



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



EFECTO ANTIFÚNGICO DE *Bacillus spp.* CONTRA *Peronospora farinosa* EN QUINUA, PUNO

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. NORMA CAHUANA LAURA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mis queridos padres Rodolfo y María, por darme la vida, por su amor y apoyo moral, su dedicación y ejemplo serán mi camino para lograr mis sueños.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.



AGRADECIMIENTOS

A la primera casa de estudios Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas, por acogerme y brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente culminando esta fascinante profesión.

A mi Directora de Tesis M.Sc. Eva Laura Chauca, quien dirigió esta tesis e hizo posible su culminación, por su exigencia, motivación y consejos acertadas.

Al M.Sc. Alfredo Ludwig Loza del Carpio, su constante apoyo ha hecho posible la culminación de la presente investigación.

A la Dra. Vicky Cristina Gonzales Alcos, sus consejos oportunos y la disponibilidad de su tiempo, han hecho posible la realización de mi trabajo de investigación.

Al Mg. Dante Mamani Sairitupac, sus valiosas sugerencias y consejos han contribuido a la mejora de mi trabajo de tesis.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL	15
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES	16
2.2. MARCO TEÓRICO	20
2.2.1. Características de la quinua.....	20
2.2.1.1. Taxonomía.....	20
2.2.1.2. Descripción botánica y agronómica	21
2.2.1.3. Preparación de la semilla.....	24
2.2.1.4. Preparación del substrato.....	24
2.2.1.5. Siembra de semilla de quinua.....	25
2.2.1.6. Principales enfermedades de la quinua.....	25
2.2.1.7. Morfología.....	29
2.3. MARCO CONCEPTUAL	39

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	41
3.2. TIPO DE ESTUDIO	42



3.3. POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA	42
3.4. METODOLOGÍA	43
3.4.1. Determinación de la presencia de <i>Bacillus spp.</i> en suelos de cultivo de quinua en la localidad de Palermo, en la provincia de Chucuito - Juli.	43
3.4.2. Determinación del efecto antifúngico de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i>	48
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Determinación de la presencia de <i>Bacillus spp.</i> en suelos de cultivo de quinua en la localidad de Palermo, en la Provincia de Chucuito - Juli.	52
4.2. Determinación del efecto antifúngico de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis sobre <i>Peronospora farinosa</i>.	54
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES	69
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	84

ÁREA: CIENCIAS BIOMÉDICAS

TEMA: BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 25/08/2017



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de quinua atacada por mildiu (<i>Peronospora farinosa</i>) tomado de (Bazile <i>et al.</i> , 2014).....	27
Figura 2. Esporangióforo y esporangios de <i>Peronospora farinosa</i> . Tomado de (Danielsen y Ames, 2000).....	29
Figura 3. Esporangios de <i>Peronospora farinosa</i> (Danielsen y Ames, 2000).....	30
Figura 4. Oosporas de <i>Peronospora farinosa</i> en tejido foliar tomado de (Danielsen y Ames, 2000).....	31
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Peronospora farinosa</i> en la zona andina. Cf: esporangióforo, C: esporangio, a: anteridio, Og: oogonio, Os: oospora. tomado de (Tapia <i>et al.</i> , 2000).	32
Figura 6. Infección primaria de mildiu observada como esporulación abundante en hojas cotiledonales de quinua. (Danielsen y Ames, 2000).	33
Figura 7. Escala de evaluación para mildiu (<i>Peronospora farinosa</i>) en porcentaje del área foliar afectada. tomado de (Danielsen y Ames, 2000).	34
Figura 8. Ubicación del anexo Salcedo de la Estación Experimental Illpa –Puno, Marzo 2016. Tomado https://google.com.pe/maps/place/Estacion/Experimental/Agraria/Illpa-Sede/Salcedo	41
Figura 9. Campo del cultivo de Quinua en el Fundo Palermo – Provincia de Chucuito – Juli, Tomada https:// google.com.pe/maps/place/juli.pe	42
Figura 10. Los 10 puntos de muestreo de suelos de un cultivo seleccionado de quinua.	44
Figura 11. Protocolo de aislamiento de <i>Bacillus spp.</i>	47
Figura 12. Características macroscópicas de <i>Bacillus spp.</i> INIA - Puno, Abril 2016...	52
Figura 13. <i>Bacillus spp.</i> Tinción Gram, microscópicamente. INIA - Puno, Abril 2016.	53
Figura 14. Diferencias del % de daño en hojas de quinua en el estadio de 6 hojas. INIA - Puno, Abril 2016.....	55
Figura 15. Diferencias del % de daño en hojas de quinua en el estadio de ramificación. INIA - Puno, Abril 2016.	57
Figura 16. Diferencias del % de daño en hojas de quinua en el estadio de inicio de panojamiento. INIA - Puno, Abril 2016.	59



Figura 17. Diferencias del % de daño en hojas de quinua en el estadio de panojamiento. INIA - Puno, Abril 2016.	61
Figura 18. Diferencias del % de daño en hojas de Quinua en el estadio de floración INIA - Puno, Abril 2016.....	63
Figura 19. Cultivo de quinua, de donde se tomó muestras de suelo, para aislar las bacterias del Genero Bacillus. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016....	85
Figura 20. Toma de muestra de suelo la rizósfera de las plantas de quinua. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.....	85
Figura 21. Pesaje de las muestras de suelo rizosferico de las plantas de quinua. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.....	86
Figura 22. Recolección de muestras de suelo del campo de cultivo de Quinua del Fundo Palermo – Juli. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.	86
Figura 23. Plantas de quinua en cámara húmeda. INIA- Puno, Abril 2016.....	87
Figura 24. Resultados del análisis de suelos INIA- Puno, Marzo 2016.....	88



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tamaño de muestra de la investigación.	43
Tabla 2.	Efecto antifúngico (%) de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i> en hojas de las plantas de quinua en el estadio de 6 hojas. abril 2016.	54
Tabla 3.	Efecto antifúngico (%) de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i> en hojas de las plantas de quinua en Estadio de Ramificación, abril 2016.....	56
Tabla 4.	Efecto antifúngico (%) de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i> en hojas de plantas de quinua en estadio de inicio de panojamiento, abril 2016.	58
Tabla 5.	Efecto antifúngico (%) de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i> en hojas de plantas de quinua en estadio de panojamiento, mayo 2016.....	60
Tabla 6.	Efecto antifúngico (%) de <i>Bacillus spp.</i> a diferentes dosis contra <i>Peronospora farinosa</i> en hojas de plantas de quinua en estadio de floración, mayo 2016.	62
Tabla 7.	Porcentaje de eficacia de las dosis de <i>Bacillus spp.</i> contra mildiu en hojas de quinua, marzo a mayo 2016.	64
Tabla 8.	Resumen de resultados de aplicación de las dosis de <i>Bacillus spp.</i> contra mildiu en las fases fenológicas entre 6 hojas y floración en quinua, marzo a mayo 2016.....	64
Tabla 9.	Análisis de fertilidad de las muestras de suelo del campo de cultivo de quinua en Palermo – Juli, marzo 2016.....	96
Tabla 10.	Análisis de varianza de daño (%) de <i>P. farinosa</i> en hojas de quinua en estadio de 6 hojas.	97
Tabla 11.	Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 7,07561.....	97
Tabla 12.	Análisis de varianza de daño (%) de <i>P. farinosa</i> en hojas de quinua en estadio de ramificación.....	98
Tabla 13.	Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 7,75716.....	98



Tabla 14. Análisis de varianza de daño (%) de <i>P. farinosa</i> en hojas de quinua en estadio de Inicio de panojamiento.	99
Tabla 15. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 9,81211.....	99
Tabla 16. Análisis de varianza de daño (%) de <i>P. farinosa</i> en hojas de quinua en estadio de panojamiento.	100
Tabla 17. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 15,12148.....	100
Tabla 18. Análisis de varianza de daño (%) de <i>P. farinosa</i> en hojas de quinua en estadio de Floración.	101
Tabla 19. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 11,50572.....	101



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

PGPR : (Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal)

pH : (Potencial Hídrico)

PJ : (Palermo Juli)

μm : (Micrómetro)

TSA : (Tripticasa de soya agar)



RESUMEN

El estudio del efecto antifúngico de *Bacillus spp.*, contra *Peronospora farinosa* en quinua se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Virología e Invernaderos de la Estación Experimental – INIA – Illpa - Puno, durante la campaña agrícola de marzo a mayo del 2016, las muestras de suelo provienen del fundo Palermo - Chucuito - Juli, los objetivos fueron: determinar la presencia de *Bacillus spp* en suelos de cultivo de quinua en la provincia de Chucuito - Juli y determinar el efecto antifúngico de *Bacillus spp* a diferentes dosis sobre *Peronospora farinosa*. El aislamiento de cepas de *Bacillus spp.*, se realizó con el método de diluciones y siembra en placa Petri, mientras que para el hongo *Peronospora farinosa* se colectaron hojas de quinua con esporulación en placas petri con agar agua y se obtuvieron los esporangios del tejido foliar para centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos, se evaluaron 5 tratamientos (T1: control, T2: 5, T3:10, T4: 15 y T5: 20 ml) de *Bacillus spp.*, con tres repeticiones, se utilizó el análisis de varianza y Prueba de contraste de Tukey. Los resultados obtenidos: se aisló una cepa denominada PJ (Palermo Juli) que resultó positiva a la tinción Gram y a esporas, y catalasa positiva, identificándose como *Bacillus spp*. Se determinó que las dosis de 20 y 15 ml de *Bacillus spp* fueron los más eficientes en el control de *Peronospora farinosa* en las plantas de quinua, teniendo solo 8.33 y 9.67 % de daño en comparación a otras dosis que tuvieron daños entre 18 y 34.67% y el efecto de control del fitopatógeno se evidenció a partir del estadio de ramificación hasta la floración y no así en el estadio de seis hojas. Se encontró diferencias significativas con el T1 (control) y los T4 (15ml) y T5 (20 ml).

Palabras clave: Antifúngico, *Bacillus spp.*, *Peronospora farinosa*, Quinua.



ABSTRACT

The study of the antifungal effect of *Bacillus spp.*, Against *Peronospora farinosa* in quinoa was carried out in the Laboratory of Tissue Culture and Virology and Greenhouses of the Experimental Station - INIA - Illpa - Puno, during the agricultural campaign from March to May 2016, the soil samples come from the Palermo - Chucuito - Juli, the objectives were: to determine the presence of *Bacillus spp* in quinoa cultivation soils in the province of Chucuito - Juli and to determine the antifungal effect of *Bacillus spp* at different doses on *Peronospora farinosa*. The isolation of *Bacillus spp.* Strains was carried out with the dilution method and sowing in a Petri dish, while for the fungus *Peronospora farinosa*, sporulated quinoa leaves were collected in petri dishes with water agar and the sporangia of the leaf tissue were obtained. To centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes, 5 treatments (T1: control, T2: 5, T3: 10, T4: 15 and T5: 20 ml) of *Bacillus spp.* were evaluated, with three repetitions, the analysis of variance was used and Tukey's contrast test. The results obtained: a strain called PJ (Palermo Juli) was isolated that was positive to Gram staining and spores, and catalase positive, identifying itself as *Bacillus spp.* It was determined that the doses of 20 and 15 ml of *Bacillus spp* were the most efficient in the control of *Peronospora farinosa* in quinoa plants, having only 8.33 and 9.67% damage compared to other doses that had damage between 18 and 34.67% and the control effect of the phytopathogen was evidenced from the branching stage to flowering and not in the six-leaf stage. Significant differences were found with T1 (control) and T4 (15ml) and T5 (20 ml).

Key words: Antifungal, *Bacillus spp.*, *Peronospora farinosa*, Quinoa.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), es una planta cultivada en zonas áridas y semi áridas de los Andes del Perú, que viene tomando gran importancia económica en éstos últimos años, donde la crecida demanda de alimentos se agrava y se trata de obtener proteínas de alta calidad en zonas agroecológicas, donde no prosperan adecuadamente otros cultivos. Es una planta de amplia adaptabilidad, cultivándose desde el sur, Tacna hasta el norte en Piura y desde el nivel del mar hasta por encima de los 4000 metros de altitud (Mujica *et al.*, 2014).

En la zona andina del Perú, constituye base de la alimentación del poblador rural y es un cultivo potencial promisorio para áreas con baja precipitación pluvial y elevada salinidad, por sus cualidades nutricionales, contenido de proteínas, vitaminas y sales minerales, lisina y balance adecuado de aminoácidos esenciales; por lo que, es comparable con alimentos de origen animal (leche, carne) (INIA y FAO, 2013).

En el Perú, su cultivo ha crecido rápidamente por su buena adaptación, especialmente en la Costa. En la región Puno, se siembra alrededor de 50,000 hectáreas con una productividad de 1,2 t/ha. Esta producción por unidad de área, es considerada baja en comparación a la producción obtenida en otras zonas del país, donde los rendimientos varían entre 4,000 y 6,000 kg/ha (Red Agrícola, 2014). Esta baja producción, se debe a la incidencia de factores climáticos adversos (heladas, sequías, granizos y cambios climáticos), ataque de plagas y enfermedades, suelos pobres y bastante fragmentados, uso de semilla de baja calidad, entre otros (INIA y FAO, 2013).



El cultivo de la quinua está expuesto al ataque de una serie de enfermedades con mayor o menor intensidad, siendo el mildiu, causado por *Peronospora farinosa*, la enfermedad más importante, cuyos daños se presentan en las hojas, provocando la reducción del área fotosintética, afectando negativamente el desarrollo de la planta y por consiguiente el rendimiento (Mujica *et al.*, 2014). La enfermedad provoca el enanismo (infección sistémica) y la defoliación prematura, causando la reducción del rendimiento entre 33 y 58%. En ataques severos y en las fases fenológicas más críticas de la planta, la enfermedad puede provocar la pérdida total, especialmente en la costa Peruana (Danielsen y Ames, 2000).

Para el control de ésta enfermedad, se efectúan 1 ó 2 aplicaciones de fungicidas durante el ciclo vegetativo del cultivo; mientras que, en la costa y valles interandinos, cada vez se utilizan mayor cantidad de productos químicos, los cuales son costosos, tóxicos y perjudiciales para la salud y el medio ambiente. Esta situación es dramática para el agricultor, ya que demanda mayor inversión y genera menores ingresos netos, el producto cosechado es contaminado, de baja calidad y dañino para la alimentación y salud humana, animal y ambiental; por lo que, es importante buscar alternativas de solución menos costosas en el control de ésta enfermedad y que sean más amigables con la naturaleza (INIA y FAO, 2013).

Una de las alternativas, es el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), como el Género *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. brevis* y otras especies que favorecen el crecimiento de las plantas mediante la producción de antifúngicos y antibióticos que inhiben el crecimiento de muchos fitopatógenos como la *Peronospora farinosa*, disminuyendo los daños causados por este hongo.



1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y el efecto antifúngico de *Bacillus spp.* sobre *Peronospora farinosa* en el cultivo de la quinua bajo condiciones de invernadero.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la presencia de *Bacillus spp.* en suelos de cultivo de quinua en la localidad de Palermo, provincia de Chucuito - Juli.

Determinar el efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis sobre *Peronospora farinosa*.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Ortuño *et al.*, (2014), colectaron plantas de quinua y muestras de suelo del sur del altiplano, llevándolas al laboratorio donde se aislaron diferentes especies de bacterias. Luego las bacterias fueron identificadas mediante técnicas moleculares: *Bacillus amyloliquefaciens*; *B. tequilensis*; *B. vallismortis*; *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. licheniformis* y *B. firmus* (aislados de las hojas). *B. aryabhattai*; *B. horikoshii*; *B. megaterium*; *B. pumilus* y *Paenibacillus odorifer*; *Pseudomonas sp.*; *B. subtilis*; *Azotobacter sp.* (aislados de las raíces); *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. amilequefasciens* (aislados del grano). También se aisló *B. cereus*, *B. thuringiensis* de la rizósfera. Esta gran diversidad de especies y cepas de bacterias asociadas a la quinua representan un potencial para desarrollar productos biotecnológicos destinados a mejorar la sostenibilidad y productividad del cultivo de quinua en el Altiplano Sur de Bolivia.

Angulo *et al.*, (2013), en el Centro Experimental de Quipaquipani de la ciudad de La Paz-Bolivia, evaluando el efecto de 13 cepas de bacterias promotoras de crecimiento, obtuvieron las cepas 1Bp y 5Bp de *Bacillus pumillus* solubilizadores de fósforo, 139 y 143 *Bacillus odorifer* fijadores de nitrógeno, 2p, 3p y 4p *Paenibacillus odoriger* fijadores de nitrógeno sobre altura de plantas 3p y 4p de pesos de panoja. Las cepas 3p y 4p fueron los que coincidieron en incrementar el crecimiento de las plantas y el peso de las panojas, siendo éste último la variable más relacionada con el rendimiento que el resto de las cepas (1Bo, 5BP, 139, 143 Y 2p).



Ortuño *et al.*, (2013), se estudiaron microorganismos nativos asociados a las plantas de quinua (*Chenopodium quinoa*) y la aplicación de estos organismos a la producción orgánica de quinua en el Altiplano Andino donde se aislaron las bacterias endofíticas nativas que son capaces de fijar el nitrógeno, solubilizar el fosfato y sintetizar una fitohormona y las cepas nativas de *Trichoderma*. Los ensayos de invernadero y ensayos de campo permitieron seleccionar cepas bacterianas promisorias, pertenecientes en su mayoría a géneros de *Bacillus* y *Paenibacillus*, que aumentaron la longitud de la planta, el peso de la panícula y el rendimiento de grano.

Gomez *et al.*, (2012), en la ciudad de Guanajuato evaluaron el efecto de cepas de *Bacillus subtilis* como promotora de crecimiento de plantas en plantas de guayaba en condiciones de invernadero. El uso rizobacterias promotoras de crecimiento son una excelente alternativa de mejora de la producción de guayabas, cultivo del que se conoce muy poco de las microflora asociada a su rizósfera y del papel ecológico que tienen en suelo.

Tejera *et al.*, (2011), en la Universidad de la Habana-Cuba, caracterizando bacterias del género *Bacillus*, obtuvieron trece cepas a partir del cultivo de arroz con potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de hongos fitopatógenos. Además, demostraron que producen auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal, solubilizadores de fosfatos y fijadores de nitrógeno, los pueden actuar en la promoción del crecimiento del cultivo de arroz. A la vez, tuvieron efectos antagónicos contra cuatro hongos, entre ellos *Pyricularia grisea*, que es el principal devastador de éste cultivo.



Layton *et al.*, (2011), evaluando el efecto biocontrolador del género *Bacillus sp.* contra hongos fitopatógenos de plantas, a través de relaciones antagónicas inductoras de muerte celular de *Fusarium oxysporum* muy relacionado con la marchitez vascular y pudrición de raíz en diversas plantas, obstrucción de los vasos que permiten la circulación vegetal hasta causar amarillamiento de las hojas por imposibilidad en el transporte de nutrientes que causan grandes pérdidas económicas en el campo agrícola: por lo que, han establecido emplear especies del género *Bacillus* que fueron capaces de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de los microorganismos y biocontrol de plagas en el fortalecimiento de los actuales estándares de calidad en los procesos ambientales.

Ragazzo *et al.*, (2011), realizando investigaciones en el Instituto Tecnológico de Tapic en México, sobre la selección de cepas de *Bacillus spp* con capacidad de producción de antibióticos para el control de fitopatógenos aislados de frutos tropicales, concluyeron que las cepas de *Bacillus* mostraron un potencial como agentes biocontroladores en frutos tropicales, dada su producción de antibióticos de hasta 316 mg-L⁻¹ para iturina A y de 1125 mg-L⁻¹ para surfactina, obtenidos para la cepa Pla10 y los niveles de inhibición globales obtenidos cercanos a 20 mm para la misma cepa, *Bacillus subtilis* Pla10 produjo cuatro fracciones de iturina A y cinco de surfactina.

Calvo *et al.*, (2010), indican que el *Bacillus* es un género altamente presente en la rizosfera de diversos cultivos, por su capacidad de formación de esporas que le da una ventaja de supervivencia en al rizosfera vegetal. Realizando la descripción morfológica de las colonias, caracterización fisiológica y bioquímica de 43 aislamientos de *Bacillus spp* provenientes de la rizosfera del cultivo de papa de las zonas alto andinas del Perú, determinaron que la mayoría de los aislamientos pertenecían al grupo de *Bacillus subtilis*. Indicándonos que los *Bacillus* crecen bien a pH ácidos. De igual manera encontraron



correlaciones entre zonas de aislamientos con temperaturas de suelos más fríos y las cepas con mejores niveles de crecimiento a 20°C.

Gil *et al.*, (2009), en Cota (Cundinamarca) identificaron las principales enfermedades en el cultivo de espinaca, considerando tres etapas de su ciclo vegetativo: Germinación, desarrollo de hojas y cosecha. Durante la germinación, “Damping-off” fue la enfermedad con mayor incidencia. Durante la cosecha, se presentaron manchas foliares causadas por *Pseudomonas syringae* (5,13%) y la incidencia del mildiu veloso disminuyó a 10,8%. Resultando el mildiu veloso, la principal enfermedad en espinaca; por lo que, se evaluaron tres fungicidas químicos, tres productos botánicos y tres productos biológicos; donde los productos químicos inhibieron en 100%, *B. subtilis* inhibió en 92% la germinación de esporangios y con una severidad de valor bajo (1,8), mientras que los demás tratamientos tuvieron poco efecto inhibitorio.

Reynoso *et al.*, (2007), realizaron trabajos en el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal en Cuba sobre la evaluación de *Bacillus* y otros géneros relacionados como biocontroladores de hongos fitopatógenos, obtuvieron 85 cepas bacterianas con características semejantes a las de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*. El 21,17% de las cepas bacterianas aisladas inhibió el pleno desarrollo micelial de *Alternaria solani*, mientras que 20% tuvo este mismo efecto sobre *Rhizoctonia solani*, de los cuales siete cepas se seleccionaron como promisorias para el control biológico de los hongos fitopatógenos estudiados, correspondientes a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichiformis* y *Paenibacillus polymyxa*.

Guillen *et al.*, (2006), evaluando en campo, el potencial biocontrolador de cuatro tipos aislados de *Bacillus* y la mezcla de estos (B1, B3, B9 Y B13) sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz; así como, el efecto en el desarrollo y rendimiento del



cultivo de Chile (*Capsicum annum*). El efecto de las bacterias se observó en el incremento de la altura de plantas en 20% y el rendimiento final en 270%. De igual manera, redujo la incidencia y la severidad de la pudrición radicular en 80% y 39% respectivamente, en comparación al testigo.

Loredo *et al.*, (2004), Determinaron que el uso de rizobacterias de vida libre o asociados a la rizosfera de las plantas que poseen mecanismos de síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento y fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos constituyen factores promotores del desarrollo de plantas. Los microorganismos estudiados fueron: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* los que tienen un papel de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el establecimiento y en la producción de gramíneas.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Características de la quinua

2.2.1.1. Taxonomía

La quinua tiene la siguiente posición taxonomía (MINAGRI, 2014):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Caryophyllaceae

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd 1778

Nombre común: Quinua



2.2.1.2. Descripción botánica y agronómica

La planta de quinua es anual, dicotiledónea herbácea, con características en su morfología, pigmentación, de amplia dispersión geográfica, y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se cultiva (Apaza *et al.*, 2013), la quinua posee plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y es tolerante a factores climáticos adversos como heladas, sequía, salinidad de suelos entre otros. Se cultiva desde el nivel del mar hasta 4000 msnm (Mujica, 1988).

Su ciclo vegetativo varía desde 90 hasta 240 días, se adapta a suelos ácidos de pH 4,5 hasta alcalinos con pH de 9,0, se desarrolla con precipitaciones desde 200 a 280 mm anuales (Apaza *et al.*, 2013), desarrollándose en suelos arenosos hasta los arcillosos, la pigmentación de la planta varía desde el verde hasta el rojo pasando por el púrpura oscuro, amarillo, granate y demás gamas de color que se pueden diferenciar dependiendo de los genotipos y etapas fenológicas (Mujica, 1988).

a. Planta

Puede llegar a medir 0.60 a 3.00 m de altura y es erguida (Apaza *et al.*, 2013), dependiendo de la fertilidad de los suelos, tipo de quinua, los genotipos, y de las condiciones ambientales donde se desarrolla (INIA y FAO, 2013).

b. Raíz

Presenta una raíz principal que es pivotante y gruesa y raíces laterales (Gómez y Aguilar, 2016) alcanzando una profundidad de 1,80 cm (Apaza, *et al.*, 2013), ramificada y muy fibrosa, lo cual le otorga buena firmeza a la planta y resistencia a cambios climáticos adversos como la sequía (INIA y FAO, 2013).



c. Tallo

Es cilíndrico y al llegar a la madurez se vuelve anguloso (Tapia y Fries, 2007) a partir de las ramificaciones, la coloración que presenta el tallo varía desde el verde al rojo, muchas veces presenta estrías (Mujica *et al.*, 2013) y también axilas pigmentadas de color verde, rojo o púrpura (INIA y FAO, 2013).

d. Hojas

Las hojas son alternas presentan dos partes: la lámina y peciolo (Apaza, *et al.*, 2013), la lámina tiene tres venas principales y es de forma romboidal, lanceolada, plana u ondulada. El peciolo es largo, fino y acanalado (Gómez y Aguilar, 2016) algo gruesa, carnosa y suave, protegida por cristales de oxalato de calcio en el haz como en el envés (Cornejo, 1976), presentando una coloración que varía del verde al rojo con diferentes tonalidades (Tapia y Fries, 2007).

e. Inflorescencia

Denomina como panoja, presenta colores variados y su clasificación es según su forma: Las amarantiformes, son panojas prolongadas. Las glomeruladas son ramificadas con forma de pequeños pompones (Solorzano, 2013). La longitud varia de 15 – 70 cm (Gómez y Aguilar, 2016), dependiendo de los genotipos, tipo de quinua, lugar donde se desarrolla (Apaza *et al.*, 2013), la fertilidad de los suelos, y condiciones climáticas, alcanzando de 30 a 80 cm de longitud por 5 a 30 cm de diámetro. El número de glomérulos por panoja varía de 80 a 120 y el número de semillas por panoja de 100 a 3000, encontrando panojas grandes que rinden hasta 500 gramos de semilla (Mujica, 1988).

f. Flores

Son pequeñas, con tamaño máximo de 3 mm, incompletas, sésiles o y desprovistas de pétalos (Rea, 1969), pueden ser hermafroditas (Apaza, *et al.*, 2013), pistiladas (femeninas) (Gómez y Aguilar, 2016).

g. Fruto

Es un aquenio de forma esferoidal, lenticular, levemente extendido hacia el centro (Gómez y Aguilar, 2016). Está constituido por el perigonio (Apaza *et al.*, 2013) que cubre a la semilla por completo, y con una sola semilla, de color variable, la cual se separa con facilidad al llegar a la madurez (Gallardo *et al.*, 1997).

h. Semilla

Es el fruto maduro sin perigonio, es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal (Apaza *et al.*, 2013), presenta colores variados como: blanco, crema, plomo, amarillo, rosado, púrpura, café y negro, según las variedades o ecotipos (Gómez y Aguilar, 2016). Presenta tres partes bien definidas que son:

- **Episperma:** Se encuentra debajo del pericarpio y es la parte que cubre el embrión (Villacorta y Talavera, 1976). En ella se encuentra la saponina que le otorga el sabor amargo de la quinua y cuya adherencia a la semilla es variable con las variedades (Apaza *et al.*, 2013).
- **Embrión:** Está formado por la radícula por dos cotiledones (Gómez y Aguilar, 2016). Los cotiledones envuelven al perisperma en forma de anillo, con una curvatura de 320°, es de color amarillo, mide 3,54 mm de longitud y 0,36 mm de ancho. Constituye el 30% del volumen total de la semilla (Carrillo, 1992).



- **Perisperma:** Es un tejido de almacenamiento de las sustancias de reserva nutricionales y está constituido principalmente por granos de almidón, es de color blanquecino (Gómez y Aguilar, 2016) y representa prácticamente el 60% de la superficie de la semilla (Mujica, 1996).

2.2.1.3. Preparación de la semilla

Antes de la siembra, la semilla debe seleccionarse para obtener plántulas vigorosas y uniformes. Esta debe proceder de centros productores de semilla con buena calidad (Cahuana, 2013). El grano o semilla después de cosecha, debe secarse a temperatura ambiente y a la siembra, debe tener una humedad alrededor del 12% (Peralta *et al.*, 2012), estar sana y enteras con buen tamaño y peso, libre de impurezas y semillas de malezas u otros granos, libre de plagas y enfermedades (Gómez y Aguilar, 2016).

2.2.1.4. Preparación del substrato.

El substrato influye en el porcentaje de germinación, enraizamiento y en la calidad del sistema radicular (CIP, 1997). Requiere de pH neutros a ligeramente alcalinos entre 6 a 8.5, tolera la salinidad y suelos de textura franca, franco limosos y franco arcillosos (Cahuana, 2013). Los mejores rendimientos se obtienen en suelos fértiles, de textura media, con buen drenaje y alto contenido de materia orgánica. Los suelos muy pesados no son adecuados para la siembra de quinua por falta de aireación que se puede producir en condiciones de alta humedad. Los suelos arenosos, tampoco son apropiados ya que su escasa capacidad de retención de agua afecta negativamente en las primeras fases fenológicas (emergencia de plántulas, cuatro, seis, ocho hojas verdaderas) del cultivo (Apaza y Delgado, 2005).

Las raíces de la quinua, crece en los primeros 30 cm del suelo, se puede cultivar quinua con resultados aceptables en suelos de 40 cm de profundidad (Minagri, 2011),



pero es preferible que éste sea de 80 cm o más, de profundidad, ya que las raíces pueden llegar a 1,20 m de profundidad, para absorber el agua y tolerar los periodos de sequía (Apaza y Delgado, 2005).

2.2.1.5. Siembra de semilla de quinua.

La siembra, se efectúa a chorro continuo, usando 8 a 10 kg/ha de semilla proveniente de semilleros certificados, con un poder germinativo no menor del 95% y un valor cultural mayor a 85% (Cahuana, 2013). La semilla se distribuye uniformemente en el fondo del surco o en macetas, ya sea con la mano o usando tubos distribuidores de semilla, evitando que la semilla entre en contacto directo con el abono (Camacho, 2009). La profundidad adecuada para el grano de quinua no debe sobrepasar los 2 cm para que la semilla pueda absorber agua y posteriormente pueda germinar y no disecarse en días calurosos. Se tapan con una capa fina de tierra (Gómez y Aguilar, 2016).

2.2.1.6. Principales enfermedades de la quinua

El Mildiu

Es la enfermedad más importante de la quinua, causado por *Peronospora farinosa* (Marca *et al.*, 2011), un oomicete, cuyos miembros son parásitos obligados (biotróficos) altamente especializados que parasitan plantas vasculares (Danielsen y Ames, 2000), afectando negativamente en el desarrollo de la planta (área foliar fotosintética de la planta) y en el rendimiento (Bazile *et al.*, 2014).



Taxonomía

Dominio: Protista

Filo: Heterokontophyta

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: Peronospora

Especie: *Peronospora farinosa*, Willd 1849

N. común: Mildiu

P. farinosa ataca a las especies de la familia Chenopodiaceae a la que pertenecen los géneros Beta, Spinacia y Chenopodium, atacando solo al género del cual ha sido aislado (Danielsen y Ames, 2000). Debido a ésta especialización fisiológica, el patógeno está subdividido en 3 grupos según sus hospedantes: *P. farinosa* f.sp. *betae* en *Beta* spp., *P. farinosa* f.sp. *spinaciae* en *Spinacia* spp., y *P. farinosa* f.sp. *chenopodii* en *Chenopodium* spp. (Agrios, 2005).

Importancia y distribución

La enfermedad afecta hojas, ramas, tallos y panojas, en cualquier estadio fenológico del cultivo. Los mayores daños se presentan en plantas jóvenes (estados de ramificación y panojamiento) (Danielsen y Ames, 2000), provoca defoliación (Bazile *et al.*, 2014), perjudicando el normal desarrollo y fructificación de la quinua (Mujica *et al.*, 2013) (Fig. 1).



Figura 1. Planta de quinua atacada por mildiu (*Peronospora farinosa*) tomado de (Bazile *et al.*, 2014).

Las condiciones ambientales con alta humedad en el ambiente (exceso de lluvias) favorecen el desarrollo del mildiu (Mujica *et al.*, 2013). La enfermedad se presenta en la todos los lugares donde se cultiva la quinua (Bazile *et al.*, 2014), por la diversidad genética del patógeno y por presentar un amplio rango de adaptabilidad. Esta enfermedad se encuentra distribuida en todos los lugares o países donde se cultiva quinua, Sudamérica, Norteamérica y Europa (Danielsen y Ames, 2000).

Patogenicidad

La patogenicidad varía con las diferentes variedades, fases fenológicas de desarrollo y órganos infectados de la planta. Generalmente, la enfermedad se inicia con pequeñas manchas de forma irregular (Cruces y Callohuari, 2016). En la cara superior de las hojas se observa manchas amarillas pálidas (cloróticas) o rojizas de tamaño y forma variables En la cara inferior, se observan pelusillas de color plomo gris violáceo



(esporangio y esporangióforos) (Gómez y Aguilar, 2016). Los síntomas aumentan en número y tamaño sucesivamente (Danielsen y Ames, 2000).

En algunos casos las lesiones están localizadas y definidas; sin embargo, en otros las lesiones son muy tenues, en ambos casos pueden cubrir la totalidad del área foliar (Apaza y Delgado 2005). Provocando alteraciones fisiológicas, disminuyendo severamente la fotosíntesis. En infecciones graves llega a necrotizar toda la hoja o área afectada de la planta (Danielsen y Ames, 2000) y produce defoliación generalizada (Gómez y Aguilar, 2016).

Cuando el ataque del mildiu a variedades de quinua susceptibles es severo, llegan a ocasionar distorsión de los tejidos afectados y las hojas muestran depresiones pronunciadas como ampollas pálidas o coloreadas. La sintomatología puede llevarnos a una confusión por ataque de virus ya que la infección del patógeno adoptan una característica de tipo sistémico (Alandia *et al.*, 1979), las plantas se tornan amarillentas y con enanismo pronunciado (Gómez y Aguilar, 2016). Esta sintomatología se expresa cuando la infección del patógeno se inicia por medio de oosporas que han quedado adheridas a los granos de semillas de quinua y las que quedaron en los residuos de cosechas en la parcela (Cruces y Callohuari, 2016).

Agente causal

Es una enfermedad originaria de los Estados Unidos conocida como mildiu *Peronospora farinosa* y en 1878 fué introducida en Europa. Esta enfermedad se presenta en ambientes húmedos en plantas que crecen a fines de la primavera (Mujica *et al.*, 2014). Las hojas basales presentan manchas cloróticas o amarillas - pálidas, las cuales, aumentan en tamaño y número conforme aumenta la humedad del medio ambiente. Cuando aumenta la humedad atmosférica, la enfermedad se desarrolla rápidamente en el has y

envés de la hoja (Danielsen y Ames, 2000). En el envés, se presenta una abundante esporulación (Bazile *et al.*, 2014).

2.2.1.7. Morfología

El patógeno presenta una estructura vegetativa constituida por hifas y en sus puntas se forman los esporangióforos y esporangios (Agrios, 2005). Las hifas son cenocíticas (sin septa) (Bazile *et al.*; 2014) y multinucleadas, proyectan haustorios que utilizan como órganos de absorción dentro de la célula estos se desarrollan en los espacios intercelulares de las hojas. El patógeno ataca principalmente la hoja formando en la cara inferior esporangióforos que miden entre 167 y 227 μm de longitud y entre 11.0 y 14.8 μm de diámetro. Los esporangióforos son arborescentes, dicotómicamente ramificados 4 a 5 veces en ángulo agudo y terminan en 2 – 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo, donde se insertan los esporangios (fig. 2) (Danielsen y Ames, 2000).



Figura 2. Esporangióforo y esporangios de *Peronospora farinosa*.
Tomado de (Danielsen y Ames, 2000).

Los esporangios son de color castaño claro translúcido y son decíduos (a la madurez se desprenden del esporangióforo), ovales, con una papila apical translúcida; miden entre 25,7 y 31,9 μm de largo y 19,3 a 24,3 μm de diámetro (fig. 3). Poseen una pared ligeramente rugosa y el protoplasma granuloso. No producen zoosporas como ocurre con otros Oomicetes. Su germinación es directamente por un tubo germinativo por lo que se les designa con los nombres de esporangio, espora o conidia (Danielsen y Ames, 2000).



Figura 3. Esporangios de *Peronospora farinosa* (Danielsen y Ames, 2000).

Las oosporas son estructuras que sobreviven las campañas agrícolas y son fuente de inóculo primario (Alandia *et al.*, 1979).

El oogonio es de forma esférica y el anteridio es claviformes (Flores *et al.*, 2010), se encuentran generalmente en forma abundante en el tejido de la hoja en proceso de necrobiosis. El oogonio es hialino, de pared gruesa, densamente granulada. El anteridio es translúcido, a menudo adosado al oogonio (Danielsen y Ames, 2000).

El diámetro de la oospora varía entre 39 y 50 μm (fig. 4) (Danielsen y Ames, 2000). *chenopodii* es un organismo heterotálico; por lo tanto, para que se forme la oospora es necesaria la presencia de dos talos genéticamente distintos y sexualmente compatibles (Bazile *et al.*, 2014).

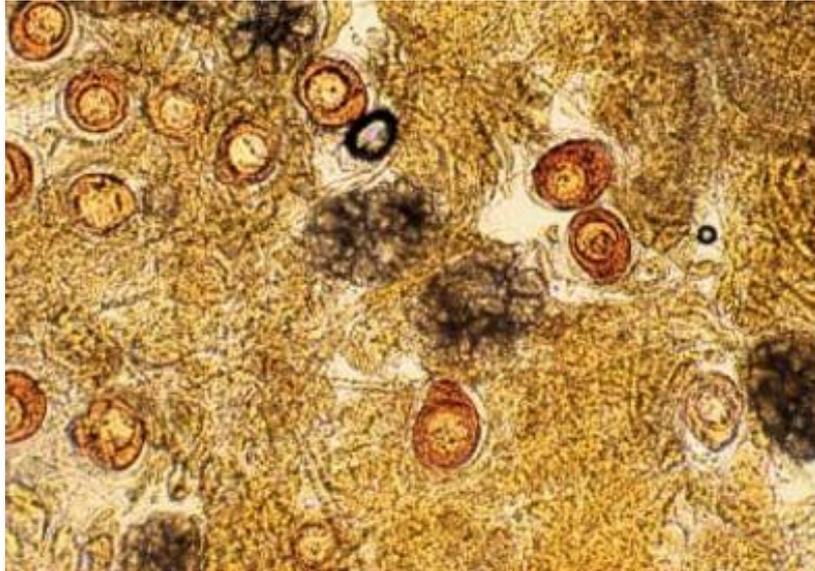


Figura 4. Oosporas de *Peronospora farinosa* en tejido foliar tomado de (Danielsen y Ames, 2000).

Durante la época de cultivo se pueden producir varias generaciones, infecciones sucesivas (policíclicos) y la reproducción del patógeno es asexualmente (esporangios) (fig. 5) (Apaza y Delgado, 2005).

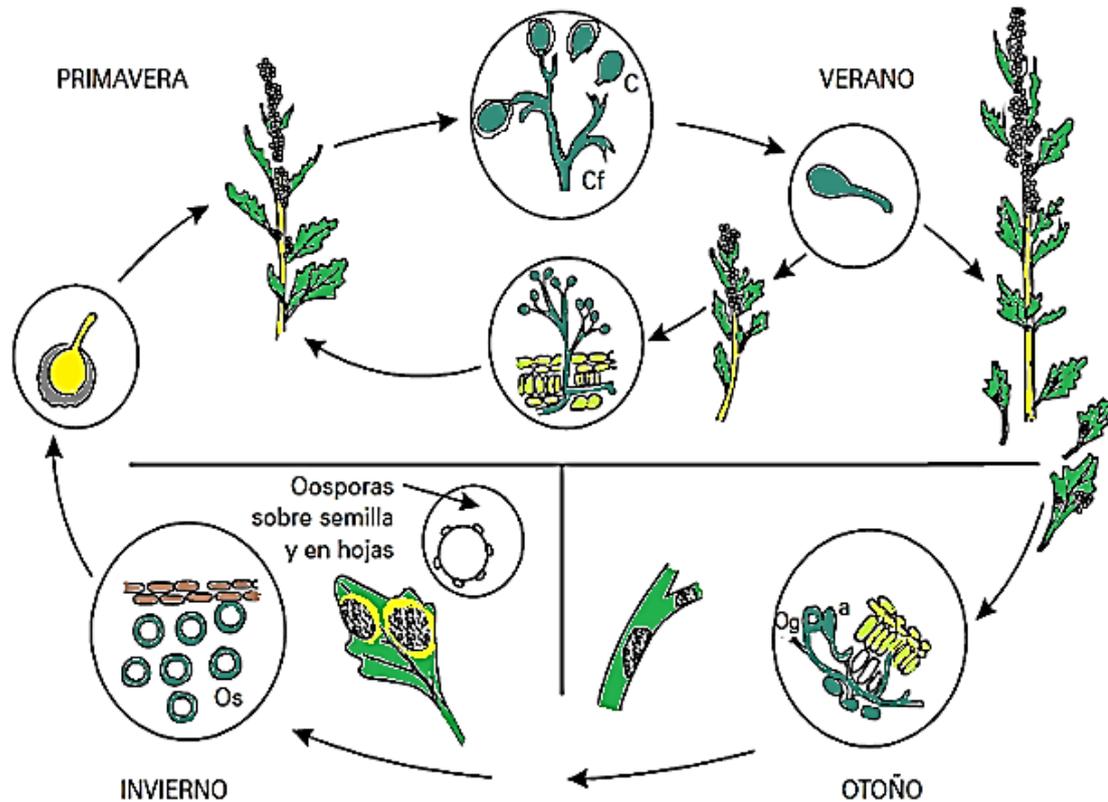


Figura 5. Ciclo de vida de *Peronospora farinosa* en la zona andina. Cf: esporangi6foro, C: esporangio, a: anteridio, Og: oogonio, Os: oospora. tomado de (Tapia *et al.*, 2000).

Epidemiologfa

El *Peronospora farinosa* se disemina a trav6s del viento, lluvias (esporangios), semilla y suelo (oosporas) (Danielsen y Ames, 2000). La infecci6n es estimulada cuando se presentan las condiciones favorables 6ptimas (alta humedad relativa >80%) (Bazile *et al.*, 2014) y las temperaturas moderadas (13 -18°C) (Mujica *et al.*, 2006).

El in6culo de *Peronospora farinosa* se encuentra presente en el suelo o en la semilla infectada inici6ndose asf la enfermedad desde las plantas pequeas. En c6mara de crecimiento, se observa la infecci6n primaria con una esporulaci6n abundante que cubre la superficie de las hojas cotiledonales (fig. 6) (Danielsen y Ames, 2000). La infecci6n primaria sirve en el campo como foco de infecci6n y la enfermedad se generaliza durante el periodo de cultivo por medio de esporangios que se desplazan por acci6n del viento y

caen en plantas sanas o en hojas sanas de la misma planta (infección secundaria) (Cruces y Callohuari, 2016). Los esporangios son estructuras propagativas por excelencia que se producen en forma policíclica a lo largo del periodo del cultivo, siempre y cuando haya suficiente humedad y una temperatura adecuada para su desarrollo (Danielsen y Ames, 2000).



Figura 6. Infección primaria de mildiu observada como esporulación abundante en hojas cotiledonales de quinua. (Danielsen y Ames, 2000).

Evaluación de la enfermedad

Se determina el porcentaje del área foliar afectado en hojas individuales. La severidad se mide en 3 hojas por planta, tomando al azar una de cada tercio (Apaza y Delgado, 2005), de acuerdo a una escala de 0% hasta 100% (fig.7) y luego se calcula el promedio de las tres hojas para obtener el valor de una planta. El valor mínimo que indica la presencia de la enfermedad es 1% (Danielsen y Ames, 2000)

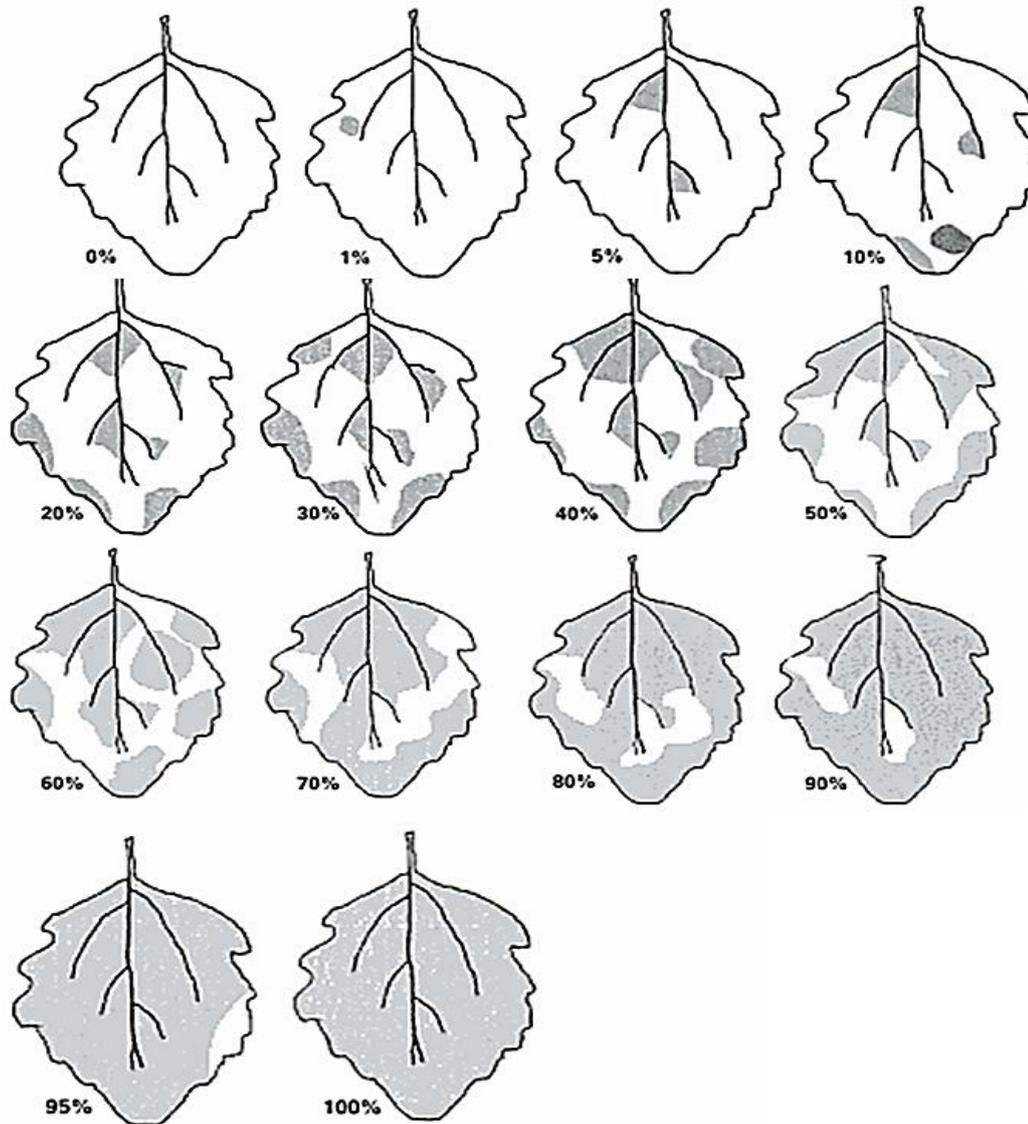


Figura 7. Escala de evaluación para mildiu (*Peronospora farinosa*) en porcentaje del área foliar afectada. tomado de (Danielsen y Ames, 2000).

Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas PGPR

El grupo de bacterias denominadas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), fué definido por Kloepper *et al.*, en 1989 como bacterias que colonizan la raíz y estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. El mecanismo por el cual las bacterias promueven el mejor desarrollo de las plantas, comprende: (i) La habilidad de producir fitohormonas (Carcaño *et al.*, 2006.), como el Ácido Indol Acético



(Deshwal y Kumar, 2013) ácido giberélico (Sivasakthi *et al.*, 2013), citoquininas (Tien *et al.*, 1979) y etileno (Glick, 1995); (ii) fijación asimbiótica de N₂ (Boddey y Döbereiner, 1995); (iii) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, producción de sideróforos (Scher y Baker, 1982); (iv) solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes (De Freitas *et al.*, 1997).

Dentro de este grupo de bacterias, se encuentran los géneros: Alcalígenes, Arthrobacter, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Serratia, Azotobacter, Azospirillum, Clostridium, Pseudomonas, Bacillus y Actinomicetos (Kloepper *et al.*, 1989; Basham y Levanony, 1990; Okon y Lavandera, 1994; Maier *et al.*, 2004).

Según Kloepper *et al.*, (1989) las PGPR pueden ser: Bioprotectores (supresión de enfermedades de plantas), Biofertilizantes (aumentar la capacidad de absorción de nutrientes) y Bioestimulantes (producción de fitohormonas). Existe interacción suelo, planta, microorganismos y ambiente los que repercuten, en el crecimiento positivo y en el desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011), las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR, pueden actuar de manera indirecta o directa: (i) Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos por las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos (García y Gómez, 2016), involucran aspectos de control biológico, inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de las plantas, producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia y la competencia por nutrimentos y el nicho (Sarabia *et al.*, 2010).



(ii) Mecanismos directos: Ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta (Glick, 1995).

Género *Bacillus*

Los *Bacillus* están altamente presentes en la rizósfera de los cultivos (Calvo *et al.*, 2010), debido a la formación de esporas que le dan una ventaja de supervivencia en la raíz vegetal, esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (Glick, 1995). Al formar endoesporas le da una ventaja competitiva en el suelo (Stephens, 1998); sin embargo, se debe adaptar a cambios bruscos de temperatura, para lo cual cuentan con genes de shock térmico inducibles (Petersohn *et al.*, 2001).

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae. Formado por microorganismos bacilares Gram positivos formadores de endosporas (Lisboa, 2003), quimioheretótrofos que normalmente son viables y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos (Macedo y Vola, 2006), son catalasa positivos, se desarrollan a pH entre 5.5 y 8.5. Las células bacterianas presentan un tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes en aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos (Koneman *et al.*, 2001). Crecen formando colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Layton *et al.*, 2011).



De acuerdo al sistema de clasificación taxonómica de la segunda edición del Manual de Bergey's (2000), el género *Bacillus* pertenece a:

Dominio: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Bacillaceae
Género: *Bacillus*

Entre las especies más representativas del género *Bacillus* se encuentran *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. Subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. lincheniformis*, *B. polimyxa*, *B. thuringiensis*, entre otros (Bergey's 2000).

Actividad antagónica de *Bacillus*

Existen microorganismos antagónicos en los campos de cultivo (PGPR), como las bacterias del género *Bacillus* que son una alternativa de control de enfermedades causadas por hongos (Sánchez *et al.*, 2014). Por ejemplo, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), presenta un papel importante en el crecimiento de las plantas y son biocontroladores de las enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus (Liu *et al.*, 1995).

Estudios previos revelan que el control biológico realizado por las PGPR involucra la producción de metabolitos bacterianos, los cuales reducen la población y la actividad de patógenos o microflora rizosférica deletérea (Glick *et al.*, 1995). Estos metabolitos pueden incluir a los sideróforos, que se unen al Fe haciéndolo menos disponible a ciertos miembros de la microflora patógena natural del suelo (Berthelin *et*



al., 1991; Kloepper *et al.*, 1987). Por otro lado, la producción de antibióticos es uno de los aspectos más estudiados como mecanismo de biocontrol. Muchos estudios han demostrado que los inóculos bacterianos que producen antibióticos como la pirrolnitrina, ficocianina, 2,4 diacetilfloroglucinol etc., causan la supresión de fitopatógenos del suelo (Pierson y Thomashow, 1992; Kloepper, 1994; Glick *et al.*, 1995; Thomashow y Weller, 1988). A su vez, Glick (1995) indicó que el mecanismo más efectivo que una PGPR puede emplear para prevenir la proliferación de fitopatógenos es la síntesis de antibióticos.

La acción biocontroladora del *Bacillus* está mediada por su perfil bioquímico ya que son productores de múltiples metabolitos biológicamente activos, así en el caso de *Bacillus subtilis* de iturin A y fengycin y en *Bacillus brevis* de gramicidina S, son capaces de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de otros microorganismos, lo que son necesarios para el biocontrol de plagas en aras del fortalecimiento de los actuales estándares de calidad en los procesos ambientales (Layton *et al.*, 2011).

Uno de los géneros más estudiados en el tema de los biocontroles es el género *Bacillus sp*, resultando el más representativo el *B. subtilis*, a pesar de que no se conoce con completa certeza su mecanismo antibacteriano y antifúngico, pero sí han reportado evidencias de producción de metabolitos antibióticos como la surfactina, la iturina A, la subtilina, la subtilisina, la micosubtilina y la bacitracina entre otras (Bais *et al.*, 2004; El-Hassan y Gowen, 2006; Gong *et al.*, 2006; Korsten y Jager, 1995; Leclere *et al.*, 2005; Kilian *et al.*, 2000; Bacon *et al.*, 2001). Además de su reconocida importancia como biocontrolador, el *B. subtilis* se ha caracterizado últimamente como la única cepa capaz de matar a microorganismos de su misma especie (González, 2006).



2.3. MARCO CONCEPTUAL

Antagonista: Son aquellos agentes biológicos capaces de interferir en el proceso de la vida de los patógenos vegetales, pueden ser hongos, bacterias, nematodos, etc. (Baker, 1968).

Antibiótico: Sustancia producida por un microorganismo que inhibe o destruye otros microorganismos, eficaz desde el punto de vista terapéutico contra una gama amplia de bacterias (Forbes *et al.*, 2004).

Antifúngicos: Engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Valdez, 2005).

Gram positiva: Tipo de célula procariota cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa (Madigan *et al.*, 2012).

Inóculo: Término para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped. (Forbes *et al.*, 2004).

Inhibición: La reducción del crecimiento microbiano debido a un descenso en el número de microorganismos presentes o alteraciones en el ambiente microbiano (Mosby, 1998).

Infección: Es el proceso de multiplicación de un microorganismo infeccioso dentro del organismo con o sin manifestación de la enfermedad. Puede ser endógena, si el organismo responsable forma parte de su flora habitual, o exógena si el proceso es adquirido externamente al huésped (Brooks *et al.*, 2011).



Patógeno: Se define como un organismo que tiene la capacidad de causar enfermedad.

Esa capacidad depende de diversos factores, que incluyen: la dosis infectante del germen, la puerta de entrada al organismo y especialmente la susceptibilidad del huésped (Forbes *et al.*, 2004).

Planta huésped: Aquel organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, el hospedante resulta involucrado ya que constituye el asiento donde se llevan a cabo las acciones entre antagonistas y patógenos (Baker, 1987).

Semilla: Es el óvulo fecundado y maduro que contiene el embrión o parte de la planta que da origen a una nueva planta, aproximadamente de 1.8 mm a 2 mm de diámetro, el color de la semilla puede ser amarillo, café, crema, plomo, blanco o translucido (Apaza y Delgado, 2005).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación, se realizó en el invernadero N° 1 del Anexo Salcedo de la Estación Experimental Illpa INIA - Puno, provincia de Puno, con coordenadas UTM 19 L 392941 8243990, Altitud a 3820 msnm.



Figura 8. Ubicación del anexo Salcedo de la Estación Experimental Illpa –Puno, Marzo 2016. Tomado <https://google.com.pe/maps/place/Estacion/Experimental/Agraria/Illpa-Sede/Salcedo>.

Las muestras de suelo provienen del campo de cultivo de quinua del fundo Palermo ubicado en el distrito de Juli provincia de Chucuito, región Puno a una altura de 3828 msnm, con coordenadas UTM 19 K 451224 8206644. Tiene un clima seco y semiseco, las precipitaciones pluviales se presentan en los meses de noviembre a marzo y son escasos durante los meses de abril a octubre.

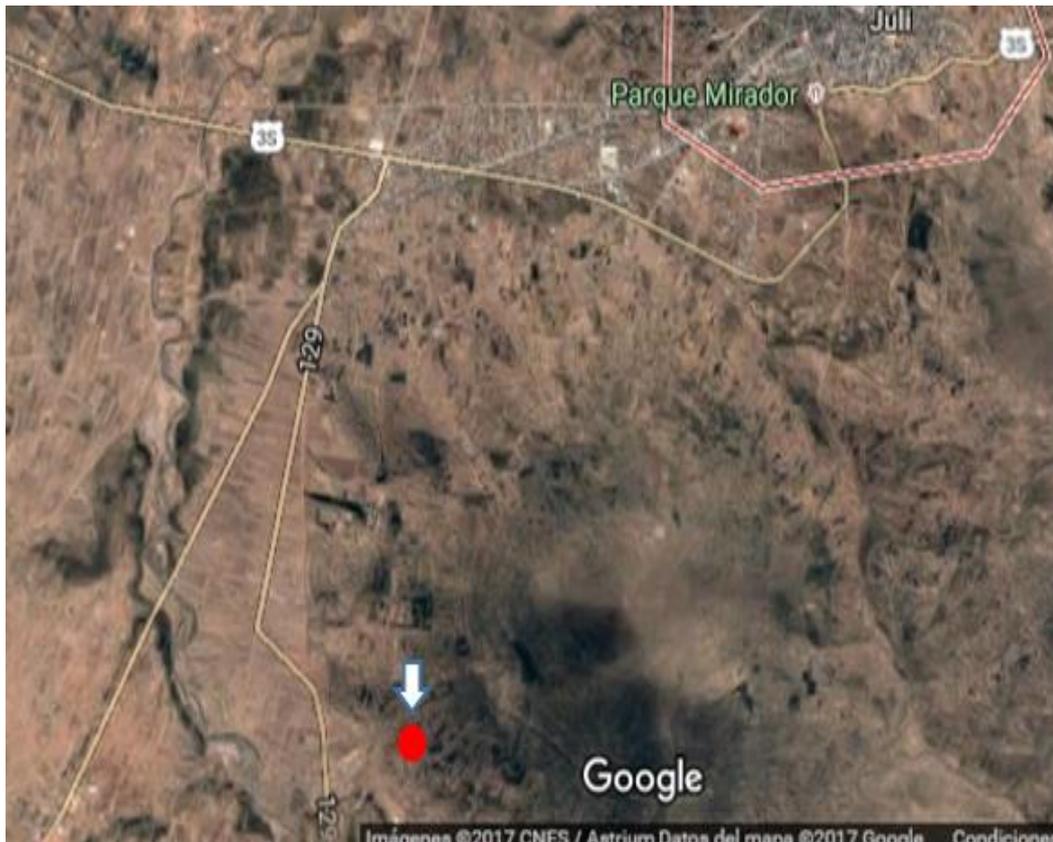


Figura 9. Campo del cultivo de quinua en el fundo Palermo – provincia de Chucuito – Juli, Tomada [https:// google.com.pe/maps/place/juli.pe](https://google.com.pe/maps/place/juli.pe).

3.2. TIPO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo experimental y se realizó durante la campaña agrícola Marzo - Mayo del 2016.

3.3. POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

Se utilizó plantas de quinua de la variedad Salcedo INIA distribuidos en 15 maceteros, se trabajó con 5 tratamientos y 3 repeticiones en cada estadío.

Tabla 1. Tamaño de muestra de la investigación.

Estadíos de la quinua									
6 hojas		Ramificación		Inicio de panojamiento		Panojamiento		Floración	
Trat	Rep	Trat	Rep	Trat	Rep	Trat	Rep	Trat	Rep
T1:	3	T1:	3	T1:	3	T1:	3	T1:	3
T2:	3	T2:	3	T2:	3	T2:	3	T2:	3
T3:	3	T3:	3	T3:	3	T3:	3	T3:	3
T4:	3	T4:	3	T4:	3	T4:	3	T4:	3
T5:	3	T5:	3	T5:	3	T5:	3	T5:	3

T1: (control)

T2: (5ml) dosis de *Bacillus spp.*

T3: (10 ml) dosis de *Bacillus spp.*

T4: (15 ml) dosis de *Bacillus spp.*

T5: (20 ml) dosis de *Bacillus spp.*

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Determinación de la presencia de *Bacillus spp.* en suelos de cultivo de quinua en la localidad de Palermo, en la provincia de Chucuito - Juli.

a. Toma de muestras de suelo para aislar *Bacillus spp.*

Las muestras de suelo fueron tomadas de un área de cultivo de quinua (5,000 m²) de la variedad Salcedo INIA Puno, en la localidad de Palermo, Provincia de Chucuito Juli. Se dividirá en submuestras y muestras.

Se elaboró un croquis del campo de cultivo, ubicando 10 puntos de muestreo, recorriendo en zig – zag (fig. 10). De cada punto se obtuvo aproximadamente 1 kg.

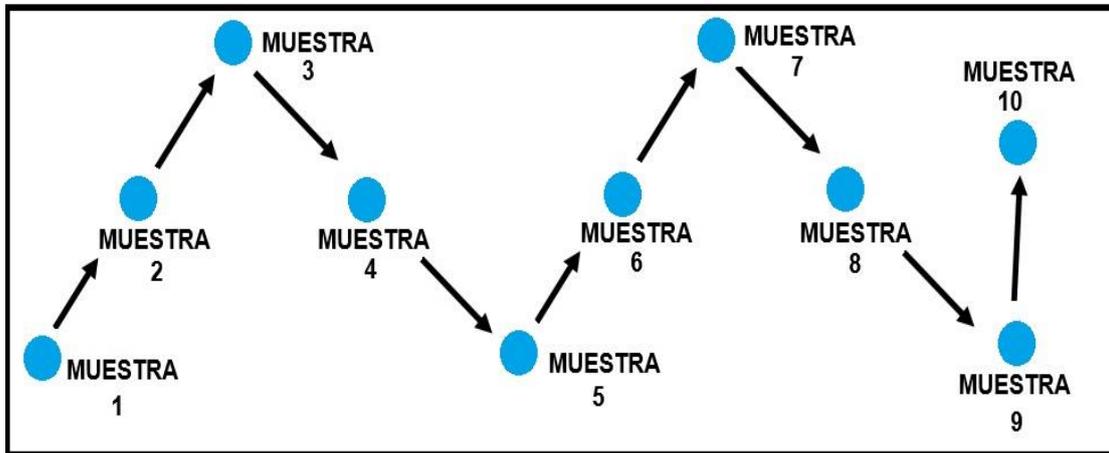


Figura 10. Los 10 puntos de muestreo de suelos de un cultivo seleccionado de quinua.

- Procedimiento de obtención de submuestras y muestras

1. Cada punto elegido estaba situado al lado del surco de las plantas de quinua, y se procedió a realizar la limpieza de la capa superficial del suelo, eliminando malezas y piedras.
2. Con una pala se cavo el suelo haciendo un hoyo de 20 cm de profundidad en forma de V, se retiró la tierra arrojándolo a un costado.
3. Con un Palin agrícola se recogió la tierra de los bordes del hoyo de aproximadamente 3 cm de grosor, luego se depositó la submuestra en una bolsa de plástico de polietileno.
4. Se realizó el mismo procedimiento en todos los puntos seleccionados.
5. Una vez terminada el procedimiento en todos los puntos seleccionados, las submuestras se juntaron sobre una bolsa de plástico limpio, luego se desmenuzaron y se mezclaron uniformemente, eliminando las piedras y restos vegetales.



6. Las submuestras se dividieron en 4 partes, de las cuales se recogió 1 parte y se descartó el resto, se volvió a realizar el mezclado y el cuarteo hasta llegar al tamaño para obtener la muestra requerida, se obtuvo 500 g de muestra para aislar cepas de *Bacillus* (muestra 1) y otra de 1 kg para el análisis Físico – Químico (muestra 2).
7. Las muestras de suelo obtenidas se colocaron en sus respectivas bolsas de plástico debidamente etiquetadas consignando todos los datos relevantes a la muestra.
8. La muestra 1 se llevó al laboratorio de cultivo de tejidos y virología en donde se realizó el aislamiento de cepas de *Bacillus*, mientras que la muestra 2 se llevó al laboratorio de suelos de la Estación Experimental Illpa – INIA-Puno, para realizar el análisis Físico – Químico.

b. Aislamiento de *Bacillus spp.*

Se utilizó el método de diluciones y siembra en placa Petri.

- Fundamento:

Método de diluciones: Se basa en hacer una dilución primaria cuya finalidad es lograr obtener una muestra representativa, lograr una distribución lo más uniforme posible, de los microorganismos contenidos en la muestra destinada al análisis (Camacho *et al.*, 2009).

Siembra en placa Petri: Se basa en sembrar o inocular artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incubaba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Santambrosio *et al.*, 2009).

- Procedimiento:

El procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar y se esterilizo todos los materiales para tener un trabajo aséptico.



1. De la muestra total (500 g), se tomó 10 g y se depositó en un matraz con 90 ml de agua destilada estéril, que representa la dilución 10¹, luego se realizó una serie de diluciones hasta llegar a 10³.
2. Esta última dilución se llevó a baño maría, 75°C por 15 minutos, a fin de eliminar las formas de vida vegetativa y obtener solo esporas bacterianas.
3. Posteriormente se sembró por incorporación en agar nutritivo con la utilización de un mechero como fuente de calor para evitar la contaminación en nuestra área de trabajo y se incubó a 28°C por 48 horas.
4. Las placas cultivadas se observaron diariamente durante 5 días a fin de seleccionar cepas de *Bacillus* de mejor crecimiento.
5. Se contabilizaron las esporas y luego se repico la cepa blanquecina filamentosa de mayor crecimiento en agar nutritivo.
6. Se realizó la evaluación de las características macroscópicas de las colonias, esto se llevó a cabo por medio de una observación visual del crecimiento en la superficie de las placas de agar, se consideraron los siguientes puntos: tamaño, forma, superficie, consistencia y coloración.
7. Para la evaluación microscópica de las colonias, se utilizó un microscopio a 100X, y se consideró los siguientes puntos: prueba de Tinción Gram para asegurar su pureza, tamaño y forma.
8. Se realizó la prueba de catalasa.
9. Por otro lado, para evitar la presencia de *Bacillus cereus*, que es un patógeno para el ser humano, las cepas se sembró en Agar Mosell y las que se identificaron como *B. cereus* fueron descartadas.

10. Finalmente se conservó la cepa de *Bacillus spp.* en placas petri para su multiplicación posterior, asignándole un código de identificación.

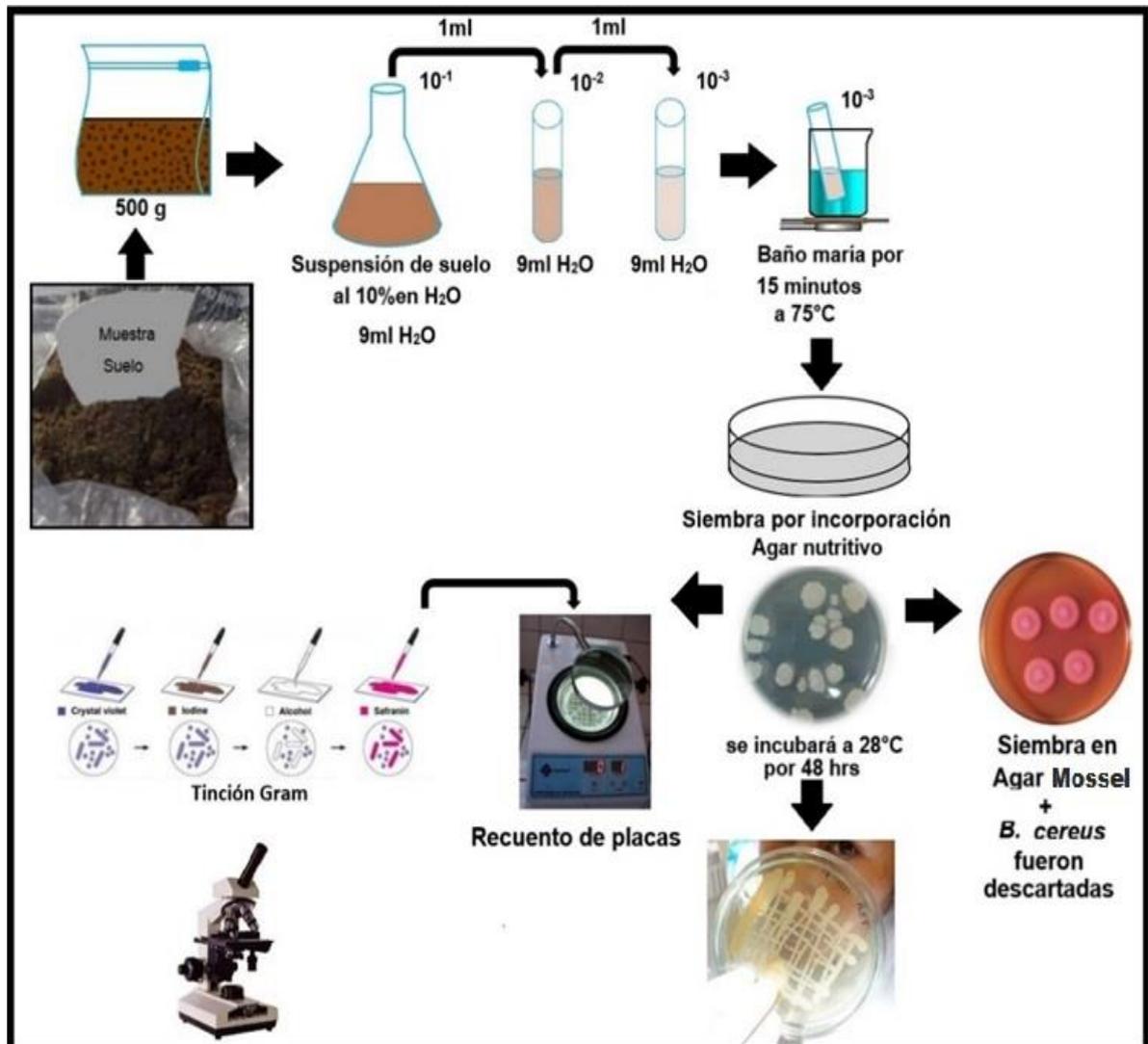


Figura 11. Protocolo de aislamiento de *Bacillus spp.*

a. Análisis Físico – Químico

Se realizó en el laboratorio de análisis de suelos y aguas de la Estación Experimental Agraria Illpa - Puno, con sede en Salcedo - Puno, los parámetros analizados fueron: Nitrógeno (N), fosforo (P) potasio (K), materia orgánica (MO) y pH (Anexo 5).



b. Aislamiento de hongo *Peronospora farinosa*.

Las hojas de quinua infestadas con mildiu fueron colectadas de la comunidad campesina San Juan de Tahuaco.

Procedimiento:

1. Se colectaron hojas de quinua con una sola lesión, a su vez presentaban abundante esporulación.
2. Seguidamente el área de la hoja de quinua infectada por mildiu, se cortó por el perímetro de la lesión, luego se obtuvieron los esporangios del tejido foliar, empleando un chorro de agua destilada (5 ml).
3. Los esporangios obtenidos se colocaron en tubos de ensayo de 5ml para centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
4. Se descartó el sobrenadante, quedando 2 ml de sedimento en el tubo de ensayo.
5. Se realizó el mismo procedimiento hasta recolectar 75 ml del inóculo de *Peronospora farinosa*.
6. Se recolectó en un matraz de Erlenmeyer 5 ml del inóculo de *Peronospora farinosa* para aplicarlos a las 15 plantas de quinua.

3.4.2. Determinación del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa*.

a. Experimento en el invernadero

1. Se utilizaron macetas limpias, donde se llenaron tierra agrícola, hasta tres cuartas partes de su volumen.



2. En cada maceta se sembraron 2 semillas de quinua de la Variedad Salcedo - INIA, procedentes de los semilleros certificados de la Estación Experimental Illpa-Puno.
3. Una vez terminada la siembra y abonamiento, se taparon con una capa de 0.5 cm de substrato y después de una ligera compactación se dio riego ligero.
4. Las plantas de quinua, emergieron uniformemente a los 4 a 5 días de la siembra.
5. Los riegos de mantenimiento fueron ligeros y se efectuaron con una frecuencia de 2 veces por semana.
6. A los 30 días de la siembra se obtuvo plantas de quinua en el estadio de 4 hojas, lista para ser inoculadas con el hongo *Peronospora farinosa*.

b. Aplicación del hongo *Peronospora farinosa* a la planta de quinua

1. Se usó 5 ml del inóculo de *Peronospora farinosa* ajustado a una concentración de 1×10^5 esporangios/ml, con un asperjador se aplicó la dosis del inóculo a cada una de las 15 plantas de quinua en el estadio de 4 hojas a los 30 días.
2. Posteriormente las plantas de quinua se trasladaron a una cámara húmeda a 20°C y 80 % HR durante 6 días. Al sexto día, para inducir la esporulación se elevó a 20 °C y 100 % HR por 24 horas.

c. Aplicación de *Bacillus spp.*

1. Pasando 24 horas de la aplicación del mildiu, se aplicaron *Bacillus spp.* en suspensión.
2. El *Bacillus spp.* se preparó en diferentes dosis T1: control, T2: 5 ml, T3: 10 ml, T4: 15 ml y T5: 20 ml.



3. Los tratamientos se aplicaron con un asperjador a las plantas de quinua, ajustado a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, luego se retomó a 20°C y 80% HR durante todo el experimento.
4. La evaluación del estado del follaje fue diaria para determinar la presencia de *Peronospora farinosa*.

d. Evaluación de la enfermedad

El porcentaje de daño se midió según la escala de evaluación para mildiu (*Peronospora farinosa*) de 0% hasta 100% (fig.7).

El porcentaje de eficacia de las dosis de *Bacillus spp.* se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% E = \frac{(\% dT - \% dD)}{\% dT} \times 100\%$$

Donde:

% E= Porcentaje de eficiencia (reducción de daño).

% dT= Porcentaje de daños en el testigo

% dD= Porcentaje de daños en las hojas de quinua con las dosis de *Bacillus spp.*

Procedimiento:

1. La planta se dividió en tres tercios, de cada tercio se tomó una hoja.
2. Cada hoja se comparó con la escala de evaluación para mildiu y se determinó el porcentaje de daño.
3. Aplicando la regla de tres simples se calculó el porcentaje de daño total de la planta.
4. Este procedimiento se realizó para cada tratamiento y repetición.



5. La observación de las hojas se realizó de la siguiente manera:

- A los 45 días: 6 hojas
- A los 52 días: Ramificación
- A los 59 días: Inicio de Panojamiento
- A los 73 días: Panojamiento
- A los 87 días: Floración

g. Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico InfoStat, versión libre para realizar el análisis de varianza (ANOVA), para un diseño completamente al azar (DCA), considerando como factor de estudio los 5 tratamientos (T1: control, T2: 5 ml, T3: 10 ml, T4: 15 ml, T5: 20 ml en la dosis de *Bacillus spp*), las variables dependientes son los porcentaje de daño en hojas en las 15 unidades experimentales con las siguientes etapas: 6 hojas, ramificación, inicio de panojamiento, panojamiento y floración que representan a las plantas de quinua, se trabajó con 3 repeticiones en cada tratamiento. Para realizar el contraste se utilizó la prueba de Tukey y se verificó las diferencias específicas, los análisis se realizaron con una confiabilidad del 95% ($\alpha=0.05$).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la presencia de *Bacillus spp.* en suelos de cultivo de quinua en la localidad de Palermo, en la Provincia de Chucuito - Juli.

Caracterización macroscópica y microscópica de *Bacillus spp.*

a. Caracterización macroscópica:

Se hizo la observación de las colonias de *Bacillus spp* a las 24 horas de tamaños de 2 a 4 mm de diámetro con forma irregular de color blanquecino, con bordes lobulados, con elevación acuminada que presenta un centro más elevado en forma de anillo con una consistencia cremosa. (Fig. 12).

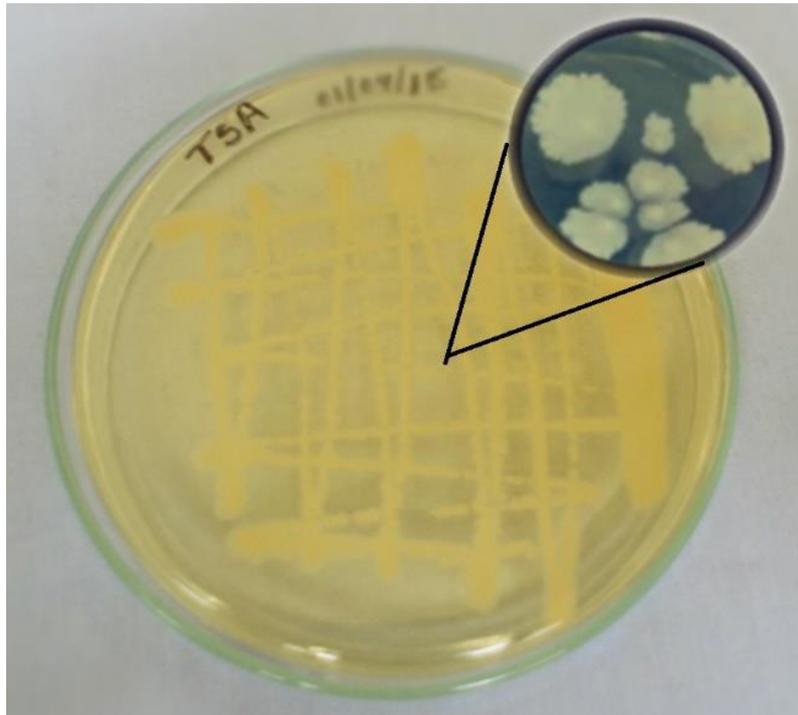


Figura 12. Características macroscópicas de *Bacillus spp.* INIA - Puno, Abril 2016.

b. Caracterización microscópica

La cepa aislada de *Bacillus spp.* fué positiva a la tinción Gram, a las esporas y a la catalasa; por otro lado, no se obtuvo crecimiento característico de *Bacillus cereus* en agar Mossel (Fig. 13).

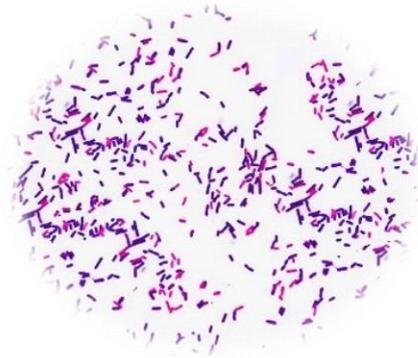


Figura 13. Características microscópicas de *Bacillus spp.* por tinción Gram. INIA - Puno, Abril 2016.

Resultados similares fueron demostrados por Koneman *et al.*, (2001) quien indica que el género *Bacillus* está formado por microorganismos bacilares de coloración gram positiva que forman endoesporas y son catalasa positivos con un pH de 5.5. a 8.5, que favorecen el crecimiento activo situación que nos permite confirmar que nuestro aislamiento en el fundo Palermo se trata de una cepa del género *Bacillus*.

Por otro lado Tejera *et al.*, (2011) indican que aislaron e identificaron a *B. subtilis*, *B. cereus* y *Bacillus sp.*, en raíces del cultivo de arroz, lo cual confirma la amplia diversidad y distribución de éste género en suelos agrícolas, donde promueven el desarrollo directo o indirecto de las plantas mediante mecanismos antagónicos (Reinoso *et al.*, 2007), así mismo Ortuño *et al.*, (2014) aislaron diferentes especies de bacterias en la quinua: *Bacillus amyloliquefaciens*; *B. tequilensis*; *B. vallismortis*; *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. licheniformis* y *B. firmus* (aislados de las hojas). *B. aryabhatai*; *B. horikoshii*;



B. megaterium; *B. pumilus* y *Paenibacillus odorifer*; *Pseudomonas sp.*; *B. subtilis*; *Azotobacter sp.* (aislados de las raíces); *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. amilequefasciens* (aislados del grano), además Ortuño *et al.*, (2013) en plantas de quinua (*Chenopodium quinoa*) seleccionaron cepas bacterianas promisorias, pertenecientes en su mayoría a géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*.

4.2. Determinación del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis sobre *Peronospora farinosa*.

a. Estadío de 6 hojas

Tabla 2. Efecto antifúngico (%) de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de las plantas de quinua en el estadío de 6 hojas. abril 2016.

Estadío de 6 hojas (% de daño)					
	T1	T2	T3	T4	T5
Trat.	(control)	(5ml)	(10ml)	(15ml)	(20ml)
Rep.					
1	5,00	3,00	0,00	5,00	5,00
2	5,00	5,00	5,00	0,00	0,00
3	10,00	5,00	0,00	0,00	0,00
Promedio	6,67	4,33	1,67	1,67	1,67
D.E.	2,89	1,16	2,89	2,89	2,89
Varianza	5,56	0,89	5,56	5,56	5,56

Los resultados del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua indican que el porcentaje de daño en las hojas de Quinua más elevado está en el T1 con un promedio de 6,67 %, mientras que el más bajo esta en los T3, T4 y T5 con un promedio de similar de 1,67 %, finalmente el

T2 presenta un promedio de 4,33 %. En cuanto a la desviación estándar es similar en los T3, T4 y T5. Existe homogeneidad de varianza en los tratamientos T3, T4 y T5.

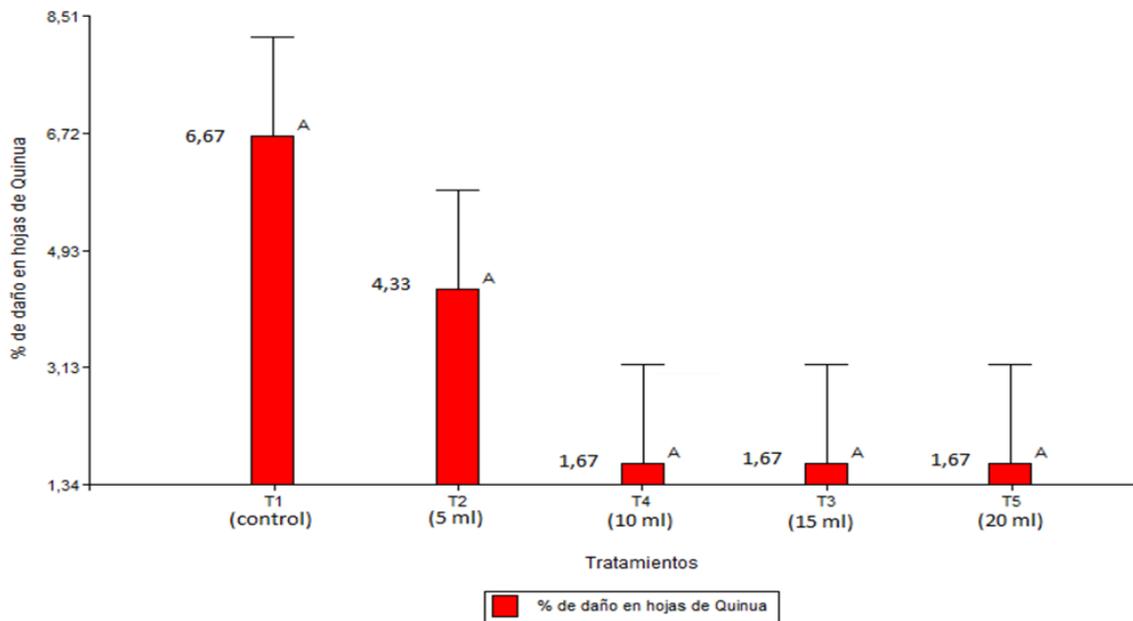


Figura 14. Porcentaje de daño en hojas de quinua por efecto de *P. farinosa* tratados con *Bacillus spp.*, en el estadio de 6 hojas. INIA - Puno, Abril 2016.

La prueba estadística de análisis de varianza (Anexo 6, Tabla 10) no encontró diferencias significativas entre los tratamientos de las dosis de *Bacillus spp.*, obteniendo un valor de $p=0.1420$, el cual es mayor a 0,05, lo que nos indica que en el estadio de 6 hojas de las plantas de Quinua no se evidencia diferencia estadística en el porcentaje de daño foliar causando por *Peronospora farinosa*.

b. Estadío de Ramificación

Tabla 3. Efecto antifúngico (%) de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de las plantas de quinua en Estadío de Ramificación, abril 2016.

Trat.	Estadío de Ramificación (% de daño)				
	T1 (control)	T2 (5ml)	T3 (10ml)	T4 (15ml)	T5 (20ml)
Rep.					
1	20,00	10,00	5,00	10,00	5,00
2	10,00	10,00	5,00	5,00	5,00
3	20,00	10,00	5,00	5,00	5,00
Promedio	16,67	10,00	5,00	6,67	5,00
D.E.	5,77	0,00	0,00	2,89	0,00
Varianza	22.23	0.00	0.00	5.56	0.00

Los resultados del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra el ataque de *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadío de Ramificación indican que el % de daño más elevado se encuentra en el T1 (control) con un promedio de 16,67 %, mientras que los porcentajes de daño más bajos están en el T3 y T4 con promedios similares de 5,00 %. En cuanto a la desviación estándar presenta la mayor en el T1, mientras que los T2, T3 y T5 presentaron coincidencias de 0.00 (tabla 03). Existe homogeneidad de varianza en los tratamientos T1, T2 y T5.

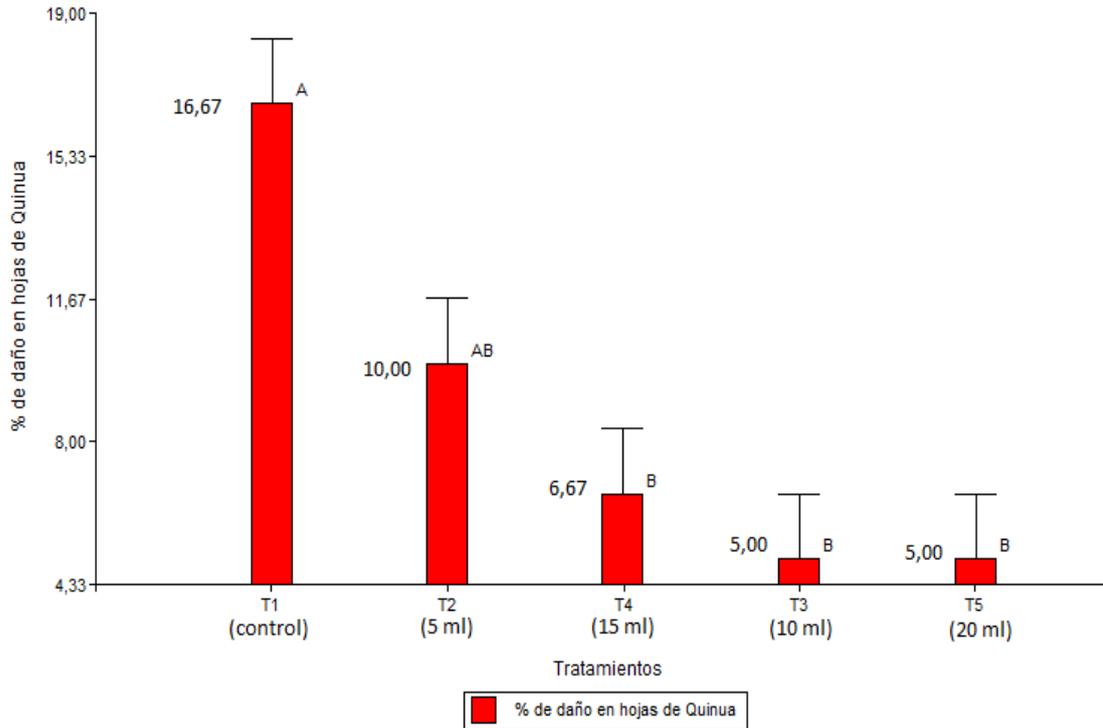


Figura 15. Porcentaje de daño en hojas de quinua por efecto de *P. farinosa* tratados con *Bacillus spp.*, en el estadio de ramificación. INIA - Puno, Abril 2016.

El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativas (**Anexo 6, Tabla 12**) entre las dosis de *Bacillus spp.* ($P= 0.0027$); por lo tanto, para encontrar estas diferencias se realizó la prueba de contraste de Tukey, (**Anexo 6, Tabla 12**), tenemos que el T1 (control) es diferente con los T3 (10 ml), T4 (15 ml) y T5 (20ml). Esta situación se interpreta que en el estadio de Ramificación de plantas de quinua disminuyeron los daños de mildiu por efecto de inhibición de *Bacillus spp.*

c. Estadío de inicio de Panojamiento

Tabla 4. Efecto antifúngico (%) de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadio de inicio de panojamiento, abril 2016.

Trat.	Estadío de Inicio de Panojamiento (% de daño)				
	T1 (control)	T2 (5ml)	T3 (10ml)	T4 (15ml)	T5 (20ml)
Rep.					
1	25,00	20,00	15,00	10,00	10,00
2	30,00	20,00	5,00	5,00	5,00
3	25,00	15,00	15,00	10,00	10,00
Promedio	26,67	18,33	11,67	8,33	8,33
D.E.	2,89	2,89	5,77	2,89	2,89
Varianza	5.56	5.56	22.23	5.56	5.56

Los resultados del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadio de inicio de panojamiento, el % de daño más elevado fue con el T1 (control), con un promedio de 26,67 % mientras que los de menores % de daño fueron los T4 y T5, con promedios iguales a 8,33 %, en este caso también se observó un efecto positivo de disminución del daño de mildiu en las hojas de quinua por efecto de inhibición causado por *Bacillus spp.*, en cuanto a la desviación estándar, fueron iguales en los T1, T2, T4 y T5, con 2,89. (tabla 04). Existe homogeneidad de varianza en los tratamientos T1, T2, T4 y T5.

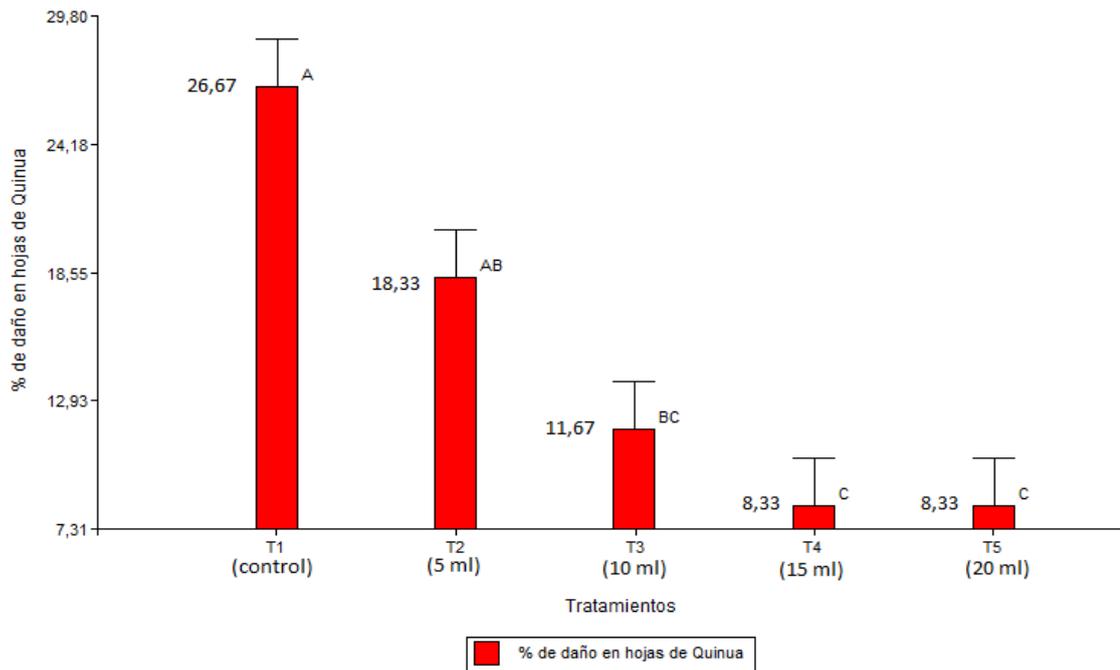


Figura 16. Porcentaje de daño en hojas de quinua por efecto de *P. farinosa* tratados con *Bacillus spp.*, en el estadio de inicio de panojamiento. INIA - Puno, Abril 2016.

Los resultados de análisis de varianza (Anexo 6, Tabla 14) de la aplicación de las dosis de *Bacillus spp.*, nos indica que existe diferencias significativas entre las dosis utilizadas ($P= 0.004$) en el control o inhibición del daño de mildiu en las hojas de quinua por efecto antifúngico de *Bacillus spp.*, por lo tanto se realizó la prueba de contraste de Tukey en donde se aprecia que el T1 (control) presenta diferencias significativas con los T3 (10 ml), T4 (15 ml) y T5 (20 ml), por lo tanto también se observa un efecto positivo de disminución de daño producido, por el hongo *Peronospora farinosa* con estos tratamientos.

d. Estadio de Panojamiento

Tabla 5. Efecto antifúngico (%) de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadio de panojamiento, mayo 2016.

Estadío de Panojamiento (% de daño)					
Trat.	T1	T2	T3	T4	T5
	(control)	(5ml)	(10ml)	(15ml)	(20ml)
Rep.					
1	50,00	40,00	30,00	15,00	15,00
2	40,00	40,00	15,00	10,00	10,00
3	50,00	30,00	30,00	15,00	15,00
Promedio	46,67	36,67	25,00	18,33	18,33
D.E.	5,77	5,77	8,66	2,89	2,89
Varianza	22.23	22.23	50.00	5.56	5.56

Los resultados del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en el estadio de panojamiento indica que el % de daño más elevado está en el T1 (control) con un promedio de 46, 67 %, mientras que los 5 de daños inferiores están en los T4 y T5, con un promedio similar de 18,33 %, en cuanto a la desviación estándar fue mínima en los T4 y T5 con un valor de 2,89, mientras que la más alta fue en el T3 con un valor de 8,66. Existe homogeneidad de varianza en los tratamientos T1 con T2 y T4 con T5.

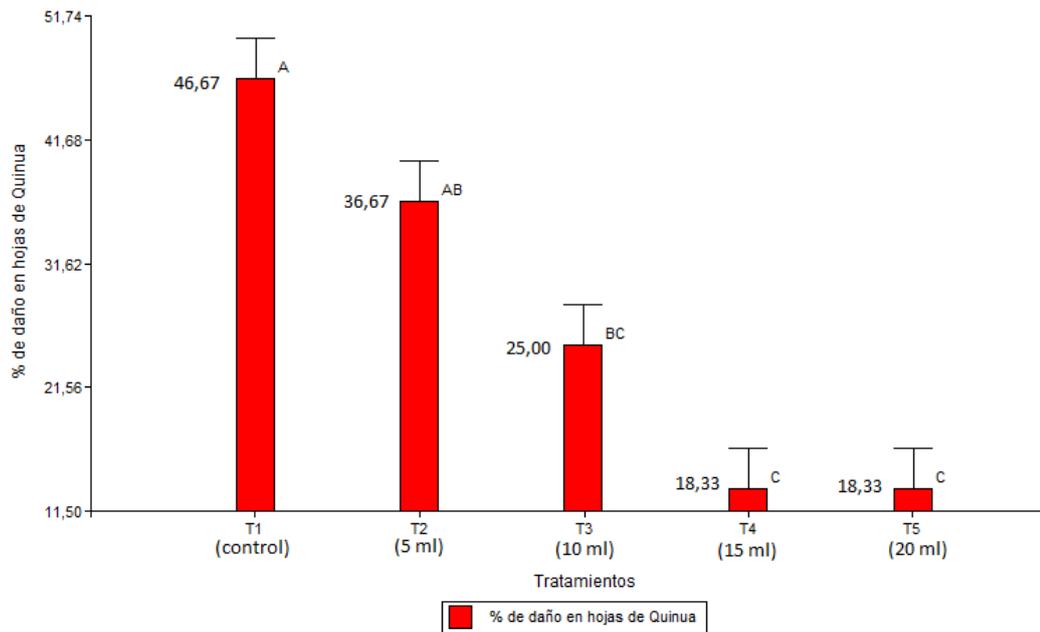


Figura 17. Porcentaje de daño en hojas de quinua por efecto de *P. farinosa* tratados con *Bacillus spp.*, en el estadio de panojamiento. INIA - Puno, Abril 2016.

Los resultados de análisis de varianza (Anexo 6, Tabla 16) de la aplicación de las dosis de *Bacillus spp.*, nos muestran que existe diferencias significativas entre las dosis de *Bacillus spp.*, ($P=0.0001$) por lo tanto se realizó la prueba de contraste de Tukey para encontrar estas diferencias, nos indican que las dosis de 20 ml (T5) y 15 ml (T4) presentan diferencias significativas con el T1 (control), de igual manera en el estadio de panojamiento se observó un efecto positivo de disminución de daño de mildiu en las hojas de quinua, por efecto inhibitorio que causan los *Bacillus spp.*

e. En el Estado de Floración

Tabla 6. Efecto antifúngico (%) de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadio de floración, mayo 2016.

Estadio de Floración (% de daño)					
Trat.	T1	T2	T3	T4	T5
Rep.	(control)	(5ml)	(10ml)	(15ml)	(20ml)
1	80,00	65,00	50,00	20,00	15,00
2	70,00	60,00	40,00	15,00	10,00
3	80,00	65,00	50,00	20,00	15,00
Promedio	76,67	63,33	46,67	18,33	13,33
D.E.	5,77	2,89	5,77	2,89	2,89
Varianza	22.23	5.56	22.23	5.56	5.56

Los resultados del efecto antifúngico de *Bacillus spp.* a diferentes dosis contra *Peronospora farinosa* en hojas de plantas de quinua en estadio de floración, indican que el T5 (20ml) obtuvo el mejor resultado en cuanto al % de daño con un promedio de 13,33 %, seguido del T4 (15 ml) con un promedio de 18,33 %, mientras que los % porcentajes de daño más levados están en los T1 (control) y T2 (5 ml), con promedios de 76,67 y 63,33 % respectivamente, la desviación estándar fue mínima, en T5 con un valor de 2,89, mientras que la más alta fue en el T1 y T3 control con un valor de 5,77 (tabla 06). Existe homogeneidad de varianza en los tratamientos T2, T4 y T5, como también en los T1 y T2.

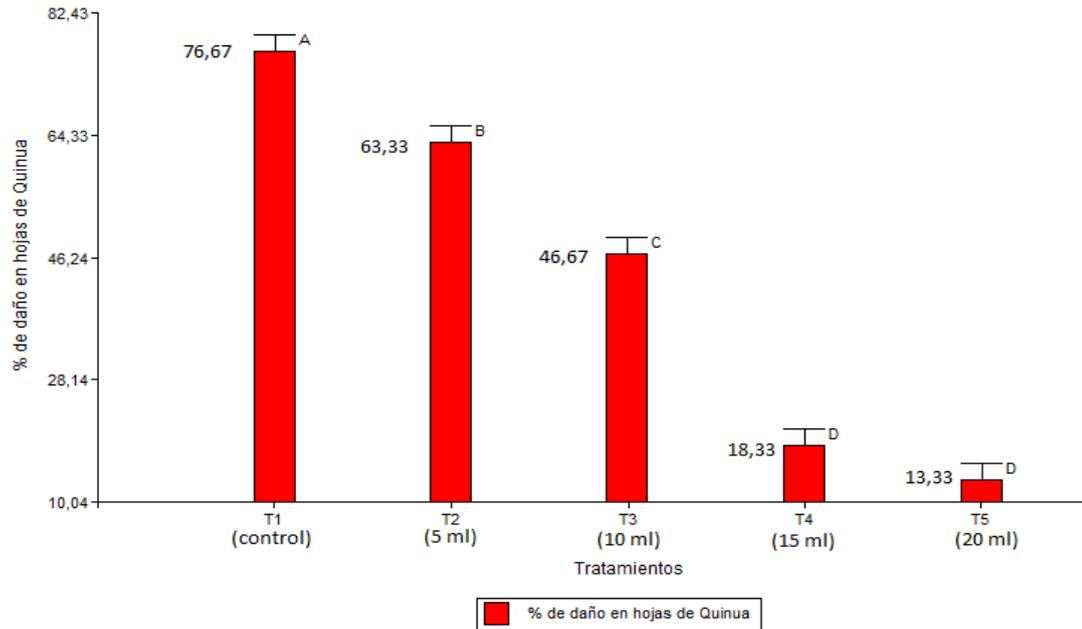


Figura 18. Porcentaje de daño en hojas de quinua por efecto de *P. farinosa* tratados con *Bacillus spp.*, en el estadio de floración INIA - Puno, Abril 2016.

Los resultados de análisis de varianza (Anexo 6 y Tabla 18) de la aplicación de las dosis de *Bacillus spp.*, nos indica que existe diferencias estadísticas significativas ($P=0.0001$) entre las dosis empleadas de *Bacillus spp.* en el control, por lo tanto se realiza la prueba de contraste de Tukey, la cual nos muestra el T1 (control) presenta diferencias significativas con T2, T3, T4 y T5. Por lo tanto, se concluye que las dosis que tuvieron mejores resultados fueron los del T4 (15 ml) y T5 (20 ml), ya que se observó que en cada uno de los estadios presentaron menores porcentajes de daño en las hojas de Quinua.

Tabla 7. Porcentaje de eficacia de las dosis de *Bacillus spp.* contra mildiu en hojas de quinua, marzo a mayo 2016.

Porcentaje (%) de eficacia de las dosis de <i>Bacillus spp.</i>					
Tratamientos	6 hojas	Ramificación	Inicio de panojamiento	Panojamiento	Floración
T2: (5 ml)	35,08	40,01	31,27	21,43	17,40
T3: (10 ml)	74,96	59,99	56,24	46,43	39,13
T4 :(15 ml)	74,96	70,01	68,77	71,44	76,10
T5: (20 ml)	74,96	70,01	68,77	71,44	82,61

El porcentaje de eficiencia más elevado fueron con los T4 y T5 obteniendo 74,96 % en el estadio de 6 hojas, 70,01 % en ramificación, 68,77 en inicio de panojamiento, 71,44 en panojamiento y 76,10 – 82,61% en floración.

Tabla 8. Resumen de resultados de aplicación de las dosis de *Bacillus spp* contra mildiu en las fases fenológicas entre 6 hojas y floración en quinua, marzo a mayo 2016.

FASES FENOLOGICAS												
Tratamiento o dosis	Estado de 6 hojas		Ramificación		Inicio de Panojamiento		Panojamiento		Floración		Promedio	
<i>Bacillus spp.</i>	Daño %	Prueba Tukey	Daño %	Prueba Tukey	Daño %	Prueba Tukey	Daño %	Prueba Tukey	Daño %	Prueba Tukey	Daño %	Prueba Tukey
20ml	1.67	a	5.00	a	8.33	A	13.3	a	13.3	a	8.332	a
							3		3			
15 ml	1.67	a	5.00	a b	8.33	a	13.3	a	18.3	b	9.332	a
							3		3			
10 ml	1.67	a	6.67	a	11.6	a b	25.0	b	46.6	c	18.33	b
					7		0		7		6	
5 ml	4.33	b	10.0	b	18.3	b	36.6	b c	63.3	d	26.53	c
			0		3		7		3			
0ml	6.67	b	16.6	c	26.6	c	46.6	c	76.6	d	34.67	c
			7		7		7		7			



Las dosis de 20 ml (T5) y 15 ml (T4) de *Bacillus spp* fueron las dosis de mayor efectividad en el control de mildiu en todas las fases fenológicas entre 6 hojas verdaderas y floración en el cultivo de la quinua en invernadero y, estas dosis tuvieron comportamiento estadísticamente similares con solo 8.3 y 9.6% de daño en las hojas de quinua, seguido del tratamiento con la dosis de 10 ml (T3) de *Bacillus spp* que tuvo 18.00% de daño por mildiu en las hojas de quinua, mientras que la dosis de 5 ml (T2) y el testigo (T1), tuvieron mayores daños de 26.53 y 34.67% por efecto de mildiu en las hojas de las plantas de quinua (Tabla 08).

Los resultados del presente estudio, confirman el efecto antifúngico de *Bacillus spp*, resultado que han señalados como alternativa de control biológico de hongos fitopatógenos en el cultivo de arroz por Tejera *et al.*, (2011) en Cuba, confirmando el carácter cosmopolita de ésta bacteria, por sus mecanismos de acción de promover el crecimiento de la planta y el efecto antagónico contra hongos patógenos. Por otro lado, Gil *et al.*, (2009), indica que, durante la cosecha con tratamiento químico, se presentaron disminución de manchas foliares causadas por la incidencia del mildiu veloso, sin embargo, si bien es factible el control químico se debe considerar los efectos secundarios sobre el ambiente, así como la resistencia que puede provocar, al respecto Layton *et al.*, (2011) señala que el control biológico con *Bacillus spp.* es importante dentro de los actuales estándares de calidad en los procesos ambientales, por lo que nuestro estudio contribuye con una alternativa de control biológico.

Layton *et al.*, (2011) aclara el efecto biocontrolador del género *Bacillus sp.*, contra hongos fitopatógenos de plantas a través de relaciones antagónicas inductoras de muerte celular de *Fusarium oxysporum* relacionado con la marchitez vascular y pudrición de raíz, por lo que podemos señalar que el mecanismo de acción contra *Peronospora farinosa*



también debe ser de este tipo de acción, como lo señalan nuestros resultados de reducción de los porcentajes de daño en hojas de quinua, con los T3, T4 y T5.

Reinoso *et al.*, (2007), confirma la alta diversidad de especies del género *Bacillus* obteniendo en su estudio 85 cepas bacterianas en Cuba, de los cuales siete cepas se seleccionaron como promisorias para el control biológico de los hongos fitopatógenos, corroborando los resultados de nuestro estudio que con una sola cepa aislada en Juli, obtuvimos resultados positivos en el control del principal hongo patógeno del cultivo de la quinua como es el mildiu. Por otro lado Guillen *et al.*, (2006), señala que utilizando cuatro tipos aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos, obtuvo el control sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz, el efecto de las bacterias se observó en el incremento de la altura de plantas en 20% y el rendimiento final en 27%, en nuestro resultado en las plantas de quinua, también pudimos observar mayor vigor en las plantas tratadas con *Bacillus spp.*, corroborando también que tuvo un efecto promotor de crecimiento, por su participación en los ciclos biogeoquímicos en el sistema suelo planta.

El mecanismo antibacteriano y antifúngico del genero *Bacillus* no ha sido del todo explicado, pero se han reportado evidencias de producción de metabolitos antibióticos como la surfactina, la iturina A, la subtilina, la subtilisina, la micosubtilina y la bacitracina (Bais *et al.*, 2004; El-Hassan y Gowen, 2006; Gong *et al.*, 2006; Korsten y Jager, 1995; Leclere *et al.*, 2005; Kilian *et al.*, 2000; Bacon *et al.*, 2001), estos metabolitos serían los que actuaron en el proceso de antagonismo observado en los resultados de mi estudio en el control de *Peronospora farinosa* en el cultivo de la quinua.

Estudios previos revelan que el control biológico realizado por bacterias involucra la producción de metabolitos bacterianos, los cuales reducen la población y la actividad de patógenos o microflora rizosférica deletérea (Glick *et al.*, 1995). Estos metabolitos



pueden incluir a los sideróforos, que se unen al Fe haciéndolo menos disponible a ciertos miembros de la microflora patógena natural del suelo (Berthelin *et al.*, 1991; por otro lado (Kloepper *et al.*, 1987) la producción de antibióticos es uno de los aspectos más estudiados como mecanismo de biocontrol; por lo que, se debe estudiar a mayor profundidad los mecanismos de control de *Bacillus* sobre patógenos fúngicos en el cultivo de la quinua como se ha demostrado, y en otros cultivos andinos que son afectados por diversos hongos.



V. CONCLUSIONES

De las muestras de suelo de un cultivo de quinua del fundo Palermo, Provincia de Chucuito – Juli, se aisló e identificó una cepa bacteriana, del género *Bacillus*, las características macroscópicas fueron: diámetro de 2 a 4 mm, forma irregular, color blanquecino, bordes lobulados, elevación acuminada, mientras que las microscópicas fueron: tinción Gram positiva, esporas y catalasa positiva.

El porcentaje de daño en hojas de quinua con el T1 (control) fue mayor en todos los estadios evaluados. 6,67% en el estadio de 6 hojas, incrementándose paulatinamente hasta 76,67% en el estadio de floración. Los tratamientos con menor porcentaje de daño fueron los T4 (15ml) y T5 (20ml) con valores similares, diferenciados solo en el último estadio, 1,67% en estadio de 6 hojas, 5,00% en ramificación, 8,33% en inicio de panojamiento, 13,33% en panojamiento y 13,33% en T4, 18,33% en T5. Por lo tanto, se determinó que las dosis de 20 y 15 ml fueron las mejores y de mayor efectividad en el control de *Peronospora farinosa* en el cultivo de quinua bajo condiciones de invernadero.



VI. RECOMENDACIONES

Realizar el asilamiento e identificación de otras cepas de *Bacillus spp.*, en otros suelos de diferentes cultivos andinos, para continuar los estudios de control biológico de diversos hongos patógenos que afectan a estos cultivos.

Determinar y registrar la diversidad de especies del género *Bacillus* y la amplitud de su distribución geográfica en la Región Puno.

Estudiar el efecto combinado de varias cepas de *Bacillus spp.*, para mejorar el efecto antagónico contra diversas especies fúngicas que atacan a los cultivos de la región.

Formular un biofungicida a base de *Bacillus spp.*, en forma de polvo para su mejor utilización por los agricultores de cultivos andinos; así como, mejorar su conservación y transporte.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alandia S., Otazu V., y Salas Y. 1979. Enfermedades. En quinua y kañiwa cultivos Andinos. Editorial IICA. Bogotá, Colombia pp. 137-148.
- Angulo 2013. Congreso Científico de la Quinoa (Memorias). La Paz - Bolivia. pp.682.
- Agrios, G. N. 2005, Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, pp. 952.
- Apaza *et al.*, 2013. Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. pp. 82.
- Apaza V. y Delgado P. 2005. Manejo y mejoramiento de quinua orgánica. Puno-Perú. pp. 150.
- Bacon C., Yates I., Hinton D. y Meredith F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. Environmental Health Perspectives. 109:325-332.
- Bais H., Fall R., y Vivanco J. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation y surfactin production Plant Physiol 134: 307-319.
- Baker K. 1968. Mechanisms of biological control of soilborne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 6: 263-294.
- Baker K. F. 1987. Evolución de los conceptos de control biológico de patógenos vegetales. Rev. Fitopatología volumen 25 pp. 65 – 85



- Bashan Y. y Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge of agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36 pp. 591-608.
- Bazile D. *et al.*, 2014. “Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013”: FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia), La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. pp. 34.
- Bergeys 2000. *Manual of the Determinative Bacteriology*. Night Edition. Philadelphia 2:540-589.
- Berthelin J., Leyrol C., Laheurte F. y Degiudici P. 1991. Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedling and plant growth related to phosphorus solubilization. In: “Growth Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects” (Keel, C., Koller, B. y Defago, G. Eds.). IOBC. Switzerland. pp. 359 - 364.
- Boddey R. y Döbereiner J. 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* 42: 241 -250.
- Brooks, G. F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A. y Miestzner, T.A. 2011. Jawetz, Melnick y Adelberg. *MICROBIOLOGIA MEDICA*. (24va. Ed.) México: McGraw Hill/ Lange.
- Cahuana R. 2013. Tecnología de producción de semilla de quinua. *Visión. Agraria*. pp. 55.



- Calvo P. Y Zuñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecol. apl. Vol. 9 N°1, pp. 31-39.
- Carrillo A. 1992. Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri spp. nuttalliae* (Chenopodiaceae) Huauzontle. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Botánica. Montecillo, México. pp. 87.
- Carcaño M., Ferrera R., Pérez J., Molina J. y Bashan Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. Terra Latinoam. 24:493-502.
- Camacho S. 2009. Manual Técnico de Cultivos de Quinoa Orgánica. Proyecto y desarrollo sostenible de la agricultura orgánica en las microcuencas alto andinas de la región Huancavelica. 1- 6.
- Camacho A., Giles M., Ortigón A., Palao M., Serrano B. y Velásquez O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2da Edición. Facultad de Química. UNAM. México. 1- 9.
- Cano A. 2011. Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A Ciencias Agrarias, Facultad de Ingeniería Agronómica. Rev. U.D.C.A Act. Y Div. Cient. 14(2): 15 - 31



- Centro Internacional De La Papa 1997. Manual de capacitación “Producción de tubérculos y semillas de papa” Fascículo 4.3 Producción de semilla pres básica y básica Métodos de Multiplicación Acelerada. pp.18.
- Cornejo G. 1976. Hojas de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) fuente de proteína. En: Convención Internacional de Chenopodiaceas. 2da. Potosí, Bolivia. 26-29 abril. IICA. Serie informes de conferencias, cursos y reuniones. No. 96. Bolivia. pp. 177-180.
- Cruces L. y Callohuari Y. 2016. Guía de identificación y control de las principales plagas que afectan a la quinua en la zona andina.
- Danielsen S. y Ames T. 2000. El mildiu (*Peronospora farinosa*) de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en la zona andina. Centro internacional de la papa, lima, Perú. pp. 32.
- Deshwal V. y Kumar P. (2013). Production of Plant growth promoting substance by *Pseudomonas*. J. of Acad. and Indus. Res. (JAIR), 2. pp 221-225.
- De Freitas J. Banerjee M. Y Germida, J. 1997. Phosphates solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus up take of canola (*Brasica napus* L.). Biological Fertilizer Soils 24: pp. 358- 363.



- El Hassan S. y Gowen S. 2006. Formulation y delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *J. of Phytopath.* 154 (3): 148-155.
- Flores V., Alanya Y., Chilquillo M., Chanvez V., Cusiatao G., Sarmiento R., Pujaico G., y Risco A. 2010. Tecnología Productiva de la Quinoa. Proyecto Integral de la Quinoa. Modulo I. pp. 74.
- Forbes B., Sahn D. y Weissfeld A. 2004. Diagnóstico microbiológico. 11va Edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires- Argentina. pp. 1115.
- Gallardo M., Gonzales A. y Ponessa G. 1997. Morfología del fruto y semilla de *Chenopodium quinoa* Willd. (Quinoa). *Chenopodiaceae. Lilloa* 39.
- García O. y Gomez L. 2016. Estudio de bacterias promotoras de crecimiento de plantas aisladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato. Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Centro Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato Vol. 2 no. 1.
- Gil R., Meza G., Jiménez J., Niño N. y Espinosa L. 2009. Enfermedades de la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) en Cota (Cundinamarca) y manejo del mildew veloso (*Peronospora farinosa*, Byford) *Revista Colombiana de ciencias hortícolas* - vol. 3 - no.2 - pp. 161-174.



- Glick, B. 1995. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-11.
- Gong M., Wang J., Zhang J., Yang H., Lu X., Pei Y. y Cheng J. 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and Identification of its antifungal substance (Iturin A). Acta biochim biophys sin (Shanghai). 38(4): 233-40.
- González J. 2006. Coloquio de Microbiología. “Canibalismo y comportamiento social en *Bacillus subtilis*” pp. 14.
- Gomez y Aguilar E. 2016. Guía de cultivo de la quinua. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura Universidad Nacional Agraria La Molina pp. 102.
- Gómez L., Hernández A., Herrera C., Arroyo G. y Vargas V., 2012. Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*) isolation of plant growth promoting rhizobacteria of guava plants (*Psidium guajava*) Universidad de Guanajuato, Campus Celaya - Salvatierra, Departamento De Ingeniería Agroindustrial. pp. 102.
- Guillén R., Hernández F., Gallegos G., Rodríguez R., Aguilar C., Padrón E. Y Reyes M. 2006. *Bacillus spp.* como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.) Revista Mexicana de Fitopatología. pp. 24.



- Instituto Nacional de Innovación Agraria y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2013. Proyecto “semillas andinas” FAO en el Perú. “Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú”. Programa Nacional de Innovación. Agraria en Cultivos Andinos. Lima - Perú. Primera edición. Noviembre, 2013.pp. 76.
- Ortuño N., Claros M., Angulo M. y Castillo J. 2014. Bacterias asociadas al cultivo de la Quinua en el altiplano boliviano y su potencial biotecnológico. Revista de agricultura pp. 53.
- Ortuño N., Castillo J., Claros M., Navia O., Angulo M., Barja D., Gutiérrez C. y Angulo M. 2013. Enhancing the sustainability of Quinoa Production and soil resilience by using Bioproducts Made with native microorganism article agronomy.
- Kilian M., Steiner U., Krebs B. y Junge G. 2000. *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent Pflanzenschutz - Nachrichten, Bayer. pp. 72-93.
- Kloepper J. 1994. Plant growth promoting rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/* plant association (Okon, Y. Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp 135-166.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R. y Zablotowitz, R. M. 1989. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology 7: 39-43.
- Kloepper, J. W., Hume, D. J., Scher, F. M., Singleton, C., Tipping, B., Lalibert, E. M., Fraulay, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I. y Lee, L. 1987. Plant



growth – promoting rhizobacterias on canola (rapeseed). *Phytopathology* 71: 42 – 46.

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P. y Winn P. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. España.

Korsten L. y Jager E. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18: 124-130.

Layton C., Maldonado E., Monroy L., Constanza L. Y Sánchez L. 2011. *Bacillus spp.* Perspectiva de su efecto biocontrolador, pp. 177 - 187.

Leclere V., Bechet M., Adam A., Guez J., Wathelet B., Ongena M., Thonart P., Gancel F., CholleT M. y Jacques P. 2005. *Mycosubtilin overproduction* by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic y biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* pp.10.

Lisboa M. A. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinífera. Talca Chile. pp. 38

Liu L., Klopper J. y Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695–698.



- Loredo, C; Lopez, L. y Espinosa, D. 2004. “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión” *Terra Latinoamericana*, 22(2) 225-239.
- Macedo M. y Vola M. 2006. Principales grupos de Bacilos Gram positivos Aerobios. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del Libro FEFMUR. Uruguay. pp. 202.
- Madigan M. *et al.* 2012. *Biología de los microorganismos*. Duodécima edición. Editorial Pearson educación, S.A. Madrid- España. pp. 1253.
- Maier A., Riedlinger J., Fiedler H. y Hampp R. 2004. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi dual culture. *Mycological Progress* 3: pp. 129-136
- MARCA S., CHANCA W., QUISPE JC. Y MAMANI V. 2011. Comportamiento actual de los agentes de la cadena productiva de quinua en la Región Puno. Gobierno Regional Puno. Dirección Regional Agraria Puno. pp. 82.
- Ministerio De Agricultura Y Riego – MINAGRI. 2014. “Quinua un futuro sembrado hace miles de años”. Memoria, 1 era Ed. Lima- Perú. pp. 127
- Ministerio De Agricultura Y Riego – MINAGRI. 2011. Manejo y fertilidad de suelos cereales y granos andinos manual técnico. Lima – Perú. pp. 47.



- Mosby B. 1998. Mosby's pocket Dictionary of Medicine Nursing Allied Health Copyright MCMXC, MCMXCIV.
- Mujica, A, Rodriguez, D., Apaza, V., Canahua, A y Jacobsen, S., 2006. Producción de quinua de calidad. Estación Experimental Illpa – Puno, Perú. pp. 14.
- Mujica A. 1983. Selección de variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Chapingo, México. Tesis Maestro en Ciencias. Centro de Genética, Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 70-76.
- Mujica A. 1988. Parámetros genéticos e índices de selección en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Genética. Montecillos, México. pp. 122.
- Mujica A. 1996. Genetic Resources of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). FAO. Roma, Italia. En prensa.
- Mujica *et al.*, 2013. Producción Orgánica de Quinoa (*Chenopodium quinoa*).
- Mujica A., Izquierdo J. y Marathe J. 2014. Libro quinua ancestral cultivo de los andes CAPITULO I. Origen y Descripción de la Quinoa.
- Okon Y. y Lavandera C. 1994. Agronomic Applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years world wide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry* 26: pp. 1591-160.



- Peralta E., Mazón N., Murillo A., Rivera M., Rodríguez D., Lomas L., y Monar C. 2012. Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. Tercera edición. Publicación Miscelánea No. 69. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. pp 68.
- Pierson S. y Thomashow S. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: pp. 330-339.
- Ragazzo S., Robles C., Lomelí G., Luna S. y Calderón S. 2011. Selección de cepas de *Bacillus spp.* Productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 17(Esp.): pp. 5-11
- Rea J. 1969. Biología floral de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Turrialba* 19:91-96. Rodríguez, R.1978. Determinación del porcentaje de autopolinización y cruzamientos naturales en tres variedades comerciales de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Ing. Agro. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. pp. 86
- Red Agrícola. 2014. Arequipa y el boon de la quinua. *Artículo Perú* N°12 ISSN 0718-0802. pp. 1-8.



- Reinoso Y., Vaillant D., Casadesús L., García E. y Pazos V. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11(1), pp. 35-40.
- Sánchez R., Mejia M., Alejo J., Valencia A. Y Reyes A. 2014. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* vs *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* pp. 1325-1332.
- Santambrosio E., Ortega M. Y Garibaldi P. 2009. “Siembra y recuento de microorganismos”. Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional rosario departamento de ingeniería química catedra de biotecnología. pp. 1-8.
- Sarabia M., Madrigal M., Martinez Y. y Carreón A. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12 (1) pp. 65-75.
- Sivasakthi S., Kanchana D., Usharani G. y Saranraj P. 2013. Production of Plant Growth Promoting Substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Isolates from Paddy Rhizosphere Soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. Department of Microbiology, Annamalai University. *International Journal of Microbiological Research*. pp. 227 – 233.
- Scher F. y Baker R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* with pathogens. *Phytopathology* 72: pp. 1570 – 1573.



Solorzano F. 2013. Ayara MADRE QUINUA.SANTILLANA.

Stephens C. 1998. Bacterial sporulation: a question of commitment?. *current biology*.
8:45-48.

Petersohn A., Brigulla M., Haas S. Hoheisel J., Lker U. Y Hecker M. 2001. Global
analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*.
183: 5617-5631.

Tapia M. y Fries Y. 2007. Guía de los campos de cultivo FAO. ROMA.

Tapia M. 2000. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. FAO,
Segunda Edición. Santiago de Chile.

Tejera H., Rojas B. y Heydrich P. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la
promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos
2011. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 42, núm. 3, septiembre-diciembre,
Centro Nacional de Investigaciones Científica Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 131-
138.

Tien T., Gaskins M. y Hubbell D. 1979. Plant growth substances produced by
Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum
americanum L.*). *Applied Environmental Microbiology* 37: pp. 101-1024.



Thomashow L. y Weller D. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. *Journal of Bacteriology* 170: pp. 3499–3508.

Valdes V. y Barbara S. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev. Cubana Farm*; pp. 39.

Villacorta L. y Talavera V. 1976. Anatomía del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Anales científicos*. Vol. XIV: 39-45. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.



ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico



Figura 19. Cultivo de quinua, de donde se tomó muestras de suelo, para aislar las bacterias del Genero Bacillus. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.



Figura 20. Toma de muestra de suelo la rizósfera de las plantas de quinua. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.



Figura 21. Pesaje de las muestras de suelo rizosferico de las plantas de quinua. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.



Figura 22. Recolección de muestras de suelo del campo de cultivo de Quinua del Fundo Palermo – Juli. Fundo Palermo Juli – Puno, Marzo 2016.



Figura 23. Plantas de quinua en cámara húmeda. INIA- Puno, Abril 2016.

Anexo 2. Resultado de análisis



SERVICIO NACIONAL DE ANÁLISIS DE SUELOS
INIA
La fertilización adecuada es el primer paso para el éxito del cultivo.
 INIA
 INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA-INIA



MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA-INIA
LABORATORIO DE ANÁLISIS
ESTACION EXPERIMENTAL: AGRARIA ILLPA - PUNO
ANEXO SALCEDO
Of. Principal: Av La Molina 1981 - La Molina Lima

ANÁLISIS DE FERTILIDAD N° 304A5-2016

Nombre : Norma Cahuana Laura. Fecha de Recepción : 10 de Marzo del 2016.

Dirección : Procedencia : Juli.

N° de Boletín : 0304A5. Fecha de Certificación : 15 de Marzo del 2016.

Cod. Lab.	COD. USUARIO	ANÁLISIS MECANICO				N %	P (ppm)	K (ppm)	Suelo: Agua 1:2.5		M.O. %	Al (mg/100 gr)	CO ₂ Ca %
		Arena %	Arcilla %	Limo %	Textura				pH	C.E. mmhos/cm			
304A5	Fundo Palermo - Juli	54	15	31	FA	0,07	8,90	130,00	6,80	0,180	2,48	0,00	0,00

Referencias: Methods of analysis for soils, plants, and waters. University of California, Division of Agricultural Sciences E.U.A. Setaiá reimpresión, Octubre 1988, 195p.

Conclusiones: La muestra analizada de SUELO CUMPLE con los requisitos de documentos referenciados.

Nota: Cualquier corrección y/o emendadura anida al presente documento. T= 766ZAS

Observaciones: (El informe solo afecta a la muestra sometida a ensayo).



INIA
ESTACION EXPERIMENTAL ILLPA - PUNO
JORGE CANHUA ROJAS
Jefe Laboratorio Analisis SALCEDO

www.inia.gob.pe

Rinconada de Salcedo s/n
Puno. Puno. Perú
T: (051) 363-812

Figura 24. Resultados del análisis de suelos INIA- Puno, Marzo 2016.

Anexo 3

FENOLOGÍA DEL CULTIVO DE QUINUA

<p>1. GERMINACIÓN DE SEMILLA DE QUINUA</p>	<p>2. EMERGENCIA DE PLANTAS DE QUINUA</p>
<ul style="list-style-type: none"> Días de siembra: 1 a 2 días 	<ul style="list-style-type: none"> Días de la siembra: 5 a 6 días. Emergencia de plantas: Con dos hojas cotiledonales cubiertas por episperma. 
<p>3. ESTADO DE PLÁNTULAS CON DOS HOJAS COTILEDONALES</p>	<p>4. ESTADO DE PLANTAS CON 2 HOJAS VERDADERAS:</p>
<ul style="list-style-type: none"> Días de la siembra: 7 a 10 días. Estado de plántulas: Cotiledones emergidos se separan y muestran 2 hojas extendidas 	<ul style="list-style-type: none"> Días de la siembra: 15 a 20 días. Estado de la planta: 1 par de hojas verdaderas extendidas después de la siembra. 
<p>5. ESTADO DE PLANTAS CON 4 HOJAS VERDADERAS</p>	<p>6. ESTADO DE PLANTAS CON 6 HOJAS VERDADERAS</p>
<ul style="list-style-type: none"> Días de la siembra: 25 a 30 días. Estado de plantas : 2 pares de hojas verdaderas extendidas. 	<ul style="list-style-type: none"> Días de la siembra: 35 a 45 días. Estado de plantas : 3 pares de hojas verdaderas extendidas. Hojas cotiledonaes se amarillan.

- Buena resistencia a sequias y al frio.



7. ESTADO DE RAMIFICACIÓN DE PLANTAS

- Días de la siembra: 45 a 50 días.
- Estado de plantas : 8 hojas verdaderas con hojas axilares y caída de hojas cotiledonales
- De mayor resistencia al frio.



8. ESTADO INICIO DE PANOJAMIENTO DE PLANTAS

- Días de la siembra: 55 a 60 días.
- Estado de plantas : inicio de fase reproductiva
- Ataque de la 1ra generación de kona kona.



9. ESTADO DE PANOJAMIENTO DE PLANTAS

- Días de la siembra: 65 a 70 días.
- Estado de plantas : inflorescencia sobre sale de la hoja.
- Glomérulos basales muestran botones florales.

10. ESTADO INICIO DE FLORACIÓN

- Días de la siembra: 75 a 80 días.

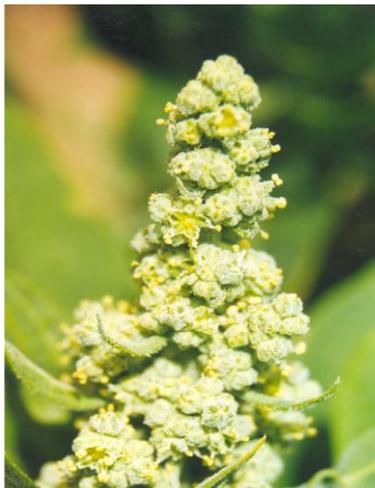


- Estado de plantas : inicio de floración parte apical de la panoja



11. ESTADO DE FLORACIÓN DE PLANTAS

- Días de la siembra: 90 a 100 días.
- Estado de plantas : el 50% de las flores de la panoja se encuentran abiertas.



12. ESTADO DE GRANO LECHOSO

- Días de la siembra: 100 a 130 días.
- Estado de plantas : A la presión de las uñas, los granos derraman liquido lechoso.
- Sensible a la falta de agua.



13. ESTADO DE GRANO PASTOSO

14. ESTADO MADUREZ FISIOLÓGICA

- Días de la siembra: 130 a 160 días.
- Estado de plantas : A la presión de uñas, los granos tienen consistencia pastosa.



- Días de la siembra: 160 a 180 días.
- Estado de plantas : A la presión de uñas, los granos presentan resistencia.
- Contenido de humedad 14 a 16%.



15. ESTADO MADUREZ DE COSECHA:

- Días de la siembra: 170 a 190 días.
- Estado de plantas: emparvado en sacos.





Anexo 4. Matriz básica de datos

Estadio	Dosis	Daño (%)
A	0	5
A	0	5
A	0	10
A	5	3
A	5	5
A	5	5
A	10	0
A	10	5
A	10	0
A	15	5
A	15	0
A	15	0
A	20	5
A	20	0
A	20	0
B	0	20
B	0	10
B	0	20
B	5	10
B	5	10
B	5	10



B	10	5
B	10	5
B	10	5
B	15	10
B	15	5
B	15	5
B	20	5
B	20	5
B	20	5
C	0	25
C	0	30
C	0	25
C	5	20
C	5	20
C	5	15
C	10	15
C	10	5
C	10	15
C	15	10
C	15	5
C	15	10
C	20	10
C	20	5



C	20	10
D	0	50
D	0	40
D	0	50
D	5	40
D	5	40
D	5	30
D	10	30
D	10	15
D	10	30
D	15	15
D	15	10
D	15	15
D	20	15
D	20	10
D	20	15
E	0	80
E	0	70
E	0	80
E	5	65
E	5	60
E	5	65
E	10	50



E	10	40
E	10	50
E	15	20
E	15	15
E	15	20
E	20	15
E	20	10
E	20	15

Anexo 5

Tabla 9. Análisis de fertilidad de las muestras de suelo del campo de cultivo de quinua en Palermo – Juli, marzo 2016.

Zona	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	pH	MO
Fundo Palermo - Juli	0.07	8.90	130.00	6.80	2.48

Anexo 6

Análisis estadístico

Tabla 10. Análisis de varianza de daño (%) de *P. farinosa* en hojas de quinua en estadio de 6 hojas.

Variable	N	R	R AJ	CV	
Daño en hojas de Quinua (%)	15	0,47	0,26	82,29	
F. V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	61,07	4	15,27	2,20	0,1420
Tratamientos	61,07	4	15,27	2,20	0,1420
Error	69,33	10	6,93		
Total	130,40	14			

Tabla 11. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 7,07561

Error: 6,9333 gl: 10

Tratamiento	Medias	N	E.E.
T1	6,67	3	1,52 A
T2	4,33	3	1,52 A
T4	1,67	3	1,52 A
T3	1,67	3	1,52 A
T5	1,67	3	1,52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 12. Análisis de varianza de daño (%) de *P. farinosa* en hojas de quinua en estadio de ramificación.

Variable	N	R	R AJ	CV
Daño en hojas de Quinua (%)	15	0,78	0,69	33,31

F. V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	290,00	4	72,50	8,70	0,0027
Tratamientos	290,00	4	72,50	8,70	0,0027
Error	83,33	10	8,33		
Total	373,33	14			

Tabla 13. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 7,75716

Error: 8,3333 gl: 10

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
T1	16,67	3	1,67	A
T2	10,00	3	1,67	A B
T4	5,67	3	1,67	B
T3	5,00	3	1,67	B
T5	5,00	3	1,67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 14. Análisis de varianza de daño (%) de *P. farinosa* en hojas de quinua en estadio de Inicio de panojamiento.

Variable	N	R	R AJ	CV
Daño en hojas de Quinua (%)	15	0,85	0,79	24,90

F. V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	740,00	4	185,00	13,88	0,0004
Tratamientos	740,00	4	185,00	13,88	0,0004
Error	133,33	10	13,33		
Total	873,33	14			

Tabla 15. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 9,81211

Error: 13,3333 gl: 10

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
T1	26,67	3	2,11	A
T2	18,33	3	2,11	A B
T3	11,67	3	2,11	B C
T4	8,33	3	2,11	C
T5	8,33	3	2,11	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 16. Análisis de varianza de daño (%) de *P. farinosa* en hojas de quinua en estadio de panojamiento.

Variable	N	R	R AJ	CV
Daño en hojas de Quinua (%)	15	0,89	0,85	20,84

F. V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	2573,33	4	643,33	20,32	0,0001
Tratamientos	2573,33	4	643,33	20,32	0,0001
Error	316,67	10	31,67		
Total	2890,00	14			

Tabla 17. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 15,12148

Error: 31,6667 gl: 10

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
T1	46,67	3	3,25	A
T2	36,67	3	3,25	A B
T3	25,00	3	3,25	B C
T4	13,33	3	3,25	C
T5	13,33	3	3,25	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 18. Análisis de varianza de daño (%) de *P. farinosa* en hojas de quinua en estadio de Floración.

Variable	N	R	R AJ	CV
Daño en hojas de Quinua (%)	15	0,98	0,97	9,81

F. V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	9140,00	4	2285,00	124,64	0,0001
Tratamientos	9140,00	4	2285,00	124,64	0,0001
Error	183,33	10	18,33		
Total	9323,33	14			

Tabla 19. Prueba de significancia de Tukey del % de daño en hojas de Quinua. Alfa = 0,05 DMS = 11,50572

Error: 18,3333 gl: 10

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
T1	76,67	3	2,47	A
T2	63,33	3	2,47	B
T3	46,67	3	2,47	C
T4	18,33	3	2,47	D
T5	13,33	3	2,47	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



CONSTANCIA

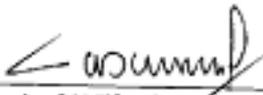
EL QUE SUSCRIBE, RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS Y VIROLOGIA DEL PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACION EN PAPA DE LA ESTACION EXPERIMENTAL AGRARIA ILLPA-PUNO-INIA.

HACE CONSTAR:

Que la Señorita, Norma Cahuana Laura, bachiller en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ha ejecutado su trabajo de Investigación de Tesis Universitaria titulada "EFECTO ANTIFUNGICO DE *Bacillus spp.* CONTRA *Peronospora variabilis* EN QUINUA" en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Virología e Invernaderos de la Estación Experimental Illpa-Puno.

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

Salcedo, Abril del 2017


Ing° Wilfredo Barrera Quispe
Responsable del Lab. de Cultivo
de Tejidos y Virología

Rinconada Salcedo s/n
Puno-Perú
T: (051) 363812
www.inia.gob.pe
E: illpa@inia.gob.pe

 Trabajando para
todos los peruanos