



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA CO-INOCULACIÓN CON  
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN EL CULTIVO  
DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L) VARIEDAD  
BOLONA.**

Tesis de grado previa a la  
obtención del título de Ingeniera  
Agrónoma.

**DIRECTOR:**

*Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.*

**AUTORA:**

*Silvana Gabriela Agila Hidalgo*

**LOJA – ECUADOR  
2016**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA**

Certificación del Tribunal de Grado.

Determinación:

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito, previo a la obtención del título de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**APROBADA**

Ing. Bolívar Cueva Cueva.

**Presidente del Tribunal**

Ing. Pablo Álvarez Figueroa.

**Miembro del Tribunal**

Ing Ángel Robles Carrión.

**Miembro del Tribunal**

Loja – Ecuador

2016

## CERTIFICACIÓN

Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.  
DOCENTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.  
DIRECTOR DE TESIS.

**Certifica:**

Que el trabajo de investigación titulado "DETERMINACIÓN DE LA CO-INOCULCIÓN CON MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN EL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.) VARIEDAD BOLONA", de la autoría de la Srta. SILVANA GABRIELA AGILA HIDALGO, previo a la obtención del título de INGENIERA AGRÓNOMA, ha sido revisado y se autoriza su presentación final para la calificación correspondiente.

Loja, 18 de enero del 2016



Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

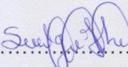
DIRECTOR DE TESIS

### AUTORÍA

Yo **SILVANA GABRIELA AGILA HIDALGO**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a 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.

Autora: Silvana Gabriela Agila Hidalgo.

Firma: .....

Cédula: 1104891633

Fecha: 07 de junio del 2016

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

Yo **SILVANA GABRIELA AGILA HIDALGO** declaro ser autor de la tesis titulada "**DETERMINACIÓN DE LA CO-INOCULACIÓN CON MICROORGANISMOS RIZOSFERICOS EN EL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L) VARIEDAD BOLONA**", como requisito para optar al grado de: **INGENIERA AGRONOMA**; 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 en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 07 del mes de junio del 2016.

Firma: .....  .....

Autor: Silvana Gabriela Agila Hidalgo

Cedula: 1104891633

Dirección: La Argelia

Correo Electrónico: gabriela.agila@gmail.com

Teléfono: 3031489-0983542251

#### DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Mg Sc. Iván Granda Mora

Tribunal de grado: Mg. Sc. Bolivar Cueva Cueva

Mg. Sc. Pablo Álvarez Figueroa

Mg. Sc. Ángel Robles Torres

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, especialmente a la Carrera de Ingeniería Agronómica por brindarme los conocimientos y la experiencia precisa para el desarrollo profesional de la vida cotidiana.

Al director de tesis Ing. Iván Granda Mora, quien me guio y asesoró a través de sus conocimientos, brindándome las sugerencias pertinentes con responsabilidad para la concreción del presente trabajo de investigación.

Así mismo agradezco al personal docente del Centro de Biotecnología anexa a la Universidad Nacional de Loja de la Ciudad de Loja provincia de Loja por haberme brindado su valiosa colaboración en la investigación de Laboratorio y en desarrollo constitutivos de la investigación.

**Silvana Gabriela Agila Hidalgo**

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo de tesis principalmente a Dios, por haberme permitido vivir y llegar a este momento tan importante en mi formación profesional.

A mis padres Livia Hidalgo Tandazo y José Agila, tía Elsa Hidalgo Tandazo y abuelitos Salvador Hidalgo (+) y ELeovina Tandazo (+) por ser pilares importantes y demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestra diferencia de opiniones.

A mi hija Ariana Sofía Tandazo Agila quien se ha convertido en una inspiración para seguir superándome y venciendo los obstáculos.

**Silvana Gabriela Agila Hidalgo**

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
<b>Certificación</b> .....	li
<b>Declaración de autoría</b> .....	iii
<b>Carta de Autorización</b> .....	iv
<b>Agradecimiento</b> .....	v
<b>Dedicatoria</b> .....	vi
<b>Título</b> .....	xi
<b>Resumen</b> .....	xii
<b>Summary</b> .....	xiii
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Revisión de literatura</b> .....	3
<b>2.1. La papa</b> .....	3
<b>2.1.1. Clasificación taxonómica</b> .....	3
<b>2.1.2. Descripción morfológica</b> .....	4
<b>2.1.3. Requerimientos Edafo-climáticos</b> .....	4
<b>2.1.4. Fases Fenológicas</b> .....	4
<b>2.1.5. Rendimiento</b> .....	6
<b>2.2. Problemas derivados de la aplicación irracional de fertilizantes minerales</b> .....	6
<b>2.3. Importancia del Nitrógeno</b> .....	7
<b>2.4. Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)</b> .....	8
<b>2.4.1. Fijación asimbiótica de Nitrógeno</b> .....	9
<b>2.4.2. Características generales de las rizobacterias</b> .....	10
<b>2.4.3. Aplicación y contribución práctica de los microorganismos rizosféricos en Solanáceas</b> .....	16
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	18

<b>3.1.</b>	<b>Descripción del área de estudio</b> .....	18
<b>3.1.1.</b>	Ubicación Política.....	19
<b>3.1.2.</b>	Ubicación Geográfica.....	20
<b>3.1.3.</b>	Ubicación Ecológica.....	20
<b>3.2.</b>	<b>Materiales</b> .....	20
<b>3.2.1.</b>	Equipos.....	20
<b>3.2.2.</b>	Materiales de Laboratorio.....	21
<b>3.2.3.</b>	Material de Campo.....	21
<b>3.3.</b>	<b>Metodología</b> .....	21
<b>3.3.1.</b>	Metodología para la determinación in vitro de la compatibilidad de los aislados rizosféricos.....	21
<b>3.3.2.</b>	Metodología para la cuantificación de la producción de ácido indól acético (AIA) y solubilización de fósforo de los aislados rizosféricos.....	21
<b>3.3.3.</b>	Metodología para validar el efecto de los mejores aislados, mediante la aplicación de biopreparados bajo condiciones de invernadero.....	22
<b>3.3.4.</b>	Metodología para comparar el efecto de la co-inoculación de rizobacterias sobre parámetros morfológicos, biomasa y fijación de nitrógeno en el cultivo de papa en condiciones controladas.....	24
<b>3.3.5.</b>	Diseño Experimental.....	25
<b>3.4.</b>	<b>Análisis Estadístico</b> .....	26
<b>4.</b>	<b>Resultados</b> .....	27
<b>5.</b>	<b>Discusión</b> .....	37
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	39
<b>7.</b>	<b>Recomendación</b> .....	40
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	41
<b>9.</b>	<b>Anexos</b> .....	49
<b>Anexo 1</b>	Análisis de compatibilidad de los aislados rizosféricos.....	50

<b>Anexo 2</b>	Datos de altura de la planta, grosor de tallo y número de hojas de la planta del cultivo de papa variedad bolona a los 15,30,45,60,75,90 DDS.....	51
<b>Anexo 3</b>	Peso fresco y seco de raíz, Peso fresco y seco de follaje en el cultivo de papa variedad bolona a los 15,30,45,60,75,90 DDS.....	52
<b>Anexo 4</b>	Montaje del Ensayo.....	53
<b>Anexo 5</b>	Fórmulas químicas.....	58

### **ÍNDICE DE FIGURAS**

CONTENIDO	PÁG.
<b>Figura 1.</b> Mapa de ubicación del área de estudio.....	19
<b>Figura 2.</b> Croquis del Diseño experimental.....	25
<b>Figura 3</b> Producción de ácido 3-indol-acético (AIA), de cada aislado rizosférico a las 72 horas de evaluación.....	29
<b>Figura 4</b> Evaluación de la altura de las plantas de papa a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 DDS.....	30
<b>Figura 5</b> Grosor de tallo en el genotipo de papa a los 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS.....	31
<b>Figura 6</b> Número de Hojas de la planta de papa a los 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS.....	31
<b>Figura 7</b> Número de tallos.....	32
<b>Figura 8.</b> Peso fresco y seco del follaje (PFF y PSF) en el genotipo de papa.....	33
<b>Figura 9</b> Peso fresco y seco de raíz en el genotipo de papa.....	34
<b>Figura 10</b> Cuadro de correlación de las variables en un diagrama de constelaciones.....	36
<b>Figura 11</b> Relación entre las variables evaluadas.....	36

## ***ÍNDICE DE CUADROS***

CONTENIDO	PÁG.
<b>Cuadro 1.</b> Aislados rizosféricos utilizados en el experimento bajo invernadero.....	24
<b>Cuadro 2.</b> Compatibilidad de los aislados rizosféricos.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Tabla de correlación de variables.....	35

**DETERMINACIÓN DE LA CO-INOCULACIÓN CON  
MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN EL CULTIVO DE LA  
PAPA (*Solanum tuberosum L*) VARIEDAD BOLONA.**

## RESÚMEN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*) es uno de los alimentos más importantes a nivel mundial. En el Ecuador es el principal alimento especialmente de las poblaciones andinas por su contenido energético y nutricional. Las aplicaciones de agroquímicos para incrementar los rendimientos agrícolas son muy elevadas, afectando la economía del agricultor y la contaminación de los suelos. Para ello es preciso generar alternativas de producción agrícola utilizando métodos sostenibles y uno de ellos es la utilización de microorganismos fijadores de nitrógeno promotores del crecimiento vegetal (PGPR) que son empleados para la fabricación de productos biológicos conocidos como inoculantes, los cuales pueden fijar el doble de nitrógeno que favorecen al mantenimiento de la fertilidad de los suelos. El presente trabajo de investigación “DETERMINACIÓN DE LA CO-INOCULACIÓN CON MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN EL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum L*) VARIEDAD BOLONA” se realizó en el Laboratorio de Biotecnología con la finalidad de conocer la eficiencia de los microorganismos rizosféricos en el crecimiento de la planta, mediante pruebas in- vitro analizamos rizobacterias para determinar la producción de ácido indolacético (AIA) y solubilización de fósforo, el aislado *Sphingomonas sanxanigenens* es el que produce mayor cantidad de AIA con un valor de 1,784 ug ml<sup>-1</sup>, seguido de *Azotobacter vinelandii* y *Ralstonia sp.*, con valores de 0,185 y 0,136 ug ml<sup>-1</sup> de AIA respectivamente en 72 horas, el aislado *Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp.*, solubilizó fósforo mostrando la formación de un halo de 5,06cm. Además se hizo la co-inoculación con microorganismos rizosféricos en donde se evaluó el efecto en el crecimiento de la planta bajo condiciones controladas, donde se observó una respuesta efectiva con las cepas *Ralstonia sp.*+ *Penicillium sp* y *Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp* que presentaron datos de altura de 130 cm y 107cm respectivamente, es decir, que tuvieron un efecto benéfico sobre la planta de papa en cuanto a la promoción del crecimiento e incremento de la formación de biomasa tanto radical como foliar.

Palabras clave: Inoculante, ácido indol acético (AIA), Rizobacterias promotoras del crecimiento en inglés Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), solubilización de fosfatos.

## SUMMARY

The cultivation of potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food worldwide. In Ecuador is the main food of the Andean populations especially for their energy and nutritional content. Agrochemical applications to increase agricultural yields are very high, affecting the economy of the farmer and soil pollution. This requires generating alternative agricultural production using sustainable methods and one of them is the use of fixing microorganisms promoters nitrogen plant growth (PGPR) which are used for the manufacture of known biological products as inoculants which can fix double nitrogen that favor the maintenance of soil fertility. This research "DETERMINATION OF CO - INOCULATION WITH MICRO rhizosphere GROWING POTATO (*Solanum tuberosum* L.) VARIETY BOLOGNA " was performed at the Laboratory of Biotechnology in order to know the efficiency of the rhizosphere microorganisms on growth plant by in- tests vitro analyze rhizobacteria to determine the production of indole acetic acid (IAA) and solubilization of phosphorus, *Sphingomonas sanxanigenens* isolated is the one that produces the greatest amount of AIA with a value of  $1.784 \text{ ug ml}^{-1}$ , followed by *Azotobacter vinelandii* and *Ralstonia* sp, 0.185 and with values of  $0.136 \text{ ug ml}^{-1}$  in 72 hours respectively AIA, the isolated *Penicillium* sp + *Sphingomonas sanxanigenens*. He solubilized fosforo showing the formation of a halo of 5,06cm. In addition the co- inoculation was made with rhizosphere microorganisms where the effect on plant growth under controlled conditions, where an effective response to strains *Ralstonia* sp was observed was evaluated + *Penicillium* sp and *Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium* sp presenting data height of 130 cm and 107cm respectively, ie, they had a beneficial effect on the potato plant in terms of promoting growth and increased biomass formation both radical and leaf.

Keywords: inoculant, indole acetic acid (IAA), growth promoting rhizobacteria English Plant growth -promoting rhizobacteria ( PGPR ), phosphate solubilization.

## 1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es uno de los cultivos más significativos en el Ecuador, los actuales sistemas de producción implementados en las partes más altas se ha constituido un factor socioeconómico entre las comunidades, siendo un alimento importante en la dieta alimenticia por presentar numerosas propiedades nutricionales (Devaux *et.al.*, 2012). La superficie cosechada en el 2013 es de 49371 ha/año que corresponde una producción de 503 toneladas métricas, en el Carchi la zona papera por excelencia es generalizada ya que los agricultores utilizan volúmenes de fertilizantes, para el efecto destinan 150 kg de fertilizante químico, los de uso más común son: Urea 46 %, Nitrato de Amonio, Carbonato de Calcio (Orbe *et al*, 2013).

Los datos en producción de papa son favorables ya que están directamente afectados por los elevados costos de producción, específicamente en la adquisición de fertilizantes para mejorar la productividad reportando un valor referencial de 1.046 USD para producir una hectárea de papa (Pozo, 2013)

La aplicación de agroquímicos utilizados para incrementar el rendimiento de este cultivo, terminan en el agua como vertido directo en las fuentes o por lixiviación hacia mantos freáticos causando la contaminación y que más tarde sería utilizada para actividades domésticas, las elevadas concentraciones de nitratos pueden alterar tanto el ecosistema y la salud de las personas (Pertuz y León, 2013).

Para ello es preciso orientar la agricultura con alternativas como la utilización de tecnologías sostenibles y una de ellas es el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal que son usados para la fabricación de productos biológicos conocidos como inoculantes microbianos que contribuyen de una manera efectiva a la recuperación de los suelos y mejoras en la producción, siendo las familias *Azotobacteriaceae*, *Ralstoniaceae*, *Sphingomonadaceae* las más significativas. Se estima que estos microorganismos fijan nitrógeno el doble de lo que aportan los agroquímicos y además estimulan el crecimiento vegetal de las plantas (Graham y Vance, 2003).

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

- Determinación in vitro de la compatibilidad de los aislados rizosféricos.
- Cuantificación de la producción de ácido indól acético (AIA) y solubilización de fósforo de los aislados rizosféricos.
- Validar el efecto de los mejores aislados, mediante la aplicación de biopreparados bajo invernadero.
- Comparar el efecto de la co-inoculación de los microorganismos rizosféricos sobre parámetros morfológicos, biomasa y fijación de nitrógeno en el cultivo de papa bajo condiciones controladas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. La papa

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, es una planta herbácea, anual, aunque puede ser considerada como perenne debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos (Meza, 2005).

#### 2.1.1. Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Tubiflorae
Familia:	Solanácea
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>tuberosum L</i>

(Aguirre, 2000)

### **2.1.2. Descripción morfológica**

Presenta abundantes raíces fibrosas que alcanzan profundidades de 30 a 40 cm que le dan buen anclaje a la planta. Con un tallo angular generalmente de color verde, aunque pueden ser de color púrpura, las hojas son compuestas con 7 a 9 folíolos tienen tricomas en el haz de forma lanceolada, se originan en los tallos subterráneos son pequeñas en forma de escamas en sus yemas axilares emergen los estolones, la inflorescencia nace en la parte terminal del tallo y puede ir un número de flores de 1 hasta 30 siendo lo más usual entre 7 a 15 pueden ser de color blanco o rosado. El fruto es una baya cuya forma depende de la variedad que produce entre 300 a 400 semillas fértiles (Meza, 2005).

### **2.1.3. Requerimientos Edafo-climáticos**

La papa es un cultivo que se adapta a regiones templadas o subtropicales, 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 desde 1000 msnm hasta los 3000 msnm donde haya una temperatura promedio de 18°C y con un pH entre 5 a 5,4(Carrillo *et al*, 2003).

### **2.1.4. Fases Fenológicas**

Fase I. Emergencia

Periodo comprendido entre la siembra y la emergencia de las plántulas (10 días), durante esta fase la plántula sobrevive de las reservas contenidas en el tubérculo – madre.(Arciniega, 2007)

#### Fase II. Estolonización

Periodo comprendido entre la emergencia y el desarrollo de estructuras diferenciadas denominadas estolones (20 días). Los estolones crecen a partir de yemas axilares (crecimiento horizontal), el número de estolones es proporcional al número de yemas axilares presentes en el tallo (Arciniega, 2007).

#### Fase III. Tuberización

La formación de los tubérculos de la papa es acompañada por alteraciones morfológicas y bioquímicas en la planta. La producción de tubérculos es fuertemente relacionada con un grado de estímulos involucrados durante la fase de inducción (30 a 40 días); es decir residuo de foto asimilada, la planta debe estar en su máximo desarrollo vegetativo (mayor índice de área foliar). La mayoría de los tubérculos con tamaños ideales para la cosecha se forman en un periodo de 2 semanas (Arciniega, 2007).

#### Fase IV. Crecimiento de los tubérculos

El crecimiento de los tubérculos presenta un carácter exponencial, o sea la proporción de asimilados exportados por las hojas se duplica, siendo dirigida la mayor parte a los tubérculos. En este estado la planta se encuentra en su máximo desarrollo vegetativo (60 días) el aumento de la materia seca se debe

a la translocación de los carbohidratos de la hoja para los órganos de reserva (Arciniega, 2007).

#### Fase V. Maduración

La maduración de los tubérculos se presenta cuando la cáscara o piel se encuentra en su grado máximo, en términos de brillo presenta mayor capacidad de almacenamiento y una piel (peridermo) más gruesa (Arciniega, 2007).

#### **2.1.5. Rendimiento**

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 (Orbe *et al.*, 2013).

#### **2.2. Problemas derivados de la aplicación irracional de fertilizantes minerales.**

Son muy numerosos los informes que indican la presencia de altos niveles de nitratos en los productos químicos agrícolas, lo que constituye una importante fuente de toxicidad para el suelo y ha obligado a un establecimiento más riguroso del control de los niveles críticos de estos compuestos en las actividades para la producción de alimentos. Debido a que el nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento de las plantas, 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 (Jiménez, 2007).

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 y que las áreas más contaminadas son, en muchos casos, aquellas en las que se practica una agricultura intensiva, con altos aportes de fertilizantes y riego (González, 2011).

### **2.3. Importancia del Nitrógeno**

El nitrógeno es un nutriente de gran importancia debido a su presencia en las principales biomoléculas de la materia vegetal que necesario para la síntesis de componente de compuestos orgánicos y de la clorofila (Giletto *et al.*, 2007).

En el cultivo de papa el nitrógeno tiene mayor impacto en el rendimiento y calidad de los tubérculos, si el nivel de nitrógeno es ineficiente disminuye la producción de materia seca total y se acorta el ciclo de senescencia prematura del follaje. Si la disponibilidad de nitrógeno es elevada se retrasa el inicio de

la tuberización, se reduce el índice de cosecha y la calidad de los tubérculos (Giletto *et al.*, 2007).

#### **2.4. Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)**

La fijación de nitrógeno puede ser abiótica o biótica. Cuando es abiótica se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas que son arrastrados al suelo por la lluvia; en tanto la fijación biótica 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 atmósfera 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. El nitrógeno generalmente es considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (Bowen y Krathy, 2010).

Hay diversas 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 asociados a las raíces, este tipo de asociación 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 (Bowen y Krathy, 2010).

#### **2.4.1. Fijación asimbiótica de Nitrógeno**

Las bacterias diazótrofes 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 nitrogenasa. Estas bacterias se encuentran prácticamente en todos los hábitats: suelo, mar, fuentes de agua dulce y sedimentos, entre los 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 diazótrofes asimbióticas utilizadas como biofertilizantes una de las más importantes es *Azotobacter spp.*, la calidad agronómica de esta radica especialmente en la capacidad de producir antibióticos, sustancias estimulantes del crecimiento vegetal del tipo auxinas, (Pandey y 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 (Cuesta *et al.*, 2006; Sabra *et al.*, 2001).

## 2.4.2. Características generales de las rizbacterias

### **Género *Azotobacter***

*Taxonomía:*

*Dominio: Bacteria*

*Phylum: Proteobacteria*

*Clase: Gammaproteobacteria*

*Orden: Pseudomonadales*

*Familia: Pseudomonadaceae*

*Género: Azotobacter*

*Especies: A. vinelandii, A. chroococcum, A. beijerinckii, A. armeniacus, A. nigricans, A. salinestrus (Rodríguez et al., 2003).*

*Azotobacter* sp., puede fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas, ya que estas poseen diferentes estrategias para proteger el complejo nitrogenasa. Estas bacterias se encuentran prácticamente en todos los hábitats: suelo, mar, fuentes de agua dulce y sedimentos (Rodríguez et al., 2003).

Se han realizado una gran cantidad de ensayos a campo donde se demuestra el efecto positivo de *Azotobacter* sobre el rendimiento de diferentes cultivos. Se han publicado los efectos sobre cultivos extensivos como maíz (Hussain et al., 1987, Martínez et al., 1988, Pandey et al., 1998,); trigo (Zambre et al., 1984, Behl 2006, Kizilkaya 2008,) y arroz (Kannaiyan et al., 1980,

Kennedy et al.,2004). Además del efecto sobre el rendimiento, algunos investigadores observaron que es posible reducir la fertilización nitrogenada hasta en un 50 % con la inoculación con este microorganismo (Kennedy *et al.*, 2004).

Se ha reportado el beneficio del uso de biopreparados con base en *Azotobacter* al aportar del 30 al 50 % de las necesidades de nitrógeno de los cultivos, con un abaratamiento de la producción y la disminución de la contaminación ambiental, al disminuir el consumo de fertilizantes nitrogenados, que se filtran a las capas de agua subterránea y que contaminan los agroecosistemas (González *et al.*, 2001).

### **Género *Sphingomonas***

*Sphingomonas* es un grupo de bacterias Gram negativas con forma de bacilo, quimioheterótrofas y estrictamente aerobias. Contienen ubiquinona 10 como su principal quinona respiratoria, glicoesfingolípidos (GSLs) en vez de lipopolisacáridos en su envoltura celular y típicamente forman colonias de color amarillo (Garrido et al., 2014). Las *Sphingomonas* se distribuyen extensamente en la naturaleza. Se aislaron de diferentes hábitats terrestres y acuáticos, de los sistemas radicales de las plantas, especímenes clínicos y de muchas otras fuentes. Existe ampliamente en diversos ambientes como el suelo (Xia *et al.*, 2005).

Varios trabajos reportan la presencia de *Sphingomonas spp.*, sobre superficies de plantas, se ha encontrado que este género bacteriano tiene efectos benéficos para las plantas (Enya *et al.*, 2007), del mismo

modo, los estudios han encontrado que *Sphingomonas spp.*, es uno de los factores que funcionan como estimulantes en el crecimiento de las plantas (Enya *et al.*, 2007; Tsavkelova *et al.*, 2006). (Nascimbém *et al.*, 2010) encontró que *Sphingomonas* en el sistema radicular de maíz, participa como degradadora de fosfatos.

### **Género *Pseudomonas***

*Taxonomía:*

*Phylum: Proteobacteria*

*Clase: Bacteria*

*Orden: Bacteriales*

*Familia: Bacteriaceae*

*Género: Ralstonia*

Especies: sp. (Yabuuchi *et al.*, 1995)

La bacteria crece muy lentamente y convive con las plantas, no se han realizado trabajos pero se conoce las propiedades que tiene para solubilizar fosfatos (Delgado *et al.*, 1999).

### **2.4.3. Aplicación y contribución práctica de los microorganismos rizosféricos en Solanáceas.**

#### **2.4.3.1. Bacterias diazotróficas: principales mecanismos de acción.**

La aplicación práctica de la inoculación de estos organismos ha sido positiva que se observaron notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, estos resultados obtenidos, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de nitrógeno por las plantas, ya que estos microorganismos solubilizan fosfatos y sintetizan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido indól acético (AIA), ácido giberélico y citoquininas, que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas (Ardila, 2006)

En investigaciones realizadas demostraron que cepas purificadas de suelos cubanos, aceleraron el porcentaje de germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra Rojo, entre el 55 y el 62 %, a los primeros 50 días del tratamiento. También demostraron que plántulas de café inoculadas con dichas cepas alcanzaron a los siete meses de la inoculación, mayores valores morfológicos de altura, diámetro del tallo, pares de hojas, masa seca y área foliar, con relación a un testigo (Delgado *et al.*,2003)

#### **2.4.3.2. Aporte de nitrógeno a la planta**

La fijación de nitrógeno en atmosférico ( $N_2$ ) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta; dicho elemento es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, amino azúcares, aminoácidos, entre otros. A nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación del elemento pues se presenta en varias bacterias de tipo rizosférico. La fijación biológica del nitrógeno con

microorganismos del suelo es considerada una de los principales mecanismos para el cual las plantas encuentran beneficio de asociación, uno de estos beneficios estudiados esta la relación mantenida con microorganismos diazotróficos que proveen a la planta de nitrógeno y está en retorno, proporcionando fuente de carbono disponible por los exhudados (Zahir, 2004).

#### **2.4.3.3. Incremento de la disponibilidad de fósforo en el suelo**

El fosforo después del nitrógeno, es el nutriente más requerido por plantas y microorganismos, y en suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente del aire como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999). Las concentraciones de P en las soluciones del suelo son pequeñas desde 0,01 – 0,03mg (Ozanne, 1980). Aunque el fosforo presente en la solución del suelo es solo una parte pequeña del contenido total del P en el suelo, es de esa parte de donde las plantas toman la mayoría de sus requerimientos en P (Bolán, 1991). La solución adecuada es el P inorgánico lábil es solubilizado al menos rápidamente por las raíces de las plantas pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980).

Las concentraciones de P asimilable son bajas, normalmente en niveles que varían entre 5 a 30 mg. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el P soluble reacciona como iones de calcio o hierro que provoca su fijación disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos

(Alexander, 1980; Atlas, 2012). La disponibilidad del P inorgánico depende de diferentes factores como; los fluidos y los minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbiana, la presencia de enzimas, ácidos orgánicos y la intensidad de la demanda del nutriente. Los agentes de origen biológico son posibles de manejar ya que tienden a mantener el fósforo en su estado de mayor disponibilidad e incrementando altas tasas de mineralización. Por lo tanto los microorganismos son fundamentales para asegurar un mayor uso del fosforo en el suelo. El mantenimiento de altas tasas de nutrientes limitantes es un desafío grande para los agricultores, quienes se ven obligados a implementar técnicas, que en algunas ocasiones no resultan benéficas para mismo suelo (Azcón y Barea, 1997; Atlas, 2012; Nautiyal *et al.*, 2000).

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosforo es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que como resultado genera un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambia las formas insolubles del P en el suelo en formas solubles (Chen *et al.*, 2006)

#### **2.4.3.4. Producción de fitohormonas y reguladores del crecimiento vegetal**

Las auxinas en compañía de las giberelinas, las citoquininas, el etileno y el ácido abscísico fueron las fitohormonas sintetizadas no solo por plantas, sino por microorganismos, incluidos bacterias, hongos y actinomycetes (Tudzinski y Sharon, 2002). La forma predominante en las plantas es el ácido indol acético (IAA) presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-CIIAA), ácido

fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Ludwig y Cohen, 2002).

La producción de fitohormonas por parte de las bacterias y su impacto en la morfogénesis de la raíz, podrían explicar gran parte los efectos positivos de las bacterias diazotróficas en el crecimiento vegetal, al incrementarse el número de pelos radicales y raíces laterales (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2014).

El termino auxina califica una clase de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir elongación en células de la región subapical de los brotes (Arteca, 1996). Dentro del grupo se puede destacar el ácido indol-acético (AIA), como una de las auxinas naturales más importantes y se ha demostrado que pueden ser sintetizadas por diferentes especies de bacterias, hongos y algas, entre los más destacados encontramos bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*, entre otros (Patten y Glick, 1996). El aminoácido triptófano se considera el mayor precursor de la síntesis de AIA. Sin embargo, mutantes auxotrófos de triptófano, mostraron evidencia de una ruta de síntesis independiente de triptófano en la que se utiliza el indol, o indol-glicerol fosfato sintasa (IGS) como precursor. (Tudzinski y Sharon, 2002).

### **Síntesis de Auxinas**

Las plantas usan 2 rutas biosintéticas para producir IAA, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente de él.

Biosíntesis de AIA dependientes de Trp: Proviene de 4 vías:

**1.- Por descarboxilación para producir triptamina (TAM) y 2 por oxigenación para originar indolacetamida (IAM).** La ruta vía IAM es una

ruta sintética descrita en bacterias que también puede ocurrir en plantas, en *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae*, la enzima Trp monooxigenasa convierte el Trp a IAM y una IAM hidrolasa convierte IAM en IAA. IAM se encuentra en *Arabidopsis* a niveles similares que IAA y se sabe que la enzima aminohidrolasa (AMI1) puede convertir IAM en IAA in vitro (Pollmann *et al.* 2003).

**3.- Por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA).** Es también importante en algunos microorganismos y puede ocurrir en plantas (Normanly, 1997). Se ha aislado IPA en plantas, pero las enzimas que convierten Trp en IPA o IPA a IAA aún no han sido identificadas.

**4.- Por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx).** La conversión de Trp a IAOx es catalizada por dos enzimas del tipo citocromo P450, llamadas CYP79B2 y CYP79B3 en *Arabidopsis* (Hull *et al.* 2000). IAOx constituye un punto común para la síntesis de IAA y de compuestos secundarios conocidos como glucosinolatos indólicos (Bak *et al.* 2001).

Biosíntesis de AIA independientes de Trp: Plantas que no pueden sintetizar Trp han demostrado ser capaces de producir auxina (Ouyang *et al.* 2000). Las mutantes de *Arabidopsis* *trpαβ* y *trpβ*, por ejemplo, deficientes en la Trp sintasa  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, son capaces de acumular compuestos conjugados de IAA, aun presentando niveles muy bajos de Trp. Por otro lado, la mutante *trp1*, que tiene niveles muy bajos de la enzima indol-3-glicerol fosfato sintasa (IGS) no acumula IAA conjugados, lo que explica que una ruta alternativa independiente de Trp a partir de indol-3-glicerol fosfato podría ser importante en plantas aunque su influencia en la producción total de auxina aún se desconoce.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se llevó a cabo en 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 octubre 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 área de estudio**

##### **3.1.1. Ubicación Política**

Este trabajo se llevó a cabo en dos sectores: la fase de laboratorio se desarrolló en el Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja y la fase de campo se desarrolló en el sector de la Estación Experimental “La Argelia”.

Provincia: Loja

Cantón: Loja

Barrio: El Capulí

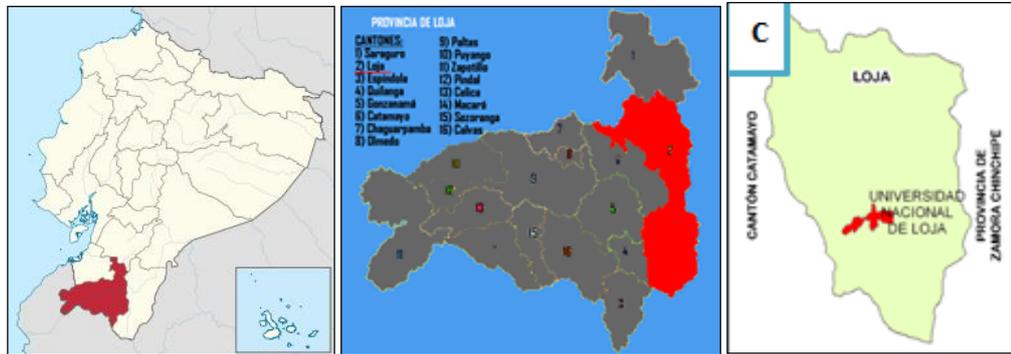


Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio. A Contexto de la República del Ecuador.

B. Contexto de la Provincia de Loja. C. Contexto de la Universidad Nacional de Loja.

### 3.1.2. Ubicación Geográfica

El 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.

La Quinta Experimental “La Argelia” se encuentra en las coordenadas:

Latitud (S): 03°57'20''

Longitud (W): 79°12'47''

Altitud: 2 138 msnm.

### **3.1.3. Ubicación Ecológica**

Según la clasificación de *Holdridge*, la zona de vida es Bosque seco Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura anual promedio de 15,62 °C, precipitación de 812,6 mm año, humedad relativa de 71,96 %; evaporación media de 111,33 mm y una velocidad máxima del viento de 5,44 m y mínima de 3,64 m. Se ubica en el área de clima templado andino.

## **3.2. Materiales**

### **3.2.1. Equipos**

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron para el desarrollo de la investigación, estuvieron disponibles en el Centro de Biotecnología, los cuales son recursos del Proyecto de Bioinoculantes: Destilador de agua, Agitador calentador, Autoclave, Flujo laminar, Incubadora, Estufa, Incubadora giratoria, Calentador de agua, Balanza analítica, Microscopio biológico óptico, Refrigeradora -20°C, Contador de colonias, Máquina de hielo, Centrifuga, Vortex, Espectrofotómetro

### **3.2.2. Reactivos**

Agar Pikosvkaya, Agar bacto, Mannitol, Extracto de levadura, Cloruro de calcio, Sacarosa, Benzoato de sodio, Sulfato de hierro, Cloruro de sodio, Alcohol, Etanol, Hipoclorito de sodio, Agar Asbby, Agar Agar, Agar Nutriente, AIA sintético, Reactivo Salkonski, Fosfato potásico, Sulfato de Magnesio.

### **3.2.3. Materiales de Laboratorio**

Micropipetas de 1000 ul, puntas de micropipetas de 1000 ul, papel lumínico, Cajas Petri, Guantes de laboratorio, Cristalería (EllenMeyer), Matraces, Beakers, Turba.

### **3.2.4. Material de Campo**

Semilla, calibrador, flexómetro, turba, arena y tierra.

## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Metodología para la determinación in vitro de la compatibilidad de los aislados rizosféricos.**

Para determinar la compatibilidad de los aislados rizosféricos, estos se inocularon en cajas de Petri con medio de cultivo agar nutriente, se inocularon por triplicado discos con colonias puras de los aislados de *Ralstonia sp*, *Sphingomonas sanxanigenens*, *Azotobacter vinelandii*. Más un control con discos de ampicilina+sulbactam. Al cabo de las 24, 48 y 72 horas se verifico el crecimiento colonial y la presencia o ausencia de antibiosis de los microorganismos inoculados.

### **3.3.2. Metodología para la cuantificación de la producción de ácido indólicético (AIA) y solubilización de fósforo de los aislados rizosféricos.**

Esta determinación se realizó por método colorimétrico usándose el reactivo Salkowski (12 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> en 7,9 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Glickman y Dessaux, 1995).

Se inocularon cada una de las cepas de microorganismos rizosféricos. Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio de cultivo líquido caldo nutriente al cual se suplementó con 1 gr L<sup>-1</sup> de triptófano y se incubara durante 24 y 48 horas a una temperatura de 30°C. Se tomó 1 ml del cultivo crecido fue transferido a tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugará a 10.000 rpm durante 5 min, luego se tomó 0,5 ml del sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo y se añadirá 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 mezclada se trasferió a microcubetas del espectrofotómetro para medir la absorbancia a 530nm.

Para verificar la capacidad de las cepas de microorganismos rizosféricos de solubilizar fosfatos inorgánicos (Zaidi *et al.*, 2009). Como resultado positivo se tomaron las cepas donde se observó un halo translúcido alrededor de la colonia.

### **3.3.3. Metodología para validar el efecto de los mejores aislados, mediante la aplicación de biopreparados bajo condiciones de invernadero.**

Los experimentos en condiciones controladas se realizaron en macetas, 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), el cual se esterilizó

a 120 °C en estufa por dos horas previo a la siembra de las semillas e inoculación de los aislados rizosféricos. Los tratamientos a evaluar fueron:

*Cuadro 1. Aislados rizosféricos utilizados en el experimento bajo invernadero.*

<b>Código</b>	<b>Tratamientos</b>
T 1	<i>Ralstonia sp.</i>
T 2	<i>Ralstonia sp. + Penicillium sp.</i>
T 3	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>
T 4	<i>Sphingomonas sanxanigenens + Penicillium sp.</i>
T 5	<i>Azotobacter vinelandii</i>
T 6	<i>Azotobacter vinelandii + Penicillium sp.</i>
T 7	<i>Penicillium sp.</i>
T 8	Control
T 9	Fertilizado

*Preparación de inóculo:*

Para la preparación de inóculo final se dispuso de un pre-inóculo inicial por cada cepa objeto de estudio de la co-inoculación (microorganismos rizosféricos) en tubos con 10 ml de medio líquido caldo nutriente y PDA. Los tubos se incubaron a 28°C durante 48 h para el crecimiento de bacterias y 192 horas para los hongos en incubadora giratoria para contar con títulos mínimos de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Al cabo del tiempo establecido se inoculó el cultivo del pre-inóculo en 250 ml para obtenerse el inóculo final, el cual se incubó a 28 °C

durante 48 y 192 horas para el crecimiento de las bacterias y hongos respectivamente en incubadora giratoria a 250 rpm.

Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias y hongos se realizó el conteo de las células viables en cada uno de los aislados. Todas las cepas contaron con títulos de  $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  para la realización de la inoculación en las semillas o suelo directamente. Este último paso se realizó aplicando 1 ml del inóculo final en todas las réplicas objeto de estudio, a excepción de las réplicas donde se encontraron el tratamiento testigo y fertilización mineral.

#### *Evaluaciones:*

Cada 15 días se hicieron comparaciones de la altura de la planta, número de hojas, número de tallos y grosor de tallo en cada uno de los tratamientos. A los 90 días después de la siembra se analizaron los parámetros de biomasa total del cultivo (peso fresco y seco de la raíz y follaje).

#### **3.3.4. Metodología para comparar el efecto de la co-inoculación de rizobacterias sobre parámetros morfológicos, biomasa y fijación de nitrógeno en el cultivo de papa en condiciones controladas.**

Para comparar el efecto de las rizobacterias se realizó pruebas de correlación múltiple y así determinar la relación entre variables evaluadas o la independencia de estas. A ello se determinó el % de N fijado por las plantas de papa para el efecto se dispusieron de 10 muestras por cada tratamiento.

### 3.3.5. Diseño Experimental.

El experimento se realizó utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con una variedad de papa “bolona” con 10 réplicas para cada uno de los tratamientos bajo invernadero con un Diseño Completamente Aleatorizado.

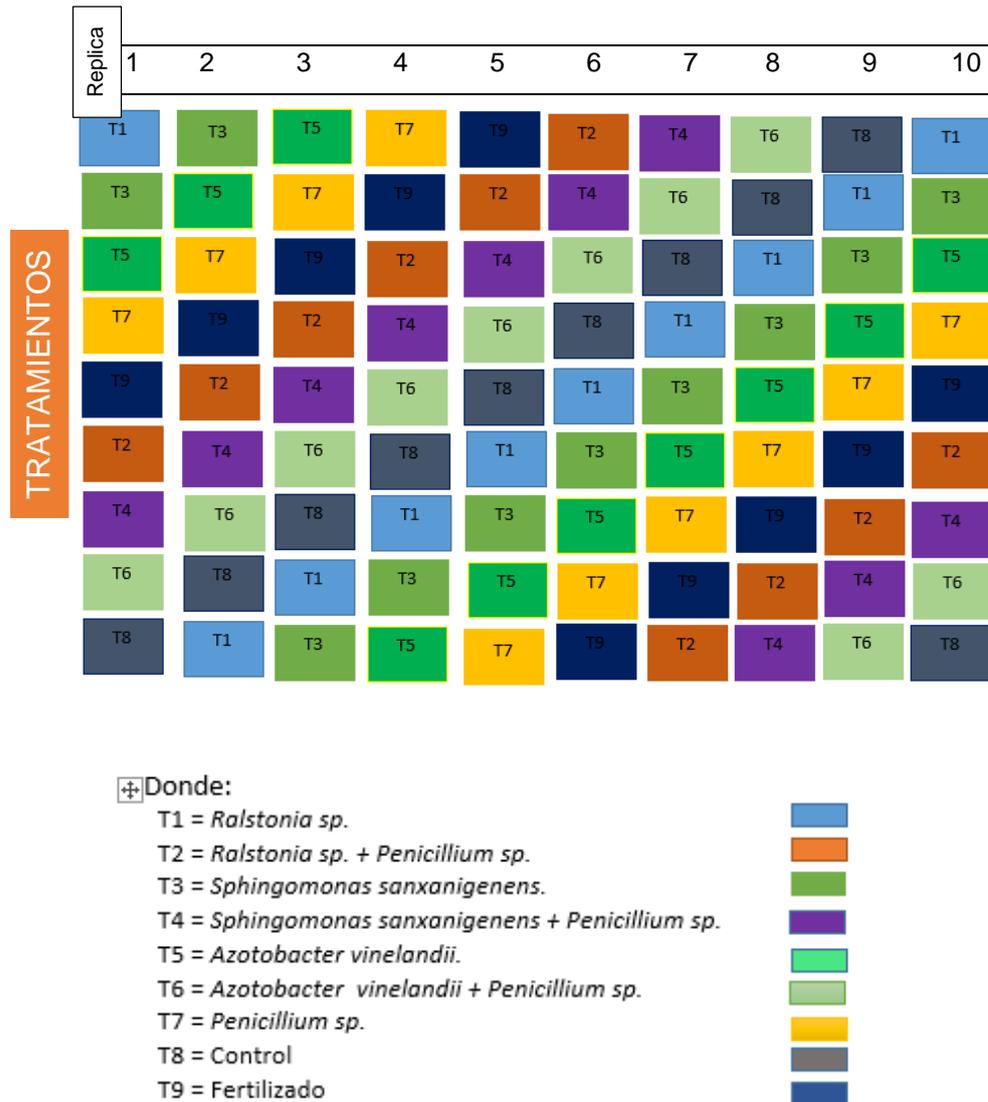


Figura 2. Croquis del Diseño experimental.

### **3.4. Análisis Estadístico**

Para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos y las variedades evaluadas, los datos se analizaron utilizándose el paquete estadístico STATGRAPHIC® Plus ver. 5.0 mediante un análisis de varianza simple (One Way ANOVA), utilizándose la prueba de Tukey HSD.

#### **3.4.1. Hipótesis Estadística**

H<sub>0</sub>: El rendimiento agrícola en papa no difiere estadísticamente entre los tratamientos aplicados, al nivel del 5% de significancia.

H<sub>a</sub>: El rendimiento agrícola en papa de al menos un tratamiento difiere estadísticamente a un nivel del 5% de significancia.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinación in vitro de la compatibilidad de los aislados rizosféricos.

- Análisis de compatibilidad de los microorganismos rizosféricos

En la tabla 2 se muestra el crecimiento y compatibilidad de los microorganismos rizosféricos. En todos los casos analizados a las 72 horas de evaluación, tanto el hongo como la bacteria son capaces de crecer mutuamente, de especial atención *Penicillium* cepa 5 y 13 con *Shingomonas sanxanigenens*.

Cuadro N° 2. Compatibilidad de los aislados rizosféricos

Aislados	Crecimiento*		Halo (cm)
	Bacteria	Hongo	
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Ralstonia</i> sp.	+	+	2,10
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	+	+	2,10
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	+++	+++	5,06
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Ralstonia</i> sp.	+	+	2,76
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	+	+	2,46
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Sphingomonas sanxanigenens</i> .	+++	+++	4,62

\*Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante.

### 4.2. Cuantificación de la producción de ácido indól acético (AIA) y solubilización de fósforo de los aislados rizosféricos.

- Producción de Ácido Indól Acético (AIA)

Como se observa en la figura 3, el aislado *Sphingomonas sanxanigenens* es el que produce mayor cantidad de ácido 3-indol-acético (AIA), con valores de 1,784 ug ml<sup>-1</sup> a las 72 horas de evaluación. Seguido de *Ralstonia* sp., y *Azotobacter vinelandii* con valores promedio de 0,136 y 0,185 ug ml<sup>-1</sup> de AIA respectivamente.

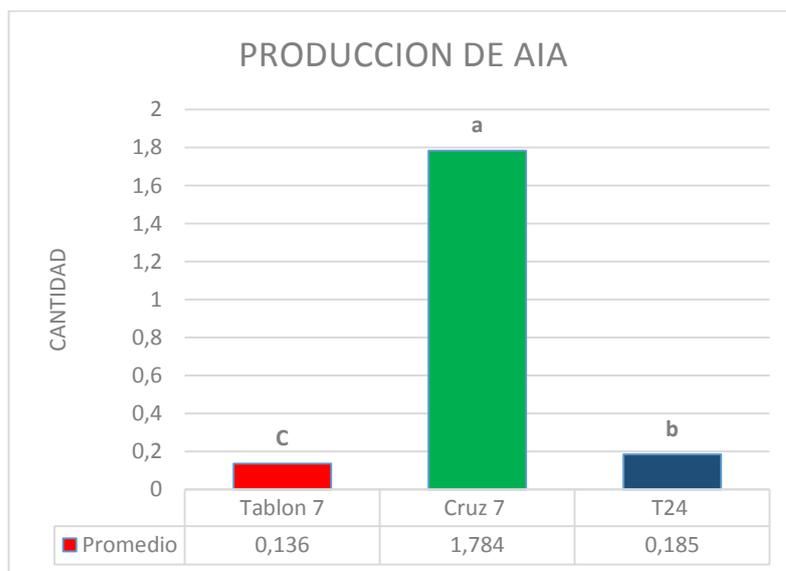


Figura 3. Producción de ácido 3-indol-acético (AIA), de cada aislado rizosférico a las 72 horas de evaluación.

- Prueba de solubilización de fosfatos.

En cuanto al comportamiento de los aislados rizosféricos la cepa 5 *Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium* sp. con respecto a la formación del halo de 5,06 cm, lo que significa que tiene la mayor capacidad de solubilización de fósforo inorgánico.

### 4.3. Validar el efecto de los mejores aislados, mediante la aplicación de biopreparados bajo invernadero.

En la figura 4 se muestra los resultados para la variable altura de la planta de papa. A los 15, 30, 45, 60 y 75 días después de la siembra (DDS) el crecimiento de las plantas es uniforme, ningún de los tratamientos influye positivamente para esta variable evaluada. Sin embargo a los 90 DDS, a pesar de no haber diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, la inoculación con *Ralstonia sp* y *Ralstonia sp.+ Penicillium sp* presentan los mejores resultados frente al control absoluto y fertilización.

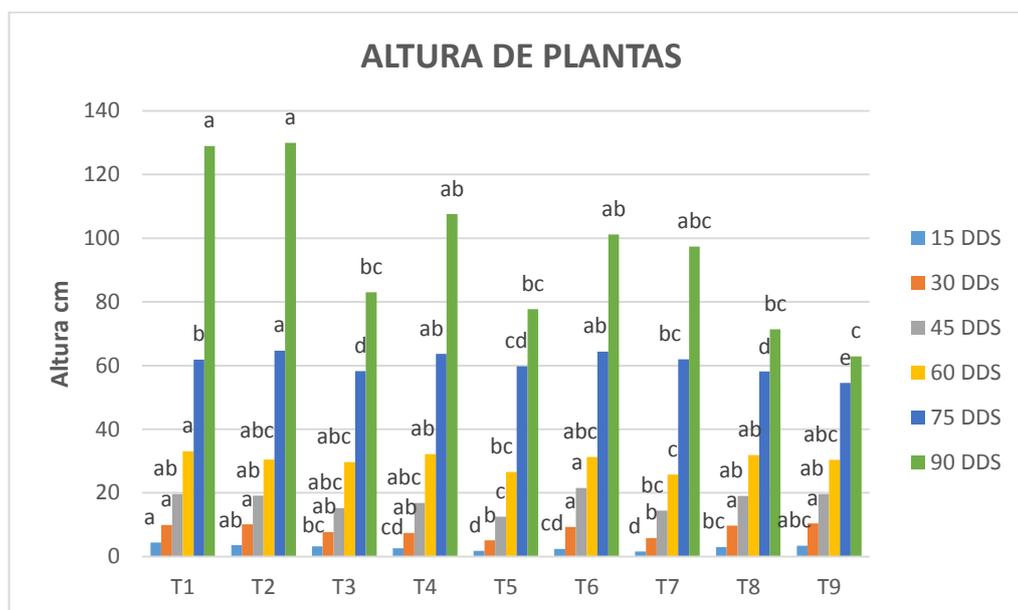


Figura 4. Evaluación de la altura de las plantas de papa a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 DDS. Tratamientos: T1 (*Ralstonia sp*), T2 (*Ralstonia sp. + Penicillium sp.*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens + Penicillium sp.*), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii + Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En la figura 5, se muestran los datos obtenidos del grosor del tallo. A los 15, 30,45, 60, 75 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 diámetro del tallo a los 15 DDS tuvo mayor influencia con la inoculación de *Ralstonia sp.* y la co-inoculación de (*Ralstonia sp.* + *Penicillium sp.*), mientras que a los 30 DDS se destaca el tratamiento (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp.*), mientras que los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas en relación a ellos, siendo el tratamiento fertilización el de menores resultados.

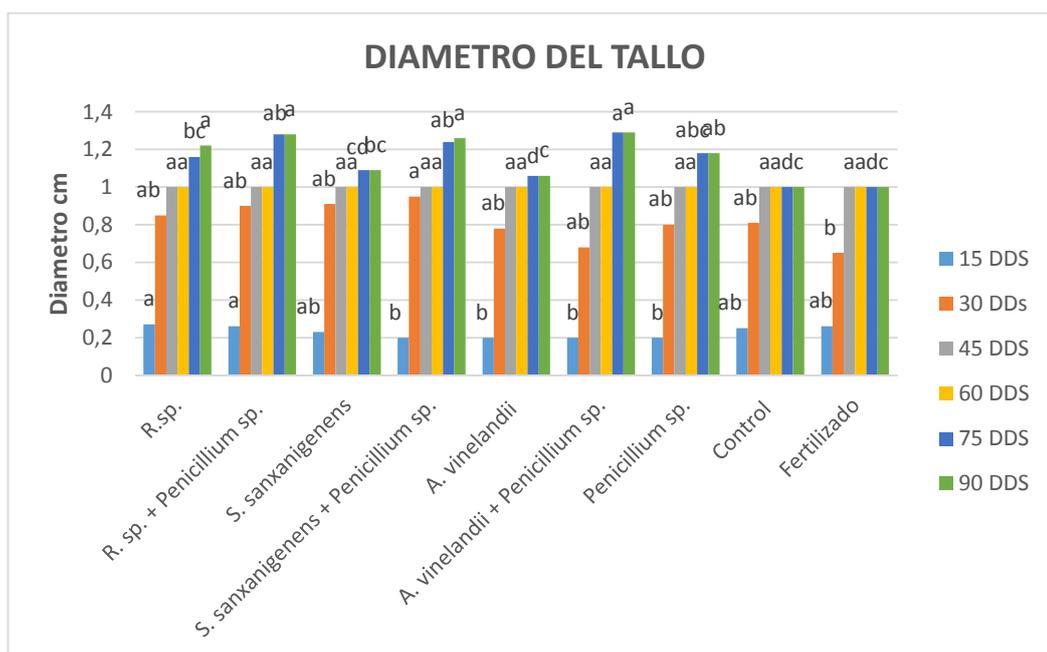


Figura 5. Grosor de tallo en el genotipo de papa a los 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS. Tratamientos: T1 (*Ralstonia sp.*), T2 (*Ralstonia sp.* + *Penicillium sp.*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp.*), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En la figura 6 se presentan los datos obtenidos del número de hojas a 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS en los cuales no se evidencia diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Sin embargo se observa que a los 15 y 30DDS el mejor tratamiento es el *R. sp. + Penicillium sp.*, con relación a los demás tratamientos.

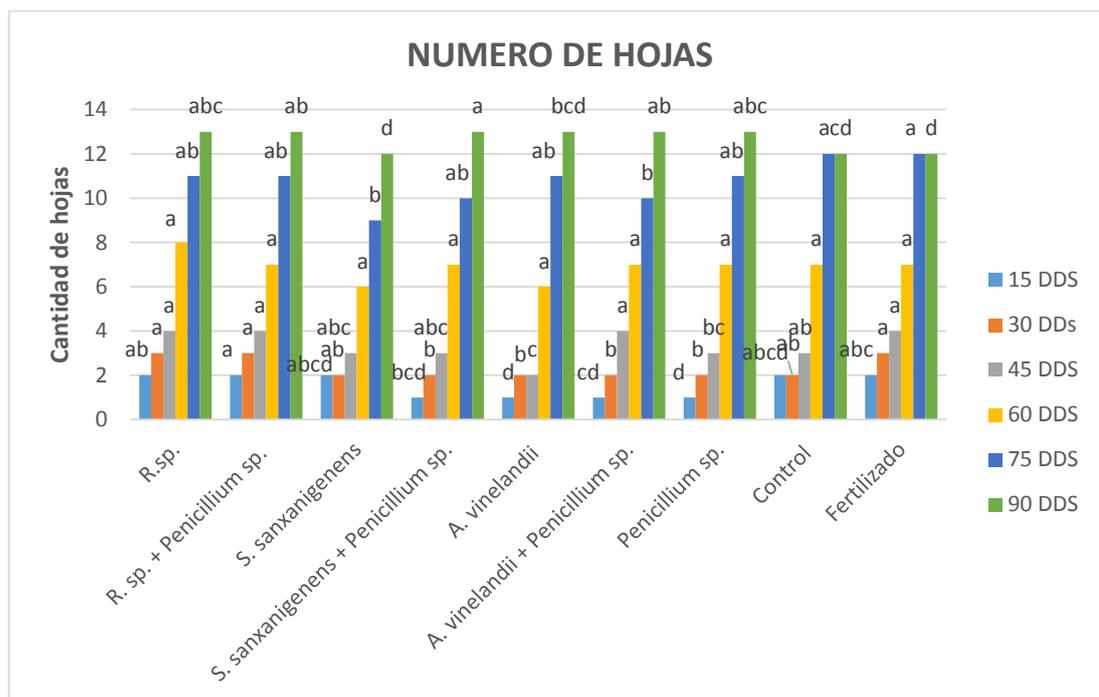


Figura 6. Número de Hojas de la planta de papa a los 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS. Tratamientos: T1 (*Ralstonia sp.*), T2 (*Ralstonia sp. + Penicillium sp.*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens + Penicillium sp.*), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii + Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En la figura 7 se refleja que en los datos obtenidos del número de tallos a 15, 30,45, 60, 75 y 90 DDS no presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

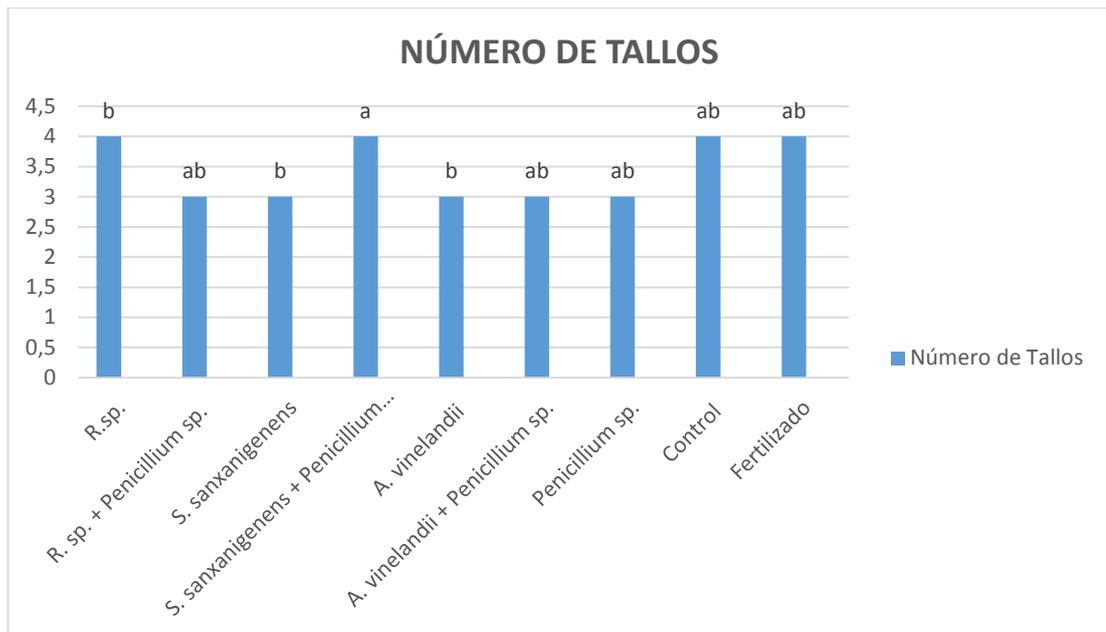


Figura 7. Número de tallos. Tratamientos: T1 (*Ralstonia sp.*), T2 (*Ralstonia sp.* + *Penicillium sp.*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp.*), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

- Análisis de biomasa.

Los valores obtenidos para el PFF (Peso fresco de follaje) tal como se detalla en la figura 8 se ve incrementado con la co-inoculación de *S. sanxanigenens* + *Penicillium sp.*, frente a los tratamientos T1, T3 y T5 no obstante con los demás tratamientos no hay diferencias estadísticas significativas. Mientras que para el PSF todos los tratamientos son homogéneos, ninguno afecta positivamente para esta variable evaluada.

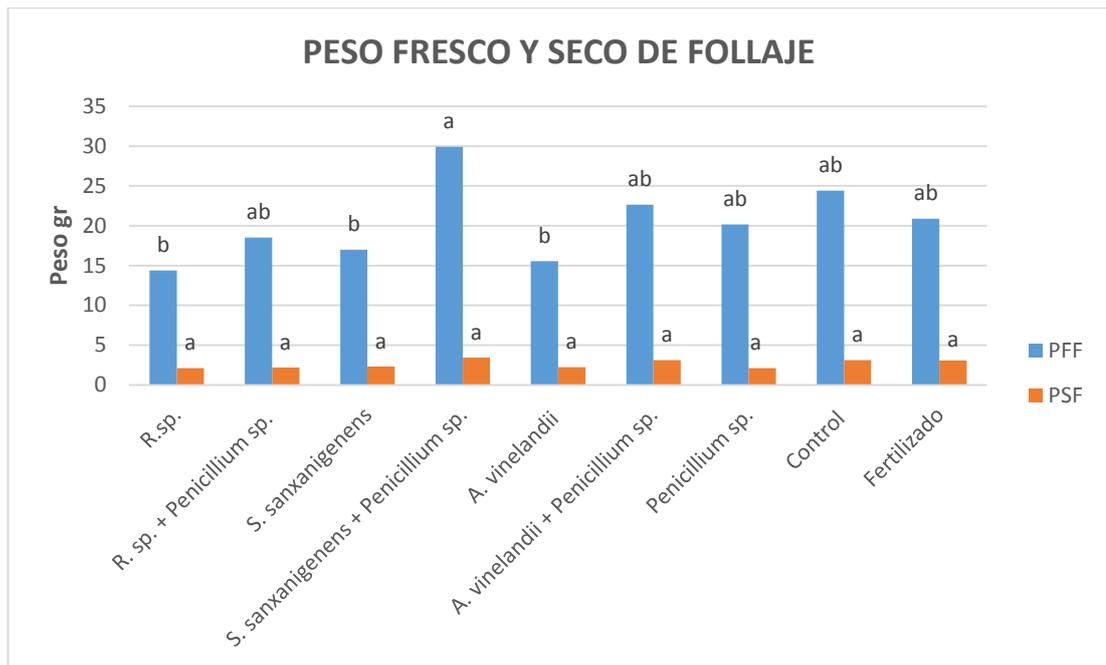


Figura 8. Peso fresco y seco del follaje (PFF y PSF) en el genotipo de papa. Tratamientos: T1 (*Ralstonia* sp), T2 (*Ralstonia* sp. + *Penicillium* sp.), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium* sp.), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

Como se detalla en la Figura 9, los valores correspondientes al PFR (Peso fresco de la raíz) para uno de los tratamientos, se evidencia que no existen diferencias estadísticas significativas, a excepción con el T7 quien presenta los valores más bajos. No así para el peso seco de la raíz (PSR) que en todos los casos los valores son homogéneos, por tanto no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados.

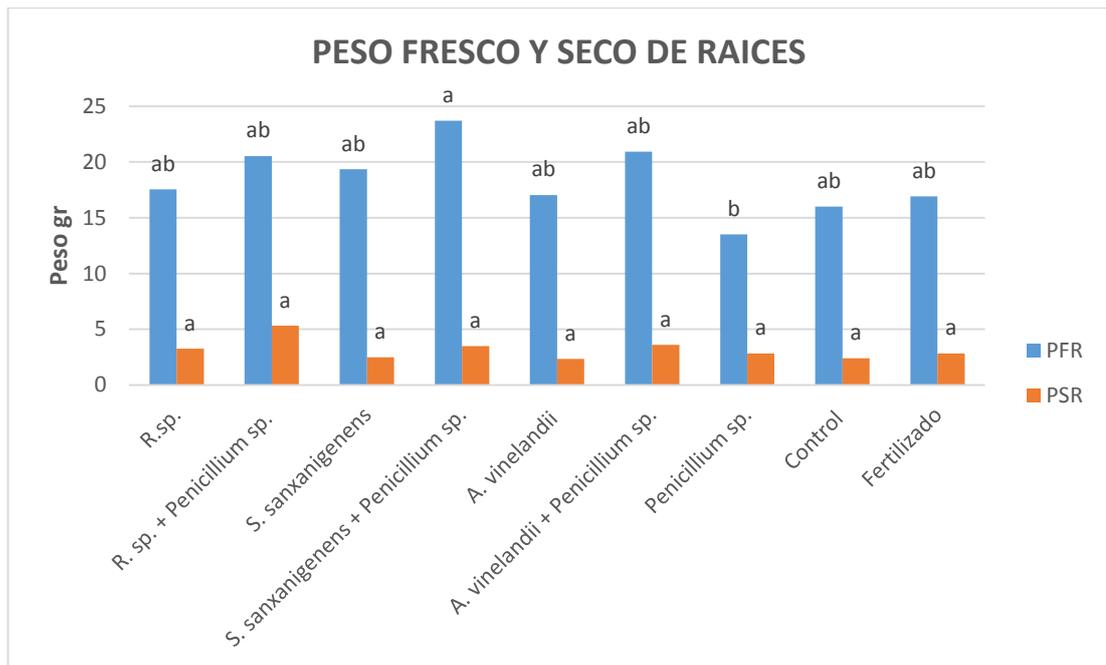


Figura 9. Peso fresco y seco de raíz en el genotipo de papa. Tratamientos: T1 (*Ralstonia sp.*), T2 (*Ralstonia sp.* + *Penicillium sp.*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium sp.*), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

#### 4.4. Comparar el efecto de la co-inoculación de los microorganismos rizosféricos sobre parámetros morfológicos, biomasa y fijación de nitrógeno en el cultivo de papa bajo en condiciones controladas.

En la figura 10 Se observa la relación de variables en la cual se puede denotar que tiene una tendencia de crecimiento lineal, es decir que al aplicar la co-inoculación de las cepas en los diferentes tratamientos el diagrama de constelación es positivo que nos dio como resultado verificar que su altura, grosor de tallo y otros factores tiene reciprocidad.

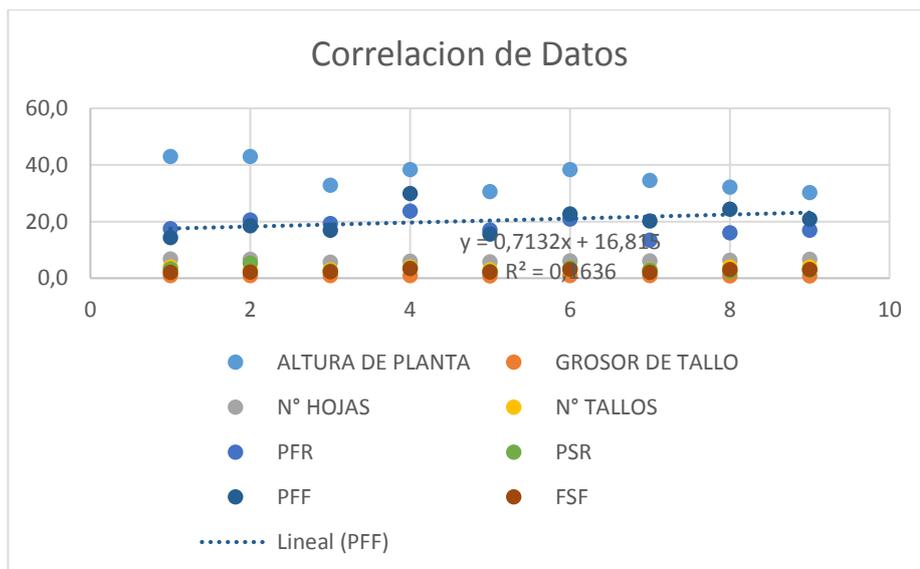


Figura 10. Cuadro de correlación de las variables en un diagrama de constelaciones.

En la tabla 3 se presenta la correlación de variables en la cual se puede denotar que tiene una tendencia de crecimiento lineal, es decir que al aplicar la co-inoculación de las cepas en los diferentes tratamientos el diagrama de constelación es positivo que nos dio como resultado verificar que su altura, grosor de tallo y otros factores tiene reciprocidad.

Cuadro N° 3. Correlación de variables

VARIABLES	ALTURA DE PLANTA	GROSOR DE TALLO	N° HOJAS	N° TALLOS	PFR	PSR	PFF	FSF
ALTURA DE PLANTA	1							
GROSOR DE TALLO	0,886323363	1						
N° HOJAS	0,482449447	0,081295225	1					
N° TALLOS	0,009463804	-0,21515796	0,47141869	1				
PFR	0,468541584	0,61710799	-0,15759855	0,04761201	1			
PSR	0,796538866	0,759631956	0,46866275	-0,18408497	0,52017942	1		
PFF	-0,040621347	0,135201791	-0,14706577	0,39615778	0,43518339	0,07408649	1	
FSF	-0,198245558	-0,155191057	-0,06846078	0,53009797	0,45131286	-0,0852854	0,86799149	1

Se observa en la Figura 11, los resultados del análisis que se realizó a las muestras con la finalidad de determinar el contenido de Nitrógeno Total, que

los tratamientos *Azotobacter vinelandii* y *A. vinelandii* + *Penicillium* sp., aon que difieren significativamente frente a los demás aislados.

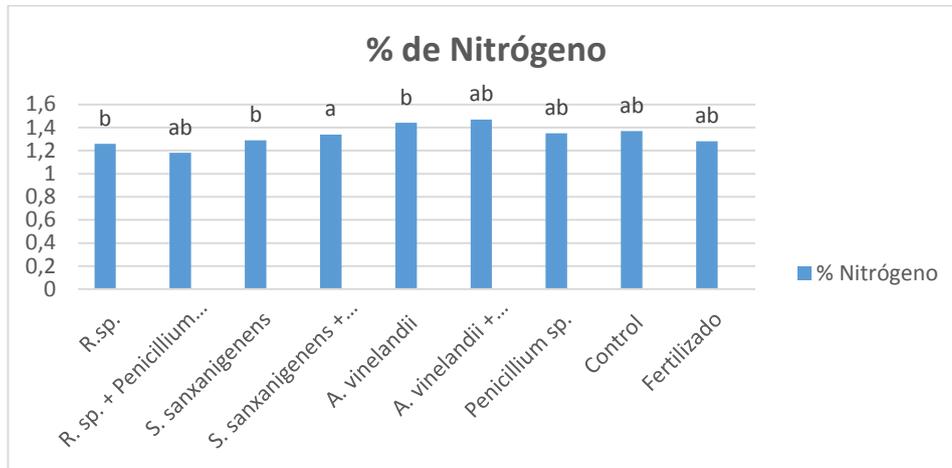


Figura 11. Relación entre las variables evaluadas. Tratamientos: T1 (*Ralstonia* sp), T2 (*Ralstonia* sp. + *Penicillium* sp.), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*), T4 (*Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium* sp.), T5 (*Azotobacter vinelandii*), T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium*), T7 (*Penicillium*) T8 (Control), T9 (Fertilización). Letras desiguales sobre las barras difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

## 5. DISCUSIÓN

Mediante el aislamiento se identificaron dos géneros de bacterias diazótrofes *Azotobacter*, *Sphingomonas*, *Pseudonamoas* (Rodríguez, 2003). Mientras que se inocularon en medios Asbby y Sobouraud donde se logró determinar que fueron capaces de producir un halo alrededor de las colonias, datos que concuerdan con (Azcón y Barea, 1997; Atlas, 2012; Nautiyal *et al.*, 2000).

Todos los aislados rizosféricos tuvieron efecto positivo, es decir, la capacidad de producir AIA, el aislado T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*) es el que produce mayor cantidad de ácido-indol-acético, con valores de 1,784 ug ml<sup>-1</sup> en 75 horas, seguida de T1 (*Ralstonia sp.*) y T5 (*Azotobacter vinelandii*) que se encuentran en una producción de AIA de 0,136 y 0,185 ug ml<sup>-1</sup> respectivamente, los cuales difieren estadísticamente con el resto de tratamientos. El AIA producido por las cepas inoculadas es el principal metabolito que induce el crecimiento de las plantas, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos, efectos que se ven reflejados en un mayor contenido de biomasa, resultados similares reporta (Patten y Glick, 1996) ya que las cepas evaluadas que presentan los valores más altos de AIA han tenido un resultado eficaz para las plantas. Las cepas que se co-inocularon para evaluar la variable altura de la planta, grosor de tallo y número de tallos se observó una respuesta efectiva con valores encontrados, que el T1(*Ralstonia sp.*), T2 (*Ralstonia sp.* + *Penicillium sp*), T3 (*Sphingomonas sanxanigenens*) con plantas de mayor tamaño de 130cm, 129cm, 83cm respectivamente, valores estadísticamente significativos en comparación con

los demás tratamientos evaluados, para el grosor del tallo los valores encontrados no presentan diferencia significativa. Los de mayores resultados al igual que en el número de hojas, 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 fitohormonas (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2014), evento que pudo darse con la cepa de *Azotobacter*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* al promover mayor número de hojas. Para las variables PFR y PFF a los 90 DDS presentan diferencia estadísticas en todos los tratamientos evaluados, pero se logró determinar que el tratamiento T4 (*Sphingomonas sanxanigenens*) y T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium sp.*) con un valores de 23,7 de 20,93 g que se obtuvo los mejores resultados. Los reguladores de crecimiento moléculas que afectan al desarrollo y crecimiento vegetal (Kamara, 2001) lo que ocasionan un mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo, de la misma manera se manifiesta valores significativos para PSR y PSF el tratamiento de T4 (*Sphingomonas sanxanigenens*) y T6 (*Azotobacter vinelandii* + *Penicillium sp.*) que alcanzaron pesos de 3,61 y 3,42 respectivamente frente al tratamiento fertilizante nitrogenado. La correlación de variables se puede denotar que tiene una tendencia de crecimiento lineal, al realizar la co-inoculación de las cepas en los diferentes tratamientos el diagrama de constelación es positivo. Para la determinación del contenido de nitrógeno total sobresale la inoculación con el tratamiento T5 (*Azotobacter vinelandii*) y T6 (*A. vinelandii* + *Penicillium sp.*) Difieren significativamente frente a las demás cepas (Zahir, 2004) ocasionando una mayor fijación del mismo.

## 6. CONCLUSIONES

- ✓ El aislado que presentó mayor capacidad para producir ácido indólic (AIA) es, *Shingomonas sanxanigenens* con un valor de 1,784  $\mu\text{g ml}^{-1}$  seguido de *Azotobacter vinelandii* y *Ralstonia* sp., con valores que van de 0,185 y 0,136  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente.
- ✓ Las cepa aislada que tuvo mayor capacidad para solubilizar fósforo in vitro en especial es *Sphingomonas sanxanigenens* + *Penicillium* sp.
- ✓ Los aislados como *Ralstonia* sp., *Ralstonia* + *Penicillium* sp, *Shingomonas sanxanigenens* + *Penicillium*, *Azotobacter vinelandii* + *Penicillium* son los mejores resultados que se originaron en los parámetros de crecimiento de la planta como altura, grosor del tallo, número de hojas y tallos.
- ✓ Para los parámetros de biomasa, las variables peso fresco de la raíz y fresco del follaje se vieron estimulados con la inoculación de *Azotobacter vinelandii*. frente a los tratamientos de control y fertilización que presentaron los valores más bajos.

## **7. RECOMENDACIÓN**

- Evaluar el efecto de las bacterias diazotróficas en otras variedades de papa, para obtener mayor información en esta rama, que permita producir un bioinoculante eficiente para este cultivo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M. (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editores, México. 234-362.
- Aguirre Z. (2000). Guía para el estudio de las principales familias botánicas de la Region Sur del Ecuador. Departamento de Botánica y Ecología. Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador.
- Arciniega V., (2007). Análisis de la Producción de Papa Bolona utilizando abonos orgánicos en Carigàn – Loja. Tesis de Ingeniero en Administración y Producción Agropecuaria. Universidad Nacional de Loja. Loja – Ecuador.
- Ardila, N. (2006). “Fijación de Nitrógeno atmosférico”. Plant Soil 43:609-619. Disponible en: [http://www.agriculturasensitiva.com/n\\_atmosferico.htm](http://www.agriculturasensitiva.com/n_atmosferico.htm).
- Arshad, M., y Frankenberger Jr., W.T. 1991. Microbial production of plant hormones. Plant and Soil. 133:1-8. Arshad, M., and Frankenberger Jr., W.T. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. Advances in Agronomy. 62:45-15.
- Arteca, R. N. 1996. Plant growth substances: principles and applications. Primera edición. Chapman & Hall. Pennsylvania, USA. 332p.
- Atlas RM. (2012). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4a ed. Pearson Educación SA. Madrid, España pp. 429-430.
- Azcón-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S., Vallejo R., y Barea JM. (2002). Analysis of the mycorrhizal potential in the rizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. Applied Soil Ecology. 21: 1-9.
- Azcón R, y Barea JM. (1997). Mycorrhizal dependency of a representative plant species in a Mediterranean shrublands (*Lavanduca spica* L.) as key factor to its use for revegetation strategies in a desertification-threatened areas. Applied Soil Ecology 7: 83-92
- Bak S., Tax F., Feldmann K., Galbraith D., y Feyereisen R., (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin

- and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 13: 101–111.
- Behl, R., Narula, N., VasudevA, M., Sato, A., Shinano, T., y Osaki, M. (2006). Harnessing wheat genotypex Azotobacter strain interactions for sustainable wheat production in semiarid tropics. *Tropics* 15(1):121-133. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Bolán NS. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plan Soil*. 134:189-207.
- Bowen, J., y 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. Bogota. 28-29.
- Carrillo, P., Moreno, J. D., Franco, B., y Fierro, L. H. (2003). Manual de papa para productores. Bucaramanga-Colombia:32-34.
- Castillo, G.; Altuna, B.; Michelena, G.; Sánchez, J., Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, 27: 137-142.
- Cuesta, A., Monsalve, J., Mesa, M., Zapata , A., y Trujilo , M. (2006). Estrategias de cultivos en la produccion de alginatos por Azotobacter vinelandii. Colombia: s/n.
- Chen Y., Rekha P., Arun A., Shen F., Lai W., y Young C., (2006). Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33–41.
- Delgado, L., García R. y García. (1999). Marchitez bacteriana del tomate causado por el biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado Mérida, Venezuela. *Forest*. 43(2):183-189.
- Delgado Y., Cupull R., Pérez C., Sánchez, A. y Vilchez, M. (2003). “Efecto de Azotobacter sp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabiga* L”. *Centro Agrícola*. Año 30. No. 1. p 26-31.

- Devaux, A., Andrade Piedra, J., Ordinola, M., Velasco, C., Hareau, G., López, G., Rojas, A., Flores, P., Fonseca, C., y Kromann, P. (2012). Agricultura, seguridad alimentaria y nutrición en los Andes: Potenciales aportes de la innovación en papa. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/109071510/Agricultura-seguridad-alimentaria-y-nutricion-en-los-Andes-Potenciales-aportes-de-la-innovacion-en-papa>.
- Enya J., Shinohara S., Tsukiboshi T., Negishi H., Sumaya K. y Tsushima S. (2007). Culturable Leaf-Associated Bacteria on Tomato Plants and Their Potential as Biological Control Agents. *Microbial Ecology* 53: 524–536. Disponible en línea: [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2050/Reenteria\\_%20Gomez\\_A\\_MC\\_Edafologia\\_2013.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2050/Reenteria_%20Gomez_A_MC_Edafologia_2013.pdf?sequence=1).
- Esquivel-Cote, R., Ramírez-Gama, R. M., Tsuzuki-Reyes, G., Orozco-Segovia, A., y Huante, P. (2010). *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and soil*, 337(1-2), 65-75.
- Garrido, O., Borgues, E., Meisy, C., López, R., Valle, L. y Escobar, R. (2014). Endoftalmitis poscirugía de catarata por *Sphingomonas paucimobilis*. *Rev Cubana Oftalmol* vol.27 no.2 Ciudad de la Habana Disponible en línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21762014000200014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762014000200014).
- Giletto, C., Rattin J., Echeverría H. y Caldiz D. (2011). Requerimiento de nitrógeno para alcanzar máximo rendimiento y calidad en variedades industriales de papa. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias. Cuyo.* 43(1):8595.
- Gonzales, F. (2011). Contaminacion por Fertilizantes: Un serio problema ambiental. *Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible*, pág. 4.
- González C., Carballo O., Acanda S., Carballo N., Remigio A., Pérez G.; Fernández, N., Hernández, Y., Mancebo, A., y Bada, A. 2001.

- "Evaluación del Dimargon durante un ensayo Ecotoxicológico".  
Revista de Toxicología. año/vol 18. Número 003. España. p157.
- González González, R. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter*, y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo en maíz, variedad INIAP 182, en la Estación Experimental. La Argelia. Loja-Ecuador.
- Graham, P., y Vance, C. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 872-877.
- Hernandez-Rodriguez, A., Heydrich, M., Diallo, B., El Jaziri, M., y Vansaputte, O. (2011). Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regul*, 191-197.
- Hernandez-Rodriguez, A., Heydrich M., Diaz A., Rivez N., y Vera. L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul*, 1-10.
- Hull A., Vij R., y Celenza J..(2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97: 2379–2384.
- Hussain A., Arshad T., Hussain M. y Hussain A. (1987). Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biol Fertil Soil* 4:73-77. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Jimenez , D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal 16S. Colombia. 19-22
- Joint Genome Institute(JGI). (2009). "Taxon Details". Consultado el 4 de julio del 2014 Disponible en línea: [http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon\\_oid=638341010](http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=638341010).

- Kamara A. (2001). Nutrición, Regulación del Crecimiento y Desarrollo Vegetal. Integración de Tecnológicos y Recomendaciones Agropecuarias de Kamara. [online] [http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia\\_04.pdf](http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia_04.pdf).
- Kannaiyan S., Govindarajan K. y Lewin H. (1980). Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant Soil* 56:487-490. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Kennedy R., Choudhury A. y Kecskés, L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biol Biochem* 36:1229-1244. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Kizilkaya, R. (2008). Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol Eng* 33:150-156. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Martinez, V., Moreno, J., De la rubia, T., y González, J. (1988). Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil*. 110:149-152. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Ludwig-Müller J y Cohen J., (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115: 320–329.
- Meza E. (2005). Producción de papa con semilla sexual (ANAF AE). Honduras: 10-16.

- Nascimbém, A., Galdiano, J., Campanharo, C., Carareto, A., y Macedo, L. (2010). Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. *Bragantia* 69:123-132. Disponible en línea: [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2050/Reentria\\_%20Gomez\\_A\\_MC\\_Edafologia\\_2013.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2050/Reentria_%20Gomez_A_MC_Edafologia_2013.pdf?sequence=1)
- Nautiyal SC. (1999). An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170:265-270.
- Nautiyal S., Bhaduria S., Kumar P., Lal H., Mondal R., y Verma D. (2000). Stress Induced Phosphate Solubilization in Bacteria Isolated from Alkaline Soils. *Microbiology Letters*. 182:291-296.
- Normanly J., Grisafi P., Fink G., y Bartel B., (1997). Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *The Plant Cell* 9: 1781–1790.
- Ouyang J, X Shao y J L.(2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24:327–333.
- Orbe D., Salazar D., Suarez M., Villafuerte W., y Cauchan M., (2013). (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador obtenido de [http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com\\_content&view=article&id=103&Itemid.75](http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid.75).
- Ozanne PG. (1980). Phosphate nutrition of plant - A general treatise. En: *The role of phosphorus in agriculture*. FE Khasawneh, EC Sample, EJ Kamprath, Eds. ASA-CSSA-SSSA, Madison, W.I.pp 559-589.
- Pandey, A., Sharma, E., y Palmi, L. (1998). Influencia de la inoculación bacteriana en el maíz en los sistemas agrícolas de las tierras altas del Sikkim Himalaya. *Biología del suelo y bioquímica*, 379-384.
- Pandey, A., y Kumar, S. (1990). Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on a range of rhizosphere fungi. *India Journal of Experimental Biology*, 52-54.
- Patten C. y Glick B. (1996). Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.

- Pertuz , S. L., y León Sicard, T. E. (2013). Aspectos ambientales de la cadena productiva de la Papa (*Solanum tuberosum* L) en zona rural de la localidad Ciudad Bolívar de Bogotá D.C., relacionados con la contaminación química del tubérculo con plaguicidas organofosforados y carbomatos. *Desarrollo y Ambiente: Contribuciones teóricas y metodológicas*, 412.
- Pollmann S, D Neu y Ew Weiler. 2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62: 293–300.
- Pozo T, (2013). Producción de papa, Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (SINAGAP), Quito-Ecuador..
- Rodríguez, D., Urrego, L., Martínez , P., y Bernal , J. (2003). Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aislado de bosque alto andino cundinamarqués. En J. A. Javier, *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp.*, mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S (pág. 28). Bogotá: 24-29.
- Rojas , M., Larrea, J., Mahillon, J., y Heydrich, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. bras de Agroecología*, 90-99.
- Sabra, W., Zeng, A., y Deckwer, W. (2001). Alginato bacteriana: la fisiología, la calidad del producto y aspectos del proceso. *Appl Microbiol Biotechnol*. Lima:315-325.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. y Zuberer, D. (2005). "Principles and Applications of Soil Microbiology". Segunda Edición, Editorial Pearson Prentice Hall, USA, pp 373-389.
- Stewart J. y Sharpley A.. (1987). Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulfur. IN: *Soil Fertility and Organic matter as critical components on production systems*. Soil Science Society of America, St. Paul, 33:221–234.

- Tudzinski, B. y Sharon, A. 2002. Byosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. *The mycota*. 183-205 Tsavkelova A., Klimova S., y Cherdyntseva, T. AND Netrusov A. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42:117-126. Consultados julio 4. 2015. Disponible en línea: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/285/1/tesis.pdf>.
- Xia, Y., Min G., Rao, Z., Luv, J., Liu, X., y Duan, J. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation* 16: 393–402. European y Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004. Diagnostic protocols for regulated pest. *Bulletin* 34:155-157. Disponible en línea: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/285/1/tesis.pdf>
- Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta, H., y Nishiuchi Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 39(11), 897-904.
- Zahir AZ., Arshad M., y Frankenbeg WT., (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*. 81:97-108.
- Zaidi A., Khan M., Ahemad M., y Oves M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zambre M., Konde K., y Sona R, (1984) Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. *Plant Soil* 79:61-67. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de compatibilidad de los aislados rizosféricos

Aislados	Crecimiento*		Halo (cm)
	Bacteria	Hongo	
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Ralstonia</i> sp.	+	+	2,10
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	+	+	2,10
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 5) + <i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	+++	+++	5,06
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Ralstonia</i> sp.	+	+	2,76
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	+	+	2,46
<i>Penicillium</i> sp. (cepa 13) + <i>Sphingomonas sanxanigenens</i> .	+++	+++	4,62

\*Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante.

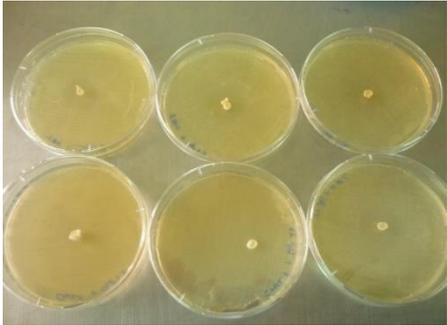
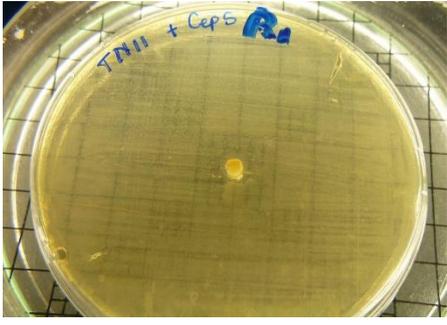
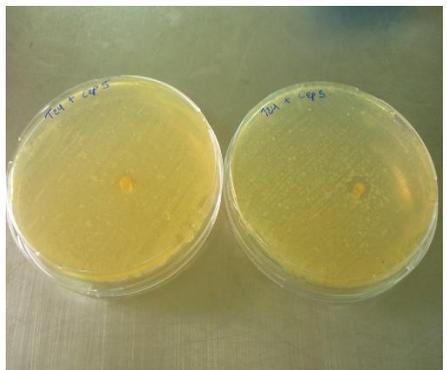
**Anexos 2. Altura, grosor de tallo y número de hojas de la planta del cultivo de papa variedad bolona a los 15,30,45,60,75,90 DDS.**

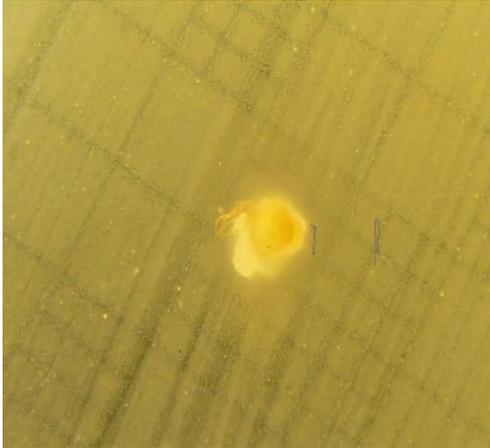
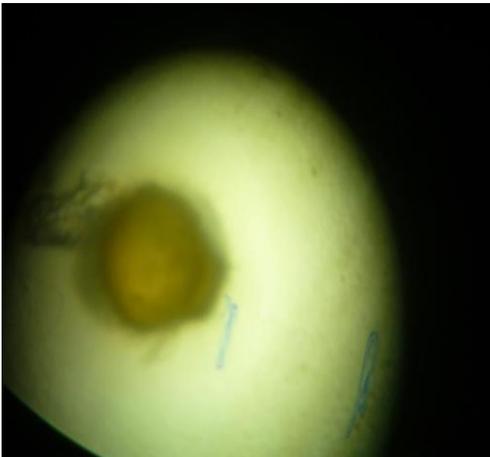
<b>Promedios de altura de las plantas(cm)</b>						
Tratamientos	15 DDS	30 DDS	45 DDS	60 DDS	75 DDS	90 DDS
TN	4,34	9,9	19,6	33,1	61,9	129
TN+H	3,55	10,1	19,1	30,5	64,7	130
Cr	3,19	7,7	15,2	29,7	58,2	83
Cr+H	2,55	7,4	16,8	32,2	63,7	107,6
P	1,77	5,1	12,5	26,5	59,8	77,7
P+H	2,38	9,3	21,5	31,3	64,1	101,2
H	1,55	5,8	14,4	25,7	62	97,4
Control	2,96	9,7	19	31,9	58,1	71,4
Fertilización	3,39	10,4	19,6	30,4	54,5	62,9
<b>Promedios de grosor de tallo de las plantas(cm)</b>						
	15 DDS	30 DDS	45 DDS	60 DDS	75 DDS	90 DDS
TN	0,27	0,85	1	1	1,16	1,22
TN+H	0,26	0,9	1	1	1,28	1,28
Cr	0,23	0,91	1	1	1,09	1,09
Cr+H	0,2	0,95	1	1	1,24	1,26
P	0,2	0,78	1	1	1,06	1,06
P+H	0,2	0,68	1	1	1,29	1,29
H	0,2	0,8	1	1	1,18	1,18
Control	0,25	0,81	1	1	1	1
Fertilización	0,26	0,65	1	1	1	1
<b>Promedios de número de hojas en las plantas(cm)</b>						
	15 DDS	30 DDS	45 DDS	60 DDS	75 DDS	90 DDS
TN	2	3	4	8	11	13
TN+H	2	3	4	7	11	13
Cr	2	2	3	6	9	12
Cr+H	1	2	3	7	10	13
P	1	2	2	6	11	13
P+H	1	2	4	7	10	13
H	1	2	3	7	11	13
Control	2	2	3	7	12	12
Fertilización	2	3	4	7	12	12

**Anexos 3. Peso fresco y seco de la Raíz, Peso fresco y seco del follaje en el cultivo de papa variedad bolona a los 15,30,45,60,75,90 DDS, y número de tallos.**

Tratamientos	Peso de la planta (gramos)				N° de Tallos
	Peso fresco de follaje	Peso fresco de raíz	Peso seco de follaje	Peso seco de raíz	
TN	14,4	17,55	2,1	3,25	4
TN+H	18,5	20,53	2,18	5,31	3
Cr	16,98	19,36	2,31	2,47	3
Cr+H	29,9	23,7	3,42	3,49	4
P	15,54	17,04	2,23	2,35	3
P+H	22,65	20,93	3,1	3,61	3
H	20,17	13,5	2,11	2,83	3
Control	24,24	16,01	3,11	2,39	4
Fertilización	20,89	16,93	3,06	2,83	4

#### Anexos 4.Montaje del ensayo

CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS		
N°	Imagen	Descripción
12		Aislamientos de Hongos y Bacterias elaborados en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja
13		Preparación de muestras para la cuantificación de AIA
14		Solubilización de Fosforo

15		Observación de presencia de AIA
16		Medio de Cultivo de Bacteria – Hongo Medicion del halo del Hongo <i>Penicillium sp</i>
17		Observaciones en el Microscopio de los medios de cultivo.

## MONTAJE DEL EXPERIMENTO

18



Preparación de sustrato (esterilización)

19



Montaje del experimento e identificación de macetas

20

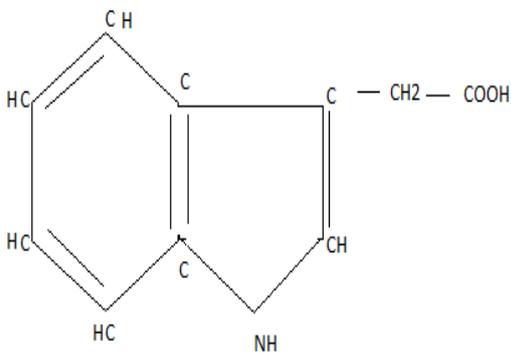
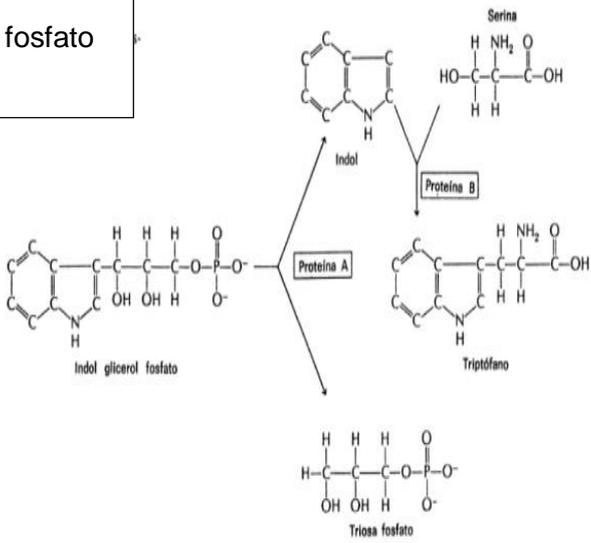


Siembra del cultivo de papa.

<p>21</p>		<p>Riego de las plantas de papa</p>
<p>22</p>		<p>Tutorado del cultivo de papa.</p>
<p>23</p>		<p>Toma de Datos de las plantas de papa de los diferentes tratamientos</p>

<p>24</p>		<p>Levantamiento del experimento sacado de plantas y observación de presencia de tubérculos en las macetas.</p>
<p>25</p>		<p>Peso de muestras de plantas de papa en el Laboratorio de Biotecnología.</p>

## Anexos 5. Fórmulas químicas

N°	Imagen	Descripción
26	<p style="text-align: center;">AIA</p> 	<p>Ácido indol acético (AIA), su fórmula: <math>C_{10}H_9NO_2</math> (Esquivel <i>et al.</i>, 2010).</p>
27	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 10px;"> <p>Ácido indol - glicerol fosfato</p> </div>  <p style="text-align: right; font-size: small;">Copyrighted material</p>	<p>Conversión del ácido indol - glicerol fosfato a triptófano (Jenkins, 1985).</p>