# Universidad Nacional de Loja

**Área Agropecuaria y los Recursos Naturales Renovables**

**INGENIERÍA AGRONÓMICA**

# "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS Y SU EFECTO EN INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*). var. Bolona".

**Tesis previa a la obtención del**
**Título de Ingeniero Agrónomo**


**AUTOR**

*Tito Xavier Álvarez Rodríguez*

**DIRECTOR**

*Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.*


Loja-Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN

Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

# Certifica:

Que el señor **Tito Xavier Álvarez Rodríguez**, egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional de Loja, realizó el presente trabajo investigativo titulado **"CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS Y SU EFECTO EN INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*). var. Bolona".** Bajo mi dirección, la misma que ha sido debidamente revisado y hecho las correcciones pertinentes, cumpliendo con todas las normas reglamentarias vigentes y dentro del cronograma establecido, por lo que autorizo su presentación.

Loja, Octubre de 2015

**Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.**
**DIRECTOR DE TESIS**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVALBES**
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TESIS**

## "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS Y SU EFECTO EN INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*). var. Bolona".

**Presentada al Tribunal Calificador como requisito para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo.**

**APROBADA:**

**Ing. Gilberto Álvarez Cajas**
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL** ----------

**Ing. Bolívar Cueva Cueva**
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL** ----------

**Ing. Max Encalada Córdova**
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL** ----------

## AUTORÍA

Yo, Tito Xavier Álvarez Rodríguez, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual.

**Autor:** Tito Xavier Álvarez Rodríguez

**Firma:** _____

**Cedula:** 1104925340

**Fecha:** Loja, Noviembre de 2015

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRONICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo, Tito Xavier Álvarez Rodríguez, declaro ser autor de la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS Y SU EFECTO EN INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*). var. Bolona"**, como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo, autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera del registro digital institucional (RDI):

Los usuarios pueden acceder al contenido de este trabajo en RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan convenio con la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para la constancia de esta autorización en la ciudad de Loja a los 13 días del mes de Noviembre del dos mil quince, firman el autor.

**Firma:**
**Autor:** Tito Xavier Álvarez Rodríguez
**Cedula:** 1104925340
**Dirección:** Zapotillo, Barrio Central
**E-mail:** txavier_a@hotmail.com
**Celular:** 0969258970

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de tesis:** Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

Tribunal de Grado:

| | |
|---|---|
| Ing. Gilberto Álvarez Cajas | Presidente |
| Ing. Bolívar Cueva Cueva | Vocal |
| Ing. Max Encalada Córdova | Vocal |

## DEDICATORIA

*Dedicada a mis queridos padres Tito y Paula por su apoyo brindado durante mi vida y por ser la base fundamental para mi superación, a mis hermanos quienes siempre han estado ahí apoyándome y a mi novia Paola gracias por todo su apoyo.*

## AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme iluminado siempre mi camino.

A mis padres por todo su amor, por estar ahí en todo momento de mi vida aprendiendo juntos lo maravillo que es la vida, por sus enseñanzas valiosas y por confiar en mí, todo esto es por ustedes.

A mis hermanos para que lo tomen como ejemplo para sus hijos a si puedan seguir adelante superando todos los obstáculos de la vida.

Al Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc., mi director de tesis al Dr. Roldan Torres y al Ing. Ángel Roblez, por su invalorable apoyo durante todo el desarrollo de mi trabajo de tesis, por su paciencia y amistad tanto dentro como fuera del campo y laboratorio.

A todos mis amigos de colegio en especial la última promoción sexto FIMA como a los nuevos amigos conocidos en la vida universitaria, quienes han estado ahí apoyando de alguna u otra forma.

A mi novia Paola Hidalgo gracias por todo tu apoya y confianza, por estar siempre ahí apoyándome y dándome ánimos para cumplir con esta meta que es muy importante en mi vida.

A todas las personas que me apoyaron de alguna manera a culminar la tesis, gracias pues cada granito de arena cuenta.

# Contenido

RESUMEN ..... XI
1 INTRODUCCIÓN ..... 1
2 REVISIÓN DE LITERATURA ..... 4
2.1 ORIGEN DE LA PAPA ..... 4
2.1.1 Clasificación taxonómica ..... 4
2.1.2 Importancia de la papa ..... 5
2.1.3 Botánica de la papa (*Solanum tuberosum* L.) ..... 5
2.1.4 Características agroecológicas del cultivo de papa ..... 6
2.2 PROBLEMAS DERIVADOS DE LA APLICACIÓN IRRACIONAL DE FERTILIZANTES MINERALES ..... 6
2.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN) ..... 7
2.4 CARATERISTICAS DE LOS ORGANISMOS RIZOSFERICOS ..... 8
2.4.1 Interacciones asociativas diazotróficas ..... 8
2.4.2 Microorganismos diazotróficos simbióticos. ..... 11
2.4.3 Microorganismos diazotrófos asimbióticos. ..... 12
2.5 APLICACIÓN Y CONTRIBUCIÓN PRÁCTICA DE LOS MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ..... 14
2.5.1 Bacterias diazotróficas: principales mecanismos de acción. ..... 14
3 MATERIALES Y MÉTODOS ..... 18
3.1 DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO ..... 18
3.1.1 Ubicación Política ..... 18
3.1.2 Ubicación Geográfica ..... 19
3.1.3 Ubicación Ecológica ..... 19
3.2 MATERIALES ..... 20
3.2.1 Equipos ..... 20
3.2.2 Reactivos ..... 20
3.2.3 Materiales de laboratorio ..... 22
3.2.4 Materiales de campo ..... 22
3.3 METODOLOGÍA ..... 23
3.3.1 Metodología para el primer objetivo ..... 23
3.3.2 Metodología para el segundo objetivo ..... 25
*3.3.3* Metodología para el tercer objetivo ..... 26

3.3.4 Diseño experimental ..... 27
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 29
3.4.1 Hipótesis Estadística ..... 29
4 RESULTADOS ..... 30
4.1 CARACTERIZAR MORFOCULTURAMENTE, AISLADOS BACTERIANOS RIZOSFÉRICOS, PROCEDENTES DE SUELOS DE LOS CANTONES SARAGURO Y LOJA ..... 30
4.1.1 Caracterización morfológica de los aislados. ..... 30
4.1.2 Análisis fisiológicos de los aislados rizosféricos ..... 31
4.2 IDENTIFICAR GENÉTICAMENTE LOS AISLADOS OBTENIDOS, MEDIANTE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. ..... 32
4.3 EVALUAR EL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE AISLADOS PROMINENTES, SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y BIOMASA EN PAPA (VAR., BOLONA) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS. ..... 33
5 DISCUSIÓN ..... 39
6 CONCLUSIONES ..... 41
7 RECOMENDACIONES ..... 42
8 BIBLIOGRAFÍA ..... 43
9 ANEXOS ..... 48

**TITULO**

**“CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS Y SU EFECTO EN INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*). var. Bolona”**

**RESUMEN**

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los alimentos más importantes a nivel mundial, en el Ecuador la papa en el principal alimento de los habitantes de las zonas altas del país. Las aplicaciones de fertilizantes químicos para incrementar los rendimientos agrícolas son muy altas, que por lo general siempre terminan en el agua los cuales contaminan este líquido vital. La utilización de fertilizantes químicos no solo afecta al bolsillo de los agricultores si no también la fertilidad de los suelos.

Para ello es necesario orientar la producción agrícola utilizando métodos sostenibles y una de ella es la utilización de microorganismos fijadores de nitrógeno, los cuales pueden fijar el doble nitrógeno de lo que aportan los fertilizantes nitrogenados los mismos que contribuyen de una manera efectiva a la recuperación de los suelos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto en el crecimiento y promoción de biomasa radicular y foliar, de microorganismos aislados de la rizosfera de plantaciones de papa, colectadas en los cantones de Loja y Saraguro. En los dos campos muestreados se identificaron dos géneros bacterianos, *Beijerinckia y Stenotrophomonas,* para este último género se destaca la obtención de dos especies diferentes (*sp*., y *maltophila*), se realizó el experimento bajo condiciones controladas, estos aislados lograron producir ácido indol acético (AIA) pero no hubo presencia de halos de solubilización de fosfatos, también tuvieron un efecto benéfico sobre la planta de papa en cuanto a la promoción del crecimiento de la planta.

**ABSTRACT**

Potato's cultivation (Solanum tuberosum L.), it is one from the most important foods to world level, in Ecuador the potato in the main food of the inhabitants of the high areas of the country. The applications of chemical fertilizers to increase the agricultural yields are very high that in general always finish in the water which contaminate this vital liquid. The use of chemical fertilizers not alone it affects to the pocket of the farmers if not also the fertility of the floors.

For it is necessary to guide the agricultural production using sustainable methods and one of her is the use of microorganisms nitrogen fixers, which can fix nitrogen twice as much of what you/they contribute the fertilizing nitrogenados the same ones that contribute from an effective way to the recovery of the floors.

Presently work was evaluated the effect in the growth and promotion of biomass radicular and to foliate, of isolated microorganisms of the rizosfera of potato plantations, collected in the cantons of Loja and Saraguro. In the two fields muestreados two bacterial goods, Beijerinckia and Stenotrophomonas were identified, for this last gender he/she stands out the obtaining of two different species (sp., and maltophila), he/she was carried out the experiment controlled low conditions, these isolated ones were able to produce acetic (AIA) sour indol but there was not presence of halos of solubilización of phosphates, they also had a beneficent effect on potato's plant as for the promotion of the growth of the plant.

# 1 INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum)* es uno de los aportes más valiosos de los agricultores prehistóricos y como tal es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Suquilanda V, 2011, p. 1) En el Ecuador la papa es el principal alimento de los habitantes de las zonas altas del país (Pumisacho y Sherwood, 2002, p. 24). La superficie cosechada de papa en el Ecuador a nivel nacional en el año 2013 fue de 49.371 hectáreas anuales, esta superficie ha generado una producción promedio de 345.922 toneladas métricas. Mientras que a nivel de provincia de Loja se siembra una superficie de 271 hectáreas, de las cuales genera una producción de 503 toneladas métricas (ESPAC, 2013).

Los reportes de producción para la papa son satisfactorios, sin embargo, estos se ven afectados por los altos costos de producción finales que realiza el productor, sobre todo destinando grandes cantidades de recursos financieros para la compra de fertilizantes, los cuales se reportan entre $1.046 USD para producir una hectárea de papa, (SINAGAP, 2013). Las aplicaciones de fertilizantes químicos para incrementar los rendimientos agrícolas de este cultivo, terminan por lo general siempre en el agua, ya sea por vertido directo en las fuentes o por lixiviación hacia los niveles freáticos, los cuales contaminan este líquido vital, que más tarde va a ser tomado para actividades domésticas, los altos niveles de nitratos pueden alterar significativamente tanto los agroecosistemas, como la salud de quienes la consuman (Pertuz y León, 2013, p 45).

En el Carchi zona papera por excelencia es generalizado el que los agricultores calculen los volúmenes de fertilizantes utilizando relaciones de semillas por sacos de fertilizantes, para el efecto destinan 150 kg de fertilizante químico, los fertilizantes de uso más común entre los

productores de papas son: Urea 46 %, Nitrato de Amonio, 18-46-0, Muriato de Potasio, Carbonato de Calcio y Sulpomag (ESPAC, 2013).

La utilización en demasía de estos fertilizantes para suplir las necesidades de este cultivo, no solo han afectado el bolsillo de los agricultores, sino también la fertilidad de los suelos, en su componente físico como biológico, haciendo que cada campaña de siembra los productores tengan que aplicar más fertilizantes para incrementar los rendimientos agrícolas para este cultivo (SINAGAP, 2013). Lamentablemente los rendimientos que se obtienen no generan divisas interesantes para el agricultor. Frente a esta realidad es necesario buscar alternativas que contribuyan primero a disminuir el uso de fertilizantes sobre todo nitrogenados y a la par reduzcan los costos de producción por hectárea y eleven significativamente los rendimientos agrícolas.

Para ello es necesario orientar la producción agrícola utilizando métodos sostenibles y una de ella es la utilización de microorganismos fijadores de nitrógeno, los mismos que contribuyen de una manera efectiva a la recuperación de los suelos y mejoras en la producción agrícola. Por tanto una de las alternativas frente a la utilización de grandes cantidades de fertilizantes, pueden ser suplidas por microorganismos que poseen la habilidad de convertir el dinitrógeno atmosférico en amonio ($NH^{4+}$), llamados fijadores de vida libre, siendo las familias Rhizobiceae y Azotobacteriaceae las más importantes, se estima que estos microorganismos pueden fijar el doble de nitrógeno de lo que aportan los fertilizantes nitrogenados y como complemento producir fitohormonas que vayan en beneficio de la promoción de vegetal de las plantas (Graham y Vance, 2003).

Estudios similares en Ecuador y concretamente en la provincia de Loja no se han llevado a cabo, por ello en la presente investigación, se realizaron estudios de caracterización e identificación

genética de bacterias rizosféricas y validar el efecto de estos microorganismos sobre el crecimiento y promoción de biomasa radicular y foliar en papa.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, los objetivos que se cumplieron en la presente investigación fueron:

1. Caracterizar morfoculturamente, aislados bacterianos rizosféricos, procedentes de suelos de los cantones Saraguro y Loja.
2. Identificar genéticamente los aislados obtenidos, mediante herramientas de biología molecular.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de aislados prominentes, sobre parámetros morfológicos y biomasa en papa (var., bolona) bajo condiciones controladas.

# 2 REVISIÓN DE LITERATURA

## 2.1 ORIGEN DE LA PAPA

La mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.*)* cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los andes de América del Sur. La primera crónica conocida que menciona la papa fue escrita por Pedro Cieza de León en 1538. Cieza encontró tubérculos que los indígenas llamaban "papas", primero en la parte alta del valle del Cuzco, Perú y posteriormente en Quito, Ecuador. El centro de domesticación se encuentra en los alrededores del lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Existen evidencia arqueológica que prueba que varias culturas, como la Inca, la Tiahuanaco, la Nazca y la Mochica, cultivaron papa (Pumisacho y Sherwood, 2002).

### 2.1.1 Clasificación taxonómica

| | |
|---|---|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Solanales |
| Familia: | Solanáceae |
| Género: | *Solanum* |
| Especie: | *Solanum tuberosum* L. |

*Fuente:* (Reveal & Chance, 2009)

### 2.1.2 Importancia de la papa

La papa es reconocida por su importante contribución a la alimentación, la seguridad alimentaria y el desarrollo económico de los pueblos del mundo. Por ello, La Organización de Naciones Unidas (ONU), el 18 de octubre de 2007 proclamó el 2008 como el Año Internacional de la papa, buscando incrementar la conciencia internacional sobre la importancia de la papa como alimento y generación de ingresos en las naciones en desarrollo, promover la investigación y el desarrollo de los sistemas basados en papa como un medio para contribuir en el cumplimiento de los objetivos del Milenio (ONU, 2008).

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) la producción mundial de papa alcanzó 311 millones de toneladas en el 2003. Esto se refleja en más de dos mil millones de consumidores de los países en desarrollo. Se estima que América Latina produce más de 12 millones de toneladas métricas anuales de papa donde las exportaciones e importaciones regionales de papa representa más de 9% de su producción interna, con tendencia creciente (Rodrigues, 2013).

### 2.1.3 Botánica de la papa (*Solanum tuberosum* L.)

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, es una planta dicotiledónea, herbácea, anual, aunque puede ser considerada como perenne debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos. Los tubérculos, son tallos subterráneos acortados y engrosados con yemas que almacenan nutrientes y la parte comercial del cultivo, ya que sirven como producto de consumo y como semilla asexual. Presenta abundantes raíces fibrosas que alcanzan profundidades de 30 a 40 cm, que le dan buen anclaje a la planta (Meza, 2005)

Las flores pueden ser de color blanco a rosado purpura dependiendo de la variedad. El fruto es una baya, cuya forma depende también de la variedad, que produce entre 300 y 400 semillas fértiles viables. Las plantas nacidas de semilla sexual son diferentes a las producidas de tubérculo, ya que presentan una raíz principal y un solo tallo, mientras que, las originadas de tubérculos son una copia de su madre, nacen de una yema y no tiene raíz principal ni cotiledones (Guarin, *et al.*, 1998).

### 2.1.4 Características agroecológicas del cultivo de papa

La papa es un cultivo que se adapta a regiones templadas o subtropicales con estación fresca; regiones áridas y semiáridas con riego; regiones subhúmedas cálidas, templadas y frías. Presentan un ciclo vegetativo de 3-4 meses en las variedades tempranas, 4-5 meses variedades intermedias y 5-6 meses las variedades tardías. La papa se desarrolla hasta los 3000 msnm pero algunos genotipos se adaptan mejor a ciertas altitudes, se recomienda su cultivo en zonas altas, de preferencia arriba de 1400 msnm, donde haya una temperatura promedio de 18°C (FHIA, 2006). Generalmente se cultiva en época lluviosa y época seca con riego, dado que no tolera un período largo de sequía. El período crítico de requerimiento de agua es desde el inicio de la formación de los tubérculos hasta la floración, cuando se debe procurar que la disponibilidad de la humedad no descienda del 50% de la capacidad de campo (Carrillo, *et al.*, 2003).

## 2.2 PROBLEMAS DERIVADOS DE LA APLICACIÓN IRRACIONAL DE FERTILIZANTES MINERALES

Debido a que el nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento de las plantas en suelos tropicales, se ha incrementado el uso de productos de síntesis, con el ánimo de aumentar la producción agrícola. Existen reportes de $77 \times 10^6$ toneladas de nitrógeno aplicados

mundialmente como fertilizante en diversos cultivos de gran importancia agronómica (Jimenez , 2007).

El problema ambiental más importante relativo al ciclo del N, es la acumulación de nitratos en el subsuelo que, por lixiviación, pueden incorporarse a las aguas subterráneas o bien ser arrastrados hacia los cauces y reservorios superficiales (Marin, *et al.*, 2003).

El nitrógeno es uno de los principales contaminantes de las aguas subterráneas. Es conocido que las plantas aprovechan únicamente un 50% del nitrógeno aportado en el abonado, esto supone que el exceso de nitrógeno se pierde, generalmente lavado del suelo por el agua que se filtra al subsuelo, siendo arrastrado hacia los acuíferos, ríos y embalses, contaminando, por tanto, las aguas destinadas a consumo humano. De hecho, en muchos trabajos de investigación se ha concluido que el principal factor responsable de la contaminación de las aguas subterráneas por nitratos es la agricultura. En diversos estudios realizados en España se muestra que la contaminación de las aguas subterráneas por nitratos afecta a grandes zonas. Las áreas más contaminadas son, en muchos casos, aquéllas en las que se practica una agricultura intensiva, con altos aportes de fertilizantes y riego (Gonzáles, 2011).

## 2.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

La fijación de nitrógeno puede ser puramente abiótica o biológica. En la primera se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas que son arrastrados al suelo por la lluvia o amonio por el proceso industrial Haber Bosch; en tanto la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso llevado a cabo por organismos procariotas donde el $N_2$ es reducido a amonio e incorporado a la biosfera.

A pesar de la abundancia de este elemento en la atmosfera más del 70%, no es aprovechable por las plantas, las cuales se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el

suelo en cantidad insuficiente para soportar los cultivos intensivos. Por lo que supone en el aporte de nitrógeno a la planta, la FBN ha despertado gran interés lo que ha considerado objeto de intensa investigación desde su descubrimiento en 1888. Con excepción del agua, el nitrógeno generalmente es considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (Bowen y Krathy, 2010).

Hay muchas investigaciones en las cuales se ha comprobado otra forma de relación, diferente a la simbiosis, entre fijadores de nitrógeno y plantas, esta es debida a diazotrofos de vida libre y asociados a raíces. Este tipo de asociación que usualmente no exhibe modificaciones o cambios morfológicos de la planta u hospedero o interacciones genéticas específicas entre la planta y la bacteria tales como se observan en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno que viven en la rizosfera y sobre la superficie de las raíces utilizan los exudados, secreciones como recurso de carbono para obtener energía utilizable para su crecimiento y fijación de nitrógeno, además algunas bacterias pueden ocupar internos de las plantas (endófitas), crecer y llevar a cabo allí su actividad (Bowen y Krathy, 2010).

## 2.4 CARATERISTICAS DE LOS ORGANISMOS RIZOSFERICOS

### 2.4.1 Interacciones asociativas diazotróficas

El primer diazótrofo de vida libre fue reportado por Beijerinck en 1925 con el nombre de *Spirillum lipoferum*. Sin embargo, fue solamente cerca de medio siglo más tarde, después del descubrimiento de la asociación *Azotobacter paspali, Paspalum notatum* altamente específica y del descubrimiento de *Spirillum lipoferum* (ahora denominada *Azospirillum*) (Abdel-Lateif, *et al.*, 2012), que los científicos aumentaron su interés por las bacterias diazotróficas asociadas con plantas gramináceas. Debido al avance de los métodos de identificación de microorganismos y a la biología molecular se ha reportado que varios géneros de bacterias son capaces de incluirse

dentro de la denominación de diazótrofos asociados íntimamente (endófitos) con las plantas, incluyendo entre otros géneros; *Acetobacter, Azoarcus, Azospirillum, Azotobacter Gluconacetobacter, Beijerinckia, Burkholderia, Enterobacter, Herbaspirillum, Klebsiella, Paenibacillus y Pseudomonas* (Torres-Gutiérrez, 2008).

Los esfuerzos para determinar las proporciones de fijación del N en asociaciones naturales con las plantas han producido una amplia gama de resultados. Según James (2000), en los últimos 30 años muchos estudios de inoculaciones, unidos a las mediciones de reducción de acetileno (ARA), el equilibrio del N y los experimentos de dilución del isótopo $N^{15}$, han sido realizados con bacterias asociadas a las raíces para determinar si las bacterias proporcionan cantidades significativas de N a las plantas cultivadas.

Generalmente la urea es la fuente más conveniente de N pero menos del 50% del producto aplicado es usada por las plantas (Halvorson, *et al*, 2002). Esta baja eficiencia tiene su causa fundamentalmente en la lixiviación del $NH^{4+}$ y $NO^{3-}$, la desnitrificación y las perdidas por escapes hacia la atmósfera (Aulakh, *et al.* 2000).

Según (Bernal, *et al.* 2002) en Ecuador son pocos los resultados obtenidos mediante la utilización de microrganismos diazotróficos. La utilización de cepas nativas de *Rhizobium*, en maní, arveja, alfalfa y en soya las cuales fueron eficientes estadísticamente en fijación biológica de nitrógeno (Bernal, *et al.* 2002). En fréjol, la cepa UMR 1478 tuvo una respuesta en rendimiento de 8.554,53 kg $ha^{-1}$ en peso fresco, en maní, las cepas ECUMP86 y ECUML102 fueron las que mostraron valores superiores tanto en rendimiento (kg $ha^{-1}$), como en porcentaje de nitrógeno. Así, las cepas ECUMP86 y ECUML102 rindieron 1.248,27 y 1.234,36 kg $ha^{-1}$ respectivamente versus 1.247,92 kg $ha^{-1}$ del tratamiento con nitrógeno y 1.038,43 kg $ha^{-1}$ del tratamiento testigo.

Aunque se ha demostrado la contribución de las asociaciones diazotróficas en varios cultivos importantes, los mecanismos incluidos en la estimulación son todavía difíciles de encontrar en la

mayoría de los casos (Sun, *et al.* 2008). Se ha reportado que las bacterias endófitas pueden promover el desarrollo de la planta y eliminar las enfermedades de estas, probablemente de manera similar a como lo hacen las rizobacterias que promueven el desarrollo de la planta (PGPR) (Lugtenberg *et al.*, 2009). Martinez-Viveros, *et al.* (2010) reportan que las PGPR realizan la promoción del desarrollo de las plantas mediante la producción de auxinas, citoquininas y giberelinas.

Estos reguladores de crecimiento (PGRs) son sustancias orgánicas que influyen en los procesos fisiológicos de las plantas en concentraciones extremadamente bajas. Debido a que la concentración de señales hormonales es crítica para la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, los cambios locales de los niveles de fitohormonas pueden conducir a cambios característicos en el crecimiento y desarrollo vegetal (Torres-Gutiérrez, 2008). Entre las fitohormonas, la mayor atención se le ha brindado a la producción de auxina (AIA), ya que varias bacterias asociadas a plantas tienen la capacidad de producir esta y a la vez diseminar esta sustancia en el suelo (Lambrecht, *et al.* 2000). Se ha estimado que el 80 % de las bacterias aisladas de la rizósfera pueden producir AIA como regulador de crecimiento de las plantas (Patten y Glick, 1996). Con frecuencia se ha postulado la solubilización del fósforo como un posible mecanismo de promoción del crecimiento de la planta mediante PGPR (Trivedi & Pandey, 2007). Son pocos los experimentos realizados con diazótrofos que solubilizan el fósforo y los resultados obtenidos son muy diversos y varían de acuerdo con las especies de la planta o la bacteria. Sin embargo, se ha demostrado que un significativo incremento del tamaño de la planta después de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* está relacionado con el incremento de la solubilización del fósforo y su absorción (Hayat, *et al.*, 2012).

### 2.4.2 Microorganismos diazotróficos simbióticos.

Las bacterias diazotróficas simbióticas son aquellas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas (guisantes, judías, tréboles, alfalfa, entre otras). Estas raíces poseen pequeños engrosamientos llamados nódulos que contienen bacteroides o rizobios, en esta alianza, la planta suministra nutrientes y protección, mientras que el rizobio proporciona a la planta nitrógeno fijado de la atmósfera (Espin, 2002).

Se han descrito 40 especies en 9 géneros de bacterias que forman nódulos en leguminosas, sin embargo, existen bacterias simbióticas que pueden colonizar otras plantas, Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* y cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium* se han encontrado en raíces de arroz (Yanii, *et al.*, 2001); *Rhizobium ettli* en raíces de maíz (Gutierrez-Zamora & Martinez-ROmero, 2001) y *Azorhizobium caulinodans* en las raíces de la oleaginosas (*Brassica napus)*; los nódulos de las raíces de aliso (*Alnus*) contienen bacterias del género *Frankia*, mientras que el pequeño helecho flotante *Azolla* contiene *Anabaena azollae* dentro de cavidades especializadas.

Una de las simbiosis más efectivas es la que se establece entre *Bradyrhizobium japonicum*-Soya, donde un 70% de la fijación de nitrógeno por la bacteria es asimilada por la planta. En Brasil se ha empleado con éxito la fertilización biológica de soya con *B. japonicum* y 0% de aporte de nitrógeno como fertilizante químico, ello ha conducido a que este país sea el segundo productor de soya a nivel mundial (Baldani, *et al.*, 1986).

La simbiosis *Rhizobium*-Leguminosas es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta (Singlenton, 2004). La formación del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos participantes de la interacción; sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizadas por los genes de nodulación del

microsimbionte (genes *nod*), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide (Baca, *et al*., 2000).

### 2.4.3 Microorganismos diazotrófos asimbióticos.

Las bacterias diazótrofas asimbióticas son aquellas que pueden fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas, ya que estas poseen diferentes estrategias para proteger el complejo *nitrogenesa*. Estas bacterias se encuentran prácticamente en todos los hábitats: suelo, mar, fuentes de agua dulce y sedimentos. Entre los principales géneros bacterianos que se hallan en vida libre o endófitos asociados a la rizosfera se encuentran: *Azotobacter* spp., *Azotococcus* spp., *Azospirillum* spp., *Beijerinckia* spp., *Azotomonas* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Chromatium* spp., *Chlorobium* spp., *Desulfovibrio* spp., *Desulfomonas spp.*, *Gluconacetobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Klebsiella* spp. (Rodriguez, *et al.*, 2003).

Entre las bacterias diazótrofas asimbióticas utilizadas como biofertilizantes una de las más importantes es *Azotobacter spp*, la importancia agronómica de esta radica especialmente en la capacidad de producir antibióticos, sustancias estimulantes del crecimiento vegetal (SPCV) del tipo auxinas, giberelinas y citoquininas (Pandey & Kumar, 1990); además de la fijación de nitrógeno, producción de vitaminas, pigmentos, (Pandey, *et al.*, 1998) aminoácidos y otras moléculas con actividad biológica de interés industrial y comercial como polisacáridos (Cuesta, *et al.*, 2006) (Sabra, *et al.*, 2001). CORPOICA produce biofertilizantes a base de *A. chroococcum* (Monibac), su forma de presentación es líquida, su concentración es de $10^7$ UFC $g^{-1}$ y ha sido utilizado en cultivos de algodón, tomate y ají (Corpoica, 2007).

#### *2.4.3.1 Género Beijerinckia*

Según Albanesi, *et al.*, (2014) las bacterias del género *Beijerinckia*, son las homólogas tropicales de *Azotobacter*. Son bastones provistos de glóbulos lipídicos polares de menor tamaño que *Azotobacter*. Las especies de este género son: *B.índica, B.movilis B. fluminensis* y *B. derxii*. El rendimiento de fijación de *Beijerinckia* es de 1,2 %, pero la velocidad de fijación es más lenta que *Azotobacter*. Usan carbono orgánico como elemento energético y plástico, no usan ácidos orgánicos, se desarrollan con pH de 6,2. Son mesófilos pero resisten temperaturas de hasta 60°C. Se los encuentra en suelos tropicales. No requieren calcio, pero sí hierro.

Cuenta con cinco especies descritas: *Beijerinckia indica* (Starkey y De, 1939), *Beijerinckia mobilis* (Derx, 1950), *Beijerinckia derxii* (Tchan, 1957), *Beijerinckia fluminensis* (Dobereiner y Ruschel, 1958), y *Beijerinckia doebereinerae* (Oggerin, *et al.*, 2009). Uno de los primeros descubrimientos en asociaciones rizosféricas entre gramíneas y bacterias estaba con *Beijerinckia fluminensis* y caña de azúcar en suelos tropicales (Dobereiner & Ruschel, 1958).

Las especies *Beijerinckia* spp (*Beijerinckia derxii*, *Beijerinckia mobilis*, *Beijerinckia indica* y *Beijerinckia fluminensis*), son bastante tolerantes a la acidez, las bacterias son comunes en las regiones de suelos tropicales, pero también se encuentran en las regiones templadas (Dobereiner y Pedrosa, 1987).

#### *2.4.3.2 Genero Stenotrophomonas*

*Stenotrophomonas* sp, es un bacilo gramnegativo, recto o ligeramente curvado, no formador de esporas, que presenta un tamaño aproximado de 0,4-0,7 µm de ancho por 0,7- 1,8 µm de largo. Considerada como bacteria móvil, debe su movilidad a la presencia de varios flagelos polares. Aparecen como bacilos individuales o en parejas, no acumulando gránulos de poli-β-hidroxi-butirato en su interior (Lopez, 2009).

En cuanto a su hábitat, *Stenotrophomonas* sp es un organismo de localización ubicua capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos; ha sido aislado en agua, en suelo, en la rizosfera de diferentes vegetales (algodón, cítricos, maíz, trigo), en animales y en alimentos (cerdos, huevos, leche y pescados congelados) (Lopez, 2009).

## 2.5 APLICACIÓN Y CONTRIBUCIÓN PRÁCTICA DE LOS MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

### 2.5.1 Bacterias diazotróficas: principales mecanismos de acción.

Las bacterias diazotróficas están representadas por diversos grupos filogenéticos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pueden vivir libres en diversos ecosistemas, establecer simbiosis o estar asociadas a las plantas (Sousa Moreira, *et al.*, 2010). Se ubican en diferentes géneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* y *Serratia* (Pedrosa , *et al.*, 2010).

Las bacterias diazotróficas, además del aporte de nitrógeno que hacen a través de la Fijación Biológica (FBN), pueden promover de forma directa el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción (Barrios y Perez, 2005). Estos efectos directos se evidencian en ausencia de otros microorganismos, es decir, en la interacción planta-microorganismo, e incluyen la solubilización de minerales y la síntesis de fitohormonas. Su influencia en la absorción de elementos minerales, debido a incrementos en los flujos iónicos de la superficie de las raíces (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2010). Los mecanismos indirectos se ponen de manifiesto cuando ocurre la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno, provocando la disminución de los efectos dañinos de este último sobre la planta (Acebo-Guerrero, *et al.*, 2011).

#### *2.5.1.1 Aporte de nitrógeno a la planta*

La FBN realizada por las células procariotas, es el proceso mediante el cual, parte del nitrógeno atmosférico se incorpora a la materia viva y constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno al ecosistema del suelo, siendo devuelto a la atmósfera principalmente, por la acción de organismos del suelo descomponedores de la materia orgánica (Hernandez-Rodriguez, *et al*, 2014). Diversos estudios revelaron que los organismos diazotróficos colonizan sus hospedantes, contribuyendo con cantidades sustanciales de nitrógeno fijado biológicamente (De Souza-Moreira, *et al.*, 2010).

Según Baldani, *et al.*, (1986). Inocularon plantas de arroz con cepas de *Herbaspirillum seropedicae* y *Burkholderia* spp., en condiciones in vitro, logrando aportes de nitrógeno a la planta entre 31 y 54%. Asimismo, (Kennedy, *et al.*, 1901) señalaron que algunas especies de *Herbaspirillum* aportaron a la planta de arroz del 19 al 54% del nitrógeno requerido para su crecimiento y desarrollo, en dependencia del cultivar. En bioensayos in vitro desarrollados en EMBRAPA Agrobiología, utilizando sulfato de amonio, se demostró que las cepas autóctonas cubanas *Pseudomonas* spp., tuvieron la capacidad de llevar a cabo la FBN, con contribuciones de nitrógeno a la planta de entre 28 y 33%.

#### *2.5.1.2 Incremento de la disponibilidad de fósforo en el suelo*

Las bacterias diazotróficas realizan la solubilización de fosfatos orgánicos, mediante un proceso catalizado por enzimas y la de fosfato inorgánico, a través de la producción de ácidos orgánicos. La liberación de ácidos orgánicos por las bacterias provoca disminución del pH en el medio, lo que facilita la liberación de fósforo inmovilizado, mediante la sustitución y excreción de $H^+$ o la liberación de iones $Ca^{2+}$ (Khan, *et al.*, 2009). Otro mecanismo está relacionado con la formación

de complejos estables que permiten la liberación de los grupos fosfatos. Estos complejos se forman debido a la alta afinidad que tienen los aniones carboxílicos de los ácidos orgánicos liberados por las bacterias, por el calcio y otros iones metálicos, como el hierro y el aluminio, presentes en los fosfatos minerales (Khan, *et al.*, 2007).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato están presentes en formas y poblaciones variadas en los diferentes suelos, e incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Entre toda la población microbiana del suelo, estas constituyen del 1 al 50% y la mayor proporción se concentra en la rizosfera. Sin embargo, se ha demostrado que no todas las bacterias que forman halos de solubilización, son verdaderas solubilizadoras de fósforo en condiciones de campo (Bashan, *et al.*, 2013).

Según Bashan, *e al.*, (2013), señalaron que para comprobar que un microorganismo solubiliza fosfato, después de la determinación de la formación de halo en medio sólido con fuentes de fósforo orgánico e inorgánico, se debe cuantificar el fósforo soluble en medio líquido y posteriormente determinar la producción de ácidos, entre ellos, ácido oxálico, fumárico y cítrico. Además, se debe determinar la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfatos orgánicos vía enzimática. La nueva metodología de selección de estas bacterias debe incluir, bioensayos in vivo e in situ que permitan determinar el aporte de fósforo a la planta y la contribución de este mecanismo a la estimulación del crecimiento vegetal (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2014).

#### *2.5.1.3 Producción de fitohormonas y reguladores del crecimiento vegetal*

La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar en gran parte los efectos positivos de las bacterias diazotróficas en el crecimiento vegetal. Al incrementarse el número de pelos radicales y raíces laterales, existe mayor absorción de agua y nutrientes por la planta y un mayor intercambio con el ambiente de la rizosfera, lo que contribuye a incrementos en el rendimiento del cultivo (Hernandez-Rodriguez,

*et al.*, 2010). La fitoestimulación está dada particularmente por la compleja y balanceada red de hormonas de plantas o compuestos similares, que influyen directamente en el crecimiento o estimulan la formación de raíces. Por ejemplo, muchas especies de *Azospirillum* producen auxinas, citoquininas y giberelinas que estimulan el desarrollo del sistema radicular, lo que provoca incrementos en los rendimientos agrícolas. La producción bacteriana de ácido indól acético (AIA) fue estudiada no solo por su efecto fisiológico en las plantas, sino también por la función que pueda desempeñar esta fitohormona en la interacción planta microorganismo (Rojas , *et al.*, 2011).

# 3 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el sector los Molinos de la Estación Experimental "La Argelia" y en el laboratorio del Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, en el periodo comprendido de noviembre del 2014 a mayo del 2015, y es parte del proyecto **"POTENCIACIÓN DE INOCULANTES BIOLÓGICOS NATIVOS PARA LEGUMINOSAS, GRAMÍNEAS Y SOLANÁCEAS A PARTIR DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES"**, la misma que se encuentra enmarcada dentro del Programa de Investigaciones de la Universidad Nacional de Loja, denominado "Biodiversidad de plantas, animales y microorganismos promisorios".

## 3.1 DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

### 3.1.1 Ubicación Política

Este trabajo se llevó a cabo en dos sectores: en el sector uno: La fase de campo se desarrolló en el sector de los Molinos de la Estación Experimental "La Argelia", donde se evaluó el efecto de aislados *rizosféricos* sobre parámetros morfológicos y biomasa en el cultivo de papa y en el sector dos: la fase de laboratorio se desarrolló en el Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, donde se realizó la identificación morfocultural y genética de los aislados obtenidos.

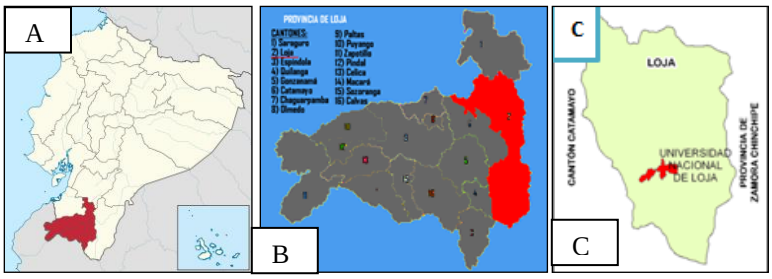



**Figura 1.** Mapa de ubicación del área de estudio. **A** Contexto de la República del Ecuador. **B.** Contexto de la Provincia de Loja. **C**. Contexto de la Universidad Nacional de Loja.

### 3.1.2 Ubicación Geográfica

El sitio del experimento fue realizado en la Quinta Experimental “La Argelia” en las siguientes coordenadas:

**Latitud (S):** 03°57´20´´

**Longitud (W):** 79°12´47´´

**Altitud:** 2 138 msnm.

El Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja presenta la siguiente ubicación geográfica:

**Latitud (S):** 03°23´35´´

**Longitud (W):** 79°11´55´´

**Altitud:** 2 138 msnm.

### 3.1.3 Ubicación Ecológica

Según la clasificación de Holdridge, citada por Ayerve & Yaguachi (2010) la zona de vida es Bosque seco Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura anual promedio de 15,62 ºC, precipitación de 812,6 mm año$^{-1}$, humedad relativa de 71,96 %; evaporación media de 111,33 mm y una velocidad máxima del viento de 5,44 m s$^{-1}$ y mínima de 3,64 m s$^{-1}$. Se ubica en el área de clima templado andino.

## 3.2 MATERIALES

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizarón para el desarrollo de la investigación, estuvieron disponibles en el Centro de Biotecnología, los cuales son recursos del Proyecto de Bioinoculantes.

### 3.2.1 Equipos

- Destilador de agua (Tipo I)
- Agitador calentador (movimiento de100-1400rpm, Temp:20°C- 300°C)
- Autoclave (MRC 50 L. Temp de 50°C-134°C)
- Flujo laminar (BIOBASE)
- Incubadora (THERMO SCIENTIFIC Temp. De 5°C-75°C)
- Incubadora giratoria (ECHNE Temp. de 5°C- 60°C)
- Balanza analítica (OHAUS 0.0001g de sensibilidad )
- Microscopio biológico óptico (OLYMPUS)
- Contador de colonias (POL-EKO diámetro contador de120 mm)
- Centrifuga
- Vortex
- Espectrofotómetro (JENWAY)

### 3.2.2 Reactivos

- Agar nutriente
- Agar bacteriológico

- Rojo congo
- Extracto de levadura
- Manitol
- Agar triptona soya
- NaCl
- Triptona peptona
- Agar Nfb
- Agar ashby-sacarosa
- Kits de extracción y purificación de ADN
- Agarosa
- Buffer TBE 1X
- Primers Universales
- Primers específicos
- Tris
- NaOH
- MgCl
- KCl.

### 3.2.3 Materiales de laboratorio

- Micropipetas 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 ul
- Puntas de micropipetas 2, 10, 20,100, 1000 ul
- Papel lumínico
- Cristalería (EllenMeyer, Matraces, Beakers).
- Cajas Petri

### 3.2.4 Materiales de campo

- Aislados rizosfericos: Z2 y Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenetrophomonas sp.*) y SL4 (*Stenetrophomonas maltophilia.*)
- Semilla de papa (variedad bolona)
- Insumos agrícolas
- Turba
- Flexómetro
- Calibrador

## 3.3 METODOLOGÍA

### 3.3.1 Metodología para el primer objetivo

***"Caracterizar morfoculturalmente, aislados bacterianos rizosféricos, procedentes de suelos de los cantones Saraguro y Loja".***

*Preparación de las muestras y aislamiento bacterianos*

Las muestras se procesaron mediante el método de siembra en placas Petri y agotamiento por estrías (Torres-Gutiérrez, 2008). Se aislaron bacterias rizosféricas asociadas al cultivo de la papa, para el efecto se colectó muestras de raíces y suelo de dicho cultivo en las localidades de Saraguro y Loja por ser las zonas de mayor producción de esta solanácea. Las muestras de raíz se esterilizaron mediante la inmersión 1 minuto en etanol 70% y 3 minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3%. Para las muestras de suelo se hicieron diluciones de hasta $10^{-7}$ y tanto los aislados obtenidos a partir de raíces y suelo se sembraron en placas de Petri con medio específico Ashby e incubando a 30 ºC durante 72 horas para observar sus características morfo-culturales.

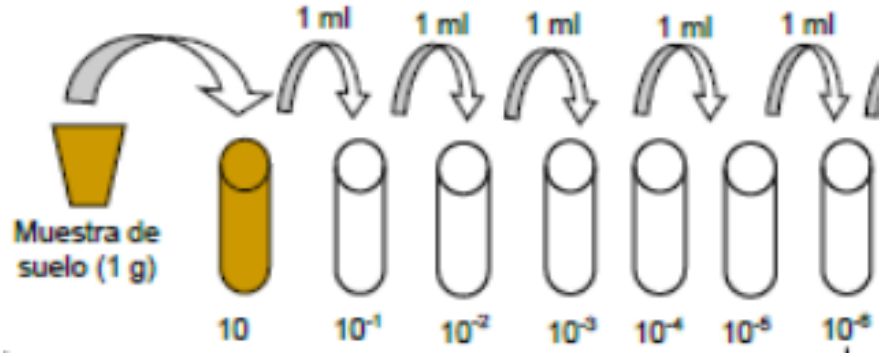



**Figura 2.** Diluciones seriadas a partir de las muestras de suelo. (Alvarez, T. 2015)

*Caracterización morfocultural de los aislados obtenidos*

Todos los aislados obtenidos mediante el proceso de aislamiento se caracterizaron morfológicamente mediante la diferenciación de las colonias respecto a: tinción al Gram, tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación de las colonias (Torres - Gutiérrez *et al.*, 2009).

*Análisis fisiológicos de los aislados*

Los análisis fisiológicos se centraron en la cuantificación de Acido-Indol-Acetico (AIA) de cada uno de los aislados. Esta determinación se realizó por método colorimétrico usándose el reactivo Salkowski (12 g $L^{-1}$ de $FeCl_3$ en 7,9 M de $H_2SO_4$) (Glickman & Dessaux, 1995). Se inocularon cada una de las cepas aisladas en medio caldo nutriente suplementado con 2,5 gr $L^{-1}$ de triptófano durante 24 y 48 h a una temperatura de 30°C. Se tomó 1 ml, del cultivo crecido y se transfirió a microtubos de 1,5 ml, y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, luego se tomó 0,5 ml del sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 0,5 ml de reactivo Salkowski, dejándose a la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Luego del tiempo transcurrido, 1 ml de la solución mesclada se trasfirió a microcubetas del espectrofotómetro para medir la absorbancia a 530 nm. Para la determinación de las cantidades de AIA producido se realizó curvas de estandarización, en las que se planteó diferentes diluciones de AIA sintético.

Para verificar la capacidad de los aislados obtenidos de solubilizar fosfatos inorgánicos, estas se inocularon por el método de punteado en medio de cultivo Pikovskaya (Nopparat, *et al.*, 2009), se incubaron por el lapso de 48 horas para luego del tiempo transcurrido observar la presencia o no del halo translucido alrededor de la colina crecida.

### 3.3.2 Metodología para el segundo objetivo

***"Identificar genéticamente los aislados obtenidos, mediante herramientas de biología molecular".***

La identificación genética de los aislados rizosféricos se llevaron a cabo mediante las técnicas de biología molecular 16S ADNr, específicamente el aislamiento de los genes de la región 16S ARNr. Esta técnica se basa en el aislamiento del ADN de las colonias, amplificación de los genes de la región 16S ARNr y purificación del producto de amplificación, reacción de secuenciación y la secuenciación de estos genes (Borda-Molina, *et al.*, 2009).

*Extracción de ADN genómico*

El aislamiento del ADN de las colonias aisladas se realizó utilizando el Kit de extracción de ADN (CHARGE SWITCH gDNA MINI BACTERIA KIT x 50 rxn. INVITROGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. Los genes de la región 16S ARNr se amplificaron con los primers universales: 5'TGGCTCAGAGAACGAACGCTGGCGGC' (Y1) y 5'TACCTTCTTACGACTTCACCCCAGTC' (Y3), los cuales amplificaron prácticamente toda la región (1500 pares de bases) correspondiente a los genes 16S ARNr (Borda-Molina, *et al.*, 2009). Se realizaron las siguientes secuencias de ciclos térmicos para la amplificación: con un paso inicial de desnaturalización del ADN de 93 °C por 2 min; 35 ciclos con un programa de temperatura de 93 °C por 45 seg., de desnaturalización a 62 °C por 45 seg., de anillamiento y 72 °C por 5 min de elongación; y un paso final de extensión de los cebadores a 72 °C por 5 min y finalmente reducir la temperatura a 10 ºC hasta retirar el producto de la amplificación del termociclador de PCR.

*Amplificación y purificación del ADN*

El producto de la amplificación de los genes 16S ARNr se purificó usando el kit de purificación (Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification, INVITROGEN) acorde con las instrucciones del fabricante y se analizó posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 150 ml de bufer TAE 1X) a 110 V durante 45 min. Luego de ello se enviaron a MACROGEN, EE-UU las muestras de ADN purificado para la reacción de secuenciación y posterior alineamiento de las secuencias, así como la cercanía de las mismas se llevó a cabo mediante el programa FASTA y la homología de las secuencias con las secuencias depositadas en la base de datos de nucleótidos internacional GeneBank de NCBI.

### *3.3.3* Metodología para el tercer objetivo

***"Evaluar el efecto de la inoculación de aislados prominentes, sobre parámetros morfológicos y biomasa en papa (var., bolona) bajo condiciones controladas"***

Los estudios del efecto de los aislados en papa en condiciones controladas se llevaron a cabo mediante experimentos en macetas, en la fase vegetativa del cultivo. Los experimentos en condiciones controladas se realizaron utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 10 réplicas bajo invernadero, se monitoreo la temperatura, humedad relativa, riego, incidencia de plagas y enfermedades y el sustrato a aplicar. Las macetas contuvieron 2 kg de sustrato (2:1:1 tierra, arena y turba respectivamente) (Cholota O, 2013), el cual se esterilizo previo a la siembra de las semillas e inoculación de los aislados. Los tratamientos a evaluar fueron Z2, Z3, Z8 y SL4, así como un tratamiento con fertilización mineral y un control sin fertilización y sin inoculación.

***Preparación del Inóculo***

Primero se realizó la preparación del pre-inóculo se dispuso de 10 ml de medio caldo nutriente. Los tubos se incubaron a 30 ºC durante 72 h en incubadora giratoria para contar con títulos mínimos de $10^8$ ufc $ml^{-1}$.

Al cabo del tiempo establecido se inóculo el cultivo de cada cepa crecida en 250 ml de medio especifico Ashby para obtenerse el inóculo final, el cual se incubo a 30 ºC durante 72 h en incubadora giratoria a 150 rpm, Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias se realizó el conteo de las células viables en cada uno de los aislados. Todas las cepas contaron con títulos de $10^9$ o $10^{10}$ ufc $ml^{-1}$ para la realización de la inoculación en las semillas o suelo directamente. Este último paso se realizó aplicando 2 ml del cultivo de cada uno de los aislados en las 10 réplicas en el momento de la siembra.

***Evaluaciones***

A partir de los 15 días de la siembra se evaluó la altura de la planta, número de hojas, número de tallos y grosor del tallo. Estas evaluaciones se realizaron todas las semanas cada 7 días. A los 90 días después de la siembra se evaluaron los parámetros morfológicos y biomasa total del cultivo (parte vegetativa). Para los análisis se dispusieron de 10 muestras por cada tratamiento.

### 3.3.4 Diseño experimental

El experimento se realizó utilizando un diseño experimental totalmente aleatorio con 10 réplicas para cada uno de los tratamientos bajo invernadero.

## a. Esquema del ensayo

| TRATAMIENTOS | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REPLICA | Z2 | Z3 | Z8 | SL4 | FERT | CONTROL |
| 1 | Z3(1) | Z8(3) | FERT(4) | SL4(6) | Z2(7) | CO(9) |
| 2 | FERT(1) | CO(2) | Z2(4) | Z8(6) | Z3(7) | SL4(9) |
| 3 | Z8(1) | SL4(3) | Z3(3) | CO(6) | FERT(8) | Z2(10) |
| 4 | CO(1) | FERT(3) | SL4(5) | Z2(6) | Z8(8) | Z3(9) |
| 5 | SL4(1) | Z2(2) | Z3(4) | FERT(6) | CO(8) | Z8(9) |
| 6 | Z2(1) | Z8(4) | CO(5) | Z3(6) | SL4(8) | FERT(10 |
| 7 | FERT(2) | SL4(4) | Z2(5) | Z8(7) | Z3(8) | CO(10) |
| 8 | Z3(2) | CO(3) | FERT(5) | SL4(7) | Z2(8) | Z8(10) |
| 9 | Z8(2) | Z2(3) | Z3(5) | CO(7) | FERT(9) | SL4(10) |
| 10 | SL4(2) | CO(4) | Z8(5) | FERT(7) | Z2(9) | Z3(10) |

**Figura 3.** Croquis del diseño experimental.

**Detalle del esquema:**

TRATAMIENTO 1: Z2 → Inoculación con cepa Z2

TRATAMIENTO 2: Z3 → Inoculación con cepa Z3

TRATAMIENTO 3: Z8 → Inoculación con cepa Z8

TRATAMIENTO 4: SL4 → Inoculación con cepa SL4

TRATAMIENTO 5: FERT → Fertilización con N

TRATAMIENTO 6: CONTROL → Sin Inoculación- Sin Fertilizante N.

## 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se procesaron utilizándose el paquete estadístico STATGRAPHICS® Plus ver. 5.0, mediante un análisis de varianza simple (One Way ANOVA), utilizándose la prueba de Tukey HSD.

### 3.4.1 Hipótesis Estadística

**H0:** La biomasa del cultivo de papa no difiere estadísticamente entre los tratamientos aplicados, al nivel del 5% de significancia.

**Ha:** La biomasa del cultivo de papa de al menos un tratamiento difiere estadísticamente a un nivel del 5% de significancia.

# 4 RESULTADOS

## 4.1 CARACTERIZAR MORFOCULTURAMENTE, AISLADOS BACTERIANOS RIZOSFÉRICOS, PROCEDENTES DE SUELOS DE LOS CANTONES SARAGURO Y LOJA

### 4.1.1 Caracterización morfológica de los aislados.

En la tabla1, se presenta las características morfológicas correspondientes a los aislados rizosféricos obtenidos. En todos los parámetros evaluados se evidencia homogeneidad en las características culturales, solo evidenciándose diferencias en cuanto al crecimiento con los aislados de Z2 y Z8. Todos los aislados presentan coloración opaca, mucosidad moderada, con bordes lisos, y elevación elevada, así como tinción Gram negativa, morfología con presencia de coco bacilos y presencia de capsula.

**Tabla 1.** Características morfológicas de los aislados rizosféricos.

| Aislado | Crec.[a] | Color[b] | Muc.[c] | Borde.[d] | Elevac[e] | Gram[f] | Morf.[g] | Cap.[h] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | +++ | 3 | ++ | 1 | ++ | - | CB | + |
| Z3 | ++ | 3 | ++ | 1 | ++ | - | CB | + |
| Z8 | +++ | 3 | ++ | 1 | ++ | - | CB | + |
| SL 4 | ++ | 3 | ++ | 1 | ++ | - | CB | + |

Caracterización de las colonias, a:Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante; b: Color: (1) trasparente, (2) traslucido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema; c: Mucosidad: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d: Bordes: (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado; e: Elevación: (+) plana, (++) elevado f: Gram: (-) negativo, positivo (+); g: Morfología: BC (bacilo corto), BL (bacilo largo), CB (coco-bacilo); h: Capsula: positiva (+), negativa (-); Abreviaturas de las localidades de aislamientos: Zhindar (Z2, Z3, Z8); Santiago 1 (SL4).

### 4.1.2 Análisis fisiológicos de los aislados rizosféricos

- *Producción de Ácido Indól Acético (AIA)*

Como se observa en la figura 4, el aislado procedente de Zhindar (Z8) es el que produce mayor cantidad de acido3-indol-acetico, con valores de 115.15 y 140,84 ug $ml^{-1}$ a las 24 y 48 horas respectivamente. Seguida de SL4 y Z2. Es evidente que mayor es el tiempo de crecimiento, la cantidad de AIA producida es mayor. No obstante el aislado de Z8 a las 48 horas es el único que difiere significativamente frente a los demás aislados, lo cual son aspectos positivos de las bacterias diazotróficas.

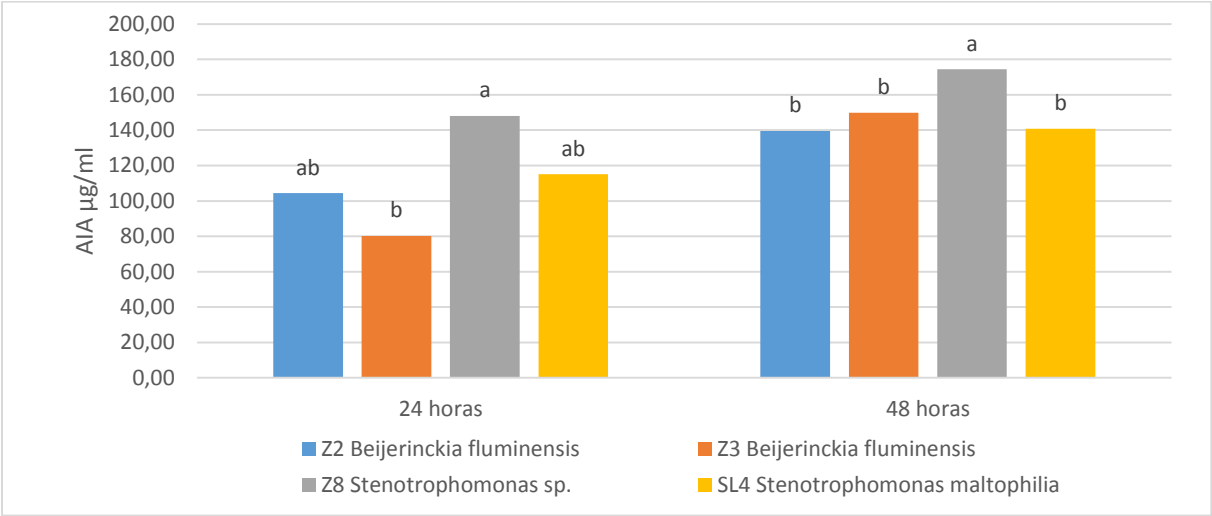



**Figura 4.** Producción de acido3-indol-acetico (AIA), de cada aislado rizosférico a las 24 y 48 horas.

- *Prueba de solubilización de Fosfatos*

En cuanto al comportamiento de las cepas con respecto al crecimiento del halo de solubilización, ninguna de los aislados fue capaz de solubilizar fosforo inorgánico, por tanto no se presenta resultados de esta evaluación.

## 4.2 IDENTIFICAR GENÉTICAMENTE LOS AISLADOS OBTENIDOS, MEDIANTE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación de los aislados rizosféricos. De un total de cuatro secuencias analizadas se identificaron dos géneros bacterianos, *Beijerinckia y Stenotrophomonas,* para este último género se destaca la obtención de dos especies diferentes (*sp*., y *maltophila*). Todas las cepas identificadas están por arriba del 98 y 99 de homología con las reportadas en la base de datos internacional GenBank.

**Tabla 3.** Identificación genética de los aislados procedentes de los cantones de Loja y Saraguro.

| Aislado | Sitio de muestreo | Organismo | Identidad de secuencia (%) | Accesión |
|---|---|---|---|---|
| Z2 | Zhindar, Saraguro | *Beijerinckia fluminensis* strain UQM 1685 | 99 | NR_116306.1 |
| Z3 | Zhindar, Saraguro | *Beijerinckia fluminensis* strain UQM 1685 | 99 | NR_116306.1 |
| Z8 | Zhindar, Saraguro | *Stenotrophomonas* sp. CV67Nov | 98 | KJ482858.1 |
| SL4 | San Lucas, Loja | *Stenotrophomonas maltophilia* st. 13637 | 99 | CP008838.1 |

## 4.3 EVALUAR EL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE AISLADOS PROMINENTES, SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y BIOMASA EN PAPA (VAR., BOLONA) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.

***Efecto de los aislados rizosféricos sobre parámetros morfológicos en papa***

La figura 5, muestra los resultados de la altura de planta de papa a los 15, 30, 60 y 90 después de la siembra (DDS). En todos los tiempos evaluados el crecimiento de las plantas se vio afectada positivamente por el aislado Z2 (*Beijerinckia fluminensis)*, el mismo que influyó significativamente en la altura de las plantas con valores promedios de 12.07 cm, 36.15 cm, 97.10 cm y 115.60 cm, presentando diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. En todos los casos el tratamiento control presentó los valores más bajos.

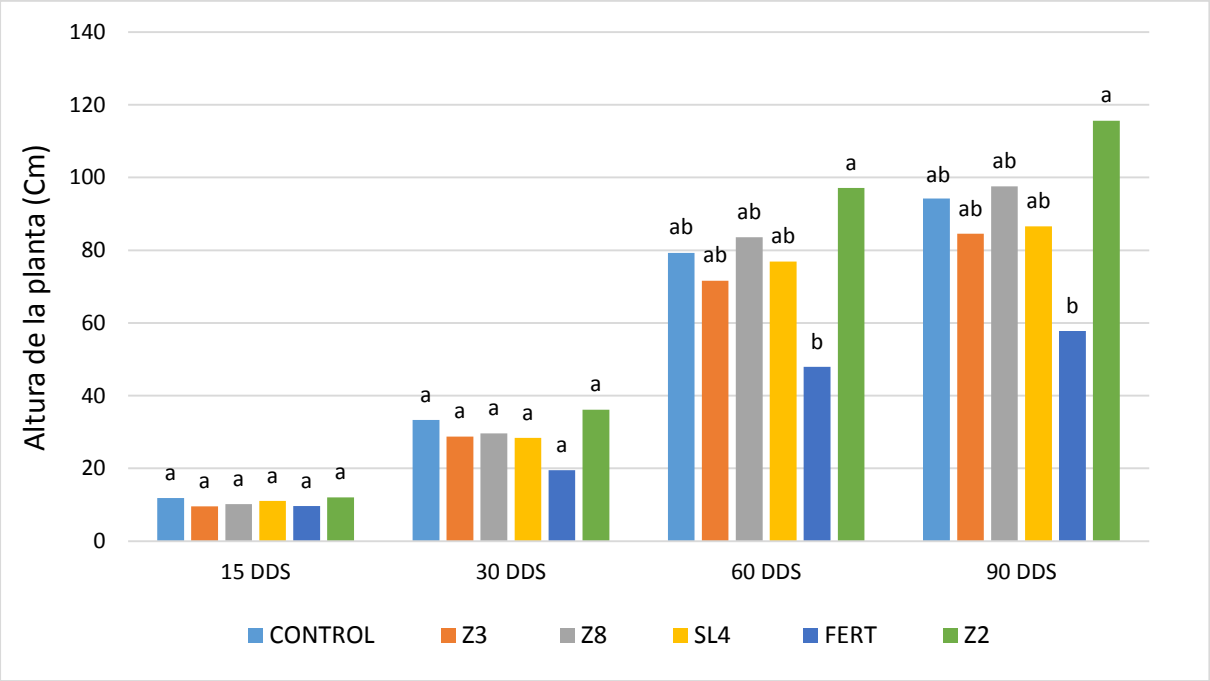



**Figura 5.** Altura de las plantas de papa a los 15, 30, 60 y 90 DDS. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), SL4 (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales sobre las barras difieren para p<0,05 Tukey.

En la figura 6, se muestran los datos obtenidos del grosor del tallo. A los 15, 30, 60 y 90 DDS se evidencia que el crecimiento en cuanto al diámetro del tallo en todos los casos analizados es homogéneo. A pesar de no haber diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos analizados y a los diferentes tiempos de evaluación. El tratamiento con la cepa Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) a los 90 DDS, es el único que presenta los valores promedio más altos con 4.94 cm de diámetro en comparación con el tratamiento control de 2.52 cm, siendo este último el de más bajos resultados.

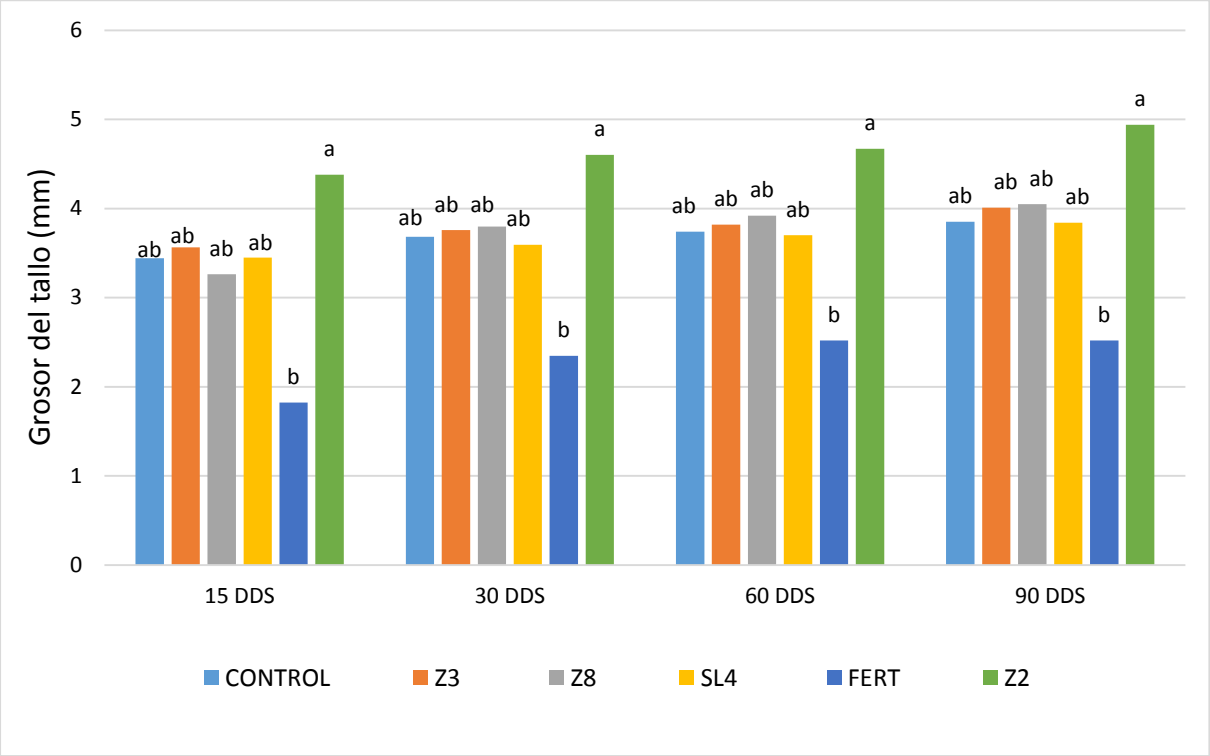



**Figura 6**. Grosor del tallo en el genotipo de papa a los 15, 30, 60 y 90 DDS. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), Santiago SL4 (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales sobre las barras difieren para p<0,05 Tukey.

La figura 7, se presentan los datos obtenidos del número de hojas en las plantas de papa, en todos los tiempos de evaluación, 15, 30, 60 y 90 DDS no se evidencia diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados. Sim embargo el tratamiento con la cepa Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) se obtienen los valores medios más altos con 10 hojas que presenta los mejores resultados.

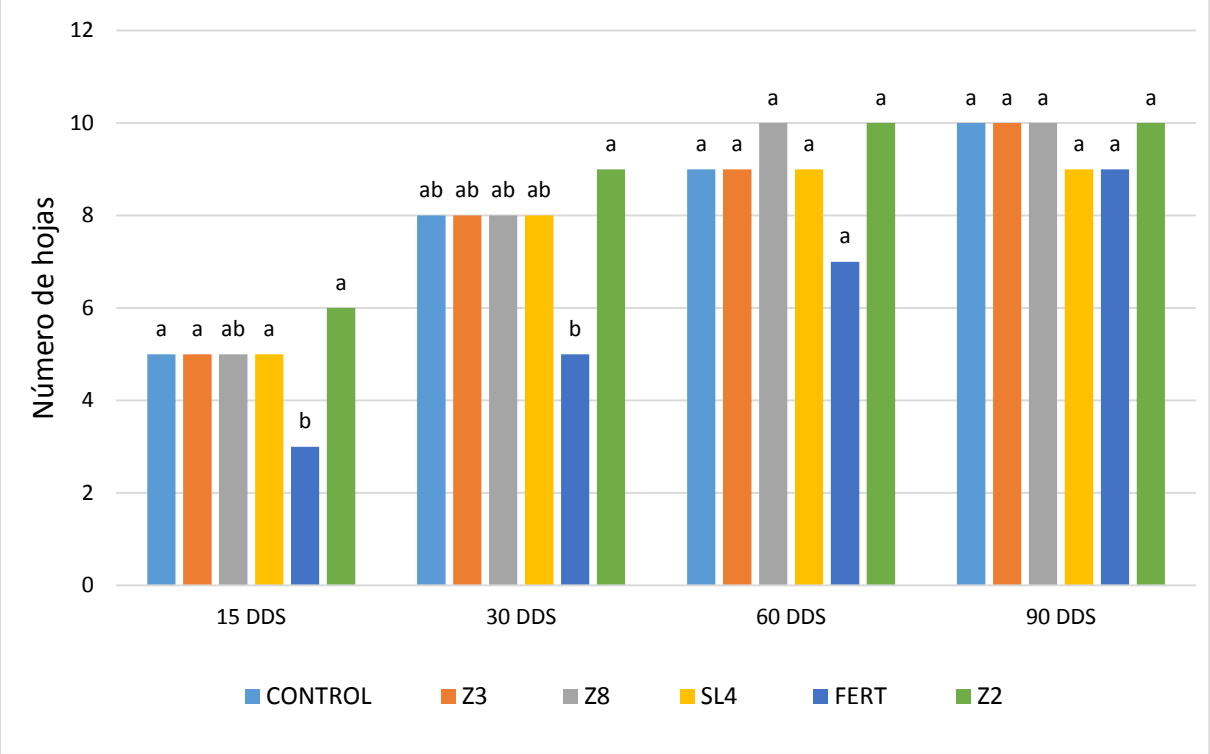



**Figura 7.** Número de hojas en el genotipo de papa a los 15, 30, 60 y 90 DDS. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), SL4 (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales sobre las barras difieren para $p<0,05$ Tukey.

En la figura 8, se presentan los datos obtenidos del número de tallos en el cultivo de papa, a los 15 DDS se observa que hay un crecimiento homogéneo en todos los tratamientos, a los 30 DDS hay homogeneidad de los tratamientos siendo los mejores el tratamiento Z8 (*Stenotrophomonas* sp.) con 3 tallos y SL4 (*Stenotrophomonas maltophilia*) con 3 tallos, en cambio el tratamiento con CONROL presenta los menores resultados con 1 tallo. A los 60 y 90 DDS el tratamiento Z8 (*Stenotrophomonas* sp.) presenta el mejor resultado con 3 tallos, el tratamiento CONTROL presenta el valor más bajo con 1 tallo y los tratamientos FERT, Z3 (*Beijerinckia fluminensis)*, SL4 (*Stenotrophomonas maltophilia*) y Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) no presentan diferencias estadísticas.

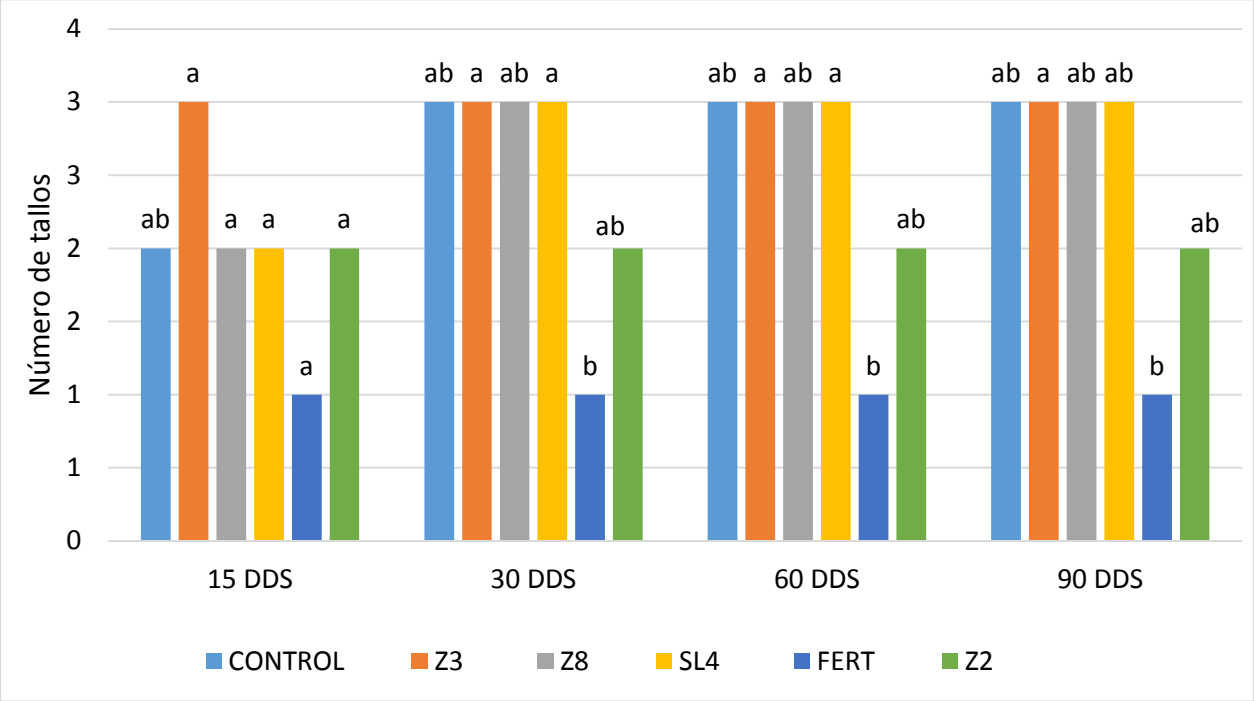
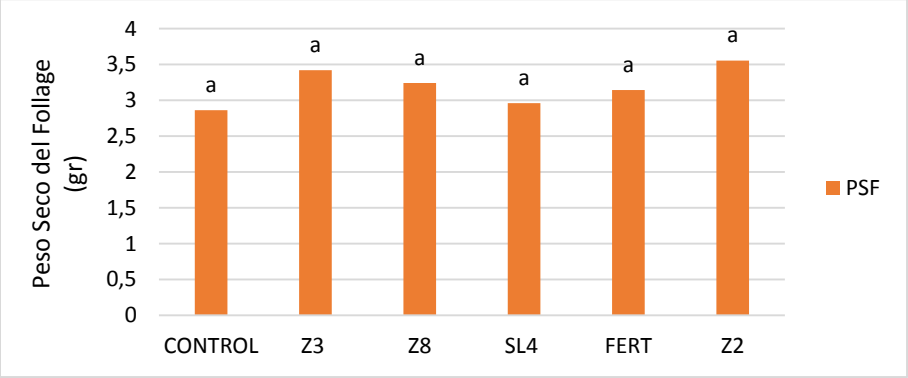



**Figura 8.** Numero de tallos en el genotipo de papa a los 15, 30, 60 y 90 DDS. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), Santiago (SL4) (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales sobre las barras difieren para p<0,05 Tukey.

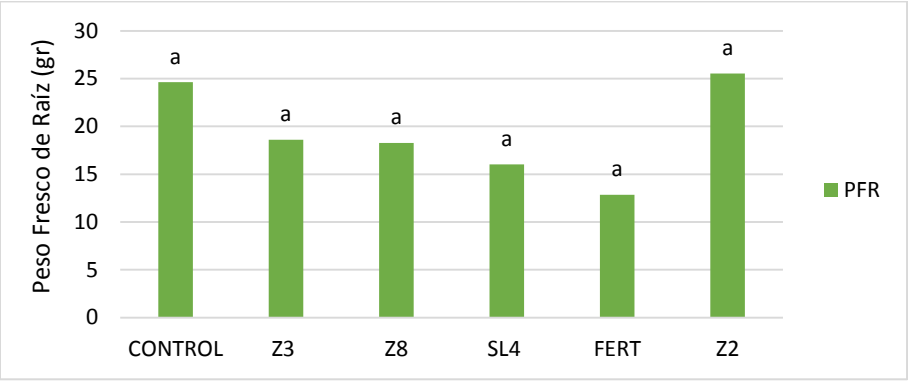
***Análisis de Biomasa***

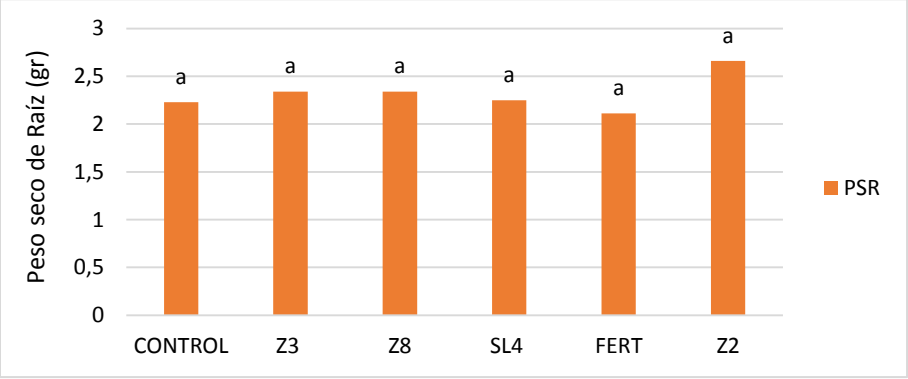
Las evaluaciones realizadas para el peso fresco y seco del follaje (PFF y PSF) en el cultivo de papa se muestran en la figura 9. Como se evidencia no hay diferencia estadísticas significativas en ningún tratamiento, sin embargo el tratamiento Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) presenta los mejores resultados tanto para PFF con 37,39 gr, como para PSF con 3.6 gr. El tratamiento CONTROL presenta los valores más bajos en ambas evaluaciones.




**Figuras 9 y 10.** Peso fresco y seco del follaje (PFF y PSF) en el genotipo de papa. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), Santiago (SL4) (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales en las barras difieren para p<0,05 Tukey.

En lo que respecta al peso fresco y seco de la raíz (PFR), no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos. A pesar de ello el tratamiento Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) presenta los mejores resultados tanto para PFR con un peso de 25,5 gr, y para PSR con 2,7 gr, mientras que el tratamiento FERT presenta los resultados más bajos.




**Figuras 11 y 12.** Peso fresco y seco de raíz en el genotipo de papa. Tratamientos: control (CONTROL), Z2 (*Beijerinckia fluminensis*), Z3 (*Beijerinckia fluminensis*), Z8 (*Stenotrophomonas* sp.), Santiago (SL4) (*Stenotrophomonas maltophilia*), fertilización (FERT). Letras desiguales en las barras difieren para p<0,05 Tukey.

# 5 DISCUSIÓN

Todas los aislados rizosféricos tuvieron la capacidad de producir AIA, la cepa que mayor cantidad de AIA promovió fue Z8 (*Stenotrophomonas sp*.,) con un promedio de 174,54 μg $ml^{-1}$, seguida de Z2 (*Beijerinckia fluminensis)* con 139,61 ug $ml^{-1}$, las cuales promovieron un crecimiento efectivo en las plantas de papa. La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar en gran parte los efectos positivos de las bacterias diazotróficas en el crecimiento vegetal. (Hernández A. *et al*., 2014). Esta información concuerda con nuestros resultados, ya que las dos cepas evaluadas que presentan los valores más altos de AIA siempre tuvieron un efecto positivo en el crecimiento y biomasa foliar en las plantas.

La altura de la planta tuvo un efecto positivo con la inoculación de las cepas inoculadas, lo cual se pudo evidenciar con los valores encontrados en el análisis de varianza para esta variable evaluada. Se observa que la cepa Z2 (*Beijerinckia fluminensis)* con (115 cm) presenta mayor altura con respecto a la influencia de los demás tratamientos. Esto pudo deberse al efecto de la cepa para promover la producción de diferentes fitohormonas en la planta y por ende un mayor crecimiento (Madrigal *et al*., 2009).

En cuanto al grosor del tallo, los valores encontrados no presentan diferencia estadísticas con los demás tratamientos, al igual que en el número de hojas. En cuanto al número de tallos el tratamiento con Z2 (*Beijerinckia fluminensis)* con 3 tallos, presenta diferencias estadísticas sobre los demás tratamientos. Las bacterias diazotróficas, además del aporte de nitrógeno, pueden promover de forma directa el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos de acción mediante la acción directa de las fitohotrmas (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2014), evento que

pudo darse con la cepa *Beijerinckia fluminensis* al promover mayor número de hojas y grosor del tallo.

En cuanto a parámetros de biomasa, específicamente en PSF y PSR a los 90 DDS no presentan diferencia estadísticas en todos los tratamientos evaluados. El efecto más sobresaliente de alguna de las cepas bacterianas sugiere que posiblemente existió un sinergismo entre el hospedante y los simbiontes, lo que permitió mejor absorción de elementos esenciales, los cuales probablemente junto con las fitohormonas que excretan en las raíces tienen acción fisiológica (Arshad y Frankenberger, 1991) lo que provocan el mayor desarrollo de la parte área del cultivo.

# 6 CONCLUSIONES

- Se logró identificar tres géneros de bacterias no referidas hasta el momento en los suelos agrícolas de Loja y Saraguro, que corresponden a: *Beijerinckia fluminensis*, *Stenotrophomonas* sp. y *Stenotrophomonas maltophilia.*
- El aislado de Z8 (*Stenotrophomonas sp.*) mostro mayor capacidad para producir ácido indól acético AIA, seguido de SL4 y Z2. Y no así para solubilizar fosfatos.
- La cepa aislada de Z2 (*Beijerinckia fluminensis*) presentó los mejores resultados en el crecimiento de la planta, grosor del tallo y parámetros de biomasa.
- El tratamiento CONTROL presentó los valores más bajos en cuanto a los parámetros morfológicos y biomasa, lo que da a entender que las bacterias inoculadas en el cultivo de papa promovieron un efecto positivo en el desarrollo de las plantas.

# 7 RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de las bacterias diazotróficas en otras condiciones edafo-climaticas, para obtener mayor información en este campo, que permita producir un bioinoculante eficiente para este cultivo.

# 8 BIBLIOGRAFÍA


Abdel-Lateif, K., Bogusz, D., & Hocher, V. (2012). The role of flavonoisd in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *plant Signaling & Behavior*, 636-641.

Acebo-Guerrero, Y., Hernandez-Rodriguez, A., Rives-Rodriguez, N., velazquez del Valle, M., & Hernandez-Lauzardo, A. (2011). Perpectivas del uso de bacterias rizosfericas en el control de Pyricularia grisea (CookeSacc.) en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.). *Revista Colomb Biotecnol*, 16-22.

Albanesi, A., Anriquez, A., & Silberman, J. (2014). Microorganismos relacionados al ciclo biogeoquimico del nitrogeno. *Catedra de Microbiologia Agricola*, s/n. Obtenido de file:///C:/Users/hp/Downloads/1081540593.Serie%20Did%C3%A1ctica%20y%20Actividades%206_Microorganismos%20relacionados%20al%20ciclo%20biogeoqu%C3%ADmico%20del%20nitr%C3%B3geno_2014.pdf

Arshad, M., & Frankenberger, W. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant Soil*, 1-8.

Aulakh, M., Khera, T., Doran, J., Singh, K., & Singh, B. (2000). Yields and Nitrogen Dynamics in a Rice-Wheat System Using Green Manure and Inorganic Fertilizer. *Publications from USDA-ARS/UNL faculty*, 303.

Ayerve Gonzaga, J., & Yaguachi Alvarez, P. (2010). Influencia del encalado y aporte de materia organica en las propiedades del suelo y en el rendimiento del cultivo de uvila (Physalis peruviana L.) en la estacion experimental la Argelia. 123.

Baca , B., Soto Urzua , L., & Pardo Ruiz, M. (2000). Fijacion Biologica de nitrogeno. *Ciencia y Cultura elementos*, 43.

Baldani, J., Baldani, V., Seldin , L., & Dobereiner, J. (1986). Characterization of Herbaspirillum seropedicae nov. sp., a root associated nitrogen fixing bacterium. En S. Gnanamanckam, *Las bacterias de la planta-asociado* (págs. 86-93). s/n: s/n.

Barrios , L., & Perez, I. (2005). Nuevos registros de hongos en semillas de Oryza sativa en Cuba. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia*, 64-67.

Bashan, Y., Kamnev, A., & De-Bashan, L. (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biol Fertil Soil*, 1-2.

Bernal, g., Suarez, A., Jerez, M., & Campaña, D. (2002). inoculacion de la semilla de leguminosas con la bacteria Rhizobium . En INIAP, *Seleccion de cepas de Rhizobium adaptadas a condiciones de campo, y su uso como inoculantes de leguminosas de la Sierra y Costa Ecuatoriana* (pág. 80). Ecuador: s/n.

Borda-Molina, D., Pardo-Garcia, J., Martinez-Salgado, M., & Montaña-Lara, J. (2009). Produccion de un biiofertilizante a partir de un aislamientos de Azotobacter nigricans obteniendo en en cultivo de Stevia rebaudiana Bert. *Universitas Scientiarum*, 71-78.

Bowen, J., & Krathy, E. (2010). Nitrogeno, fijacion biologica en leguminosas tropicales. En la Agricultura de las Americas. En J. Cuervo, *Aislamiento y caracterizacion de Bacillus spp como fijadores biologicos de nitrogeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (pág. 28). Bogota D.C.

Carrillo, P., Moreno, J. D., Franco, B., & Fierro, L. H. (2003). *Manual de papa para productores.* Colombia: Bucaramanga.

Cholota Guamán, O. (2013). Evaluación de sustratos para el enraizamiento de plantulas de sábila (Aloe vera). 144.

Corpoica. (sf de 2007). *Portafolios de productos y servicios*. Obtenido de http://www.corpoica.org.co

Cuesta, A., Monsalve, J., Mesa, M., Zapata , A., & Trujilo , M. (2006). *Estrategias de cultivos en la produccion de alginatos por Azotobacter vinelandii.* Colombia: s/n.

De Souza-Moreira, F., Da Silva, K., Abrahao-Nobrega, S., & Carvalho, F. (2010). Bacterias diazotroficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicacoes. . *Comunicata Scientiae*, 74-99.

Derx, H. (1950). Beijerinckia a new genus of notrogen-fixing bacteria accurring in tropical soils . *Procedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, 140-147.

Dobereiner, J., & Pedrosa , F. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. *Science Tech Publishers*, 154.

Dobereiner, J., & Ruschel, A. (1958). Uma nova especie de Beijerinckia . *Revista de Biologia*, 261-272.

ESPAC. (10 de 05 de 2013). *visualizador de estadisticas agropecuarias del Ecuador ESPAC*. Obtenido de http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=75

Espin, G. (2002). Biologia de Azotobacter vinelandii. En O. C. Melissa, *respuesta fisiologica del frijol caupi (Vigna unguiculata L. Walp) a la coinoculacion de bacterias diazotroficas de los generos Azotobacter y Rhizobiun en suelos del departamento del Cesar* (pág. 61). Mexico: s/n.

FHIA, F. H. (2006). La papa: un cultivo tradicional que sigue siendo alternativa. En L. Hernández, *Caracterización del potencial agroecológico y socioeconómico de la producción, uso y manejo de semillas de papa (Solanum tuberosum), en la zona Trifinio, Honduras* (págs. 2-4). Honduras.

Glickman, E., & Dessaux, Y. (1995). Un examen critico de la especificidad del reactivo Salkowski para compuestos indolicos producidas por bacterias fitopatogenos. *Appl. Environ, Microbiol*, 793-796.

Gonzales, F. (01 de 01 de 2011). Contaminacion por Fertilizantes: Un serio problema ambiental. *Medio Ambiente y Desarrrollo Sostenible*, pág. 4.

Graham, P., & Vance, C. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plan Physiology*, 872-877.

Guarin, S., Ñustes, C., & Ospina, J. (1998). Estudio de la fertilidad en 81 genotipos de la coleccion colombiana de Solanum phureja. En L. O. Hernández Hernández, *Caracterizacion del potencial agroecológico y socioeconómico de la produccion, uso y manejo de la semilla de la papa (Solanum tuberosum), en la zona Trifinio, Honduras* (págs. 49-58). Honduras: sn.

Gutierrez-Zamora, M., & Martinez-ROmero, E. (2001). Natural endophytic association between Rhizobium etli and maize (Zea mays L.). *Journal of Biotechnology*, 117-126.

Halvorson, A., Follett, R., Bartolo, M., & Scweissing, F. (2002). Nitrogen fertilizer use efficiency of furrow-irrigated onion and corn. *Agronj*, 442-449.

Harter, T., & Lund, J. (2012). Report for the State Resources Control Board Report tu the Legislature. *Addressing Nitrate in California´s Drinking Water*, 75.

Hayat, R., Ahmed, I., & Shairdil, R. (2012). An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. *Crop Production for Agricultural Improvement*, 557-579.

Hernandez-Rodriguez, A., Heydrich, M., Diallo, B., El Jaziri, M., & Vansaputte, O. (2010). Cell-free culture medium of Burkholderia cepacia improves seed germinationand seedling growth in maize (Zae mays) and rice (Oryza sativa). *Plant Growth Regul*, 191-197.

Hernandez-Rodriguez, A., Heydrich, M., Diaz, A., Rivez, N., Acebo, Y., & Vera , L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotroficas asociativas en la promocion del crecimiento vegetal y el control de Pyricularia aryzae (Sacc.) en el cultivo del arroz (Oryza sativa L.). *Plant Growth Regul*, 1-10.

James , E. (2000). nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field crops research*, 197-209.

Jimenez , D. (2007). *Caracterizacion molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el analisis de restriccion del ADN ribosomal 16S.* Colombia: s/n.

Kennedy, C., Rudnick, P., Mc Donald, M., & Melton, T. (1901). *Genus III. Azotobacter.*

Khan, A., Jilani, G., Akhtar , M., Naqvi, S., & Raheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Mechanisms and their Role in Crop Production. *J Agric Biol Sci*, 48-58.

Khan, M., Zaidi, A., & Wani, P. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agricultura. *Agron Sustain Dev*, 29-43.

Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., & Vanderleyden, J. (2000). Acido indol-3-acético: una molecula de señalizacion reciproca en las interacciones bacteria de plantas. *Tendencias Microbiol*, 298-300.

Lopez, M. (2009). *Estudio microbiologico de nuevas alternativas en el tratamiento de Stenotrophomonas maltophilia.* Obtenido de http://eprints.ucm.es/8445/1/T30716.pdf

Marin, V., Baldani, V., Dos Santos, R., & Baldani, I. (2003). *Fixacao biologica de nitrogeno; Bacterias fijadoras de nitrogeno de importancia para la agricultura tropical.* Brasil: empresa Brasilera de Pesquisa Agropecuaria.

Martinez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., & Mora, M. (2010). Mecanismos y consideraciones practicas que intervienen en la promoción del crecimiento de la planta de rizobacterias . *Diario de la ciencia del suelo y la nutricion de las plantas*, 293-319.

Meza, E. (2005). *Produccion de papa con semilla sexual (ANAFAE).* Honduras: s/n.

Meza, E. (2009). Produccion de papa con semilla sexual (ANAFAE). En L. Hernández, *Caracterizacion del potencial agroecológico y socieconomico de la producción, uso y manejo de semilla de papa (Solanum tuberosum), en la zona Trifinio, Honduras* (pág. 12p). Costa Rica.

Nopparat, C., Jatupornpipat, & Rittiboon, A. (2009). Optimizacion del hongo-solubilizar fosfatos, Aspergillus japonicas SA22P3406, en el cultivo de estado solido mediante la metodologia de superficie de respuesta. *Nat. Sci*, 172-181.

Oggerin, M., Arahal, D., Rubio, V., & Marin , I. (2009). Identification of Beijerinckia fluminensis strains CIP 106281T and UQM 1685T as Rhizobium radiobacter strains, ans proposal of Beijerinckia doebereinerae sp. nov. to accommodate Beijerinckia fluminensis LMG 2819. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2323-2328.

ONU. (20 de 02 de 2008). *Bolivia prepara actos para el año internacional de la papa.* Obtenido de http://www.bolpress.com/art.php?Cod=2008022012

Pandey, A., & Kumar, S. (1990). Inhibitory effects of Azotobacter chroococcum and Azospirillum brasilense on a range of rhizosphere fungi. *India Journal of Experimental Biology*, 52-54.

Pandey, A., Sharma, E., & Palmi, L. (1998). Influencia de la inoculacion bacteriana en el maiz en los sistemas agricolas de las tierras altas del Sikkim Himalaya. *Biologia del suelo y bioquimica*, 379-384.

Patten , C., & Glick, B. (1996). biosintesis bacteriana de ácido indol-3-acético. *Can J Microbiol*, 207-220.

Pedrosa , R., Teixeira, K., Fernadez Scavino, A., Garcia de Salamone, I., Baca , B., & Azcon , R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de la plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*, 155-164.

Pertuz , S. L., & León Sicard, T. E. (2013). Aspectos ambientales de la cadena productiva de la Papa (Solanum tuberosum L) en zona rural de la localidad Ciudad Bolivar de Bogota D.C., relacionados con la contaminacion quimica del tuberclo con plaguicidas organofosforados y carbomatos. *Desarrollo y Ambiente: Contribuciones teoricas y metodológicas*, 412.

Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). *El cultivo de papa en Ecuador.* Ecuador: INIAP-CIP.

Reveal, J., & Chance, M. (2009). APG III. Botanical Journal of the Linnean Society of London. *A phylogenetic classificacion of the land plants to accompany*, 161.

Rodrigues , M. (11 de 02 de 2013). *La prodcuccion y el comercio de la papa enel contexto internacional y latinoamericano* . Obtenido de https://www.clubensayos.com/Negocios/LA-PRODUCCI%C3%93N-Y-EL-COMERCIO-DE-LA-PAPA/538968.html

Rodriguez, D., Urrego, L., Martinez , P., & Bernal , J. (2003). Evaluacion preliminar de dos matrices para la inmovilizacion de bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fosofro aislado de bosque alto andino cundinamarqués. En J. A. Javier, *Caracterizacion molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp., mediante el analisis de restriccion del DNA ribosomal 16S* (pág. 28). Bogota: s/n.

Rojas , M., Larrea, J., Mahillon, J., & Heydrich, M. (2011). Aislamiento y caracterizacion de cepas de Bacillus asociadas al cultivo del arroz (Oryza sativa L.). *Rev. bras de Agroecologia*, 90-99.

Sabra, W., Zeng, A., & deckwer, W. (2001). Alginato bacteriana: la fisiologia, la calidad del producto y aspectos del proceso. *Appl Microbiol Biotechnol*, 315-325.

SINAGAP. (3 de 05 de 2013). *Sistema de INformacion Nacional de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca*. Obtenido de http://sinagap.agricultura.gob.ec/ano2014bpi-agroq/descargables-2014

Singlenton, P. (2004). *Bacterias en biologia, biotecnologia y medicina.* España: Acribia.

Sousa Moreira, F., Da Silva, K., Abrahao Nobrega , R., & De Carvalho, F. (2010). Bacterias diazotroficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicacoes. *Comunicata Scientiae*, 74-99.

Starkey, R., & De, P. (1939). A new species of Azotobacter. *Soil Science*, 329-343.

Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., & Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (Oryza sativa L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecol*, 415-424.

Suquilanda V, M. (2011). La Produccion Organica de la Papa. *Tierra Adentro*, 41.

Tchan, Y. (1957). Studies of nitrogen-fixing bacteria.VI. A new species of nitrogen-fixing bacteria. *Proceeding of the Linnean Society New South Wale*, 261-272.

Torres-Gutiérrez, R. (2008). Phytoestimulactory effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (Phaseolus vulgaris L.) interaction. *Dissertationes de Agricultura*, 155.

Trivedi, P., & Pandey, A. (2007). Baja temperatura solubilizacion de fosfatos y promoción del crecimiento vegetal por bacterias psicrotróficas, aislado de la India Himalayan Region. *Res. J. microbiology*, 454-461.

Yanii, Y., Rizk , R., Abd El-Fattah, F., Squartini, A., Corinch, V., & Giacomini, A. (2001). La promotora del crecimiento asociacion vegetal beneficioso de Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii con raices de arroz. *Applied and Enviromental Microbiology*, 845-870.

# 9 ANEXOS

**Anexo 1.** Identificación de colonias bacterianas en placa.

La evaluación de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/gr) se la realizó con la ayuda de un cuantificador de colonias, en el cual se identificó las características generales de las bacterias, que a continuación se muestra:

| **Parámetros morfológicos** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **a. Crecimiento:** | ( ) nulo | ( ) ligero | ( ) moderado | ( ) abundante | |
| **b. Color:** | ( ) transparente | ( ) traslucido | ( ) opaco | ( ) blanco opaco | ( ) crema |
| **c. Mucosidad:** | ( ) nulo | ( ) ligero | ( ) moderado | ( ) abundante | |
| **d. Bordes:** | ( ) liso | ( ) ondulado | ( ) lobulado | ( ) dentado | ( ) filamentoso |
| **e. Forma:** | ( ) punteada | ( ) circular | ( ) filamentosa | ( ) irregular | ( ) rizoide |

**a**/Crecimiento: (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; **b**/Color: (1) transparente, (2) traslúcido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema; **c**/Mucosidad: (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; **d**/Bordes: (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado, (4) dentado, (5) filamentoso;**e**/Forma: (1) punteado, (2) circular, (3) filamentosa, (4) irregular, (5) rizoide.

**Anexos 2.** Producción de acido3-indol-acetico (AIA), de cada aislado rizosférico a las 24 y 48 horas.

| Cepas | Tratamiento | AIA 24 Horas | AIA 48 Horas |
|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 109,07 | 136,92 |
| Z2 | 1 | 139,85 | 148,04 |
| Z2 | 1 | 64,15 | 144,71 |
| Santiago1 | 2 | 81,12 | 156,81 |
| Santiago1 | 2 | 86,03 | 151,61 |
| Santiago1 | 2 | 73,49 | 141,12 |
| Z3 | 3 | 139,79 | 174,60 |
| Z3 | 3 | 167,58 | 174,38 |
| Z3 | 3 | 136,75 | 174,60 |
| Z8 | 4 | 129,79 | 137,58 |
| Z8 | 4 | 98,35 | 141,83 |
| Z8 | 4 | 117,30 | 143,10 |

**Anexos 3.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento de papa variedad bolona a los 15 DDS**.**

| Tratamiento | Muestra | Replica | Altura (Cm) | Grosor tallo (mm) | N° hojas | N° tallos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 1 | 5,00 | 3,58 | 6 | 1 |
| Z2 | 2 | 1 | 11,80 | 2,80 | 5 | 4 |
| Z2 | 3 | 1 | 3,00 | 3,20 | 4 | 1 |
| Z2 | 4 | 1 | 21,00 | 4,15 | 6 | 2 |
| Z2 | 5 | 1 | 15,00 | 3,08 | 5 | 1 |
| Z2 | 6 | 1 | 16,70 | 3,75 | 6 | 3 |
| Z2 | 7 | 1 | 10,00 | 3,98 | 5 | 3 |
| Z2 | 8 | 1 | 8,50 | 3,24 | 5 | 2 |
| Z2 | 9 | 1 | 12,70 | 3,09 | 6 | 3 |
| Z2 | 10 | 1 | 14,70 | 3,54 | 6 | 3 |
| Z3 | 1 | 2 | 12,30 | 3,95 | 5 | 3 |
| Z3 | 2 | 2 | 8,00 | 3,59 | 5 | 2 |
| Z3 | 3 | 2 | 8,00 | 3,10 | 5 | 3 |
| Z3 | 4 | 2 | 12,50 | 4,63 | 7 | 2 |
| Z3 | 5 | 2 | 9,67 | 2,85 | 6 | 3 |
| Z3 | 6 | 2 | 8,00 | 4,19 | 4 | 3 |
| Z3 | 7 | 2 | 15,30 | 3,43 | 6 | 3 |
| Z3 | 8 | 2 | 10,50 | 3,90 | 6 | 2 |
| Z3 | 9 | 2 | 5,00 | 3,40 | 4 | 1 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z3 | 10 | 2 | 6,67 | 2,60 | 5 | 3 |
| Z8 | 1 | 3 | 10,70 | 4,03 | 5 | 3 |
| Z8 | 2 | 3 | 6,75 | 2,90 | 5 | 2 |
| Z8 | 3 | 3 | 21,00 | 5,00 | 6 | 2 |
| Z8 | 4 | 3 | 18,00 | 4,45 | 7 | 1 |
| Z8 | 5 | 3 | 10,00 | 4,05 | 6 | 1 |
| Z8 | 6 | 3 | 15,30 | 3,13 | 5 | 4 |
| Z8 | 7 | 3 | 6,33 | 2,76 | 5 | 3 |
| Z8 | 8 | 3 | 9,00 | 3,39 | 5 | 3 |
| Z8 | 9 | 3 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Z8 | 10 | 3 | 4,50 | 2,93 | 5 | 2 |
| SL4 | 1 | 4 | 3,50 | 3,99 | 5 | 1 |
| SL4 | 2 | 4 | 4,50 | 3,22 | 5 | 1 |
| SL4 | 3 | 4 | 15,30 | 3,21 | 6 | 3 |
| SL4 | 4 | 4 | 4,50 | 2,60 | 5 | 2 |
| SL4 | 5 | 4 | 14,00 | 4,00 | 6 | 1 |
| SL4 | 6 | 4 | 21,80 | 3,30 | 5 | 4 |
| SL4 | 7 | 4 | 13,00 | 4,22 | 6 | 2 |
| SL4 | 8 | 4 | 6,50 | 3,20 | 5 | 3 |
| SL4 | 9 | 4 | 22,30 | 3,73 | 6 | 3 |
| SL4 | 10 | 4 | 5,00 | 3,02 | 4 | 1 |
| Control | 1 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 2 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |

Continuación del anexo 3...

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3 | 5 | 42,50 | 3,48 | 9 | 2 |
| Control | 4 | 5 | 15,50 | 5,24 | 4 | 2 |
| Control | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 6 | 5 | 32,00 | 6,30 | 9 | 1 |
| Control | 7 | 5 | 6,88 | 3,20 | 5 | 4 |
| Control | 8 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 9 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 10 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Fert. | 1 | 6 | 12,00 | 5,55 | 7 | 1 |
| Fert. | 2 | 6 | 15,00 | 4,25 | 6 | 2 |
| Fert. | 3 | 6 | 9,00 | 4,00 | 7 | 1 |
| Fert. | 4 | 6 | 7,50 | 3,19 | 5 | 2 |
| Fert. | 5 | 6 | 10,00 | 4,30 | 5 | 1 |
| Fert. | 6 | 6 | 17,00 | 3,15 | 6 | 4 |
| Fert. | 7 | 6 | 10,00 | 4,52 | 5 | 2 |
| Fert. | 8 | 6 | 11,00 | 5,04 | 6 | 1 |
| Fert. | 9 | 6 | 22,00 | 6,73 | 8 | 1 |
| Fert. | 10 | 6 | 6,67 | 3,06 | 4 | 3 |

**Anexos 4.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento de papa variedad bolona a los 30 DDS**.**

| Tratamiento | Muestra | Replica | Altura (Cm) | Grosor tallo (mm) | N° hojas | N° tallos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 1 | 18,00 | 3,53 | 8 | 3 |
| Z2 | 2 | 1 | 33,80 | 2,89 | 7 | 4 |
| Z2 | 3 | 1 | 24,00 | 4,60 | 9 | 1 |
| Z2 | 4 | 1 | 44,50 | 4,15 | 10 | 2 |
| Z2 | 5 | 1 | 32,00 | 3,30 | 8 | 1 |
| Z2 | 6 | 1 | 38,30 | 3,83 | 9 | 3 |
| Z2 | 7 | 1 | 42,00 | 4,00 | 6 | 3 |
| Z2 | 8 | 1 | 29,50 | 3,70 | 8 | 2 |
| Z2 | 9 | 1 | 36,00 | 3,25 | 9 | 3 |
| Z2 | 10 | 1 | 34,70 | 3,58 | 8 | 3 |
| Z3 | 1 | 2 | 38,30 | 4,00 | 7 | 3 |
| Z3 | 2 | 2 | 26,50 | 4,18 | 8 | 2 |
| Z3 | 3 | 2 | 26,30 | 3,37 | 8 | 3 |
| Z3 | 4 | 2 | 36,00 | 4,70 | 11 | 2 |
| Z3 | 5 | 2 | 25,50 | 2,79 | 9 | 4 |
| Z3 | 6 | 2 | 29,70 | 4,27 | 9 | 3 |
| Z3 | 7 | 2 | 21,30 | 3,47 | 8 | 3 |
| Z3 | 8 | 2 | 33,00 | 4,00 | 8 | 2 |
| Z3 | 9 | 2 | 14,50 | 3,83 | 6 | 4 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z3 | 10 | 2 | 36,00 | 2,97 | 7 | 3 |
| Z8 | 1 | 3 | 34,30 | 4,08 | 8 | 3 |
| Z8 | 2 | 3 | 26,00 | 3,43 | 9 | 2 |
| Z8 | 3 | 3 | 50,50 | 5,00 | 7 | 2 |
| Z8 | 4 | 3 | 29,50 | 3,08 | 8 | 2 |
| Z8 | 5 | 3 | 34,00 | 4,70 | 9 | 1 |
| Z8 | 6 | 3 | 37,80 | 3,21 | 8 | 4 |
| Z8 | 7 | 3 | 24,30 | 3,00 | 8 | 3 |
| Z8 | 8 | 3 | 27,70 | 3,67 | 8 | 3 |
| Z8 | 9 | 3 | 11,50 | 4,13 | 6 | 2 |
| Z8 | 10 | 3 | 21,00 | 3,67 | 7 | 3 |
| SL4 | 1 | 4 | 14,00 | 4,10 | 8 | 2 |
| SL4 | 2 | 4 | 10,70 | 3,53 | 6 | 3 |
| SL4 | 3 | 4 | 42,30 | 3,38 | 9 | 3 |
| SL4 | 4 | 4 | 20,70 | 3,23 | 7 | 3 |
| SL4 | 5 | 4 | 37,00 | 4,00 | 10 | 1 |
| SL4 | 6 | 4 | 46,50 | 3,33 | 8 | 4 |
| SL4 | 7 | 4 | 32,00 | 3,83 | 8 | 2 |
| | 8 | 4 | 22,30 | 3,65 | 7 | 4 |
| SL4 | 9 | 4 | 46,00 | 3,73 | 8 | 3 |
| SL4 | 10 | 4 | 12,30 | 3,15 | 6 | 3 |
| Control | 1 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 2 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |

Continuación del anexo 4..

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3 | 5 | 62,50 | 3,70 | 12 | 2 |
| Control | 4 | 5 | 32,00 | 4,65 | 8 | 4 |
| Control | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 6 | 5 | 56,00 | 6,60 | 13 | 1 |
| Control | 7 | 5 | 32,00 | 3,66 | 9 | 4 |
| Control | 8 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 9 | 5 | 13,00 | 4,85 | 8 | 2 |
| Control | 10 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Fert. | 1 | 6 | 40,00 | 5,70 | 9 | 1 |
| Fert. | 2 | 6 | 41,00 | 4,48 | 8 | 2 |
| Fert. | 3 | 6 | 17,50 | 3,55 | 7 | 2 |
| Fert. | 4 | 6 | 32,00 | 3,50 | 8 | 2 |
| Fert. | 5 | 6 | 48,00 | 5,20 | 9 | 1 |
| Fert. | 6 | 6 | 40,00 | 3,35 | 8 | 4 |
| Fert. | 7 | 6 | 32,00 | 4,70 | 8 | 2 |
| Fert. | 8 | 6 | 32,00 | 5,30 | 10 | 1 |
| Fert. | 9 | 6 | 53,00 | 6,80 | 12 | 1 |
| Fert. | 10 | 6 | 26,00 | 3,43 | 7 | 3 |

**Anexos 5.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento de papa variedad bolona a los 60 DDS**.**

| Tratamiento | Muestra | Replica | Altura (Cm) | Grosor tallo (mm) | N° hojas | N° tallos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 1 | 70,00 | 3,80 | 11 | 3 |
| Z2 | 2 | 1 | 68,00 | 2,90 | 9 | 4 |
| Z2 | 3 | 1 | 100,00 | 5,30 | 12 | 1 |
| Z2 | 4 | 1 | 99,00 | 4,20 | 9 | 2 |
| Z2 | 5 | 1 | 51,00 | 2,60 | 8 | 2 |
| Z2 | 6 | 1 | 83,00 | 3,80 | 7 | 3 |
| Z2 | 7 | 1 | 87,00 | 4,00 | 8 | 3 |
| Z2 | 8 | 1 | 84,00 | 3,90 | 9 | 2 |
| Z2 | 9 | 1 | 81,00 | 3,30 | 9 | 3 |
| Z2 | 10 | 1 | 70,00 | 3,60 | 8 | 3 |
| Z3 | 1 | 2 | 98,00 | 4,00 | 10 | 3 |
| Z3 | 2 | 2 | 62,00 | 4,40 | 8 | 2 |
| Z3 | 3 | 2 | 66,00 | 3,40 | 7 | 3 |
| Z3 | 4 | 2 | 96,00 | 4,70 | 11 | 2 |
| Z3 | 5 | 2 | 61,00 | 2,80 | 8 | 4 |
| Z3 | 6 | 2 | 84,00 | 4,40 | 10 | 3 |
| Z3 | 7 | 2 | 27,00 | 3,50 | 8 | 3 |
| Z3 | 8 | 2 | 98,00 | 4,00 | 9 | 2 |
| Z3 | 9 | 2 | 62,00 | 3,90 | 8 | 4 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z3 | 10 | 2 | 62,00 | 3,10 | 8 | 3 |
| Z8 | 1 | 3 | 97,00 | 4,10 | 9 | 3 |
| Z8 | 2 | 3 | 71,00 | 3,50 | 9 | 2 |
| Z8 | 3 | 3 | 115,00 | 5,00 | 11 | 2 |
| Z8 | 4 | 3 | 69,00 | 3,10 | 10 | 2 |
| Z8 | 5 | 3 | 108,00 | 4,70 | 11 | 1 |
| Z8 | 6 | 3 | 91,00 | 3,30 | 11 | 4 |
| Z8 | 7 | 3 | 71,00 | 3,30 | 10 | 3 |
| Z8 | 8 | 3 | 72,00 | 3,70 | 8 | 3 |
| Z8 | 9 | 3 | 79,00 | 4,50 | 9 | 2 |
| Z8 | 10 | 3 | 63,00 | 4,00 | 7 | 3 |
| SL4 | 1 | 4 | 79,00 | 4,10 | 11 | 2 |
| SL4 | 2 | 4 | 63,00 | 3,70 | 9 | 3 |
| SL4 | 3 | 4 | 90,00 | 3,40 | 8 | 3 |
| SL4 | 4 | 4 | 59,00 | 3,40 | 8 | 3 |
| SL4 | 5 | 4 | 91,00 | 4,00 | 11 | 1 |
| SL4 | 6 | 4 | 95,00 | 3,40 | 9 | 4 |
| SL4 | 7 | 4 | 89,00 | 4,00 | 9 | 2 |
| SL4 | 8 | 4 | 72,00 | 3,40 | 8 | 4 |
| SL4 | 9 | 4 | 82,00 | 4,10 | 8 | 3 |
| SL4 | 10 | 4 | 49,00 | 3,50 | 10 | 3 |
| Control | 1 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 2 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |

Continuación del anexo 5.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3 | 5 | 122,00 | 4,30 | 15 | 2 |
| Control | 4 | 5 | 95,00 | 4,80 | 11 | 4 |
| Control | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 6 | 5 | 112,00 | 6,90 | 17 | 1 |
| Control | 7 | 5 | 82,00 | 4,00 | 10 | 4 |
| Control | 8 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 9 | 5 | 68,00 | 5,20 | 15 | 2 |
| Control | 10 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Fert. | 1 | 6 | 115,00 | 5,70 | 11 | 1 |
| Fert. | 2 | 6 | 103,00 | 4,50 | 9 | 2 |
| Fert. | 3 | 6 | 66,00 | 3,70 | 9 | 2 |
| Fert. | 4 | 6 | 88,00 | 3,70 | 8 | 2 |
| Fert. | 5 | 6 | 119,00 | 5,20 | 12 | 1 |
| Fert. | 6 | 6 | 82,00 | 3,50 | 8 | 4 |
| Fert. | 7 | 6 | 95,00 | 4,70 | 10 | 2 |
| Fert. | 8 | 6 | 103,00 | 5,30 | 12 | 1 |
| Fert. | 9 | 6 | 135,00 | 6,80 | 12 | 1 |
| Fert. | 10 | 6 | 65,00 | 3,60 | 7 | 3 |

**Anexos 6.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento de papa variedad bolona a los 90 DDS**.**

| Tratamiento | Muestra | Replica | Altura (Cm) | Grosor tallo (mm) | N° hojas | N° tallos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 1 | 93,00 | 3,90 | 10 | 3 |
| Z2 | 2 | 1 | 75,00 | 3,00 | 4 | 4 |
| Z2 | 3 | 1 | 121,00 | 5,30 | 13 | 1 |
| Z2 | 4 | 1 | 105,00 | 4,70 | 7 | 2 |
| Z2 | 5 | 1 | 59,00 | 2,60 | 6 | 2 |
| Z2 | 6 | 1 | 90,00 | 3,90 | 8 | 3 |
| Z2 | 7 | 1 | 128,00 | 4,10 | 7 | 3 |
| Z2 | 8 | 1 | 107,00 | 4,00 | 8 | 2 |
| Z2 | 9 | 1 | 89,00 | 3,40 | 7 | 3 |
| Z2 | 10 | 1 | 75,00 | 3,60 | 8 | 3 |
| Z3 | 1 | 2 | 118,00 | 4,30 | 10 | 3 |
| Z3 | 2 | 2 | 73,00 | 4,50 | 7 | 2 |
| Z3 | 3 | 2 | 78,00 | 3,50 | 8 | 3 |
| Z3 | 4 | 2 | 127,00 | 4,90 | 12 | 2 |
| Z3 | 5 | 2 | 77,00 | 3,00 | 9 | 4 |
| Z3 | 6 | 2 | 103,00 | 4,80 | 6 | 3 |
| Z3 | 7 | 2 | 27,00 | 3,60 | 8 | 3 |
| Z3 | 8 | 2 | 105,00 | 4,20 | 7 | 2 |
| Z3 | 9 | 2 | 73,00 | 3,90 | 9 | 4 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z3 | 10 | 2 | 64,00 | 3,40 | 5 | 3 |
| Z8 | 1 | 3 | 117,00 | 4,20 | 7 | 3 |
| Z8 | 2 | 3 | 75,00 | 3,70 | 8 | 2 |
| Z8 | 3 | 3 | 143,00 | 5,00 | 10 | 2 |
| Z8 | 4 | 3 | 71,00 | 3,10 | 7 | 2 |
| Z8 | 5 | 3 | 127,00 | 4,70 | 11 | 1 |
| Z8 | 6 | 3 | 102,00 | 3,50 | 7 | 4 |
| Z8 | 7 | 3 | 79,00 | 3,50 | 7 | 3 |
| Z8 | 8 | 3 | 75,00 | 3,80 | 7 | 3 |
| Z8 | 9 | 3 | 113,00 | 4,90 | 9 | 2 |
| Z8 | 10 | 3 | 74,00 | 4,10 | 8 | 3 |
| SL4 | 1 | 4 | 94,00 | 4,20 | 6 | 2 |
| SL4 | 2 | 4 | 81,00 | 3,80 | 6 | 3 |
| SL4 | 3 | 4 | 98,00 | 3,40 | 5 | 3 |
| SL4 | 4 | 4 | 63,00 | 3,50 | 6 | 3 |
| SL4 | 5 | 4 | 97,00 | 4,20 | 9 | 1 |
| SL4 | 6 | 4 | 115,00 | 3,60 | 9 | 4 |
| SL4 | 7 | 4 | 95,00 | 4,10 | 8 | 2 |
| SL4 | 8 | 4 | 83,00 | 3,80 | 7 | 4 |
| SL4 | 9 | 4 | 84,00 | 4,20 | 5 | 3 |
| SL4 | 10 | 4 | 56,00 | 3,60 | 6 | 3 |
| Control | 1 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 2 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |

Continuación del anexo 6.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 3 | 5 | 98,00 | 3,50 | 8 | 3 |
| Control | 4 | 5 | 126,00 | 4,90 | 10 | 4 |
| Control | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 6 | 5 | 135,00 | 6,90 | 18 | 1 |
| Control | 7 | 5 | 116,00 | 4,30 | 10 | 4 |
| Control | 8 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Control | 9 | 5 | 103,00 | 5,60 | 13 | 2 |
| Control | 10 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 |
| Fert. | 1 | 6 | 132,00 | 5,80 | 6 | 1 |
| Fert. | 2 | 6 | 133,00 | 5,30 | 11 | 2 |
| Fert. | 3 | 6 | 77,00 | 3,80 | 9 | 2 |
| Fert. | 4 | 6 | 90,00 | 4,10 | 5 | 2 |
| Fert. | 5 | 6 | 144,00 | 5,80 | 7 | 1 |
| Fert. | 6 | 6 | 89,00 | 3,70 | 8 | 4 |
| Fert. | 7 | 6 | 109,00 | 4,70 | 9 | 2 |
| Fert. | 8 | 6 | 120,00 | 5,50 | 7 | 1 |
| Fert. | 9 | 6 | 190,00 | 7,00 | 15 | 1 |
| Fert. | 10 | 6 | 72,00 | 3,70 | 7 | 3 |

**Anexos 7.** Parámetros de biomasa en papa variedad bolona a los 90 DDS**.**

| Tratamiento | Muestra | Replica | PFF | PFR | PSF | PSR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z2 | 1 | 1 | 31,33 | 32,03 | 3,00 | 2,70 |
| Z2 | 2 | 1 | 12,62 | 18,85 | 1,10 | 1,10 |
| Z2 | 3 | 1 | 37,56 | 19,14 | 3,40 | 1,90 |
| Z2 | 4 | 1 | 32,18 | 19,56 | 2,70 | 1,60 |
| Z2 | 5 | 1 | 10,77 | 34,73 | 1,90 | 1,30 |
| Z2 | 6 | 1 | 30,05 | 25,09 | 3,40 | 2,70 |
| Z2 | 7 | 1 | 56,84 | 27,07 | 5,40 | 3,30 |
| Z2 | 8 | 1 | 35,86 | 26,22 | 1,80 | 2,90 |
| Z2 | 9 | 1 | 28,63 | 27,92 | 2,90 | 2,70 |
| Z2 | 10 | 1 | 28,21 | 15,73 | 3,00 | 2,10 |
| Z3 | 1 | 2 | 50,30 | 23,30 | 4,40 | 2,80 |
| Z3 | 2 | 2 | 32,50 | 12,20 | 2,60 | 1,60 |
| Z3 | 3 | 2 | 35,80 | 18,20 | 4,80 | 3,00 |
| Z3 | 4 | 2 | 56,30 | 15,80 | 5,40 | 2,40 |
| Z3 | 5 | 2 | 28,60 | 18,50 | 3,10 | 2,20 |
| Z3 | 6 | 2 | 39,20 | 18,10 | 4,00 | 2,60 |
| Z3 | 7 | 2 | 13,50 | 8,40 | 1,60 | 1,00 |
| Z3 | 8 | 2 | 45,70 | 21,70 | 5,10 | 2,80 |
| Z3 | 9 | 2 | 26,10 | 36,10 | 1,90 | 3,30 |
| Z3 | 10 | 2 | 13,70 | 13,70 | 1,30 | 1,70 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Z8 | 1 | 3 | 47,70 | 40,20 | 4,20 | 4,90 |
| Z8 | 2 | 3 | 28,10 | 11,30 | 2,70 | 1,60 |
| Z8 | 3 | 3 | 52,40 | 18,10 | 4,20 | 1,90 |
| Z8 | 4 | 3 | 17,70 | 17,80 | 1,60 | 2,80 |
| Z8 | 5 | 3 | 50,60 | 14,70 | 4,10 | 1,90 |
| Z8 | 6 | 3 | 36,30 | 17,00 | 3,90 | 2,50 |
| Z8 | 7 | 3 | 30,20 | 15,60 | 3,10 | 1,80 |
| Z8 | 8 | 3 | 28,20 | 13,60 | 2,90 | 1,90 |
| Z8 | 9 | 3 | 39,40 | 12,20 | 3,80 | 1,90 |
| Z8 | 10 | 3 | 20,50 | 22,30 | 1,90 | 2,20 |
| SL4 | 1 | 4 | 26,40 | 9,90 | 2,40 | 1,30 |
| SL4 | 2 | 4 | 24,00 | 12,50 | 2,50 | 2,20 |
| SL4 | 3 | 4 | 40,30 | 17,10 | 3,50 | 2,30 |
| SL4 | 4 | 4 | 24,40 | 22,70 | 3,20 | 3,50 |
| SL4 | 5 | 4 | 30,60 | 17,00 | 3,00 | 2,20 |
| SL4 | 6 | 4 | 58,00 | 10,10 | 6,60 | 1,80 |
| SL4 | 7 | 4 | 29,70 | 18,70 | 2,40 | 2,10 |
| SL4 | 8 | 4 | 25,10 | 14,80 | 2,30 | 2,10 |
| SL4 | 9 | 4 | 26,00 | 13,10 | 2,30 | 2,20 |
| SL4 | 10 | 4 | 13,30 | 24,30 | 1,40 | 2,80 |
| Control | 1 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Control | 2 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Control | 3 | 5 | 40,82 | 24,52 | 4,10 | 3,30 |

Continuación del anexo 7.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 4 | 5 | 77,25 | 34,87 | 8,60 | 4,40 |
| Control | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Control | 6 | 5 | 92,56 | 29,34 | 8,10 | 5,80 |
| Control | 7 | 5 | 58,68 | 24,24 | 5,80 | 3,20 |
| Control | 8 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Control | 9 | 5 | 49,19 | 32,89 | 4,80 | 4,40 |
| Control | 10 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Fert. | 1 | 6 | 41,25 | 18,43 | 4,50 | 2,00 |
| Fert. | 2 | 6 | 45,36 | 31,61 | 3,10 | 2,20 |
| Fert. | 3 | 6 | 24,10 | 31,47 | 2,00 | 2,50 |
| Fert. | 4 | 6 | 30,19 | 27,22 | 3,00 | 3,30 |
| Fert. | 5 | 6 | 44,51 | 27,36 | 4,20 | 2,40 |
| Fert. | 6 | 6 | 27,78 | 20,98 | 2,90 | 2,60 |
| Fert. | 7 | 6 | 32,60 | 15,17 | 2,80 | 1,50 |
| Fert. | 8 | 6 | 35,01 | 26,22 | 3,50 | 3,30 |
| Fert. | 9 | 6 | 55,71 | 31,33 | 6,00 | 4,20 |
| Fert. | 10 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Anexos 7.** Prueba de Tukey HSD en parámetros de producción de acido3-indol-acetico (AIA), de cada aislado rizosférico a las 24 y 48 horas.

| Cepas | 24 horas | | 48 horas | |
|---|---|---|---|---|
| Z3 | 104,357 | ab | 139,607 | b |
| Z8 | 80,213 | b | 149,847 | b |
| SL4 | 148,04 | a | 174,527 | a |
| Z2 | 115,147 | ab | 140,837 | b |

**Anexos 8.** Prueba de Kruskal-Wallis sobre el efecto de los aislados en el parámetro de altura.

| AISLADOS | TRATAMIENTOS | ALTURA (Medias) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 DDS | | 30 DDS | | 60 DDS | | 90 DDS | |
| FERT | T1 | 11,84 | a | 33,28 | a | 79,3 | ab | 94,2 | ab |
| Z3 | T2 | 9,59 | a | 28,71 | a | 71,6 | ab | 84,5 | ab |
| Z8 | T3 | 10,16 | a | 29,66 | a | 83,6 | ab | 97,6 | ab |
| SL4 | T4 | 11,04 | a | 28,38 | a | 76,9 | ab | 86,6 | ab |
| CONTROL | T5 | 9,69 | a | 19,55 | a | 47,9 | b | 57,8 | b |
| Z2 | T6 | 12,02 | a | 36,15 | a | 97,1 | a | 115,6 | a |

**Anexos 9.** Prueba de Kruskal-Wallis sobre el efecto de los aislados en el parámetro de grosor del tallo.

| AISLADOS | TRATAMIENTOS | GROSOR TALLO | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 DDS | 30 DDS | 60 DDS | 90 DDS |
| FERT | 1 | 3,44 ab | 3,68 ab | 3,74 ab | 3,85 ab |
| Z3 | 2 | 3,56 ab | 3,76 ab | 3,82 ab | 4,01 ab |
| Z8 | 3 | 3,26 ab | 3,80 ab | 3,92 ab | 4,05 ab |
| SL4 | 4 | 3,45 ab | 3,59 ab | 3,7 ab | 3,84 ab |
| CONTROL | 5 | 1,82 b | 2,35 b | 2,52 b | 2,52 b |
| Z2 | 6 | 4,38 a | 4,60 a | 4,67 a | 4,94 a |

**Anexos 10.** Prueba de Kruskal-Wallis sobre el efecto de los aislados en el parámetro de número de hojas.

| AISLADOS | TRATAMIENTOS | N de HOJAS | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 DDS | 30 DDS | 60 DDS | 90 DDS |
| FERT | 1 | 5 a | 8 ab | 9 a | 8 a |
| Z3 | 2 | 5 a | 8 ab | 9 a | 8 a |
| Z8 | 3 | 5 ab | 8 ab | 10 a | 8 a |
| SL4 | 4 | 5 a | 8 ab | 9 a | 7 a |
| CONTROL | 5 | 3 b | 5 b | 7 a | 6 a |
| Z2 | 6 | 6 a | 9 a | 10 a | 8 a |

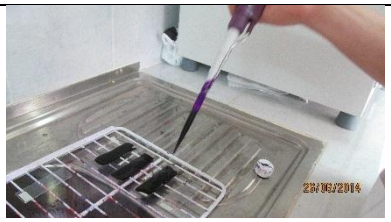
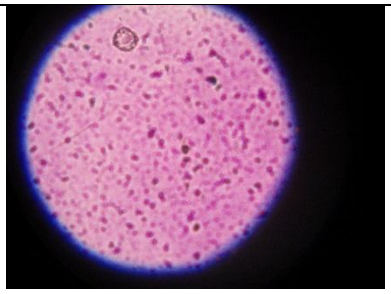
**Anexos 11.** Prueba de Kruskal-Wallis sobre el efecto de los aislados en el parámetro de número de tallos.

| AISLADOS | TRATAMIENTOS | N de TALLOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 DDS | 30 DDS | 60 DDS | 90 DDS |
| FERT | 1 | 2 a | 3 ab | 3 ab | 3 ab |
| Z3 | 2 | 3 a | 3 a | 3 a | 3 a |
| Z8 | 3 | 2 a | 3 ab | 3 ab | 3 ab |
| SL4 | 4 | 2 a | 3 a | 3 a | 3 ab |
| CONTROL | 5 | 1 a | 1 a | 1 b | 1 b |
| Z2 | 6 | 2 ab | 2 ab | 2 ab | 2 ab |

**Anexos 12.** Prueba de Kruskal-Wallis sobre el efecto de los aislados en los parámetros de biomasa.

| AISLADOS | TRATAMIENTOS | PARAMETROS DE BIOMASA | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | PFF | PFR | PSF | PSR |
| CONTROL | 1 | 30,405 a | 24,634 a | 2,86 a | 2,23 a |
| Z3 | 2 | 34,17 a | 18,6 a | 3,42 a | 2,34 a |
| Z8 | 3 | 35,11 a | 18,28 a | 3,24 a | 2,34 a |
| SL4 | 4 | 29,78 a | 16,02 a | 2,96 a | 2,25 a |
| FERT | 5 | 31,85 a | 14,586 a | 3,14 a | 2,11 a |
| Z2 | 6 | 37,39 a | 25,532 a | 3,55 a | 2,66 a |

**Anexo 13.** FIGURAS.

| Figura N° | Imagen | Descripción |
|---|---|---|
| **CARACTERIZACIÓN MORFOCULTURAL DE LOS AISLADOS** | | |
| **1** | | Frotis para la observación de tinción gram |
| **2** |  | Realización de tinción gram |
| **3** |  | Observación en microscopio de tinción gram |
| **4** | | Observación de parámetros morfológicos de las colonias |
| **5** | | Observación de parámetros morfológicos de las colonias |

| | | |
|---|---|---|
| **6** | | Preparación de muestras para la cuantificación de AIA |
| **7** | | Observación de presencia de AIA |
| **MONTAJE DEL EXPERIMENTO** | | |
| 8 | | Preparación de sustrato (esterilización) |
| 9 | | |
| 10 | | Montaje del experimento e identificación de macetas |
| 11 | | Siembra de papa |

| | | |
|---|---|---|
| 12 | | Inoculación de los diferentes aislados |
| 13 | | Riego de las plantas de papa |
| 14 | | Medición de grosor del tallo de plantas de papa |
| 15 | | Altura de plantas de papa |
| 16 | | Primera visita del director de tesis Ing. Iván Granda |
| **LEVANTAMIENTO DEL EXPERIMENTO** | | |

| | | |
|---|---|---|
| 17 | | Levantamiento del experimento sacado de plantas |
| 18 | | Observación de presencia de tubérculos en las macetas |
| 19 | | Peso de muestras de plantas de papa. |