RB14	13.33	b

6 días después del sembrado

Tabla ANOVA para porcentaje de germinación por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Aislado	8	16030	2003.7	3.319	0.0164 *
Residuales	18	10867	603.7		

Prueba de múltiples rangos para porcentaje de germinación por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB08	90.00	a
RB22	80.00	a
RB01	63.33	ab
TB05	60.00	ab
RB10	50.00	abc
Control	33.33	bc
RB02	30.00	bc
TB01	26.67	bc
RB14	13.33	c

7 días después del sembrado

Tabla ANOVA para porcentaje de germinación por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Aislado	8	13763	1720.4	4.51	0.00381 **
Residuales	18	6867	381.5		

Prueba de múltiples rangos para porcentaje de germinación por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB08	90.00	a
RB22	86.67	a
TB05	73.33	a
RB01	66.67	ab
RB10	56.67	abc
Control	36.67	bc
RB02	33.33	bc
RB14	33.33	bc
TB01	30.00	c

Anexo 12. Colonias significativas para la prueba de germinación *in vitro*

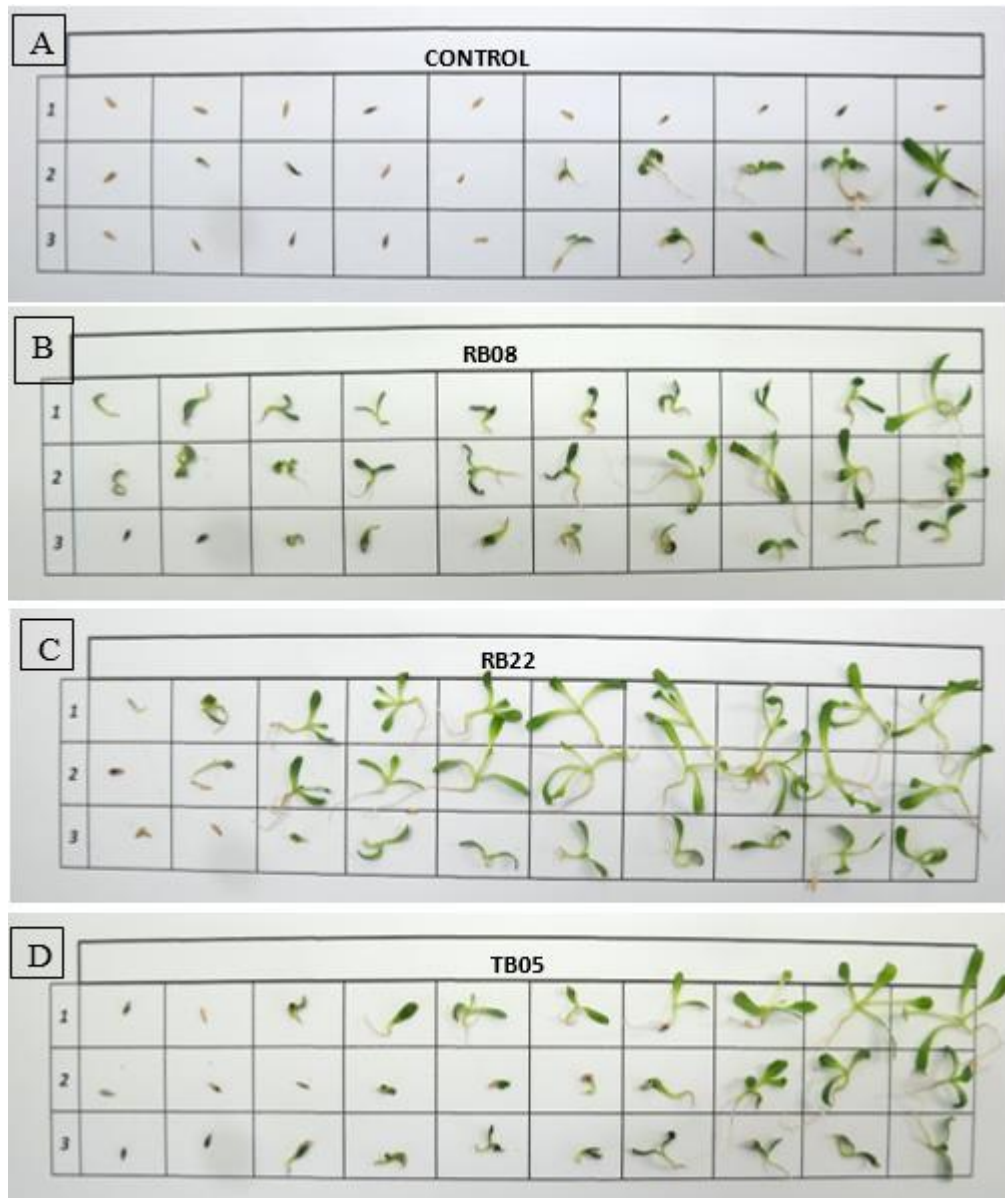


Figura. Colonias significativas en el porcentaje de germinación. (A) Cepa RB08 con 90% de germinación. (B) Cepa RB22 con 86.67% de germinación. (C) Cepa TB05 con 73.33% de germinación.

Anexo 13: Análisis estadístico para la prueba de invernadero

- Variable: Altura en centímetros de plántulas de tarwi.
- Evaluaciones: 0, 10, 17, 24, 35 y 42 días después de la siembra.

0 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	9.32	3.108	0.49	0.692
Residuales	36	228.45	6.346		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	17.45	a
RB10	17.10	a
Control	16.55	a
RB01/14	16.20	a

10 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	21.86	7.286	0.873	0.464
Residuales	36	300.29	8.341		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	28.60	a
RB10	28.30	a
RB01/14	27.10	a
Control	26.89	a

17 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	224.9	74.97	20.7	5.76e-08 **
Residuales	36	130.4	3.62		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	41.22	a
RB10	39.40	b
RB01/14	37.22	c
Control	34.89	d

24 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	177.8	59.25	2.451	0.0792 .
Residuales	36	870.4	24.18		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	56.22	a
RB10	54.40	ab
RB01/14	52.55	ab
Control	50.55	b

35 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	431	143.67	3.017	0.0424 *
Residuales	36	1714	47.62		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB01/14	78.33	a
TB05	77.22	a
RB10	74.00	ab
Control	69.88	b

42 días después del sembrado

Tabla ANOVA para altura de plántula por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	414.8	138.27	2.279	0.096
Residuales	36	2183.9	60.66		

Prueba de múltiples rangos para altura de plántula por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	83.22	a
RB01/14	82.33	ab
RB10	77.70	ab
Control	75.44	b

- Variable: Longitud de inflorescencia en milímetros.
- Evaluaciones: 24 y 35 días después de la siembra.

24 días después del sembrado

Tabla ANOVA para longitud de inflorescencia por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	146	48.67	1.559	0.218
Residuales	32	999	31.22		

Prueba de múltiples rangos para longitud de inflorescencia por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	19.15	a
RB01/14	17.26	ab
RB10	15.45	ab
Control	13.75	b

35 días después del sembrado

Tabla ANOVA para longitud de inflorescencia por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	2030	676.7	1.176	0.334
Residuales	32	18420	575.6		

Prueba de múltiples rangos para longitud de inflorescencia por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
RB01/14	61.68	a
RB10	58.19	a
TB05	53.49	a
Control	41.77	a

- Variable: Peso fresco en gramos de plántulas de tarwi.
- Evaluación: 42 días después de la siembra.

42 días después del sembrado

Tabla ANOVA para peso fresco por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	868	289.3	1.621	0.204
Residuales	32	5712	178.5		

Prueba de múltiples rangos para peso fresco por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	51.52	a
Control	40.45	a
RB01/14	40.25	a
RB10	39.87	a

- Variable: Peso seco en gramos de plántulas de tarwi.
- Evaluación: 42 días después de la siembra.

42 días después del sembrado

Tabla ANOVA para peso seco por tratamiento

	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Inóculo	3	19.63	6.543	1.354	0.275
Residuales	32	154.68	4.834		

Prueba de múltiples rangos para peso seco por tratamiento ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
TB05	8.14	a
Control	6.85	a
RB01/14	6.41	a
RB10	6.27	a

Anexo 14. Regresión lineal para patrón de cloruro de amonio en la prueba de fijación de nitrógeno

- *Supuesto de normalidad de errores*

Shapiro-wilk normality test

data: RI
w = 0.85305, p-value = **0.1666**

Los residuales están distribuidos con normalidad porque el p-value es menor que 0.05.

- *Hipótesis de coeficientes*

Hipótesis planteada: La pendiente es igual a cero

Hipótesis alterna: La pendiente es diferente de cero

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.034190	0.035900	0.952	0.395
x1	0.242129	0.005929	40.840	2.15e-06 ***

Residual standard error: 0.0496 on 4 degrees of freedom
Multiple R-squared: **0.9976**, Adjusted R-squared: 0.997
F-statistic: 1668 on 1 and 4 DF, p-value: **2.148e-06**

- *Hipótesis de ANOVA:*

Hipótesis planteada: La variable independiente es igual a cero

Hipótesis alterna: La variable independiente es diferente de cero

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
x1	1	4.104	4.104	1668	2.15e-06 ***
Residuals	4	0.010	0.002		

Se rechaza la hipótesis planteada porque el p-value es menor que 0.05, por ende la variable independiente es significativa en el modelo.

- *Ecuación de regresión lineal*

```
RegModel.1$coefficients
(Intercept)      x1
0.03419048  0.24212857
```

$$Y=0.242*X + 0.034$$