

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Rhizobium* sp EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILLD.) VARIEDAD SALCEDO – INIA HASTA LA APARICIÓN DE DOS HOJAS VERDADERAS EN CONDICIONES *in vitro*

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

Br. GUSTAVO SILVERIO MAMANI ROJAS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**PUNO PERÚ**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Rhizobium* sp EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILLD.) VARIEDAD SALCEDO – INIA HASTA LA APARICIÓN DE DOS HOJAS VERDADERAS EN CONDICIONES *in vitro*

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

Br. GUSTAVO SILVERIO MAMANI ROJAS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA



**APROBADA POR:**

**PRESIDENTE**

.....  
Mg. MARTHA ELIZABETH APARICIO SAAVEDRA

**PRIMER MIEMBRO**

.....  
Blgo. HERMINIO RENÉ ALFARO TAPIA

**SEGUNDO MIEMBRO**

.....  
Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

**ASESOR DE TESIS**

.....  
Dr. Sc. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

Fecha de sustentación, 26/07/2019.

**Área :** Ciencias Biomédicas

**Tema:** Biotecnología Microbiana y Vegetal

## URKUND

## Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS EFECTO DE LA INOCULACION DE Rhizobium sp EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (Chenopodium quinoa WILLD) VARIEDAD SALCEDO - INIA HASTA LA APARICION DE DOS HOJAS VERDADERAS EN CONDICIONES IN VITRO.pdf (D61749666)

Submitted: 12/31/2019 6:05:00 PM

Submitted By: acanales@unap.edu.pe

Significance: 18 %

## Sources included in the report:

TESIS BIOL GUSTAVO ultimo corregido imprimir.pdf (D61739810)

TESIS BIOL TANIA rev sin REF BIBLIOG 2 urk.docx (D60335044)

<https://www.semanticscholar.org/paper/Est-tudiantil-Versi%C3%B3n-Estudiantil-Versi%C3%B3n-V-AlonsoV.-Pereyra/70f6be94cfc684ffdbeda0357421f5dfdde1b247/figure/1>

<https://funcionestadistica.jimdo.com/app/download/11893773157/Unidad+2+PSICO+%2528Medidas+de+posici%C3%B3n%2529+2018.pdf?t=1543257067>

<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/952/Tesis.pdf>

<https://www.redalyc.org/service/r2020/downloadPdf/341/34100207/1>

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/824/cien25.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<https://www.pag.org.mx/index.php/PAG/article/view/659/828>

[https://www.researchgate.net/publication/298069900\\_Aislamiento\\_de\\_cepas\\_de\\_Rhizobium\\_spp\\_asociados\\_a\\_dos\\_leguminosas\\_forrajeras\\_en\\_el\\_Centro\\_Biotecnologico\\_del\\_Caribe\\_Isolation\\_of\\_Rhizobium\\_spp\\_associated\\_two\\_forage\\_leguminous\\_in\\_the\\_Caribbean\\_Biotech](https://www.researchgate.net/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobium_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forrajeras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Caribe_Isolation_of_Rhizobium_spp_associated_two_forage_leguminous_in_the_Caribbean_Biotech)

<https://ishareslide.net/document/universidad-nacional-del-altiplano-facultad-de-ciencias-biologicas-escuela-profesional-de-biologia>

<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13207/T-2408.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

## Instances where selected sources appear:

40

## DEDICATORIA

A Dios, por permitirme y darme la oportunidad de vivir en este mundo maravilloso, por brindarle sentido a mi vida y acompañarme en todo momento de ella, por la gracia infinita de su amor y bendición.

Mis padres, Silverio y Constantina, por su amor impartido, su lucha incesante ante las adversidades y el apoyo incondicional y afable, en su labor de mi formación profesional para con la sociedad.

Mis hermanos, Maledaine, Gutemberg y Ángel por influir en mis aspiraciones futuras, su apoyo moral, valores y conocimientos compartidos.

Mis familiares; mis abuelitos(as), tíos(as), primos(as), por los consejos, ideas, gestos y acciones de sueños e ideales conseguidos y por advenir.

Mis docentes de la facultad de ciencias biológicas, por la impartir con sapiencia los conocimientos y valores que enmarcan el futuro de la investigación para el desarrollo de la ciencia.

Amigos y compañeros, por su amistad brindada, de inolvidables sueños de un futuro sustentable por alcanzar y por influir en muchas acciones y metas aún por conseguir, compartiendo valores y enseñanzas en esta casa superior de estudios.

Adquiere sabiduría, adquiere inteligencia, no te olvides ni te apartes de las razones. (Proverbios 4:5)

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su infinita gracia, por iluminar y guiar mi camino por el sendero correcto e influir en muchas de mis decisiones y acciones; por mostrarnos una naturaleza sabia y misteriosa; por poner en mi camino a todas las personas que con respeto y cariño recordare siempre.

Mis padres, Constantina y Silverio por compartir sus experiencias, forjarme valores y acompañarme en lo largo de mi camino, por su apoyo incondicional, consejos incesantes y por mostrar acciones inquebrantables de fortaleza ante las adversidades de la vida.

A Mis hermanos, Maledaine, por su gran apoyo moral con ejemplo de perseverancia, valor y coraje; Gutenberg y Ángel, por demostrarme la constancia de sus acciones y energías inagotables de su niñez para la realización de lo deseado.

Mis familiares; mis abuelitos(as), tíos(as), primos(as), por el cariño y confianza depositada a lo largo de mi formación. Por sus consejos de superación y cambio por un mejor desarrollo.

A la Universidad, que con nostalgia dejaré de ver sus puertas de las que me abrió paso para mi formación y el conocimiento en aras para el desarrollo de la ciencia. A mi facultad que con mucha tristeza dejo sus salones donde permanecerán los recuerdos.

A mi Director de tesis, Juan José Pauro Roque, que supo guiarme y apoyarme. A mis jurados de tesis, Mg. Martha Aparicio Saavedra, Blgo. Herminio René Alfaro Tapia, Mg. Dante Mamani Sairitupac; quienes con su dedicación y tiempo brindado en pro de la investigación y desarrollo supieron pulir con sus observaciones y sabiduría para la realización y culminación del presente trabajo.

Mis Docentes de la facultad de ciencias biológicas, que impartieron sus conocimientos, valores y enseñanzas en el trayecto de mi formación profesional para con la sociedad y con la exigencia que demanda en estos tiempos de globalización.

A Mis Amigos y compañeros, Jaimes, Richard, Nilo, Carlos, Jhon, Marco, Lisbeth, Yudith, entre otros que con mucho cariño y simpatía compartimos mucho en dentro y fuera de las aulas de la universidad.

Un agradecimiento muy especial a la mejor amiga y compañera que llegó y forma parte de mi vida, que con su alegría, humildad y sencillez y que con mucho cariño y empatía supo apoyarme en las distintas etapas para la realización de la misma. Celeste.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.1 Objetivo General: .....	14
1.2 Objetivos Específicos: .....	14
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Antecedentes .....	15
2.2 Marco teórico .....	18
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Tamaño de muestra .....	25
3.2 Tipo de estudio .....	25
3.3 Determinación del efecto de las bacterias <i>Rhizobium</i> sp en el proceso de germinación <i>in vitro</i> de semillas de quinua .....	25
3.3.1 Frecuencia y muestreo .....	25
3.3.2 Descripción detallada de los equipos y materiales por objetivo específico .....	25
3.3.3 Variables que se analizó .....	28
3.3.4 Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis .....	28
3.4 Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium</i> sp en el crecimiento de	

plantas de quinua . . . . .	28
3.4.1 Frecuencia y muestreo . . . . .	28
3.4.2 Descripción detallada de los equipos y materiales por objetivo específico . . . . .	29
3.4.3 Variables que se analizó . . . . .	30
3.4.4 Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis . . . . .	30
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>32</b>
4.1 Efecto de las bacterias <i>Rhizobium</i> sp en el proceso de germinación <i>in vitro</i> de semillas de quinua . . . . .	32
4.2 Efecto <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium</i> sp en el crecimiento de plantas de quinua .	36
<b>V. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>42</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES . . . . .</b>	<b>43</b>
<b>VII. REFERENCIAS . . . . .</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS . . . . .</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Individuo de quinua variedad Salcedo INIA.....	26
<b>Figura 2.</b> Fases fenológicas del cultivo de la quinua, la línea roja indica hasta que etapa se realizó la investigación.....	29
<b>Figura 3.</b> Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp en la germinación de semillas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.....	33
<b>Figura 4.</b> Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp en la longitud de los tallos de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.....	38
<b>Figura 5.</b> Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp en la longitud de las raíces de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre 2017. ....	39
<b>Figura 6.</b> Cultivo de alfalfa en la localidad del centro poblado Moro Orcco del distrito de Azángaro durante los meses de julio a setiembre del 2017.....	52
<b>Figura 7.</b> Obtención de nódulos de <i>Rhizobium</i> sp a partir de raíces de alfalfa durante los meses de julio a setiembre del 2017. ....	52
<b>Figura 8.</b> Proceso de desinfección de semillas de quinua variedad Salcedo INIA y nódulos de alfalfa, realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.....	52
<b>Figura 9.</b> Proceso de plaqueado con agar Levadura Manitol (LMA) con azul de bromotimol y cultivo de nódulos de alfalfa, realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017. ....	53

<b>Figura 10.</b> Crecimiento de bacterias <i>Rhizobium</i> en medio de cultivo LMA.....	53
<b>Figura 11.</b> Inoculación y transferencia de semillas de quinua a tubos de ensayo conteniendo agar Knop realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.....	53
<b>Figura 12.</b> Inoculación de semillas de quinua con <i>Rhizobium</i> sp luego de 30 días de cultivo <i>in vitro</i> realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.....	54
<b>Figura 13.</b> Medición de las plantas de quinua, realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017. ....	54
<b>Figura 14.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de los porcentajes de germinación de semillas post inoculación de <i>Rhizobium</i> sp en tres concentraciones de $1.5 \times 10^8$ células/mL, $3 \times 10^8$ células/mL y $6 \times 10^8$ células/mL. ....	54
<b>Figura 15.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de longitud de tallos post inoculación de <i>Rhizobium</i> sp en concentraciones de $1.5 \times 10^8$ células/mL, $3 \times 10^8$ células/mL y $6 \times 10^8$ células/mL . ....	55
<b>Figura 16.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de longitud de raíces post inoculación de <i>Rhizobium</i> sp en tres concentraciones de $1.5 \times 10^8$ células/mL, $3 \times 10^8$ células/mL y $6 \times 10^8$ células/mL.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Plantas hospedadoras de bacterias del género <i>Rhizobium</i> sp (Carrillo,2005). 20	
<b>Tabla 2.</b> Germinación (%) de semillas de quinua inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp en tres concentraciones, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Longitud de tallos post inoculación de plantas de quinua con bacterias del género <i>Rhizobium</i> sp en tres concentraciones, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.....	37
<b>Tabla 4.</b> Longitud de raíces post inoculación de plantas de quinua con bacterias del género <i>Rhizobium</i> sp en tres concentraciones bacterianas, julio a setiembre del 2017. ....	38

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%	: porcentaje
° C	: grados centígrados
<i>et al.</i>	: y colaboradores
FCCBB	: Facultad de Ciencias Biológicas
g	: gramos
ml	: mililitro
cm	: centímetros
n	: tamaño de muestra
No	: número
R1, R2 y R3	: repeticiones 1, 2 y 3
spp	: especies
UNA – P	: Universidad Nacional del Altiplano - Puno

## RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA Puno, efectuados durante los meses de julio a setiembre del 2017. Los **objetivos** de la investigación fueron: a) determinar el efecto de las bacterias *Rhizobium* sp en el proceso de germinación *in vitro* de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la variedad Salcedo INIA, y b) evaluar el efecto *in vitro* de *Rhizobium* sp en el crecimiento de plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la variedad Salcedo INIA hasta la fase de aparición de dos hojas verdaderas, mediante la determinación de la longitud de raíces y tallos. En la **metodología** se recolectaron muestras de nódulos de alfalfa, estos pasaron por un proceso de desinfección, para posteriormente realizar el aislamiento de las bacterias del género *Rhizobium* sp en medio Agar Levadura Manitol, seguidamente se prepararon concentraciones bacterianas de *Rhizobium* sp de  $1.5 \times 10^8$  células/mL,  $3 \times 10^8$  células/mL y  $6 \times 10^8$  células/mL, las cuales fueron inoculadas a semillas no germinadas para determinar su efecto en el proceso de germinación, posteriormente se inocularon cada una de las concentraciones bacterianas a semillas post germinadas, para luego de 30 días de experimentación, determinar sus efectos en el crecimiento vegetal, mediante la determinación de la longitud de raíz y tallo. Los **resultados** fueron: Las bacterias *Rhizobium* sp originaron efectos positivos en el proceso de germinación de semillas de quinua obteniéndose promedios de germinación del 90.33% al inocular una concentración de  $6 \times 10^8$  células/ml, seguido de  $3 \times 10^8$  células/mL con 57.7% y con  $1.5 \times 10^8$  células/mL un porcentaje de germinación de 29% ( $P < 0.05$ ). Las bacterias *Rhizobium* sp originaron un mejor crecimiento de plantas de quinua post inoculación, determinándose los mejor crecimiento de tallos que se obtuvieron con una inoculación de  $6 \times 10^8$  células/mL de *Rhizobium* sp con un promedio de longitud de 14.68 cm, seguido de la concentración de  $3 \times 10^8$  células/mL con 8.93 cm como promedio, con la concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/mL con 5.61 cm, y en el control 5.87 cm ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, las mayor longitud de raíces se obtuvieron con bacterias *Rhizobium* sp en las mismas concentraciones de 1.5, 3 y  $6 \times 10^8$  células/mL que fueron 5.97 cm, 6.01 cm y 4.53 cm respectivamente y en el control 5.21 cm ( $P < 0.05$ ). Se concluye que las bacterias *Rhizobium* sp poseen un efecto positivo en la germinación y crecimiento de plantas de quinua.

**Palabras clave:** inoculante, *Rhizobium* sp, quinua, *Chenopodium quinoa*, *in vitro*.

## ABSTRACT

The research was conducted in the Alimony microbiology laboratory of the FCCBB of the UNA - Puno, carried out during the months of July to September 2017. The objectives of the research were: a) to determine the effect of *Rhizobium* sp bacteria in the process of In vitro germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the Salcedo INIA variety, and b) evaluation of the *in vitro* effect of *Rhizobium* sp on the growth of quinoa plants (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the Salcedo INIA variety until the phase of the appearance of two green leaves, by determining the length of roots and stems. In the methodology, samples of alfalfa nodules were collected, they went through a disinfection process, to subsequently isolate the bacteria of the *Rhizobium* sp genus in Mangar Yeast Agar medium, then several  $1.5 \times 10^8$  *Rhizobium* sp bacterial bacteria were prepared / mL,  $3 \times 10^8$  cells / mL and  $6 \times 10^8$  cells / mL, which were inoculated to non-germinated seeds to determine their effect on the germination process, each of the bacterial infections were then inoculated to post-germinated seeds, to After 30 days of experimentation, determine its effects on plant growth, by determining the length of the root and stem. The results were: *Rhizobium* sp bacteria caused positive effects in the quinoa seed germination process, obtaining germination averages of 90.33% when inoculating a concentration of  $6 \times 10^8$  cells / ml, followed by  $3 \times 10^8$  cells / mL with 57.7% and with  $1.5 \times 10^8$  cells / mL a germination percentage of 29% ( $P < 0.05$ ). *Rhizobium* sp bacteria caused a better growth of quinoa plants after inoculation, determining the best stem growth that was obtained with an inoculation of  $6 \times 10^8$  cells / mL of *Rhizobium* sp with an average length of 14.68 cm, followed by the concentration of  $3 \times 10^8$  cells / mL with 8.93 cm on average, with the concentration of  $1.5 \times 10^8$  cells / mL with 5.61 cm, and in the control 5.87 cm ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the greatest root lengths were obtained with *Rhizobium* sp bacteria in the same dimensions of 1.5, 3 and  $6 \times 10^8$  cells / mL that were 5.97 cm, 6.01 cm and 4.53 cm respectively and in the control 5.21 cm ( $P < 0.05$ ). It is concluded that *Rhizobium* sp bacteria have a positive effect on the germination and growth of quinoa plants.

Keywords: inoculant, *Rhizobium* sp, quinoa, *Chenopodium quinoa*, *in vitro*.

## I. INTRODUCCIÓN

La quinua es un cereal, muy demandada en los mercados de los Estados Unidos y Europa, debido a su alto contenido de nutrientes esenciales para la fisiología del ser humano y debido a que su producción es netamente orgánica. En la actualidad se carecen de estudios, para aseverar que las bacterias *Rhizobium* sp posean efectos estimulantes en el crecimiento de las plantas. Ante ello en esta investigación, se desea investigar si las bacterias del género *Rhizobium* sp, posee un efecto beneficioso en la germinación de semillas y crecimiento vegetal de las plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). De esta manera lograr la aplicación en calidad de biofertilizante y así disminuir el uso de agroquímicos en los campos de cultivo de la región Puno.

El constante uso de fertilizantes químicos en los suelos del Altiplano Peruano, ha traído como consecuencia la erosión, la salinización y la disminución de la carga microbiana benéfica, originando la reducción del normal crecimiento de las plantas. Entre la carga microbiana benéfica se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno, como lo son las bacterias del género *Rhizobium* sp, los cuales se encuentran en simbiosis con las raíces de plantas de la familia Fabaceae; pero varios estudios dan a conocer que la inoculación de este género bacteriano, tiene también efectos benéficos en otras plantas que no sean Fabáceas.

La investigación busca aislar *Rhizobium* sp. a partir de nódulos de alfalfa y demostrar su efecto en la germinación de semillas y el crecimiento de plantas de quinua *in vitro* hasta la fase de aparición de dos hojas verdaderas, y una vez comprobada su eficacia ser una alternativa para aumentar el contenido en nitrógeno en los campos de cultivo en el

departamento de Puno, ya que puede utilizarse como biofertilizante. Esta investigación nos permitirá aplicar una alternativa basada en microorganismos frente a los productos químicos que son muy utilizados en la región de Puno por su capacidad de fijar nitrógeno. Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

### **1.1 Objetivo General:**

Evaluar el efecto de la inoculación de *rhizobium* sp en quinua (*Chenopodium quinoa* willd.) variedad salcedo – INIA.

### **1.2 Objetivos Específicos:**

- Determinar el efecto de las bacterias *Rhizobium* sp en el proceso de germinación *in vitro* de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la variedad Salcedo INIA.
- Evaluar el efecto *in vitro* de *Rhizobium* sp en el crecimiento de plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la variedad Salcedo INIA, hasta la aparición de dos hojas verdaderas, mediante la determinación de la longitud de raíces y tallos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes

**Pérez et al. (2019)**, al evaluar el potencial alelopático de lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* (campanilla morada) L. Roth en la germinación de semillas y el crecimiento radical de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y determinar el efecto de estos lixiviados en el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899, el lixiviado acuoso de raíz como el de la parte aérea de *I. purpurea* estimuló la germinación de semillas de frijol y la elongación radical; **Gonzáles et al. (2018)**, evaluaron el efecto del biofertilizante *Azotobacter* – *Rhizobium* en *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”, como alternativa a la fertilización química, el mejor tratamiento fue con *Azotobacter* sp. con 70% de germinación, superior al control negativo, la biomasa seca fue superior a la fertilización con nitrato de potasio luego de 20 días de evaluación; **Jara (2015)**, al identificar cepas del género *Azotobacter* y su efecto en coinoculación con *Rhizobium* en tomate (*Lycopersicum esculentum*) y que al producir ácido indolacético (AIA) y no así solubilizar fósforo, obtuvo mejores resultados en cuanto a la altura, parámetros de biomasa, peso fresco de la raíz y peso del fruto inoculadas con *Rhizobium* sp. y el mejor número de frutos al inocular *Azotobacter vinelandii*; **González et al. (2015)**, evaluó el efecto del Bioenraiz®, con propiedades auxínicas estimulan la germinación y el crecimiento vegetal, en la obtención de plántulas de cafeto del cultivar “Caturra rojo” (*Coffea arabica* L.), la germinación fue mejor con 200 mL/L de Bioenraiz®, obteniéndose 79,4 y 94,5 % a los 50 y 60 días después de la siembra, respectivamente y plántulas con mejores variables evaluadas.

**Chipana (2015)**, evaluó el efecto biofertilizante *Rhizobium etli* en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo demostrándose que *Rhizobium etli* a una concentración de  $10^{10}$  cél/mL genera un mayor efecto en el rendimiento, calidad y rentabilidad de la vainita en campo; **Hernández (2014)**, experimentó en el encino (familia Fagaceae) la inoculación del hongo *Boletus frostii*, una bacteria *Rhizobium* sp y ambos a la vez, no encontró diferencia significativa entre los tratamientos, pero las mejores características morfológicas se obtuvieron al inocular ambos microorganismos induciendo mayor altura, mayor peso seco total y sobrevivencia del 100%; **Diestra (2014)**, determinó que *Rhizobium etli* Rf-167-01 coinoculado con *Azotobacter chroococcum* CALT-01 en plántulas de *Solanum tuberosum* “papa” var. Canchán se determinó que las plántulas coinoculadas obtuvieron mejores valores en las variables agronómicas evaluadas como la altura de las plántulas, longitud de raíz, peso de la materia seca de la parte aérea, radicular y total de las plántulas y área foliar; **Luna et al. (2013)**, identificaron cuatro rizobacterias previamente aisladas de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), las cepas MA04 y MA17 aumentaron el porcentaje de germinación en 5 y 6% respectivamente, mientras que las cepas MA06 y MA12 incrementaron el peso de las plántulas en 17 y 20% respectivamente.

**Pérez et al. (2008)**, en Cuba, aislaron a los géneros bacterianos *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium* a partir de los nódulos de las cinco plantas leguminosas, y al inocular a plantas mostró que todas las cepas aisladas fueron efectivas en la nodulación, por tanto, son cepas promisorias para la obtención de inoculantes para las leguminosas forrajeras; **Santillana et al. (2005)**, evaluaron 19 cepas de *Rhizobium* en la germinación y en el crecimiento de plantas de *Lycopersicon esculentum*, en arena esterilizada y en cámara de crecimiento, utilizando suelo franco arenoso, con pH 7.3, nueve cepas

estimularon la germinación de las semillas, mientras siete cepas promovieron el crecimiento de plantas especialmente las cepas PEVF02 y PEVF08; **Huanca (2001)**, al determinar la infectividad y efectividad de alfalfa con cepas de los inoculantes BIAGRO (B339) y RHIZOLAM (ID36), en Characato – Arequipa, fijó la mayor cantidad de nitrógeno cuando se inoculó con RHIZOLAM y no existió diferencia significativa entre el efecto de la preinoculación y el pelletizado sobre el poder germinativo de alfalfa; **Ballesteros & Lozano (1994)**, evaluaron ocho cepas de *Rhizobium* inoculadas con cinco variedades de frijol, las cepas de mejor comportamiento en cuanto a nitrógeno fijado fueron en su orden: CIAT 144, CIAT 899, y CIAT 2 con promedio de nitrógeno fijado del 28%.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Fijación biológica del nitrógeno

Las bacterias simbióticas, son aquellas que se asocian a una planta en un nódulo de fijación del nitrógeno, incluyen distintos géneros de *Rhizobium* y otras pocas bacterias (*Burkholderia tuberum*, *Methylobacterium nodulans* y *Ralstonia taiwanensis*, entre otros) que nodulan con fabáceas (Carrillo, 2005), en cuyo interior se multiplican las bacterias y transforman el nitrógeno (N) del aire en amonio, siendo asimilado por las plantas y les permite crecer en suelos pobres en N, previamente las raíces excretan un exudado de flavonoides atrayentes de las bacterias *Rhizobium* (quimiotactismo), que activan la expresión de genes para producir moléculas de reconocimiento e infección de la planta, adhiriéndose mediante proteínas específicas, a los pelos absorbentes, induciendo la curvatura del extremo, mediante la liberación de lipooligosacáridos conocidos como los factores de nodulación (Nod) (CIAT, 1988).

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos aerobios rectos Gram negativos, con un diámetro de 0.5 – 0.9  $\mu\text{m}$  y una longitud de 1.2 a 3.0  $\mu\text{m}$ , es móvil porque posee un flagelo (polar o subpolar) o bien 2 a 6 flagelos peritricos, no forman esporas ni quistes y fijan nitrógeno en simbiosis con plantas fabáceas, la temperatura óptima para su crecimiento oscila entre los 25 a 30 °C y su coeficiente de G + C es del 59 – 64% (Jordan, 1984), morfológicamente las células vegetativas jóvenes son bacilos cortos y en cultivos envejecidos o en condiciones ambientales adversas aparecen células pleomórficas; en medio LMA, producen acidez moderada, forman colonias circulares, convexas, elevadas, semitranslúcidas y mucilaginosas, con diámetros de 2 a 4 mm luego de 3 a 5 días de incubación, algunas cepas son encapsuladas y la mayoría sintetizan exopolisacáridos

solubles en agua, son organismos quimioorganotrofos con un metabolismo respiratorio donde el oxígeno es el aceptor terminal de electrones (Mora, 2005).

La taxonomía de las bacterias *Rhizobium* sp es la siguiente (Ramírez *et al.*, 2008):

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Proteobacteria alfa
Orden	: Rhizobiales
Familia	: Rhizobiaceae
Género	: <i>Rhizobium</i> sp.

Las bacterias son aerobias, tienen su temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C, algunas especies crecen a temperaturas de 40 °C, el pH óptimo entre 6.0 y 7.0, pero pueden predominar entre 4.0 a 10.0, el tiempo de generación de cepas *Rhizobium* sp es entre 1.5 a 5.0 horas, son quimiorganoheterótrofo y utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como fuente de carbono, sin formar gas, no son capaces de metabolizar celulosa, almidón, caseína, quitina y agar, algunas cepas requieren de biotina, pantotenato o ácido nicotínico (Kuykendall *et al.*, 2005), las células vegetales de la corteza interna de las raíces se dividen y originan el primordio nodular, provocando la aparición del nódulo, un verdadero órgano especializado en el intercambio metabólico entre las raíces y la bacteria, dichas simbiosis entre las bacterias *Rhizobium* y las fabáceas son muy específicas, por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli induce la nodulación del frijol, pero no en alfalfa (Truchet, 1993), tal como se observa en la tabla 1.

**Tabla 1.** Plantas hospedadoras de bacterias del género *Rhizobium* (Carrillo, 2005).

<b>Rizobacteria</b>	<b>Plantas hospedadoras</b>
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia</i> spp, <i>Lotus arabicus</i> , <i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp (nódulos del tallo)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza cuneata</i>
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> spp
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp, <i>Macroptilium</i> spp
<i>Sinorhizobium</i> sp.	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> spp
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Parasponia</i> spp (no legumbre)

Las bacterias se mantienen confinadas en los simbiosomas (vesículas protegidas por membranas), que actúan como barrera y controla el flujo de ácidos carboxílicos (malato,

succinato, fumarato), los cuales se constituyen en fuente de carbono, tales ácidos proceden de la oxidación de carbohidratos biosintetizados en las hojas mediante la fotosíntesis, a continuación las bacterias se van transformando en bacteroides, grandes e irregulares, generando proteínas específicas como la nitrogenasa y algunos citocromos (Carrillo, 2005), para que los nódulos fijen nitrógeno (N), deben contener leghemoglobina, que transporta el oxígeno a bajas concentraciones pero en forma estable, permitiendo una elevada actividad respiratoria sin afectar a la nitrogenasa, pues se inactiva ante la presencia de oxígeno, asimismo acumulan poli -  $\beta$  - hidroxibutirato (Madigan *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de nódulos, uno indeterminado y alargado (en arveja y alfalfa) y otros determinados y globosos, los indeterminados se alargan por la presencia de un meristemo persistente localizado en el ápice, por otra parte, los nódulos determinados son globosos, debido a la presencia de meristemos esféricos (Patriarca, 2002), los genes esenciales para la nodulación, incluyen los implicados con la formación de la pared celular bacteriana que expresan la síntesis de exo y lipopolisacáridos, el otro gen es de nodulación (nod), que reside en el plásmido Sym junto a los genes de fijación (nif), los genes nod son inducidos por la presencia del hospedador, su principal función es la biosíntesis de proteínas de reconocimiento de flavonoides (Ballati, 1996).

### **2.2.2 Fijación simbiótica de nitrógeno en fabáceas**

La fijación biológica de nitrógeno (N) la llevan a cabo entre procariontes del suelo en simbiosis con las raíces de las plantas, fijando aproximadamente entre 140 y 175 millones de toneladas de N, y las bacterias del género *Rhizobium* sp contribuyen entre 35 a 75 millones de toneladas de nitrógeno fijado (Ferrera & Alarcón, 2010), por tanto las

fabáceas aumentan la fertilidad de los suelos, dependiendo de la relación bacteria – planta – ambiente, asimismo, la selección de variedades de fabáceas con mayor capacidad para fijar nitrógeno y adaptadas a diversos ambientes incrementaría el aporte de nitrógeno a los cultivos (CIAT, 1988).

Las fabáceas silvestres como cultivadas son noduladas por las cepas *Rhizobium* sp nativos del suelo, no siendo siempre efectivos, por lo que debe de realizarse la selección de cepas sobresalientes, también cada cepa debe ser capaz de adaptarse a distintas condiciones de suelo y nodular efectivamente muchos cultivos de fabáceas (Soto & García, 2004), cuando una fabácea es introducida por primera vez, no presenta nodulación o es muy baja e inefectiva, porque su simbiote no se encuentra en el suelo y no tiene competencia de otras cepas del suelo, lo contrario sucede en fabáceas cultivadas por muchos años, ya que los *Rhizobium* sp nativos específicos siempre están presentes y persisten en el suelo, como sucede en suelos de México, donde los *Rhizobium* sp de frijol al inicio en temporada de lluvias presentan un número más probable (NMP) de 1000 a 8000 células por g de suelo, y al cultivar la fabácea, la población bacteriana alcanza los 50000 cél/g de suelo (Ferrera & Alarcón, 2010).

En la soya (*Glycine max*), se observó que más del 40% de los suelos no tienen *Rhizobium* sp para esta fabácea; en cambio, los *Rhizobium* sp del caupí (*Vigna unguiculata*) están presentes en valores de 1000/g de suelo, muchas cepas de *Rhizobium* sp del suelo son de baja efectividad, pero se encuentran en altos recuentos en el suelo, aunque nodulan abundantemente a su hospedero, fijan bajas cantidades de N, sin embargo, la competencia es el factor más crítico para lograr el éxito en la inoculación de fabáceas, ya que las poblaciones inefectivas de *Rhizobium* representan una barrera para el establecimiento y

nodulación de las cepas inoculadas (Ferrera & Alarcón, 2010), por otro lado, la fijación de N inicia entre los primeros 15 y 20 días después de la emergencia cuando los primeros nódulos se han formado (Elkan, 1992), la sacarosa, procedente de la parte aérea es la fuente principal del carbono que requieren los nódulos; sin embargo, los bacteroides no pueden utilizar los di o monosacáridos debido a que carecen de transportadores o vías glicolíticas para metabolizar los azúcares (Ferrera & Alarcón, 2010).

### 2.2.3 La quinua (*Chenopodium quinua* Willd)

La información que se menciona a continuación fue reportada por León (2003).

#### **Taxonomía**

Reyno: Vegetal

División: Fanerógamas

Clase: Dicotiledóneas

Sub – clase: Angiospermales

Orden: centroespermales

Familia: Chenopodiceas

Género: *Chenopodium*

Sección: *Chenopodia*

Subsección: *Cellulata*

Especie: *Chenopodium quinua* Willd.

**Origen.** Se atribuye su origen a la zona andina del Altiplano Peruano – boliviano, por estar caracterizada por la gran cantidad de especies silvestres y la gran variabilidad genética, principalmente en ecotipos, reconociéndose cinco categorías básicas (León, 2003).

**Quinuas altiplánicas.** Crecen en lugares aledaños al lago Titicaca a una altura de 3800 msnm, estos cultivos se caracterizan por tener buena resistencia a las heladas, son bajos en tamaño, no ramificados (tienen un solo tallo y panoja terminal que es glomerulada densa), llegan a tener una altura de 1 a 2 m, con periodo vegetativo corto, se tiene quinuas precoces como: Illpa-INIA y Salcedo – INIA, semi – tardías: blanca de Juli, tardías: como la kancolla, chewecca, tahuaco, amarilla de Marangani (León, 2003).

**Variabilidad genética.** La quinua es una especie tetraploide, constituido por 36 cromosomas somáticas, está constituido por 4 juegos cromosómicos, con un número básico de 9 cromosomas ( $4n = 4 \times 9 = 36$ ). El color de las plantas de quinua es un carácter de herencia simple; en cambio el color de los granos es por la acción de agentes complementarios, siendo el color blanco un carácter recesivo (León, 2003).

En quinua el tipo de inflorescencia puede ser amarantiforme o glomerulada, siendo esta última dominante sobre la primera. El contenido de saponina en quinua es heredable, siendo recesivo el carácter dulce. La saponina se ubica en la primera membrana. Su contenido y adherencia en los granos es muy variable y ha sido motivo de varios estudios y técnicas para eliminarla, por el sabor amargo que confiere al grano (Gandarillas, 1979), que el carácter amargo o contenido de saponina estaría determinado por un simple gen dominante. Sin embargo, la presencia de una escala gradual de contenido de saponina indicaría más bien su carácter poligénico (León, 2003).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra estuvo constituido por 100 semillas de la variedad Salcedo INIA para evaluar los efectos en el proceso de germinación. Mientras tanto para evaluar el efecto en el crecimiento vegetal, el tamaño de muestra fue de 50 plantas, originadas post germinación.

#### 3.2 Tipo de estudio

Experimental y analítico de corte transversal.

#### 3.3 Determinación del efecto de las bacterias *Rhizobium* sp en el proceso de germinación *in vitro* de semillas de quinua

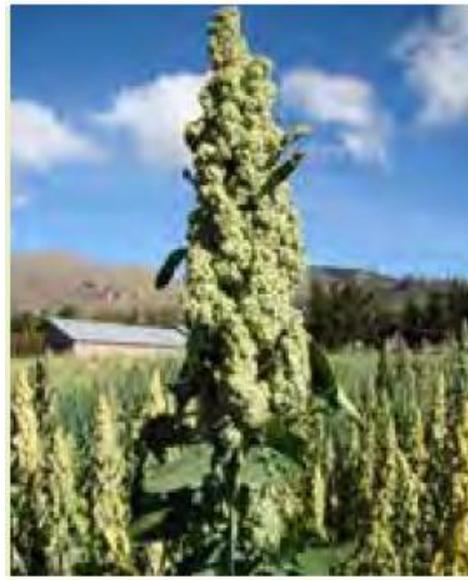
##### 3.3.1 Frecuencia y muestreo

El muestreo a realizar esta investigación, fue no probabilístico por conveniencia (Casal & Mateu, 2003), y estuvo conformado por la localidad de muestreo del centro poblado de Moro Orcco del distrito de Azángaro, debido a que estas localidades poseen campos de cultivo de papa, quinua, habas, entre otros cultivos; el aislamiento se realizó con tres repeticiones en tres campos de cultivo, haciendo un total de nueve unidades experimentales.

##### 3.3.2 Descripción detallada de los equipos y materiales por objetivo específico

#### Descripción de las características de la variedad Salcedo INIA de la quinua

La variedad Salcedo INIA, posee las siguientes características (INIA, 2017): tiene un crecimiento herbáceo, su hábito de crecimiento es simple, su ciclo vegetativo, es de 150 días en el Altiplano, 135 días en los valles interandinos, 120 días en la costa, la altura de la planta puede llegar oscila entre 1.48 a 1.70 m, y su rendimiento promedio de gramo, es de 2.5 t/ha en la zona alto andina y de 6.5 t/ha en costa y valles interandinos.



**Figura 1.** Individuo de quinua variedad Salcedo INIA.

**Aislamiento de *Rhizobium* sp.** A partir de nódulos de alfalfa, se desarrolló la metodología realizada de acuerdo al manual del CIAT (1988), con ayuda de una pala, se extrajeron las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) que presentaron mejor aspecto en los campos de cultivo del centro poblado de Moro Orcco, en el distrito de Azángaro, luego se colectaron sus raíces, se colocaron los nódulos en frascos con sílica gel y algodón para su posterior conservación, asignándoles a cada muestra un código de acuerdo al lugar de muestreo y número de planta, posteriormente se trasladaron al laboratorio de Ecología de la FCCBB - UNAP para su tratamiento y procesamiento respectivo, una vez en el laboratorio de Ecología, se seleccionaron 3 nódulos de las raíces de alfalfa de cada frasco con sílica gel, se colocaron en sobres de papel de filtro estéril y se hidrató en agua

destilada estéril durante 30 minutos, se desinfectaron con alcohol al 70% por espacio de 1 min en un recipiente estéril, se trasladaron a otro recipiente que contenía hipoclorito de sodio (lejía) al 3% y se dejó reposar durante 3 minutos, posteriormente se enjuagó cuatro veces con agua destilada estéril hasta que no se perciba el olor a hipoclorito de sodio, con ayuda de las pinzas estériles, se abrieron los sobres que contienen los nódulos, se colocaron los nódulos en placas Petri estériles y con ayuda de una pipeta se agregó una gota de agua destilada estéril a cada uno, con una bagueta se procedió a tritutarlos, y utilizando un asa de siembra, mediante estrías se cultivó en placas Petri con medio Agar Levadura Manitol (LMA) con Azul de Bromotimol, por estrías paralelas, posteriormente se incubaron las placas a 28 °C por 72 horas, una vez observado el crecimiento, se procedió a elegir las colonias de los posibles *Rhizobium* sp teniendo en consideración las características típicas de estos. Posteriormente se reaislaron en placas Petri con medio LMA hasta obtener colonias aisladas con crecimiento homogéneo (Zúñiga, 2012).

**Inoculación de *Rhizobium* en semillas de quinua.** Las semillas de quinua se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por un lapso de tiempo de 3 minutos, a continuación, se lavaron tres veces consecutivas hasta retirar todas las impurezas, luego se realizó la imbibición de las semillas en frascos de vidrio de 250 mL, los cuales contenían concentraciones bacterianas de los estándares  $1.5 \times 10^8$  células/mL,  $3 \times 10^8$  células/mL y  $6 \times 10^8$  células/mL, según los estándares 0.5, 1 y 2 de McFarland, por un tiempo de 35 minutos y luego se secaron por 40 minutos, finalmente, se colocaron en bandejas de plástico de 310 mm de largo por 210 mm de ancho, de manera que se colocaron 10 semillas por fila y 5 semillas por columna, hasta obtener 50 semillas en total, evaluándose el porcentaje de germinación a las 48 horas.

El parámetro del porcentaje de germinación (PG) de semillas de quinua (Carrillo *et al.*,

2015), se determinó cada 24 horas por un tiempo total de 05 días y se calculó mediante la siguiente ecuación matemática:

$$PG = \frac{\textit{Semillas germinadas}}{\textit{Número total de semillas de prueba}} \times 100$$

### 3.3.3 Variables que se analizó

**Variable independiente:** Inoculación de bacterias *Rhizobium* sp.

**Variable dependiente:** Porcentaje de germinación.

### 3.3.4 Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis

El diseño experimental que se aplicó fue completo al azar. En la evaluación de la germinación de semillas, los tratamientos estuvieron representados por las placas Petri con semillas inoculadas y no inoculadas, cada tratamiento presentó tres repeticiones. En la evaluación, los porcentajes de germinación de semillas de quinua fueron analizados mediante un análisis de varianza y pruebas de Tukey. Para todo el análisis se consideró un nivel de confianza del 95% (Ibañez, 2009), la tabulación de datos se elaboró en el programa Microsoft Office Excel y el análisis se realizó con el paquete estadístico Infostat (versión libre).

## 3.4 Evaluación del efecto *in vitro* de *Rhizobium* sp en el crecimiento de plantas de quinua

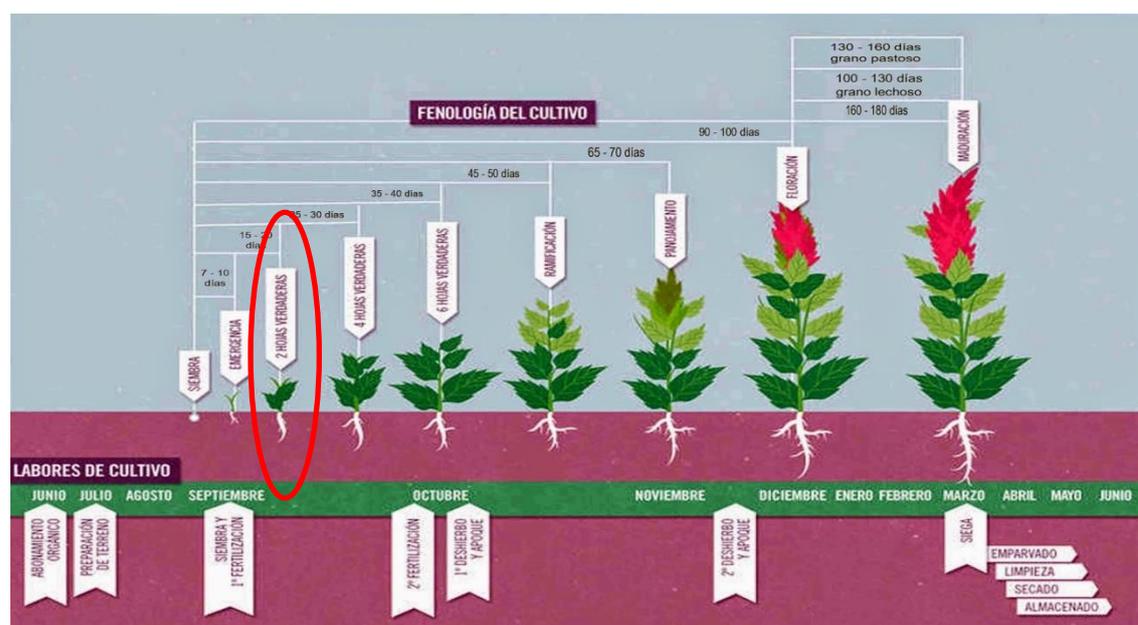
### 3.4.1 Frecuencia y muestreo

El muestreo a realizar esta investigación, fue no probabilístico por conveniencia (Casal

& Mateu, 2003), y estuvo conformado por la inoculación en semillas de quinua y posterior observación del crecimiento de plantas de quinua, la administración se llevó a cabo con tres repeticiones, haciendo un total de nueve unidades experimentales.

### 3.4.2 Descripción detallada de los equipos y materiales por objetivo específico

La evaluación *in vitro* del crecimiento de la quinua, se realizó hasta la fase fenológica de la aparición de 2 hojas verdaderas, tal como se observa en la **Figura 2**, debido a que se desea investigar en sus fases iniciales del crecimiento de la quinua, más no en todo el desarrollo de las plantas.



**Figura 2.** Fases fenológicas del cultivo de la quinua, la línea roja indica hasta que etapa se realizó la investigación.

Para determinar el efecto *in vitro* de *Rhizobium* sp en el crecimiento de plantas de quinua, hasta la aparición de dos hojas verdaderas, se realizaron los siguientes procedimientos: de las cepas de *Rhizobium* sp conservadas en refrigeración, se tomaron una asada, luego se sembró en caldo levadura manitol, posteriormente se incubó a 28 °C por 7 días con la

finalidad de obtener una población de bacterias de  $1.5 \times 10^8$  células/mL,  $3 \times 10^8$  células/mL y  $6 \times 10^8$  células/mL, las cuales fueron inoculadas en las semillas post germinadas, para la autenticación se escogieron las semillas de quinua que presentaron radículas con punta fina, las semillas pequeñas germinadas se transfirieron a tubos de ensayo conteniendo medio Knop gelificado con agar, los tubos que presentaron las semillas se cubrieron con papel aluminio en la parte externa inferior para proporcionarle la oscuridad necesaria a la raíz, los tubos se colocaron en gradillas y se trasladó a una cámara de crecimiento, proporcionándoles 12 horas de luz blanca y directa (utilizándose dos fluorescentes de 40 watts cada uno) y 12 horas de oscuridad, a una temperatura ambiente (Zúñiga, 2012), la observación del efecto de las bacterias *Rhizobium* sp en el crecimiento y la biometría, se realizó al concluir los 30 días de experimentación, hasta la fase fenológica de aparición de las dos hojas verdaderas, una vez finalizada el tiempo de experimentación, se realizó la evaluación biométrica de la longitud de tallos y raíces con la ayuda de un vernier, en un total de 5 plantas colectadas al azar.

### 3.4.3 Variables que se analizó

**Variable independiente:** Inoculación de bacterias *Rhizobium* sp en tres concentraciones

**Variable dependiente:** Crecimiento de plantas de quinua (longitud de tallos y raíces).

### 3.4.4 Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis

El diseño experimental que se aplicó fue completo al azar. En la evaluación del crecimiento de las plantas de quinua, los tratamientos estuvieron representados por los tubos de ensayo conteniendo plantas de quinua inoculadas y no inoculadas, cada

tratamiento presentó tres repeticiones. En la evaluación, las longitudes de tallos y raíces inoculados y no inoculados fueron analizados mediante un análisis de varianza y pruebas de Tukey. Para todo el análisis se consideró un nivel de confianza del 95% (Ibañez, 2009), la tabulación de datos se elaboró en el programa Microsoft Office Excel y el análisis se realizó con el paquete estadístico Infostat (versión libre).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Efecto de las bacterias *Rhizobium* sp en el proceso de germinación *in vitro* de semillas de quinua

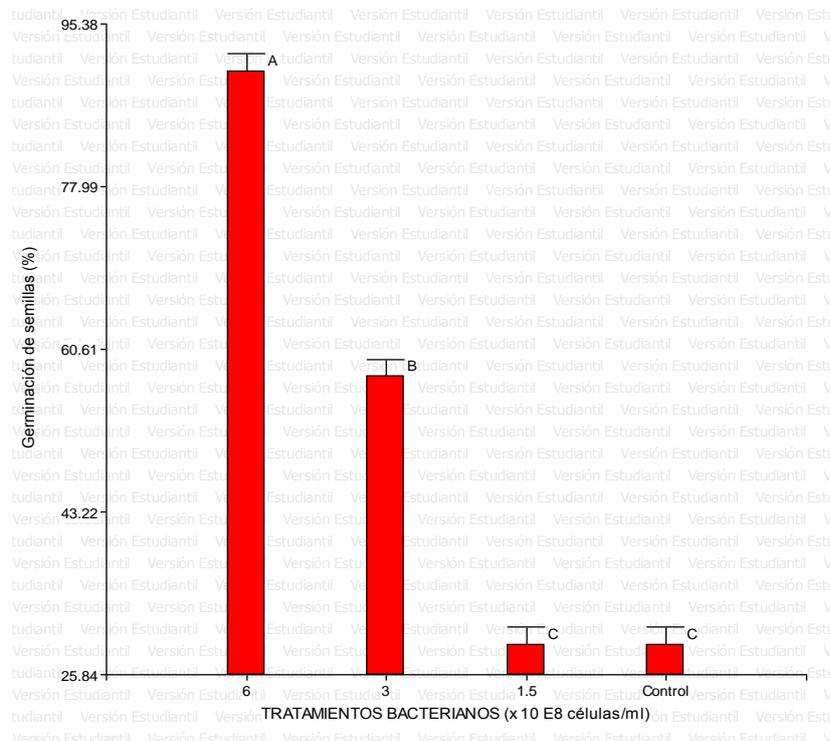
Los porcentajes de germinación de semillas de quinua, variaron según la concentración de bacterias inoculadas, el mayor promedio de germinación se obtuvo al inocular una concentración de  $6 \times 10^8$  células/mL con el 90.33%, seguido de  $3 \times 10^8$  células/mL con 57.67% y con  $1.5 \times 10^8$  células/mL un porcentaje de germinación de 29%, éste último fue similar al promedio obtenido con el tratamiento control en el cual se obtuvo un porcentaje de 29%. Todos los coeficientes de variabilidad oscilaron entre 3.45% y 12.43%, los cuales los datos presentaron una dispersión baja (Tabla 2).

**Tabla 2.** Germinación (%) de semillas de quinua inoculadas con *Rhizobium* en tres concentraciones, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.

Concentraciones bacterianas (estándar McFarland)	Repeticiones			Prom (%)	C. V. (%)
	1	2	3		
Control	25	32	30	29.00	12.43
$1.5 \times 10^8$ células/mL (0.5)	30	28	29	29.00	3.45
$3 \times 10^8$ células/mL (1)	60	55	58	57.67	4.36
$6 \times 10^8$ células/mL (2)	85	92	94	90.33	5.23

Al realizar el análisis estadístico de los porcentajes de germinación post inoculación con diferentes concentraciones de bacterias *Rhizobium* sp, presentaron diferencia estadística

significativa ( $F=239.86$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0001$ ), siendo mayor el porcentaje de germinación al inocular concentraciones bacterianas de  $6 \times 10^8$  células/mL, seguidos de  $3 \times 10^8$  células/mL y la concentración  $1.5 \times 10^8$  células/mL, ésta última fue similar a los resultados obtenidos en el tratamiento control (Figura 3).



**Figura 3.** Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp en la germinación de semillas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.

Las bacterias estimulan el crecimiento de los tallos y las raíces, lo cual concuerda con Perrine *et al.* (2004), quienes afirman que las bacterias *Rhizobium* sp producen altas concentraciones de ácido indol acético (AIA), lo cuales estimulan el crecimiento de semillas en el cultivo del arroz, varias especies tales como *R. leguminosarum* bv trifolii, como bacterias fijadoras del nitrógeno promueven el crecimiento de plantas no leguminosas, ya que poseen efectos en las raíces de arroz (*Oryza sativa*) y *Rhizobium etli* en raíces de maíz (*Zea mays*), pudiendo introducirse y colonizar otras plantas como

*Azorhizobium caulinodans* en las raíces de la oleaginosa *Brassica napus* (Santillana *et al.*, 2005); según Mayak *et al.* (2004) afirman que las cepas de *Rhizobium* sp producen ACC deaminasa, que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, incrementándose de esta manera la longitud y el crecimiento de las raíces.

La presencia de nódulos en las raíces de la alfalfa no fue abundante por lo que se debió salir varias veces al campo para recolectar nuevos nódulos, pero al cabo de ello se logró obtener el desarrollo de las colonias en los medios de cultivo, este incidente suscitado en el Laboratorio de Ecología, se debería probablemente a que los suelos presentaron niveles de acidez moderada lo que no permitiría el desarrollo de *Rhizobium* sp, ya que los suelos muy ácidos originan problemas de nutrición mineral como la deficiencia de Ca, Mg y K, tanto para *Rhizobium* como para las fabáceas hospedante (Jiménez & Lamo, 1998), por otro lado, la deficiencia de fósforo (P) y nitrógeno (N), causa la reducción de la fijación de nitrógeno, originando efectos específicos en la iniciación y crecimiento de los nódulos y la enzima nitrogenasa, principal característica de las bacterias *Rhizobium* sp (Montes, 1999), así como por la reducida absorción de molibdeno (Mo) que disminuye el crecimiento de las fabáceas y por tanto de sus nódulos; sin embargo, la presencia de algunos nódulos radiculares con pigmentación interna roja, se debe probablemente a la abundancia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ), quienes se encuentran en niveles altos no permitiendo la viabilidad nodular (Mayea *et al.*, 1998).

Los nódulos de las raíces de la alfalfa, variaron según la localidad de procedencia, lo cual concuerda con lo manifestado por Somasegaran & Hoben (1994), quienes afirman haber encontrado los mayores porcentajes de *Rhizobium* sp en los Municipios de Santa Rosa y Villanueva en Colombia, y podría deberse a la mayor actividad de siembra de fabáceas,

en especial la planta de donde se aisló la bacteria (fríjol caupí) y por la ausencia de iones de  $Al^{3+}$  reprimiendo la expresión del gen nod (Richardson *et al.*, 1988), y  $Co^{+2}$ , que son metales perjudiciales para el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, las plantas controlan el número de nódulos, mediante procesos fisiológicos de autorregulación, controlados por la presencia de nitratos en sus suelos, donde las raíces de las plantas fabáceas poco noduladas, pueden darse en casos donde abunde nitrógeno en el suelo, inhibiendo la nodulación (Caba *et al.*, 2001), asimismo Coyne (2000) indica que el número de nódulos dependerá de la presencia de fósforo, potasio, magnesio y calcio, presentes en el suelo, adicionalmente, los niveles altos de fósforo (P), incrementa la absorción de manganeso (Mn), induciendo al descenso en el número y el volumen de nódulos, contrarrestado por la presencia de calcio (Pérez & Torralba, 1997).

Las colonias de *Rhizobium* spp presentaron una textura cremosa, de coloración entre blanquecina y rosada, de regular tamaño (Figura 10), lo cual concuerdan con los reportados por Spaink (2000) y Coyne (2000), ya que afirman que las colonias de *Rhizobium* presentan una consistencia mucosa por los lipopolisacáridos y las formas bacterianas variaron desde esferoidales a bacilares alargadas, incluyendo irregulares, lo cual concuerda con lo observado en la presente investigación; asimismo, fueron similares a los reportados por Carranza (2004), quien también reporta que colonias amarillas y mucosas, Gram negativas móviles, todo bacilos y 2 cepas aisladas con morfología de cocobacilo; por otro lado, Morales (1992) reporta similares resultados de aislamiento de *Rhizobium* en LMA – ABT, obteniendo colonias convexas – cónicas, algunas más aplanadas, textura húmeda y elástica, Gram negativos, y produciendo notable acidez, cambiando el medio de verde a amarillo en 48 horas; asimismo difiere, ya que las colonias

fueron de color blanco lechoso de aspecto brillante y el tamaño de colonias fueron mayores a 4 mm.

En la investigación se utilizó los medios de cultivo Agar Levadura Manitol con Azul de Bromotimol (LMA – ABT) para el aislamiento de *Rhizobium* spp, esta afirmación coincide con Hernández *et al.* (2012), quienes recomiendan que para lograr el aislamiento efectivo de bacterias nativas *Rhizobium*, realizar la extracción directa de los nódulos de las plantas en estudio, utilizando medios de cultivo específicos para la diferenciación bioquímica de las especies, entre los más conocidos y utilizados se mencionan al medio Levadura Manitol Agar (LMA), la cual obtuvieron en siete días (Vásquez & Guevara, 2015).

#### **4.2 Efecto *in vitro* de *Rhizobium* sp en el crecimiento de plantas de quinua**

Los mejores crecimientos en longitud de los tallos de las plantas de quinua, variaron según la concentración de bacterias inoculadas, el mayor promedio de longitud de tallo se obtuvo al inocular una concentración de  $6 \times 10^8$  células/mL con el 14.68 cm, seguido de  $3 \times 10^8$  células/mL con 8.93 cm y con  $1.5 \times 10^8$  células/mL con una longitud de 5.61 cm, mientras que en el control se obtuvo un promedio de 5.87 cm. Todos los coeficientes de variabilidad oscilaron entre 1.97% y 4.58%, los cuales los datos presentaron una dispersión baja (Tabla 3).

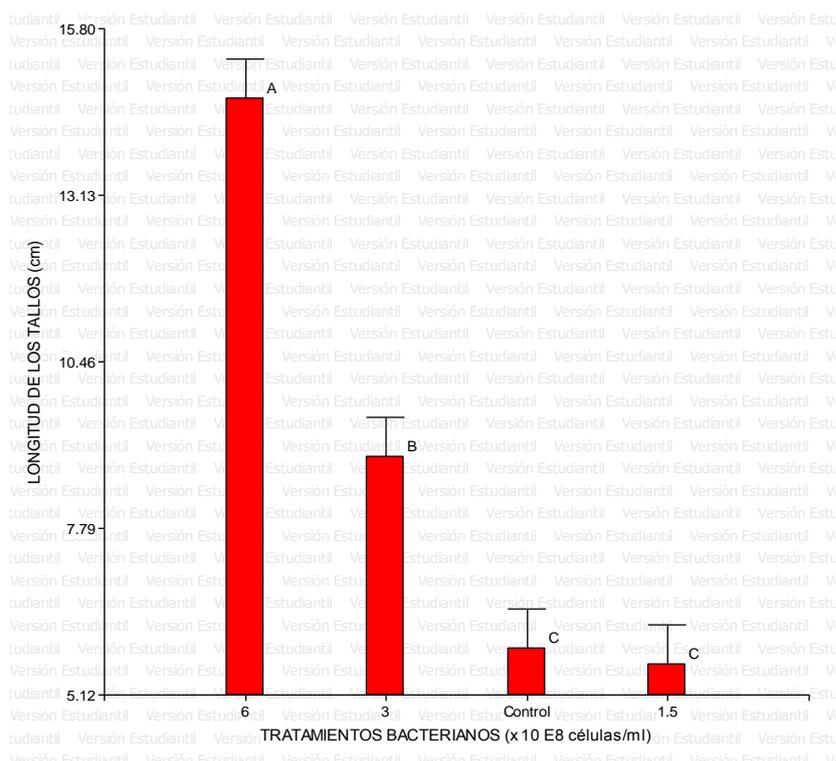
Los mejores crecimientos en longitud de las raíces de las plantas de quinua, variaron según la concentración de bacterias inoculadas, el mayor promedio de longitud de raíces se obtuvo al inocular una concentración de  $3 \times 10^8$  células/mL con 6.01 cm, seguido de  $1.5 \times 10^8$  células/mL con 5.97 cm y con  $6 \times 10^8$  células/mL con una longitud de 4.53 cm,

mientras que en el control se obtuvo un promedio de 5.21 cm. Todos los coeficientes de variabilidad oscilaron entre 2.48% y 4.52%, los cuales los datos presentaron una dispersión baja (Tabla 4).

**Tabla 3.** Longitud de tallos post inoculación de plantas de quinua con bacterias del género *Rhizobium* sp en tres concentraciones, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.

Concentraciones bacterianas (estándar McFarland)	Repeticiones			Prom (cm)	C. V. (%)
	1	2	3		
Control	6.15	5.48	5.97	5.87	1.97
$1.5 \times 10^8$ células/ml (0.5)	5.04	6.10	5.68	5.61	3.17
$3 \times 10^8$ células/mL (1)	8.54	9.61	8.64	8.93	2.21
$6 \times 10^8$ células/mL (2)	12.40	15.42	16.23	14.68	4.58

Al realizar el análisis estadístico de longitud de tallos post inoculación con diferentes concentraciones de bacterias *Rhizobium* sp, presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 44.26$ ;  $gl = 3$ ;  $P = <0.0001$ ), siendo mayor la longitud de tallos al inocular concentraciones bacterianas de  $6 \times 10^8$  células/mL, seguidos de  $3 \times 10^8$  células/mL, el control y la concentración  $1.5 \times 10^8$  células/mL, éstos últimos tratamientos presentaron diferencia estadística significativa (Figura 4).

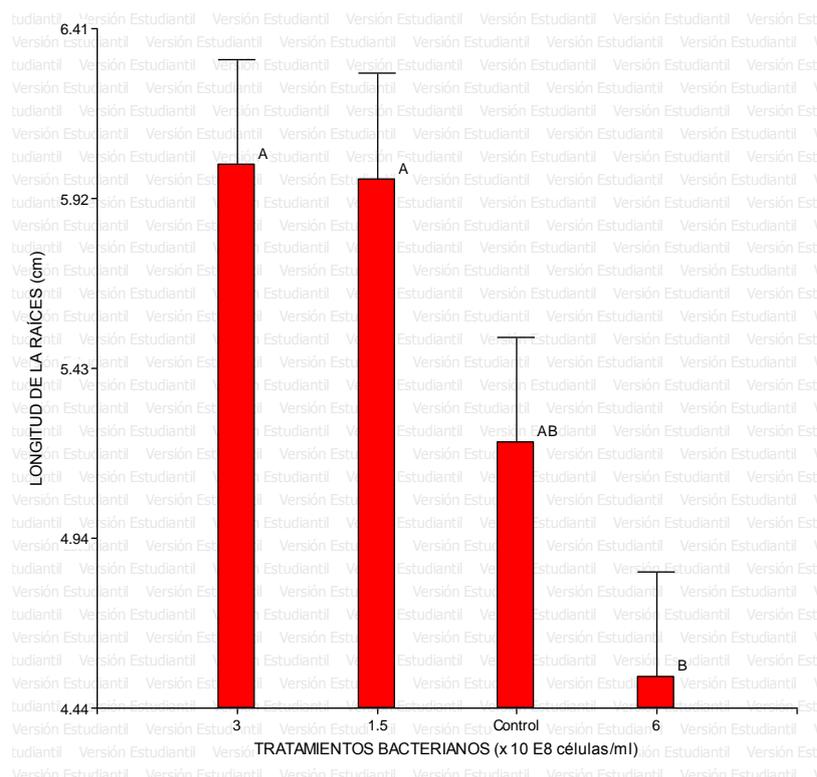


**Figura 4.** Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp en la longitud de los tallos de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre del 2017.

**Tabla 4.** Longitud de raíces post inoculación de plantas de quinua con bacterias del género *Rhizobium* sp en tres concentraciones bacterianas, julio a setiembre del 2017.

Concentraciones bacterianas (estándar McFarland)	Repeticiones			Prom (cm)	C. V. (%)
	1	2	3		
Control	4.48	5.26	5.89	5.21	4.52
1.5 x 10 <sup>8</sup> células/ml (0.5)	5.45	5.94	6.53	5.97	3.02
3 x 10 <sup>8</sup> células/mL (1)	5.50	6.32	6.22	6.01	2.48
6 x 10 <sup>8</sup> células/mL (2)	4.61	4.14	4.85	4.53	2.66

Al realizar el análisis estadístico de la longitud de las raíces post inoculación con diferentes concentraciones de bacterias *Rhizobium* sp, presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 5.30$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0.0264$ ), siendo mayor la longitud de las raíces al inocular concentraciones bacterianas de  $3 \times 10^8$  células/mL, seguidos de  $1.5 \times 10^8$  células/ml, el control y la concentración  $6 \times 10^8$  células/mL, éstos últimos tratamientos presentaron diferencia estadística significativa (Figura 5).



**Figura 5.** Prueba de Tukey del efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp en la longitud de las raíces de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, julio a setiembre 2017.

Los resultados obtenidos en la investigación, coinciden con los experimentos realizados con bacterias *Rhizobium* sp que mejoraron el rendimiento del cultivo de habas (*Vicia faba*) a nivel de campo (Nuñez *et al.*, 2005), asimismo, las cepas de *Rhizobium* sp, estimulan la germinación de semillas de otras plantas que no sean fabáceas, como el

tomate (*Lycopersicon esculentum*) y promueven su crecimiento, ya que poseen un efecto estimulante sobre las semillas de tomate, resultando en una mejor germinación, debido a la habilidad a que los rizobios producen hormonas como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquininas, que son hormonas vegetales (Dey *et al.*, 2004).

Perrine *et al.* (2004) afirma que el efecto de las bacterias *Rhizobium* sp, se debe a que éstas producen el ácido indol acético, las giberelinas y las citoquininas, los cuales son liberados a la rizósfera o en los tejidos de las plantas, de esta manera estimulan el desarrollo de la raíz e incrementan la absorción de nutrientes de la raíz, logrando así el beneficio de las plantas no leguminosas, lo cual concuerda con Gutiérrez & Martínez (2001) quienes encontraron incrementos de 42% de la materia seca de la parte aérea y de 49% de la materia seca de raíz en plantas de maíz inoculadas con *Rhizobium etli*.

Por otro lado, las plantas inoculadas con *Rhizobium* asegura el mayor desarrollo radicular del cultivo, mejorando la respuesta de la planta ante estrés o sequía, de esta manera estimula el crecimiento general de las plantas (Domit *et al.*, 1990), evidenciado el incremento en la altura y peso seco total de las plantas, asimismo, otra estimulación es la producción de sideróforos microbianos que controlan la presencia de enfermedades en el suelo y en nutrición de las plantas con hierro (Loper & Buyer, 1991), también poseen la capacidad de solubilizar fosfato (Halder & Chakrabarty, 1993) y producen ácido indol acético (AIA) (Wang *et al.*, 1982), regulando el crecimiento directo de la raíz, tal como se obtuvo en plantas de canola (*Brassica campestris*) y la lechuga (*Lactuca sativa*) (Noel *et al.*, 1996), aduciéndose a la presencia de las citoquininas (Saghir & Javed, 2010), que estimulan el mayor desarrollo de la raíz e incrementa la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz (Izaguirre *et al.*, 2007) y giberelinas que aumentan el crecimiento de

brotos de las plántulas, y también produce citosinas (Ahmad *et al.*, 2008).

La promoción del crecimiento y el incremento en longitud de las hojas se debe también a los mecanismos diferentes como la supresión de patógenos, a través de la liberación de sideróforos, antibióticos, cianuro de hidrógeno (Vessey, 2009) y enzimas como la 1-aminociclopropano -1 – ácido carboxílico (ACC) – deaminasa (Dobbelaere *et al.*, 2003), mejorando así la nutrición de las plantas y favoreciendo el desarrollo del sistema radical y el crecimiento de las plantas; en tal sentido posee un potencial para que sea utilizado como promotor de crecimiento de plantas no leguminosas, constituye un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable para reducir el uso de químicos en plantas (Chabot *et al.*, 1996).

El crecimiento de todas las plantas está determinado de forma directa o indirecta por la disponibilidad de nutrientes minerales, en especial del nitrógeno, debido a que es un factor limitante más importante, una planta con deficiencia de nitrógeno sufriría clorosis, manifestando una coloración amarillenta de tallos y hojas, falta de desarrollo y debilidad, por el contrario, cuando la planta tiene suficiente nitrógeno, sus hojas y tallos crecen rápidamente, en ese sentido en agricultura el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas y, así, en suelos carentes de nitrógeno, los rendimientos de los cultivos son bajos (Calvo, 2011).

## V. CONCLUSIONES

- Las bacterias *Rhizobium* sp originan efectos positivos en el proceso de germinación de semillas de quinua obteniéndose promedios de germinación del 90.33% al inocular una concentración de  $6 \times 10^8$  células/mL, seguido de  $3 \times 10^8$  células/mL con 57.67% y con  $1.5 \times 10^8$  células/mL un porcentaje de germinación de 29.00%, existiendo diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).
- *In vitro*, las bacterias *Rhizobium* originan un mejor crecimiento en plantas de quinua post inoculación, determinándose el mejor crecimiento de tallos que se obtuvieron con una inoculación de  $6 \times 10^8$  células/mL de *Rhizobium* sp con un promedio de longitud de 14.68 cm, seguido de la concentración de  $3 \times 10^8$  células/mL con 8.93 cm como promedio, y finalmente con la concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/mL con 5.61 cm; las mayo longitud de raíces se obtuvieron con bacterias *Rhizobium* sp en concentraciones de  $3 \times 10^8$  células/mL, con 6.01 cm, seguido de  $1.5 \times 10^8$  células/mL con 5.97cm y finalmente con la concentración de  $6 \times 10^8$  células/mL con 4.53cm.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de las especies de bacterias *Rhizobium* spp aisladas en suelos del Altiplano Peruano.
- Evaluar las especies de bacterias *Rhizobium* spp aisladas en los suelos del altiplano Puneño para establecer su potencial como fijadoras de nitrógeno en las diversas variedades comerciales de quinua (*Chenopodium quinoa*).
- Realizar inoculaciones experimentales en diferentes concentraciones y diversas semillas de fabáceas con la finalidad de obtener bioinoculantes propios del Altiplano Peruano.

## VII. REFERENCIAS

- Ahmad, I., Pichtel, J. & Hayat, S. (2008). *Plant-Bacteria Interactions*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Antoun H. Beauchamp Ch. & Goussard N. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non legumes. Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 204: 57-67.
- Ballati, P. (1996). *Legume Inoculants*. Kingraf, La Plata.
- Ballesteros, M. & Lozano, A. (1994). Evaluación de la fijación de nitrógeno por cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Revista Colombiana de química*. Bogota-Colombia. 12 p.
- Bécquer, C., Lazarovitz G., Nielsen L., Quintana M., Adesina M., Quigley L., Lalin I. & Ibbotson C. (2015). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y *Trichoderma* en trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista de Pastos y Forrajes*. Vol. 38, No. 1: 29 – 37.
- Calvo, P., Meneses L. & Zúñiga D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Revista Ecología Aplicada*, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. 7 (1,2): 141 – 148.
- Calvo, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Rev. CT* 3: 173 – 186.
- Carrillo K., Colmenares A., Ramírez L., Moreno L. & Cárdenas D. (2015). Inoculación de cilandro (*Coriandrum sativum* L.) con rizobacterias en Villa del Rosario, Norte de Santander. *Revista Fac. Nal. Agr. Medellín – Colombia*. Vol. 68, No. 1: 7459 – 7470.
- Carrillo, L. (2005). *Manual de Microbiología Agrícola*. Editorial UNs. Argentina. 175p.

- Casal, J. & Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev.* 1: 3 – 7.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. & Beauchamp, C. (1996). Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2767- 2772.
- Chipana, V. (2015). Efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium* en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo. Tesis de Magíster en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible. 205 p.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). (1988). Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Colombia.
- Córdova, Y., Rivera M., Ferrera R., Obrador J. & Córdova V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar Gran enano y su potencial para integrar un biofertilizante. *Revista Publicaciones Uciencia. Universidad y Ciencia, México.* 25 (3): 253 – 265.
- Dey, R., Pal K., Bhatt M. & Chauhan M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 159: 371-394.
- Diestra, E. (2014). Efecto de la coinoculación de *Rhizobium etli* y *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de *Solanum tuberosum* “papa” var. Canchán en condiciones de laboratorio. Tesis de Biólogo – Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. 59 p.
- Dobbelaere, J., Vanderleyden, Y. & Okon, Y. (2003). Plant grow-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Rev Plants Scien.* 22(2):107-149.
- Domit, A., Costa, J., Vidor, C. & Pereira, S. (1990). Inoculation of cereal seeds with

- Bradyrhizobium japonicum* and its effect on soybeans grown in succession. R Bras Ci Solo 1990; 14:313–320.
- Elkan, H. (1992). Biological nitrogen fixation systems in tropical ecosystems. Inglaterra, pp. 27-40.
- Ferrera, R. & Alarcón, A. (2010). Microbiología Agrícola; hongos, bacterias, micro y macro fauna, control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas. Primera edición. México D.F. 568 p.
- Gandarillas, H. (1979). Mejoramiento genético. En M. Tapia, La quinua y la kañiwa: cultivos andinos (p. 228). Bogotá: CIID. Recuperado el 16 de julio de 2017, de [https://books.google.com.pe/books?id=FfemqEmGXysC&pg=PA65&hl=es&source=gbs\\_toc\\_r&cad=4#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=FfemqEmGXysC&pg=PA65&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false)
- González, E., Alcarraz, M., Castro, A. & Casas Sh. (2018). Efecto del biofertilizante *Azotobacter – Rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.), como alternativa a la fertilización química. Rev. Ciencia e Investigación. 21 (2), 7 – 12.
- González, L. & Orozco, A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. Bol. Soc. Bot. Mex. 1996. Vol. 58.
- González, M., Rosales, P., Castilla, Y., Lacerra, J. & Ferrer, M. (2015). Efecto del Bioenraíz® como estimulante de la germinación y el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L.). Rev. Cultivos Tropicales. 26 (1), 73 – 79.
- Guerinot, L. (1991). Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. Plant Soil 1991; 130: 199– 209.
- Gutierrez, A. & Martinez E. (2001). Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). Journal of Biotechnology. 91: 117-126.
- Halder, A. & Chakrabartty, K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by

Rhizobium. Folia Microbiol. 38: 325–330.

- Hernández, E. (2014). Efecto de *Rhizobium* spp y *Boletus frostii* en el crecimiento de plántulas de *Quercus resinosa*. Tesis de Ingeniera Agroecóloga. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 63 p.
- Huanca, L. (2001). Evaluación de dos cepas de *Rhizobium meliloti* con inoculación simple y peleteada en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*). Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 61 p.
- Ibañez, V. (2009). Métodos estadísticos. Maestría en Ganadería Andina. Escuela de Post Grado, Universidad Nacional del Altiplano. Editorial Universitaria. Puno – Perú. 582 p.
- Ibarra, Cl. (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México. 85 p.
- INIA, Instituto Nacional de Investigación Agraria. (2017). Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. FAO, INIA. Lima – Perú. 82 p.
- Izaguirre, M., Labandera. C. & Sanjuán, J. (2007). Biofertilizantes en Ibero América: visión Técnica, científica y empresarial. Montevideo-Uruguay.
- Jara, Sh. (2015). Caracterización e identificación de cepas nativas del género *Azotobacter* y su efecto en co – inoculación con *Rhizobium* en tomate de mesa. Tesis de Ing. Agrónomo. Carrera de Ing. Agronómica, Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 80 p.
- Jordan, D. (1984). Gram – negative aerobic rods and cocci. Family III Rhizobiaceae. En

- N. Krieg y J. Holt (edit.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins Co. Baltimores, USA. Vol. 1: 234 – 244.
- Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). *Rhizobium*. Frank, 1889, 338. Bergey's Manual os Systematic bacteriology. Editorial Springer US. p. 325-340.
- León, J. (2003). Cultivo de Quinoa en Puno - Perú. Descripción, manejo y producción. UNA Puno - Perú. 62 p.
- Loper, J. & Buyer, J. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol. Plant-Microbe Int.; 4: 5–13.
- Luna, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S. & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Rev. Fitotec. Mex. 36 (1), 63 - 69.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2003). Brock-Biología de los Microorganismos. Décima edición. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Mantilla, A., Cardona G., Peña C., Murcia U., Rodríguez M. & Zambrano M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonía colombiana. Rev. Biol. Trop. Vol. 57 (4): 915 – 927.
- Mayak, S., Tirosh T. & Glick B. (2004). Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry. 42: 565- 572.
- Mora, L. (2005). Caracterización a nivel genético y molecular de la producción de bacteriocina por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. España. 364 p.
- Noel, C., Sheng, C., Yost, K, Pharis, P. & Hynes M. (1996). *Rhizobium leguminosarum*

- as a plant growthpromoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can J Microbiol.* 42: 279–283.
- Nuñez, M., Santillana, N. & Zúñiga Dávila, D. (2005). Evaluación de cuatro cepas de *Rhizobium* en *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro en condiciones de campo. *Naturaleza y Desarrollo.* 3(2): En prensa.
- Ogata, K. & Zúñiga D. (2008). Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Revista Zonas Áridas.* 12 (1): 191 – 208.
- Patriarca, E. (2002). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.
- Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M. & Morales, B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.* 10 p.
- Pérez, P., Ferrera, R., Alarcón, A., Trejo L., Cruz, R. & Silva H. (2019). Respuesta del simbiosistema frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y *Rhizobium tropici* CIAT899 ante el efecto alelopático de *Ipomoea purpurea* L. Roth. *Rev. Argentina de Microbiología.* 51 (1), 47 – 55.
- Perrine, F., Rolfe B., Hynes M. & Hocart C. (2004). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry.* 42: 723-729.
- Ramírez, M., García, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, M., Mateos, F., Martínez, E. & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum* DSM 30132T (=NCIMB 11478T) into the new species

- Rhizobium pisi* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, pp. 2484-2490.
- Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Biólogo. E. A. P. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Marcos.
- Saghir, K. & Javed, Z. (2010). Microbes for Legume Improvement 2010 Springer-Verlag /Wien Printed in Germany.
- Sánchez, D. (2011). Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Sofía) bajo invernadero. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 92 p.
- Santillana, N., Arellano, C. & Zúñiga D. (2005). Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Revista Ecología Aplicada. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. 4 (1,2), 47 – 51.
- Soto, J. & Gacía, A. (2004). Recolección, aislamiento e identificación de cepas de bacterias nativas de Jutiapa y Chimaltenango, del género *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli, para el aprovechamiento de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol. Informe Final Proyecto 14-01. Concyt, Fonacyt e Icta, Guatemala. 29 p.
- Truchet, G. (1993). Mundo Científico Vol. 133: 267-269.
- Vessey, K. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. Plant & Soil. 255: 571-586.

- Wang, T., Martinez J. & López I. (2002). *Rhizobium* y su simbiosis con plantas. Monografía. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wang, T., Wood, E. & Brewin, J. (1982). Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas. Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strains of *R. leguminosarum*. *Planta*. 155: 343–349.
- Yanni, Y., Rizk R., Fattah F.K. & Squartine A. (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice root. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 845-870.
- Zúñiga, D. (2010). Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. *Perúbiodiverso*. Lima – Perú. 207 p.
- Zuñiga, D. (2012). Manual de Microbiología agrícola. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima – Perú. 112 p.

## ANEXOS



**Figura 6.** Cultivo de alfalfa en la localidad del centro poblado Moro Orcco del distrito de Azángaro durante los meses de julio a setiembre del 2017.



**Figura 7.** Obtención de nódulos de *Rhizobium* sp a partir de raíces de alfalfa en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.



**Figura 8.** Proceso de desinfección de semillas de quinua variedad Salcedo INIA y nódulos de alfalfa, realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.



**Figura 9.** Proceso de plaqueado con agar Levadura Manitol (LMA) con azul de bromotimol y cultivo de nódulos de alfalfa, realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.



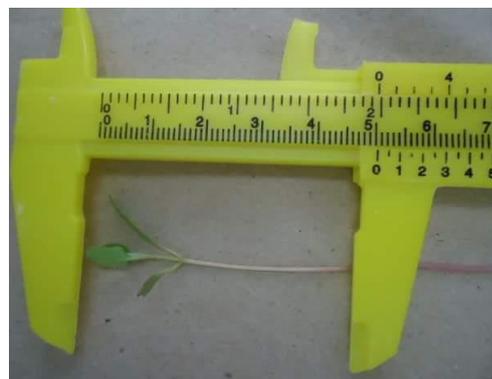
**Figura 10.** Crecimiento de bacterias *Rhizobium* sp en medio de cultivo LMA.



**Figura 11.** Inoculación y transferencia de semillas de quinua a tubos de ensayo conteniendo agar Knop realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.



**Figura 12.** Plantas inoculadas de quinua con *Rhizobium* sp luego de 30 días de cultivo *in vitro* realizado en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.



**Figura 13.** Medición de las plantas de quinua, realizado en Laboratorio de Microbiología de los Alimentos – FCCBB – UNA P, durante los meses de julio a setiembre del 2017.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Germinación	12	0.99	0.98	6.34	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7675.67	3	2558.56	239.86	<0.0001
Tratamientos	7675.67	3	2558.56	239.86	<0.0001
Error	85.33	8	10.67		
Total	7761.00	11			
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=8.53961					
Error: 10.6667 gl: 8					
Tratamientos	Medias	n	E.E.		
6 x 10 <sup>8</sup> células/ml (2)	90.33	3	1.89	A	
3 x 10 <sup>8</sup> células/ml (1)	57.67	3	1.89	B	
1.5 x 10 <sup>8</sup> células/ml (0...)	29.00	3	1.89	C	
Control	29.00	3	1.89	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

**Figura 14.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de los porcentajes de germinación de semillas post inoculación de *Rhizobium* sp en tres concentraciones de 1.5 x 10<sup>8</sup> células/mL, 3 x 10<sup>8</sup> células/mL y 6 x 10<sup>8</sup> células/mL.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Tallos	12	0.94	0.92	12.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	160.29	3	53.43	44.26	<0.0001
Tratamientos	160.29	3	53.43	44.26	<0.0001
Error	9.66	8	1.21		
Total	169.94	11			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.87282  
 Error: 1.2072 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.
6 x 10 <sup>8</sup> células/ml (2)	14.68	3	0.63 A
3 x 10 <sup>8</sup> células/ml (1)	8.93	3	0.63 B
Control	5.87	3	0.63 C
1.5 x 10 <sup>8</sup> células/ml (0...)	5.61	3	0.63 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Figura 15.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de longitud de tallos post inoculación de *Rhizobium* sp en tres concentraciones de 1.5 x 10<sup>8</sup> células/mL, 3 x 10<sup>8</sup> células/mL y 6 x 10<sup>8</sup> células/mL.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Raíces	12	0.67	0.54	9.75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4.46	3	1.49	5.30	0.0264
Tratamientos	4.46	3	1.49	5.30	0.0264
Error	2.24	8	0.28		
Total	6.71	11			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.38475  
 Error: 0.2805 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.
3 x 10 <sup>8</sup> células/ml (1)	6.01	3	0.31 A
1.5 x 10 <sup>8</sup> células/ml (0...)	5.97	3	0.31 A
Control	5.21	3	0.31 A B
6 x 10 <sup>8</sup> células/ml (2)	4.53	3	0.31 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Figura 16.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de longitud de raíces post inoculación de *Rhizobium* sp en tres concentraciones de 1.5 x 10<sup>8</sup> células/mL, 3 x 10<sup>8</sup> células/mL y 6 x 10<sup>8</sup> células/mL.



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos



## CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que el Bachiller **GUSTAVO SILVERIO MAMANI ROJAS**, egresado de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: “EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Rhizobium* sp EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) VARIEDAD SALCEDO – INIA HASTA LA APARICIÓN DE DOS HOJAS VERDADERAS EN CONDICIONES *in vitro*”, en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de mayo a setiembre del 2017.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 15 de julio del 2019.




Dr. M. Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA  
Jefe de Laboratorio de Microbiología de los Alimentos  
FCCBB – UNA Puno