

# INFORME FINAL DEL PROYECTO

**“DESARROLLO DE BIOINSUMOS PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE HORTALIZAS CON PEQUEÑOS AGRICULTORES PARA UNA SOBERANÍA ALIMENTARIA EN LOS ANDES”**

FINANCIADO POR **FONTAGRO** A TRAVÉS DE **PROINPA**

RESPONSABLES: OSCAR ORTIZ, MERCY ROJAS, GIAN QUISPE, JUAN SANCHEZ

JUNIO 2012

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen Ejecutivo .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Evaluación de Técnicas para la Producción Biofertilizantes .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Evaluación de técnicas para la producción de bioabonos fermentados .....</b>	<b>3</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Principales resultados .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2008-2009) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDAD REPORTADA (CAMPAÑA 2008-2009) .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2009-2010).....</b>	<b>32</b>
<b>1.4 PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2010-2011).....</b>	<b>65</b>
<b>Revisión bibliográfica.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

## RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto se inició en Setiembre 2008 y culminó en Junio 2012. El Centro Internacional de la Papa (CIP) tuvo a su cargo el desarrollo de los siguientes objetivos específicos:

Con la finalidad de realizar un mejor estudio y cumplir con los Objetivos del Proyecto, el trabajo de investigación se dividió en dos áreas de análisis:

### 1. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN BIOFERTILIZANTES

Se realizó muestreo de suelo y rizósfera de plantas de papa en diferentes pisos altitudinales (departamentos de: Huancavelica, Junin, Huanuco y Cajamarca) de las cuales se aislaron 230 bacterias que se sometieron a un proceso de selección en base a pruebas de promoción de crecimiento y antagonismo con la finalidad de seleccionar las mejores cepas. De esta evaluación se obtuvieron un total de 60 cepas que fueron analizadas a nivel de invernadero en plántulas *in vitro* y semillas tubérculos de papa, así como en otros cultivos como: maíz, lechuga, rabanito, acelga, espinaca. De las 60 mejores cepas, P1-20/08, B1-22/06, P1-21/08 y A1-30/08 mostraron los mejores resultados por lo que se les realizó pruebas adicionales a nivel de invernadero y campo determinándose lo siguiente:

- Igual efecto en el crecimiento vegetal cuando las cepas bacterianas se inoculan a tubérculo semilla ó plántulas *in vitro* de papa.
- Adaptabilidad de las cepas bacterianas en suelos de pH ácido y básico.
- Igual rendimiento cuando las cepas se aplican solo a la siembra ó en varios momentos del ciclo del cultivo.
- Especificidad de asociación entre las cepas y los diferentes cultivares de papa.
- Efecto positivo de la cepa B1-22/06 en el cultivo de lechuga en condiciones de invernadero y campo.
- La cepa P1-20/08 obtuvo los mejores resultados a nivel de invernadero, pero su aplicación a nivel de campo mostraron resultados no consistentes.

### 2. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOABONOS FERMENTADOS

Se instalaron un total de 39 tratamientos diferentes de 'bioles', y 14 tratamientos diferentes de 'compost' en los departamentos de Lima (200 msnm), Huancayo (3300 msnm) y Huancavelica (4000 msnm).

En el primer año se evaluaron 12 tratamientos de 'bioles', de los cuales se seleccionaron 6 en base a su buen rendimiento y análisis a nivel de laboratorio, cobertor y campo. En el segundo año se instalaron nuevamente los 6 mejores 'bioles' replicados en 3 localidades diferentes con tratamientos adicionales propios de la zona. Para el tercer año la selección se basó en la relación C/N de los mejores rendimientos obtenidos por tratamiento.

Para el caso del 'compost' en el primer año no se obtuvieron los resultados esperados. En el segundo año se instalaron 9 tratamientos diferentes en base al tipo de insumo (estiércol de llama, vacuno y guano de pollo) y relación volumen. Se seleccionaron los 4 mejores tratamientos para ser instalados en el tercer año.

En base a los estudios realizados, se puede determinar lo siguiente:

1. La producción de biogás en los bioles se encuentra influenciada por el pH y la relación C/N. Dichas variables se encuentran influenciadas por el tipo de insumo que se utiliza (leche, leguminosas, levaduras y melaza). Por otro lado, los nutrientes en los bioles se encuentran relacionados por el pH y el contenido en los insumos.
2. Se han identificado tres tipos de bioles que superan a los tratamientos testigo de fertilización química en rendimiento y beneficio-costo en las zonas de Lima, Huancayo y Huancavelica.
3. En el ‘compost’ se observó que las variables físicas-químicas se encuentran influenciadas por el tipo de insumo que se emplea. Se ha identificado que la relación 2:1 (estiércol: paja seca) obtuvo los mejores resultados.
4. En la evaluación participativa, se identificó al abono fermentado “biol” como la nueva tecnología de mayor aceptación por parte de los agricultores

## I. INTRODUCCIÓN

El proyecto tuvo una duración de 3 años y nueve meses (Setiembre 2008 a Junio 2012). El Centro Internacional de la Papa (CIP) tuvo a su cargo los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo 1:** Desarrollar un cepario de microorganismos nativos para indicar la formación de un banco de germoplasma enfocado a la producción y uso de bioinsumos que permitan contribuir con el desarrollo de una agricultura libres de agroquímicos sintéticos.

**Objetivo 2:** Adaptar y desarrollar técnicas caseras ajustadas a las condiciones locales para la producción de biofertilizantes con microorganismo y abonos mejorados para mejorar la fertilidad del suelo y los ingresos de los agricultores.

**Objetivo 5:** Evaluar participativamente con pequeños horticultores a pequeña escala el potencial uso de los bioinsumos desarrollados.

**Objetivo 6:** Difundir el conocimiento y experiencias probadas con investigadores de otros países, técnicos locales y agricultores en las zonas piloto de cada país,

## II. PRINCIPALES RESULTADOS

Los experimentos de invernadero realizados en la estación del CIP-Lima, mostraron los siguientes resultados: 1) Igual efecto promotor del crecimiento vegetal cuando las cepas son aplicadas en tubérculo semilla o en plántulas *in vitro* de papa 2) No se encontraron diferencias significativas cuando las cepas P1-20/08, B1-35/06 y A2-19/08 son aplicadas solas o en combinación 3) El sustrato 2:2: 1 (mezcla de musgo, tierra negra y arena en proporción 2:2:1) fué el mejor sustrato 4) Adaptación de las cepas P1-20/08 y B1-35/06 a pH ácidos (4.5) y alcalinos (7.6) 5) Especificidad cepa-planta con las cepas P1-20/08 y A1-19/08 en los cultivares Unica, Huamantanga, Revolución y Serranita 6) Aumento en el rendimiento del cultivo de lechuga con las cepas B1-22/06 y A1-30/06 inoculadas solas o en combinación con otras cepas.

En Huancayo y en Huancavelica los resultados de campo demostraron: 1) La inoculación de las cepas P1-20/08 en el cultivar Yungay no mostró resultados consistentes en 3 experimentos de campo evaluados 2) No hay diferencias en el rendimiento de tubérculos con la aplicación de cepas inoculadas en 3

diferentes momentos del ciclo fenológico de la planta. Los resultados sugieren que solo una inoculación a la siembra es suficiente. 3) La cepa B1-22/06 y en combinación con una dosis mínima de fertilización incrementó el rendimiento del cultivo lechuga.

Los resultados indican que en los bioles los nutrientes (P, Ca, Mg, Mn y Fe) se encuentra en mayor cantidad a pH ácidos, siendo los insumos que causa la acidez la melaza, la leche y la levadura; mientras los nutrientes (N, K, S, Na, Cu y Zn) están influenciado por el tipo de insumo, en el cual el estiércol de vacuno fue la mejor fuente. La población microbiana de *Bacillus*, *Actinomicetes* y *Coliformes totales* son favorecidas a pH neutro, mientras la acidificación en el biol disminuye su población. Se han identificado tres tipos de bioles que superan a los tratamientos testigo de fertilización química en rendimiento y beneficio-costo en las zonas de Lima, Huancayo y Huancavelica. En el compost la temperatura llego hasta los 60 °C esto se consigue con una relación C/N de 16. El pH estuvo entre 7 y 8 importantes cuando son utilizados en suelos de pH ácidos. La cantidad de CE, MO, C/N, N, P, K, Ca, Mg, Na, S, Cu, Zn, Mn y Fe, se encuentra influenciada por el tipo de insumo que se utilice. Siendo el estiércol de vacuno la mejor fuente. Se han identificado dos tipos de compost que superan al tratamiento testigo de fertilización química en rendimiento y beneficio-costo en la zona de Huancayo y Huancavelica. Los resultados muestran al abono fermentado “biol” como la nueva tecnología de mayor aceptación por parte de los agricultores.

### **1.1. PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2008-2009)**

En las actividades relacionadas al uso de biofertilizantes, un total de 171 cepas nativas de Perú, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y al grupo Actinomycetos fueron aisladas e identificadas a nivel molecular y están actualmente disponibles en el cepario de microorganismos del CIP. (Actividad 1.1) De las cuales 129 cepas (aisladas en el 2008) fueron evaluadas *in vitro*, invernadero y campo. De las pruebas *in vitro*, el 32 % de las cepas presentó la capacidad de solubilizar fosfatos, 44 % producción de AIA (Actividad 1.2) y el 28 % capacidad antagónica contra *R. solani* y *F. solani* (Actividad 1.3) obteniéndose los mejores resultados en las 3 pruebas con el género *Pseudomonas*. En base a estas pruebas *in vitro*, se seleccionaron 60 cepas que presentaron las mejores capacidades de promoción de crecimiento y efecto antagonista. Posteriormente estas cepas se sometieron a diferentes temperaturas y pH (Actividad 1.4), en el cual la mayoría de las cepas presentaron una mejor adaptación a las temperaturas de 15 y 20 °C y pH 5.5. Además se realizaron curvas de crecimiento de las cepas para determinar las condiciones óptimas (temperatura, aieración, tiempo) para alcanzar una población óptima de 10<sup>8</sup> UFC/ml (Actividad 2.1), y se determinó que las cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* alcanza la población óptima a las 24 horas en el medio TSB, y los Actinomycetos a las 72 horas en el medio NB, a 28 °C y 150 rpm de agitación continua. Respecto a los experimentos en invernadero, de las 60 cepas seleccionadas y evaluadas, 12 cepas presentaron resultados positivos después de la inoculación de las bacterias en plántulas *in vitro* de *S. tuberosum* cv. Unica, en el cual las cepas P1-20/08 (*P. putida*) y A1-05/08 (Actinomiceto) mostraron los mejores resultados (Actividad 1.2). Simultáneamente se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas en plántulas *in vitro* y tubérculo semilla del cultivar Unica (Actividad 1.4), donde no se presentó diferencias significativas entre ambas. Con este antecedente, se hizo un experimento en campo y se determinó el método de inoculación de bacterias más efectivo en tubérculo semilla (Actividad 2.1), el cual consistió en sumergir los tubérculos en una mezcla de agua (2-3 L) con 125 ml de suspensión bacteriana por 20-30 minutos y adicionalmente inocular los tubérculos ya colocados en el surco con una mezcla de agua (2-3 L) con 125 ml de suspensión bacteriana. Además se evaluó el efecto de las cepas bacterianas en diferentes cultivos como lechuga, acelga, maíz, espinaca y rabanito (Actividad 1.2), obteniéndose los mejores resultados con las cepas B1-22/06 (*B. subtilis*) en el cultivo acelga y lechuga y A1-30/08 (Actinomicetos) en el cultivo de lechuga y rabanito.

La Actividad de Evaluación de técnicas para la producción de bioabonos fermentados se realizó sin mayor problema, los resultados indican en los bioles que la producción de biogás se encuentra influenciada por el pH y la relación C/N. Dichas variables se encuentra influenciada por el tipo de insumo que se utilice. Por otro lado, los nutrientes en los bioles se encuentran relacionados por el pH y el contenido en los insumos. Se han identificado 6 diferentes tipos de bioles los cuales muestran los mejores resultados. En el compost las variables físicos-químicas se encuentran influenciadas por el tipo de insumo que se emplee. Se han identificado que los compost de relación 2:1 (estiércol: paja seca) tuvieron los mejores resultados.

## **1.2. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDAD REPORTADA (CAMPAÑA 2008-2009)**

### **1.2.1 ACTIVIDAD 1.1: COLECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE DIFERENTES ZONAS ANDINAS**

#### **Objetivo de la actividad:**

- Disponer de un banco de germoplasma de microorganismos caracterizados e identificados.

#### **Indicadores de la actividad:**

- Cepario con 171 cepas bacterianas aisladas e identificados a nivel molecular disponibles en el cepario de microorganismos del CIP.
- Protocolos de aislamiento para cada tipo de microorganismos

#### **Materiales y Métodos**

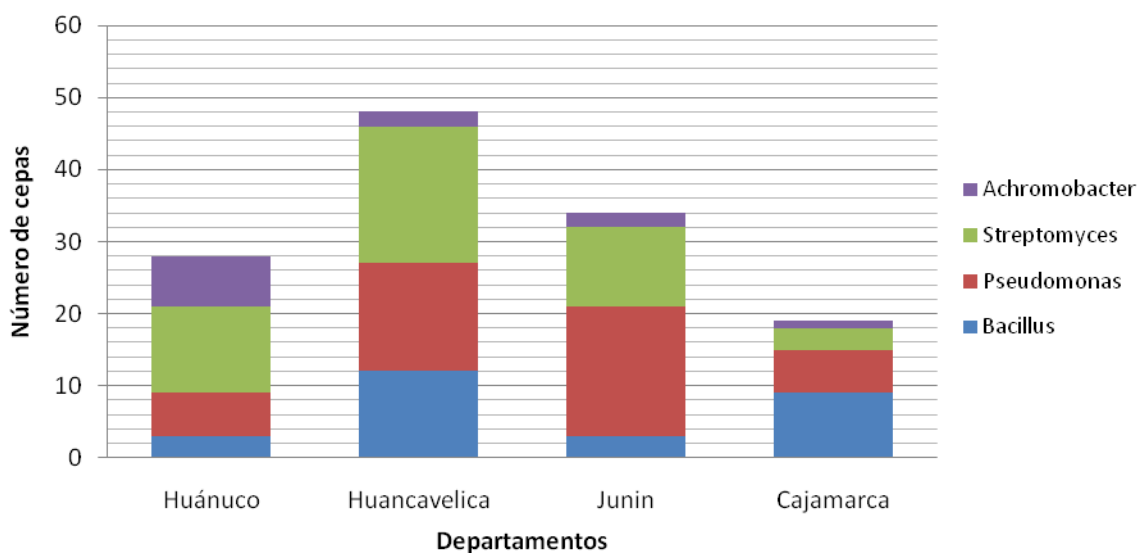
En el 2008, un total de 12 campos localizados en los departamentos de Huánuco, Huancavelica, Junín y Cajamarca fueron muestreados (Anexo 1). Para el muestreo de rizósfera y raíces, se seleccionaron al azar dos plantas de papa (*S. tuberosum* L.) de cada campo, luego se colocó las muestras en bolsas de plástico estériles debidamente cerradas y rotuladas para su posterior traslado al laboratorio de Patología Molecular y Fitopatología del CIP para su procesamiento microbiológico. Las muestras se procesaron por el método de diluciones sucesivas, aislando y caracterizando las diferentes bacterias. Una vez obtenida colonias aisladas y puras se guardaron en agar inclinado a 4 ° C y en glicerol al 20% a -20°C. Se realizaron pruebas bioquímicas preliminares de identificación presuntiva de los microorganismos aislados y posteriormente se enviaron a la universidad de Gent para su identificación molecular a nivel de especie en base a la técnica FAME (Acid Methyl Ester Analysis) usando el MIDI system.

#### **Resultados y discusión:**

En el 2008, se aislaron un total de 230 cepas, de las cuales se obtuvieron un total de 129 cepas identificadas a nivel de especie basado en la técnica FAME pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* (Tabla 1). Las cepas pertenecientes al grupo Actinomicetos aún no han sido identificadas. Adicionalmente, en el año 2006, se aislaron e identificaron de 43 cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y al grupo Actinomycetos conformando un total de 171 cepas las cuales actualmente se encuentran disponibles el cepario de microorganismos del CIP (Anexo 3). Estas cepas bacterianas se encuentran actualmente preservadas a bajas temperaturas en agar inclinado a 4 °C y en glicerol al 20% a -20°C para garantizar su supervivencia en el tiempo y su disponibilidad en el cepario de microorganismos del CIP.

**Tabla 1.** Numero de cepas bacterianas identificadas a nivel de especie por la técnica de FAME presentes en los departamentos muestreados de Huánuco, Huancavelica, Junín y Cajamarca, durante el periodo de Abril-Mayo 2008.

Género	Especie	Numero de cepas aisladas e identificadas			
		Huancavelica	Huánuco	Junín	Cajamarca
<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	6	1	2	7
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	6	0	0	0
	<i>B. subtilis</i>	0	1	1	2
	<i>B. licheniformis</i>	0	1	0	0
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>	15	6	18	6
	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0
<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter sp.</i>	2	7	2	1
<i>Actinomicetos</i>	No identificada	19	12	11	3
<b>Numero Total de cepas aisladas e identificadas</b>		<b>129</b>			



**Figura 1.** Número de cepas bacterianas agrupadas por género presentes en los departamentos de Huánuco, Huancavelica, Junín y Cajamarca. Periodo de Abril –Mayo 2008.

La Figura 1 muestra, mayor número de cepas en los departamentos de Huancavelica y Junín, de las cuales el 50 % pertenecen al género *Bacillus* y 43 % al grupo Actinomicetos respectivamente. Esto se debe a que en los campos muestreados de ambos departamentos presentaron un rango de pH entre 5 a 8 y clase textural del suelo franco-franco arenoso (Anexo 4) los cuales están dentro del rango apropiado para *Bacillus* y Actinomicetos. Además los campos muestreadas se mantuvieron en descanso por 2 años (Anexo 1) lo cual estas condiciones son favorables para la presencia de las bacterias. En el departamento de Huánuco no hay presencia del género *Bacillus*, esto puede deberse a

que el pH del suelo (pH 4.47) está por debajo del rango apropiado para el crecimiento de *Bacillus*, y la materia orgánica presente en el suelo fue mayor al 1 %.

El asilamiento de las 129 bacterias en los diferentes campos muestreados demuestran la capacidad de estas cepas de colonizar las raíces; esta capacidad de colonización es una condición indispensable para que una bacteria sea considerada como una verdadera bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), siendo por tanto esta capacidad un primer paso y un rasgo crucial para la selección de los inóculos microbianos a ser usados como biofertilizantes. Es también un primer indicio de que el microorganismo es capaz de lograr el efecto benéfico esperado. Además de la colonización, el éxito en la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal reside en el estudio de cepas compatibles y específicas a los diversos cultivos y a las condiciones ambientales prevalecientes.

#### 1.2.2 ACTIVIDAD 1.2: EVALUACIÓN IN VITRO Y EN MACETA CON ORGANISMOS RELACIONADOS A LOS BIOFERTILIZANTES

##### **Objetivo de la actividad:**

- Selección de los mejores microorganismos por características y propósitos.

##### **Indicadores de la actividad:**

- Pruebas *in vitro* de promoción del crecimiento de 129 cepas aisladas e identificadas.
- Experimentos en condiciones de invernadero con las mejores cepas seleccionadas en base a las pruebas *in vitro* de promoción del crecimiento.
- Desarrollo de protocolos de pruebas de promoción del crecimiento *in vitro* y ensayos a nivel de invernadero.
- Difusión de los protocolos a los países miembros del proyecto.

##### **Material y Métodos**

###### **a) Pruebas *in vitro* de promoción de crecimiento**

###### **Pruebas *in vitro* de producción de Ácido-3- Indol Acético (AIA) y Solubilización de Fosfatos**

Para detectar la producción de Acido-3- Indol Acético (AIA) por las cepas aisladas se empleó el método colorimétrico propuesto por Gordon y Weber basado en la reacción del reactivo de Salkowsky en detectar compuestos derivados del indol. Este método consistió en sembrar cada cepa en el medio TSB (Tripticasa Soy Brtoh), suplementado con L-Triptófano para inducir la producción de AIA por las bacterias. Los resultados de reacción positiva a la producción de AIA se evaluaron observando el cambio de color de medio TSB a diferentes tonalidades de fucsia (Anexo 5).

Para la solubilización de fosfato en medio sólido, se empleó la metodología propuesta por Nautiyal, en el cual cada cepa se sembró en el medio TSB y posteriormente se colocó por duplicado 15 µl de esta suspensión en una placa dividida en cuatro cuadrantes conteniendo el medio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) sólido con fosfato tricálcico. Las placas se incubaron por 31 días a 28 ±2°C, la evaluación de la prueba de solubilización de fosfato en placa se realizó interdiariamente durante 31 días, mediante la medición del radio de un halo transparente (halo de solubilización de fosfatos) alrededor de la colonia y el radio de la colonia (Anexo 6)

###### **b) Ensayos a nivel de invernadero**

Después de realizar las pruebas de promoción de crecimiento *in vitro*, se seleccionaron 60 cepas diferentes pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* *Achromobacter* y al grupo



Actinomicetos en base a las mejores capacidades de promoción del crecimiento evaluadas *in vitro*, para su posterior inoculación en los cultivos papa y hortalizas en condiciones de invernadero.

**Experimento I:** 01 experimento a nivel de cobertor se realizó en la estación experimental del CIP-Lima (240 msnm) durante el periodo Noviembre 2008 - Febrero 2009. La temperatura promedio en este periodo fue de 28 °C y humedad relativa de 78.91%. Se evaluó un total de 60 cepas bacterianas, seleccionadas en base a los mejores resultados obtenidos de las pruebas de solubilización de fosfatos y producción de AIA *in vitro*. Las cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y al grupo Actinomicetos se inocularon en plántulas *in vitro* de *S. tuberosum* cv. Unica, posteriormente fueron sembradas en macetas con suelo estéril cuyo sustrato usado fue mezcla musgo molido, tierra negra y arena (proporción 2:2:1). Las cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* fueron sembradas en el medio TSB (Trypticase Soy Broth) a 28 °C en movimiento continuo en el shaker a 150 rpm por 1 día hasta una concentración final de 10<sup>8</sup>UFC/ml. Las cepas de Actinomicetos crecieron en el medio NB (Nutritive Broth) por 3 días y en similares condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente se procedió a inocular las raíces de cada plántula de *S. tuberosum* L. cv. Unica con 5 ml de inóculo bacteriano (10<sup>8</sup>UFC/ml). Se empleó como tratamiento control el medio TSB sin bacteria. Después de la primera semana de inoculación de las cepas, cada una de las macetas fueron fertilizadas con 100 ml de fertilizante soluble N,P,K (20-20-20 kg ha<sup>-1</sup>) a una concentración de 1.5g/L. Un total de 60 tratamientos experimentales y 01 tratamiento control fueron establecidos con cuatro repeticiones por tratamiento, los cuales se mantuvieron en el cobertor a la temperatura de la estación y riego controlado (Anexo 8). Las plantas se cosecharon 11 semanas después y se evaluó los siguientes parámetros de crecimiento: número de tubérculos y peso fresco y seco de tubérculos y de toda la planta.

Los datos obtenidos en ambos experimentos se analizaron con el programa estadístico R. Se hizo el análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos con la prueba de Tukey (p<0,05)

**Experimento II:** El ensayo se realizó en el cobertor en la estación experimental del CIP-Lima (240 msn,) durante la campaña Agosto 2008 - Noviembre 2008. Se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas B1-22/06 (*Bacillus subtilis*) y A-30/06 (*Actinomyces*) sobre diferentes cultivos: lechuga, acelga, maíz, espinaca y rabanito. Se inocularon las semillas de cada uno de estos cultivos por el método de inmersión, el cual consistió en sumergir las semillas en la suspensión bacteriana (10<sup>8</sup>UFC/ ml) por un tiempo de 15-20 minutos. El tratamiento control consistió en sumergir las semillas en el medio TSB sin inoculación de bacterias. Posteriormente las semillas fueron sembradas en macetas conteniendo un sustrato estéril. Un total de 03 tratamientos fueron establecidos, con tres repeticiones por tratamiento las cuales permanecieron en el cobertor a la temperatura de estación y condiciones controladas de riego hasta su evaluación. Las plantas se cosecharon de acuerdo al ciclo fenológico de cada cultivo y se evaluaron el peso fresco y seco de las hojas.

### Resultados y Discusión

El 32 % de las cepas presentó la capacidad de solubilizar fosfatos, de las cuales el 40 % de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaron la mejor capacidad de solubilizar fosfatos, en el cual se observa que 11 cepas producen halos de solubilización mayor de 1 cm<sup>2</sup> (Tabla 1). Se presentó los mayores halos de solubilización con las cepas P1-50/08 y P1-21/08 con áreas de halos solubilización de 5.03 y 2.70 cm<sup>2</sup> respectivamente. Esta prueba nos permite seleccionar microorganismos capaces de convertir los compuestos inorgánicos insolubles del fósforo (formas no asimilables por las plantas) a fosfatos di y monobásicos solubles (formas asimilables por las raíces de las plantas).

Respecto a la producción de AIA, el 44 % de las cepas presentaron esta capacidad. En la Tabla 1 se observa que las cepas del género *Pseudomonas* y *Bacillus* presentaron mayor número de cepas

positivas a la producción de AIA. La producción de AIA varía entre géneros y especies y es afectada por las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento, la constitución genética, la disponibilidad de sustratos y las diferentes vías biosintéticas de producción de auxinas. Adicionalmente, la cantidad de oxígeno y la limitación de nitrógeno, condiciones ampliamente distribuidas en los suelos, elevan la producción de AIA por las bacterias, lo que estimula el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales que, a su vez, favorecen la absorción de nutrimentos e incrementan el rendimiento del cultivo.

**Tabla 1.** Número de cepas que presentan la capacidad de solubilizar fosfatos y producir ácido indol-3-acético (AIA).

Género	Áreas Solubilización Fosfatos (cm <sup>2</sup> )			Número de cepas	Intensidad de Producción de AIA				Número de cepas
	<0.5	0.5-1	>1		+	++	+++	+++	
<i>Bacillus</i>	13	3	2	<b>18</b>	8	8	3	2	<b>21</b>
<i>Pseudomonas</i>	2	5	11	<b>18</b>	6	12	2	1	<b>21</b>
<i>Actinomyces</i>	5	0	0	<b>5</b>	10	1	3	1	<b>15</b>

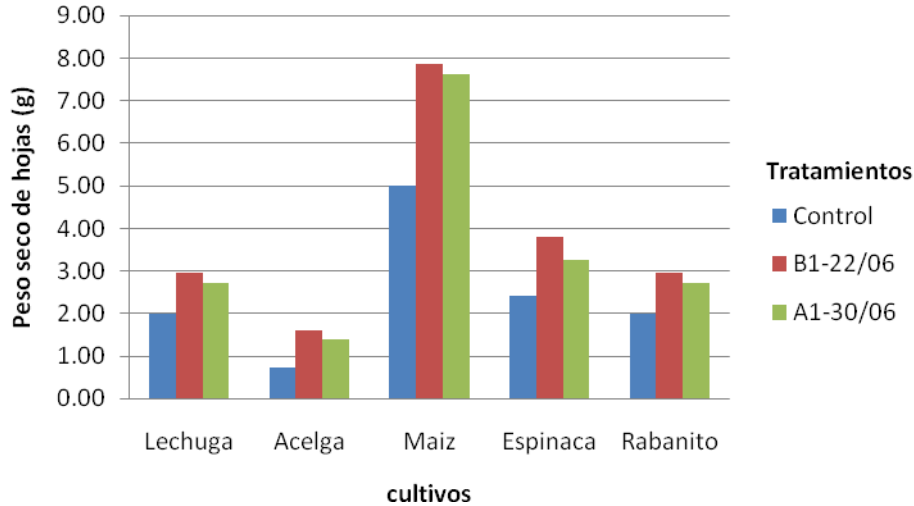
Para el Experimento I, en la Tabla 2 se observa los resultados de 12 mejores cepas pertenecientes a los diferentes géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y al grupo Actinomicetos, en el cual todas las cepas mostraron resultados estadísticamente significativos respecto al tratamiento control en los dos parámetros de crecimiento evaluados. Dichas cepas mostraron un incremento en el peso seco de tubérculos en un rango de 67-142% con respecto al tratamiento control. En la tabla 2, se observa que las cepas A2-07/08 (*B. pumilus*) P1-21/08 (*P. putida*) A1-05/08 (Actinomicetos) mostraron los mejores resultados. Las 46 cepas restantes de las 60 cepas evaluadas no presentaron resultados estadísticamente significativos con respecto al control en los parámetros evaluados.

En el experimento II, la Figura 1 muestra que los tratamientos inoculados con la cepa B1-22/06 (*B. subtilis*) incremento en 115 % y 59 % el peso seco de acelga y lechuga respectivamente. La cepa A1-30/06 (*Actinomyces*) incremento en 60% el peso seco de rabanito y en 59% el peso seco de lechuga comparado respecto al tratamiento control.

**Tabla 2.** Efecto de cepas bacterianas en el número de tubérculos y peso seco de tubérculos de *S. tuberosum* L. cv. UNICA, 11 semanas después de la inoculación de bacterias. La Molina-Lima. Periodo Noviembre 2008 - Febrero 2009. Experimento I.

Cepa	Identificación molecular	Parámetros de crecimiento	
		NT	PSP (g)
A2-06/08	<i>Bacillus pumilus</i>	5.75 b	14.58 a
A2-07/08	<i>Bacillus pumilus</i>	5.00 b	15.34 a
P1-18/08	<i>Pseudomonas putida</i>	4.75 ab	14.93 a
P1-21/08	<i>Pseudomonas putida</i>	6.50 a	14.79 a
P1-20/08	<i>Pseudomonas putida</i>	4.25 ab	10.59 ab
P1-38/08	<i>Pseudomonas putida</i>	5.75 ab	14.73 a
A3-19/08	<i>Bacillus pumilus</i>	4.75 ab	11.43 a
A3-32/08	<i>Bacillus pumilus</i>	5.50 ab	14.51 a
A3-33/08	<i>Bacillus pumilus</i>	3.00 ab	10.55 a
A1-05/08	No identificada	8.00 a	13.42 a
A1-33/08	No identificada	8.75 a	12.81a
A1-19/08	No identificada	7.25 a	11.53 a
A1-37/08	No identificada	7.75 a	15.33 a
Control		2.25 b	6.33 b

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ). Promedio de cuatro repeticiones.



**Figura 1.** Peso seco de hojas (g) de los cultivos de Lechuga, Acelga, Maíz, Espinaca y Rabanito después de la inoculación de bacterias. La Molina, Lima. Periodo Agosto - Noviembre 2008. Experimento II

#### 1.2.4 ACTIVIDAD 1.3: EVALUACIÓN IN VITRO Y MACETA CON ORGANISMOS RELACIONADOS A LOS BIOPLAGUICIDAS

##### **Objetivo de la actividad:**

- Selección de cepas que presenten actividad antagonista contra hongos fitopatógenos.

##### **Indicadores de la actividad:**

- Pruebas in vitro de antagonismo con las 171 cepas aisladas e identificadas.
- Desarrollo de protocolos de pruebas de antagonismo in vitro
- Difusión de los protocolos a los países miembros del proyecto.

##### **Materiales y Métodos**

##### **Prueba de antagonismo in vitro contra hongos fitopatógenos: *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani***

Un total de 171 cepas fueron sembradas en el medio Trypticase Soya Broth (TSB) durante 24 horas, luego se colocó por duplicado 15 µl de esta suspensión bacteriana en una placa con PDA a pH 7, cada placa se dividió en 3 cuadrantes iguales e equidistantes. La gota de suspensión bacteriana se ubicó dentro de cada cuadrante y al borde de la placa. Paralelamente se obtuvo con ayuda de un sacabocado un disco de 1cm de diámetro del micelio de *R. solani*, este micelio fue colocado en el centro de cada placa con PDA. El mismo procedimiento se realizó para la prueba de antagonismo contra *F. solani*. Las placas se incubaron a  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5 días para *R. solani* y 7 días para *F. solani*. Se evaluó la inhibición del crecimiento de ambos hongos fitopatógenos por las cepas bacterianas y se expresó en porcentaje de inhibición de crecimiento siguiendo la técnica propuesta por Ahmed. Esta técnica consistió en medir el crecimiento del hongo desde el centro de la placa hasta el radio de máximo crecimiento del hongo en cm; teniendo como referencia el crecimiento máximo de cada hongo en una placa control sin bacteria. Para determinar el porcentaje de inhibición se restó matemáticamente

el máximo crecimiento del hongo desde el centro de la placa (placa control) y el crecimiento del mismo hasta el borde del halo de inhibición del crecimiento formado alrededor de la bacteria, dividido entre el máximo crecimiento del hongo y finalmente multiplicado por 100. La prueba se realizó por duplicado, con el objetivo de calcular la desviación estándar de las medidas tomadas para comprobar la existencia de variabilidad.

### Resultados y Discusión

En la Tabla 1, se observa que el 28 % de las cepas evaluadas presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de *R. solani* y *F. Solani*. El 27 % de las cepas de *Pseudomonas* presentó el más alto porcentaje de inhibición (33-73%) de crecimiento para los hongos *R. solani* y *F. solani*. Las cepas P1-50/08 y P1-20/08 presentaron los más altos porcentajes de inhibición para ambos hongos. Además se observa que el número de cepas capaces de inhibir el crecimiento de *R. solani* no son las mismas cepas que inhiben el crecimiento de *F. solani*, esto puede estar relacionado a los diferentes mecanismos de control que presentan las bacterias contra estos 02 hongos. Esta variabilidad de inhibición del crecimiento contra hongos fitopatógenos demuestra la complejidad de los sistemas de control que pueden presentar las bacterias, además de la presencia y acción de más de un tipo de sustancia y mecanismo en el control de hongos relacionados tanto a la producción de enzimas que degradan la pared celular como a la producción de diferentes sustancias antifúngicas.

**Tabla 1.** Número de cepas con capacidad de inhibir el crecimiento de *R. solani* y *F. solani* *in vitro*.

Genero	Antagonismo contra <i>R. solani</i> <sup>a</sup>		Antagonismo contra <i>F. solani</i> <sup>b</sup>		Antagonismo contra <i>R. solani</i> y <i>F. solani</i> <sup>b</sup>	
	Nº de cepas	Rango de Porcentaje Inhibición (%)	Nº de cepas	Rango de Porcentaje Inhibición (%)	Nº de cepas	Rango de Porcentaje Inhibición (%)
<i>Bacillus</i>	7	30-65	5	20-23	3	22-65
<i>Pseudomonas</i>	12	33-79	16	35-73	14	33-73
<i>Actinomycetos</i>	13	26-73	15	15-38	12	24-73

#### 1.2.4 ACTIVIDAD 1.4: CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL MANEJO EN CAMPO

##### Objetivo de la actividad:

- Evaluar las mejores condiciones de uso de microorganismos y algunos factores de restricción.

##### Indicadores de la actividad:

- Pruebas *in vitro* para determinar las características fisiológicas de las cepas.
- Experimento en invernadero con factores de restricción.

##### Material y Métodos

###### a). Pruebas *in vitro* para determinar las características Fisiológicas

###### Crecimiento a diferentes temperaturas

Un total de 60 cepas se sembraron en el medio TSA. Las placas fueron incubadas a las temperaturas de 4, 10, 15 y 20 °C. Se evaluó el crecimiento de cada cepa, midiendo diariamente el diámetro de las

colonias durante 10 días, los cuales fueron comparados con el tratamiento control. El tratamiento control fue incubado a 28 °C (la temperatura óptima para el crecimiento de las cepas bacterianas).

### **Crecimiento a diferentes valores de pH**

60 cepas se sembraron en el medio TSA con diferentes valores de pH (pH 4, 5.5 y 7.0). Las placas se incubaron durante 10 días a 28°C. El crecimiento de cada aislamiento se evaluó midiendo el diámetro de las colonias diariamente y se comparó con el crecimiento de colonias de la placa control a pH 7.

### **b) Factores de restricción**

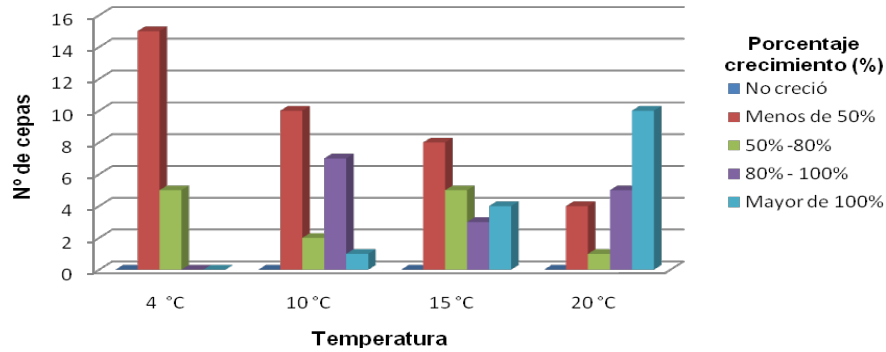
**Experimento I:** Un experimento a nivel de cobertor se realizó en la estación experimental del CIP, La Molina, Lima (240 msnm) durante el periodo Noviembre 2008 - Febrero 2009. La temperatura promedio en este periodo fue de 28 °C y humedad relativa de 78.91%. Se evaluó un total de 09 cepas bacterianas, estas cepas fueron seleccionadas en base a las pruebas de promoción de crecimiento y antagonismo contra hongos fitopatógenos *in vitro*. Las cepas fueron inoculadas en plántulas *in vitro* y semilla tubérculo de *S. tuberosum* cv. Unica sembradas en macetas con suelo estéril cuyo sustrato usado fue mezcla musgo molido, tierra negra y arena (proporción 2:2:1). Las cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* se sembraron en el medio TSB (Trypticase Soy Broth) a 28 °C en movimiento continuo en el shaker a 150 rpm por 1 día hasta una concentración final de 10<sup>8</sup>UFC/ml. Las cepas de Actinomicetos crecieron en el medio NB (Nutritive Broth) por 3 días en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Las plántulas *in vitro* fueron inoculadas con 5 ml de inóculo bacteriano (10<sup>8</sup>UFC/ml) en las raíces y las semillas tubérculo se sumergieron en 30 ml de inóculo bacteriano por 20-30 minutos. El tratamiento control consistió en medio TSB sin bacteria. Después de la primera semana de inoculación de las cepas, cada una de las macetas fueron fertilizadas con 100 ml de fertilizante soluble N,P,K (20-20-20 kg ha<sup>-1</sup>) a una concentración de 1.5g/L. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, los cuales se mantuvieron en el cobertor a la temperatura de la estación y riego controlado. Las plantas se cosecharon 11 semanas después y se evaluó los siguientes parámetros de crecimiento: número de tubérculos y peso fresco y seco de tubérculos y de toda la planta.

### **Material y Métodos**

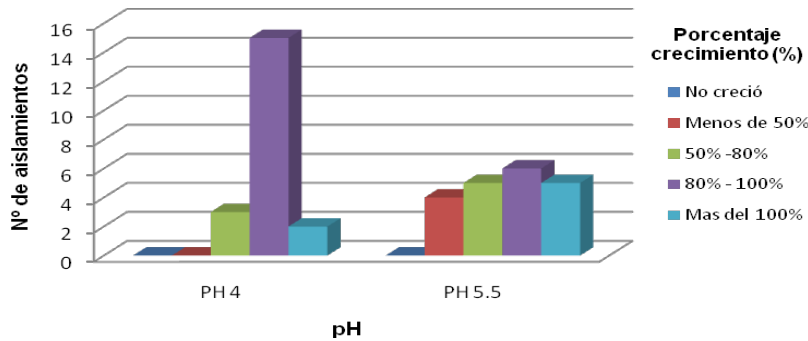
En la Figura 1, se observa que las cepas bacterianas crecieron en las diferentes temperaturas evaluadas. En la temperatura de 4 °C se observa poca adaptabilidad, sin embargo en las temperaturas de 15 y 20 °C, se observó un mejor crecimiento, por lo tanto se deduce que estas cepas pueden adaptarse rápidamente cuando son introducidas al suelo ya que la temperatura del suelo se encuentra entre 10 y 15°C (a excepción de suelos tropicales). Esta identificación de temperaturas óptimas de crecimiento es necesaria para la rápida adaptación, crecimiento de la bacteria y producción de sustancias promotoras del crecimiento cuando son aplicadas al suelo. En la Figura 2, se observa que la mayoría de las cepas bacterianas crecieron en ambos tipos de pH (pH 4.4 y 5.5), a excepción de los actinomicetos. La adaptabilidad de las cepas a este pH ácido quizás se deba a que la mayoría de cepas evaluadas provienen de suelos con pH ácido. Hay que considerar que la selección de cepas efectivas en condiciones de laboratorio no necesariamente tendrán el mismo comportamiento en plantas cultivadas en campo.

Respecto a los factores de restricción de crecimiento de las bacterias, se demostró que no hay diferencias entre la inoculación de las cepas bacterianas a plántulas *in vitro* o tubérculo semilla de *S. tuberosum* L. cv. Unica. La inoculación en semillas es una ventaja, ya que el tubérculo semilla tiene la capacidad de almacenar sustancias de reserva que permiten un mejor desarrollo de la planta, y al ser influenciado por la bacteria se traduce en un mejor desarrollo de la planta, es decir promueve el crecimiento vegetal. Esto depende de factores ambientales, de la variedad de papa utilizada y del inoculante bacteriano. Los resultados sugieren que estas cepas podrían ser empleadas más adelante en

cultivos a gran escala en el campo, como un complemento de los productos químicos utilizados cotidianamente, con la finalidad de disminuir el deterioro de los suelos agrícolas y aumentar la producción del cultivo de papa.



**Figura 1.** Número de cepas bacterianas bajo diferentes temperaturas de crecimiento.  
 \*El porcentaje de crecimiento de cada aislamiento en las diferentes temperaturas (4°, 10°, 15°y 20 C°), es comparado con respecto al control (28 C°).  
 \*\* Crecimiento control =100 %



**Figura 2.** Número de cepas bacterianas bajo diferentes valores de pH.  
 \*El porcentaje de crecimiento de cada aislamiento en los diferentes pH (4 y 5.5) es comparado con respecto al control (pH 7).  
 \*\*Crecimiento control=100%

#### 1.2.5 ACTIVIDAD 2.1: DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE MULTIPLICACIÓN MASIVA Y SU VALIDACIÓN.

##### Objetivo de la actividad:

- Evaluar e identificar el mejor método de multiplicación e inoculación de las cepas bacterianas.

**Indicadores de la actividad:**

- Determinación de curvas de crecimiento para cada género bacteriano.
- Ensayo de soportes a nivel de invernadero.

**Material y Métodos****a) Determinación de curvas de crecimiento de las cepas**

Se realizaron curvas de crecimiento de las bacterias para determinar los tiempos óptimos de cultivo, temperatura adecuada y agitación óptima. Las cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* fueron sembradas en el medio TSB (Trypticase Soy Broth) a  $28 \pm 2$  °C en movimiento continuo en el shaker a 150 rpm por 5 días. Las cepas de Actinomicetos fueron sembradas en el medio NB (Nutritive Broth) por 10 días en las condiciones mencionadas anteriormente.

**b) Ensayo de soportes a nivel de invernadero.**

Se probaron dos soportes inertes: talco y vermiculita. Se inoculó ambos soportes con las cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Las suspensiones bacterianas fueron aplicadas a dos volúmenes diferentes en cada soporte. (**S>I**: mitad de volumen de inoculante por cada volumen de soporte y **S=I**: mismo volumen de inoculante y soporte).

Después de la inoculación, los soportes se sometieron a las temperaturas de 4 ° C y 25 ° C (temperatura ambiente). Posteriormente se realizó el conteo de las poblaciones bacterianas mediante la técnica de diluciones sucesivas y siembra por incorporación en placa para determinar la supervivencia de las bacterias en los soportes sometidos a ambas temperaturas.

**c) Ensayo de campo**

Se evaluó los efectos de la inoculación de las bacterias en tubérculo semilla. Se usó el método de inmersión, el cual consistió en sumergir los tubérculos semilla en una mezcla de agua (2-3 L) con 125 ml de suspensión bacteriana por 20-30 minutos y posteriormente se inoculó los tubérculos (ya colocados en el surco) con mezcla adicional de agua (2-3 L) más 125 ml de suspensión bacteriana.

**Resultados y discusión:**

Las curvas de crecimiento determinaron que las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* llegan a la población óptima de  $10^8$  ufc/ml a las 24 horas a 28 °C y 150 rpm en el medio TSB y las cepas de los grupo Actinomicetos a las 72 horas en el medio CN bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

En la prueba de soportes se determinó que el mejor método para conservar las bacterias es el talco, el cual se inoculó con la suspensión bacteriana y se dejó secar a temperatura ambiente. Esta mezcla preservó a las poblaciones de bacterias hasta 6 semanas a las temperaturas de 25°C (temperatura ambiente) y a 4°C, en el cual esta última temperatura presentó mejores resultados, por lo tanto sólo basta inocular el soporte con la mitad de volumen de inoculante para poder asegurar el mantenimiento de la población de bacterias en el tiempo (Tabla 1 y Tabla 2). Los dos tipos de soporte presentaron buenos resultados de conservación de la población, por lo tanto se puede usar cualquiera de los dos. Respecto al método de inoculación a semillas tubérculos, sumergir los tubérculos en el inoculante por 20-30 minutos en una mezcla de agua con bacteria y posteriormente añadir nuevamente una mezcla de agua con bacterias a cada tubérculo en los surcos presentó buenos resultados.

Tabla 1. Población de bacterias en el tiempo en los 02 tipos de soporte conservados a 25 °C.

BACTERIAS	SOPORTES	(P. Inicial)	(1 Sem)	(2 Sem)	(4 Sem)	(6 Sem)
BACILLUS	ST>VI	42x10 <sup>8</sup>	67x10 <sup>8</sup>	109x10 <sup>7</sup>	76x10 <sup>7</sup>	71x10 <sup>7</sup>
	ST=VI		41x10 <sup>8</sup>	66x10 <sup>7</sup>	56x10 <sup>7</sup>	61x10 <sup>7</sup>
	SV>VI		114x10 <sup>8</sup>	201x10 <sup>7</sup>	221x10 <sup>7</sup>	182x10 <sup>7</sup>
	SV=VI		38x10 <sup>8</sup>	78x10 <sup>7</sup>	66x10 <sup>7</sup>	68x10 <sup>7</sup>
ACTINOMYCETOS	ST>VI	32x10 <sup>8</sup>	31x10 <sup>7</sup>	64x10 <sup>6</sup>	35x10 <sup>6</sup>	41x10 <sup>6</sup>
	ST=VI		45x10 <sup>5</sup>	36x10 <sup>5</sup>	37x10 <sup>5</sup>	39x10 <sup>5</sup>
	SV>VI		38x10 <sup>6</sup>	42x10 <sup>6</sup>	46x10 <sup>6</sup>	54x10 <sup>6</sup>
	SV=VI		52x10 <sup>6</sup>	36x10 <sup>6</sup>	32x10 <sup>6</sup>	73x10 <sup>5</sup>

SV: soporte vermiculita, ST: soporte talco

Tabla 2. Población de bacterias en el tiempo en los 02 tipos de soporte conservados a 4 °C.

BACTERIAS	SOPORTES	(P. Inicial)	(1 Sem)	(2 Sem)	(4 Sem)	(6 Sem)
BACILLUS	ST>VI	61x10 <sup>8</sup>	35x10 <sup>8</sup>	49x10 <sup>8</sup>	44x10 <sup>8</sup>	41x10 <sup>8</sup>
	ST=VI		46x10 <sup>8</sup>	39x10 <sup>8</sup>	42x10 <sup>8</sup>	32x10 <sup>8</sup>
	SV>VI		44x10 <sup>8</sup>	41x10 <sup>8</sup>	38x10 <sup>8</sup>	35x10 <sup>8</sup>
	SV=VI		52x10 <sup>8</sup>	51x10 <sup>8</sup>	46x10 <sup>8</sup>	35x10 <sup>8</sup>
	NS>VI		31x10 <sup>5</sup>	0	0	69x10 <sup>2</sup>
	NS=VI		275x10 <sup>4</sup>	0	0	176x10 <sup>2</sup>
ACTINOMYCETOS	ST>VI	46x10 <sup>8</sup>	35x10 <sup>7</sup>	33x10 <sup>7</sup>	42x10 <sup>6</sup>	46x10 <sup>6</sup>
	ST=VI		91x10 <sup>6</sup>	74x10 <sup>6</sup>	66x10 <sup>6</sup>	59x10 <sup>6</sup>
	SV>VI		155x10 <sup>7</sup>	120x10 <sup>7</sup>	32x10 <sup>7</sup>	71x10 <sup>6</sup>
	SV=VI		99x10 <sup>6</sup>	56x10 <sup>6</sup>	51x10 <sup>6</sup>	94x10 <sup>5</sup>

#### 1.2.6 ACTIVIDAD 2.4: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOABONOS FERMENTADOS.

##### Objetivo de la actividad:

- Identificar los componentes activos de los bioles elaborados a partir de diferentes insumos y determinar su modo de acción.
- Mejorar la preparación de los abonos sólidos (compost) que manejan los agricultores en la sierra
- Evaluar la efectividad de los bioabonos fermentados sólidos y líquidos.

##### Indicadores de la actividad:

- Bioabonos fermentados preparados
- Análisis físico y químico de los biabonos fermentados.
- Análisis de los rendimientos de los ensayos.

##### Material y Métodos

Para identificar los componentes activos de los bioles elaborados a partir de diferentes insumos y determinar su modo acción, se instalaron biodigestores de una sola carga en la Estación Experimental de la Molina en el Centro Internacional de la Papa (CIP), durante el periodo del 7 noviembre 2008 al 9 marzo de 2009 (Foto 1). Se prepararon 12 diferentes tipos de abonos orgánicos líquidos conocidos



como “bioles” (Tabla 1). Los diferentes tipos de bioles fueron elegidos en base a su frecuencia de uso por diversas instituciones de investigación, ONGs y agricultores. Para la construcción de los biodigestores se usaron cilindros de plástico de 120 L de capacidad con tapa hermética. Se tomaron muestras de los insumos y de los bioles (siete muestreos), las cuales fueron colectadas y enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) para sus análisis físicos y químicos.

Las variables evaluadas durante el experimento fueron: registro de temperatura, pH y conductividad eléctrica (CE), contenidos totales de nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio, cobre, hierro y zinc (Chapman et al. 1997).

Para mejorar la preparación de los abonos sólidos que manejan los agricultores en la sierra. Se instalaron pilas de compost en las instalaciones del CIP-Lima (280 msnm), durante el 13 de marzo al 13 julio del 2009 y en el CIP-Huancayo (3300 msnm) del 13 junio al 10 diciembre del 2009.

**Tabla 1:** Diferentes bioles preparados y evaluados en el CIP-Lima (7 noviembre 2008 a 9 de marzo del 2009).

INGREDIENTES	BIODIGESTORES (BIOLES)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Relación C/N	24	20	26	6	26	27	25	29	5	5.1	27	26
Agua (L)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Estiércol(kg)	15+5	0+20	15+5	15+5	15+5	15+5	0+2	0+2	0+2	0+2	15+1	15+5
Melaza (kg)			2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	5	5	5	2.5
Leguminosa(kg)			1				1	1		1	2	1
Leche (L)			1.5		1.5		1.5				3	1.5
Ceniza (kg)			0.5		0.5		0.5	1	1			0.5
Levadura (kg)			0.25		0.25		0.25	0.25	0.25		0.5	0.25
Nitrógeno (kg)				0.9					0.9	0.9		
Fósforo (kg)						0.9				0.9		
capacidad	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
			S/A									C/A



**Foto 1:** Diferentes tratamientos de bioles instalados a campo abierto en el CIP-Lima (7 noviembre 2008 a 9 de marzo del 2009)

En Lima se prepararon y evaluaron ocho tipos de compost (Foto 2), con residuos de paja seca de cebada, ceniza y estiércoles de vacuno, llama y guano de gallina. El objetivo fue evaluar la influencia de los tipos de estiércol y la relación en peso seco de los insumos utilizados (estiércol: paja de cebada). Los compost 1, 2, 4, 5 y 7; tuvieron una relación C/N de 25 (Tabla 2). Esta relación considerada como optima para la degradación de la materia orgánica (Domínguez, 1997; Guerrero, et. al., 2007), para conseguir dicha relación se agrego nitrógeno inorgánico. Todas las pilas de compost tuvieron un peso seco de 140 kg y fueron regadas con 160 l de agua al inicio de la instalación.

En Huancayo los tratamientos de compost fueron similares a los de Lima, siendo la diferencia el reemplazo del insumo de guano de gallina usado en Lima por el guano de pollo usado en Huancayo (Tabla 3).

Se realizaron muestreos en los diferentes tipos de compost para observar las variables indicadas más adelante. Los muestreos fueron realizados a los 14, 44, 70, 105 y 120 días en Lima y a los 30, 60, 90, 120 y 180 días de instalado el experimento en Huancayo (Foto 3).

Las variables evaluadas fueron: la temperatura, pH, CE, contenido totales de nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio cobre, fierro y zinc, según lo sugerido por Chapman et al. (1997).

Los datos obtenidos del ensayo de la evaluación biológica de los bioles y compost fueron procesados sin transformar mediante el análisis de variancia (ANVA) y la prueba de comparación de medias de Duncan-Waller ( $\alpha = 0.05$ ). En todos los casos haciendo uso del el software SAS 9.1 (Statistical Analysis System).

**Tabla 2:** Diferentes compost preparados en el CIP-Lima, con residuos de cebada y ceniza con y sin nitrógeno (13 marzo – 13 julio 2009).

Compost	Definición
1, C/N 25	Compost: estiércol llama: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
2, C/N 25	Compost : estiércol llama: paja de cebada 2:1con fertilizante
3, C/N 40	Compost: estiércol llama: paja de cebada 2:1 sin fertilizante
4, C/N 25	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
5, C/N 25	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 1:1 sin fertilizante.

6, C/N 31	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
7, C/N 25	Compost: guano gallina: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
8, C/N 21	Compost: guano gallina: paja de cebada 2:1 sin fertilizante.

Clave: C/N: relación carbono/nitrógeno.



**Foto 2:** Diferentes tratamientos de compost instalados en el CIP-Lima (13 marzo – 13 julio 2009).

**Tabla 3:** Diferentes tratamientos de compost preparados en el CIP-Huancayo, con residuos de cebada y ceniza con y sin nitrógeno (13 junio-10 diciembre 2009).

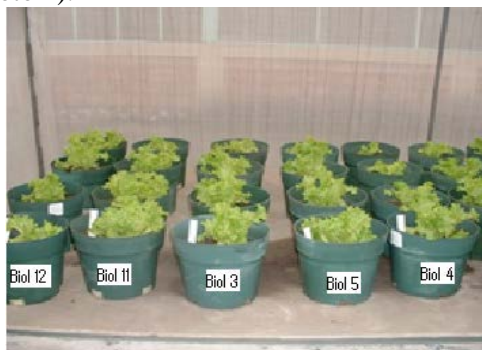
COMPOST	DEFINICIÓN
1 C/N 25	Compost: estiércol llama: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
2 C/N 25	Compost : estiércol llama:paja de cebada 2:1con fertilizante
3, C/N 32	Compost: estiércol llama : paja de cebada 2:1 sin fertilizante
4 C/N 25	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
5 C/N 25	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 2:1 sin fertilizante.
6 C/N 30	Compost: estiércol vacuno: paja de cebada 2:1 con fertilizante.
7 C/N 25	Compost: guano pollo: paja de cebada 1:1 con fertilizante.
8 C/N 25	Compost: guano pollo: paja de cebada 2:1 con fertilizante.
9 C/N 29	Compost: guano pollo: paja de cebada 2:1 sin fertilizante

Clave: C/N: relación carbono/nitrógeno.



**Foto 3:** Diferentes tratamientos de compost instalados en el CIP-Huancayo (13 junio-10 diciembre 2009)

Para la evaluación biológica de los bioabonos fermentados (sólidos y líquidos) se instalaron ensayos bajo cobertor en la zona de Lima. El diseño para el ensayo de los bioles fue completamente al azar (DCA) con 50 tratamientos y cuatro repeticiones por tratamientos con arreglo factorial. Se probaron los doce bioles preparados en el CIP-Lima (Tabla 1), a dos frecuencia de aplicación (2 y 5 veces), comparados con dos testigos: control (sin aplicación) y el fertilizante químico foliar peters (20-20-20, NPK). La unidad experimental fue una maceta número ocho. El volumen de la solución aplicada fue de 15 ml macetas<sup>-1</sup> y la dosis del fertilizante químico foliar fue de 4 g L<sup>-1</sup>. La dosis de los bioles fue de 40% (40 ml biol + 60 ml agua). El sustrato empleado consistió en una mezcla de arena y musgo en una proporción 2:1 en volumen. El análisis químico del sustrato arrojó los siguientes resultados: N: 0.95%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 0.22% y K<sub>2</sub>O: 0.17% (Foto 4).



**Foto 4:** Ensayo a nivel de cobertor instalado en el CIP-Lima para evaluar la efectividad de los bioles preparados el 7 noviembre 2008 a 9 de marzo del 2009.

Para la evaluación de la efectividad del compost, el diseño fue un DCA con diecisiete tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento con arreglo factorial. Se probaron los ocho compost preparados en el CIP-Lima (Tabla 2) a dos dosis (20 y 40 g maceta<sup>-1</sup>), comparados con un testigo: control (sin aplicación). La unidad experimental fue una maceta número ocho. El sustrato empleado fue arena y musgo en una proporción 2:1 en volumen. El análisis químico del sustrato arrojó los siguientes resultados: N: 0.95%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:0.22% y K<sub>2</sub>O: 0.17%.(Foto 5)

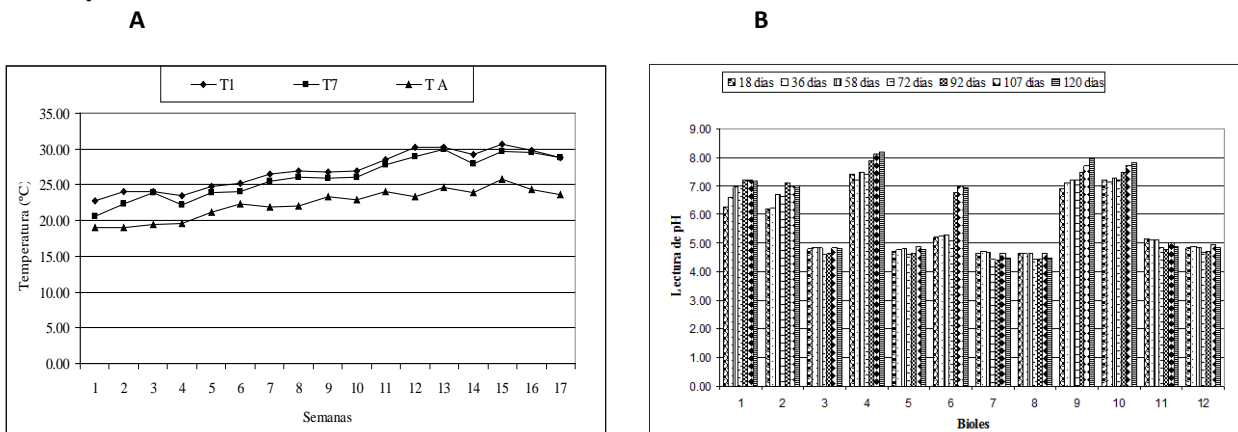


**Foto 5:** Ensayo a nivel de cobertor instalado en el CIP-Lima para evaluar la efectividad de los compost preparados el 13 marzo a 13 julio 2009

## Resultados y discusiones

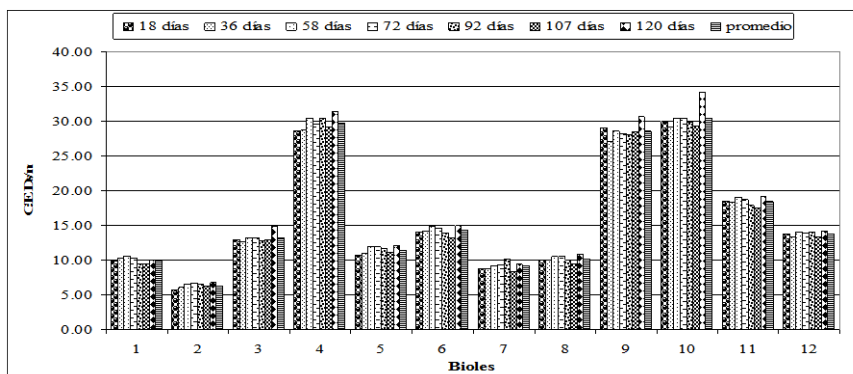
### Evaluación de la preparación de los Bioles

En la Figura 1 se observa la evolución de la temperatura y el pH en los diferentes tipos de bioles preparados en Lima. La temperatura de los bioles desde el inicio de la instalación hasta la semana seis estuvo entre los 20 y 25 °C, luego en la semana doce subió a 30 °C, y se mantuvo así hasta la cosecha de los bioles. En el primer año de experimentación se concluye que el incremento de la temperatura en los bioles se debió al aumento de la temperatura del ambiente (TA), y siempre fue menor a la registrada en los bioles 1 y 7. Por otro lado, el pH de los bioles fue ácido en los tratamientos 3, 5, 7, 8, 11 y 12. Mientras en los bioles 1, 2, 4, 9 y 10 fue de neutro a básicos. Solo el biol 6 tuvo un doble comportamiento siendo ácido al inicio y neutro en el tercer mes. La acidez en los bioles se debió a la leche, la levadura y la melaza. Mientras la basicidad fue causada por la urea, que fue agregado a los bioles 4, 9 y 10 (Tabla 1). El grupo de los bioles neutro-básicos produjo biogas a excepción del biol 2. Los bioles ácidos no produjeron biogas a excepción del 3 y el 12, que produjeron biogas las dos primeras semana de instalado el experimento, para reanudar la producción en la séptima semana en el biol 12 y la novena semana en el biol 3.



**Figura 1:** Lectura de los análisis físicos. A: temperatura de los bioles 1, 7 y del aire (TA) y B: registro de pH de los bioles instalados en el CIP-Lima (7 noviembre 2008-9 marzo del 2009).

La CE más alta arrojaron los bioles 4, 9 y 10 de 30 dS m<sup>-1</sup>, dicha conductividad fue causada por la urea (Figura 2). Además se puede ver la estabilidad a través del tiempo de fermentación ya que, la CE en los bioles a los 18 días es similar que a los 120 días de fermentación anaeróbica.



**Figura 2:** Conductividad eléctrica en diferentes tiempo de fermentación de los bioles instalados en el CIP-Lima (7 noviembre 2008-9 marzo del 2009).

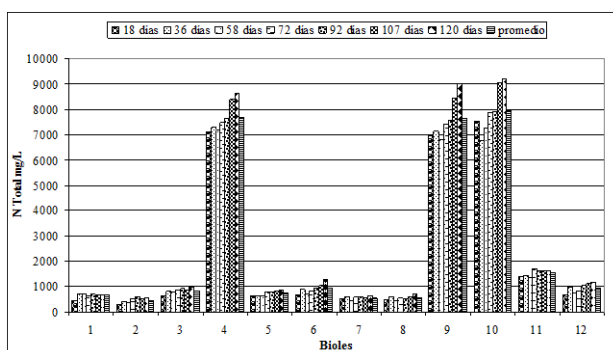
En la Figura 3, se observa los resultados de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio totales de los bioles. El contenido de nitrógeno más alto arrojaron los bioles 4, 9 y 10 de 8 g L<sup>-1</sup>. Esto se debe a que en estos bioles se agregó urea, para ver la dinámica poblacional de los microorganismos en condiciones anaeróbicas (Tabla 1). Por otro lado, desde el primer hasta el séptimo muestreo se observa un ligero

aumento del contenido de nitrógeno. Los demás bioles tuvieron valores menores a  $1 \text{ g L}^{-1}$ , excepto el biol 11 de  $1.8 \text{ g L}^{-1}$ , debido a que tuvo la mayor cantidad de insumo. En el primer año de evaluación se concluye que la cantidad de nitrógeno total fue menor a  $1.8 \text{ g L}^{-1}$ , cuando se emplean insumos orgánicos.

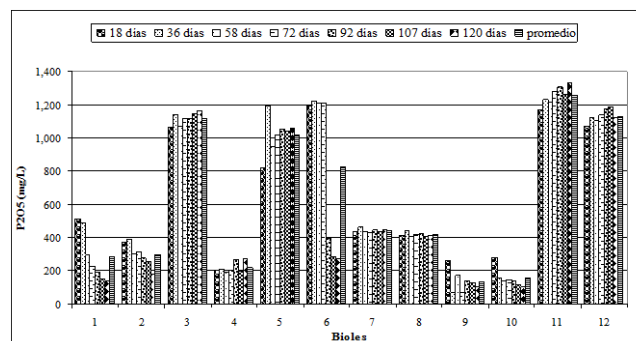
El contenido de fósforo totales en los bioles 3, 5, 11 y 12, estuvo entre  $1.1 \text{ g L}^{-1}$  a  $1.3 \text{ g L}^{-1}$  y pH ácido; mientras los bioles básicos 1, 2, 4, 9 y 10, tuvieron menos de  $0.4 \text{ g L}^{-1}$ . En el biol 6 se agregó fósforo bajo la forma de súper triple ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ), siendo el contenido de este elemento de  $1.2 \text{ g L}^{-1}$  en el cuarto muestreo y pH de 5; luego en el quinto muestreo la cantidad de fósforo bajó a  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  y el pH subió a 7. Se concluye que la cantidad de fósforo totales en los bioles está influenciado por el pH del medio.

El mayor contenido de potasio totales arrojó el biol 11 de  $7.5 \text{ g L}^{-1}$ , debido a que tuvo la mayor cantidad de insumo (Tabla 1). Siguen los bioles 12 y 3 con  $4.8 \text{ g L}^{-1}$  y  $4.5 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente. Mientras el biol 2 arrojó el valor más bajo con  $1.2 \text{ g L}^{-1}$ . El resto de los bioles tuvieron en promedio  $3 \text{ g L}^{-1}$ . En este primer año se concluye que la cantidad de potasio en los bioles no está influenciado por el pH del medio; ya que, bioles ácidos y básicos mostraron resultados similares. También se observó en todos los bioles que no hubo incremento o disminución marcada del contenido de potasio desde el inicio del muestreo (18 días) hasta el momento de la descarga (120 días).

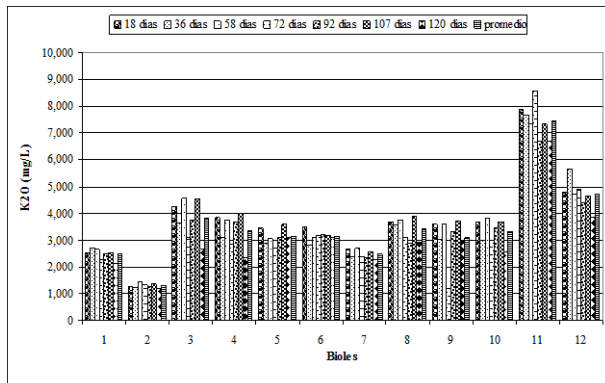
Los contenidos de calcio totales más alto arrojaron los bioles ácidos 3, 5, 7, 8, 11 y 12 con valores que van de  $2.0 \text{ g L}^{-1}$  a  $5.0 \text{ g L}^{-1}$ . Mientras los bioles básicos 1, 2, 4, 9 y 10, se aproximan a  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . Entonces en este primer año se concluye que el contenido de calcio está influenciado por el pH del medio.



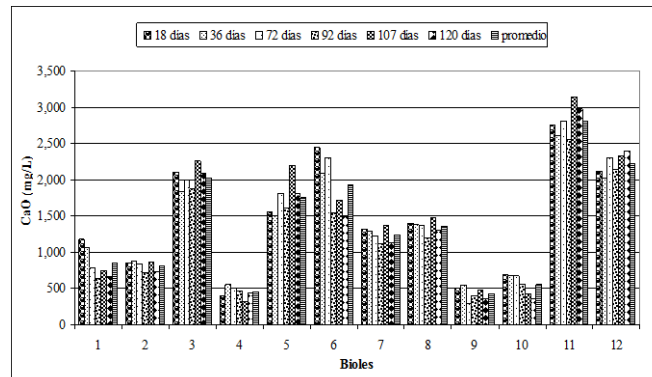
**A**



**B**



C



D

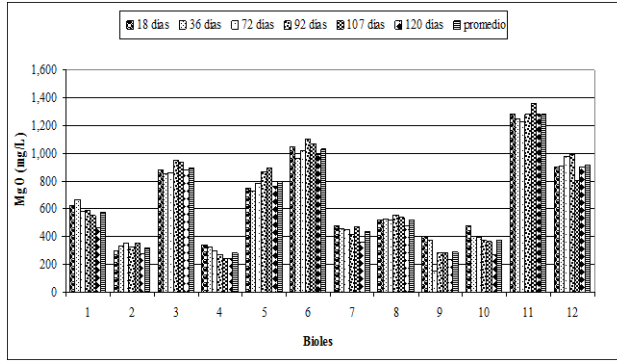
**Figura 3:** Lectura de los análisis químicos. A: nitrógeno , B:fósforo , C: potasio, D: Calcio; de los bioles instalados en el CIP-Lima (7 noviembre 2008-9 marzo del 2009).

En la Figura 4 se observa los resultados del contenido total de magnesio, cobre, manganeso y zinc en los bioles. El contenido más elevado de magnesio se observó en los bioles 3, 5, 6, 11 y 12, de  $1.1 \text{ g L}^{-1}$ . Los bioles 7 y 8 arrojaron en promedio  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  ambos grupos ácidos, pero la diferencia del contenido de magnesio se debe al tipo de estiércol utilizado, en el primer grupo el estiércol tuvo menor contenido de humedad a diferencia del segundo grupo, por lo tanto mayor contenido de materia seca (Tabla 1). Los bioles básicos 1, 4, 9 y 10, tuvieron los valores promedio más bajos de  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ . Entonces se concluye en este primer año que la cantidad de magnesio en los bioles está influenciado por el pH y del contenido de este elemento en los insumos empleados.

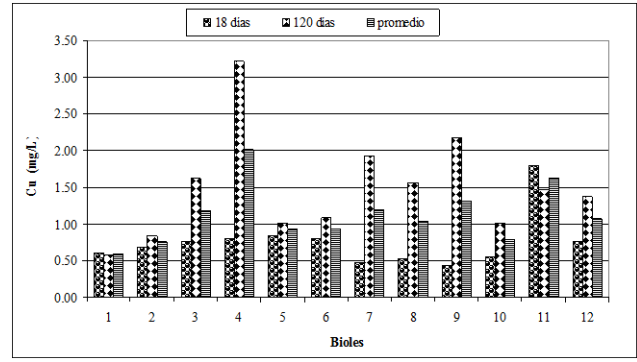
El contenido promedio de cobre en los bioles estuvo fluctuando desde los  $0.5$  a  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Por otro lado, hubo un aumento del contenido de este elemento en el biol entre el primer muestreo (18 días) y séptimo muestreo (120 días), excepto en los bioles 1 y 11. En este primer año se concluye que el contenido de cobre no está influenciado por el pH del medio, porque bioles ácidos y básicos arrojaron resultados similares.

El contenido promedio de manganeso más alto se observó en los bioles 3, 6, 11 y 12, con valores de  $10$  a  $16 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 11); detrás los bioles 5, 7 y 8, con  $7 \text{ mg L}^{-1}$ , siguen el grupo de los bioles 1, 2, 4, 9 y 10, con  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Los dos primeros grupos tuvieron pH ácidos mientras en el último grupo el pH fue mayor a 7. Por lo tanto, se puede decir en este primer año que el contenido de manganeso en los bioles está influenciado por el pH del medio.

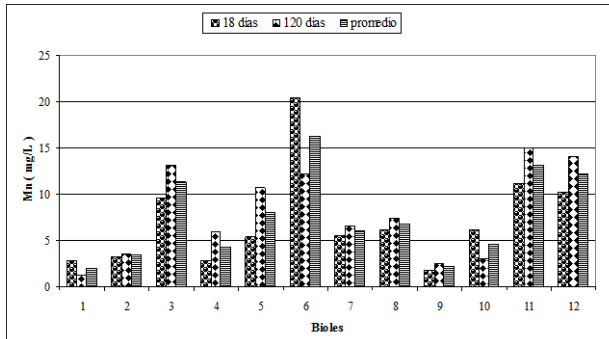
El contenido promedio de zinc más alto arrojó el biol 8 de  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ; los demás bioles arrojaron valores que van desde los  $2$  a  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . El contenido de zinc en todos los tratamientos aumentó entre el primer y séptimo muestreo excepto en el biol 11. Por lo tanto, en este primer año se concluye que el contenido de zinc no está influenciado por el pH del medio, ya que tratamientos ácidos y básicos arrojaron resultados similares.



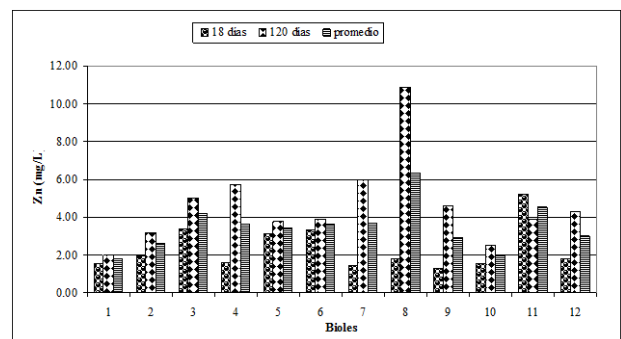
**A**



**B**



**C**



**D**

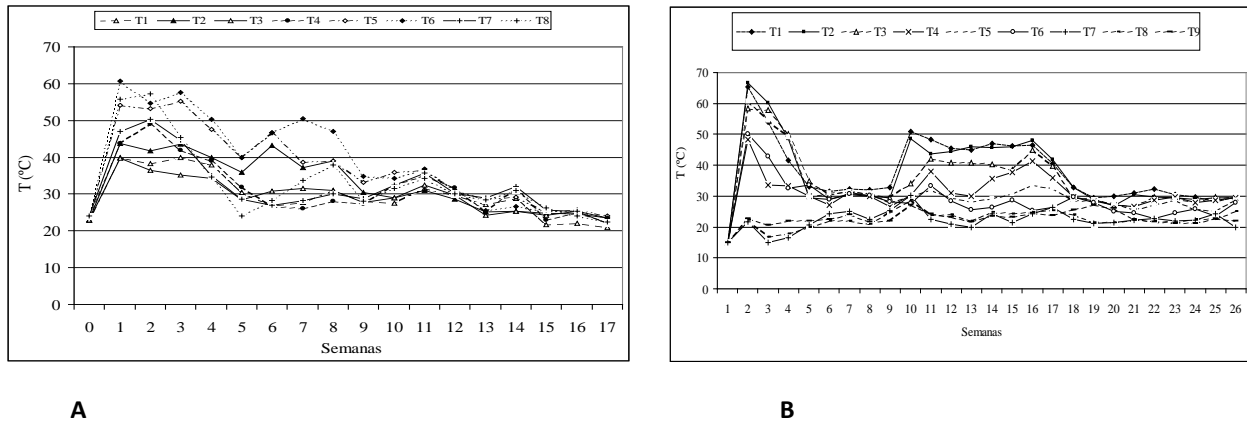
**Figura 5:** Lectura de los analisis quimicos. A: magnesio, B:cobre , C: manganeso y D: zinc de los bioles instalados en el CIP-Lima (7 noviembre 2008-9 marzo del 2009).

### Evaluación de la preparación de los Compost

En la Figura 5 se observa las temperaturas de las pilas de los compost de la zona de Lima y Huancayo. En Lima, la temperatura de los compost 1, 2 y 3 de estiércol de llama desde el inicio de la instalación hasta la semana seis fue de 43 °C, luego en la semana doce descendió a 30 °C y continuó así hasta la cosecha. El compost 3 registró menor temperatura que los compost 1 y 2, debido a su alta relación C/N. Los compost 4, 5 y 6; de estiércol de vacuno durante las primeras cuatro semanas la temperatura fue de 60 °C, luego en la semana cinco bajó a 55 °C, después en la semana nueve se encontró entre 45 y 50 °C, finalmente en la semana trece bajó a 25 °C y se mantuvo así hasta la cosecha. En los compost 7 y 8, de guano de gallina, la temperatura registradas desde el inicio de la instalación hasta la semana dos fue de 57 °C, y en las semanas tres y cuatro estuvo entre 44 y 35°C, después entre las semanas cinco y catorce bajó a 30 °C, y, finalmente, durante las tres últimas semana bajó a 21 °C. El compost 8 tuvo mayor temperatura que el compost 7 debido a su baja relación C/N. En Huancayo las temperaturas de los compost estuvieron comprendidas entre los 15 y 66 °C. La temperatura en los compost 1, 2, y 3 de estiércol de llama estuvo entre 50 y 66 °C desde el inicio de la instalación hasta la semana tres, luego entre las semanas cuatro y ocho bajó a 30 °C, después entre las semanas nueve y dieciséis subió a 45 °C y decae en la semana diecinueve a 30 °C, y se mantiene así hasta la cosecha. El compost 3 registró menor temperatura que los compost 1 y 2, debido a su alta relación C/N. Los compost 4, 5 y 6 de estiércol de vacuno desde el inicio de la instalación hasta la semana dos fue de 57 °C, luego entre las semanas tres y seis bajó a 30 °C, después en las semanas ocho y dieciocho subió a 40 °C, decae en la semana diecinueve a 30 °C y logra mantenerse así hasta la cosecha. El compost 6 registró menor temperatura que los compost 4 y 5, por su

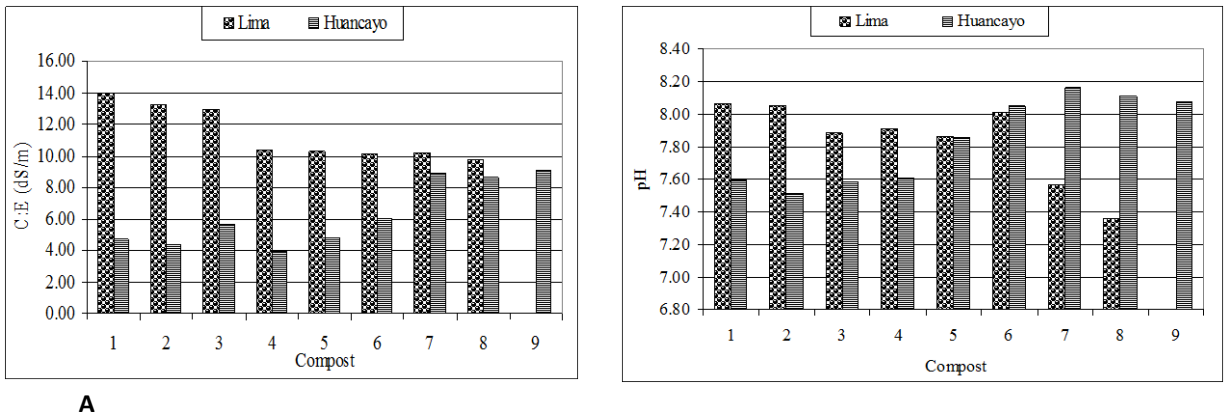


alta relación C/N. Los compost 6, 7 y 8 de guano de pollo la temperatura durante todo el experimento fue de 22 °C.



**Figura 5:** Temperaturas en diferentes tiempos de fermentación de los compost, A: CIP-Lima (13 marzo – 13 julio 2009) y B: CIP-Huancayo (13 junio-10 diciembre 2009).

En la Figura 6 se observa los resultados obtenidos respecto a la CE y el pH de las pilas de compost de dos zonas. En Lima, los compost 1, 2 y 3 a base de estiércol de llama, la CE arrojó medidas entre 12 y 13 dS m<sup>-1</sup>, mientras los demás compost arrojaron menos de 10 dS m<sup>-1</sup>. En Huancayo los compost 1, 2, 3 de estiércol de llama fue de 3 dS m<sup>-1</sup>, los compost 4, 5 y 6 de estiércol de vacuno fue de 6 dS m<sup>-1</sup> y los compost 7, 8 y 9 de guano de pollo fue de 9 dS m<sup>-1</sup>. Los altos valores de la CE en los compost de Lima y los compost 8 y 9 de Huancayo, se debió al tipo de estiércol que se empleó ya que, provenían de animales estabulados en donde su alimentación es a base de concentrado (maíz, afrecho, harina de pescado y soya); mientras los estiércoles de los animales de vacuno y llama de la zona de Huancayo son alimentados con forrajes. El uso de compost con alto contenido de sales no es conveniente ya que puede afectar el crecimiento de las plantas; en especial cuando se utilizan cantidades elevadas en las preparación de las camas de germinación de viveros o en macetas (Guerrero, 1993).

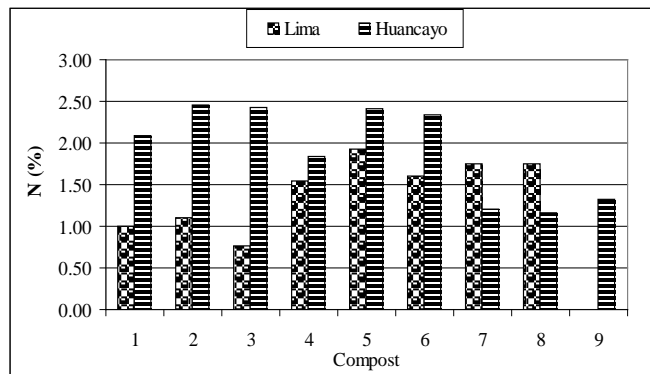


**A**  
**B**

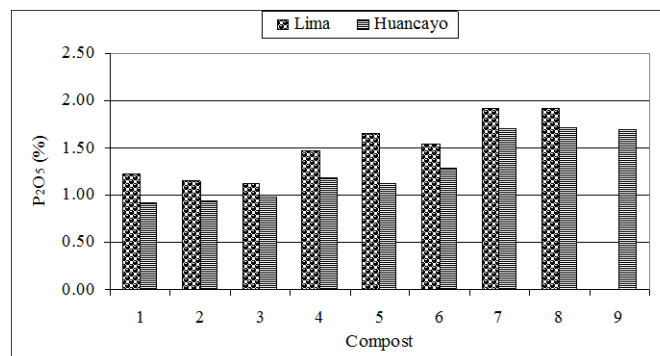
**Figura 6:** Lectura de los análisis físicos. A: Conductividad eléctrica y B: pH de las pilas de compost instalados en el CIP-Lima (13 marzo – 13 julio 2009) y CIP-Huancayo (13 junio-10 diciembre 2009).

En la Figura 7 se observa los resultados obtenidos del análisis de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio de las pilas de compost de dos zonas. En Lima, los valores más alto de nitrógeno arrojaron los compost 4, 5 y 6, a base de estiércol de vacuno, de 1.54% a 1.92% detrás los compost 7 y 8 de guano de gallina de 1.75% a 1.76%, cierran los compost 1, 2 y 3 de estiércol de llama de 0.76% a 1.10%. En Huancayo los resultado más alto de contenido de nitrógeno lo mostraron los compost 1, 2 y 3 a base de estiércol de llama de 2.08% a 2.45%, detrás los compost 4, 5 y 6 a partir de estiércol de vacuno de 1.84% a 2.40%, finalmente los compost 7, 8 y 9 de guano de pollo de 1.17% a 1.33%. El contenido de fósforo más alto en Lima lo registraron los compost 7 y 8 con guano de gallina de 1.91% a 1.92%, seguido por los compost 4, 5 y 6 a partir de estiércol de vacuno de 1.47% a 1.66%, cierran los compost 1, 2 y 3 de estiércol de llama de 1.13% a 1.23%.

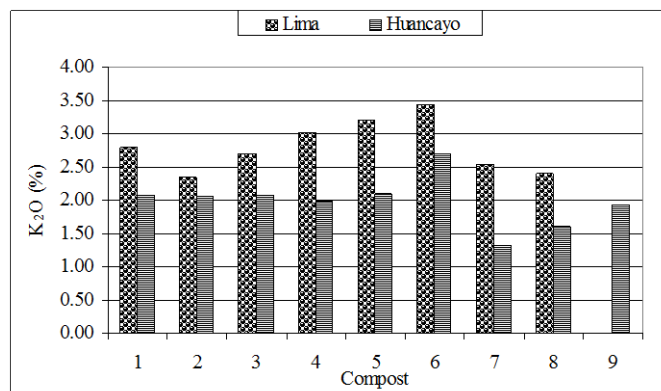
En Huancayo los resultados más alto de fósforo arrojaron los compost 7, 8 y 9 de guano de pollo de 1.69% a 1.71%, seguido por los compost 4, 5 y 6 de estiércol de vacuno de 1.13% a 1.29%, cierran los compost 1, 2 y 3 de estiércol de llama de 0.92% a 0.98%. Las cantidades más alta de potasio en Lima arrojaron los compost 3, 4 y 5 provenientes de estiércol de vacunos, con contenidos de 3.01% a 3.44% detrás los compost 1, 2 y 3 a base de estiércol de llama con contenidos de 2.33% a 2.80%, terminan los compost 7 y 8 a partir de guano de gallina entre 2.39% a 2.53%. En Huancayo los resultados más alto de potasio arrojaron los compost 3, 4 y 5 proveniente de estiércol de vacuno (1.98% a 2.69%), continua los compost 1, 2 y 3 a base de estiércol de llama de 2.07% a 2.08%, cierran los compost 7, 8 y 9 de guano de pollo de 1.32% a 1.92%. Las cantidades más altas de magnesio en Lima lo arrojaron los compost 7 y 8 de guano de gallina con contenidos de 1.20% a 1.35%, detrás los compost 4, 5 y 6 a partir de estiércol de vacuno entre 1.11% a 1.30%, cierran los compost 1, 2 y 3; de estiércol de llama de 1.03% a 1.20%. En Huancayo los resultados más alto de magnesio tuvieron los compost 7, 8 y 9 provenientes de guano de pollo de 1.19% a 1.28%, continua los compost 4, 5 y 6 de estiércol de vacuno de 0.80% a 0.87%, termina los compost 1, 2 y 3 a base de estiércol de llama con 0.86%.



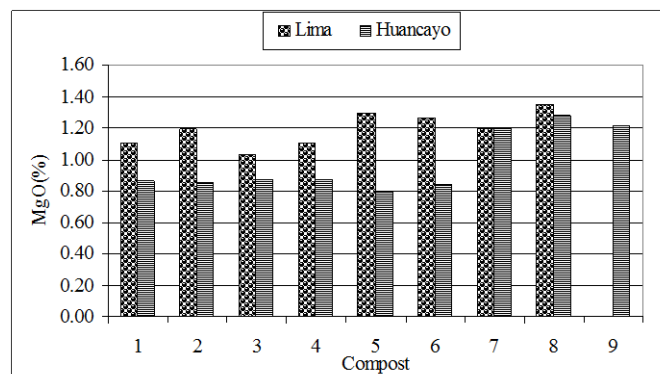
A



B



C



D

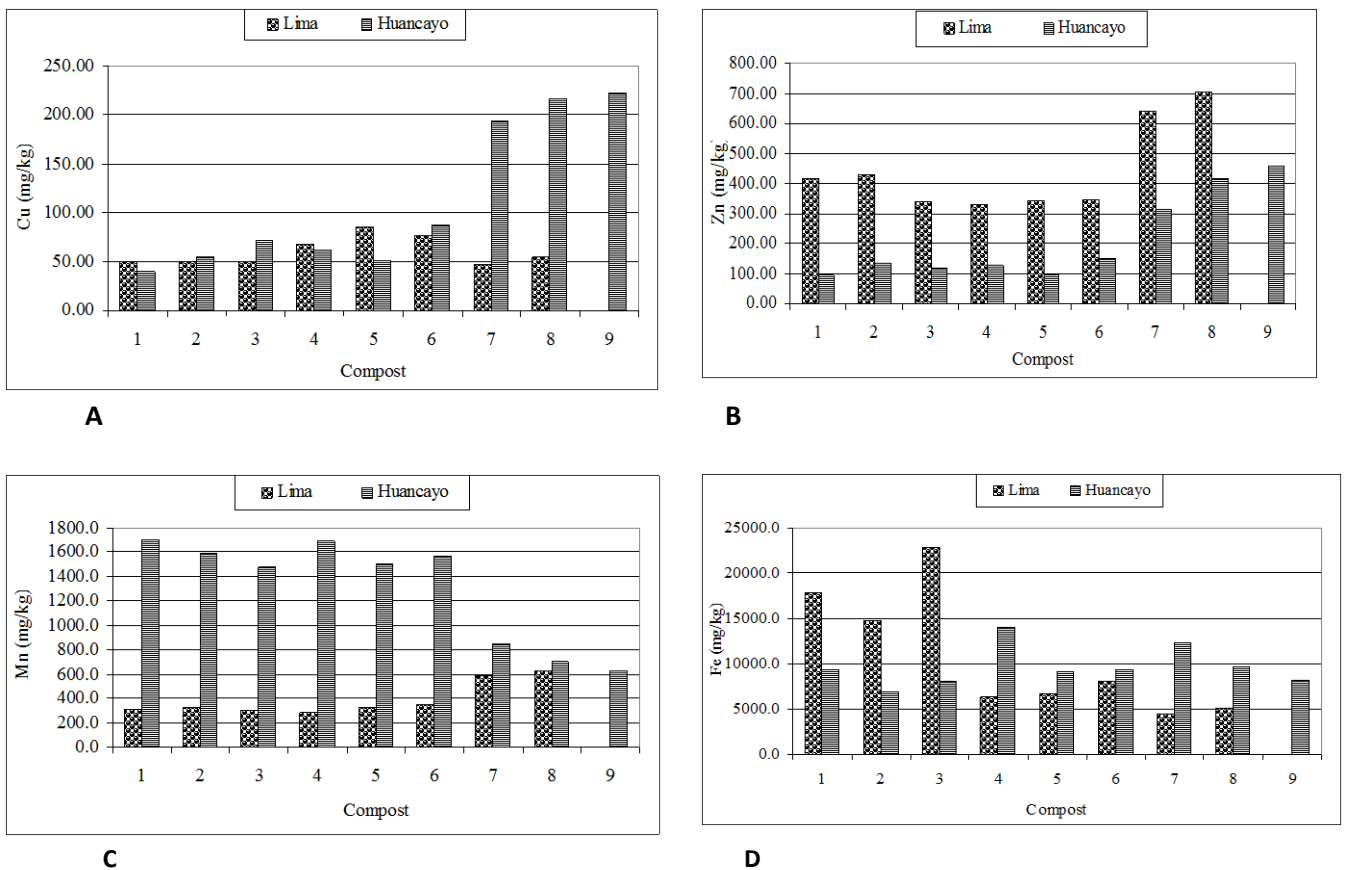
**Figura 7:** Lectura de los análisis químicos. A: nitrógeno, B: fosforo, C: potasio y D: magnesio de los compost instalados en el CIP-Lima (13 marzo – 13 julio 2009) y CIP-Huancayo (13 junio-10 diciembre 2009)

En la Figura 8 se observa los resultados obtenidos respecto al contenido de cobre, zinc, manganeso y hierro de las pilas de compost de dos localidades. En Lima, el contenido de cobre de los compost estuvieron entre 49 y 85 mg kg<sup>-1</sup>. En Huancayo se observaron los contenidos más alto de cobre (194 a 223 mg kg<sup>-1</sup>) en los compost 7, 8 y 9 provenientes de guano de pollo, seguidos de los compost 4, 5 y 6, a base de estiércoles de vacuno, con 51 a 87 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, finalmente los compost 1, 2 y 3, de estiércol de llama, con 40 a 72 mg kg<sup>-1</sup> de cobre.

En Lima las cantidades de zinc más alta (641 a 705 mg kg<sup>-1</sup>) se observaron en los compost 7 y 8, a base de guano de gallina, seguidos de los compost 1, 2 y 3, a partir de estiércol de llama, con 340 a 430 mg kg<sup>-1</sup>, y los compost 4, 5 y 6, de estiércol de vacuno, con 343 a 345 mg kg<sup>-1</sup>. En Huancayo los valores más alto de zinc se observaron en los compost 7, 8 y 9, provenientes de guano de pollo, con 315 a 348 mg kg<sup>-1</sup>, seguidos de los compost 1, 2, 3, 4, 5 y 6, a base de estiércoles de llama los tres primeros y de vacuno los tres últimos, con 95 a 150 mg kg<sup>-1</sup>.

En Lima, las cantidades más alta de manganeso se observaron en los compost 7 y 8, a base de guano de gallina, con 580 a 620 mg kg<sup>-1</sup>, seguidos de los compost 1, 2, 3, 4, 5 y 6, a partir de estiércoles de llama los tres primeros y de vacuno los tres últimos, con 280 a 350 mg kg<sup>-1</sup>. En Huancayo, los valores más alto de manganeso se observaron en los compost 1, 2, 3, 4, 5 y 6, provenientes de estiércol de llama los tres primeros y de vacuno los tres últimos, con 1,470 a 1,700 mg kg<sup>-1</sup>, seguidos de los compost 7, 8 y 9 a base de guano de pollo con 620 a 850 mg kg<sup>-1</sup>.

En Lima, los compost 7 y 8 a base de guano de gallina mostraron las cantidades más altas de hierro (641 a 705 mg kg<sup>-1</sup>), seguidos de los compost 1, 2, y 3, a partir de estiércol de llama, con 340 a 430 mg kg<sup>-1</sup>, finalmente los compost 4, 5 y 6; de estiércol de vacuno con 343 a 345 mg kg<sup>-1</sup>. En Huancayo, los contenidos más alto de hierro se observaron en los compost 7, 8 y 9 provenientes del guano de pollo, con 315 a 348 mg kg<sup>-1</sup>, seguidos de los compost 1, 2, 3, 4, 5, 6, a base de estiércoles de llama los tres primeros y de vacuno los tres últimos de 95 a 150 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 8:** Lectura de los análisis químicos. A: cobre, B: zinc, C: manganeso y D: hierro de los compost instalados en el CIP-Lima (13 marzo – 13 julio 2009) y CIP-Huancayo (13 junio-10 diciembre 2009)

Resumiendo los resultados obtenidos de los compost evaluados provenientes de diferentes especies de animales son bajos en contenidos de nutrientes NPK 1.75%-1.4%-2.5%, comparados con el guano de isla NPK 13%-14%-2%, pero los compost son insumos que se pueden producir en la propia finca de esta manera no depender de insumos externos y el reciclaje de los nutrientes. Por otro lado, Villagarcía (1990) menciona una dosis ideal para el cultivo de la papa de NPK 192-108-128, para las condiciones de la Sierra Central de Perú. Entonces con una dosis de 10 TM ha<sup>-1</sup> de compost en peso seco es suficiente para cubrir las necesidades del cultivo de papa de NPK. Además los compost aportan micronutrientes : Cu: 1.25 kg, Zn:3.0 kg, Mn:8.0 kg y Fe:10 kg, importantes para la nutrición humana.

### Evaluar la efectividad de los bioles y compost

En los experimentos para evaluar la efectividad de los bioles a nivel de cobertor, los rendimientos más altos en la variable peso seco se observaron en el biol 12, seguido de los bioles 11, 5, 3, 4, 9 y 1, finalmente los bioles 8, 7, 6, 2 y 10. (Tabla 4). Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se

realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento en las siguientes variables: pH:-0.59; CE:-0.12; N:-0.27; P: 0.88; K: 0.65; Ca: 0.80; Mg: 0.66; Na: -0.01; Cu:-0.03; Zn: -0.03; Mn: 0.73; Fe: 0.79. Los resultados muestran alta correlación entre el rendimiento y los contenidos de nutrientes fósforo y calcio y hierro. Siendo estos los que se encuentran en mayor cantidad en los tratamientos ácidos 12, 11, 5 y 3, y en la frecuencia de aplicación 5 veces supera estadísticamente a 2 veces; pero solo en la variable de peso seco.

Los resultados de la evaluación de la efectividad de los compost a nivel de cobertor en Lima, Tabla 5, muestran que el compost 4, a base de estiércol de vacuno en relación 1:1 fue superior a los demás en las variables de peso fresco y seco. Este tratamiento de compost alcanzo temperaturas cercano a los 55 °C, condiciones ideales para la máxima degradación de la materia orgánica (Miller, 1993; Rynk, 1992; Szterm y Pravia, 1999), siguen los compost 8 y 7 de guano de gallina en relación 2:1 y 1:1 respectivamente. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los compost se realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento de las siguientes variables: MO: 0.8; pH:-0.07; N: 0.58; P: 0.74; K: 0.60; Ca: 0.60; S: 0.55; Mg: 0.65; Na: 0.20; Cu: 0.03; Zn: 0.79; Mn: 0.62; Fe:-0.81; B: 0.19. Con estos resultados podemos decir que no existe correlación entre los nutrientes y el rendimiento. Entonces se puede afirmar que existe otros factores que están influenciado en el rendimiento del cultivo, tales como: el incremento en la actividad de la fauna del suelo, reducción de microorganismos patógenos (Bulluck et al., 2002), incremento en la densidad aparente e intercambio cationico, estabilización del pH, disminución del lavado de nitratos (Stamatiadis et al., 1999, Pickering et al., 1998), eliminación de patogenos y semillas de malezas (Eastman et al., 2001; Dixon y Walsh, 1998) y degradación de residuos de plaguicidas (Block 1998, Buyuksomez et al., 2000).

**Tabla 4:** Rendimiento promedio del cultivo de lechuga a nivel de macetas provenientes de los bioles preparados del 7 noviembre 2008 a 9 de marzo del 2009 en la zona de Lima.

Factores	Tratamientos o bioles	Peso fresco g maceta-1	Peso seco g maceta-1
Bioles	12	13.561 a	1.2667 a
	11	11.715 bac	1.1687 ba
	5	12.560 bc	1.1231 ba
	3	10.545 bac	1.0363 ba
	4	8.596 bc	0.8175 ba
	9	9.496 bac	0.8127 ba
	1	7.957 c	0.8053 ba
	8	8.716 bc	0.7831 b
	7	8.279 bc	0.7669 b
	6	7.875 c	0.7500 b
	2	7.616 c	0.7338 b
Frecuencia	10	7.345 c	0.7313 b
	2 veces	9.0359 a	0.83968 b
	5 veces	10.0200 a	0.96066 a

Promedios con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Duncan Waller  $\alpha=0.05$ )

**Tabla 5:** Rendimiento promedio en el cultivo de lechuga a nivel de maceta proveniente de los compost Lima.

Factores	Compost	Peso fresco en (g maceta-1)	Peso seco en (g maceta-1)
Compost	4	40.228 a	5.2300 a
	8	39.651 ba	4.9550 ba
	7	35.946 bc	4.9500 ba
	6	35.326 c	4.6250 ba
	5	32.010 dc	4.3900 bc
	2	29.514 de	3.7988 dc
	3	26.471 e	3.7300 dc
	1	27.823 de	3.4263 d
Dosis	20 g/maceta	36.437 a	4.7769 a
	10 g/maceta	30.305 b	3.9994 b

Promedios con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Duncan Waller  $\alpha=0.05$ )

## Conclusiones

### Bioles

La producción de biogás en la zona de Lima es favorable cuando el pH es básico y la relación C/N de 5. Esta producción de biogás en el biodigestor es un indicador de la etapa metanogénica la cual garantiza la descomposición de la materia orgánica. Los insumos que acidifican los bioles fueron: la melaza, la leche y la levadura; mientras el insumo que causó la alcalinidad fue la urea. En condiciones ácidas los nutrientes de los bioles P, Ca, Mg, Mn y Fe, arrojaron las mayores cantidades, mientras en condiciones básicas dichos nutrientes arrojaron menor contenido. Por lo tanto, se recomienda usar los insumos que acidifican los bioles anteriormente mencionados. Por otro lado, los nutrientes N, K, Na, Cu y Zn se encuentran relacionados por el contenido de estos elementos en los insumos. Entonces se recomienda emplear el estiércol de vacuno como la mejor fuente. La conductividad eléctrica en los bioles se encuentra influenciada por el tipo de insumo que se utilice, siendo la urea el insumo que eleva la CE. En ese sentido se recomienda usar dosis bajas en la aplicación foliar para no causar un estrés al cultivo. En los siete muestreos realizados en los bioles no se observó aumento o disminución significativa del contenido de los elementos totales N, P, K, Ca y Mg. A nivel de cobertor existe correlación directa entre el contenido de P, Ca, Fe en los bioles y el rendimiento del cultivo de lechuga. Los mejores resultados en peso fresco del cultivo de lechuga se consiguieron con los bioles 12, 11, 5, 3, 4 y 9. Estos bioles son de naturaleza ácida, excepto los bioles 4 y 9. Aparentemente la condición ácida en los bioles favorece el rendimiento ya que se encontró correlación directa con los nutrientes fósforo, calcio y hierro. En el segundo año para confirmar los resultados obtenidos se volvieron a instalar los tratamientos que tuvieron los mejores resultados y nuevas formulas propios de los agricultores de la zona de Huancayo y Huancavelica

### Compost

La conductividad eléctrica se encuentra influenciada por el tipo de insumos que se utilice. En los compost a base de insumos de estiércol de llama y vacuno, guano de gallina y pollo, el pH estuvo entre 7 y 8, favoreciendo la degradación de la materia orgánica. La cantidad de los nutrientes N, P, K, Mg, Ca, Na, Cu, Zn y Mn, en los compost se encuentra influenciada por el contenido de estos elementos en los insumos. A nivel de cobertor los mejores rendimientos en el cultivo de lechuga se consiguieron con los compost de relación 2:1 (estiércol: paja seca). En condiciones de la Sierra se recomienda que las frecuencias de volteo de las pilas de compost sean de 30 días para incrementar la temperatura. Por otro lado, para la siguiente campaña se instalaran los compost en proporción 2:1 (estiércol: paja).

## Logro de los objetivos

El logro de los objetivos esta al 50% según el tiempo programado.

## Problemas o dificultades

En esta fase se tuvo problemas con el manejo de las pilas de compost ya que la temperatura no se incrementó como se esperaba. Por otro lado, en el biol no se pudo analizar el contenido de fitohormonas, porque no se encontró laboratorios que hagan este tipo de análisis. Esta sustancia podría explicar las diferencias observadas.

## Revisión Bibliográfica

- Block, D. 1998. Degrading PCBs through composting. *Biocycle* 39 (12):45-48.
- Bulluck L, Brosius M, Evanylo G y Ristaino B 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial physical and chemical properties on organic and conventional farm s. *Applied Soil Ecology* 19: 147-160
- Buyuksonmez, F., Rynk R, Hess F y Bechinski E. 2000. Occurrence, degradation and fate of pesticides during composting: occurrence and fate of pesticides In *Compost and composting systems Compost Science and Utilization* 8 (1): 6-10.
- Chapman HD, Pratt PF. 1997. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Editorial Trillas. México. 195 p
- Dixon, G. y Walsh, U. 1998. Suppression of plant pathogens by organic extracts a review. *Acta Horticulturae* 469: 383 - 390.
- Domínguez, V. 1997. Tratado de Fertilización. Ed. Tercera. Edit. Mundi – Prensa. Madrid - España. 613 p.
- Eastman B, Kane P, Edwards C, Trytek L, Gunadi B, Stermer A y Mobley J. 2001. The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. *Compost-Science-and-Utilization* 9 (1): 38 – 49.
- Guerrero J y Monsalve J 2007. Evaluación del compostaje de subproductos derivados del sacrificio y faenado del ganado. In *Redalyc Scientia Technica* N° 34 595-600.
- Guerrero, J. 1993. Abonos Orgánicos: Tecnología para el manejo ecológicos de suelo. RAAA-OFASA. Lima-Peru. 89 p.
- Miller, F. 1993. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In: *Soil microbial ecology*. Metting, F. B. J. (Eds). Marcel Dekker. 515-544.
- Pickerin J, Kendle A y Hadley P. 1998. The suitability of composted green waste as an organic mulch: effects on soil moisture retention and surface temperature. *Acta Horticulture* 469 : 319 – 324.
- Rynk, R. 1992. *On-farm composting handbook*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Cooperative Extension. New York 186 p.
- Stamatiadis S, Werner M y Buchanan M. 1999. Field assessment of soil quality as affected by compost and fertilizer application in a broccoli field (San Benito County, California) *Applied Soil Ecology* 12 :217-225.
- Sztern, D., y M. Pravia. 1999. Manual para la elaboración de compost. Bases conceptuales y procedimientos OPS/OMS Montevideo-Uruguay. 69p.
- VILLAGARCIA. S. 1990. Resultados de ensayos de campo sobre fertilización y nutrición mineral en el cultivo de papa. Lima-Perú. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Zethner, G., E. Pfundtner y J. Humer. 2002. *Qualitat Von Abfallen aus Biogasanlagen (Calidad de los residuos de las plantas de biogas)* Federal Environment Agency, Austria.

- Schoebitz Cid, MI. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) [Tesis para optar el grado de Licenciado en Ciencias Agrarias]. Valdivia, 2006.
- Díaz P, Ferrera R, Almaraz J, Alcántar G. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Rev Terra* 2001; 19(4):327-35
- Maier A, Riedlinger J, Fiedler H, Hampp R. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi dual culture. *Rev Mycological Progress* 2004; 3: 129–136
- Gosling P, Hodge A, Bending G. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Rev. Agriculture, Ecosystems and Environment* 2006; 113: 17–35.
- Peña H, Reyes Isbelia. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de Nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 2007; 32(8): 560-65
- Lara C, Villalba M, Oviedo L. Bacterias fijadoras asimbióticas de San Carlos. Córdova, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2007; IX (2):6-14
- Caracaño M, Ferrera R, Pérez J, Molina J, Bashan J. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 2006; 24(4):493-502
- Alexander M. Most-Probable-Number Method for Microbial Populations. En: *Methods for total microbial*. New York, 1950:1467-1472

### 1.3 PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2009-2010)

En Octubre 2009-June 2010, se evaluó el efecto de 15 diferentes cepas bacterianas en el rendimiento de tubérculos del cultivar Yungay en condiciones de campo en el distrito de La Victoria, Junín, (Actividad 1.2) los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Este primer experimento se estableció con la finalidad de seleccionar las mejores cepas en condiciones de campo. Posteriormente se instalaron 04 experimentos en condiciones de invernadero en la estación experimental del CIP, Lima y 02 experimentos en condiciones de campo en La Victoria, Junín y San José de Aymará, Huancavelica (Actividad 1.4) para continuar con el proceso de selección de las mejores cepas bajo ciertos factores de restricción como: inoculación de las cepas en diferentes cultivares de papa (Experimento I y VI), mezcla de cepas (Experimento II), diferentes sustratos (Experimento III), diferentes pH del suelo (Experimento IV) y en diferentes frecuencias de aplicación (Experimento V). Los resultados en condiciones de invernadero para experimento I, muestran que los cultivares Huamantanga y Unica incrementaron el rendimiento de los tubérculos en 10-30%, con la inoculación de las cepas P1-20/08 y A1-19/08, además esta última cepa presentó un mejor respuesta cuando se aplicó en los 8 diferentes tipos de sustratos evaluados (Experimento III). En el experimento IV, las cepas incrementaron el peso seco de tubérculos en los pH extremadamente ácido (pH 4.5) y básico (pH 7.8), el experimento II no mostró diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con una sola cepa o mezcla de cepas. Los resultados obtenidos de los 04 experimentos fueron variables y se realizó una repetición de cada experimento para el período 2010-2011. Respecto a los experimentos de campo, no se observaron diferencias significativas al inocular las cepas en 03 diferentes momentos del ciclo del cultivo (Experimento V) y por último la inoculación de la cepa A1-45/08 incrementó en rendimiento de tubérculos en las variedades Unica, Peruanita y Yungay. En la actividad 2.1, de los 3 sustratos naturales evaluados (cebada, camote y papa), el que presentó mejor resultado fue el sustrato de cebada al 30%, en el cual se alcanzó la mejor y óptima concentración celular ( $10^8$  UFC/ml), además este sustrato puede ser



usado como reemplazo de los medios de cultivo comerciales, disminuyendo los costos de producción del inoculante.

Durante la campaña (2009-2010) la actividad del proyecto estuvo enfocada a la actividad 2.4 (Evaluación de técnicas para la producción de bio-abonos fermentados) esta actividad fue realizada sin mayor problema, los resultados indican en los bioles que la producción de biogás se encuentra influenciada por el pH y la relación C/N. Dichas variables se encuentran influenciada por el tipo de insumo que se utilice. Por otro lado, los nutrientes en los bioles se encuentran relacionados por el pH y el contenido en los insumos. Se han identificado que los bioles de relación C/N de 30, 21 y 5 tuvieron los mejores resultados. En el compost la temperatura puede llegar hasta los 60 °C y las variables físicos-químicas se encuentran influenciadas por el tipo de insumo que se emplee. Se han identificado que los compost de relación 2:1 (estiércol: paja seca) a base de estiércol de vacuno tuvieron los mejores rendimientos y beneficio-costo.

1.3.1 Actividad 1.2: Evaluación in vitro, maceta y campo con organismos relacionados a los biofertilizantes

### **Objetivo de la actividad:**

- Selección de los mejores microorganismos por características y propósitos.

### **Indicadores de la actividad:**

- Experimentos en condiciones de campo con las mejores cepas seleccionadas en base a las pruebas in vitro y experimentos de invernadero
- Desarrollo de protocolos de inoculación de bacterias en condiciones de campo.
- Difusión de los protocolos a los países miembros del proyecto.

### **Material y Métodos**

Durante la campaña Setiembre 2009 - June 2010, 01 experimento de campo fue conducido en la estación experimental del CIP.

**Experimento I:** Se realizó en la Estación Experimental del CIP en La Victoria (3 230 msnm) en el departamento de Junín, Perú durante la campaña Setiembre 2009 - June 2010. Se evaluó un total de 15 cepas en tubérculos semilla de *S. tuberosum* cv. Yungay. Los tratamientos incluyeron inoculación de una sola cepa y dos tratamientos control con fertilización orgánica e inorgánica. La inoculación de las bacterias se realizó a la siembra y al aporque. Después de 150 días, los tubérculos fueron cosechados y clasificados en tubérculos comerciales, no comerciales y dañados. El peso y número de tubérculos fue registrado. El Experimento, fué implementado con los agricultores de cada zona y protegido contra plagas y enfermedades

Los datos se analizaron con el programa estadístico R y sometidos al Análisis de Varianza (ANOVA) usando un diseño completamente al azar (DCA). El análisis de múltiples comparaciones y la significancia entre los tratamientos se hizo con la Prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

### **Resultados y Discusión**

La Tabla 1 muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados que incluyeron inoculación de bacterias con respecto a los tratamientos control con fertilización orgánica e inorgánica.

**Table 1.** Rendimiento (t ha<sup>-1</sup>) de *S. tuberosum* L. cv. Yungay después de la inoculación de 15 diferentes cepas bacterianas. La Victoria, Junín. Periodo Setiembre 2009- Junio 2010. Experimento I.

Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )
T1	5t estiercol ha <sup>-1</sup>	22.84 b
T2	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + 100 Kg N, 120 Kg P, 100 Kg ha <sup>-1</sup>	31.79 a
T3	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A3-32/08	23.14 b
T4	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A2-14/06	22.62 b
T5	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A2-04/08	20.25 b
T6	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A2-09/08	22.29 b
T7	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A2-20/08	22.73 b
T8	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A1-33/08	22.65 b
T9	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A1-38/08	21.73 b
T10	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A1-39/08	23.37 b
T11	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + A1-42/08	21.46 b
T12	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + P1-21/08	24.42 ab
T13	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + P1-20/08	23.37 b
T14	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + P1-50/08	21.47 b
T15	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + B1-35/08	20.08 b
T16	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + B1-38/08	22.99 b
T17	5 t estiercol ha <sup>-1</sup> + B1-07/08	21.87 b

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey p < 0.05). Promedio de cuatro repeticiones.

### 1.3.2 ACTIVIDAD 1.4: CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL MANEJO EN CAMPO

#### **Objetivo de la actividad:**

- Evaluar las mejores condiciones de uso de microorganismos y algunos factores de restricción.

#### **Indicadores de la actividad:**

- Experimento en invernadero con factores de restricción.

#### **Material y Métodos**

Se establecieron 04 experimentos a nivel de cobertor y 02 experimentos a nivel de campo.

#### **Ensayos de Invernadero:**

**Experimento I- Inoculación de bacterias solas y en mezcla:** 10 cepas identificadas como *Bacillus subtilis* (B1-22/06), *Bacillus pumilus* (A2-19/08 y A2-20/08), *Bacillus amyloliquefasciens* (B1-35/06), *Paenibacillus lentimorbus* (B1-05/06), and *Pseudomonas putida* (P1-20/08 and P1-01/08), y 03 cepas de Actinomicetos (A1-19/08, A1-31/08 and A1-37/08) fueron evaluados. Los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* fueron sembrados en el medio TSB (Tripticasa Soy Broth) a 28 °C, y en agitación continua en el shaker a 150 rpm por 1 día hasta una concentración final de 10<sup>8</sup>UFC/ml. Las cepas de Actinomicetos crecieron en el medio NB (Nutritive Broth) por 3 días. Estas 10 cepas fueron aplicadas a 05 diferentes cultivares de papa (Huamantanga, Peruanita, Unica, Yana Wancuy y Yungay). Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y fueron comparados con un tratamiento control (sin inoculación de bacteria)

**Experimento II-Inoculación de bacterias en diferentes cultivares de papa:** 04 cepas (A1-19/08, A2-19/08, B1-35/06 and P1-20/08) fueron inoculadas en plántulas in vitro de *Solanum tuberosum* L. cv Revolución. Los tratamientos incluyeron inoculación de una cepa, mezcla de dos, tres y cuatro cepas y un tratamiento control (sin inoculación bacteriana).

**Experimento III-Inoculación de bacterias en diferentes tipos de sustratos:** 04 cepas (B1-35/06, A1-19/08, P1-20/08 and A2-19/08) se inocularon en ocho diferentes tipos de sustratos. Los sustratos presentaron una composición de arena, musgo y tierra negra. Las diferentes proporciones (v:v:v) están descritas en la Tabla 1. El sustrato fue esterilizado a 85 °C durante 4 horas y luego fue colocado en macetas e irrigadas hasta la capacidad de campo con agua potable.

**Experimento IV: Inoculación de bacterias en sustratos con diferentes pH:** 07 cepas (B1-22/06, B1-35/06, A2-19/08, A2-20/08, P1-20/08 A1-19/08 and A1-37/08) fueron evaluadas en sustratos con diferentes valores de pH. El sustrato consistió en una mezcla de musgo, tierra negra y arena (2:2:1). El pH de los sustratos fue ajustado a pH 4.5 con Sulfato de Hierro (FeSO<sub>4</sub>), y a pH 6.8 and 7.6 con (CaCO<sub>3</sub>). En los Experimentos III y IV se usó tubérculos semillas de *S. tuberosum* cv. Serranita. Para la inoculación de tubérculos, se usó el método de inmersión, el cual consistió en colocar los tubérculos en una bolsa plástica y sumergidos dentro de la suspensión bacteriana por 20-30 minutos. Para el tratamiento control los tubérculos fueron sumergidos en el medio TSB (sin bacteria).

**Tabla 1.** Proporción Volumen:Volumen:Volumen (v:v:v) de los diferentes tipos de sustratos usados en el experimento.

Textura de Suelo	Arena Lavada	Musgo
S1	100	-
S2	80	20
S3	60	40
S4	40	60
S5	-	10
S6	-	25
S7	-	50
S8	20	40

Todos los experimentos se establecieron al sembrar las plántulas *in vitro* y tubérculos semilla pre germinados en cada maceta conteniendo diferentes sustratos. Las plántulas y tubérculos fueron colocados a la misma profundidad (aproximadamente 2.5 cm de profundidad) en todas las macetas. Para evitar el estrés nutricional de las plantas, el fertilizante soluble Peter fue aplicado (0.5 g/L) después de 2 semanas de la inoculación. Las plantas crecieron en el cobertor bajo condiciones naturales de luz, temperatura de 15-18°C. Las macetas fueron distribuidas completamente al azar en el cobertor. Once semanas después de la inoculación, se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea y radical de las plantas. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico R. El análisis de múltiple comparaciones (DCA) fue usado y la significancia entre los tratamientos fue comparado con la Prueba de Tukey a un nivel de significancia de  $p < 0,05$

## Ensayos de Campo

**Experimento V-Inoculación de bacterias en 04 diferentes momentos del ciclo del cultivo:** Durante el periodo Octubre 2009- June 2010, un experimento en condiciones de campo fue conducido en la estación experimental del CIP ubicado en La Victoria (3 230 msnm) en el departamento de Junín, Perú. En este experimento se seleccionaron un total de 02 cepas en base a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e invernadero durante el primer año (periodo 2009-2010). Las cepas P1-20/08 y B1-35/06 se inocularon en tubérculos semilla de la variedad Yungay. La inoculación de las bacterias se realizó a la siembra, a las 4 semanas, al aporque, y 3 semanas después. Los tratamientos incluyeron inoculación de una sola cepa, un tratamiento control sin inocular y otro tratamiento control con fertilización química N,P,K (100-120-100 kg ha<sup>-1</sup>). Cada parcela estuvo conformada por 6 surcos con 15 plantas por surco (90 tuberculos/parcela). Al momento de la cosecha, las plantas de los bordes fueron eliminadas y el área de cosecha final fue de 16.4 m<sup>2</sup>, el cual consistió de 4 surcos y 13 plantas por surco. Los tubérculos fueron cosechados y clasificados por categorías en tubérculos comerciales, (>80 g), no comerciales (<80 g) y dañados y se registró el peso y el número de tubérculos. Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico R. Se hizo el análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Experimento VI-Inoculación de bacterias en diferentes cultivares de papa:** En el mismo periodo Octubre 2009- June 2010 se instaló un experimento en San José de Aymara, Huancavelica (3 884 msnm). Se inocularon las cepas bacterianas A1-45/08 y A2-18/08, en 05 cultivares de papa (Unica, Peruanita, Huamantanga, Yana Huancuy, Unica y Yungay).

## **Resultados y Discusión:**

En el Experimento I, se observa que los tratamientos inoculados con bacterias en los cultivares Peruanita y Yungay presentaron bajos incrementos en la producción de tubérculos. Por otro lado, los tratamientos con bacteria en los cultivares Huamantanga y Unica presentó los más altos rendimientos en un rango de 10-30%. (Figura 1). Las cepas que mostraron efecto positivo en al menos 3 o 4 variedades fueron P1-20/08 (*P. putida*) A1-19/08 y A1-31/08 (Actinomicetos)

En la Tabla 2, muestra los resultados para el Experimento II, el cual se observa los mejores resultados en el T1 (P1-20/08), T2, (B1-35/06), T18 (P1-20/08 + B1-35/06+A1-19/08) y T21 (P1-20/08 + A1-19/08) . Los resultados demuestran que la inoculación de P1-20/08 aplicada individualmente o en mezcla presentó los mejores resultados.

En la Tabla 3 muestra los resultados del Experimento III. Se observa que la cepa A1-19/08 (Actinomiceto) presentó los mejores resultados en los diferentes tipos de sustratos. Al observar esto podemos deducir que las cepas bacterianas se ven afectadas por las diferentes composiciones del sustrato, sin embargo aún en suelos pobres como el Sustrato 1, se observa incremento en el número y peso fresco y seco de tubérculos con respecto al control aunque no estadísticamente significativos.

En la Figura 2, se muestra los resultados del Experimento IV, en el cual se observa un aumento significativo en el peso seco de tubérculos en el pH 4.5 y 7.8 comparado al control. En general las cepas bacterianas incrementaron el peso seco de tubérculos en condiciones extremadamente ácidas (pH 4.5) y en condiciones extremadamente básicas (pH 7.8). Esta capacidad de las cepas de crecer en condiciones extremas permite seleccionar cepas para ser inoculadas en determinados tipos de suelos con condiciones extremas.

En los experimentos de campos, para el Experimento V, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas a diferentes tiempos del ciclo del cultivo de papa (Tabla 4)

En la Tabla 5 se observa que la cepa A1-45/08 presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al control en los cultivares Unica, Peruanita y Yungay. Ninguna de las cepas evaluadas mostraron efecto positivo en el rendimiento de tubérculos de los cultivares Yana Huancuy y Huamantanga, lo cual demostraría la poca especificidad de las cepas en ambos cultivos.

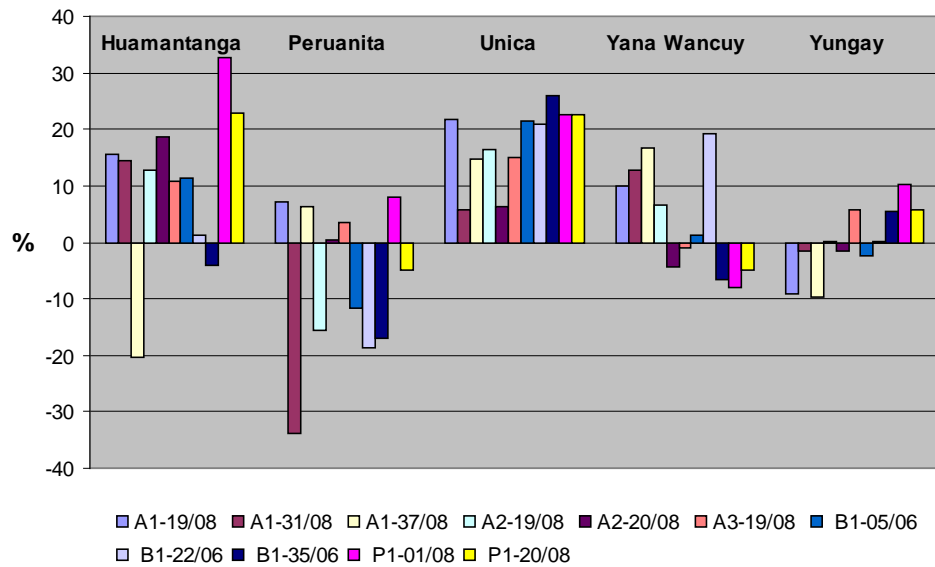


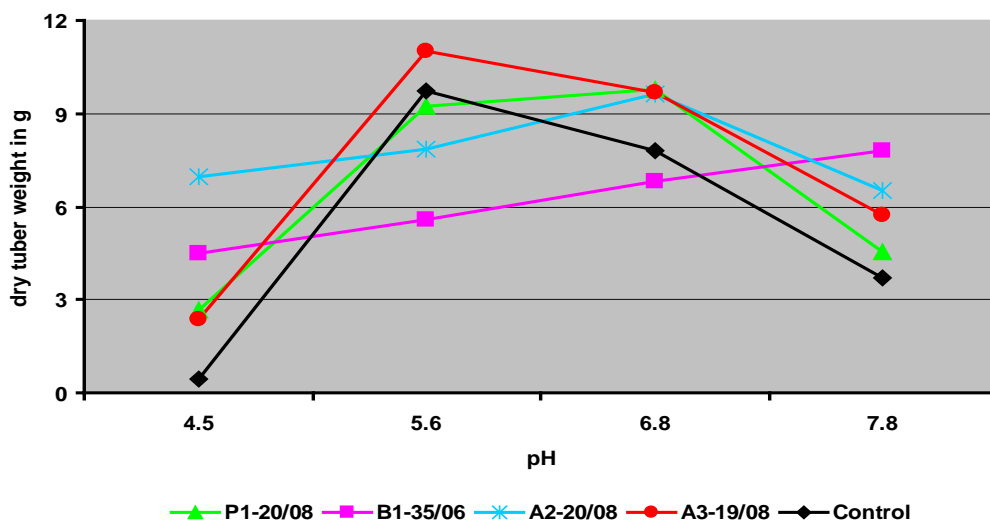
Figura 1. Incrementos y decrementos en porcentaje (%) del peso seco de tubérculos de diferentes cultivares de papa inoculados con bacteria comparado con el control. Experimento 1.

Tabla 2. Efecto de las bacterias en los principales parámetros de crecimiento de *S. tuberosum* cv. Revolución después de 12 semanas de la inoculación de bacterias inoculadas individualmente y en mezclas. Periodo 2009-2010

Tratamientos	NT	PFT	PST	PFP	PSP
T1	11.25	84.19	17.83	139.93	23.65
T2	10.25	88.69	18.71	132.35	23.61
T18	10.25	87.01	17.47	131.52	22.16
T24	8.25	74.84	15.29	133.08	22.63
Control	9	70.16	15.17	110.15	19.85

**Tabla 3.** Efecto de las bacterias en los principales parámetros de crecimiento de plantas de papa cultivar Serranita 12 semanas después de la inoculación de bacterias en los diferentes tipos de sustratos. Periodo 2009-2010.

Sustrato	Cepa	NT	PFT	PST	PFP	PSP
Sustrato 1	A1-19/08	5.5	49.77	9.82	84.24	13.22
	Control	2.5	21.48	3.6	43.2	6.58
Sustrato 2	A1-19/08	7.75	57.3	11.43	82.11	14.6
	Control	3.75	33.38	6.24	52.3	8.69
Sustrato 3	A1-19/08	4.75	55.29	10.14	86.39	14.21
	Control	3.75	40.51	7.8	68.78	10.25
Sustrato 4	A1-19/08	11	57.58	11.55	99.15	15.5
	Control	4.75	43.23	7.6	69.71	13.89
Sustrato 5	A1-19/08	13.25	50.23	10.97	93.75	16.11
	Control	5.25	37.23	5.96	77.24	13.72
Sustrato 6	A1-19/08	8	69.19	13.79	126.41	20.82
	Control	6.5	42.43	6.75	85.39	19.54
Sustrato 7	A1-19/08	5.6	84.53	6.8	121.68	22.83
	Control	6.25	56	9.66	91.82	15.15
Sustrato 8	A1-19/08	8	64.64	15.03	106.41	21.33
	Control	6.75	60.86	12.06	94.8	20.31



**Figura 2.** Peso seco de tubérculos en g de *S. tuberosum* var Serranita en sustrato con diferentes valores de pH después de 12 semanas de inoculación de bacterias. Periodo 2009-2010.

**Tabla 4.** Rendimiento de tubérculos en t ha<sup>-1</sup> del cultivar Yungay, después de la inoculación de 02 cepas bacterianas en tres diferentes tiempos. La Victoria, Período 2009-2010.

Tratamiento	Description	La Victoria
		Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )
T1	5 t guano ha <sup>-1</sup>	27.13 a
T2	5 t guano ha <sup>-1</sup> + 100 Kg N, 120 Kg P, 100 K ha <sup>-1</sup>	27.85 a
T3	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra	29.13 a
T4	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra, 4 semanas, al aporque	29.75 a
T5	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra, al aporque	25.28 a
T6	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a las 4 semanas, al aporque, a las 3 semanas	27.17 a
T7	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra	26.64 a
T8	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra, 4 semanas, al aporque	28.57 a
T9	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra, al aporque	28.14 a
T10	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a las 4 semanas, al aporque, a las 3 semanas	30.65 a

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey p < 0.05).  
Promedio de cuatro repeticiones.

**Tabla 5.** Rendimiento en t ha<sup>-1</sup> de cinco cultivares de papa (Unica, Yana Huancuy, Peruanita, Huamantanga y Yungay) después de la inoculación de 02 cepas bacterianas. San Jose de Aymara. Periodo 2009-2010

Treatments	Description	Tubers yields in t ha <sup>-1</sup>				
		Unica	Yana Huancuy	Peruanita	Huamantanga	Yungay
T1	5 t manure ha <sup>-1</sup> + A1-45/08	16.70 a	14.31 a	19.29 a	17.29 a	19.22 a
T2	5 t manure ha <sup>-1</sup> + A2-18/08	13.11 b	17.63 a	18.19 ab	15.48 a	16.55 ab
T3	5 t manure ha <sup>-1</sup>	1.42 b	13.88 a	14.31 b	14.22 a	17.13 ab

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey p < 0.05).  
Promedio de cuatro repeticiones.



### 1.3.3 ACTIVIDAD 2.1: DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE MULTIPLICACIÓN MASIVA Y SU VALIDACIÓN.

#### **Objetivo de la actividad:**

- Evaluar e identificar el mejor método de multiplicación e inoculación de las cepas bacterianas.

#### **Indicadores de la actividad:**

- Determinación de curvas de crecimiento para cada género bacteriano.
- Ensayo de soportes a nivel de invernadero.

**Objetivo de la actividad:** Conocer la mejor manera de realizar la multiplicación e inoculación de microorganismos.

**Indicador de actividad:** Se evaluó el desarrollo en tres tipos de sustratos naturales a tres concentraciones distintas para la multiplicación de los microorganismos.

#### **Metodología:**

Se prepararon medios de cultivo en base a tres tipos de sustratos naturales (cebada; camote y papa) en tres concentraciones (10, 20, 30% - para cebada y 20, 40 y 60% - para papa y camote) suplementados con azúcar de mesa (1%) y se utilizaron para la multiplicación masiva de 4 géneros de PGPR (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*) utilizando un inóculo del 1% e incubando a 30 °C con agitación mecánica a 150 rpm durante 24 hrs para luego determinar la concentración celular alcanzada mediante el método de recuento en placa por incorporación. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorio conducido mediante un arreglo factorial 4 x 9 (géneros – sustrato) con tres repeticiones y un testigo (Caldo Soya – Tripticasa).

#### **Resultados y discusión:**

Se determinó la metodología para la preparación de los sustratos la cual consiste en: lavar el sustrato, pelar y picar (en el caso de papa y camote), pesar la cantidad necesaria, hervir en agua destilada para luego filtrar con gasa y distribuir en el volumen deseado, agregando el azúcar de mesa; finalmente esterilizar. El medio ya esterilizado debe ser almacenado y refrigerado (4°C).

Los microorganismos evaluados lograron su multiplicación en los sustratos naturales preparados, manteniéndose viables. Los resultados obtenidos indican que el inóculo bacteriano al 1% es suficiente para alcanzar la concentración de  $10^8$  UFC/mL con un tiempo de incubación de 24 horas, para todos los géneros de PGPR evaluados. El sustrato con el que se obtuvo mejores resultados fue cebada al 30%, con la mayor concentración celular alcanzada para 2 de los 3 géneros evaluados; mostrando además ventajas como la disponibilidad, facilidad y rapidez en la preparación.

En general todos los sustratos evaluados mostraron factibilidad de ser usados como reemplazo al medio de cultivo comercial, significando esto la disminución en los costos de producción; además, la concentración celular obtenida demuestra que las cepas evaluadas poseen capacidad de adaptación a un nuevo sustrato siendo esta característica fundamental y aprovechable para ampliación del espectro de cultivos blanco.

**Tabla 4.** Concentración celular alcanzada en 24 horas a 30 °C y 150 rpm (M1 = Cebada 10%; M2 = Cebada 20%; M3 = Cebada 30%; M4 = Camote 20%; M5 = Camote 40%; M6 = Camote 60%; M7 = Papa 20%; M8 = Papa 40%; M9 = Papa 60%; Testigo = Caldo Soya Tripticasa)

Bacteria (UFC/mL)		Sustratos									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	Testigo
<i>Bacillus pumilis</i>	Promedio	2.1E+08	1.1E+08	8.9E+07	9.8E+07	<b>8.0E+08</b>	3.0E+08	5.1E+08	4.4E+08	3.3E+08	4.1E+08
<i>Bacillus subtilis</i>	Promedio	1.1E+08	1.6E+08	<b>2.3E+08</b>	6.3E+07	<b>5.9E+08</b>	2.4E+08	1.8E+08	1.4E+08	1.7E+08	1.2E+08
<i>Pseudomonas</i>	Promedio	4.3E+08	4.2E+08	<b>6.4E+08</b>	3.2E+08	4.7E+08	4.4E+08	8.1E+08	5.6E+08	7.1E+08	3.5E+08

### 1.3.3 ACTIVIDAD 2.4: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOABONOS FERMENTADOS.

#### Objetivo de la actividad:

- Identificar los componentes activos de los bioles elaborados a partir de diferentes insumos y determinar su modo de acción.
- Mejorar la preparación de los abonos sólidos (compost) que manejan los agricultores en la sierra
- Evaluar la efectividad de los bioabonos fermentados sólidos y líquidos

#### Indicadores de la actividad:

- Bioabonos fermentados preparados
- Análisis físico y químico de los biabonos fermentados.
- Análisis de los rendimientos de los ensayos

#### Materiales y métodos

En el segundo año se instalaron bioles en tres localidades diferentes: Centro Internacional de la Papa (CIP)-Lima, CIP Santa Ana-Huancayo (3,200 msnm) y poblado de Ccasapata- Huancavelica (3,800 msnm), ver la Foto 6. Se seleccionaron los mejores tratamientos resultantes del primer año de evaluación. La selección se basó en los rendimientos obtenidos en el ámbito de invernadero y los análisis físico-químicos de los bioles. Con el objetivo de evaluar el proceso de preparación y el comportamiento de los bioles en condiciones ambientales de costa y sierra del Perú, los bioles del 1 al 6 fueron los que mejores resultados arrojaron el primer año (Tabla 6). El biol 7, tuvo melaza y urea para ver el comportamiento de los insumos en estas condiciones. El biol 8 se diferencia del 2 por la agitación manual, y fue instalado en Lima y Huancayo. A los bioles 9 y 10 se adicionaron nuevos insumos: el boro, la cáscara de huevo y la arcilla. Para evaluar la disponibilidad del boro en condiciones anaeróbica y ver el efecto en los rendimientos de los cultivos. Los bioles 11, 12 y 13 se diferencian de los bioles 3, 6 y 8 respectivamente debido al guano de gallina y se instaló solo en Lima. Los bioles 14 y 15 comprenden a nuevas formulas propios de los agricultores de Huancavelica. El tiempo de retención de los bioles fue de 6.5 meses para Huancayo y Huancavelica y de 5 meses en Lima. Se realizaron seis muestreos para Huancayo, tres para

Huancavelica y cinco para Lima. La instalación de los bioles fue similar al primer año, al igual que la evaluación de las variables físicas (pH, CE) y químicas (N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Fe, Mn, Cu, Zn y B). Para mejorar la preparación de los abonos sólidos se instalaron pilas de compost en el CIP-Huancayo durante el periodo del 6 junio al 6 noviembre 2010 y en la Comunidad de San José de Aymara-Huancavelica del 12 junio al 12 noviembre 2010 (Foto 7). Se seleccionaron los mejores tratamientos de compost de la zona de Lima y Huancayo preparados en la campaña 2009-2010 (primer año), la selección se baso en los rendimientos obtenidos a nivel de cobertor y los análisis físico-químicos. Los mejores resultados fueron los compost a base de llama y vacuno en proporción 2:1 estiércol: paja cebada (Tabla 7).



A

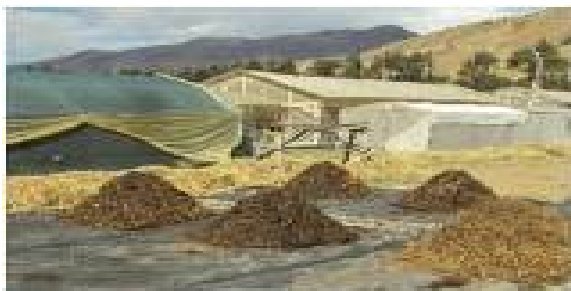


B



C

**Foto 6:** Diferentes tratamientos de bioles instalados a campo abierto. A: CIP-Lima (23 junio a 23 noviembre 2009); B: CIP-Huancayo (6 mayo a 6 septiembre 2009) y C: Comunidad de Ccasapata-Huancavelica (6 junio a 6 noviembre 2009)



A



B

**Foto 7:** Diferentes tratamientos de compost instalados en el segundo año. A: CIP-Huancayo (6 junio-6 noviembre 2010) y B: Comunidad San José de Aymara-Huancavelica (12 junio-12 noviembre 2010).

**Tabla 6:** Diferentes bioles preparados en el CIP-Lima (23 junio a 23 noviembre 2009), CIP-Huancayo (6 mayo a 6 septiembre 2009) y comunidad de Ccasapata-Huancavelica (6 junio a 6 noviembre 2009).

Ingredientes	Biodigestores (bioles)														
	Primer y segundo año						Segundo año								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C/N Lima	25	29	27	20	4	30	5	28	33	40	19	20	20	-	-
C/N Huancayo	22	26	26	40	4	40	4	26	29	46	-	-	-	-	-
C/N Huancavelica	21	36	37	41	4	37	-	-	30	33	-	-	-	30	27
Agua (L)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Estiércol (kg)*	15+5	15+5	15+5	20	20	15+15	15+5	15+5	15+5	15+5	20	30	20	15	20
Melaza (kg)		2.5	2.5	5	5	5	2.5	2.5	5	10	2.5	5	2.5	2.5	2.5
Leguminosa(kg)		1		1		2		1	2.5	2.5		2	1	3	2
Leche (L)		1.5	1.5			3		1.5	1.5	1.5	1.5	3	1.5	2	2
Ceniza (kg)		0.5	0.5	1	1			0.5	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5	1
Levadura (kg)		0.25	0.25	0.25	0.25	0.5		0.25	0.5		0.25	0.5	0.25	0.25	0.25
Nitrógeno (kg)					0.9		0.9								
Boro (kg)									0.15						
Cascara huevo (kg)									0.65	0.65					
Arcilla (Kg)									2	2					
Rumex de ovino (kg)														3	3
Sales minerales (kg)														1	1
Harina pescado (kg)															2.5

\*Bioles 1-6 son similares en las tres localidades (estiércol de vacuno); 7 y 8 en Lima y Huancayo (estiércol de vacuno); 9 y 10 en Lima (estiércol de vacuno) en Huancayo y Huancavelica (estiércol de cuy); 11, 12 y 13, en Lima (estiércol de gallina); 14 y 15 solo en Huancavelica (estiércol ovino)

\*\*A/m: agitación

El compost 1 es propio de los agricultores de la Sierra en donde se mezcla los estiércoles de diferentes especies de animales, residuos de cosecha, ceniza y restos de la cocina (Quispe, 2007). En este tratamiento se le agregó el manejo de las pilas y la frecuencia de volteos. El compost 2 fue a base de estiércol de llama y relación C/N de 16. El compost 3 fue a base de estiércol de llama y relación C/N de 36. El compost 4 fue con estiércol de vacuno y relación C/N de 34. Se inoculó 6 cepas diferentes de bacterias celulíticas para ver la capacidad degradativa en estas condiciones, las cepas fueron obtenidas del Laboratorio del Programa de Cultivo Integrado y Sistema de Investigación, Área de Suelo (Tabla 8). El compost 5 consistió de estiércol de vacuno y relación C/N de 34. Todas las pilas tuvieron un peso seco de 250 kg.

**Tabla 7:** Diferentes tratamientos de compost preparados en el CIP-Huancayo (6 junio-6 noviembre 2010) y la comunidad de San José de Aymara (12 junio-12 noviembre 2010), con residuos de cebada y ceniza con y sin nitrógeno

Tratamientos	Estiércoles	Estiércol seco kg	Paja cebada kg	Ceniza kg	urea kg	C/N
Compost 1	agricultor	250	-	12.5	-	20
Compost 2	llama	166.6	83	12.5	7.100	16
Compost 3	llama	166.6	83	12.5	-	36
Compost 4*	vacuno	166.6	83	12.5	-	34
Compost 5	vacuno	166.6	83	12.5	-	34

**Tabla 8:** Aplicación de bacterias lignocelulolíticas en los tratamientos de compost de Huancayo y Huancavelica.

Codigo CIP	Identificación	Propiedades
A1-19/08	<i>Actinomycetes</i>	Degradación de lignina, celulosa y almidón.
A1-31/08	<i>Actinomycetes</i>	Degradación de lignina, celulosa y almidón.
A1-37/08	<i>Actinomycetes</i>	Degradación de lignina, celulosa y almidón.
B1-21/06	<i>Bacillus subtilis</i>	Degradación de celulosa
B1-22/06	<i>Bacillus subtilis</i>	Degradación de celulosa

Los muestreos fueron realizados a los 55, 113 y 150 días después de la instalación en ambas localidades. La evaluación de las variables físicas (pH, CE) y químicas (% MO, N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Fe, Mn, Cu y Zn) fueron realizadas siguiendo la metodología del primer año.

Para la evaluación de la efectividad de los bioles se instalaron ensayos con los cultivos de espinaca, nabo, beterraga y lechuga a nivel de fitotoldos en la comunidad de Ccasapata-Huancavelica. El diseño fue un DBCA con 12 tratamientos y 4 repeticiones por tratamientos. Se probaron los bioles preparados en la comunidad (Tabla 6), comparados con dos testigos: control (sin aplicación) y fertilizantes químico foliar

grow more (20-20-20, NPK). La parcela elemental fue de 0.4 m<sup>2</sup> y el área por tratamiento de 1.6 m<sup>2</sup>, el marco de la plantación fue de 20 cm entre surco y 20 cm entre planta. Se realizaron ocho aplicaciones por cultivo, el inicio de la aplicación fue según el periodo fenológico. El gasto de la solución fue de 15 ml planta<sup>-1</sup>. La dosis de los tratamientos de bioles fue de 40% y del fertilizante químico foliar de 4 g L<sup>-1</sup>. El suelo en donde se realizó este ensayo es de tipo franco con un pH 6.23; CE: 1.06 dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>: 0.0%; MO: 7.85%; N: 0.27%, P: 43.6 ppm; K: 990 ppm (Foto 8).



A



B



C



D

**Foto 8:** Diferentes ensayos instalados en la comunidad de Ccasapata-Huancavelica para evaluar la efectividad de los bioles del 6 de junio al 6 de noviembre 2009. A: Fitotoldo familiar, B: Cultivo de nabo, C: Cultivo de espinaca y D: Cultivo de betarraga.

Para la evaluación de la efectividad de los compost se instalaron ensayos con el cultivo de papa cultivar Yungay a nivel de campo en la estación del CIP-Huancayo y la comunidad de San José de Aymara-Huancavelica (Foto 9). En ambas zonas el diseño fue un DBCA con trece tratamientos y tres repeticiones por tratamiento con arreglo factorial. Se probaron los cinco compost preparados (Tabla 8), a dos dosis (5 y 10 TM ha<sup>-1</sup>), comparados con un tratamiento control, un tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 + 10 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino y un tratamiento testigo 10 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol ovino. La parcela elemental consistió de 21 m<sup>2</sup> y el área por tratamiento fue de 63.3 m<sup>2</sup>. El distanciamiento de siembra fue de 100 cm entre surco y 35 cm entre plantas. El tipo de suelo en donde se realizó este ensayo en Huancayo es de tipo franco con un pH 7.38; CE: 0.53 dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>:2.00%; MO: 2.94%; N: 0.15%, P: 10.7 ppm; K: 117 ppm. En Huancavelica el suelo en donde se realizó este ensayo es considerado orgánico con un pH 4.46; CE: 0.20dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>:0.00%; MO: 14.88%; N: 0.57%, P: 30 ppm; K: 153 ppm. Por otro lado, se realizó un análisis de beneficio-costos en los dos ensayos siguiendo la metodología del presupuesto parcial (CIMMYT, 1988), en donde el precio de tubérculo comercial fue de 50 centimos de sol kg<sup>-1</sup> y del tubérculo no comercial de 20 centimos de sol kg<sup>-1</sup>.

Los datos fueron procesados sin transformar mediante el análisis de variancia (ANVA) y la prueba de comparación de medias de Duncan-Waller ( $\alpha = 0.05$ ). En todos los casos haciendo uso del el software SAS 9.1 (Stastitcal Analysis System).



**Foto 9:** Ensayo instalado en La victoria-Huancayo a nivel de campo para evaluar la efectividad de los diversos tipos de compost preparados el 6 junio al 6 noviembre 2010.

## Resultados y discusiones

### Evaluación de la preparación de los Bioles

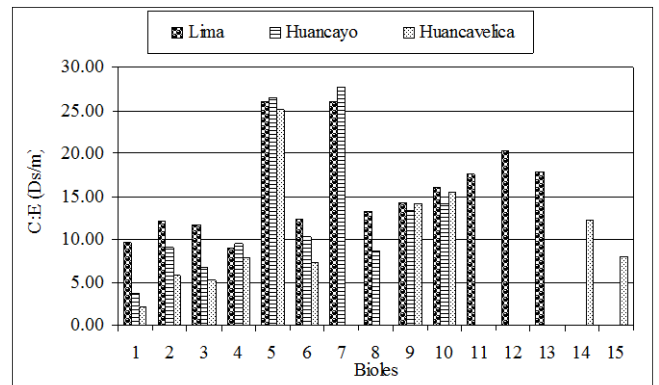
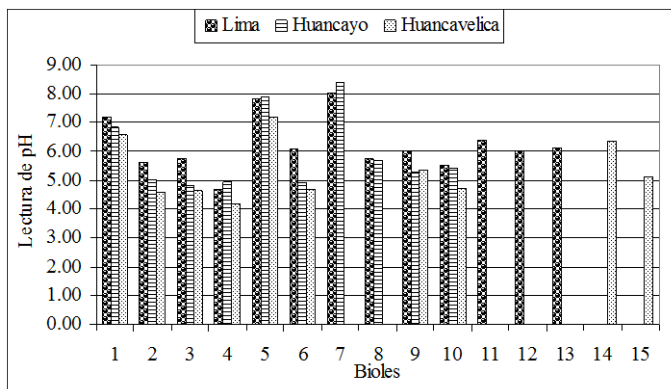
En la Figura 9 se observan los resultados obtenidos respecto a pH, CE, nitrógeno y fósforo totales de las tres zonas de estudio. Los bioles 1, 5 y 7 tuvieron pH entre 7.5 y 8.5 (básicos), el resto de los bioles tuvieron pH entre 4.5 y 6.8 (ácidos). La basicidad en los bioles se debió a la adición de la urea en los bioles 5 y 7; mientras en el biol 1 fue por el estiércol. La acidez en los bioles fue causada por la levadura, la leche y la melaza. La producción de biogás en el biol 1 fue solo en Lima, empezó en la semana once y tuvo una relación C/N de 25; mientras las dos zonas restantes no produjeron biogás. El biol 5 produjo biogás en Lima, mientras en Huancayo y Huancavelica no produjeron a pesar de tener relación C/N de 5 y pH entre 7.2 y 8.0; condiciones necesaria para la producción de biogás según el primer año de estudio. Este resultado se puede atribuir a las bajas temperaturas de la sierra, donde llega a tener diferencia de 20 °C entre el día y la noche; propiciando condiciones desfavorables para el desarrollo de los microorganismos que son sensibles a los cambios bruscos. El biol 7 produjo biogás en Lima, pero en Huancayo no produjo a pesar de tener la misma relación C/N. Los bioles 11, 12 y 13 de Lima a base de guano de gallina solo el 12, produjo biogás con relación C/N de 20 y pH de 6.0. La producción de biogás en el biol 12 puede haberse debido a la cantidad de insumos aplicados, siendo el doble que los bioles 11 y 13. El resto de los bioles 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 14 y 15 no produjeron biogás.

Los valores promedios más alto de la CE arrojaron los bioles 5 y 7 con 27 dS m<sup>-1</sup>, debido a la urea. Entonces la conductividad eléctrica se encuentra influenciada por el tipo de insumo ya que, bioles con formulas idénticas arrojaron resultados diferentes. En Lima el resto de los bioles tuvieron CE entre 10 y 20 dS m<sup>-1</sup>; esto se debió al estiércol que provenía de animales estabulados, en donde su alimentación fue a base de concentrado a diferencia de las otras zonas, donde el principal alimento lo constituye el forraje. Por lo tanto, se puede decir que además del tipo de insumo esta su calidad.

El contenido de nitrógeno más alto se observó en los bioles 5 y 7 de 7.9 a 9.4 g L<sup>-1</sup>, estos tuvieron relación C/N de 5 (Tabla 6). Debido a la urea agregada como fuente de nitrógeno inorgánico. Siguen los bioles 11, 12 y 13 a base de guano de gallina con valores de 3.5 a 5 g L<sup>-1</sup>, seguidos por los bioles 9 y 10 de 1.3 a 1.6 g L<sup>-1</sup>. El resto de los bioles arrojaron menos de 1.0 g L<sup>-1</sup>. En el primer año la cantidad de nitrógeno totales en los bioles a base de insumos orgánicos y estiércol de vacuno fue menor de 1.8 g L<sup>-1</sup>.

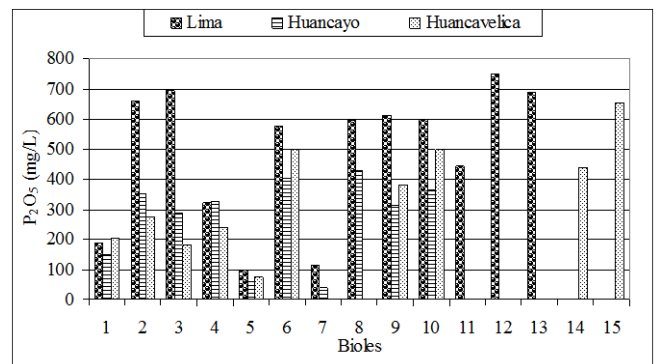
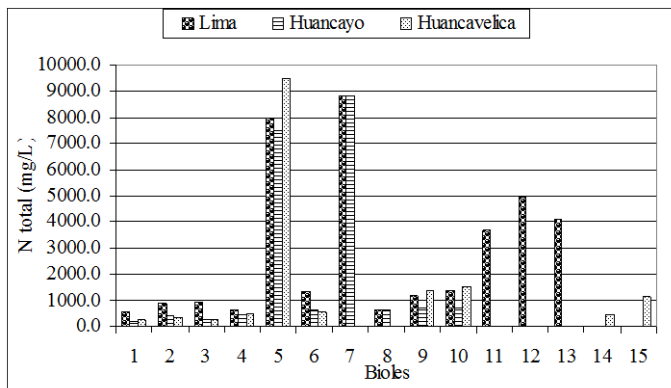
Estos resultados comparados con los fertilizantes foliares en el mercado es bajo. En este segundo año con insumos orgánicos y con estiércoles de cuy y ovino arrojaron resultados similares; pero en los bioles a base de guano de gallina tuvieron nitrógeno total de 5 g L-1.

Los contenidos de fósforo más bajo se observaron en los bioles 5 y 7 de 0.1 a 0.05 g L-1, ambos bioles tuvieron pH básicos. El biol 1 arrojó 0.2 g L-1 y su pH fue cercano a 7. Los bioles 2, 3, 6, 8, 9 y 10 arrojaron valores de 0.70 g L-1 y pH ácidos. En los bioles 11, 12 y 13 a base de guano de gallina fue de 0.75 g L-1 y pH ácidos. El biol 15, a base de estiércol de ovino, de la zona de Huancavelica tuvo 0.68 g L-1. Entonces se puede afirmar que el contenido de fósforo en los bioles se encuentra influenciado por el pH del medio, y este a su vez del tipo de insumo que se utilice.



A

B



C

D

**Figura 9:** Lectura de los análisis químicos. A: pH, B:CE, C:nitrógeno y D:fósforo, de los bioles preparados en el CIP-Lima (23 junio a 23 noviembre 2009), CIP-Huancayo (6 mayo a 6 septiembre 2009) y comunidad de Ccasapata-Huancavelica (6 junio a 6 noviembre 2009).

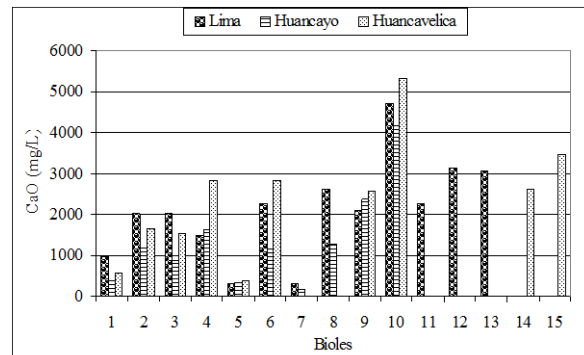
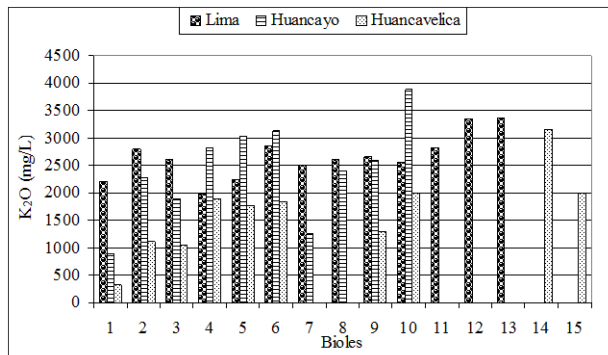
En la Figura 10 se observan los resultados respecto al contenido de potasio, calcio, magnesio y azufre totales en los bioles de las tres localidades. El contenido de potasio en el biol 1 arrojó entre 0.30 y 2.10 g L-1 siendo mayor en Lima, esto se debió al contenido de K en el estiércol de vacuno. Los bioles 2, 3, 7, 8 y 10 estuvieron entre 1.0 y 2.7 g L-1. El biol 4 de Huancayo arrojó el mayor contenido con 2.7 g L-1 debido a la ceniza incluida como insumo. Los bioles 11, 12 y 13 de guano de gallina de Lima arrojaron 3.0 g L-1. Los bioles 14 y 15 de Huancavelica arrojaron valores de 2.0 y 3.0 g L-1 respectivamente.



El contenido de calcio más bajo se observó en los bioles 1, 5 y 7 de 0.4 g L<sup>-1</sup> y pH básico. Los bioles 2, 3 y 8 tuvieron entre 0.9 y 2.8 g L<sup>-1</sup> siendo mayor en Lima. Los bioles 11, 12 y 13 a base de guano de gallina arrojaron valores de 2.2 a 3.2 g L<sup>-1</sup>. El biol 14 a base de estiércol de vacuno tuvo 2.5 g L<sup>-1</sup> y el biol 15 de estiércol de ovino tuvo un contenido de 3.2 g L<sup>-1</sup>.

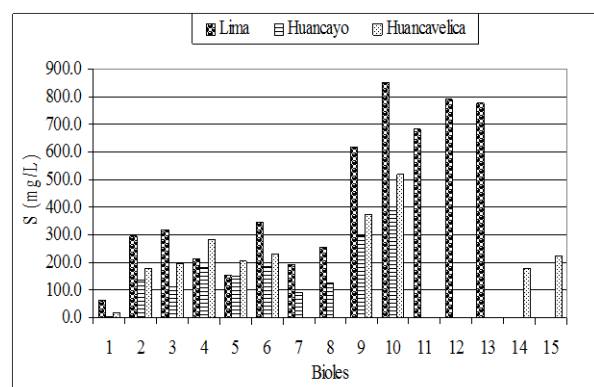
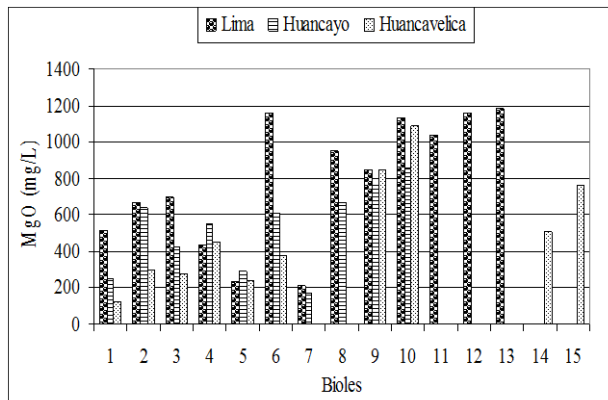
El contenido de magnesio más alto se observó en los bioles 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, con valores entre 0.8 y 1.2 g L<sup>-1</sup>, detrás los bioles 2, 3, 4, 14 y 15, con 0.4 a 0.8 g L<sup>-1</sup>. En estos dos grupos el pH fue ácido, cierran los bioles 1, 5 y 7 con 0.2 g L<sup>-1</sup> y pH básicos.

El contenido de azufre más bajo arrojó el biol 1 debido al estiércol de vacuno. Los bioles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 muestran resultados parecidos a diferencia de los bioles 9 y 10 donde se agregó la cáscara de huevo y la arcilla (Tabla 6), ocasionando un aumento del contenido de azufre. Los tratamientos 11, 12 y 13, fueron de guano de gallina y arrojaron resultados de 700 mg L<sup>-1</sup>. Los bioles 14 y 15 arrojaron en promedio 200 mg L<sup>-1</sup>.



A

B



C

D

**Figura 10:** Lectura de los análisis químicos. A: Potasio, B: calcio, C: magnesio y D: azufre de los bioles preparados en el CIP-Lima (23 junio a 23 noviembre 2009), CIP-Huancayo (6 mayo a 6 septiembre 2009) y comunidad de Ccasapata-Huancavelica (6 junio a 6 noviembre 2009).

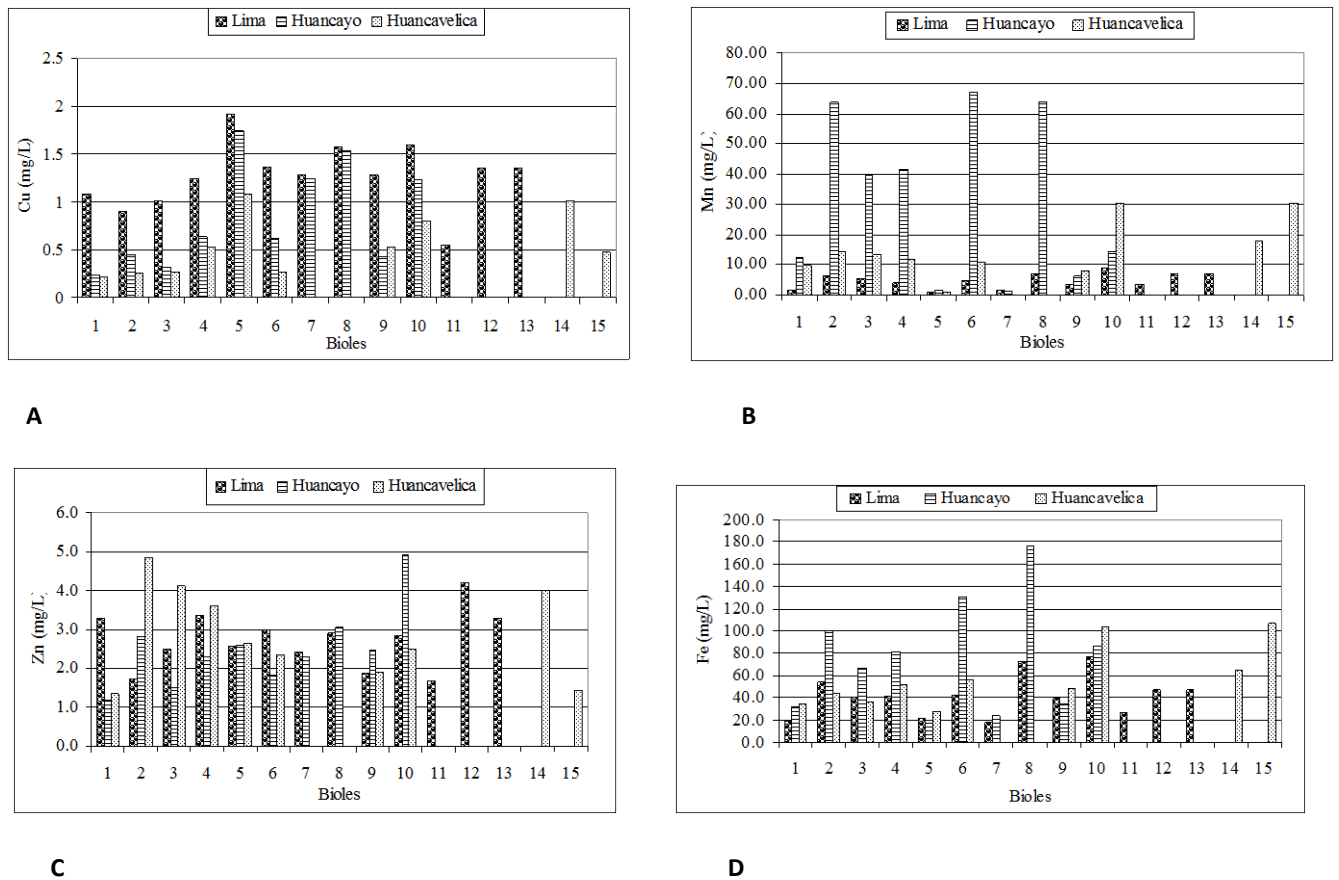
En la Figura 11 se muestra los resultados conseguidos de cobre, manganeso, zinc y hierro en los bioles de las tres zonas. El contenido de cobre más alto se observó en la zona de Lima, sigue Huancayo y termina Huancavelica. Esto se debe por el contenido de cobre en los insumos.

El contenido de manganeso más bajo se observó en los bioles 1, 5 y 7 menos de 10 mg L<sup>-1</sup> y pH básicos, mientras los bioles 2, 6 y 8 tuvieron valores promedio de 60 mg L<sup>-1</sup> siendo en la zona de Huancayo el más alto debido al estiércol y al pH ácido del medio. Los bioles 14 y 15 tuvieron entre 20 y 30 mg L<sup>-1</sup>.

El contenido de zinc más alto se observó en los bioles 1, 6 y 7 de la zona de Lima, debido al estiércol. Los bioles 2, 3, 4, y 5 tuvieron los contenidos más altos de Zn en la zona de Huancavelica de 2.5 a 5 mg L-1, esto se debe a la ceniza. Mientras los bioles 9 y 10 arrojaron los valores más alto en la zona de Huancayo de 2.5 mg L-1 a 5.0 mg L-1, debido al estiércol de cuy. Los bioles 11, 12 y 13 a base de guano de gallina de Lima estuvieron entre 2 y 4 mg L-1. Los bioles 14 y 15 de Huancavelica arrojaron entre 1.3 y 4 mg L-1.

El contenido de hierro más bajo se observaron en los bioles 1, 5 y 7 y pH básicos. Los bioles 2, 3, 4, 6, 7 y 8 a pesar de tener el mayor contenido de Fe en el estiércol de Lima, los resultados más altos fueron en la zona de Huancayo, debido al pH ácido. En los bioles 9 y 10 se observó entre 40 y 100 mg L-1, siendo los resultados más altos en la zona de Huancavelica por el contenido de este micro-elemento en el estiércol de cuy. Los bioles 11, 12 y 13 de guano de gallina de la zona de Lima tuvieron contenidos promedios de 40 mg L-1. Los bioles 14 y 15 tuvieron entre 60 y 100 mg L-1.

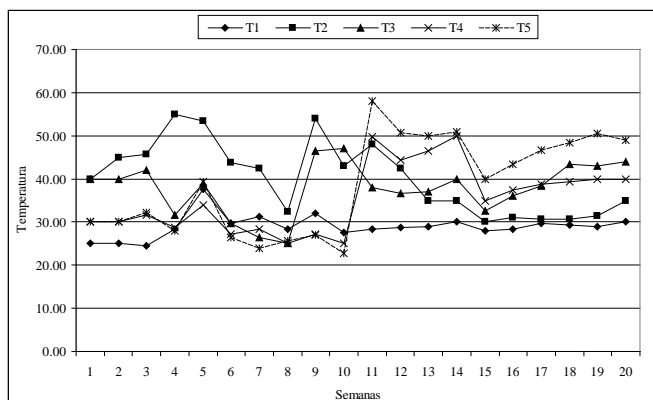
Resumiendo el contenido de los micronutrientes observados en los bioles es bajo comparado con los fertilizantes químicos foliares. Por ejemplo el peters tiene 20 g L-1 de N, 20 g L-1 de P2O5 y 20 g L-1 de K2O; pero los bioles además de aportar los macronutrientes contribuyen con otros compuestos como vitaminas, ácidos de cadenas cortas, aminoácidos, fitohormonas y micronutrientes.



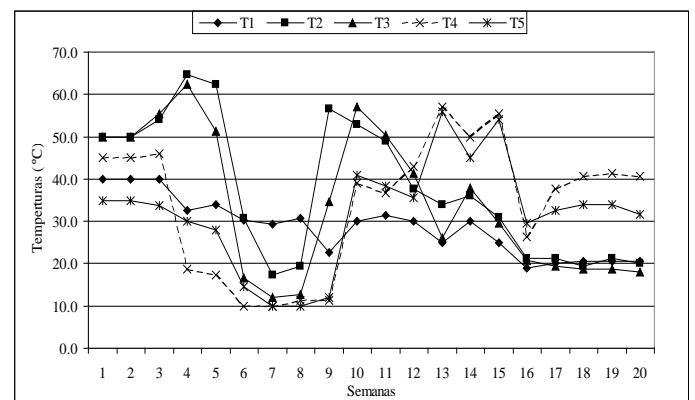
**Figura 11:** Lectura de los análisis químicos. A: cobre, B: manganeso, C: zinc y D: hierro de los bioles preparados en el CIP-Lima (23 junio a 23 noviembre 2009), CIP-Huancayo (6 mayo a 6 septiembre 2009) y comunidad de Ccasapata-Huancavelica (6 junio a 6 noviembre 2009).

### Evaluación de la preparación de los compost

En la Figura 12 se aprecia las temperaturas de las pilas de compost de las dos localidades. En Huancayo El compost 1 a base de mezcla de estiércoles de vacuno, gallina, asno y cuy; propios de los agricultores y relación C/N de 20, alcanzó temperatura de 47°C por un tiempo de cinco semana. En el compost 2 de estiércol de llama y relación C/N de 16, la temperatura llegó a 55 °C por cinco semanas. El compost 3 de estiércol de llama y relación C/N de 36, alcanzó temperatura de 45 °C por ocho semanas. En las pilas de compost de estiércol de vacuno e inoculados con microorganismos, la temperatura llegó a 50 °C por ocho semanas. El compost 5 de estiércol de vacuno y relación C/N de 34 alcanzó una temperatura de 58 °C. En San José de Aymara-Huancavelica, el compost 1 propios de los agricultores y relación C/N de 20, la temperatura fue de 40 °C por tres semanas. El compost 2 de estiércol de llama y relación C/N de 16 alcanzó temperatura de 65 °C por cuatro semanas. El compost 3 de estiércol de llama y relación C/N de 36, la temperatura fue de 60 °C por cuatro semanas. El compost 4 de estiércol de vacuno e inoculado con mezcla de microorganismos alcanzó la temperatura de 55 °C por tres semanas. El compost 5 de estiércol de vacuno y relación C/N de 34, la temperatura fue de 55 °C por dos semana. En ambas localidades el compost 2, alcanzó la temperatura más alta, seguido por los compost 5 de Huancayo y 3 de Huancavelica. Este resultado se puede deber a que el compost 2 tuvo la relación C/N de 16, siendo la más baja de todas las pilas. Los resultados registrados fueron superiores a los reportados por Chilon (2010) quien produjo compost en la zona del altiplano a base de restos orgánicos, paja de cereales, estiércol, ceniza, agua, leche, yogurt, quinua y levadura. En donde la máxima alcanzada fue de 45 °C. Por otro lado, con los niveles de temperatura alcanzadas por los diferentes compost en los dos año de investigación, se puede afirmar que hubo degradación de la materia orgánica (Miller, 1993; Rynk 1992, Szterm y Pravia, 1999). Excepto en los compost a base de guano de pollo de la zona de Huancayo del primer año.



A



B

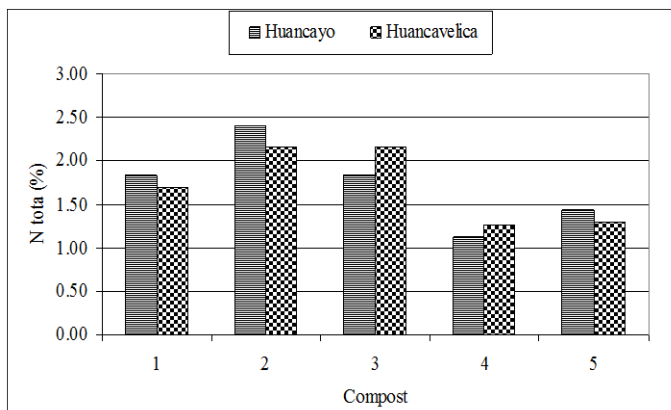
**Figura 12:** Lectura de la temperatura en los compost preparados en: A: CIP-Huancayo (6 junio-6 noviembre 2010) y B: Comunidad San José de Aymará (12 junio-12 noviembre 2010).

En la Figura 13 se observa los resultados de los análisis de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio en las pilas de compost de las dos localidades. El contenido de nitrógeno más alto se observó en los compost 2 y 3 a partir de estiércol de llama de 1.8% a 2.4%, seguido por el compost 1 propios de los agricultores de 1.7% a 1.8%, y los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 1.2% a 1.4%. Por otro lado, se reporta resultados similares de 1.4 % a base de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales, et. al., 1998), de 1.4% a 1.6% a base de residuos de café y estiércol de ovino (Pierre et. al., 2009), de 2.0% a base de un compost tipo FIO (Cerrato, et. al., 2007), de 0.9% a 1.1% a base de residuos de banano, vástago y aserrín (Henao, 2002), de 1.10% a 1.46%, con estiércol de vacuno y resto vegetales (Fening, et. al., 2010).

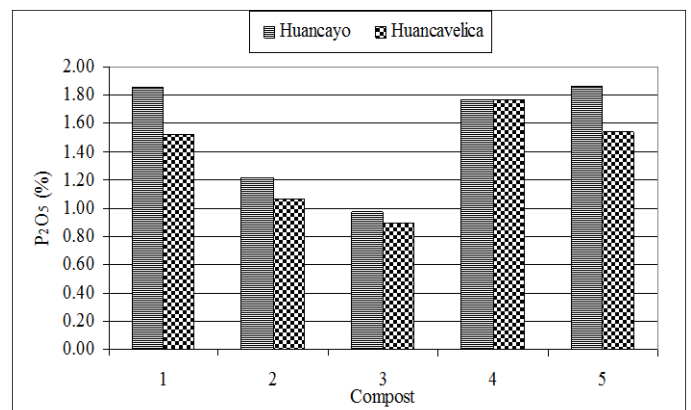
El contenido de fósforo más alto lo tuvieron los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 1.56% a 1.80%, sigue el compost 1 propios de los agricultores de 1.50% a 1.80%, cierran los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 0.90% a 1.20%. Coincidiendo con los resultados de 1.48 % a base de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales, et. al., 1998), de 1.08 % con residuo de champiñon y gallinaza (Romero, et. al., 2000). Pero superiores a los valores de 0.4% a 0.6% a base de residuos de banano y aserrín (Henao 2002), de 0.41% a 0.51% a base de residuos de café y estiércol de ovino (Pierre et. al., 2009), de 0.5 % con un compost tipo FIO (Cerrato, et. al., 2007), de 0.28% a 0.31% con estiércol de vacuno y resto vegetales (Fening, et. al., 2010) y de 0.15% elaborado con residuos hortofrutícola (Sánchez del Pinto et. al., 2011).

El contenido de potasio más alto lo tuvieron los compost 4 y 5 a base de estiércol de vacuno de 2.60% a 3.10%, seguido del compost 1 propios de los agricultores de 2.0% a 2.35%, finalmente los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 1.60% a 1.80%. Coincidiendo con los valores de 2.5% a 3.0% a base de residuos de banano, vástago y aserrín (Henao, 2002), de 2.1% compost tipo FIO (Cerrato et. al., 2007), de 1.32% elaborado con residuos hortofrutícola (Sánchez del Pinto et. al., 2011), de 1.26% a 0.68% con estiércol de vacuno y resto vegetales (Fening et. al., 2010) y de 2.47% de residuo de Champiñon y gallinaza (Romero et. al., 2000). Pero superiores a los valores de 0.71%, a base de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales, et. al., 1998) y de 0.7% a 0.8% a base de residuos de café y estiércol de ovino (Pierre et. al., 2009).

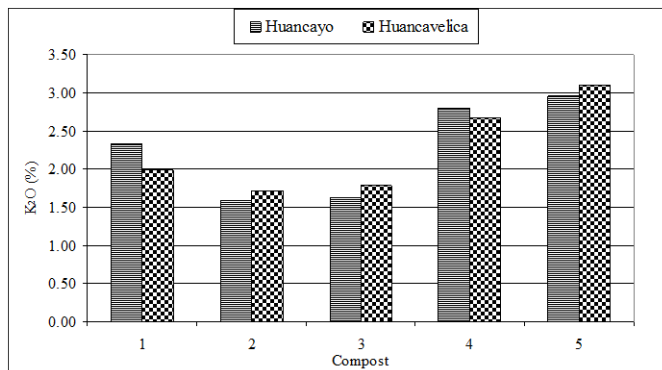
El contenido de calcio más alto lo tuvieron los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 4.30% a 5.20%, sigue el compost 1 propios de los agricultores de 4.30% a 4.40%, cierran los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 2.40% a 2.60%. Los resultados coinciden con los valores de 3.79% a base de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales et al., 1998), de 2.4% elaborado con residuos hortofrutícola (Sánchez del Pinto, 2011), de 3.5% a 4.2% a base de residuos de café y estiércol de ovino (Pierre et al., 2009). Pero superiores a los valores de 0.45% a 0.62% con estiércol de vacuno y resto vegetales (Fening et al., 2010) y de 1.5 % con un compost tipo FIO (Cerrato et al., 2007).



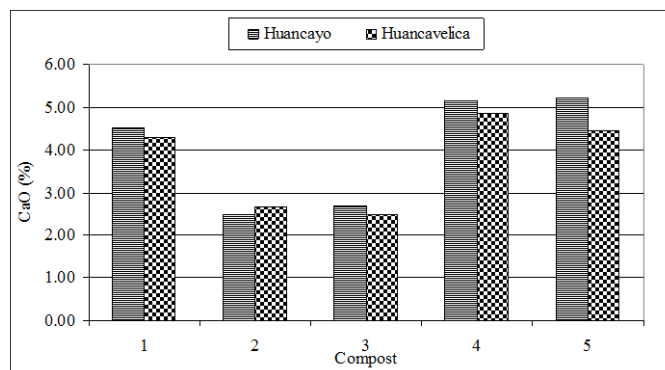
**A**



**B**



C



D

**Figura 13:** Lectura de los análisis químicos. A: nitrógeno, B: fósforo, C: potasio y D: calcio de los compost preparados en el CIP-Huancayo (6 junio-6 noviembre 2010) y Comunidad San José de Aymará (12 junio-12 noviembre 2010).

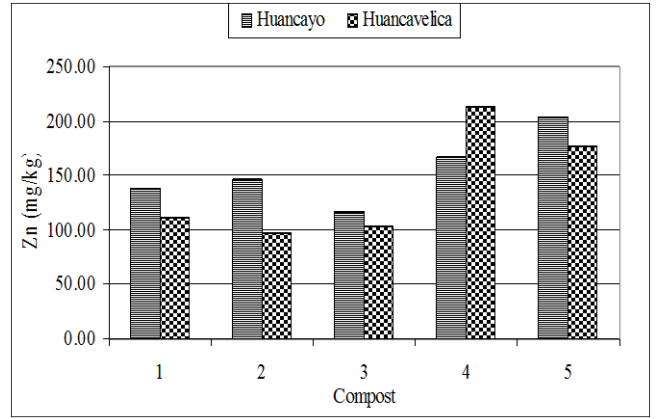
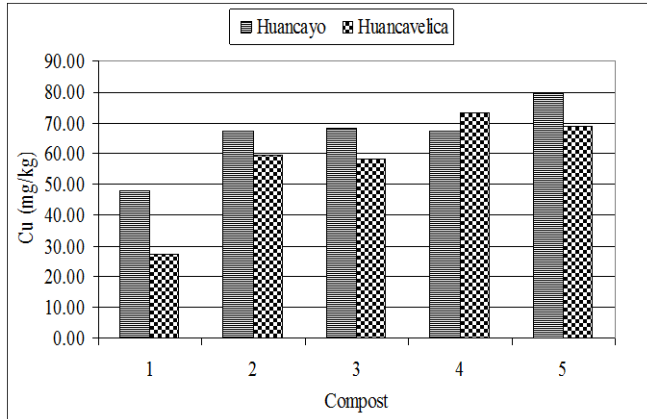
En la Figura 14 se observa los resultados de los análisis de cobre, manganeso, zinc y hierro en las pilas de compost de las localidades de Huancayo y Huancavelica. El contenido de cobre más alto se observó en los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 70 a 80 mg kg<sup>-1</sup>, seguido de los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 60 a 69 mg kg<sup>-1</sup>, y el compost 1 propios de los agricultores de 30 a 48 mg kg<sup>-1</sup>. Estos resultados son parecidos a los valores de 55 mg kg<sup>-1</sup> a base de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales et al., 1998). Pero superiores a los resultados de 16 a 19 mg kg<sup>-1</sup> con residuos de café y estiércol de ovino (Pierre et al., 2009), de 26 mg kg<sup>-1</sup> con un compost tipo FIO (Cerrato et al., 2007), y de 27 mg kg<sup>-1</sup> a base de estiércol de vacuno (Speranzini, 2007).

El contenido de zinc más alto lo tuvieron los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 150 a 220 mg kg<sup>-1</sup>, seguido de los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 100 a 149 mg kg<sup>-1</sup>, y el compost 1 propios de los agricultores de 100 a 140 mg kg<sup>-1</sup>. Coincidiendo con Gonzales et al., (1998) de 221 mg kg<sup>-1</sup> a base de estiércol de caballo y gallinaza, Cerrato et al., (2007) de 177 mg kg<sup>-1</sup> de un compost tipo FIO. En cambio, Pierre et al., (2009), Speranzini (2007) y Ravindran et al., (2007) reportaron valores inferiores a 59 mg kg<sup>-1</sup> de un compost a base de residuos de café y estiércol de ovino y vacuno.

El contenido de manganeso más alto se observó en el compost 1 propios de los agricultores de 1,000 a 1,600 mg kg<sup>-1</sup>, seguido de los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 1,200 mg kg<sup>-1</sup>, y los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 400 a 600 mg kg<sup>-1</sup>. Estos resultados son parecidos a los valores de 557 mg kg<sup>-1</sup> de un compost tipo FIO (Cerrato et al., 2007), de 415 mg kg<sup>-1</sup> con guano de aves de corral (Speranzini, 2007). En cambio, Gonzales et al., (1998) obtuvo datos superiores de 11,380 mg kg<sup>-1</sup> a base de estiércol de caballo y gallinaza. Mientras, Pierre et al., (2009) y Ravindran et al., (2007) consiguieron resultados inferiores de 194 mg kg<sup>-1</sup> con residuos de café y estiércol de ovino.

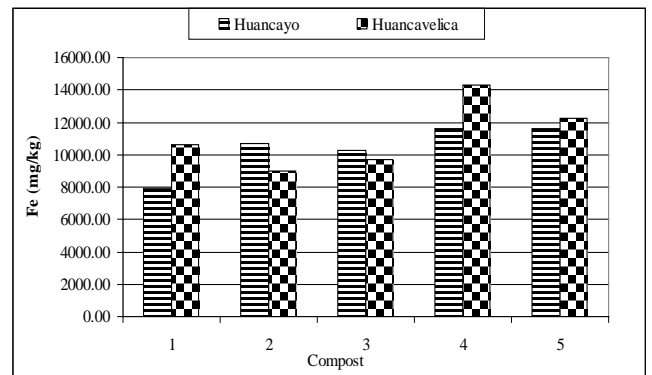
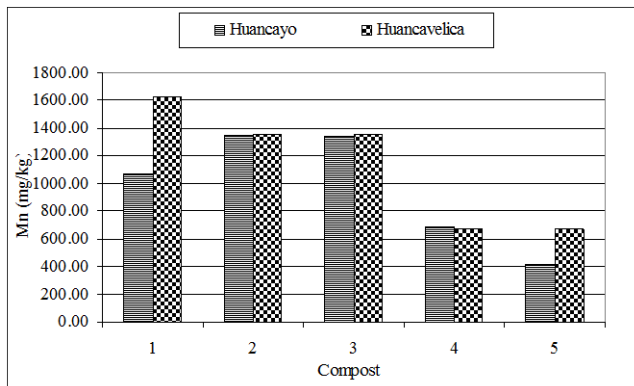
El contenido de hierro más alto lo tuvieron los compost 4 y 5 de estiércol de vacuno de 1,200 a 1,400 mg kg<sup>-1</sup>, seguido de los compost 2 y 3 de estiércol de llama de 850 a 1,000 mg kg<sup>-1</sup>, finalmente el compost 1 propios de los agricultores de 800 a 1,000 mg kg<sup>-1</sup>. Estos resultados son parecidos con los de Speranzini (2007) de 2,115 mg kg<sup>-1</sup> a base de estiércol de vacuno. Pero menores a los valores de 72,329 mg kg<sup>-1</sup> de estiércol de caballo y gallinaza (Gonzales et al., 1998), de 4,300 mg kg<sup>-1</sup> de residuo de café y estiércol de ovino (Pierre et al., 2009), de 9,200 mg kg<sup>-1</sup> de un compost tipo FIO (Cerrato et al., 2007), y de 10,733 mg kg<sup>-1</sup> a base de residuos vegetal, estiércol de vacuno (Ravindran et al., 2007).

Entonces el contenido de los nutrientes en el compost se encuentra influenciado del tipo de insumo que se utilice en la preparación, por lo tanto según los resultados el mejor insumo fue el estiércol de vacuno.



A

B



C

D

**Figura 14:** Lectura de los análisis químicos. A: cobre, B: manganeso, C: zinc y D: hierro de los compost preparados en el CIP-Huancayo (.6 junio-6 noviembre 2010) y Comunidad San José de Aymará-Huancavelica (12 junio-12 noviembre 2010).

### Evaluación de la efectividad de los bioles y compost

Los resultados de la evaluación de la efectividad de los bioles se observan en la Tabla 9, mostrando los rendimientos obtenidos en peso fresco de los cultivos de espinaca, nabo, betarraga y lechuga de la zona de Huancavelica a nivel de fitotoldo familiar.

Los resultados referidos a espinaca muestran evidencia para afirmar que al menos un tratamiento es diferente estadísticamente hablando. El tratamiento testigo de fertilización química foliar fue superior al resto de los tratamientos de los bioles y al tratamiento control; siguen en orden de prioridad el tratamiento de biol 1, el cual muestra resultados estadísticamente diferente a los demás bioles, detrás el tratamiento de biol 4, seguido por los tratamientos de los bioles 15 y 9, luego el control y el tratamiento de biol 5, cierran los tratamientos de los bioles 10, 3, 6, 14 y 2. Por otro lado, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación ( $R^2$ ) con el rendimiento en las variables de: pH: 0.40; CE: 0.11; N: 0.05; P: -0.13; K: 0.01; Ca: -0.17; S: -0.1; Mg: 0.00; Na: 0.10; Cu: -0.13; Zn: -0.69; Mn: -0.11; Fe: -0.03; B: 0.21. Según los resultados, no existe correlación alguna entre contenido de nutrientes y el rendimiento.

En el cultivo de nabo, los mejores resultados se observaron en el tratamiento del biol 14 y el tratamiento químico foliar, detrás los tratamientos de los bioles 4, 5 y 1, continúan los tratamientos de los bioles 6, 2 y 9; finalizan el tratamiento de los bioles 3, el tratamiento control y los tratamientos de los bioles 15 y 10. Por otro parte, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento en las variables de: pH: 0.38; CE: 0.03; N: 0.32; P:-0.65; K:-0.07; Ca:-0.62; S: -0.33; Mg:-0.58; Na: -0.34; Cu:-0.21; Zn: -0.09; Mn:-0.72; Fe:-0.73; B: 0.12. Según los resultados no existe correlación entre los nutrientes y el rendimiento.

En el cultivo betarraga, los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos de los bioles 14, 1, 5 y el tratamiento químico foliar, detrás el tratamiento control y los tratamientos de los bioles 10, 4, 6, 15 y 2, cierran los tratamientos de los bioles 9 y 3. Por otra parte, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento en las variables de: pH: 0.61; CE: 0.35; N: 0.29; P:-0.04; K:-0.36; Ca: 0.13; S: 0.37; Mg: 0.36; Na: 0.38; Cu: 0.13; Zn: -0.66; Mn: -0.11; Fe: 0.07; B: 0.43. Según los resultados no existe correlación entre los contenidos de nutrientes y el rendimiento.

En el cultivo de lechuga, el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento químico foliar, siguen los tratamientos de los bioles 6, 10 y el tratamiento control, detrás los tratamientos de los bioles 1 y 15, cierran los tratamientos de los bioles 9, 4, 3, 2, 14 y 5. Por otro lado, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R2) entre el rendimiento y las variables de: pH: -0.07; CE: -0.26; N:-0.27; P: 0.47; K:-0.05; Ca: 0.39; S: 0.14; Mg: 0.23; Na:-0.09; Cu:-0.32; Zn: -0.61; Mn: 0.32; Fe: 0.39; B:-0.14. Según los resultados no existe correlación entre los contenidos de nutrientes y el rendimiento.

Resumiendo los resultados obtenidos en el análisis de correlación entre los nutrientes en los bioles y los rendimientos en los cultivos de espinaca, nabo, betarraga y lechuga no se encontró correlación alguna. Aparentemente existen otros tipos de compuestos en los bioles que están influenciados en los resultados (vitaminas, aminoácidos, ácidos de cadenas cortas y fitohormonas).

En la tabla 10 se observan los resultados a nivel de campo de la evaluación de la efectividad del compost en la variable de peso fresco de tubérculo totales en el cultivo de papa cultivar Yungay en dos localidades. En Huancayo los rendimientos más alto respecto a peso de tubérculo total fue el tratamiento de compost 1 de dosis 10 TM ha<sup>-1</sup>, el cual superó al tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 + 10 TM ha<sup>-1</sup> estiércol de ovino en 1.36 TM ha<sup>-1</sup> de peso fresco de tubérculos al tratamiento testigo de estiércol de ovino de 10 TM ha<sup>-1</sup> en 6.22 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control (efecto del suelo) en 26.34 TM ha<sup>-1</sup>. Por otro lado, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento de tubérculos totales en las variables de: MO: -0.31; pH: 0.11; CE: 0.52; N:-0.10; P: 0.62; K: 0.57; Ca: 0.49; S: 0.24; Mg: 0.39; Na: 0.34; Cu: 0.40; Zn: 0.88; Mn: -0.66; Fe: 0.31; B:-0.34. Según los resultados no existe correlación entre los nutrientes y los rendimientos. A excepción del contenido de zinc donde existe correlación directa significativa. En Huancavelica, el rendimiento más alto en peso de tubérculos fresco totales se observó en el tratamiento con fertilización de NPK 120-120-120 + 10 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino, el cual superó al tratamiento de compost 2 de dosis 10 TM ha<sup>-1</sup> en 8.14 TM ha<sup>-1</sup> de peso fresco de tubérculos al tratamiento testigo de 10 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino en 14.68 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 36.1 TM ha<sup>-1</sup>. Por otro lado, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R2) con el rendimiento de los tubérculos totales en las variables de: MO: -0.62; pH: 0.70; C:E: 0.92; N:-0.66; P:0.88; K:0.77; Ca:0.81; S: 0.22; Mg:0.78; Na: 0.80; Cu:0.58; Zn: 0.96; Mn: -0.74; Fe:0.94; B:-0.60. Según los resultados existe correlación directa entre el rendimiento y los nutrientes fósforo, calcio, sodio, zinc y hierro. Este resultado en donde se observa un efecto positivo de los nutrientes aportados por el compost puede deberse al pH de 4.2 del suelo en donde se realizó el ensayo, condición para que los nutrientes fósforo, calcio, magnesio, zinc y hierro del suelo no se encuentren disponible para el cultivo. Entonces el compost por tener pH básico funciona como un abono y un mejorador del suelo.

Para la evaluación de los tipos de compost en la tabla 11 se observa los resultados en las variables de peso fresco de tubérculos totales y comerciales del cultivo de la papa. En la zona de Huancayo fue el compost 5 a base de estiércol de vacuno y en la zona de San José de Aymara fue el compost 4 a base de estiércol de vacuno y mezcla de bacterias. Esto se debe a que los compost a base de estiércol de vacuno fueron los que reportaron los mayores contenidos de macro y micronutrientes, y en la zona de San José de Aymara a 4000 msnm, las bacterias influenciaron la descomposición de la materia orgánica.



**Tabla 9:** Rendimiento promedio en el cultivo de betarraga, espinaca, nabo y lechuga a nivel de fitotoldo familiar provenientes de los bioles preparados del 6 junio al 16 de diciembre 2009, en la comunidad de Ccasapata-Huancavelica.

Prioridad	Espinaca		Nabo		Betarraga		Lechuga	
	rendimiento (kg/m <sup>2</sup> )	tratamiento	rendimiento (kg/m <sup>2</sup> )	tratamiento	rendimiento (kg/m <sup>2</sup> )	tratamiento	rendimiento (kg/m <sup>2</sup> )	tratamiento
1	3.18 a	Químico foliar.	2.35 a	Biol 14	3.6428 a	Bio 14	3.3759 a	Quimico foliar.
2	2.15 b	Biol 1	1.92 ba	Quimico foliar.	3.6159 a	Biol 1	2.3969 b	Biol 6
3	1.61 cb	Biol 4	1.58 bc	Biol 4	3.4406 a	Biol 5	2.2505 b	Control
4	1.48 cd	Biol 15	1.58 bc	Biol 5	3.1047 a	Químico foliar	2.1625 b	Biol 10
5	1.45 cd	Biol 9	1.51 bc	Biol 1	2.9313 a	Biol 10	2.1063 cb	Biol 1
6	1.16 cde	Control	1.30 c	Biol 6	2.4269 ba	Control	1.5350 cd	Biol 15
7	1.15 cde	Biol 5	1.29 c	Biol 2	2.3589 ba	Biol 4	1.1349 ed	Biol 9
8	0.97 fde	Biol 10	1.25 c	Biol 9	1.9563 ba	Biol 6	1.0463 ed	Biol 4
9	0.66 fe	Biol 3	0.77 d	Biol 3	1.9354 ba	Biol 15	0.8938 ed	Biol 3
10	0.60 fe	Biol 6	0.71 d	Control	1.7366 ba	Biol 2	0.8813 ed	Biol 2
11	0.58 fe	Biol 14	0.58 d	Biol 15	0.9969 b	Biol 9	0.8786 ed	Biol 14
12	0.48 f	Biol 2	0.57 d	Boil 10	0.6427 b	Biol 3	0.8375 e	Biol 5

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas (Waller,  $\alpha = 0.05$ )

**Tabla 10:** Rendimiento promedio del cultivo de papa en la variable de peso fresco de tubérculos a nivel de campo provenientes de los compost preparados del 6 junio al 6 de noviembre 2010 en Huancayo y del 12 junio al 12 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara-Huancavelica.

Peso de tubérculos fresco totales en Huancayo		Peso de tubérculos fresco comerciales en Huancavelica	
TM ha <sup>-1</sup>	Tratamiento	TM ha <sup>-1</sup>	Tratamientos
51.018 a	Compost 1 10TM ha <sup>-1</sup>	41.06 a	(120-120-120, NPK) +10 TM ha <sup>-1</sup> estiércol de ovino
49.815 ba	Compost 2 10TM ha <sup>-1</sup>	32.92 b	Compost 2 10TM ha <sup>-1</sup>
49.756 ba	Compost 5 10TM ha <sup>-1</sup>	31.27 cb	Compost 4 10TM ha <sup>-1</sup>
48.911 ba	(120-120-120, NPK) + 10 TM ha <sup>-1</sup> Estiércol de ovino	29.70 cbd	Compost 1 10TM ha <sup>-1</sup>
46.637 ba	Compost 5 5TM ha <sup>-1</sup>	29.11 cbd	Compost 5 10TM ha <sup>-1</sup>
46.006 ba	Compost 4 10TM ha <sup>-1</sup>	27.75 cebd	Compost 3 10TM ha <sup>-1</sup>
44.798 bc	Estiércol 10 TM ha <sup>-1</sup>	26.48 cefd	Compost 4 5TM ha <sup>-1</sup>
43.851 bc	Compost 3 10TM ha <sup>-1</sup>	26.38 cefd	10 TM ha <sup>-1</sup> estiércol ovino
39.554 bc	Compost 4 5TM ha <sup>-1</sup>	25.53 efd	Compost 5 5TM ha <sup>-1</sup>
39.417 dc	Compost 2 5TM ha <sup>-1</sup>	22.53 gfd	Compost 3 5TM ha <sup>-1</sup>
35.655 d	Compost 1 5TM ha <sup>-1</sup>	22.16 gfd	Compost 1 5TM ha <sup>-1</sup>
35.119 d	Compost3 5 TM ha <sup>-1</sup>	18.96 g	Compost 2 5TM ha <sup>-1</sup>
24.658 e	Control	4.96 h	Control

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas (Waller,  $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 11:** Rendimiento promedio del cultivo de papa a nivel de campo de cinco tratamientos de compost preparados del 6 junio al 6 de noviembre 2010, en la estación la Victoria-Huancayo y del 12 junio al 12 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara-Huancavelica.

Peso de tubérculos fresco totales		Peso de tubérculos fresco comerciales		Peso de tubérculos fresco totales		Peso de tubérculos fresco comerciales	
TM ha <sup>-1</sup>	Tipos de compost	TM ha <sup>-1</sup>	Tipos de compost	TM ha <sup>-1</sup>	Tipos de compost	TM ha <sup>-1</sup>	Tipos de compost
48.20 a	compost5	36.99 a	compost5	28.87 a	compost4	17.89 a	compost4
44.62 ba	compost2	34.87 ba	compost2	27.32 ba	compost5	17.53 a	compost5
43.34 bc	compost1	33.80 ba	compost1	25.94 b	compost2	15.35 b	compost2
42.78 bc	compost4	31.19 bc	compost4	25.93 b	compost1	15.31 b	compost3
39.49 c	compost3	29.01 c	compost3	25.14 b	compost3	15.11 b	compost1

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas (Waller,  $\alpha = 0.05$ ).

En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos a nivel de campo en la variable de peso fresco de tubérculos totales y comerciales, en dos dosis, en ambas zonas la dosis de 10 TM ha<sup>-1</sup> supera estadística a la dosis de 5 TM ha<sup>-1</sup>.

**Tabla 12** : Rendimiento promedio del cultivo de papa evaluados a dos dosis en la variable peso fresco de tubérculos totales y comerciales obtenidos a nivel de campo provenientes de los compost preparados del 6 junio al 6 de noviembre 2010 en Huancayo y del 12 junio al 12 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara-Huancavelica.

Peso de tubérculos totales en Huancayo		Peso de tubérculos comerciales en Huancayo		Peso de tubérculos totales en Huancavelica		Peso de tubérculos comerciales en Huancavelica	
TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	Dosis
48.089 <b>a</b>	10 TM	36.471 <b>a</b>	10 TM	30.15 <b>a</b>	10 TM	18.85 <b>a</b>	10 TM
39.276 <b>b</b>	5 TM	29.880 <b>b</b>	5 TM	23.13 <b>b</b>	5 TM	13.62 <b>b</b>	5 TM

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas (Waller,  $\alpha = 0.05$ ).

En las tablas 13 y 14 se observa el análisis de beneficio costo de los compost instalados en dos localidades. En Huancayo en el cultivo de papa el mayor beneficio-costo se consigue con el compost 1, seguido por el compost 5, más atrás el compost 3 y 4, cierran el compost 2 y el tratamiento testigo. En la zona de Aymara-Huancavelica el compost que arrojó el más alto valor de beneficio-costo fue el compost 1, seguido por el compost 5 y el tratamiento testigo, más atrás los compost 3 y 4, cierra el compost 2.

**Tabla 13:** Evaluación del presupuesto parcial en el ensayo de papa a nivel de campo provenientes de los compost preparados del 6 de junio al 6 de noviembre 2010, en la zona de Huancayo

	T1 5TM	T1 10TM	T2 5TM	T2 10TM	T3 5TM	T3 10TM	T4 5TM	T4 10TM	T5 5TM	T5 10TM	Testigo	Control
1.Rendimiento kg ha <sup>-1</sup>	35,530	50,720	39,244	49,548	35,899	43,762	38,916	45,559	46,280	49,375	47,012	24,583
2.Beneficio bruto S/ ha <sup>-1</sup>	15,145	22,389	17,113	21,570	14,710	18,426	16,754	18,881	20,094	21,234	20,347	9,474
2.1 Beneficio tubérculo comercial S/ ha <sup>-1</sup>	13,399	20,408	15,441	19,435	12,890	16,122	14,908	16,283	18,063	18,932	18241	7,595
2.2 Beneficio tubérculo no comercial S/ ha <sup>-1</sup>	1,746	1,981	1,673	2,136	1,820	2,304	1,846	2,599	2,031	2,302	2,106	1,879
3. Costo fertilizante edáfico S/ ha <sup>-1</sup>											1175	
4.Costo estiércol S/ ha <sup>-1</sup>											1000	
5.Costo Compost S/ ha <sup>-1</sup>	629	1257	1328	2656	966	1931	1249	2398	988	1977	0	0
5.1 Insumos	479	957	1178	2356	816	1631	999	1998	838	1677	0	0
5.2 Mano de obra	150	300	150	300	150	300	150	300	150	300	0	0
5.3 Costo Bacterias	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
6 Costo total (3, 4 y 5) S/ ha <sup>-1</sup>	629	1257	1328	2656	966	1931	1249	2398	988	1977	2175	0
7.Beneficio neto (2-6) S/ ha <sup>-1</sup>	14,517	21,131	15,785	18,914	13,745	16,494	15,505	16,483	19,105	19,257	18,172	9,474
B/C (7:6)	23	17	12	7	14	9	12	7	19	10	8	-

**Tabla 14:** Evaluación del presupuesto parcial en el ensayo de papa a nivel de campo provenientes de los compost preparados del 12 junio al 12 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara-Huancavelica.

	<b>T1 5TM</b>	<b>T1 10TM</b>	<b>T2 5TM</b>	<b>T2 10TM</b>	<b>T3 5TM</b>	<b>T3 10TM</b>	<b>T4 5TM</b>	<b>T4 10TM</b>	<b>T5 5TM</b>	<b>T5 10TM</b>	<b>Testigo</b>	<b>control</b>
1.Rendimiento kg ha <sup>-1</sup>	30,238	29,280	18,803	32,036	22,446	27,371	26,174	31,028	24,999	28,587	40,080	26,138
2.Beneficio bruto S/ ha <sup>-1</sup>	8,330	11,013	7,113	12,268	8,452	10,689	9,667	12,511	9,770	11,468	16,059	9,565
2.1 Beneficio tubérculo comercial S/ ha <sup>-1</sup>	6,524	8,595	5,587	9,768	6,628	8,691	7,387	10,509	7,950	9,584	13405	7,229
2.2 Beneficio tubérculo no comercial S/ ha <sup>-1</sup>	1,806	2,418	1,526	2,500	1,824	1,998	2,280	2,002	1,820	1,884	2,654	2,336
3. Costo fertilizante edáfico S/ ha <sup>-1</sup>											1175	
4.Costo estiércol S/ ha <sup>-1</sup>											1000	
5.Costo Compost S/ ha <sup>-1</sup>	625	1249	1426	2853	944	1888	1284	2467	924	1847	0	0
5.1 Insumos	475	949	1276	2553	794	1588	1034	2067	774	1547	0	0
5.2 Mano de obra	150	300	150	300	150	300	150	300	150	300	0	0
5.3 Costo Bacterias	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
6.Costo total (3, 4 y 5) S/. ha <sup>-1</sup>	625	1249	1426	2853	944	1888	1284	2467	924	1847	2175	0
7.Beneficio neto (2-6) S/ ha <sup>-1</sup>	7,705	9,764	5,686	9,415	7,508	8,800	8,383	10,044	8,846	9,620	13,884	9,565
B/C (7:6)	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	

## **Conclusiones**

### **Bioles**

Los insumos que acidifican el medio de los bioles en condiciones de Costa y Sierra son: La melaza, alfalfa, levadura y la leche. Mientras el que ocasiona la basicidad es la urea. La producción de biogás en la zona de la sierra se puede dar a pH ácido. Por lo tanto, la producción de biogás en el biodigestor es un indicador de la etapa metanogénica la cual garantiza la descomposición de la materia orgánica en compuestos asimilables para los cultivos. La conductividad eléctrica en los bioles se encuentra influenciada por el tipo y la calidad de los insumos que se utilice. Entonces se recomienda usar estiércol que tengan baja CE, porque pueden afectar la población de los microorganismos en los bioles. La cantidad de los nutrientes P, Ca, Mg y los micronutrientes Mn y Fe en los bioles se encuentra influenciada por el pH del medio favorable cuando son ácidos, mientras el contenido N, K, S y los micronutrientes Cu y Zn, no se encuentran influenciados por el pH del medio. Pero si de la cantidad que se encuentre en los insumos que se utilice. Por lo tanto, para tener pH ácidos se pueden usar los insumos anteriormente descritos.

En la zona de Ccasapata-Huancavelica los rendimientos más altos en el cultivo de espinaca a nivel de fitotoldo familiares se consiguieron con el biol 1 de relación C/N 21, este resultado fue menor al testigo pero superior al tratamiento control. En el cultivo de nabo los mejores rendimientos se obtuvieron con el biol 14 de relación C/N 30, siendo superior al tratamiento testigo. En el cultivo de betarraga los mejores rendimientos se consiguieron con los bioles 14, 1 y 5 de relaciones C/N 30, 21 y 5 respectivamente, siendo superiores al tratamiento testigo, y en el cultivo de lechuga no se encontró evidencia estadística para afirmar que al menos un tratamiento de biol fue superior al tratamiento control. Los resultados obtenidos con los bioles son diferentes en los cultivos evaluados, esto puede deberse a que cada especie de planta requiere ciertos nutrientes y compuestos orgánicos en especial para su desarrollo producidos durante el proceso de la biodigestión.

Los resultados no fueron consistentes en los cultivos evaluados, en ese sentido se tomaron las relaciones C/N de 21, 30 y 5, como base para la siguiente campaña y confirmar los resultados obtenidos.

### **Compost**

La temperatura en las pilas de compost puede llegar hasta los 60 °C en la zona de Huancayo y Huancavelica en proporción 2:1 (estiércol: paja seca), favorecida con una relación C/N de 16. Ya que la temperatura en estas condiciones garantiza la descomposición de la materia orgánica. El pH en las pilas de los compost estuvo entre 7 y 8, recomendado para suelo ácido. La cantidad de CE, MO, C/N, N, P, K, Ca, Mg, Na, S, Cu, Zn, Mn y Fe, en los compost se encuentra influenciada por el contenido de los insumos que se utilice. Los contenidos más altos de los nutrientes N, P, Ca, Mg, Na, S, Cu, Zn, Mn y Fe arrojaron los compost a base de estiércol de vacuno. Entonces se recomienda usar dicha fuente. El mejor rendimiento en el cultivo de papa en las variables peso fresco de tubérculos totales y comerciales se consiguieron con el compost 5 en Huancayo y el compost 4 en Huancavelica, ambos a base de estiércol de vacuno y solo al compost 4 se le adiciono las bacterias celulíticas. Esta diferencia de resultado pudo deberse a que en la zona de Huancavelica las condiciones climáticas son más adversa, por lo tanto, las bacterias inoculadas en las pilas de compost favoreció la descomposición de la materia orgánica. La mejor dosis de compost a nivel de campo se consiguió con la aplicación de 10 TM ha-1. La evaluación en términos beneficio-costos comparados con el fertilizante químico fue más rentable con el compost, siendo una alternativa económicamente sustentable.

## **Logro de los objetivos**

El logro de los objetivos esta al 80% según el tiempo programado.

## **Problemas o dificultades**

En esta etapa se tuvo problemas para hacer el análisis de las fitohormonas en los bioles ya que, en el Perú no se encontró laboratorio que pueda realizar este tipo de pruebas porque no es de rutina. Esto implica que algunos de los resultados obtenidos podrían estar explicados por la presencia de fitohormonas, lo cual explicaría la ausencia de correlación entre contenido de nutrientes y rendimiento en varios de los casos analizados.

## **Revisión bibliográfica**

- Cerrato, M., H. Leblanc, y C. Kameko. 2007. Potencial de mineralización de nitrógeno de bokashi, compost y lombricompost producidos en la universidad de EARTH. *Tierra tropical* 3 (2): 183-197.
- Chilon, E. 2010. Compostaje altoandino, suelo vivo y cambio climático. *Ciencia Agro* 2 (1):221-227.
- CIMMYT 1989. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. E.R. Mexico D.F., Mexico 79p.
- Fening, J., Ewusi-Mensah, y Y. Safo. 2010. Improving the fertilizer value of cattle manure for sustaining small holder crop production in Ghana. *Journal of Agronomy* 9(3):92-101.
- Gonzales, C., C. Alvarez, F. Pomares, y M. Benites. 1998. Efecto de fertilización en papa con compost, gallinaza y combinaciones de ambas. *Agronomia Trop.*58 (3):233-243.
- Henao, A., M. Leon, y J. Ospina. 2002. Evaluación de los microorganismos aceleradores del proceso de descomposición en banano de rechazo. Cartagena de Indias Colombia, Asociación de bananeros de Colombia AUGURA.
- Miller, F. 1993. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In: *Soil microbial ecology*. Metting, F. B. J. (Eds). Marcel Dekker. 515-544.
- Pickering J, Kendle A y Hadley P. 1998. The suitability of composted green waste as an organic mulch: effects on soil moisture retention and surface temperature. *Acta Horticulture* 469 : 319 – 324.
- Pierre, F., M. Rosell, A. Quiroz, y Y. Granda. 2009. Evaluación química y biológica de pulpa de café en Caspito Municipio de Andrés Bello. Estados de Lara-Venezuela. *Bioagro* (21) 2: 105-110.
- Quispe, G. 2007: Evaluación del sistema del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) en la comunidad campesina de Aramachay (Sincos, Jauja, Junín) Tesis Ing. Agrónomo Lima, Perú. UNALM. 95 p.
- Ravindran, K., K. Venkatesan, T. Balasubramanian, y V. Balakrishnan. 2007. Effect of halophytic compost along with farmyard manure and phosphobacteria on growth characteristics of *Arachis hypogaea* Linn. *Science of the Total Environment* 384: 333-341.
- Romero, M., A. Trinidad, y R. Garcia. 2000. Producción de papa y biomasa microbiana en suelos con abonos orgánicos y minerales. *Agrociencia* 34 (3).
- Rynk, R. 1992. *On-farm composting handbook*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Cooperative Extension. New York 186 p.

- Sanchez del Pinto, M., A. Albanesi, V. Palazzi, J. Trejo, y A. Polo. 2011. Compostaje y lombricompostaje de residuos hortofrutícolas. Madrid-España.
- Speranzini, D. 2007. Grape vine: A newsletter for commercial fruit growers. Don't forget the secondary or micro-nutrients from applied manure or compost. OMAFRA Volumen 11, issue 5.
- Sztern, D., y M. Pravia. 1999. Manual para la elaboración de compost. Bases conceptuales y procedimientos OPS/OMS Montevideo-Uruguay. 69p.



## 1.4 PRINCIPALES RESULTADOS (CAMPAÑA 2010-2011)

En el período Noviembre 2011-Abril 2012, se evaluó el efecto de 05 cepas bacterianas en condiciones de invernadero y de campo sobre el cultivo de lechuga (Actividad 1.2). En el experimento I se observa que los tratamientos T3, T7 y T10 obtuvieron los mejores resultados, lo cual sugiere que las cepas presentan una mejor respuesta cuando las bacterias son aplicadas solas (T3 y T7) y en mezcla de cepas (T10) sin embargo los resultados obtenidos en el Experimento II, se observa que el mejor tratamiento fue el T8 (B1-22/06 + dosis mínima de fertilizante). En el experimento III, en los tratamientos T4 y T7 se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (Tabla 3). Los resultados demuestran que la cepa P1-20/08 (*Pseudomonas putida*) presenta una buena respuesta cuando es inoculada sola y en combinación con el humus.

En los experimentos de invernadero, se evidenció la inconsistencia de las respuestas de los microorganismos ante determinados factores de restricción (Actividad 1.4). En el experimento I, los cultivares Yungay, Huamantanga y Unica obtuvieron los mejores resultados y solo se obtuvieron resultados consistentes respecto a la campaña anterior en el cultivar Huamantanga. En el Experimento II se confirma los resultados de la campaña anterior, al no encontrarse diferencias significativas en inocular una sola cepa o mezcla de cepas. Respecto al Experimento III, se observaron diferencias significativas solo en el sustrato 8, observándose resultados inconsistentes respecto al experimento anterior en el cual se registraron efectos positivos en todos los sustratos evaluados. En el experimento IV, las cepas incrementaron el rendimiento en los pH 4.5, 6.8 y 7.6, obteniéndose resultados consistentes respecto a la campaña anterior solo en los pH 4.5 y 7.6. Respecto a los experimentos de campo; en el Experimento IV no se observó diferencias significativas al inocular las bacterias en 03 diferentes momentos del ciclo fenológico, sin embargo los resultados sugieren que la inoculación de las cepas P1-20/08 y B1-35/06 solo al momento de la siembra incrementa el rendimiento de tubérculos comparado a las otras inoculaciones. En el experimento V, se observó que las cepas P1-20/08 y B1-22/06 obtuvieron buenos resultados en los cultivares Yana Huancuy y Amarilla del centro.

### 1.4.1 ACTIVIDAD 1.2: EVALUACIÓN IN VITRO, MACETA Y CAMPO CON ORGANISMOS RELACIONADOS A LOS BIOFERTILIZANTES

#### Objetivo de la actividad:

- Selección de los mejores microorganismos por características y propósitos.

#### Indicadores de la actividad:

- Experimentos en condiciones de invernadero y campo con las mejores cepas seleccionadas en base a las pruebas in vitro y experimentos de invernadero

#### Material y Métodos

En la campaña 2010-2011, un total de 03 experimentos fueron evaluados. El Experimento I fue evaluado en condiciones de invernadero y los Experimentos II y III fueron evaluados en condiciones de campo.

**Experimento I:** Un ensayo a nivel de cobertor se realizó en la estación experimental del CIP, La Molina, Lima (240 msnm,) durante la campaña Noviembre 2011 - Febrero 2012. La temperatura promedio en este periodo fue de 24 °C y la humedad relativa de 66 %. Se evaluaron un total de 05 cepas bacterianas: B1-21/06 (*B. subtilis*), B1-35/06 (*B. amyloliquefaciens*), P1-20/08 y P1-21/08 (*P. putida*) y A1-30/06 (Actinomicetos). Cada tratamiento incluyó inoculación de una sola cepa, mezcla de cepas y en combinación con fertilizante químico N,P, K (20-20-20 kg ha<sup>-1</sup>) y un tratamiento control sin inóculo bacteriano y sin fertilización química y otro tratamiento control con solo fertilización

química NPK (20-20-20 kg ha<sup>-1</sup>). Para evaluar el efecto de las bacterias en el rendimiento de lechuga cultivar Nainer, se inocularon las semillas de lechuga por el método de inmersión, el cual consistió en sumergir las semillas en la suspensión bacteriana (10<sup>8</sup>UFC/ ml) por un tiempo de 15-20 minutos. Para los tratamientos control, las semillas fueron sumergidas en el medio TSB sin inoculo bacteriano. Posteriormente las semillas fueron sembradas en macetas conteniendo un sustrato estéril (mezcla de tierra negra, musgo molido y arena de río en proporción 2:2:1) y 30 días después de la siembra se aplicó el fertilizante químico Peters NPK (20-20-20 kg ha<sup>-1</sup>) a una concentración de 2 g maceta. Un total de 13 tratamientos fueron establecidos, con cuatro repeticiones por tratamiento las cuales permanecieron en el cobertor a la temperatura de estación y condiciones controladas de riego hasta su evaluación. Las plantas se cosecharon a las 15 semanas y se evaluaron el peso fresco y seco de las hojas.

**Experimento II:** El ensayo fue conducido bajo condiciones de campo en el FUNDO del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) durante el periodo Noviembre 2011 - Febrero 2012. La temperatura promedio fue de 21°C. Se evaluó un total de 03 cepas de bacterias: B1-22/06 (*B. subtilis*), P1-20/08 (*P. putida*) y A1-30/06 (Actinomicetos). Cada tratamiento incluyó inoculación de una sola cepa sin fertilización química y con fertilización química a una dosis mínima de NPK (50-30-30 Kg ha<sup>-1</sup>). Un tratamiento control sin bacteria y sin fertilización química, otro tratamiento control con dosis mínima de fertilización química NPK (50-30-30 Kg ha<sup>-1</sup>) y adicionalmente otro tratamiento control con una dosis normal de fertilización de NPK (100-100-100 Kg ha<sup>-1</sup>). Para evaluar el efecto de las bacterias en el rendimiento de lechuga cultivar Nainer, las raíces de las plantas se sumergieron en la suspensión bacteriana (10<sup>8</sup>UFC/ ml) por un tiempo de 15-20 minutos. Para los tratamientos control, las raíces fueron sumergidas en el medio TSB sin inocular. Posteriormente los plantines fueron transplantadas a cada parcela. Las características del suelo fueron textura franco-arenoso, pH 7.87, CE: 0.48 dS m<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub>: 4%, materia orgánica: 1.57%, P: 15.6 y K: 123 ppm. Los fertilizantes químicos urea (46%N), súper fosfato triple (46%P) y cloruro de potasio (60%K), fueron aplicados 15 días después de la siembra. Un total de 09 tratamientos fueron establecidos, con cuatro repeticiones por tratamiento los cuales permanecieron en el cobertor a la temperatura de estación y bajo un sistema de riego por gravedad. Las plantas se cosecharon 15 semanas después de la siembra y se evaluaron el peso fresco y seco de las hojas.

**Experimento III:** El ensayo fue conducido bajo condiciones de campo en el Distrito de Punchao, Provincia de Humalies, Departamento de Huánuco (3,800msnm) durante el periodo Diciembre 2011 - abril 2012. La temperatura promedio fue de 11.3 °C. Se evaluó un total de 03 cepas bacterianas: B1-22/06 (*B. subtilis*), P1-20/08 (*P. putida*) y A1-30/06 (Actinomicetos). Cada tratamiento incluyó inoculación de una sola cepa y en combinación con humus. Un tratamiento control sin bacteria y con humus. Para evaluar el efecto de las bacterias en el rendimiento de lechuga, se usaron Plantines de *Lactuca sativa* L. cv. White Cos, los cuales se sumergieron sus raíces en suspensión bacteriana (10<sup>8</sup>UFC/ ml) por 15-20 minutos. Para los tratamientos control, las raicillas de los plantines fueron sumergidas en el medio TSB sin inocular. Posteriormente los plantines de fueron transplantados a campo. Las características del suelo fueron: textura franco, pH 6.11, CE: 0.39 dS m<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub>: 0.00%, materia orgánica: 1.91%, P: 3.5 ppm, K: 47 ppm, NO<sub>3</sub>:40.53 ppm. Los fertilizantes químicos urea (46%N), súper fosfato triple (46%P) y cloruro de potasio (60%K), fueron aplicados 15 días después de la siembra. El campo fue regado bajo el sistema de riego por gravedad. Un total de 09 tratamientos fueron establecidos, con cuatro repeticiones por tratamiento las cuales permanecieron en el cobertor a la temperatura de estación y Bajo un sistema de riego por gravedad. Las plantas fueron cosechadas a las 13 semanas después de la siembra y se evaluaron el peso fresco y seco de las hojas.

Para el análisis de los datos se usó el programa Statistical Analysis System (SAS) y la prueba de comparaciones de medias con Waller ( $\alpha=0.05$ ), para el análisis de grupo se utilizó la prueba de contraste entre promedios de tratamientos.

## Resultados y Discusión:

En la Tabla 1 se observa diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos T3, T7 y T10 con respecto al control, los resultados sugieren que hay una mejor respuesta cuando las bacterias son aplicadas solas (T3 y T7) y en mezcla de cepas (T10). Además se observa que los tratamientos inoculados con una sola cepa y sin dosis mínima de fertilización (T3, T4 y T5) presentan un ligero incremento en el rendimiento de tubérculos comparado a los tratamientos que incluyeron las mismas cepas y a una dosis mínima de fertilización (T11, T12, T13) pero sin diferencias estadísticamente significativas.

En la Tabla 2, se observa que sólo el tratamiento T8 (B1-22/06 + dosis mínima de fertilizante) presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control. Este resultado contrasta los resultados obtenidos en el Experimento I descrito anteriormente, en el cual el T12 (B1-22/06 + dosis mínima de fertilizante) presentó el menor rendimiento.

En los tratamientos T4 y T7 no se observó diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (Tabla 3). Sin embargo se observa que P1-20/08 (*Pseudomonas putida*) presenta una buena respuesta cuando es inoculada sola y en combinación con el humus.

**Tabla 1.** Peso Fresco y Seco de hojas en g maceta<sup>-1</sup> de *Lactuca sativa* L. cv. Nainer después de la inoculación 05 cepas bacterianas inoculadas solas, en mezcla y en combinación con fertilización química. La Molina, November 2011-Febrero 2012. Experimento I.

Tratamiento	Descripción	Peso Fresco Hojas (g)	Peso Seco Hojas (g)
		g maceta <sup>-1</sup>	g maceta <sup>-1</sup>
T1	Control	4.08 d	0.39 d
T2	N, P, K (20-20-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	8.97 cd	0.94 bc
T3	A1-30/06	21.13 ab	1.95 a
T4	B1-22/06	7.34 cd	0.52 d
T5	P1-20/08	9.17 cd	0.87 bc
T6	B1-35/06	8.33 cd	0.81 c
T7	P1-21/06	23.35 a	2.08 a
T8	P1-20/08+ B1-35-06	12.36 cd	1.14 b
T9	P1-20/06+P1-21/06	13.725 bc	1.15 bc
T10	B1-22/06+B1-35-06	22.57 a	2.13 a
T11	A1-30/06 + N, P, K (20-20-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	11.76 cd	0.97 bc
T12	B1-22/06 + N, P, K (20-20-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	5.39 cd	0.52 d
T13	P1-20/08 + N, P, K (20-20-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	12.95 bc	1.15 bc

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey p < 0.05). Promedio de cuatro repeticiones.

**Tabla 2.** Peso Fresco y Seco de hojas en g maceta<sup>-1</sup> de *Lactuca sativa* L. cv. Nainer después de la inoculación de 03 cepas bacterianas inoculadas individualmente y en combinación con fertilización química. Fundo de la UNLAM, La Molina, Noviembre 2011-Febrero 2012. Experimento II

Tratamiento	Descripción	Peso Fresco Hojas	Peso Seco Hojas
		Kg ha <sup>-1</sup>	Kg ha <sup>-1</sup>
T1	Control	30.87 d	2.69 b
T2	N, P, K (100-100-100 Kg ha <sup>-1</sup> )	36.03 bcd	3.44 ab
T3	N, P, K (50-30-30 Kg ha <sup>-1</sup> )	35.25 bcd	3.29 ab
T4	A1-30/06	37.75 abc	3.37 ab
T5	B1-22/06	33.04 cd	2.81 ab
T6	P1-20/08	35.52 bcd	3.33 ab
T7	A1-30/06 + N, P, K (50-30-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	39.8 ab	3.62 ab
T8	B1-22/06 + N, P, K (50-30-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	42.17 a	4.05 a
T9	P1-20/08 + N, P, K (50-30-20 Kg ha <sup>-1</sup> )	35.58 bcd	2.93 ab

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ). Promedio de cuatro repeticiones.

**Tabla 3.** Peso Fresco en g maceta<sup>-1</sup> de *Lactuca sativa* L. cv. White Cos después de la inoculación de 03 cepas bacterianas individualmente y en combinación con humus. Punchao, Huánuco, Diciembre 2011-Abril 2012. Experimento III.

Tratamiento	Descripción	Peso Fresco Hojas
		Kg ha <sup>-1</sup>
T1	Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	12.44 ab
T2	A1-30/06	10.46 ab
T3	B1-22/06	10.29 ab
T4	P1-20/08	13.96 a
T5	A1-30/06 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	8.13 ab
T6	B1-22/06 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	12.21 ab
T7	P1-20/08 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	14.17 a

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ).

Promedio de cuatro repeticiones.

#### 1.4.2 ACTIVIDAD 1.4: CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL MANEJO EN CAMPO

##### Objetivo de la actividad:

- Evaluar las mejores condiciones de uso de microorganismos y algunos factores de restricción.

### **Indicadores de la actividad:**

- Experimento en invernadero y campo con factores de restricción.

### **Material y Métodos**

Se establecieron 04 experimentos a nivel de cobertor (Experimentos I, II, III y IV) y 02 experimentos a nivel de campo (Experimento IV y V). Se estableció la misma metodología reportada en el periodo 2009-2010.

### **Experimentos de Invernadero:**

Se instalaron los Experimentos I, II, III y IV, en la estación Experimental del CIP, La Molina Lima, durante el periodo June 2010-Diciembre 2010.

### **Experimentos de Campo:**

**Experimento V:** Durante el periodo Octubre 2010- June 2011, un experimento en condiciones de campo fue conducido en la estación experimental del CIP ubicado en La Victoria (3 230 msnm) en el departamento de Junín, Perú. En este experimento se usó las mismas cepas y el mismo diseño experimental del experimento V del periodo Octubre 2009 – June 2010, con la finalidad de confirmar los resultados

**Experimento VI:** En Octubre 2010- June 2011 se instaló un experimento en San José de Aymara, Huancavelica (3 884 msnm). Se inocularon las cepas bacterianas P1-20/08 y B1-22/08 en 05 cultivares de papa (Amarilla del Centro, Yana Huancuy, Peruanita, Huamantanga, y Yungay), la metodología de inoculación es la misma metodología propuesta en periodos anteriores.

### **Resultados y Discusión:**

Para el Experimento I, la Tabla 1 indica que los cultivares Peruanita y Unica no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos comparado al tratamiento control ( $p < 0.05$ ). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en el periodo 2009-2010 con el cultivar Unica, en el cual se encontró bajos incrementos o efectos negativos en este cultivar. Por el contrario, los resultados en los cultivares Huamantanga, Yana Wancuy y Yungay mostraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con bacterias con respecto al control ( $p < 0.001$ ), con un rango de incremento de 25-738 % en el peso seco de tubérculos. La Figura muestra que el porcentaje de peso seco de tubérculos en el cultivar Yungay incrementó significativamente comparado al tratamiento control. El incremento en el peso seco fue mayor en las cepas A1-37/08, B1-05/06 and P1-20/08. Las cepas que mostraron efectos positivos en el peso seco en menos 03 cultivares fueron: A1-37/08, B1-05/06, P1-20/08 B1-22/06 A1-19/08 A2-19/08 B1-35/08. Estos resultados son consistentes a los obtenidos con las cepas P1-20/08, A1-19/08 evaluadas en el periodo 2009-2010.

En el experimento II, los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos inoculados con una cepa o mezcla de cepas comparado al control (Tabla 2). Sin embargo, los tratamientos que incluyeron inoculación de *Pseudomonas* individualmente (T1) o en combinación con otras cepas (T12, T13 y T15) incrementó los parámetros de crecimiento evaluados pero estos resultados no son estadísticamente significativos. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en el periodo 2009-2010.

Para el Experimento III, la Figura 2, indica que el peso seco de los tubérculos mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ) solo en el sustrato 8. El incremento en el peso seco de tubérculos fue mayor en las cepas A2-19/08 y A1-19/08. Estos resultados no son consistentes con los resultados obtenidos en el periodo 2009-2010, en el cual la cepa A1-19/08 presentó el mejor rendimiento en todos los sustratos evaluados. En la Figura 2 se observa que los sustratos 5, 6, 7 presentaron el menor peso seco de tubérculos lo que indica que el establecimiento y colonización de las bacterias depende del tipo del sustrato usado. Además los resultados indican que en suelos muy pobres (Sustrato 1) las bacterias influyen positivamente en el crecimiento de las plantas y desarrollo de tubérculos pero las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. Se puede inferir que las bacterias se comportan de manera diferente según los tipos de suelos en el campo.

Para el Experimento IV, en la Figura 3 se observa que los tratamientos con bacteria incrementaron el peso seco de tubérculos en el pH 4.5, 6.8 and 7.6. El incremento en el peso seco fue mayor en las cepas A1-19/08, B1-22/06, B1-35/06 and A2-20/08. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la periodo 2009-2010, en el cual presentó el mejor comportamiento de las cepas en los pH extremos (pH 4.5 y 7.8) (Figure 3). En la Figura se observa que todos los tratamientos con bacteria incrementaron el peso seco de tubérculos en condiciones extremas de pH (pH 4.5 y 7.6) comparado al control, sin embargo los resultados indicaron disminución en el peso seco de tubérculos bajo las más favorables condiciones para el crecimiento de plantas de papa (pH 5.6)

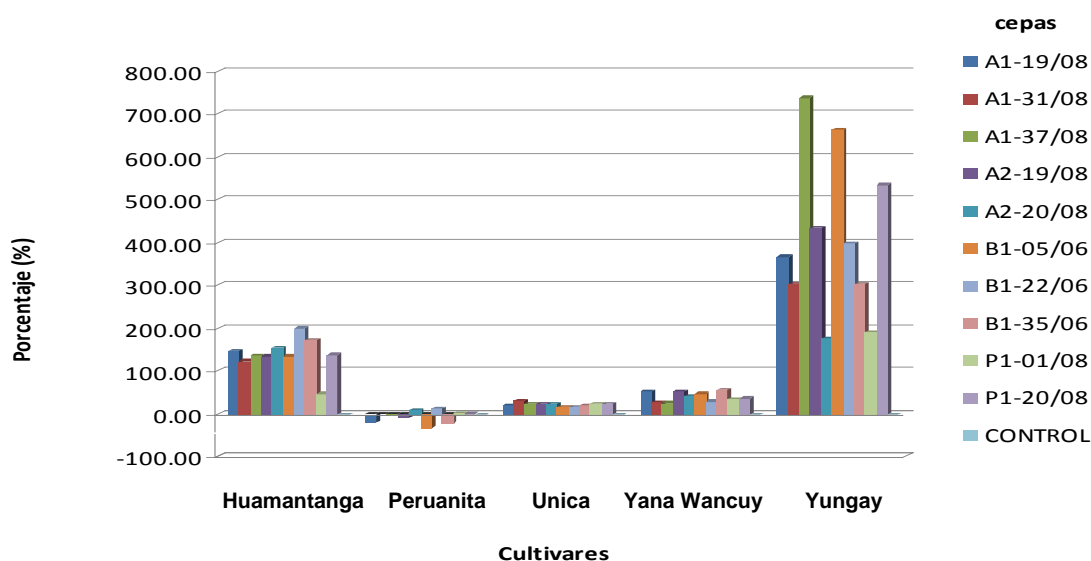
Tabla 3 muestra que no hay diferencias significativas entre todos los tratamientos evaluados. Sin embargo los resultados sugieren que la inoculación de las cepas P1-20/08 y B1-35/06 solo al momento de la siembra incrementa el rendimiento de tubérculos comparado a las otras inoculaciones (después de 4 semanas de la siembra, al aporque y 3 semanas después del aporque)

Los tratamientos inoculados con las cepas P1-20/08 (*P. putida*) y B1-22/06 (*B. subtilis*) incrementaron el rendimiento de tubérculos ( $t\ ha^{-1}$ ) en un rango de 40-63 % en Amarilla del Centro y de 36-45% en Yana Huancuy comparado al control. Estos resultados muestran inconsistencia respecto a los experimentos de invernadero del periodo 2009-2010, donde la cepa P1-20/08 presentó efectos negativos en el cultivar Yana Huancuy, pero son consistentes con el experimento en invernadero de la presente campaña.

Tabla 1. Efecto de microorganismos en el peso seco de tubérculos en gramos de los diferentes cultivares de papa después de 12 semanas de inoculación de bacterias. Período 2010-2011. Experimento I

Tratamientos	Cultivares de papa				
	Huamantanga	Peruanita	Unica	Yana Hancuy	Yungay
A1-19/08	12.96 a	4.08 a	20.64 a	15.2 a	27.60 cde
A1-31/08	11.73 ab	4.92 a	22.58 a	12.6 ab	23.90 cde
A1-37/08	12.36 ab	4.86 a	21.16 a	12.45 ab	49.50 a
A2-19/08	12.31 ab	4.66 a	21.22 a	15.12 a	31.60 bcd
A2-20/08	13.33 a	5.53 a	21.26 a	14.18 a	16.30 ef
B1-05/06	12.28 ab	3.42 a	20.12 a	14.68 a	45.10 ab
B1-22/06	15.68 a	5.71 a	20.05 a	12.87 ab	29.50 cde
B1-35/06	14.28 a	3.98 a	20.64 a	15.5 a	23.90 cde
P1-01/08	7.70 bc	5.19 a	21.44 a	13.36 a	17.20 def
P1-20/08	12.5 a	5.12 a	21.10 a	13.57 a	37.50 abc
CONTROL	5.22 c	5.04 a	17.09 a	9.91 b	5.90 f

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ). Promedio de cinco repeticiones.

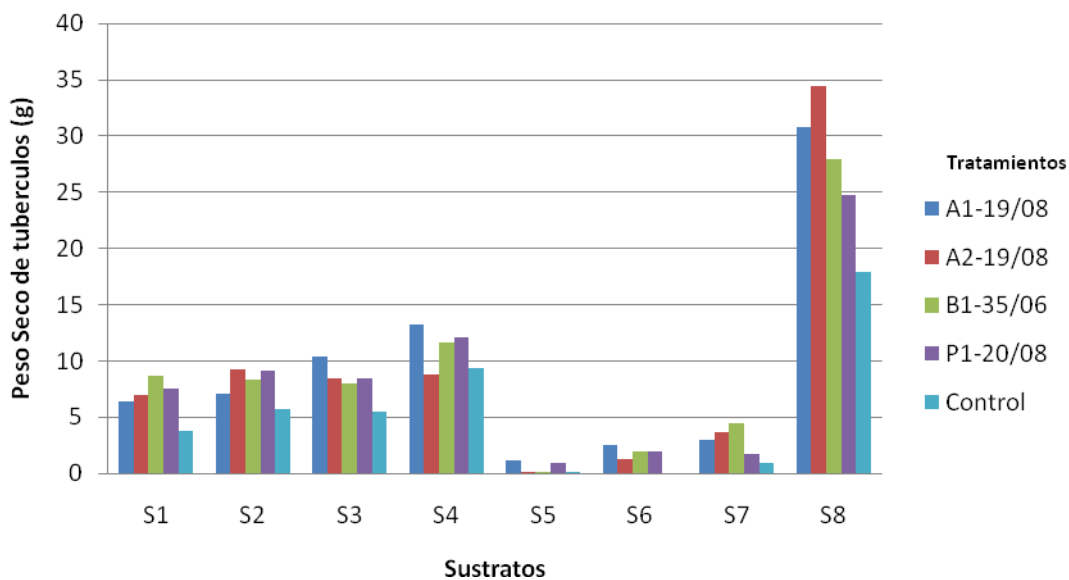


**Figura 1.** Incrementos y decrementos en porcentaje (%) del peso seco de tubérculos de diferentes cultivares de papa inoculados con bacteria comparado con el control. Experimento I.

**Tabla 2.** Efecto de las bacterias en los principales parámetros de crecimiento de *S. tuberosum* cv. Revolución después de 12 semanas de la inoculación de bacterias inoculadas individualmente y en mezclas. Periodo 2009-2010

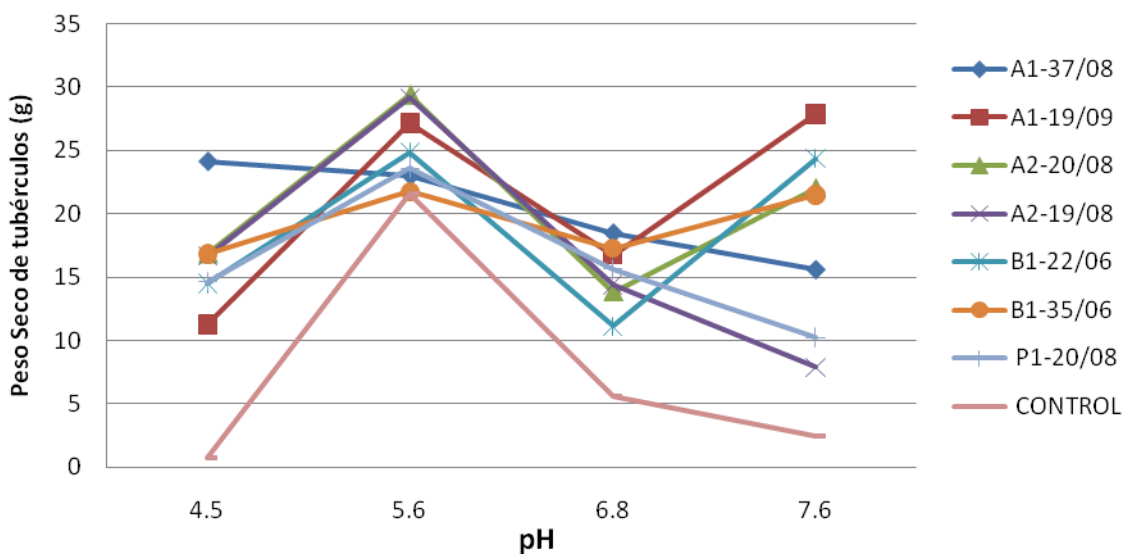
Tratamientos	PFT(g)	PST (g)	PFP (g)	PSP(g)
<b>T1</b>	<b>132.20 a</b>	<b>32.43 a</b>	<b>192.70 ab</b>	<b>39.01 a</b>
T2	120.40 a	27.08 a	173.65 ab	33.28 a
T3	115.40 a	26.85 a	168.00 ab	32.78 a
T4	127.65 a	29.13 a	180.58 ab	35.33 a
T5	115.00 a	26.95 a	159.65 b	32.40 a
T6	126.95 a	29.10 a	178.03 a	34.85 a
T7	118.43 a	26.95 a	166.95 ab	32.53 a
T8	126.15 a	29.93 a	180.85 ab	36.80 a
T9	118.75 a	26.75 a	170.68 ab	31.98 a
T10	114.10 a	26.50 a	165.33 ab	32.60 a
T11	125.10 a	27.90 a	176.48 ab	32.89 a
<b>T12</b>	<b>132.43 a</b>	<b>32.13 a</b>	<b>188.50 ab</b>	<b>37.73 a</b>
<b>T13</b>	<b>135.15 a</b>	<b>32.88 a</b>	<b>186.75 ab</b>	<b>38.90 a</b>
T14	125.15 a	29.53 a	181.65 ab	35.33 a
<b>T15</b>	<b>133.83 a</b>	<b>30.35 a</b>	<b>185.13 ab</b>	<b>36.80 a</b>
Control	132.15 a	29.03 a	197.30 a	35.08 a

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ). Promedio de cinco repeticiones.



**Figura 2.** Efecto de los tratamientos en el Peso Seco de Tubérculos del *S. tuberosum* L. cv. Serranita en 8 diferentes tipos de sustratos 12 semanas después de inoculación de bacterias. Periodo 2010-2011. Experimento III

S1=Sustrato 1, S2=Sustrato 2, S3=Sustrato 3, S4=Sustrato 4, S5=Sustrato 5, S6=Sustrato 6, S7=Sustrato 7, S8 =Sustrato 8.



**Figura 3.** Peso seco de tubérculos en g de *S. tuberosum* L. cv. Serranita en sustrato con diferentes valores de pH después de 12 semanas de inoculación de bacterias. Periodo 2009-2010.



**Tabla 3.** Rendimiento de tubérculos en t ha<sup>-1</sup> de *S. tuberosum* L. cultivar Yungay, después de la inoculación de 02 cepas bacterianas en tres diferentes tiempos. La Victoria, Periodo 2010-2011

Tratamientos	Descripcion	La Victoria
		Rendimiento de tubérculos ( t ha <sup>-1</sup> )
T1	5 t guano ha <sup>-1</sup>	31.50 ab
T2	5 t guano ha <sup>-1</sup> + 100 Kg N, 120 Kg P, 100 K ha <sup>-1</sup>	31.00 ab
T3	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra	33.25 a
T4	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra, 4 semanas, al aporque	21.50 bcd
T5	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a la siembra, al aporque	14.75 e
T6	5 t guano ha <sup>-1</sup> + P1-20/08 a las 4 semanas, al aporque, a las 3 semanas	14.25 de
T7	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra	26.75 abc
T8	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra, 4 semanas, al aporque	12.75 de
T9	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a la siembra, al aporque	18.5 cd
T10	5 t guano ha <sup>-1</sup> + B1-35/06 a las 4 semanas, al aporque, a las 3 semanas	10.75 de

**Tabla 4.** Rendimiento en t ha<sup>-1</sup> de cinco cultivares de *S. tuberosum* L. (Amarilla del Centro, Yana Huancuy, Peruanita, Huamantanga y Yungay) después de la inoculación de 02 cepas bacterianas. San Jose de Aymara. Periodo 2010-2011

Treatments	Description	Rendimiento de tuberculos (t ha <sup>-1</sup> )				
		Amarilla del centro	Yana Huancuy	Peruanita	Huamantanga	Yungay
T1	5 t manure ha <sup>-1</sup> + P1-20/08	27.54 a	29.23 a	30.16 a	24.29 a	19.73 a
T2	5 t manure ha <sup>-1</sup> + B1-22/06	23.68 a	27.32 a	29.86 a	25.50 a	20.94 a
T3	5 t manure ha <sup>-1</sup>	16.90 b	20.12 b	27.90 a	22.54 a	16.29 a

Durante la campaña (2010-2011) las actividades del proyecto estuvieron enfocadas a la actividad 2.4 (Evaluación de técnicas para la producción de bioabonos fermentados) y la actividad 5.1 (Evaluación participativa con los biofertilizantes) estas actividades fueron realizadas sin mayores problemas. Los resultados de la actividad 2.4 indican en los bioles que la producción de biogás se encuentra influenciada por el pH y la relación C/N. Dichas variables se encuentra influenciada por el tipo de insumo que se utilice. Por otro lado, los nutrientes en los bioles y las poblaciones microbianas se encuentran relacionados por el pH y el tipo de insumo. Se ha podido disminuir el tiempo de preparación de este abono fermentado hasta en un 40%. Los bioles de relación C/N de 10 y 21 tuvieron los mejores rendimientos y beneficio-costo. Los resultados de la actividad 5.1 indican al biol 1 constituido por mezcla de estiércol y relación C/N de 21, como la nueva tecnología de mayor aceptación por parte de los agricultores.

#### 2.4.3 ACTIVIDAD 2.4: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOABONOS FERMENTADOS.

##### Objetivo de la actividad:

- Identificar los componentes activos de los bioles elaborados a partir de diferentes insumos y determinar su modo de acción.
- Evaluar la efectividad de los bioabonos fermentados

#### **Indicadores de la actividad:**

- Bioabonos fermentados preparados
- Análisis físico-químico y microbiológicos de los bioabonos fermentados.
- Análisis de los rendimientos de los ensayos.

#### **Materiales y Métodos**

Se seleccionaron los mejores tratamientos de los bioles preparados de los dos años anteriores y de las tres localidades: CIP- Huancayo (3200 msnm), Ccasapata-Huancavelica (4000 msnm) y CIP-Lima (280 msnm). La selección se basó en los rendimientos obtenidos en cobertores, campo y los análisis físico-químicos de los bioles. Los tratamientos seleccionados se instalaron en las tres localidades descritas más la localidad de San José de Aymará-Huancavelica (4000 msnm), ver Foto 10 y Tabla 15. El objetivo fue identificar los componentes activos de los bioles elaborados a partir de diferentes insumos y determinar su modo de acción. En estos experimentos se investigó la efectividad y el comportamiento de los bioles de acuerdo a la relación carbono/nitrógeno (C/N) de 10a, 21 y 30 de origen orgánico e inorgánico obtenidos de los resultados de los experimentos en los 2 años anteriores en condiciones ambientales de la costa y la sierra de Perú. Los análisis físicos y químicos de todos los bioabonos fermentados fueron realizados en el laboratorio de la facultad de Agronomía de la UNALM. Los análisis microbiológicos de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Actinomycetes* sp y Coliformes totales en las instalaciones del CIP-Lima. La instalación de los bioles fue realizada similar al primer año, al igual que la evaluación de las variables físicas (pH, CE) y químicas (N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Fe, Mn, Cu, Zn y B).

a La relación C/N de 5 del segundo año se cambio por el de 10, porque con insumos orgánicos no se pudo llegar a dicha relación.



A



B



C

D

Foto 10: Diferentes tratamientos de bioles instalados a campo abierto. A: CIP-Lima (9 junio – 9 noviembre 2010); B: Comunidad de Ccasapata-Huancavelica (26 agosto – 10 enero 2011); C: Comunidad de San José de Aymará (6 julio – 21 noviembre 2010) y D: CIP-Huancayo (5 julio – 20 noviembre 2010).

**Tabla 15:** Diferentes bioles preparados en el CIP-Lima (9 junio –9 noviembre 2010), CIP-Huancayo (5 julio–20 noviembre 2010), Aymara-Huancavelica (6 julio–21 noviembre 2010), y Ccasapata-Huancavelica (26 agosto-10 enero 2011).

Ingredientes	BIODIGESTORES O BIOLES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C/N *	21 org	21 org	21 org	21 ino	21 ino	10 org	10 ino	30 org	30 org	21 org	10 org	30 org
Agua (L)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Estiércol(Kg) **	10+5+5	10+2+8	10+0+10	10+5+5	10+5+5	10+5+5	10+5+5	8+12+0	7+13+0	10+0+10	10+5+5	8+12+0
Melaza (Kg)		2.5	5	2.5	5	5	5	2.5	2.5	5	5	2.5
Leguminosa (Kg)			1			1		1	3	1	1	1
Leche (L)									2			
Ceniza (Kg)			1		1	1	1	1	0.5	1	1	1
Levadura (Kg)			0.25		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Nitrógeno (kg)				0.04	0.08		0.55					
Harina pescado(Kg)						10					10	
Rumex (Kg)									3			
Sales minerales (Kg)									1			
Capacidad (L)	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Agitación										C/A	C/A	C/A
Lima	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Huancayo	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Aymará-Huancavelica	A		A				A		A	A		
Ccasapata-Huancavelica	C			C		C			C		C	

\*ino : Inorgánico; org : Orgánico

\*\* 10+5+5: Estiércol vacuno + estiércol ovino +guano de gallina (Lima) o pollo (Huancayo, Aymara y Ccasapata)

Para la evaluación de la efectividad de los bioles se instalaron experimentos a nivel de campo y cobertor en Lima, Huancayo y Huancavelica (Foto 11). En Lima se instaló un ensayo a nivel de cobertor en el cultivo de papa cultivar Canchan; el diseño fue un DCA con catorce tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. Se probaron los doce bioles preparados en CIP-Lima (Tabla 15), comparados con dos tratamientos testigos: control (sin aplicación) y el fertilizante químico foliar peters (20-20-20, NPK). La cosecha fue realizada a los 90 días después de la siembra. La unidad experimental consistió de una maceta número ocho. El gasto de la solución fue de 15 ml macetas<sup>-1</sup>. La dosis de los tratamientos de los bioles fue de 40%, y el fertilizante químico foliar fue de 4 g L<sup>-1</sup>. Se realizaron seis aplicaciones en total con una frecuencia de una semana. El sustrato empleado en las macetas fue una mezcla de arena y musgo en una proporción 2:1 en volumen, el contenido de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O en el sustrato fue de 0.80%, 0.25% y 0.19%, respectivamente.

En Huancayo, a nivel de campo, se instaló un ensayo de maíz amiláceo el diseño fue un DBCA con catorce tratamientos y cuatro repeticiones por tratamientos. Se probaron los diez tratamientos de bioles preparados en el CIP-Huancayo (Tabla 15), comparado con cuatro tratamientos testigos: tratamiento control, tratamiento testigo de fertilización mínima NPK 50-30-30, tratamiento testigo de fertilización alta NPK 180-100-100 y tratamiento testigo químico foliar bayfolan (20-20-20 NPK) + fertilización mínima NPK 50-30-30. La cosecha fue realizada a los 5 meses después de la siembra. La parcela elemental consistió de 36 m<sup>2</sup> y el área por tratamiento fue de 144 m<sup>2</sup>. El distanciamiento de siembra fue de 75 cm entre surco y 40 cm entre planta. La dosis de los tratamientos de los bioles fue de 40%, las aplicaciones foliares se realizaron a los 34, 49, 62, 79 y 94 días después de la siembra teniendo un gasto de solución de 150, 150, 200, 400 y 400 L ha<sup>-1</sup> respectivamente. El suelo en donde se realizó el ensayo fue de tipo franco arenoso con un pH 7.51; CE: 0.89 dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>: 15.20%; MO: 2.80%; N: 0.20%, P: 34.8 ppm; K: 117 ppm. También se instaló un ensayo con plantas de papa cultivar Yungay el diseño fue un DBCA con trece tratamientos y tres repeticiones por tratamientos con arreglo factorial. Se probaron los bioles 1, 5, 6, 9 y 10 preparados en el CIP-Huancayo (Tabla 15), a dos dosis (5% y 40%, la razón de emplear una dosis de 5% fue para evaluar el beneficio-costo y hacer una comparación factible con el fertilizantes químico), comparados con tres testigos: Tratamiento control, tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 NPK + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino y el tratamiento testigo químico foliar bayfolan (20-20-20 NPK) + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino. La cosecha se realizó a los seis meses después de la siembra. La parcela elemental consistió de 21 m<sup>2</sup> y el área por tratamiento fue de 63 m<sup>2</sup>. El distanciamiento de siembra fue de 100 cm entre surco y 35 cm entre planta. Se realizaron ocho aplicaciones durante todo el periodo fenológico del cultivo (tres crecimiento inicial, tres crecimiento lineal y dos en pleno crecimiento). El gasto de la solución fue de 200 L ha<sup>-1</sup> en crecimiento inicial, y de 400 L ha<sup>-1</sup> en crecimiento lineal y en pleno crecimiento. El suelo en donde se realizó el ensayo es de tipo franco con un pH 7.38; CE: 0.53 dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>: 2.0%; MO: 2.94%; N: 0.15%, P: 10.7 ppm; K: 117 ppm.

En San José de Aymara-Huancavelica se instaló un ensayo con plantas de papa cultivar Yungay. El diseño fue un DBCA con trece tratamientos y tres repeticiones por tratamientos con arreglo factorial. Se probaron los bioles 1, 3, 7, 9 y 10 preparados en la comunidad (Tabla 15), a dos dosis (5% y 40 %) comparados con tres testigos: Control (efecto del suelo), 120-120-120 NPK + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino (fertilización ideal) y fertilizante químico bayfolan (20-20-20 NPK) + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol de ovino(edáfico). La cosecha fue realizada seis meses después de la siembra. La parcela elemental consistió de 21 m<sup>2</sup> y el área por tratamiento fue de 63 m<sup>2</sup>. El distanciamiento de siembra fue de 100 cm entre surco y 35 cm entre planta. Se realizaron ocho aplicaciones durante todo el periodo fonológico de la planta de papa (tres en crecimiento inicial, tres en crecimiento lineal y dos en pleno crecimiento). El gasto de la solución fue de 200 L ha<sup>-1</sup> en crecimiento inicial, y de 400 L ha<sup>-1</sup> en crecimiento lineal y en pleno crecimiento. El suelo en donde se realizó este ensayo es considerado como orgánico con un pH 4.46; CE: 0.20 dS m<sup>-1</sup>; CaCO<sub>3</sub>: 0.0%; MO: 14.88%; N: 0.57%, P: 30.0 ppm; K: 153 ppm.

Los datos fueron procesados sin transformar mediante el análisis de variancia (ANVA) y la prueba de comparación de medias de Duncan-Waller ( $\alpha = 0.05$ ). En todos los casos haciendo uso del el software SAS 9.1 (Stastitcal Analysis System).

Para la evaluación del beneficio-costos se empleó el método del presupuesto parcial (CIMMYT, 1988), en los cultivos de papa y maíz-choclo. En el primer cultivo el precio de tubérculo comercial fue de 50 céntimos de sol kg-1 y del tubérculo no comercial de 20 céntimos de sol kg-1. Mientras en el segundo cultivo el precio fue de 50 céntimos de sol kg-1.



A



B



C



D

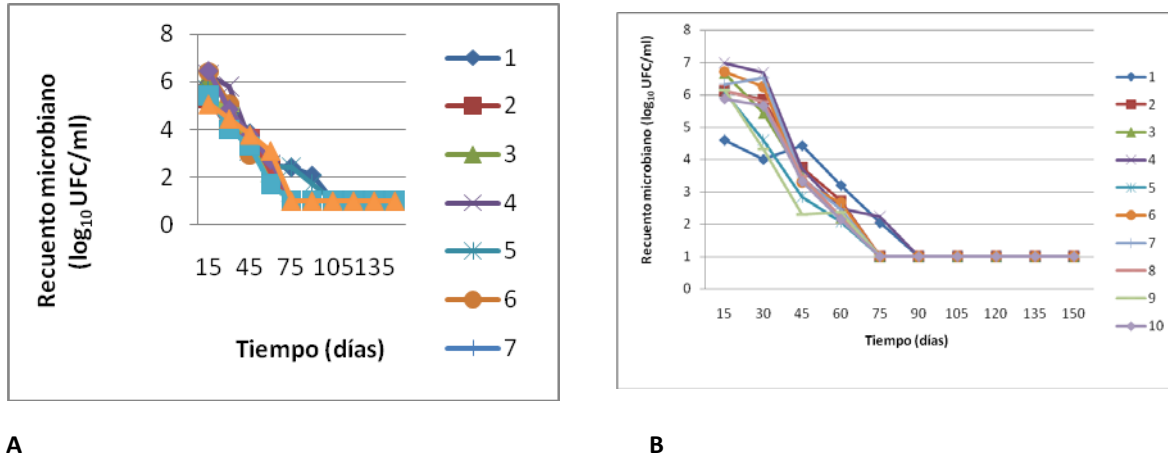
**Foto 11:** Diferentes ensayos instalados en la Costa y Sierra de Perú para evaluar la efectividad de los bioles (campaña 2010-2011). A: Plantas de papa cultivar Canchan a nivel de cobertor CIP-Lima (280 msnm); B: Plantas de maíz a nivel de campo en La Victoria-Huancayo (3300 msnm); C: Plantas de papa cultivar Yungay a nivel de campo en La Victoria-Huancayo (3300 msnm); D: Plantas de papa cultivar Yungay a nivel de campo en la comunidad San José de Aymara-Huancavelica (4000 msnm).

## Resultados y discusiones

### Evaluación de la preparación de los Bioles

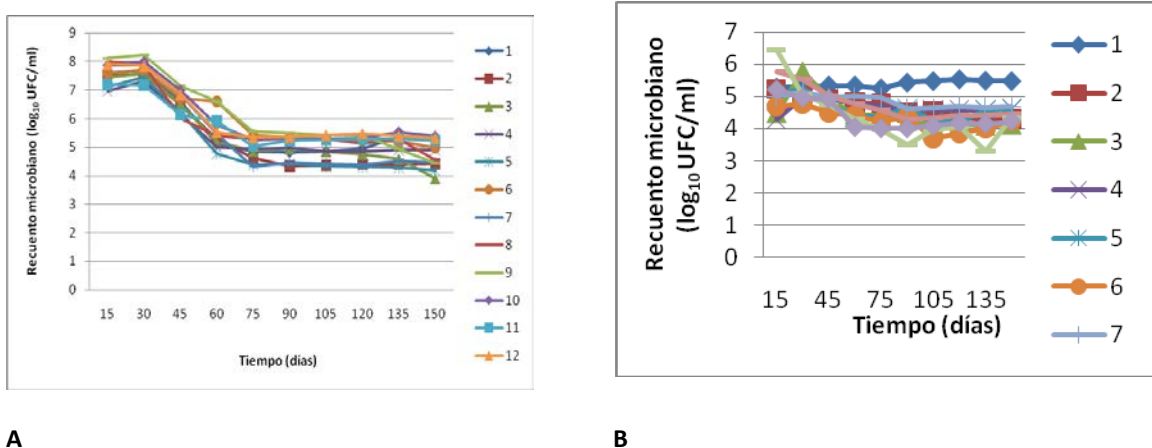
Los resultados respecto a la población microbiana en los bioles y ver el comportamiento de estos a través del tiempo de fermentación se muestran en la Figura 15, la cual exhibe los datos del recuento de la dinámica poblacional de *Pseudomonas* sp en placas expresadas en UFC/ml de biol para los bioles de Lima y Huancayo. Se observa una caída en la curva de crecimiento para la mayoría de bioles a los setenta y cinco días de evaluación, en ambas zonas. Esto se debe a la ausencia de oxígeno en los biodigestores,

siendo las *Pseudomonas* microorganismos aerobios estrictos por lo tanto la población decrece. Respecto a la dinámica poblacional de *Bacillus* sp. (Figura 16), se observa que la población microbiana es constante en el tiempo, con ligeros descensos en algunos casos. Los bacilos hasta los ciento cincuenta días pudieron ser contabilizados, y el cambio en la dinámica poblacional del inicio al final del experimento no fue tan variable debido a la forma de resistencia y su capacidad de adaptación a condiciones adversas.

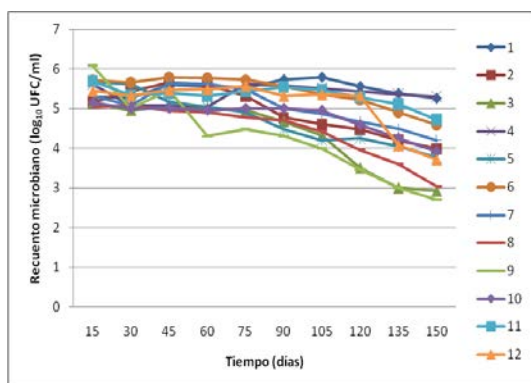


**Figura 15** : Dinámica poblacional de *Pseudomonas* sp. en los bioles. A :Lima; B :Huancayo

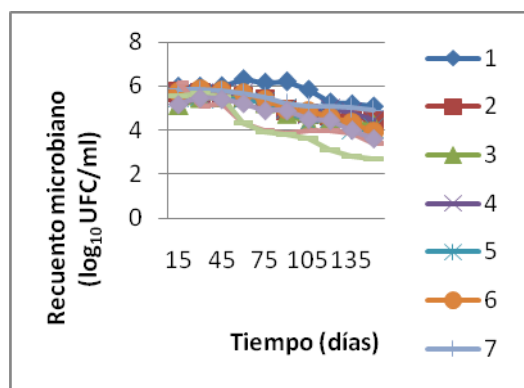
Respecto a la dinámica poblacional de los actinomicetos (Figura 17), se observa que las curvas de crecimiento descenden durante el tiempo de evaluación, demostrando ser más sensibles que los *Bacillus*. Los bioles de Lima en general inician con una carga microbiana homogénea, a los quince días del experimento (primer muestreo), y conforme transcurre el tiempo muestra un descenso considerable para la mayoría de bioles. Los bioles 1 son los que registraron pH de 7 (neutros), mientras los bioles 9, los pH más ácidos en ambas localidades. La cantidad de actinomicetos se mantuvo constante en el pH básico, mientras en él más ácido disminuyó significativamente. Entonces se puede decir que la población de los actinomicetos se encuentra en función del pH del medio.



**Figura 16** : Dinámica poblacional de *Bacillus* sp. en los bioles. A: Lima, B:Huancayo



A



B

**Figura 17 :** Dinámica poblacional de actinomicetos en los bioles. A: Lima; B: Huancayo

Respecto a las cantidades de los coliformes totales en los bioles, en el Perú solo se cuenta con una ley referencial para este tipo de abono, según la ley general de aguas (MINEM, 1969), el biol puede considerarse dentro del nivel III (Aguas para riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales), este propone un límite bacteriológico de 5000 NMP/100ml. En la tabla 16 se aprecia la cantidad de Coliformes totales permitidos según ley observados en los bioles preparados en la zona de Lima, a los 90 días sería el biol 3 el que se puede usar, a los 105 días se pueden usar los bioles 6, 7, 8, 11 y 12, a los 120 días los bioles 9 y 10, a los 135 días el biol 4; y a los 150 días de fermentación el único biol que aun no se puede emplear es el biol 1. Por otro lado, en la Tabla 17 se observa los bioles de la zona de Huancayo en donde a los 90 días los bioles que se pueden emplear son el 3, 5, 6, 8, 9 y 10, a los 105 días el biol 2, a los 120 días el biol 7 y a los 150 días el biol 4. El único biol que no se podría emplear es el biol 1. En ambas zonas el biol 1 contiene la cantidad de Coliformes totales por encima del valor permitido según la ley general de aguas. Esto es atribuido a que este biol no contuvo ninguna fuente fermentadora o acidificadora, y solo estuvo constituido por estiércol y agua. Resumiendo los resultados conseguidos para disminuir el tiempo de preparación de los bioles en términos de cantidades de Coliformes totales en condiciones de sierra y en la época de invierno-otoño de la costa se puede disminuir el tiempo de preparación hasta un 40% (considerando 5 meses de preparación) mediante la acidificación del medio.

**Tabla 16:** Contenido de Coliformes totales (ufc/ml) en los bioles de la zona de Lima (9 junio-9 noviembre 2010)

	15 días	30 días	45 días	60 días	75 días	90 días	105 días	120 días	135 días	150 días
<b>Biol 1</b>	1.6E+11	1.6E+11	2.2E+10	8.0E+09	9.0E+08	1.6E+07	9.0E+06	9.0E+06	1.7E+06	5.0E+04
<b>Biol 2</b>	1.6E+10	9.0E+10	8.0E+09	1.3E+08	2.2E+08	1.6E+07	9.0E+06	1.7E+03	2.0E+01	2.0E+01
<b>Biol 3</b>	1.6E+11	8.0E+10	1.6E+09	1.4E+08	2.2E+05	3.0E+03	4.0E+02	2.0E+01	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 4</b>	1.6E+11	1.6E+11	1.6E+10	4.0E+08	5.0E+07	2.6E+05	3.0E+04	2.2E+04	8.0E+03	1.7E+03
<b>Biol 5</b>	1.7E+10	1.6E+11	1.6E+10	1.3E+09	9.0E+07	8.0E+04	9.0E+04	9.0E+04	3.0E+04	3.4E+03
<b>Biol 6</b>	2.8E+10	1.6E+11	2.2E+10	2.6E+09	8.0E+07	1.3E+05	1.7E+03	4.0E+02	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 7</b>	1.6E+11	1.6E+11	5.0E+10	7.0E+09	4.0E+06	4.0E+05	2.2E+03	4.0E+02	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 8</b>	1.6E+09	1.3E+10	8.0E+08	1.7E+08	2.6E+06	2.0E+04	8.0E+02	2.0E+01	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 9</b>	5.0E+09	3.0E+09	1.7E+08	2.1E+07	8.0E+04	1.3E+05	1.3E+05	4.0E+02	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 10</b>	1.6E+09	2.2E+10	3.0E+09	1.1E+08	5.0E+06	2.6E+05	5.0E+04	2.2E+03	2.0E+01	2.0E+01
<b>Biol 11</b>	1.6E+10	1.6E+11	9.0E+09	9.0E+06	2.6E+05	2.6E+04	2.2E+03	4.0E+02	2.0E+01	2.0E+00
<b>Biol 12</b>	1.6E+10	1.6E+11	9.0E+10	9.0E+08	1.3E+07	1.3E+05	8.0E+03	2.2E+03	1.3E+03	2.0E+01

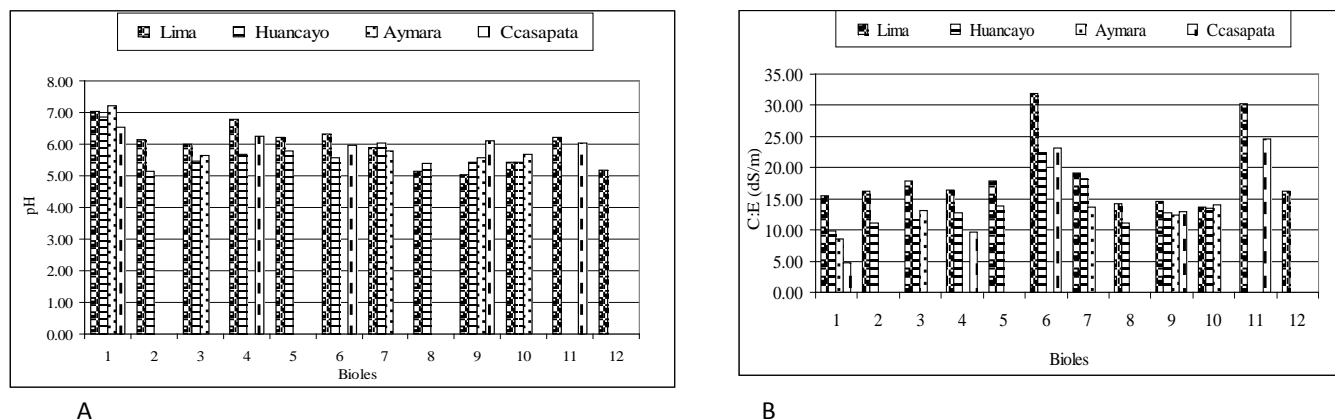
**Tabla 17:** Contenido de *Coliformes totales* (ufc/ml) en los bioles de la zona de Huancayo (5 julio-20 noviembre 2010)

	15 días	30 días	45 días	60 días	75 días	90 días	105 días	120 días	135 días	150 días
<b>Biol 1</b>	1.6E+11	1.6E+10	5.0E+08	9.0E+07	9.0E+08	9.0E+06	1.6E+06	1.1E+06	5.0E+05	1.3E+05
<b>Biol 2</b>	2.2E+09	8.0E+09	1.6E+09	3.0E+07	1.4E+05	6.0E+04	8.0E+03	1.4E+03	2.0E+01	2.0E+00
<b>Biol 3</b>	3.0E+08	2.2E+08	1.7E+08	5.0E+06	9.0E+04	9.0E+03	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01
<b>Biol 4</b>	1.6E+11	8.0E+09	1.6E+09	1.1E+08	2.3E+07	1.7E+07	2.2E+06	1.6E+06	5.0E+04	3.0E+03
<b>Biol 5</b>	1.7E+08	2.1E+07	1.7E+07	3.0E+06	3.0E+06	1.1E+03	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+00
<b>Biol 6</b>	2.3E+09	1.4E+09	1.7E+08	7.0E+06	2.3E+05	2.6E+03	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 7</b>	1.6E+11	1.7E+09	1.4E+08	1.7E+07	1.1E+06	1.7E+05	5.0E+04	5.0E+03	8.0E+02	4.0E+02
<b>Biol 8</b>	1.4E+09	1.1E+09	8.0E+07	3.0E+06	2.6E+06	7.0E+02	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+00	2.0E+00
<b>Biol 9</b>	2.6E+10	8.0E+08	2.6E+07	8.0E+05	5.0E+05	2.2E+03	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+00
<b>Biol 10</b>	1.6E+10	1.1E+10	9.0E+07	1.2E+06	4.0E+05	3.3E+03	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01	2.0E+01

En la Figura 18 se muestra los resultados obtenidos de pH y CE de los bioles en diferentes localidades. El pH más alto arrojó el biol 1, siendo en Lima y Aymara cerca de 7.0 y produjeron biogás; mientras en las demás zonas restantes fueron ácidos. El biol 2, tuvo pH entre 5 y 6 y no produjo biogás. El biol 3 arrojó pH de 5.6 y produjo biogás en la zona de Huancayo y Aymara, pero solo las tres primeras semanas de iniciado la fermentación anaeróbica. El biol 4 tuvo pH de 5.5 a 6.5, produjo biogás durante toda la fase de estudio en Lima y Huancayo. Los bioles 5, 8 y 12, no produjeron biogás en ninguna zona. El biol 6 arrojó un pH de 5.5 y 6.5, produjo biogás durante toda la fase de fermentación en Lima y en la zona de Huancayo hasta la semana catorce. El biol 7 tuvo un pH de 5.8 a 6.0, produjo biogás en tres localidades Lima, Huancayo y Aymará. El biol 9 arrojó un pH de 5.5 a 5.8, produjo biogás en Huancayo y Aymara, las siete primeras semanas. El biol 10 no produjo biogás, tuvo agitación manual y una relación de C/N de 21. El biol 11 tuvo pH de 6.2 produjo biogás las primeras ocho semanas en Lima. La producción de biogas estuvo comprendida entre rangos de pH de 5.5 a 7.2. Sin embargo, en el segundo año en la zona de la sierra con pH entre 7 y 8, no hubo producción de biogás; esta inhibición se puede deber a las diferencia de temperatura entre el día y la noche causando un estrés para las bacterias metanogénicas (Karadag, 2011). Por lo tanto, la producción de biogás en condiciones ácida, es un indicador que garantiza la degradación completa de la materia orgánica, incrementando la calidad de los bioles.

La CE más alta se observó en el biol 6 de 22 a 32 dS m<sup>-1</sup>, seguido del biol 11 de 25 a 30 dS m<sup>-1</sup>; estos resultados fueron influidos por la harina de pescado (Tabla 14). Continúa el biol 7 de 14 a 19 dS m<sup>-1</sup>, debido a la urea. Los demás bioles tuvieron valores menores de 15 dS m<sup>-1</sup>. Entonces se concluye que la CE está influenciada por el tipo, la calidad y la cantidad de insumo ya que, tratamientos con la misma fórmula (insumos) arrojaron resultados diferentes. Así por ejemplo, todos los bioles de Lima tuvieron mayor conductividad eléctrica, esto se debió al estiércol que provenía de animales estabulados, en donde su alimentación es a base de concentrado. La conductividad eléctrica en los bioles se encuentra relacionada con la cantidad de nitrógeno o sodio presentes en los bioles, estos nutrientes pueden ocasionar una alteración en la población microbiana afectando la degradación de la materia orgánica. Por otro lado, en cultivos sensibles a la salinidad la aplicación foliar puede causar un estrés a las plantas.





**Figura 18** Lectura de los análisis químicos. A: pH, B: Conductividad eléctrica de los bioles preparados en el CIP-Lima (9 junio-9 noviembre 2010), CIP-Huancayo (5 julio-20 noviembre 2010), Aymara-Huancavelica (6 julio-21 noviembre 2010) y Ccasapata-Huancavelica (26 agosto 2010-10 enero 2011).

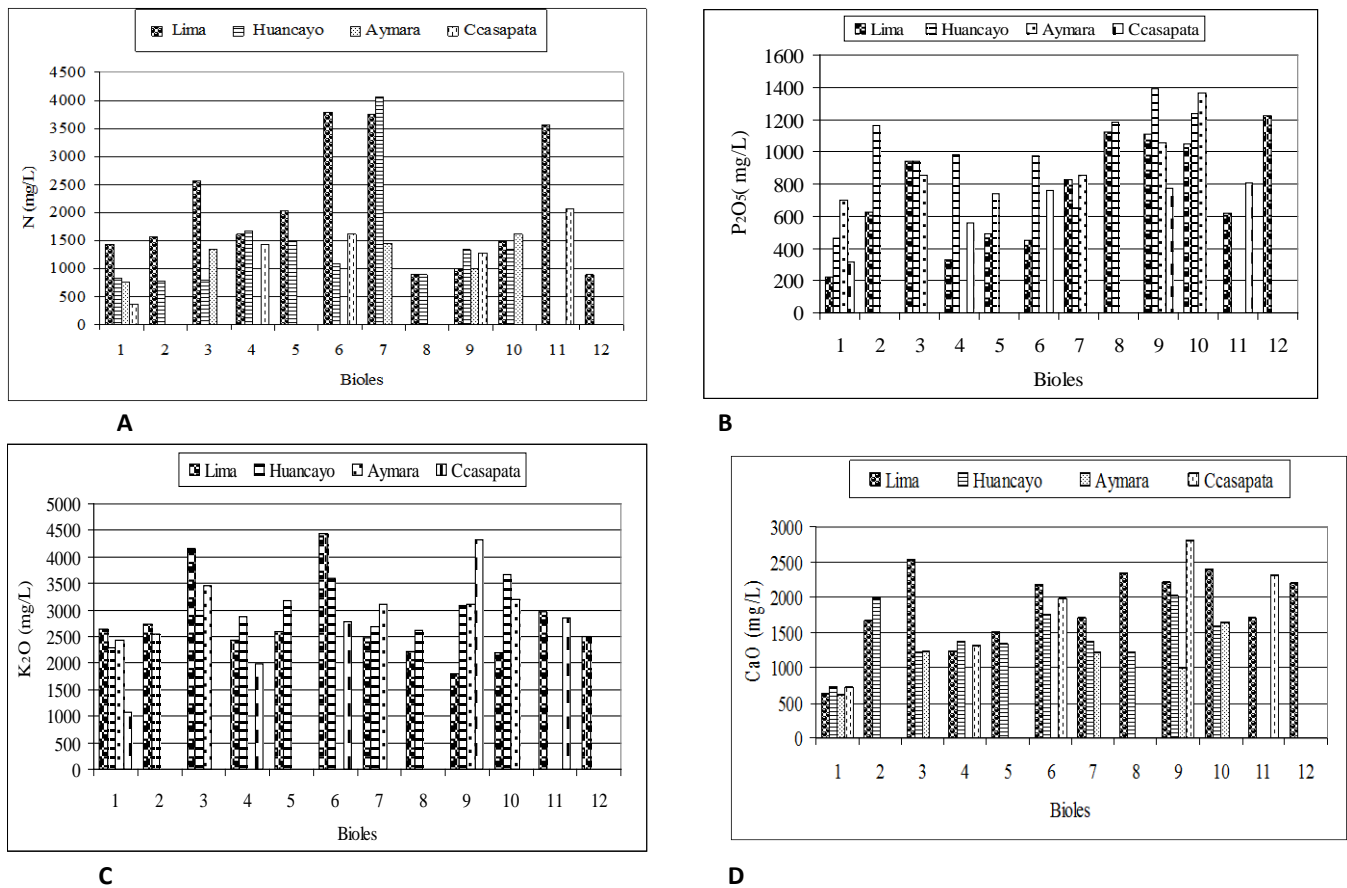
En la Figura 19 se observan los resultados obtenidos de nitrógeno, fósforo, potasio y manganesio de los bioles en diferentes zonas. El contenido de nitrógeno más alto se observó en los bioles 6, 7 y 11 con 4 g L-1 en la zona de Lima. Estos bioles tuvieron una relación C/N de 10 (Tabla 15). En Huancayo los bioles 6 y 7 a pesar de tener igual relación C/N de 10 mostraron resultados de 1 y 4 g L-1 respectivamente. Esta diferencia se debió por los insumos utilizados, en el primero fue la harina de pescado y en el segundo la urea. En Ccasapata-Huancavelica los bioles 6 y 11 corresponde a formulas idénticas, pero los resultados fueron de 1.6 y 2.0 g L-1 respectivamente. En los primeros dos años se encontró que la cantidad de nitrógeno total en los bioles se encuentra influenciado por el insumo, donde los tratamientos con urea arrojaron los valores más altos. En este tercer año se confirma los resultados.

El contenido de fósforo más bajo lo tuvo el biol 1 con valores entre 0.2 y 0.7 g L-1 y pH cercano a 7. Estos resultados son similares a los reportados por Postsch (2004) de 0.43 g L-1 de estiércol de vacuno y pH de 7.96; pero superiores a los reportados por Galindo et al (2007) de 0.052 g L-1 con pH de 6, Ramos (2004) de 0.053 g L-1 con pH de 6.8, Clark (2007) de 0.076 g kg-1 a base de restos de banano y de Calderón, (1980) de 0.048 g kg-1 a base de estiércol de vacuno y pH de 6.7 a 7.9. Mientras los bioles 8, 9, 10 y 12 tuvieron los valores más alto de 1.1 a 1.4 g L-1 y pH ácidos. Coincidiendo con los resultados de Zethner (2002) de 1.01 g L-1 a base de estiércol de vacuno y restos de comida caseras, pero el pH fue de 8.1 Entonces se concluye que la cantidad de fósforo en los bioles se encuentra influenciado por el pH del medio, confirmando los resultados obtenidos en los dos primero años. Por lo tanto, para incrementar el contenido de fósforo en los bioles deben de prepararse en condiciones ácidas. El insumo que se puede usar es el estiércol de vacuno.

El contenido de potasio de los bioles 1, 2, 3 y 4 estuvo entre 1 y 4 g L-1, siendo mayor en la zona de Lima, le siguen las localidades de Aymara y Huancayo, termina la zona de Ccasapata. Este resultado es debido a la cantidad de potasio en el insumo de estiércol de vacuno. Los bioles 5 y 8 arrojaron entre 2.5 y 3.0 g L-1, resultando superior en la zona de Huancayo, detrás Lima; esta diferencia se debió al contenido de potasio en la ceniza. Estos resultados coinciden con Barrios (2001) de 2.297 g L-1, Ponce (1999) de 2.89 g L-1, Postsch, (2004) de 2.66 g kg-1 y Zethner (2002) de 2.94 g kg-1, con estiércol de vacuno y restos de comida caseras. El biol 6 arrojó 4.0 g L-1, donde la zona de Lima tuvo el mayor contenido, debido a la harina de pescado. El biol 9 de la zona de Ccasapata arrojó el contenido más alto con 4.4 g L-1, debido al estiércol de ovino. Coincidiendo con Clark (2007) de 4.2 g kg-1 de restos de banano; pero superior a lo reportado por Calderón (1980) de 0.29 mg kg-1, con estiércol de vacuno. Entonces se concluye que la cantidad de potasio en los bioles no está influenciado por el pH del medio, sino por el

contenido de este elemento en los insumos. Por lo tanto, se recomienda usar el estiércol de ovino como la fuente principal.

El contenido de calcio más bajo arrojó el biol 1 con 600 mg L<sup>-1</sup>, debido a su pH cercano a 7. Coincidiendo con los resultados reportado por Ramos (2004) de 765 mg L<sup>-1</sup> con pH de 6.2, Zethner (2002) de 500 mg kg<sup>-1</sup> con pH de 8.1, pero superiores a los de Barrios (2001) de 230 mg L<sup>-1</sup> con pH de 7.3, Galindo et. al., (2007) de 191 mg L<sup>-1</sup>, con pH básico y Clark (2007) de 56 mg kg<sup>-1</sup> a base de residuos de banano. Los demás bioles arrojaron valores entre 1,100 y 2,500 mg L<sup>-1</sup> y pH ácidos. Estos resultados fueron similares a los de Ponce (1999) de 1,800 mg L<sup>-1</sup> con pH de 6.5, Postsch (2004) de 1,050 mg kg<sup>-1</sup> con pH de 7.96 y Calderón (1980) de 2,100 mg kg<sup>-1</sup> con pH de 6.7. Entonces se concluye que la cantidad de calcio en los bioles está influenciado por el pH del medio y el contenido de este nutriente en los insumos.



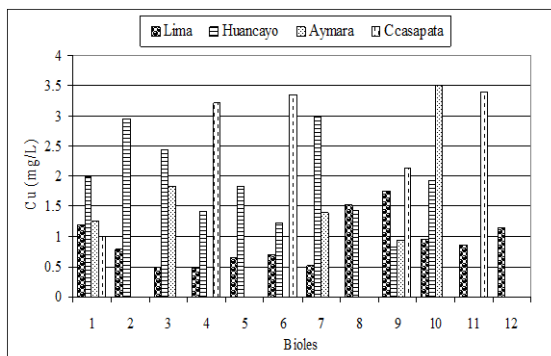
**Figura 19:** Lectura de los análisis químicos. A:nitrógeno, B:fósforo, C: potasio y D: calcio de los bioles preparados en el CIP-Lima (9 junio-9 noviembre 2010), CIP-Huancayo (5 julio-20 noviembre 2010), Aymara-Huancavelica (6 julio-21 noviembre 2010) y Ccasapata-Huancavelica (26 agosto 2010-10 enero 2011).

En la Figura 20 se aprecian los resultados obtenidos de cobre, manganeso, zinc y hierro de los bioles en diferentes zonas. El contenido de cobre en los bioles estuvo entre los 0.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>; siendo más alto en la zona de Huancayo, seguido de Aymara, detrás Lima y finalmente Ccasapata. Coincidiendo con los resultados de Galindo et al. (2007) de 1.1 mg L<sup>-1</sup>. Pero inferiores a los reportado por Ramos (2004) de 24.6 mg L<sup>-1</sup>. Entonces se concluye que la cantidad de cobre en los bioles no se encuentra influenciado por el pH, pero si del contenido de este microelemento en los insumos.

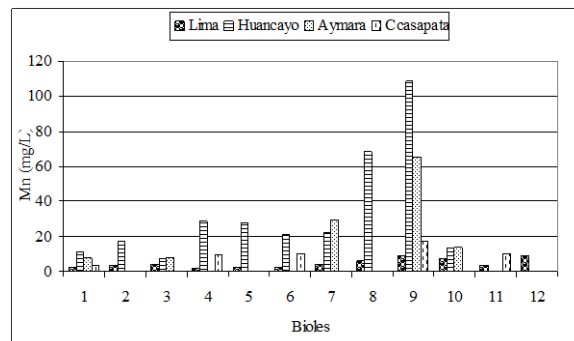
El contenido de manganeso más alto arrojó el biol 9 con valores entre 10 y 110 mg L<sup>-1</sup>, resultando mayor en la localidad de Huancayo, seguido de Aymara, detrás Ccasapata y termina Lima; esto se debió al contenido de este microelemento en el estiércol de ovino. Los demás bioles tuvieron valores menores de 30 mg L<sup>-1</sup>, excepto el biol 8 de la zona de Ccasapata. Estos resultados coinciden con los de Ramos (2004) de 18 a 38.3 mg L<sup>-1</sup> y Galindo (2007) de 3.8 a 4.5 mg L<sup>-1</sup>. Entonces se concluye que el contenido de manganeso en los bioles está influenciado por el contenido de este microelemento en los insumos y por el pH del medio.

El contenido de zinc en los bioles 1, 2, 3, 5 y 10, arrojaron valores entre 1.5 y 6 mg L<sup>-1</sup> siendo mayor en la zona de Huancayo, seguido de Lima, detrás Aymara y termina Ccasapata. Esto se debe a la cantidad de este microelemento en el guano de pollo. Los bioles 6 y 11 tuvieron valores entre 2 y 4.8 mg L<sup>-1</sup>, siendo los más altos en la zona de Ccasapata, debido a la ceniza. Los demás bioles arrojaron valores menores de 4 mg L<sup>-1</sup>. Superiores a los resultados de Galindo et al., (2007) de 0.38 mg L<sup>-1</sup> y Calderón (1980) de 0.05 mg L<sup>-1</sup> de estiércol de vacuno. Pero menores a lo reportado por Ramos (2004) de 19 a 120 mg L<sup>-1</sup>. Entonces la cantidad de zinc en los bioles no está influenciada por el pH del medio; sino de la cantidad de este nutriente en los insumos. Por lo tanto, se recomienda usar el guano de pollo y/o la ceniza.

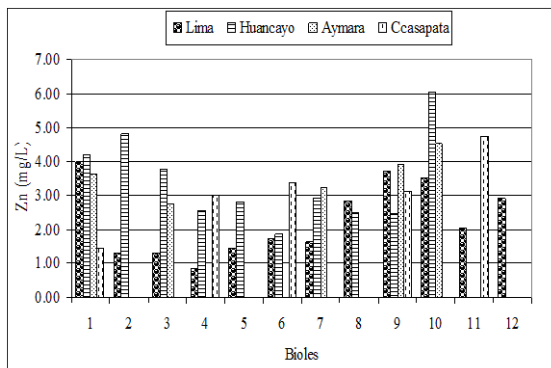
El contenido hierro más bajo arrojó el biol 1 entre 10 y 30 mg L<sup>-1</sup> y pH cercano a 7. Los bioles 2, 3, 4, 5, 8 y 9, arrojaron valores entre 15 y 90 mg L<sup>-1</sup>, siendo los resultados más altos en la zona de Huancayo; debido a los estiércoles. Los bioles 6 y 11 arrojaron los valores más alto entre 40 y 100 mg L<sup>-1</sup>, siendo más altos en Lima, debido a la harina de pescado (Tabla 15). Estos resultados fueron superiores a los reportados por (Galindo et. al., 2007) de 0.3 mg L<sup>-1</sup> y Ramos (2004) de 5 mg L<sup>-1</sup>. Entonces se concluye que la cantidad de hierro en los bioles se encuentra influenciado por el pH del medio y por el contenido de este nutriente en los insumos empleados. Por lo tanto, se recomienda usar la harina de pescado como la fuente principal.



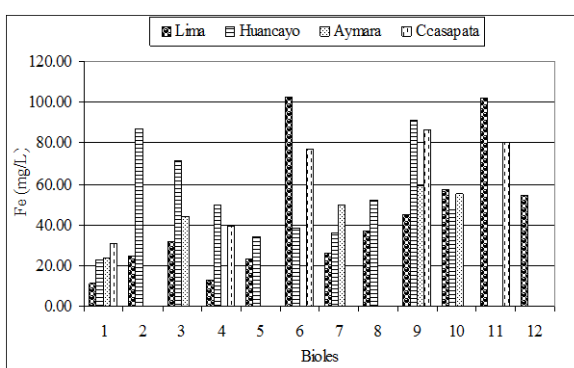
A



B



C



D

**Figura 20:** Lectura de los análisis químicos. A:cobre, B:manganeso, C: zinc y D: hierro de los bioles preparados en el CIP-Lima (9 junio-9 noviembre 2010), CIP-Huancayo (5 julio-20 noviembre 2010), Aymara-Huancavelica (6 julio-21 noviembre 2010) y Ccasapata-Huancavelica (26 agosto 2010-10 enero 2011).

### Evaluación de la efectividad de los bioabonos

En la Tabla 18, se observan los resultados obtenidos con el cultivo de la papa a nivel de cobertor en las variables de peso fresco de follaje, tubérculo, número de tubérculo e índice de cosecha de la zona de Lima. En la variable peso de follaje fresco el mejor tratamiento fue el biol 6, superó al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 11.12 g maceta<sup>-1</sup>, al tratamiento control en 11.63 g maceta<sup>-1</sup>. Sigue el tratamiento de biol 11 que se diferencia con el biol 6 por la agitación manual; detrás los bioles 3 y 10. En la variable peso de tubérculo fresco el mejor tratamiento fue el biol 8 superó al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 5.08 g maceta<sup>-1</sup>, al tratamiento control en 14.41 g maceta<sup>-1</sup>. Siguen los tratamientos de los bioles 7, 9, 10, 5 y 1. En la variable número de tubérculo los mejores tratamientos fueron los bioles 4, 1 y 9.

**Tabla 18:** Rendimiento promedio del cultivo de papa a nivel de cobertor de diferentes tipos de bioles preparados del 9 junio al 9 de noviembre 2010 en la estación del CIP-Lima.

TRATAMIENTOS	Peso follaje fresco g maceta <sup>-1</sup>	Peso tubérculo fresco g maceta <sup>-1</sup>	Numero de tubérculos	% DE ÍNDICE DE COSECHA
Biol 1	14.418 <b>ecd</b>	14.923 <b>a</b>	1.547 <b>ba</b>	50.43 <b>ba</b>
Biol 2	18.428 <b>becd</b>	11.898 <b>bac</b>	1.362 <b>bdac</b>	34.16 <b>bc</b>
Biol 3	15.005 <b>ecd</b>	13.950 <b>ba</b>	1.492 <b>bac</b>	46.03 <b>ba</b>
Biol 4	14.778 <b>ecd</b>	13.123 <b>ba</b>	1.699 <b>a</b>	47.00 <b>ba</b>
Biol 5	14.358 <b>ecd</b>	16.633 <b>a</b>	1.313 <b>bdac</b>	52.72 <b>ba</b>
Biol 6	26.558 <b>a</b>	0.00 <b>d</b>	0.00 <b>e</b>	0.00 <b>e</b>
Biol 7	16.778 <b>ecd</b>	17.663 <b>a</b>	1.475 <b>bac</b>	51.05 <b>ba</b>
Biol 8	13.288 <b>e</b>	18.178 <b>a</b>	1.402 <b>bac</b>	58.12 <b>a</b>
Biol 9	13.635 <b>ed</b>	16.855 <b>a</b>	1.547 <b>ba</b>	55.22 <b>a</b>
Biol 10	19.468 <b>bcd</b>	16.823 <b>a</b>	1.475 <b>bac</b>	45.77 <b>ba</b>
Biol 11	21.595 <b>ba</b>	5.313 <b>bdc</b>	1.095 <b>ebdc</b>	18.49 <b>edc</b>
Biol 12	18.428 <b>becd</b>	11.965 <b>bac</b>	1.256 <b>bdac</b>	32.19 <b>bdc</b>
Control	14.928 <b>ecd</b>	3.765 <b>dc</b>	0.836 <b>ed</b>	11.43 <b>ed</b>
Fertilizante	15.438 <b>becd</b>	13.088 <b>ba</b>	1.402 <b>bac</b>	45.49 <b>ba</b>

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente diferentes (Waller,  $\alpha = 0.05$ )

En la Tabla 19 se observan los resultados conseguidos a nivel de campo en las variables de peso de mazorca y follaje de la zona de Huancayo. En la variable peso de mazorca los rendimientos más alto se consiguieron con el tratamiento del biol 6 + fertilización NPK de 50-30-30, el cual superó al tratamiento testigo químico foliar + fertilización NPK 50-30-30 en 35.47 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización NPK 50-30-30 en 38.43 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización NPK de 180-100-100 en 42.05 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 49.69 TM ha<sup>-1</sup>. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R<sup>2</sup>) con el peso de la mazorca en las variables de: pH: -0.18; CE: -0.58; N: 0.13; P:-0.18; K: 0.58; Mg: 0.13; Ca:-0.18; Na: 0.54; Cu:-0.65; Zn: -0.60; Mn: 0.66; Fe: 0.01; B:-0.16; S: 0.15. Según los resultados no existe correlación entre el contenido de nutriente en los bioles y el peso de la mazorca.

En la variable peso de follaje fresco, el tratamiento de biol 6 + fertilización NPK de 50-30-30 superó al tratamiento testigo químico foliar + fertilización NPK de 50-30-30 en 27 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo

de fertilización NPK 50-30-30 en 53 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización NPK 180-100-100 en 62 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 73.44 TM ha<sup>-1</sup>. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R<sup>2</sup>) con el peso del follaje en las variables de: pH: -0.03; CE: 0.30; N: 0.12; P: -0.03; K: 0.30; Mg: 0.12; Ca: -0.03; Na: 0.17; Cu: -0.59; Zn: -0.63; Mn: 0.59; Fe: -0.20; B: -0.50; S: -0.11. Según los resultados no existe correlación alguna entre los nutrientes y el peso fresco del follaje.

**Tabla 19:** Rendimiento promedio del cultivo de maíz amiláceo a nivel de campo de diferentes tipos de bioles preparados del 5 junio al 20 de noviembre 2010 en la estación del CIP-Huancayo.

Peso mazorca		Peso follaje	
TM ha <sup>-1</sup>	Tratamientos	TM ha <sup>-1</sup>	Tratamientos
74.01 <b>a</b>	Biol6 + (50-30-30, NPK)	167.59 <b>a</b>	Biol6+ (50-30-30, NPK)
69.82 <b>ba</b>	Biol9+ (50-30-30, NPK)	156.11 <b>b</b>	Biol8+ (50-30-30, NPK)
67.20 <b>b</b>	Biol8+ (50-30-30, NPK)	155.53 <b>b</b>	Biol5+ (50-30-30, NPK)
58.25 <b>c</b>	Biol7+ (50-30-30, NPK)	154.94 <b>b</b>	Biol4+ (50-30-30, NPK)
55.72 <b>dc</b>	Biol5+ (50-30-30, NPK)	153.46 <b>b</b>	Biol9+ (50-30-30, NPK)
52.31 <b>d</b>	Biol4+ (50-30-30, NPK)	147.22 <b>db</b>	Biol7+ (50-30-30, NPK)
46.36 <b>e</b>	Biol3+ (50-30-30, NPK)	140.71 <b>cd</b>	Fertilizante foliar + (50-30-30, NPK)
45.68 <b>e</b>	Biol10+ (50-30-30, NPK)	134.35 <b>ed</b>	Biol1+ (50-30-30, NPK)
44.84 <b>e</b>	Biol1+ (50-30-30, NPK)	130.09 <b>ef</b>	Biol2+ (50-30-30, NPK)
43.75 <b>e</b>	Biol2+ (50-30-30, NPK)	126.10 <b>ef</b>	Biol10+ (50-30-30, NPK)
38.54 <b>f</b>	Fertilizante foliar +(50-30-30, NPK)	122.69 <b>gf</b>	Biol3+ (50-30-30, NPK)
35.58 <b>gf</b>	Fertilizante edáfico (50-30-30, NPK)	114.18 <b>gh</b>	Fertilizante edáfico(50-30-30, NPK)
31.51 <b>g</b>	Fertilizante edáfico (180-100-100, NPK)	105.84 <b>h</b>	Fertilizante edáfico (180-100-100, NPK)
24.32 <b>h</b>	Control	93.56 <b>i</b>	Control

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas, (Waller  $\alpha = 0.05$ )

En la Tabla 20, se observan los resultados obtenidos a nivel de campo en las variables de peso de tubérculos totales y comerciales del cultivo de papa cultivar Yungay de la zona de Huancayo. En la variable peso de tubérculos totales, el tratamiento del biol 1 de dosis 5 % superó al tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 en 10.04 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 12.92 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 33.21 TM ha<sup>-1</sup>. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R<sup>2</sup>) y el peso de tubérculos totales en las variables de: pH: 0.85; CE: 0.22; N: -0.34; P: 0.85; K: -0.22; Mg: -0.34; Ca: 0.85; Na: -0.12; Cu: 0.80; Zn: 0.21; Mn: -0.79; Fe: -0.74; S: -0.41. Según los resultados existe correlación directa entre el peso de tubérculos totales y el pH, el fósforo, el calcio y el cobre. En la variable peso de tubérculos comerciales el tratamiento del biol 1 de dosis 5% superó al tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 en 10.88 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 11.406 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 28.12 TM ha<sup>-1</sup>. Por otro parte, para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación (R<sup>2</sup>) y el peso de tubérculos comerciales en las variables de: pH: 0.83; CE: -0.35; N: -0.37; P: 0.83; K: -0.35; Mg: -0.37; Ca: 0.83; Na: -0.26; Cu: 0.87; Zn: 0.32; Mn: -0.78; Fe: -0.71;; S: -0.45. Según los resultados existe correlación directa entre el peso de tubérculos comerciales y el pH, el fósforo, el calcio y el cobre.

**Tabla 20:** Rendimiento promedio del cultivo de papa a nivel de campo evaluados en la variables peso de tubérculos totales y comerciales de diferentes bioles preparados del 5 junio al 20 de noviembre 2010 en la estación del CIP-Huancayo.

Peso de tubérculos totales		Peso de tubérculos comerciales	
TM ha <sup>-1</sup>	T	TM ha <sup>-1</sup>	T
52.55 <b>a</b>	Biol 1 al 5%	40.93 <b>a</b>	Biol 1 al 5%
43.47 <b>b</b>	Biol 5 al 5%	33.69 <b>b</b>	Biol 6 al 5%
43.08 <b>b</b>	Biol 6 al 5%	32.79 <b>cb</b>	Biol 5 al 5%
42.226 <b>cb</b>	(120-120-120, NPK) edáfico	31.21 <b>cbd</b>	Biol 5 al 40%
41.04 <b>cb</b>	Biol 5 al 40%	30.845 <b>cbd</b>	Biol 10 al 40%
39.72 <b>cb</b>	Biol 10 al 40%	30.054 <b>cbd</b>	(120-120-120, NPK) edáfico
39.33 <b>cb</b>	Fertilizante químico foliar	29.524 <b>cd</b>	Fertilizante químico foliar
39.185 <b>cb</b>	Biol 1 al 40%	28.982 <b>cd</b>	Biol 9 al 5%
39.179 <b>cb</b>	Biol 9 al 5%	28.548 <b>ed</b>	Biol 10 al 5%
38.94 <b>cb</b>	Biol 10 al 5%	28.19 <b>ed</b>	Biol 1 al 40%
37.506 <b>c</b>	Biol 6 al 40%	24.429 <b>fe</b>	Biol 6 al 40%
30.756 <b>d</b>	Biol 9 al 40%	22.224 <b>f</b>	Biol 9 al 40%
19.074 <b>e</b>	Control	12.821 <b>g</b>	Control

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas, (Waller  $\alpha = 0.05$ )

En la Tabla 21, se aprecian los resultados obtenidos a nivel de campo en las variables de peso de tubérculos totales y comerciales de la zona de San José de Aymara-Huancavelica. En la variable peso de tubérculos totales, el tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 superó al tratamiento del biol 9 de dosis 40% en 8.47 TM ha<sup>-1</sup>, al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 4.92 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 22.29 TM ha<sup>-1</sup>. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación ( $R^2$ ) y el peso de tubérculos totales en las variables de: pH: -0.62; CE: 0.73; N: 0.71; P: 0.91; K: 0.40; Mg: 0.82; Ca: 0.79; Na: 0.59; Cu: 0.63; Zn: 0.70; Mn: 0.33; Fe: 0.88; B:-0.46; S: 0.57. Según los resultados existe correlación directa entre el peso de tubérculos totales y el contenido de fósforo, magnesio y hierro. En la variable peso de tubérculos comerciales, el tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 resulto estadísticamente similar al tratamiento de biol 10 de dosis 40%, pero estadísticamente superó al tratamiento testigo de fertilización química foliar en 9.70 TM ha<sup>-1</sup> y al tratamiento control en 19.63 TM ha<sup>-1</sup>. Para evaluar la influencia de los nutrientes en los bioles se realizó un análisis de correlación ( $R^2$ ) y el peso de tubérculos comerciales en las variables de: pH: -0.46; CE: 0.61; N: 0.69; P: 0.94; K: 0.30; Mg: 0.71; Ca: 0.80; Na: 0.61; Cu: 0.80; Zn: 0.80; Mn: 0.10; Fe: 0.76; S: 0.62. Según los resultados existe correlación significativa directa entre el peso de tubérculos comerciales y el contenido de fósforo, calcio, cobre y zinc.

**Tabla 21:** Rendimiento promedio del cultivo de papa a nivel de campo evaluados en la variables peso de tubérculos totales y comerciales de diferentes bioles preparados del 6 junio al 21 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara.

Peso de tubérculos totales		Peso de tubérculos comerciales	
TM ha <sup>-1</sup>	T	TM ha <sup>-1</sup>	T
40.131a	(120-120-120, NPK) edáfico	25.6786 a	(120-120-120, NPK) edáfico
35.208 b	Fertilizantequímico foliar	24.2738 a	Biol 10 al 40%
31.714 cb	Biol 9 al 40%	19.744 b	Biol 9 al 40%
31.583 cb	Biol 10 al 40%	18.2083 cb	Biol 10 al 5%
31.387 cb	Biol 10 al 5%	18.0119 cb	Biol 7 al 40%
30.512 c	Biol 7 al 40%	15.9702 cd	Fertilizante químico foliar
25.792 d	Biol 3 al 40%	14.0833 ed	Biol 3 al 40%
24.03 ed	Biol 7 al 5%	13.4881 ed	Biol 1 al 40%
23.452 ed	Biol 1 al 40%	11.9405 ef	Biol 7 al 5%
22.905 ed	Biol 9 al 5%	10.494 f	Biol 9 al 5%
20.077 ef	Biol 3 al 5%	10.3155 f	Biol 3 al 5%
19.69 ef	Biol 1 al 5%	10.1786 f	Biol 1 al 5%
17.833 f	Control	6.0476 g	Control

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas, (Waller  $\alpha = 0.05$ )

En la Tabla 22 se aprecian los resultados de peso fresco de tubérculos totales y comerciales evaluados a dos dosis en los bioles preparados en Huancayo y Huancavelica. En Huancayo la dosis de los bioles 5% superó estadísticamente a 40%; en las variables de rendimientos de peso de tubérculos totales, comerciales. Mientras en Huancavelica los bioles de dosis 40% superaron estadísticamente a los bioles de dosis 5%, en las variables de peso de tubérculos totales y comerciales.

**Tabla 22:** Rendimientos promedio del cultivo de papa en las variables peso de tubérculos totales y comerciales de los bioles de la zona de Huancayo y Huancavelica.

Peso de tubérculos totales en Huancayo		Peso de tubérculos comerciales en Huancayo		Peso de tubérculos totales en Huancavelica		Peso de tubérculos comerciales en Huancavelica	
TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	dosis	TM ha <sup>-1</sup>	dosis
43.44 a	5%	32.98 a	5%	28.61 a	40%	17.92 a	40%
37.64 b	40%	27.38 b	40%	23.61 b	5%	12.22 b	5%

Letras diferentes entre columnas son estadísticamente significativas, (Waller  $\alpha = 0.05$ )

En la evaluación del beneficio-costo de los bioles en el cultivo de maíz-choclo en la zona de Huancayo el mayor beneficio-costo se consiguió con el biol 8, seguido por los bioles 7 y 4; más atrás los bioles 6, 1, el tratamiento testigo de fertilización NPK 50-30-30, los bioles 2, 3 y 10; finalizan el biol 9, el tratamiento testigo de fertilización química foliar y el tratamiento testigo de fertilización NPK 180-100-100 (Tabla 23). En el cultivo de la papa el tratamiento en el que se observa el mayor rendimiento fue el biol 1, quien obtuvo el mayor beneficio-costo, seguido por los bioles 5, 10 y 9; más atrás el biol 6, el tratamiento de fertilización química foliar y el tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 (Tabla 24). En la zona de Aymara-Huancavelica en el cultivo de papa el mayor rendimiento arrojó el biol 10, el cual obtuvo el mayor beneficio-costo, seguido por el biol 1; más atrás los bioles 7, 3 y 9; finalizan el tratamiento testigo de fertilización química foliar y el tratamiento testigo de fertilización NPK 120-120-120 (Tabla 25).





**Tabla 23:** Evaluación del presupuesto parcial del ensayo de maíz amiláceo a nivel de campo de diferentes tipos de bioles preparados del 5 junio al 20 de noviembre 2010 en la estación del CIP-Huancayo.

	bio1	bio2	bio3	bio4	bio5	bio6	bio7	bio8	bio9	bio10	Edáfico*	foliar	Edáfico**	Control
1. Rendimiento kg ha <sup>-1</sup>	44,840	43,750	46,360	52,310	55,720	74,010	58,250	67,200	68,820	45,680	31,510	38,540	35,580	24,320
2. Beneficio bruto S/ ha <sup>-1</sup>	22,420	21,875	23,180	26,155	27,860	37,005	29,125	33,600	34,410	22,840	15,755	19,270	17,790	12,160
3. Costo fertilizante edáfico S/ ha <sup>-1</sup>	371	371	371	371	371	371	371	371	371	371	992	371	371	0
4. Costo fertilizante foliar S/ ha <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	286	0	0
5. Costo biol S/ ha <sup>-1</sup>	77	127	196	119	179	374	180	145	499	185	0	0	0	0
5.1 Insumos	40	90	159	82	142	337	143	108	462	148	0	0	0	0
5.2 Mano de obra	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0
5.3 Cilindro	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	0	0	0	0
6. Costo total (3, 4 y 5) S/ ha <sup>-1</sup>	448	498	567	490	550	745	551	516	870	556	992	657	371	-
7. Beneficio neto (2-6) S/ ha <sup>-1</sup>	21,919	21,324	22,560	25,612	27,257	36,207	28,521	33,031	33,487	22,231	14,763	18,613	17,419	12,160
B/C (7:6)	49	43	40	52	50	49	52	64	39	40	15	28	47	-

\* Edáfico 180-100-100 NPK

\*\* Edáfico 50-30-30 NPK

**Tabla 24:** Evaluación del presupuesto parcial en el ensayo de papa a nivel de campo de diferentes tipos de bioles preparados del 5 junio al 20 de noviembre 2010 en la estación del CIP-Huancayo.

	<b>T1 5%</b>	<b>T1 40%</b>	<b>T5 5%</b>	<b>T5 40%</b>	<b>T6 5%</b>	<b>T6 40%</b>	<b>T9 5%</b>	<b>T9 40%</b>	<b>T10 5%</b>	<b>T10 40%</b>	<b>Edáfico *</b>	<b>foliar</b>	<b>Control</b>
1.Rendimiento kg ha <sup>-1</sup>	51,734	38,702	42,576	41,043	42,333	37,206	38,905	35,006	38,619	39,399	30,054	29,524	12,821
2.Beneficio bruto S/ ha <sup>-1</sup>	34,905	24,654	28,189	24,654	28,681	22,100	25,170	20,333	24,853	26,387	26,011	25,305	11,429
2.1 Beneficio tubérculo comercial S/ ha <sup>-1</sup>	32,744	22,552	26,232	22,552	26,952	19,543	23,186	17,776	22,838	24,676	24043.2	23,619	10,257
2.2 Beneficio tubérculo no comercial S/ ha <sup>-1</sup>	2,161	2,102	1,957	2,102	1,729	2,557	1,985	2,557	2,014	1,711	1,968	1,686	1,172
3. Costo fertilizante edáfico S/ ha <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1170	0	0
4.Costo fertilizante foliar S/ ha <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	286	0
5.Costo biol S/ ha <sup>-1</sup>	47	117	73	321	121	711	152	960	74	333	0	0	0
5.1 Insumos	10	80	36	284	84	674	115	923	37	296	0	0	0
5.2 Mano de obra	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0
5.3 Cilindro	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27			
6.Costo total (3, 4 y 5) S/. ha <sup>-1</sup>	47	117	73	321	121	711	152	960	74	333	1170	286	0
7.Beneficio neto (2-6) S/ ha <sup>-1</sup>	34,858	24,537	26,159	24,333	28,559	21,389	25,018	19,373	24,779	26,053	24,841	25,019	11,429
B/C (7:6)	741	209	361	76	236	30	164	20	335	78	21	87	-

\*120-120-120 NPK

**Tabla 25:** Evaluación del presupuesto parcial en el ensayo de papa a nivel de campo de diferentes bioles preparados del 6 junio al 21 de noviembre 2010, en la comunidad de San José de Aymara.

	T1 5%	T1 40%	T3 5%	T3 40%	T7 5%	T7 40%	T9 5%	T9 40%	T10 5%	T1 40%	Edáfico*	foliar	Control
1.Rendimiento kg ha <sup>-1</sup>	19,184	22,594	19,374	24,094	23,26	29,332	22,244	30,865	30,434	38,790	38,041	25,559	17,219
2.Beneficio bruto S/ ha <sup>-1</sup>	9,944	12,607	10,064	13,269	11,81	16,673	10,745	18,017	17,012	22,322	23,015	14,694	7,072
2.1 Beneficio tubérculo comercial S/ ha <sup>-1</sup>	8,142	10,785	8,252	11,266	9,552	14,409	8,395	15,792	14,566	19,418	20542.4	12,776	4,838
2.2 Beneficio tubérculo no comercial S/ ha <sup>-1</sup>	1,801	1,823	1,812	2,002	2,265	2,264	2,350	2,225	2,445	2,903	2472.6	1,918	2,234
3. Costo fertilizante edáfico S/ ha <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1170	0	0
4.Costo fertilizante foliar S/ ha <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	286	0
5.Costo biol S/ ha <sup>-1</sup>	47	117	77	355	73	324	152	960	74	333			
5.1 Insumos	10	80	40	318	36	287	115	923	37	296			
5.2 Mano de obra	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
5.3 Cilindro	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27			
6.Costo total (3, 4 y 5) S/ ha <sup>-1</sup>	47	117	77	355	73	324	152	960	74	333	1170	286	0
7.Beneficio neto (2-6) S/ ha <sup>-1</sup>	9,897	12,490	8,175	12,914	11,74	16,349	10,593	17,057	16,938	21,988	21,845	14,408	7,072
B/C (7:6)	210	106	107	36	161	50	70	18	229	66	19	50	-

\* 120-120-120 NPK

## Conclusiones

La producción de biogás en los bioles se produce cuando el pH se encuentra entre 5.5 y 7.0, y relaciones C/N de 5, 10 y 21. Por lo tanto, la producción de biogás en condiciones ácida, es un indicador que garantiza la descomposición de la materia orgánica en sustancias que favorecen el desarrollo de los cultivos incrementando la calidad de los bioles. El pH de 7 fue el más elevado observado en las cuatro zonas de estudios siendo el biol 1, el cual estuvo constituido por mezcla de estiércol con relación C/N de 21, siendo la población microbiana de *Actinomycetes*, *Bacillus* y *Coliformes totales* los más altos.

La conductividad eléctrica en los bioles se encuentra influenciada por el tipo, la calidad y la cantidad de insumo que se utilice. Entonces se recomienda usar insumos de baja CE para no causar una alteración en la población microbiana que pueda afectar la descomposición de la materia orgánica. Por otro lado, en cultivos sensibles a la salinidad la aplicación foliar de los bioles de alta CE puede causar un estrés a las plantas.

El contenido de los elementos N, K, Cu y Zn, en los bioles está influenciado por el contenido de estos elementos en los insumos que se utilice; mientras los elementos P, Ca, Mn, y Fe se encuentra influenciado por el pH del medio. Por lo tanto, la producción de los bioles debe darse en condiciones de pH (6.0 – 7.0). Esto se consigue utilizando insumos como: la leche, levadura y la melaza. Ya que en esta condición se asegura la disponibilidad de los nutrientes P, Ca, Mn y Fe, indispensable en zonas en donde el cultivo tiene limitaciones para la absorción de los nutrientes (suelos fuertemente ácidos). Por otro lado, los nutrientes (N, K, Na, S, Cu y Zn) se encuentran influenciado por el insumo, entonces se recomienda usar el estiércol de vacuno como la fuente principal.

En Lima a nivel de cobertor en el cultivo de papa en la variable peso de follaje fresco el mejor biol fue el biol 6 de relación C/N 10, este biol causo un mayor desarrollo del follaje ya que arrojó un alto contenido de nitrógeno, y en la variable peso de tubérculos fresco fueron los bioles 8, 7, 9, 10, 1 y 5. Estos bioles son estadísticamente iguales en rendimientos, entonces se recomienda usar el biol 1, porque está constituido por mezcla de estiércol y relación C/N de 21.

En la zona de Huancayo a nivel de campo en el cultivo de maíz-amiláceo los rendimientos más alto en la variable peso fresco de mazorca y follaje se consigue con el biol 6 de relación C/N 10. El análisis de correlación entre el contenido de nutrientes en los bioles y el peso de la mazorca y follaje no se encontró correlación alguna. Entonces para el cultivo de maíz se recomienda usar bioles con relación C/N de 10, provenientes de insumos orgánicos.

En la zona de Huancayo a nivel de campo en el cultivo de papa los mejores rendimientos en las variables peso de tubérculos totales y comerciales fue el biol 1 de relación C/N 21 constituido por mezcla de estiércol. La evaluación de la dosis de los bioles 5 % superó a 40 %, dicha evaluación fue realizado en un suelo de pH 7.36 Por lo tanto, en suelos neutros se necesita menor cantidad de biol, porque las condiciones en el cual se desarrolla el cultivo son favorables para la adsorción de los nutrientes del suelo.

En la zona de Aymara-Huancavelica a nivel de campo en el cultivo de papa los mejores rendimientos en la variable de peso de tubérculos totales fue el tratamiento testigo de fertilización alta NPK 120-120-120, y en la variable peso de tubérculos comerciales fueron los tratamientos de fertilización alta de NPK 120-120-120 y el biol 10. En esta última variable el biol 10 igualo al tratamiento testigo de fertilización alta y superó al tratamiento testigo de fertilización foliar lo cual es muy prometedor. Este biol tuvo una relación C/N de 21 constituido por insumos que acidifican (melaza, leche y levadura) más la agitación manual. La evaluación de la dosis de bioles 40% supero a 5%, dicha evaluación fue realizado en un suelo de pH 4.46. Por lo tanto, en suelos ácidos se

necesita mayor cantidad de biol para ver el efecto en los cultivos, ya que en dichos suelos los cultivos tienen dificultad para adsorber los nutrientes del suelo.

En la zona de la Victoria-Huancayo y San José de Aymara-Huancavelica los nutrientes de los bioles que tuvieron correlación directa con el rendimiento en el cultivo de la papa fueron: el fósforo, calcio, magnesio y cobre. Dichos nutrientes se encuentran influenciados por el pH en los bioles a excepción del cobre.

Las nuevas tecnologías “bioles” evaluadas en términos de beneficio-costos comparadas con los fertilizantes químicos en los cultivos de maíz amiláceo y papa, resultaron más rentables para el agricultor, por lo tanto una alternativa económicamente sostenible.

Se ha logrado reducir el tiempo de preparación de los bioles en términos de cantidades de *Coliformes totales* en condiciones de la sierra y costa hasta un 40% (considerando 5 meses de preparación). Esto se puede conseguir mediante la acidificación del medio con los insumos ya descritos. Por lo tanto, los agricultores en un año pueden preparar sus bioles consiguiendo cuatro cosechas de estos abonos fermentados.

### **Logros de los objetivos**

El logro de los objetivos está al 100 % según el tiempo programado

### **Problemas o dificultades**

En esta etapa se tuvieron problemas para hacer el análisis de las fitohormonas en los bioles ya que, en el Perú no se encontró laboratorio que pueda realizar este tipo de pruebas porque no es de rutina. Esto implica que algunos de los resultados obtenidos podrían estar explicados por la presencia de fitohormonas, lo cual explicaría la ausencia de correlación entre contenido de nutrientes y rendimiento en algunos de los casos analizados.

### **Revisión bibliográfica**

- Barrios, F. 2001. Efecto de diferentes concentraciones de biol aplicado al suelo y foliarmente en el cultivo de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis Ing. Agrónomo. Lima –Peru. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).
- Calderón, C. 1980. Resultados de utilización de biol en diferentes cultivos. Cajamarca-Perú. ITINTEC.
- CIMMYT 1989. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. E.R. Mexico D.F., Mexico 79p.
- Clark, W., y P. Radninge. 2007. Digestion of waste bananas to generate energy in Australia. Australia.
- Galindo, A., C. Jeronimo, E. Spaans, y M. Weil. 2007. Los abonos líquidos fermentados y su efectividad en las plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) Tierra tropical 3 (1): 91-96.
- Karadag, D. 2011. Anaerobic H<sub>2</sub> production at elevated temperature (60 °C) by enriched mixed consortia from mesophilic source. International journal of hydrogen energy 36: 458-465.
- MINEM. (Ministerio de Energía y Minas) 1969. Ley General de Aguas - Decreto Ley N° 17752. (En Línea). Disponible en: <http://intranet2.minem.gob.pe/web/archivos/dgaam/publicaciones/compendio99/17752.pdf>. Consultado Agosto 2010.
- Ponce, S. 1999. Evaluación de Biol. Extracto de Humus de lombriz y fertilizantes en el manejo hidropónico de dos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Lima-Peru. UNALM.
- Potsch, E., E. Pfundtner, R. Resch, y P. Much. 2004. Stoffliche Zusammensetzung und Ausbringungseigenschaften von Gärresten aus Biogasanlagen (composición y

- características de uso de los restos fermentados de las plantas de biogas); Alpenlandisches Expertenforum, 18-19 Marzo 2004. Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein. Irtding, Austria.
- Ramos, F. 2004. Efecto de bioles en la producción de maíz morado. Tesis de Ing. Agrónomo. Lima-Perú. UNALM.
- Zethner, G., E. Pfundtner y J. Humer. 2002. Qualität Von Abfällen aus Biogasanlagen (Calidad de los residuos de las plantas de biogas) Federal Environment Agency, Austria.

#### 1.4.4 ACTIVIDAD 5.1 EVALUACIÓN PARTICIPATIVA CON BIOFERTILIZANTE

##### **Objetivo de la actividad:**

- Evaluación participativa con pequeños horticultores
- Identificar los criterios de selección de los agricultores para una tecnología relacionada a los bioinsumos.
- Seleccionar las mejores tecnologías en floración y cosecha del cultivo de papa.

##### **Indicadores de la actividad:**

- Selección y evaluación de cepas bacterianas en campo de lechuga.
- Criterios de selección identificados en el cultivo de lechuga
- Identificación y selección de las mejores tecnologías por los agricultores.

##### **Material y Métodos:**

Las evaluación participativa se realizó durante la ejecución del experimento III, periodo 2010-2011, en el cual se evaluó participativamente el efecto de la inoculación de las cepas P1-20/08 y A1-30/06 en el crecimiento y rendimiento de *Lactuca sativa* L. cv. White Cos. Esta evaluación se realizó con 20 agricultores (15 mujeres y 15 varones) del Distrito de Punchao, Provincia de Humalies, Departamento de Huánuco (3,800msnm) y la ONG Diaconia.

El entrenamiento de los agricultores en el uso de nuevas tecnologías estuvo enfocado en las escuelas de campo, en el cual se explicó la metodología de evaluación y se definió las tareas y responsabilidades entre los agricultores y el CIP antes de la siembra de lechuga. Al momento de la siembra, personal capacitado del CIP explicó el proceso de inoculación de microorganismos en las semillas de lechuga (cantidad de inóculo, tiempo de inmersión de las semillas en el inóculo) y en la cosecha se reunió a los agricultores para explicar los beneficios del uso de microorganismos benéficos y definir los criterios de selección de nuevas tecnologías y las evaluaciones participativas de la mejor tecnología. Para la selección de las nuevas tecnologías, se usó el protocolo adaptado de la Guía de Evaluación y Recolección de datos del Diseño Mama & Bebe. Este protocolo describe el procedimiento de selección participativa de tecnologías de fertilización de suelos. Para definir los criterios de selección, se reunió a los agricultores y se hizo evaluaciones participativas del estado actual y deseado de las plantas (hojas verdes, plantas uniformes, altura de plantas y libres de enfermedades). Esta evaluación consistió en entregar 6 granos de maíz a los varones y 6 granos de habas a las mujeres y se estandarizó una escala de votación: 3 granos= excelente, 2 granos=muy importante y 1 grano= importante. Para la selección de la mejor tecnología (tratamientos inoculados con bacteria) se considero los criterios de selección previamente identificados.

## Resultados

### Identificación de los criterios de selección

En la cosecha, los agricultores identificaron los siguientes criterios de selección para la selección de las nuevas tecnologías: cultivo con cabeza grande, cabeza coposa, planta grande ,hojas verdes y muchas hojas (Tabla 1). De los criterios identificados anteriormente, los agricultores consideran que la nueva tecnología aplicada debe producir un cultivo con cabeza grande (53 puntos) y cabeza coposa (46 puntos).

### Selección las mejores tecnologías

En la selección las mejores tecnologías, en la Tabla 2 se observa que el mayor puntaje se obtuvo en los tratamientos T7, T2 y T4, en los cuales se incluyeron la inoculación de bacterias + humus y solo bacteria. La menor puntuación se obtuvo en los tratamientos T1 (tratamiento control) y T3. Esta percepción de los agricultor acerca del buen estado de las plantas son consistentes con los resultados (datos cuantitativos) encontrados en el experimento III, periodo 2011-2012 en el cual se obtuvo el mejor resultado en el tratamiento T7 (14.17 Kg peso seco ha<sup>-1</sup>).

**Tabla 1:** Identificación de los criterios de selección en el momento de la cosecha por los agricultores (hombres y mujeres) del Distrito de Punchao , Huánuco. Período 2011-2012

Criterios Identificados	Puntaje		Puntaje Total
	Hombres	Mujeres	
Cabeza coposa	34	12	46
Planta grande	21	16	37
Hojas verdes	13	18	31
Cabeza grande	17	36	53
Muchas hojas	5	8	13

**Tabla 2.** Puntuación de las tecnologías aplicadas (bacteria y bacteria + humus) al momento de la cosecha del cultivo de lechuga. Distrito de Punchao , Huánuco. Período 2011-2012

Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Puntaje		Puntaje Total
		Hombres	Mujeres	
T7	P1-20/08 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	69	63	132
T2	A1-30/06	79	37	116
T4	P1-20/08	70	45	115
T6	B1-22/06 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	57	60	107
T5	A1-30/06 + Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	62	30	92
T1	Humus (5 t ha <sup>-1</sup> )	50	35	85
T3	B1-22/06	54	34	84

### Materiales y métodos

Para esta actividad se empleó el protocolo que es una adaptación de la guía de evaluación y recolección de datos del diseño mamá & bebé (Fonseca *et al*, 2010). El cual describe el procedimiento de selección participativa de tecnologías de fertilización foliar en dos momentos de las fases del cultivo de la papa: floración y cosecha. Al momento de la floración y la cosecha se definió los criterios de selección y se realizó las evaluaciones participativas de las características y opiniones de los agricultores acerca del estado deseado y real de las plantas. Para realizar este ranking se entregó seis granos de maíz a los varones y seis granos de frejol a las mujeres. Se explicó en palabras simple que votaran como si fueran elecciones: 3 granos para el excelente, 2 granos para el muy importante y 1 grano para el importante. La selección de las mejores tecnologías en el estado de floración y cosecha en los tratamientos instalados tomando en cuenta los criterios previamente identificados, se procedió a la evaluación por bloque, en donde la votación se realizó de la misma manera que para la identificación de criterios. En la época de floración y cosecha se trabajó con un grupo de 17 agricultores en San José de Aymará y 29 agricultores para la comunidad de Ccasapata de la zona de Huancavelica.(Foto 12).



A



B



C

**Foto 12:** Evaluación participativa de fertilizantes, bioabonos y fertilizantes foliares con agricultores de dos comunidades. A y B: San José de Aymará; C: Comunidad de Sotopampa.



### Resultados y Discusiones

En la comunidad de San Jose de Aymara se realizó la selección en la época de floración, donde los agricultores consideran que los fertilizantes y los abonos deben producir en un cultivo de papa la “mayor producción”, criterio que consiguió 35 votos, le sigue los “tallos gruesos y mayor follaje” con 18 votos cada uno (Tabla 26); mientras los agricultores de Sotopampa mencionan al “crecimiento rápido” como el criterio más importante que debe producir el fertilizante foliar en el cultivo de la papa con 81 votos seguido por “hojas verdes y el tamaño alto” (Tabla 27). Resumiendo en las dos localidades en la época de floración se concluye que los criterios de selección identificados por los agricultores fueron “crecimiento rápido” y “mayor producción”

**Tabla 26:** Identificación de los criterios de selección de fertilizantes, bioabonos y abonos foliares en San José de Aymará-Huancavelica al momento de la floración.

Criterios identificados	Puntaje hombres	Puntaje mujeres	Total
1.Hojas verdes	4	6	10
2.Menor costo de producción	11	2	13
3.Mayor follaje	14	4	18
4.Tallos gruesos	12	6	18
5.Mayor producción	19	16	35

**Tabla 27:** Identificación de los criterios de selección de fertilizantes, bioabonos y abonos foliares en Sotopampa-Huancavelica al momento de la floración.

Criterios identificados	Puntaje hombres	Puntaje mujeres	Total
1. Hojas verdes	51	0	51
2. Tamaño alto	42	0	42
3. Crecimiento rápido	81	0	81

En la época de cosecha los agricultores de San José de Aymara consideran que los fertilizantes y abonos deben producir en un cultivo de papa de “calidad y cantidad”, criterio que consiguió 44 votos, le sigue los “tubérculos grandes y parejos” y “tubérculos sanos” ambos con 35 votos (Tabla 28); mientras los agricultores de Sotopampa mencionan a “tubérculos sanos” como el criterio más importante que debe producir el fertilizante foliar en el cultivo de la papa con 59 votos seguidos por “tubérculos grandes” y “mayor producción ”(Tabla 29).

Resumiendo en las dos localidades en la época de cosecha se concluye que los criterios de selección identificados por los agricultores fueron “calidad y cantidad” y “tubérculos sanos”

**Tabla 28:** Identificación de los criterios de selección de fertilizantes, bioabonos y abonos foliares en San José de Aymará-Huancavelica al momento de la cosecha.

Criterios identificados	Puntaje hombres	Puntaje mujeres	Total
1.Tubérculos grandes y parejos	24	11	35
2. Calidad y cantidad	26	18	44
3.Tubérculos sanos	22	13	35

**Tabla 29:** Identificación de los criterios de selección de fertilizantes, bioabonos y abonos foliares en Sotopampa-Huancavelica al momento de la cosecha.

<b>Criterios identificados</b>	<b>Puntaje hombres</b>	<b>Puntaje mujeres</b>	<b>TOTAL</b>
1. Mayor producción	48	0	48
2. Tubérculos grandes	54	0	54
3. Tubérculos sanos	59	0	59

Para la selección de la mejor tecnología en la época de floración del cultivo de papa se encontró, en la zona de San José de Aymará, que la tecnología que tuvo la mayor votación fue el tratamiento 12, que consistió en una fertilización NPK 120-120-120 + 5TM ha-1 de estiércol. Le sigue el tratamiento 1 con 45 votos que corresponde al biol 1 de dosis 5% + 5 TM ha-1 de estiércol. Al final el tratamiento 11 con 32 votos que corresponde al testigo de fertilización química foliar + 5 TM ha-1 de estiércol. En la época de la cosecha de papa se encontró que la tecnología con mayor aceptación fue el tratamiento testigo 12 de fertilización NPK 120-120-120 + 5TM ha-1 de estiércol, seguido del tratamiento 11 con 45 votos que corresponde al testigo de fertilización química foliar + 5 TM ha-1 de estiércol, cierra el tratamiento 5 con 41 votos que corresponde al biol 10 de dosis 5% + 5 TM ha-1 de estiércol. En esta zona los cinco tratamientos con mayor aceptación por los agricultores en los dos momentos de evaluación fueron el tratamiento 12, seguido por los tratamientos 1 y 11, más atrás los tratamientos 5 y 2 (Tabla 30).

**Tabla 30:** Evaluación de las tecnologías en los momentos de floración y cosecha en el poblado de San José de Aymara-Huancavelica

Tratamientos	Floración	Cosecha	Total
T1 : Biol 1 5% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	45	30	75
T2 : Biol 3 5% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	19	31	50
T3 : Biol 7 5% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	15	1	16
T4 : Biol 9 5% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	12	4	16
T5 : Biol 10 5% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	13	41	54
T6 : Biol 1 40% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	27	16	43
T7 : Biol 3 40% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	8	29	37
T8 : Biol 7 40% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	17	16	33
T9 : Biol 9 40% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	17	10	27
T10 : Biol 10 40% + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	18	15	32
T11 : Fertilizante foliar + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	32	48	70
T12 : Fertilización NPK 120-120-120 + 5TM ha <sup>-1</sup> estiércol	82	95	177
T13 : Control	16	5	21

En Sotopampa-Huancavelica se encontró que la tecnología con mayor votación en la época de floración del cultivo de papa fue el tratamiento testigo de orine humano + 5TM ha<sup>-1</sup> de estiércol con 29 votos, seguidos por el tratamiento del biol 1 y el tratamiento testigo de fertilización química foliar, ambos con 28 votos. En la época de cosecha la tecnología con mayor aceptación fue el tratamiento 8 con 69 votos que consistió en el purín de vacuno + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol, seguido del tratamiento 6 con 62 votos que corresponde al biol 9 + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol, cierra el tratamiento 10 con 58 votos que es el orine humano + 5 TM ha<sup>-1</sup> de estiércol. En esta zona los cinco tratamientos con mayor aceptación por los agricultores en los dos momentos de evaluación fueron los tratamientos 10, 8, 6 y 3 más atrás el tratamiento 7 (Tabla 30).

Resumiendo los resultados encontrados según la percepción de los agricultores de 8 diferentes bioles evaluados se concluye que la nueva tecnología más aceptada en las dos zonas fue el biol 1, seguido del biol 9 en Ccasapata y el biol 10 en San José de Aymara.

**Tabla 31:** Evaluación de las tecnologías en los momentos de floración y cosecha en el poblado de Ccasapata-Huancavelica

Tratamientos	Floración	Cosecha	Total
T1 :5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	2	32	34
T2 : Fertilizante químico foliar + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	28	30	58
T3 : Biol 1+ 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	28	50	78
T4 : Biol 4 + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	22	28	50
T5 : Biol 6 + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	16	30	46
T6 : Biol 9 + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	19	62	81
T7 : Biol 11 +5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	9	53	62
T8 : Purín vacuno +5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	16	69	85
T9 : Purín ovino + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	16	20	36
T10 : Purín orine humano + 5 TM ha <sup>-1</sup> de estiércol	29	58	87

### **Conclusiones**

Los criterios de selección identificados en la época de floración en cultivo de papa en las dos localidades por los agricultores fueron “crecimiento rápido” y “mayor producción” y en la época de cosecha los criterios de selección identificados fueron “calidad y cantidad” y “tubérculos sanos”.

La selección de la mejor tecnología de los bioles en floración y cosecha en el cultivo de papa por parte de los agricultores de las dos zonas fue el biol 1, mientras el biol 9 en Huancayo y el biol 10 en Huancavelica.

### **Logro de los objetivos**

El logro de los objetivos esta al 100 % según el tiempo programado.

### **Revisión bibliográfica**

Fonseca, C., De Haan, S., Salas, E., De Mendiburu, F. 2010. Guía de evaluación y recolección de datos: Metodología Mamá & Bebé para la selección participativa de variedades. Centro Internacional de la Papa (CIP), Red Latín Papa, Lima.

1.4.5 ACTIVIDAD 6.1 Y 6.2. DIFUNDIR EL CONOCIMIENTO Y EXPERIENCIAS PROBADAS CON INVESTIGADORES DE OTROS PAÍSES, TÉCNICOS LOCALES Y AGRICULTORES EN LAS ZONAS PILOTO DE CADA PAÍS.

La Tabla 1 muestra que un total de 10 tesis fueron ejecutadas durante los 3 años del proyecto, de las cuales 7 de ellas han sido sustentadas y publicadas en las respectivas universidades. La Tabla 2, muestra la participación en un workshop para difusión de los conocimientos científicos. Las tablas 3 muestran las capacitaciones a técnicos en el uso y manejo de biofertilizantes.

**Tabla 1.** Registro de Tesis realizadas durante los 3 años de duración del proyecto

Numero	Titulo	Autor	Estado
1	Capacidad promotora del crecimiento vegetal por bacterias del género <i>Azotobacter</i> y Actinomicetos aislados de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Peru	Marvic Rico	Concluida
2	Diversidad y selección de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes provenientes de la rizósfera y suelos como promotoras del crecimiento y desarrollo de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Ccori Martinez	Concluida
3	Efecto promotor del crecimiento y desarrollo vegetal de <i>Azospirillum sp.</i> sobre el cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L. var. UNICA (papa)	Mercy Rojas	Concluida
4	Supervivencia de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> en 02 tipos de soporte (talco y vermiculita)	Cristian Aparicio	No concluida
5	Efecto promotor del crecimiento vegetal de los <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y Actinomicetos inoculados en diferentes cultivares de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L) a nivel de invernadero	Leo Silva	No concluida
6	Efecto promotor del crecimiento vegetal de los <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y Actinomicetos inoculados en <i>Solanum tuberosum</i> L cv Serranita cultivada en diferentes sustratos y PH	Marlene Camacho	No concluida
7	Uso de medios caseros a base de cebada, papa y camote para la multiplicación de bacterias	Carlos Gonzales	Concluida
8	Efecto promotor del crecimiento vegetal de los <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y Actinomicetos inoculados en <i>Solanum tuberosum</i> L cv Serranita) cultivados en diferentes sustratos y PH	Luis Stechman	Concluida
9	Efecto promotor del crecimiento vegetal de los géneros <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y Actinomicetos inoculados en diferentes cultivares de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L) a nivel de invernadero	Rosalía Yauri	Concluida
10	Estudio microbiológico de la población bacteriana presente en los bioles	Gladys Lino	Concluida

**Tabla 2.** Participación en el 9<sup>th</sup> International and 1<sup>st</sup> Latinamerican PGPR workshop, celebrado en Medellin, Colombia.

<b>Ponente</b>	<b>Título de poster</b>	<b>Fecha</b>	<b>lugar</b>
Mercy Rojas	PGPR aplicación to seed tuber production using aeroponic system	3-9 de junio del 2012	Colombia

**Tabla 3.** Registro de personas capacitadas en el uso y manejo de bacterias benéficas durante los 3 años de duración del proyecto

<b>Nombres y Apellidos</b>	<b>País de procedencia</b>	<b>Año</b>
Oscar Vivanco	Ecuador	2009
Mayra Claros	Bolivia	2009
Nelly Ramirez	Peru	2010
Ann Doat	Belgica	2010
Daniela Valencia	Peru	2011

## ANEXOS

## Anexo 1

### Características agroecológicas de campos de papa muestreados. Periodo 2008-2009

N Campo	Departamento	Provincia	Distrito	Lugar	Altitud	Latitud y Longitud		Ensayo	Variedad	Cultivo Anterior	Propietario
Campo 1	Huánuco	Huánuco	Churubamba	Huayllacan	3500	L.S. 9°41'15"	L.W. 76°41'15"	Agricultores	Tumbay	terenos en descanso	Varios
Campo 2	Huánuco	Huánuco	Churubamba	Mataos	3000	L.S. 76°31'51.6"	L.W. 9°44'3.77"	Agricultores	Canchan	Terrenos en descanso	Varios
Campo 3	Huánuco	Huánuco	Churubamba	Mision Punta	3500	L.S. 9°42'11.27"	L.W. 76°31'51.6"	Agricultores	Canchan	Terrenos en descanso	Varios
Campo 4	Huánuco	Huánuco	Churubamba	Paccha	3400	L.S. 9°43'05"	L.W. 76°41'15"	Agricultores	Amarilis	terenos en descanso	Varios
Campo 5	Huancavelica	Tayacaja	Pazos	San Jose de Aymara	3950	L.S. 12°14'17.34"	L.W. 75°03'46.14"	Tipos de guano	Amarilla del centro	descanso 2 años	Benavides Perez Coronación
Campo 6	Huancavelica	Tayacaja	Pazos	Vista Alegre	3840	L.S. 12°16'15.24"	L.W. 75°1'12.36"	Agricultores	Camotillo y Peruanita	descanso 2 años	Varios
Campo 7	Huancavelica	Tayacaja	Pazos	Mullaca (INIA - CIP)	3420	L.S. 12°16'47.9"	L.W. 75°28'46.2"	Abonos orgánicos	Peruanita	papa	Medardo
Campo 8	Junín	Huancayo	El Tambo	La Victoria - CIP	3200	L.S. 12°03'21"	L.W. 75°12'67"	Mulch y PGPR	Yungay	Descanso 2 años	Centro Intenacional de la Papa
Campo 9	Junín	Huancayo	Pucará	Marcavalle	3362	L.S. 12°13'0"	L.W. 75°08'0"	Agricultores	Huayro y Yungay	descanso 2 años	Varios
Campo 10	Junín	Huancayo	Pucará	Patalá (INIA - CIP)	4132	L.S. 12°12'39.78"	L.W. 75°04'24.3"	Fertilización en papas nativas	Huamantanga, Yana Huayro y Yana Huancuy	descanso 8 años	Cayo y Oscar Hualpa Romero
Campo 11	Cajamarca	Cajamarca	Encañada	Pampa Culebra	3098	L.S. 7°08'0"	L.W. 78°20'0"	Agricultores	Perricholi	terenos en descanso	Sebastian Lucano
Campo 12	Cajamarca	Cajamarca	Baños del Inca	PuyLucana	2800	L.S. 7°05'0"	L.W. 78°27'0"	Agricultores	Yungay	terenos en descanso	Andrés Sanchez



## Anexo 2

Características agroecológicas de campos de papa muestreados en el periodo 2006.

N Campo	Departamento	Provincia	Distrito	Lugar	Altitud	Latitud y Longitud	Variedad	Cultivo Anterior	Propietario
Campo A	Hunacavelica	Tayacaja	Pazos	San Jose de Aymara	4200	LS 12° 14' 6.48"/LW 75° 03'17.36"	Amarilla	ND	ND
Campo B	Hunacavelica	Tayacaja	Pazos	San Jose de Aymara	4030	LS 12° 14' 6.48"/LW 75° 03'17.36"	Peruanita	ND	Clider Palomino
Campo C	Puno	Puno	Puno	Thunco	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Ccompis	Pasturas	Graciela Ccama
Campo D	Puno	Puno	Puno	Challa	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Ccompis	Descanso	Desiperio Catacora
Campo E	Puno	Puno	Puno	Chilacollo	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Imilla Negra	Quinua	Desiperio Catacora
Campo F	Puno	Puno	Puno	Cuturapi	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Imilla Negra	Descanso	Edgar Mamani
Campo G	Puno	Puno	Puno	Ichu	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Ccompis	Quinua	Victoria Ramos
Campo H	Puno	Puno	Puno	Tinicachi	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Ccompis	Habas	Jose Machicado
Campo I	Puno	Puno	Puno	Ancaca	3900-4000	LS 15° 50' 15"/LW 70° 01'18"	Ccompis	Descanso	Miguel Quispe

### Anexo 3

Cepas aisladas e identificadas a nivel de especie por cada campo muestreado

<b>Numero</b>	<b>Código CIP</b>	<b>Campo</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Identificación</b>
1	B1-01/06	Campo A	2006	Bacillus subtilis
2	B1-04/06	Campo A	2006	Bacillus amyloliquefaciens
3	B1-07/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
4	B1-08/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
5	B1-09/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
6	B1-10/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
7	B1-11/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
8	B1-12/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
9	B1-14/06	Campo C	2006	Bacillus subtilis
10	B1-15/06	Campo D	2006	Bacillus subtilis
11	B1-16/06	Campo D	2006	Bacillus subtilis
12	B1-17/06	Campo D	2006	Bacillus amyloliquefaciens
13	B1-18/06	Campo E	2006	Bacillus amyloliquefaciens
14	B1-19/06	Campo E	2006	Bacillus subtilis
15	B1-20/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
16	B1-21/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
17	B1-22/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
18	B1-23/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
19	B1-24/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
20	B1-26/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
21	B1-27/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
22	B1-29/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
23	B1-30/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
24	B1-31/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
25	B1-32/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
26	B1-33/06	Campo F	2006	Bacillus subtilis
27	B1-34/06	Campo B	2006	Bacillus amyloliquefaciens
28	B1-35/06	Campo B	2006	Bacillus amyloliquefaciens
29	B1-36/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
30	B1-37/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
31	B1-38/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
32	B1-39/06	Campo B	2006	Bacillus amyloliquefaciens
33	B1-40/06	Campo B	2006	Bacillus amyloliquefaciens
34	B1-41/06	Campo B	2006	Bacillus amyloliquefaciens
35	B1-42/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
36	B1-43/06	Campo B	2006	Bacillus subtilis
37	A3-23/06	Campo A	2006	Pseudomonas fluorescens
38	A3-41/06	Campo B	2006	Achromobacter
39	A1-17/06	Campo A	2006	No identificada
40	A1-18/06	Campo A	2006	No identificada
41	A1-22/06	Campo A	2006	No identificada
42	A1-30/06	Campo D	2006	No identificada
43	A1-31/06	Campo D	2006	No identificada
44	P1-01/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
45	P1-02/08	Campo 5	2008	Pseudomonas putida
46	P1-04/08	Campo 1	2008	Achromobacter (alcaligenes)
47	P1-06/08	Campo 9	2008	Pseudomonas putida
48	P1-08/08	Campo 9	2008	Pseudomonas putida
49	P1-09/08	Campo 8	2008	Pseudomonas putida
50	P1-10/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida

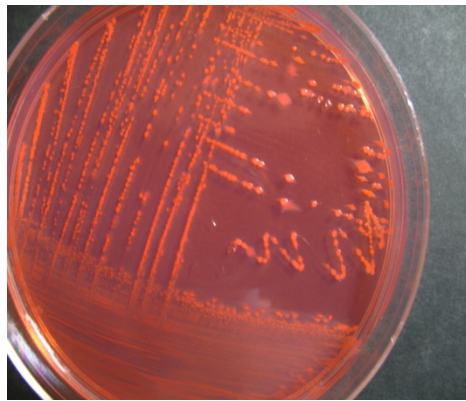
<b>Numero</b>	<b>Código CIP</b>	<b>Campo</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Identificación</b>
51	P1-11/08	Campo 3	2008	Pseudomonas putida
52	P1-12/08	Campo 9	2008	Achromobacter (alcaligenes)
53	P1-13/08	Campo 4	2008	Pseudomonas putida
54	P1-14/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
55	P1-15/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
56	P1-16/08	Campo 9	2008	Pseudomonas putida
57	P1-17/08	Campo 3	2008	Achromobacter (alcaligenes)
58	P1-18/08	Campo 5	2008	Pseudomonas putida
59	P1-19/08	Campo 7	2008	Achromobacter (alcaligenes)
60	P1-20/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
61	P1-21/08	Campo 9	2008	Pseudomonas putida
62	P1-23/08	Campo 3	2008	Pseudomonas putida
63	P1-24/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
64	P1-25/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
65	P1-26/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
66	P1-27/08	Campo 9	2008	Pseudomonas putida
67	P1-28/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
68	P1-29/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
69	P1-31/08	Campo 5	2008	Pseudomonas putida
70	P1-32/08	Campo 5	2008	Pseudomonas putida
71	P1-33/08	Campo 9	2008	Achromobacter (alcaligenes)
72	P1-34/08	Campo 1	2008	Achromobacter (alcaligenes)
73	P1-35/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
74	P1-36/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
75	P1-38/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
76	P1-39/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
77	P1-40/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
78	P1-41/08	Campo 4	2008	Achromobacter (alcaligenes)
79	P1-43/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
80	P1-45/08	Campo 7	2008	Achromobacter (alcaligenes)
81	P1-46/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
82	P1-47/08	Campo 3	2008	Achromobacter (alcaligenes)
83	P1-48/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
84	P1-50/08	Campo 12	2008	Pseudomonas putida
85	P1-51/08	Campo 11	2008	Pseudomonas putida
86	P1-52/08	Campo 11	2008	Achromobacter (alcaligenes)
87	P1-53/08	Campo 11	2008	Pseudomonas putida
88	P1-54/08	Campo 10	2008	Pseudomonas putida
89	P1-55/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
90	P1-56/08	Campo 1	2008	Pseudomonas putida
91	P1-57/08	Campo 3	2008	Achromobacter (alcaligenes)
92	P1-59/08	Campo 6	2008	Pseudomonas putida
93	P1-60/08	Campo 7	2008	No identificada
94	P1-61/08	Campo 8	2008	Pseudomonas putida
95	P1-62/08	Campo 8	2008	No identificada
96	P1-63/08	Campo 7	2008	Pseudomonas putida
97	P1-64/08	Campo 7	2008	No identificada
98	P1-67/08	Campo 4	2008	No identificada
99	A2-01/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus
100	A2-02/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus

<b>Numero</b>	<b>Código CIP</b>	<b>Campo</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Identificación</b>
101	A2-03/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus
102	A2-04/08	Campo 10	2008	Bacillus pumilus
103	A2-05/08	Campo 10	2008	Bacillus pumilus
104	A2-06/08	Campo 8	2008	Bacillus pumilus
105	A2-07/08	Campo 8	2008	Bacillus pumilus
106	A2-08/08	Campo 4	2008	Pseudomonas putida
107	A2-09/08	Campo 4	2008	Bacillus licheniformis
108	A2-10/08	Campo 4	2008	Bacillus subtilis
109	A2-11/08	Campo 12	2008	Pseudomonas putida
110	A2-12/08	Campo 12	2008	Pseudomonas putida
111	A2-14/08	Campo 12	2008	No identificada
112	A2-15/08	Campo 12	2008	Bacillus pumilus
113	A2-16/08	Campo 12	2008	No identificada
114	A2-17/08	Campo 12	2008	Pseudomonas putida
115	A2-18/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
116	A2-19/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
117	A2-20/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
118	A2-21/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
119	A2-22/08	Campo 11	2008	Bacillus subtilis
120	A2-23/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
121	A2-24/08	Campo 11	2008	Bacillus subtilis
122	A3-03/08	Campo 4	2008	Bacillus pumilus
123	A3-05/08	Campo 1	2008	Pseudomonas putida
124	A3-06/08	Campo 4	2008	Pseudomonas putida
125	A3-19/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus
126	A3-20/08	Campo 10	2008	Bacillus subtilis
127	A3-32/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus
128	A3-33/08	Campo 5	2008	Bacillus pumilus
129	A3-45/08	Campo 12	2008	Pseudomonas
130	A3-46/08	Campo 12	2008	Rhizobium radiobacter
131	A3-48/08	Campo 11	2008	Bacillus pumilus
132	A3-51/08	Campo 4	2008	Achromobacter
133	A1-01/08	Campo 10	2008	No identificada
134	A1-02/08	Campo 7	2008	No identificada
135	A1-03/08	Campo 7	2008	No identificada
136	A1-04/08	Campo 10	2008	No identificada
137	A1-05/08	Campo 7	2008	No identificada
138	A1-06/08	Campo 5	2008	No identificada
139	A1-07/08	Campo 7	2008	No identificada
140	A1-08/08	Campo 7	2008	No identificada
141	A1-09/08	Campo 8	2008	No identificada
142	A1-10/08	Campo 10	2008	No identificada
143	A1-11/08	Campo 8	2008	No identificada
144	A1-12/08	Campo 5	2008	No identificada
145	A1-13/08	Campo 10	2008	No identificada
146	A1-14/08	Campo 8	2008	No identificada
147	A1-15/08	Campo 10	2008	No identificada
148	A1-16/08	Campo 5	2008	No identificada
149	A1-17/08	Campo 5	2008	No identificada
150	A1-18/08	Campo 10	2008	No identificada

<b>Numero</b>	<b>Código CIP</b>	<b>Campo</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Identificación</b>
151	A1-19/08	Campo 8	2008	No identificada
152	A1-20/08	Campo 7	2008	No identificada
153	A1-21/08	Campo 7	2008	No identificada
154	A1-22/08	Campo 10	2008	No identificada
155	A1-23/08	Campo 7	2008	No identificada
156	A1-24/08	Campo 5	2008	No identificada
157	A1-25/08	Campo 7	2008	No identificada
158	A1-26/08	Campo 2	2008	No identificada
159	A1-27/08	Campo 2	2008	No identificada
160	A1-28/08	Campo 4	2008	No identificada
161	A1-29/08	Campo 2	2008	No identificada
162	A1-30/08	Campo 4	2008	No identificada
163	A1-31/08	Campo 5	2008	No identificada
164	A1-32/08	Campo 5	2008	No identificada
165	A1-33/08	Campo 5	2008	No identificada
166	A1-34/08	Campo 4	2008	No identificada
167	A1-35/08	Campo 3	2008	No identificada
168	A1-36/08	Campo 5	2008	No identificada
169	A1-37/08	Campo 12	2008	No identificada
170	A1-38/08	Campo 12	2008	No identificada
171	A1-39/08	Campo 11	2008	No identificada
172	A1-40/08	Campo 2	2008	No identificada
173	A1-41/08	Campo 5	2008	No identificada
174	A1-42/08	Campo 4	2008	No identificada
175	A1-43/08	Campo 2	2008	No identificada
176	A1-44/08	Campo 2	2008	No identificada
177	A1-45/08	Campo 2	2008	No identificada

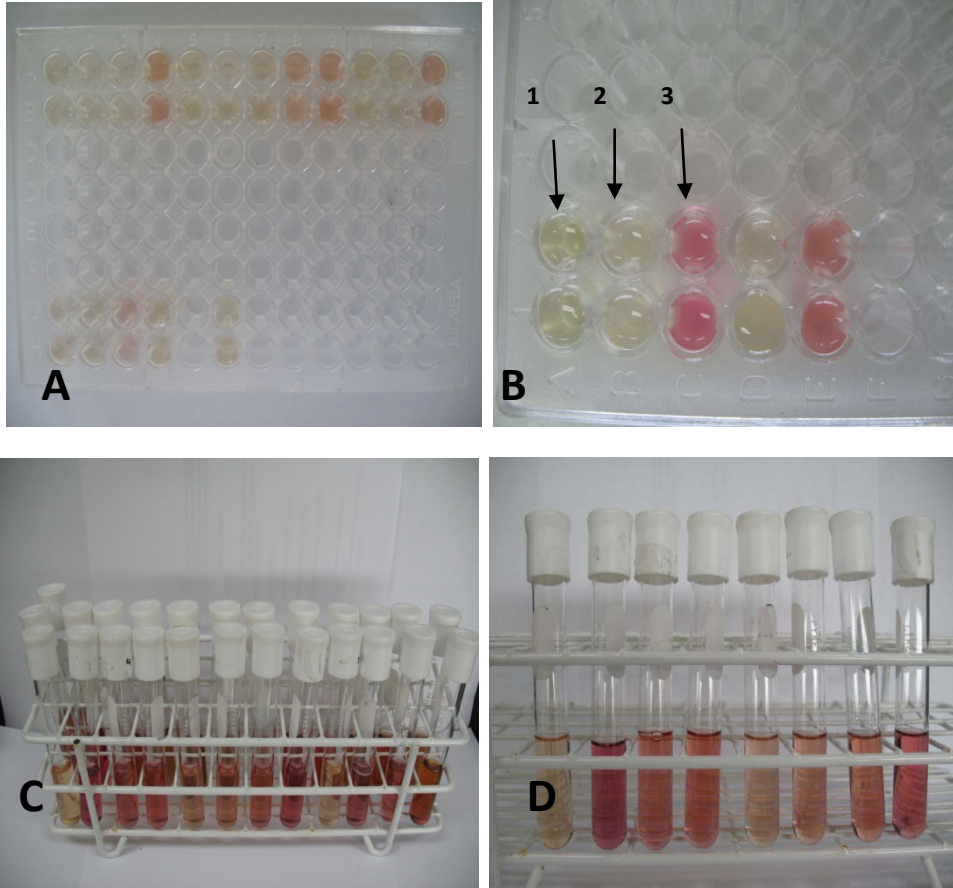
#### Anexo 4

Aislamiento e identificación presuntiva de los géneros *Pseudomonas putida*, Actinomicetos y *Bacillus pumilus*.



## Anexo 5

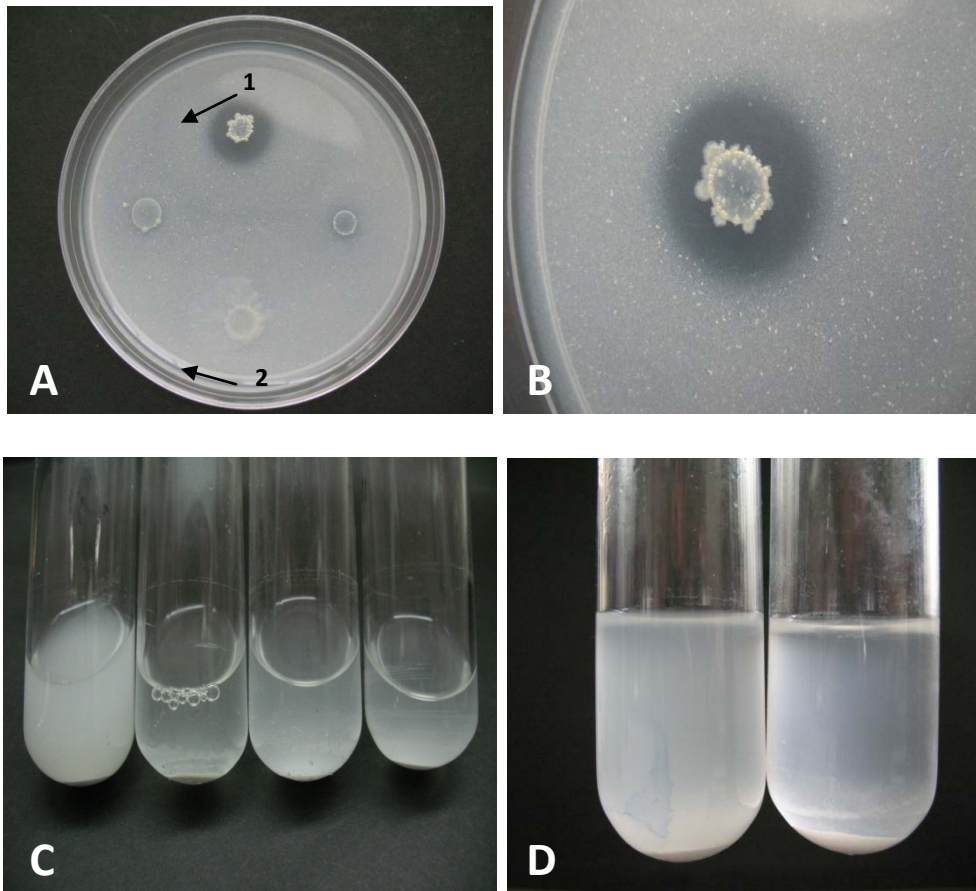
Prueba cualitativa *in vitro* de producción de ácido-3-indol acético (AIA)



Prueba cualitativa y cuantitativa de producción de ácido-3-indol acético (AIA) en el medio TSB suplementado con L-triptófano. A, Prueba cualitativa de producción de AIA al quinto día de evaluación a 28 °C; B, diferentes tonalidades de fucsia que indican la producción de AIA. Flechas: 1, Control; 2, Aislamiento que no produce AIA; 3, Aislamiento que produce AIA; C, Prueba cuantitativa de producción de AIA ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) por 24 aislamientos de *Azospirillum* sp. a los 15 días de evaluación a 28 °C; D, Diferentes niveles de concentración de producción de AIA.

## Anexo 6

### Prueba de solubilización de fosfatos *in vitro*

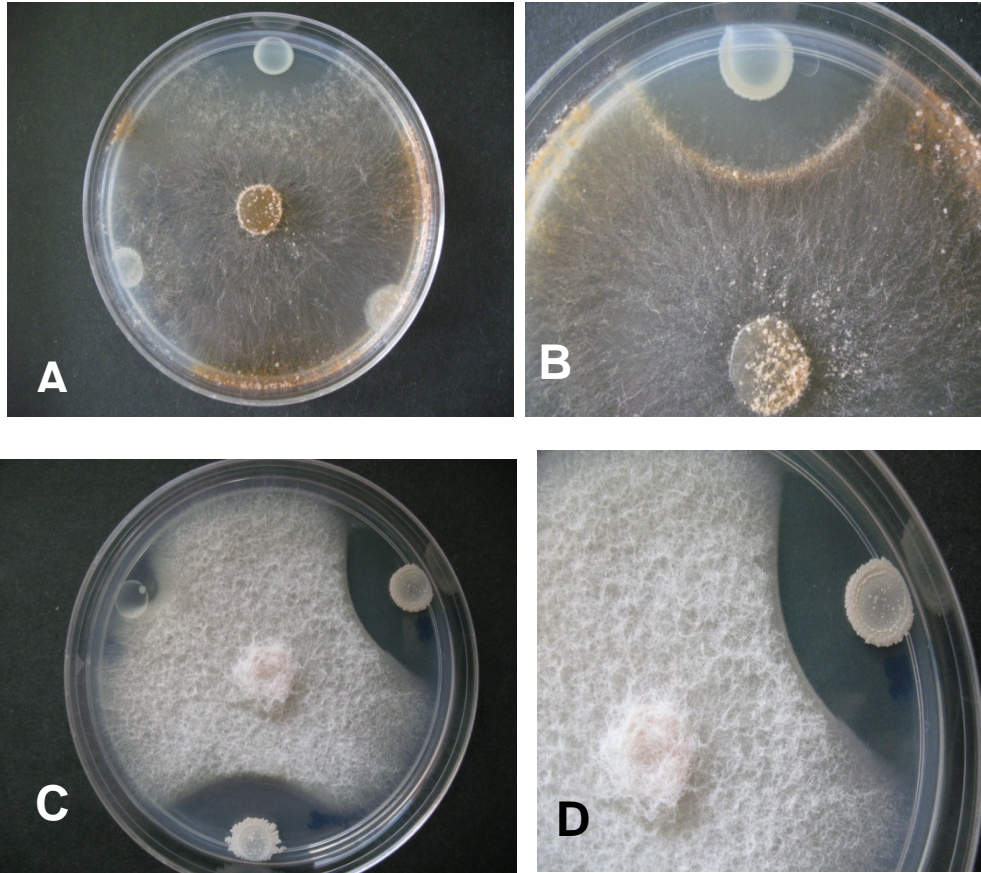


Prueba de solubilización de fosfatos *in vitro*.. A, B Presencia de halos de solubilización de fosfatos. en el medio NBRIP sólido a los 31 días de evaluación a 28 °C. Flechas: 1, colonia con halo de solubilización; 2, colonia sin halo de solubilización; C, Solubilización de fosfatos en el medio NBRIP líquido a los 15 días de evaluación a 28 °C. D. En la fotografía se observa la turbidez del medio NBRIP en el tubo control (derecha) y la solubilización de fosfatos inorgánicos insolubles en el medio líquido NBRIP en el tubo inoculado con bacteria. (izquierda)



## Anexo 7

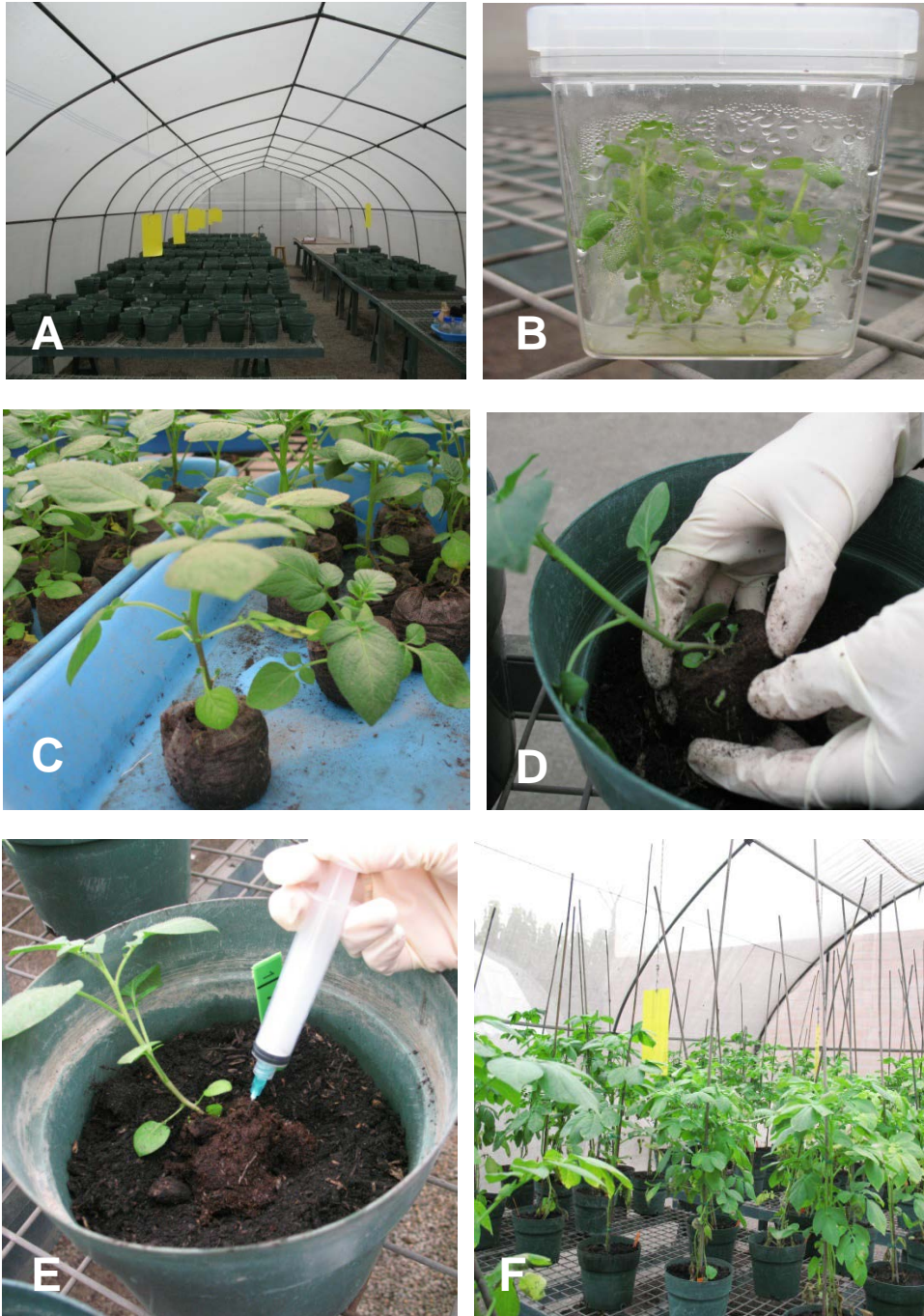
Prueba de antagonismo *in vitro* contra *R. solani* y *F. solani*.



Fotografías de inhibición del crecimiento *in vitro* de *R. solani* y *F. solani*. por *Azospirillum* sp. A, B, Inhibición del crecimiento *in vitro* de *R. solani* por *Azospirillum* sp. a los 5 días de evaluación a 20 °C; C,D, Inhibición del crecimiento *in vitro* de *F. solani* por *Azospirillum* sp. a los 7 días de evaluación a 20 °C.

## Anexo 8

### Instalación de plántulas *in vitro* en invernadero



Instalación de plántulas *in vitro* en invernadero. A, Instalación de macetas con suelo estéril y no estéril; B, Plántulas *in vitro* de papa (*S. tuberosum* L. var. UNICA) en medio MS; C, Transplante de plántulas de papa a pellet de turba “Jiffy-7®”; Transplante de cada pellet de turba a macetas; E, Inoculación de bacteria ( $10^8$  UFC/ml); F, Plantas de papa después de 8 semanas de inoculación

## Anexo 9

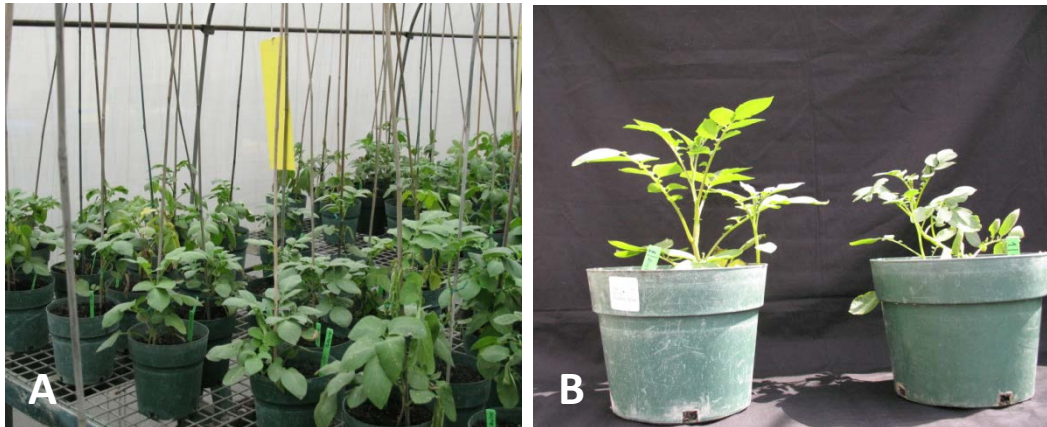
### Instalación de semillas tubérculo en invernadero



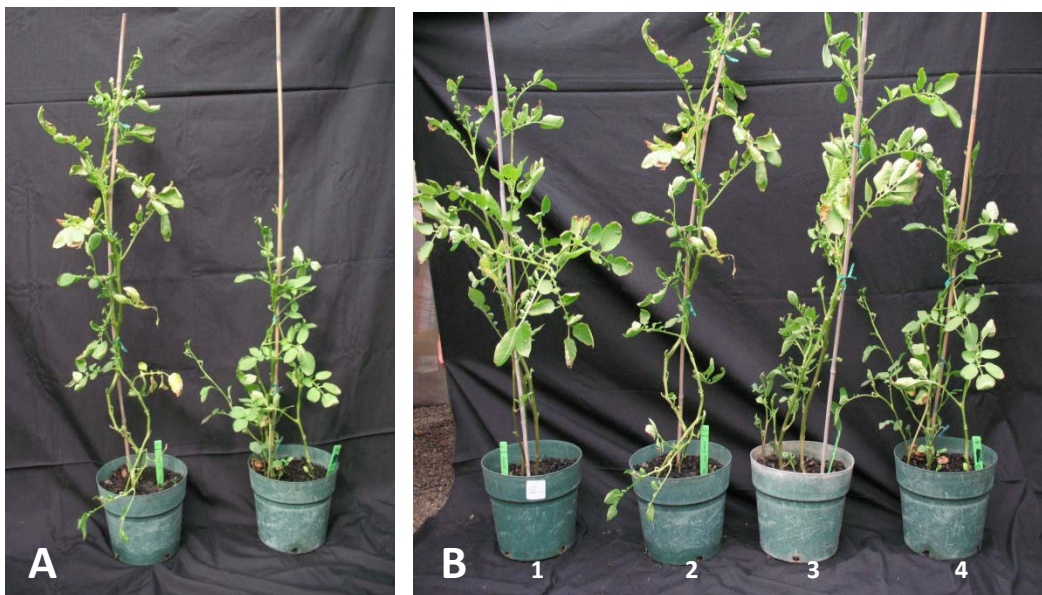
Instalación de tubérculos semilla en invernadero, A, Semillas tubérculos pre-germinadas; B, Inoculación de semillas tubérculo con *suspensión bacteriana* ( $10^8$ UFC/ml); C, Transplante de semilla tubérculo a maceta; D, Plantas de papa después de 8 semanas de inoculación .

## Anexo 10

Plantas de papa (*S. tuberosum* L. var. UNICA) después de 11 semanas de inoculación



Plantas de papa (*S. tuberosum* L. var. UNICA) instaladas en invernadero. A, Plantas después de cuatro semanas de inoculación con bacteria. B, Planta de papa después de cuatro semanas de inoculación con bacteria (izquierda) y planta sin inocular (derecha)



Plantas de papa (*S. tuberosum* L. var. UNICA) después de 11 semanas de inoculación con bacterias. A, Plantas de papa en macetas con suelo estéril después de 11 semanas de inoculación con *Azospirillum* sp. (izquierda) y sin inocular (derecha); B, Plantas de papa en macetas con suelo estéril y no estéril después de 11 semanas de inoculación con bacteria. Numeros: 1, Suelo estéril+planta in vitro; 2, Suelo estéril+semilla-tubérculo; 3, Suelo no estéril+semilla tubérculo, 4, maceta control.



# **INFORME ACTIVIDADES – BIOINSUMOS FONTAGRO**

## **CORPORACIÓN PBA**

### **Proyecto: Desarrollo de Bioinsumos para la producción sostenible de hortalizas con pequeños agricultores para una soberanía alimentaria en Los Andes**

A continuación se presenta los resultados finales de las actividades realizadas en Colombia en el marco de este proyecto, actividades lideradas por la Corporación PBA como socio de la propuesta y la alianza local establecida con el Centro de Investigaciones y Extensión Rural de la Universidad Nacional de Colombia, quienes apoyaron y acompañaron procesos iniciales en la investigación tecnológica en temas especializados. Con estas entidades y las organizaciones de pequeños agricultores, quienes participaron activamente en estos procesos, se establecieron equipos de trabajo con un enfoque muy integral y participativo que apuntó a que las tecnologías desarrolladas se ajustaran a las necesidades reales de las comunidades y finalmente las usaran para mejorar sus ingresos y su calidad de vida.

#### **Objetivo (del proyecto):**

Investigar y desarrollar participativamente con pequeños agricultores procesos de producción y uso de bioinsumos para contribuir a la producción agrícola limpia, sostenible, responsable y de bajo costo.

**Objetivo específico No1:** Desarrollar un cepario de microorganismos nativos para iniciar la formación de un banco de germoplasma enfocado a la producción y uso de bioinsumos que permitan contribuir con el desarrollo de una agricultura libre de agroquímicos sintéticos.

#### **Actividad 1.1 Colección, identificación y caracterización de Microorganismos de zonas productoras de hortalizas y tubérculos de Boyacá y Cundinamarca - Colombia:**

##### **Introducción**

Existen varios factores que determinan la disponibilidad del P para las plantas, los más importantes en producción agrícola son el pH del suelo, el tipo de arcilla predominante, la fuente y localización del P aplicado. El pH ideal para tener una buena disponibilidad de P fluctúa entre 5,5 y 6,5.

Adicionalmente, otro factor que favorece esta fijación, es la formación de precipitados insolubles con el Al en medios fuertemente ácidos. Debido a la inmovilidad del P en el suelo, es importante tener en cuenta el tipo de fertilizante y la forma de aplicación, las fuentes solubles y relativamente solubles se utilizan en cultivos de ciclo corto y deben ser colocados, en lo posible, en forma localizada para lograr en menor tiempo el contacto del P con el suelo y de esta forma contrarrestar en algún grado la fijación de la fuente aplicada. Con excepción de la pequeña contribución hecha por la meteorización de los minerales primarios, los fertilizantes fosfatados representan la única fuente nueva de P disponible que ingresa en el sistema (Bernal y Espinosa, 2003).

Para establecer la relación entre los microorganismos, suelo y plantas, los estudios de aislamiento, identificación y descripción de los microorganismos presentes en el suelo, son importantes para

describir su influencia en la nutrición de las plantas y por consiguiente en el rendimiento de las cosechas, constituyéndose en aspectos importantes para el manejo integrado de suelos. Una vez se conocen dichas poblaciones microbianas y sus funciones en el suelo, se puede determinar cuáles de ellas participan en la solubilización de fósforo y evaluar su capacidad solubilizadora.

Los microorganismos pertenecientes a especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Apergillus*, entre otros, solubilizan las sales de calcio, hierro, aluminio, magnesio, manganeso y otros fosfatos, liberando los fosfatos en cantidades superiores a sus propias demandas nutricionales, además de ser capaces de asimilar el elemento. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos insolubles del fósforo son movilizados, es la producción de ácidos orgánicos, en el caso de fosfato tricálcico, los ácidos orgánicos e inorgánicos lo convierten a fosfatos di-monobásicos, resultando aumento en la disponibilidad del elemento para las plantas (Grant, 1996).

Con base en lo anterior, se planteó esta investigación, cuyo objetivo fue aislar, identificar y cuantificar bacterias solubilizadoras de fosfato y determinar el efecto de estos microorganismos en el crecimiento y desarrollo del cultivo de la papa.

En trabajos anteriores se han aislado de distintos suelos bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. (Fernández et al, 2005)

Con esta investigación se pretende romper con aquella dependencia que tienen los pequeños agricultores del uso de fertilizantes de síntesis química, los cuales día a día se hacen más costosos, incrementando los costos de producción. Para ello se pretendió mostrar y enseñar otras fuentes y medios para realizar un manejo de la fertilidad del suelo, aislando bacterias que se encuentran en el suelo y que solubilizan el fósforo haciéndolo más disponible para las plantas.

### **1.1.1 Colección, identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo, en la zona productora de papa de Ventaquemada, Boyacá**

#### **Metodología**

##### **Obtención de microorganismos**

Se tomaron muestras de suelos de áreas agrícolas de pequeños productores de la región de Boyacá, en cultivos de papa en una alta actividad Fisiológica en etapa de floración. Estas muestras se secaron al aire y se tamizaron con malla de 2 mm para posterior realización de los ensayos.

Se determinó la abundancia de la microflora de los suelos, con la técnica de las diluciones decimales y siembra en placa de Petri, se utilizó el medio Agar nutritivo y 4 placas por dilución sembrada. Se cuantificó las bacterias con la misma técnica y siembra en medio Agar nutritivo con cicloheximida (100 mg L<sup>-1</sup>). Posteriormente se incubaron las muestras a 30°C durante 2-3 días.

##### **Determinación de la solubilización de fósforo**

Se determinó el número de bacterias solubilizadoras por gramo de suelo de manera similar a la descrita para el número de la microflora pero utilizando el medio NBRIP. En las cajas se incubaron los microorganismos a 28°C durante 7 días hasta la aparición de halos claros alrededor de las UFC solubilizadoras de fosfato.

## Selección de bacterias

Se seleccionaron las colonias solubilizadoras cuyos tipos morfológicos fueron predominantes y se realizaron cultivos líquidos en caldo nutritivo. Se sembraron 10  $\mu$ L de cada cultivo (Densidad Óptica=0.6) en medio NBRIP a razón de 4 aislamientos por caja de Petri. Se incubaron las placas durante 11 días a 28°C hasta observar la aparición de halos.

Los aislamientos bacterianos de la microflora seleccionados por el tamaño del halo, se utilizaron para cuantificar el fósforo solubilizado en medio líquido por medio de la técnica de cubetas para determinación de fosfatasas.

Se realizaron diferentes pruebas de selección que incluyen curvas de crecimiento de las bacterias en medios con diferente fuente de fosforo, pruebas de patogenicidad vegetal y resistencia a antibióticos.

## Identificación de Microorganismos

La identificación de la morfología microscópica de las colonias se realizó por medio de la tinción de Gram según Bergey's, 1956. Para la identificación de las bacterias se utilizaron los Sistemas de Identificación BD BBL Crystal™ que están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores.

## Pruebas de Invernadero

Se estableció un ensayo con 19 tratamientos con tres repeticiones cada uno; se sembró semillas de papa variedad diacol capiro en sustrato turba canadiense esterilizada y posteriormente inoculada con cada una de las bacterias, entre los tratamientos se utilizó un control sin microorganismos y un control con un testigo comercial (FOSFO RIZ) que es elaborado con *Pseudomonas sp.*

Se evaluaron variables como: % de germinación, altura de plantas, número de tallos, días de germinación, días de inicio de la floración, número de tubérculos y calidad de tubérculos, diámetro de tubérculos, peso y rendimiento

## Resultados

### Primeras pruebas de selección

En investigaciones preliminares, se contó con 24 bacterias, potencialmente solubilizadores de fosforo, que fueron evaluadas en campo y conservadas, inicialmente, en las instalaciones de la Universidad Nacional, para un posterior uso:



Fotografía 1. Bacterias que muestran potencial solubilizador de fosforo



Las bacterias inicialmente seleccionadas fueron identificadas con las letras UN (Universidad Nacional) PBA (Por Corporación PBA) y un número.

**Tabla 1.** Muestra la identificación usada para las Bacterias solubilizadoras de fosfatos de la primera clasificación.

Número	Bacteria
1	UNPBA 040
2	UNPBA 023
3	UNPBA 096
4	UNPBA 032
5	UNPBA 006
6	UNPBA 059
7	UNPBA 024
8	UNPBA 097
9	UNPBA 071
10	T3R4 – 7
11	UNPBA 011
12	UNPBA 064
13	UNPBA 093
14	UNPBA 064
15	UNPBA 012
16	UNPBA 029
17	T3R3 - 7 UN 03
18	UNPBA 009
19	UNPBA 021
20	UNPBA 020
21	UNPBA 060
22	UNPBA 018
23	UNPBA 062
24	UNPBA 037



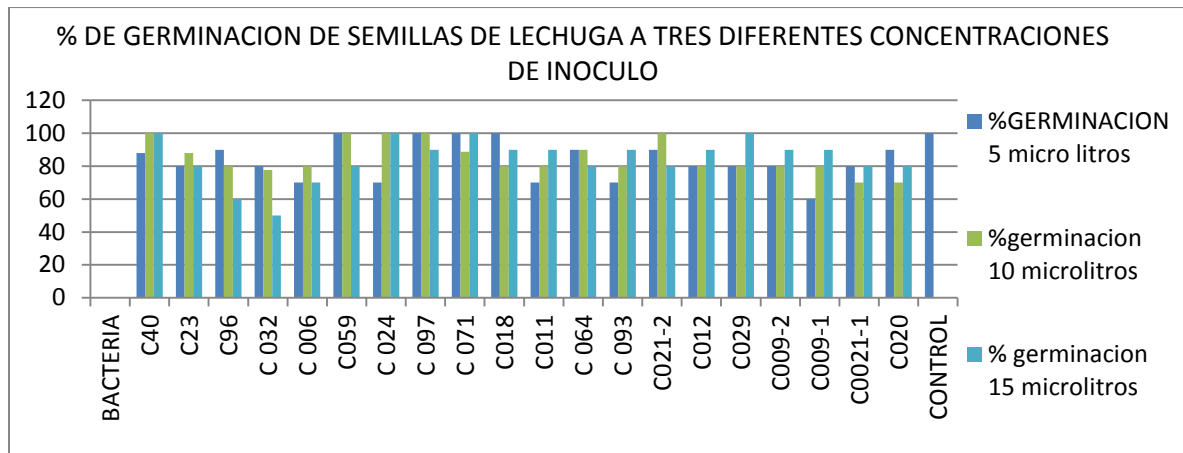
**Fotografía 2.** Microorganismos solubilizadores de fosforo conservados y multiplicados en los laboratorios de la U. Nal.

### Actividad estimuladora de crecimiento vegetal

Los resultados encontrados con la prueba de patogenicidad vegetal, con semillas de lechuga, mostraron cómo algunas bacterias pueden reducir el porcentaje de germinación hasta en un 50% en la concentración más alta (15

100% de germinación. Por otro lado, se encontró algunos materiales que no incidieron en la germinación y, por el contrario, incentivan el desarrollo de las semillas.

□L), con

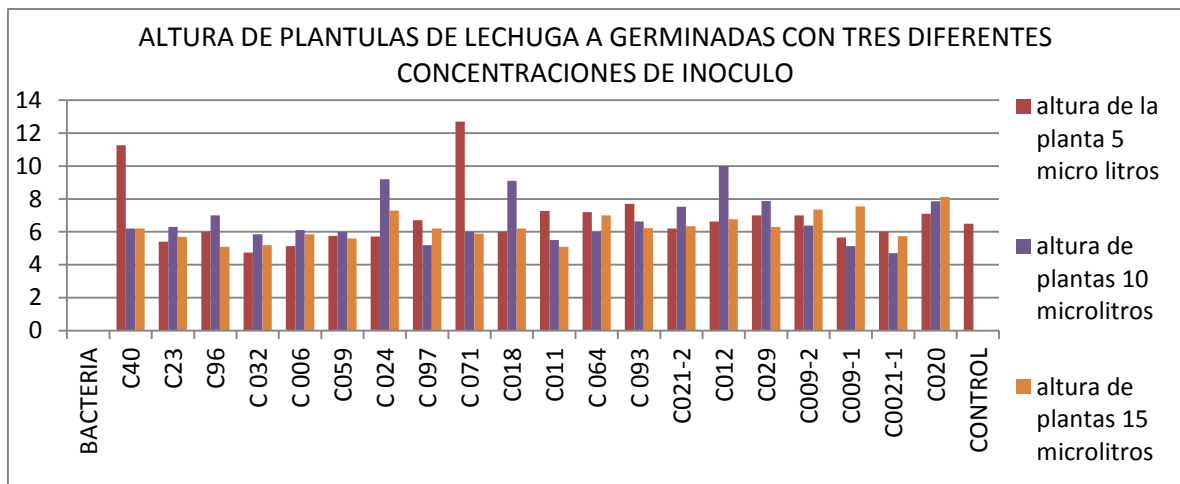


**Figura 1.** Porcentaje de germinación de semillas de lechuga, en prueba realizada para evaluar posibles bacterias estimuladoras de crecimiento

Las bacterias 040, 059, 024, 071, 018, 021, 0.29 y el control, alcanzaron un 100% de germinación de las semillas a los 10 días después de la siembra independientemente de la concentración aplicada de la bacteria, sin embargo se puede observar en la figura 1, que bacterias como 029, 021, 040, 024, tienen un mayor porcentaje de germinación a concentración de 15  $\mu$ l, otras como 059, 097, 018 y 020, alcanzan el mayor porcentaje de germinación en la concentración 5  $\mu$ l, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Se puede utilizar una concentración promedio es decir 10  $\mu$ l para obtener un buen porcentaje de germinación en todas las bacterias evaluadas.

La bacteria 032 puede llegar a tener un efecto negativo en la germinación de semillas a una alta concentración, sin embargo cuando se utiliza concentraciones bajas se obtiene buenos resultados de germinación.

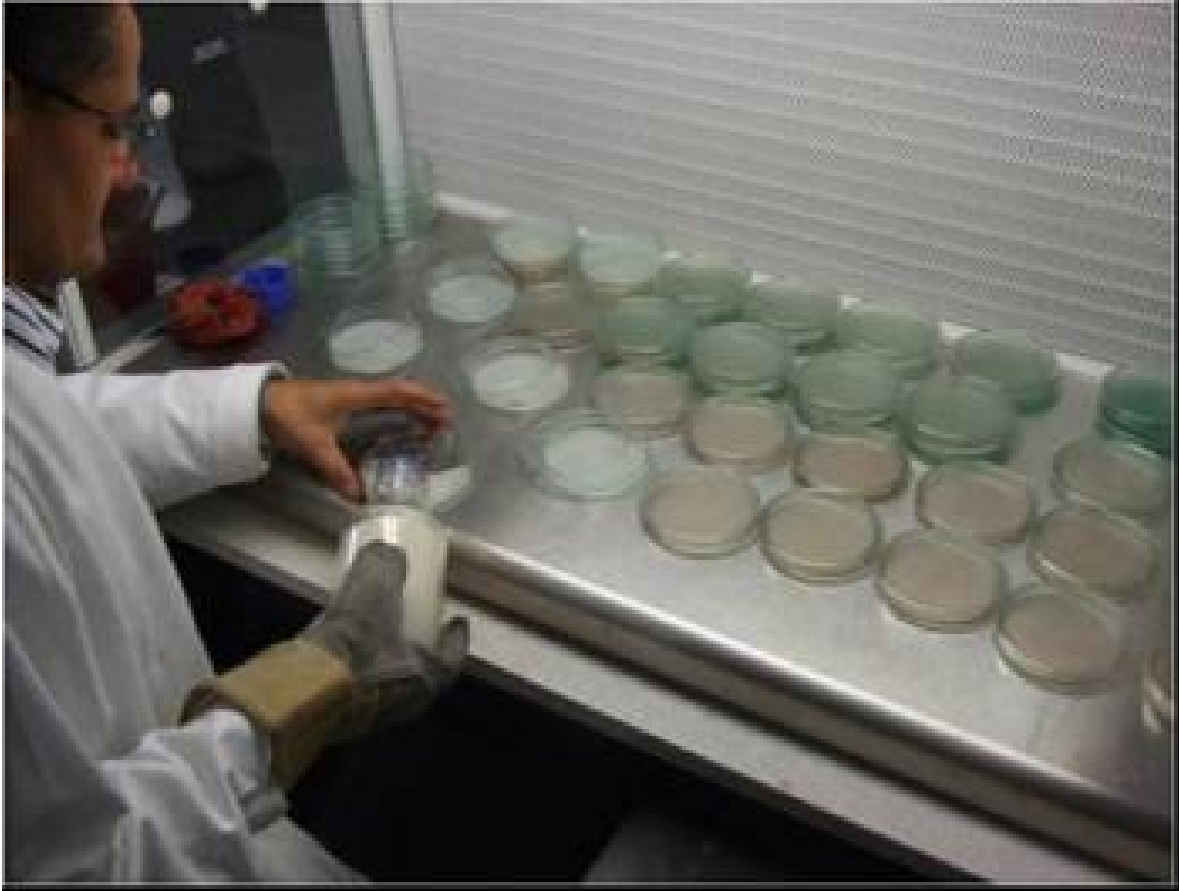


**Figura 2.** Altura de plántulas de semilla a los 10 días después del a siembra, en las diferentes concentraciones de bacterias evaluadas (5  $\mu$ , 10  $\mu$ , 15  $\mu$ ).

Las bacterias 071 y 040 tienen valores de altura mayores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) con respecto al control, cabe notar que estas alturas mayores se presentan con la concentración más baja de 5  $\mu$ l, lo que hace más eficiente a estas bacterias en su papel como promotoras de crecimiento vegetal. Bacterias como 096, 024, 0.18, 012, presentan mayor altura en la concentración de 10  $\mu$ l de bacteria y en la concentración mayor de 15  $\mu$ l de bacteria la altura de las plántulas no es estadísticamente significativa con respecto al control.

## Solubilización al medio SSR

En la prueba de solubilización en medio SSR se encontraron 17 materiales con una reacción positiva, que nos indica que estas bacterias promueven la solubilidad de fosfatos.



**Fotografía 3.** Preparación de medios de cultivo Pikosvskaya para el aislamiento de microorganismos potencialmente solubilizadores de fosforo

## Potencial solubilizador con diferentes fuentes de fosfato

En esta prueba se evaluó la capacidad de la bacteria de crecer en el medio y la formación de la colonia de cada uno de los microorganismos. Se utilizó una escala de criterio propio en la que se mostraba si la bacteria era capaz de crecer en los diferentes medios y la capacidad de formar una colonia grande y continua.

**Tabla 2.** Criterio para determinar el crecimiento de las bacterias en medios con diferentes fuentes de fosforo

Crecimiento	Valoración
Alta capacidad de crecer	+++
Media capacidad de crecer	++
Baja capacidad de crecer	+
No crecimiento de la bacteria	-

Los resultados del potencial solubilizador con diferentes fuentes de fosfato, mostraron 10 bacterias que tienen alta y media capacidad de crecer (+++; ++), sin importar la fuente de fosfato evaluada, pero otras bacterias tienen baja capacidad de crecer (+) y/o no crecieron (-) al modificar la fuente de fosfato, incluso algunas bacterias no presentaron crecimiento en la fuente evaluada de medio Pikosvskaya.

**Tabla 3.** Crecimiento de las bacterias en medio **Pikovskaya** con diferentes fuentes de fosfato.

	BACTERIA	Fosfato Al	Fosfato Fe	R. fosfórica	Pikovskaya
1	UNPBA 040	-	-	+++	+++
2	UNPBA 023	++	++	++	++
3	UNPBA 096	+	+	++	+++
4	UNPBA 032	+	++	++	+++
5	UNPBA 006	+++	+++	+++	+++
6	UNPBA 059	+	+	++	+++
7	UNPBA 024	++	+	++	+++
8	UNPBA 097	-	-	++	+++
9	UNPBA 071	++	++	++	++
11	UNPBA 011	++	++	++	++
12	UNPBA 064	+	++	+++	+++
13	UNPBA 093	-	-	-	-
14	UNPBA 021-2	++	++	++	+++
15	UNPBA 012	-	-	-	-
16	UNPBA 029	+	++	+++	+++
18	UNPBA 009-1	+++	+++	+++	+++
19	UNPBA 021-1	-	-	-	-
20	UNPBA 020	+	++	+++	+++
21	UNPBA 060	++	++	++	+++
22	UNPBA 018	+	+	+	++
23	UNPBA 062	++	++	++	+++
24	UNPBA 009-2	+++	+++	+++	+++

Bacterias como 006, 009 y 008 tienen una muy alta capacidad de crecer en medios ácidos, lo que indica que se adaptarían muy fácilmente a suelos con pH bajos, por el contrario bacterias como 037, 032, 093 y 097, no crecieron en ningún medio o presentaron crecimiento limitado en todos los medios y fueron descartadas del estudio.

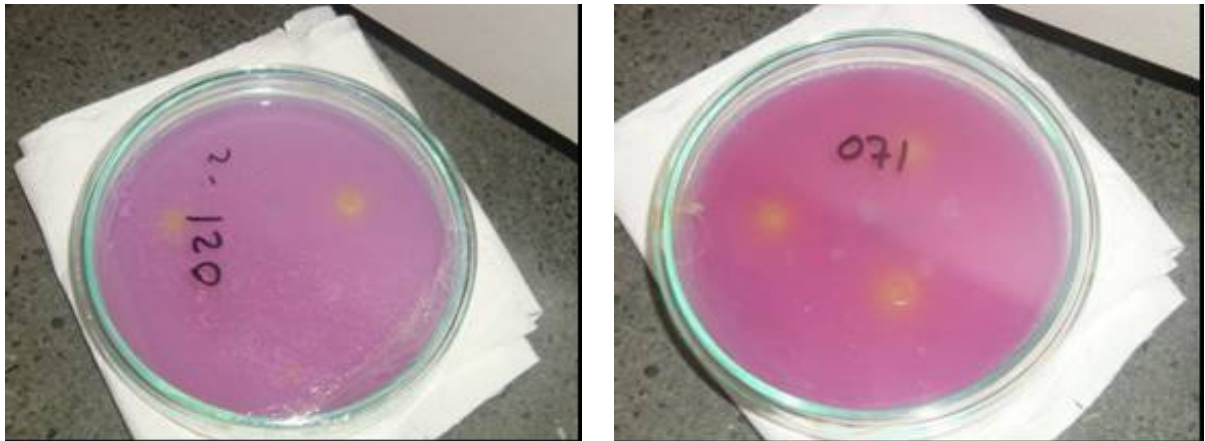
### Actividad acidulante/solubilizadora

**Tabla 4.** Bacterias que presentaron las mayores eficiencias de solubilización de las 19 preseleccionadas

BACTERIA	COLONIA	HALO	EFICIENCIA
O64	0,47	0,90	1,93*
101	0,30	0,77	2,56*
O59	0,30	0,70	2,33*
O21	0,37	0,67	1,82
O12	0,47	0,93	2,00*
OO9	0,33	0,50	1,50
OO6	0,53	1,10	2,06*
O23	0,30	0,33	1,11
O24	0,37	0,70	1,91*
O71	0,63	1,03	1,63
O20	0,20	0,20	1,00
O96	0,47	0,90	1,93*

En la actividad solubilizadora de forma cualitativa por medio de medición de halos de solubilización se observó que bacterias 101, 059, 012 y 006 tienen una alta capacidad solubilizadora; de las 23 bacterias inicialmente evaluadas solo 12 tiene una capacidad solubilizadora diferente de 1.

Bacterias como 006 tiene una alta capacidad de solubilización y además crece muy bien en medios con diferentes fuentes de fosforo, no actúa como promotora de crecimiento ya que no estimula la germinación ni el crecimiento de plántulas sin embargo tiene una alta capacidad solubilizadora y puede promover procesos metabólicos en la planta al solubilizar el fosforo del suelo.



Fotografías 4. Halos de solubilización en medio SRS.

### Cuantificación de fósforo soluble

La bacteria 006 tiene un valor más alto de concentración de fósforo que el testigo comercial y es significativa la diferencia con respecto a las demás bacterias y al control, esto indica que esta bacteria es un microorganismo con potencial solubilizador de fósforo para el cultivo de papa en suelos de Boyacá, también se puede observar que las bacterias 059, 064 y 012 tiene una capacidad de solubilización.

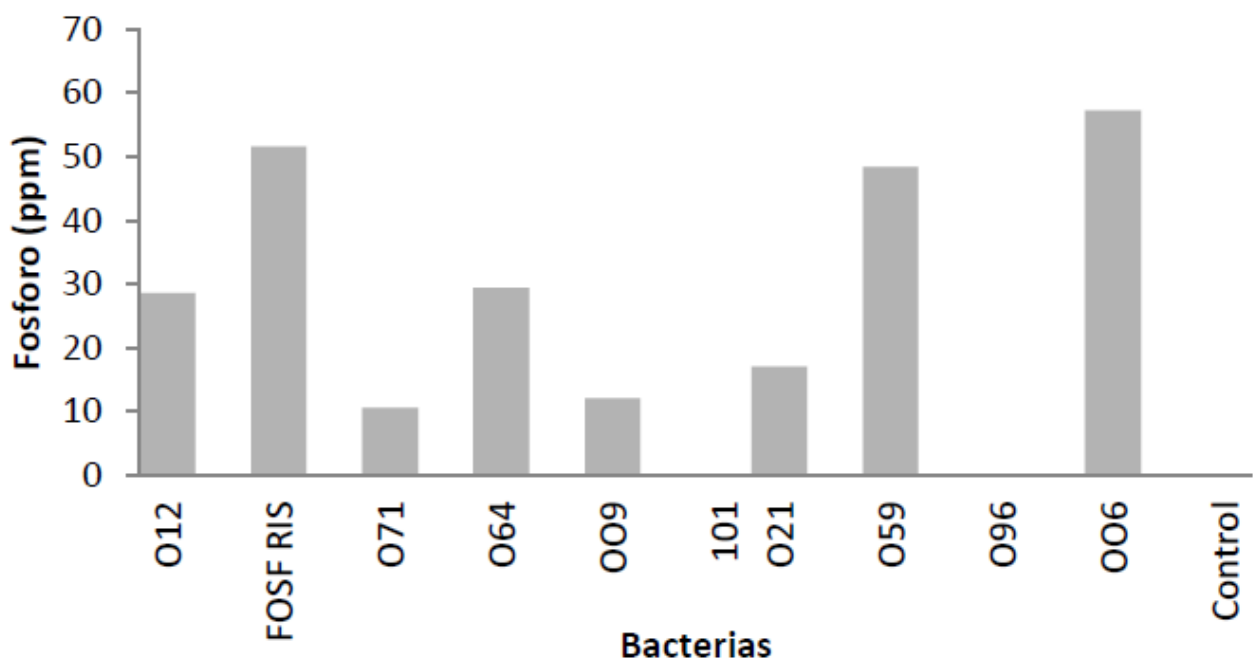


Figura 3. Concentración de fósforo en ppm de bacterias solubilizadoras de fósforo evaluadas por medio de método SPECTROQUANT FOSFATO.

### CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

#### Tinción Gram

La caracterización macroscópica de las colonias se realizó teniendo en cuenta características en cuanto a su aspecto como tamaño, color, y textura (Molano, 2004). Se identificó la morfología microscópica realizando tinción de Gram según Bergey's (1959). Los resultados que se obtuvieron en esta prueba se muestran en la Tabla 5:

**Tabla 5.** Muestra los resultados de la prueba de Tinción Gram

	<b>Bacteria</b>	<b>Reacción gram</b>
1	UNPBA 040	Positivo
2	UNPBA 023	Negativo
3	UNPBA 096	Negativo
4	UNPBA 032	Negativo
5	UNPBA 006	Negativo
6	UNPBA 059	Negativo
7	UNPBA 024	Positiva
9	UNPBA 071	Positivo
11	UNPBA 011	Negativo
12	UNPBA 064	Negativo
14	UNPBA 021-2	Negativo
16	UNPBA 029	Negativo
18	UNPBA 009-1	Negativo
20	UNPBA 020	Positivo
21	UNPBA 060	Negativo
22	UNPBA 018	Negativo
23	UNPBA 062	Negativo
24	UNPBA 009-2	Negativo

Resultados de la caracterización por tinción Gram, para bacterias, mostraron que solo cuatro materiales reaccionaron positivamente, indicando que tienen resistencia a antibióticos, esto indica que estas bacterias tienen más posibilidades de crecer en medios menos favorables.

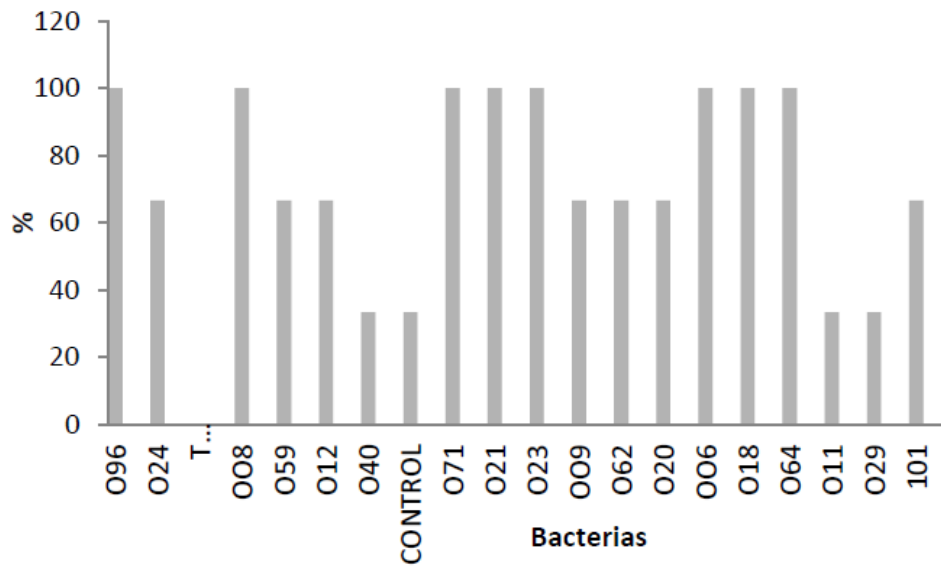
**Tabla 6.** Caracterización bioquímica de bacterias solubilizadoras de fosforo

COMPUESTO/BACTERIA	064	006	021	009	059
Arabinosa	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
p-n-p fosfato	-	+	-	-	-
p-n-p a B- glucosido	-	-	-	-	-
p-n-p-B-galactosido	-	-	-	-	-
ProlinaNitroanilida	-	-	-	-	-
p-n-p-bis-fosfato	-	-	-	-	-
p-n-p-xilosido	-	-	-	-	-
p-n-p-a-arabinisido	-	-	-	-	-
p-n-p-fosforicolina	-	-	-	-	-
p-n-p-B-glucuronido	-	-	-	-	-
p-n-p-N-acetil glucosamida	-	-	-	-	-
γ-L-glutamil p-nitroanilida	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	-	-	+
p-nitro-DL-fenilalanina	+	+	+	+	+
Urea	-	-	+	+	+
Glicina	-	-	+	+	-
Citrato	-	-	-	+	-
Ácido malónico	+	-	-	+	-
cloruro de trifeniltetrazolio	+	+	-	-	-
Arginina	+	+	-	-	-
Lisina	-	+	-	-	-

La bacteria 059 y 006 son Gram negativas, además son bacilos pequeños. La bacteria 064 es una Gram positiva en forma de bacilo más definida y clara. Se puede afirmar que la bacteria 064 pertenece al género *Bacillus*, estos microorganismos son bacilos de gran tamaño (4-10  $\mu\text{m}$ ), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas.

### Resultados pruebas de Invernadero

A los 23 días después de la siembra (dds) de las semillas de papa se realizó el primer muestreo, en donde se evaluó el % de germinación y el crecimiento vegetativo.



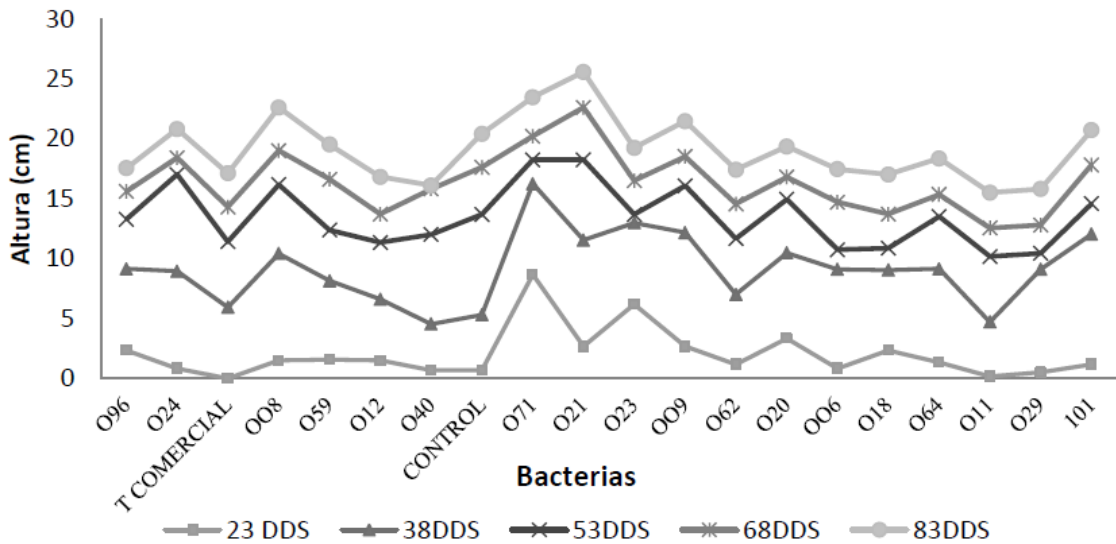
**Figura 4.** Porcentaje de mejor brotación de plantas de papa a los 23 días después de la siembra

Las plantas sembradas con bacterias como 096, 008, 071, 021, 023, 006, 018, 064, presentaron un 100% de germinación para el día 23 dds, y se presentó una diferencia significativa con respecto al control y al testigo comercial, los cuales germinaron hasta el día 33. Con estos resultados se reafirma el hecho de que bacterias como 096, 008, 071, 018 y 021 son promotoras de crecimiento y estimulan la germinación comparando con los resultados obtenidos en la prueba de actividad estimuladora de crecimiento en semillas de lechuga, la bacteria 006 por el contrario no obtuvo buenos resultados en esta prueba pero al llevarla a la evaluación en campo presenta algún tipo de estimulación en la germinación.



**Fotografía 5.** Emergencia de las plantas de papa que están siendo evaluadas en invernadero.

En el primer muestreo, se observó que la bacteria 071 ejerce algún efecto de promotor de crecimiento, ya que en las tres repeticiones se encontraron plantas vigorosas y con mayor altura, con respecto a las demás bacterias seleccionadas (Plantas tratamiento control y las inoculadas con el testigo comercial); de igual manera la bacteria 023 también muestra un buen comportamiento en invernadero. Posteriormente en los análisis foliares se podrá evidenciar los efectos en la asimilación de fósforo.



**Figura 5.** Evolución de altura en plantas de papa durante el ciclo de cultivo cultivadas con bacterias solubilizadoras de P.

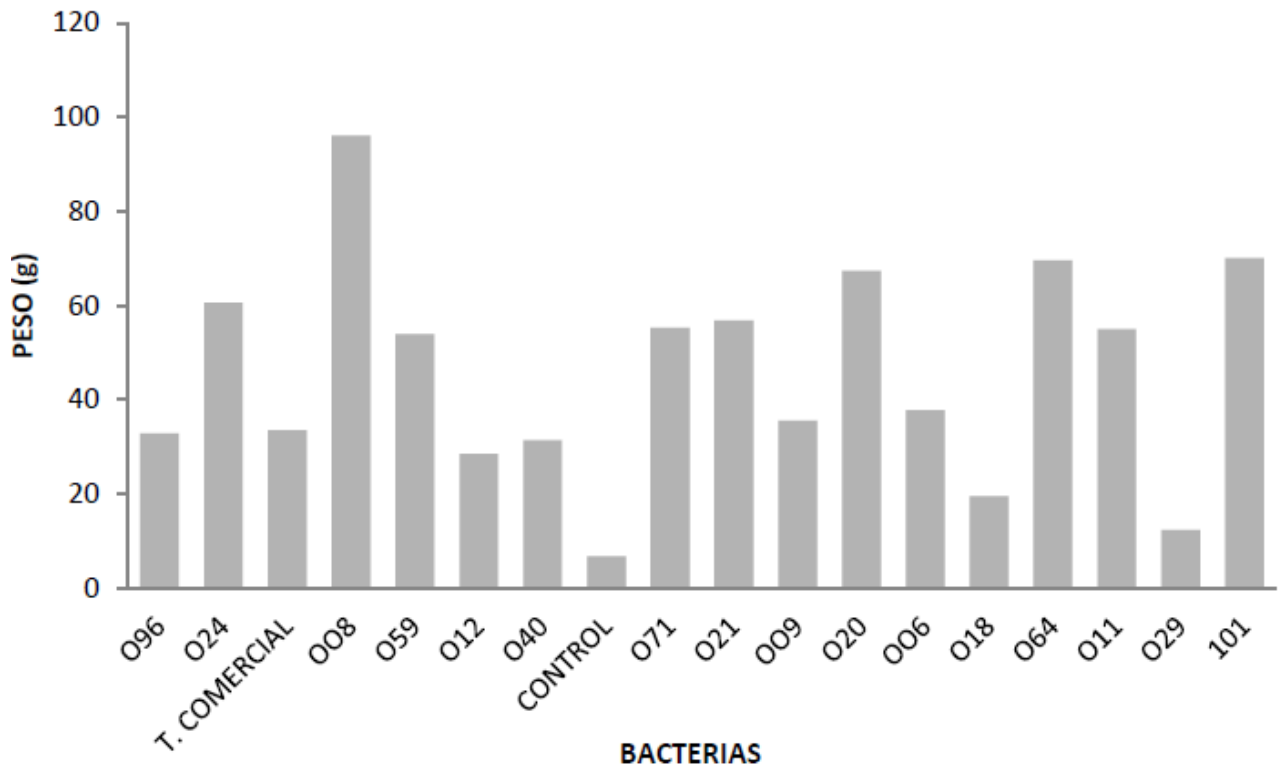
El crecimiento de las plantas fue homogéneo durante todo el ciclo, no se presentaron diferencias significativas en cuanto altura, sin embargo se pudo observar que las bacterias con mayor capacidad de solubilización 006, testigo comercial y 012 no son las que presentan mayor altura, por el contrario bacterias como la 071, 021, 008, 024 y 101 que no presentan los mayores valores de solubilización, son las que presentan mayor altura en las plantas durante todo el ciclo; esto puede deberse a que estas bacterias estimulan el crecimiento vegetal por medio de algún tipo de sustancia o por ser fijadoras de nitrógeno.



**Fotografía 6.** Evaluación del crecimiento de las plantas de papa inoculadas con bacterias en invernadero.

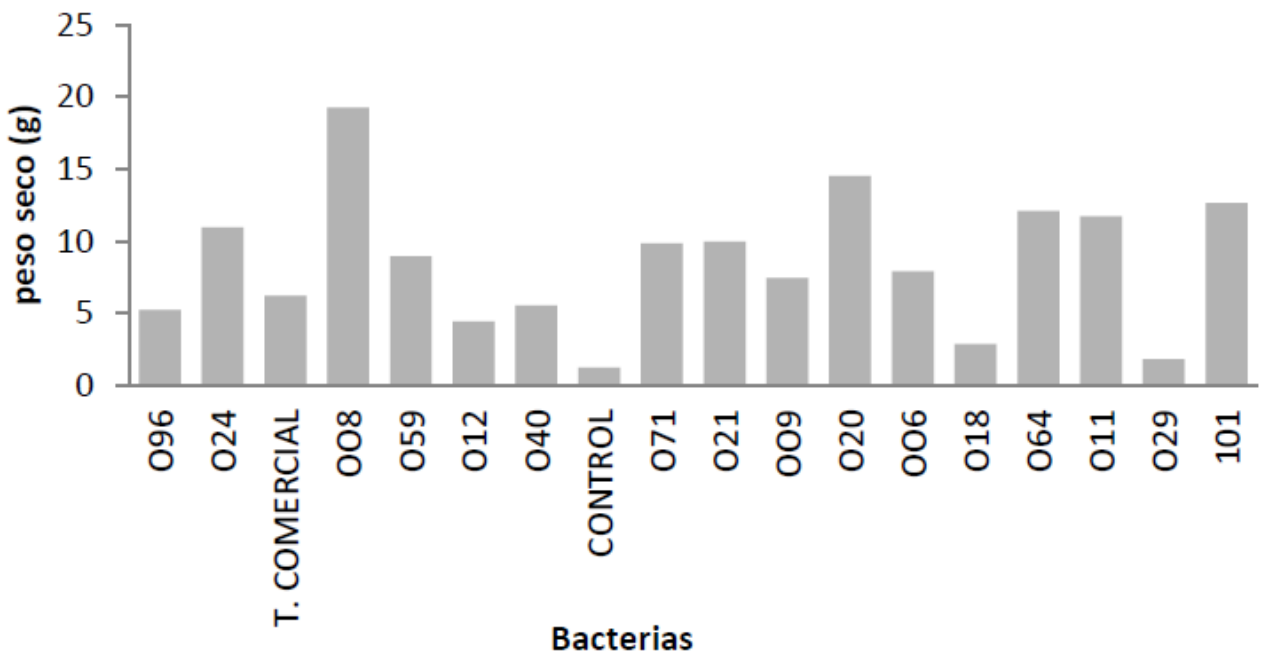


### Contenido de fósforo en tejido vegetal de papa



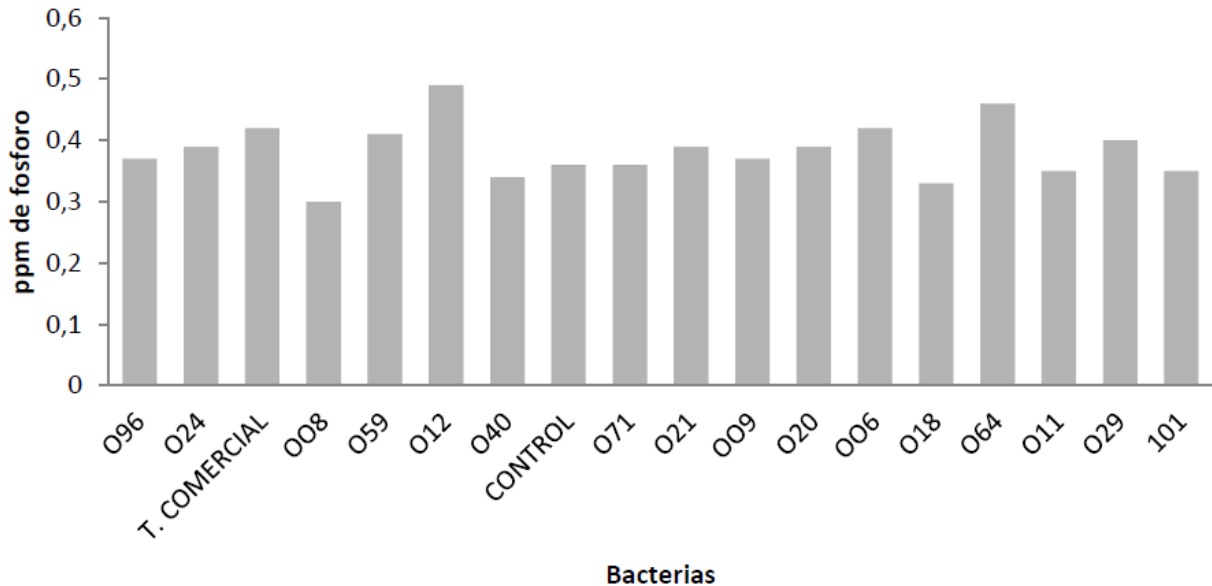
**Figura 6.** Peso fresco de las plantas de papa a los 115dds con la presencia de las diferentes bacterias evaluadas

En la figura se observa el peso fresco a los 115 días después de la siembra, que las bacterias 008, 101, 064, 024 y el testigo comercial presentan los valores más altos de peso fresco presentándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las bacterias. En esta variable, las bacterias 008 y 101 son las que presentan los mayores valores, lo que se explica que son posibles microorganismos promotores de crecimiento, aunque no son las mejores solubilizadoras.



**Figura 7.** Peso seco de las plantas de papa a los 115dds con la presencia de las diferentes bacterias evaluadas

La bacteria 008 es la que presenta nuevamente los valores más altos de peso en las plantas de papa lo que sugiere que esta bacteria puede tener la capacidad de liberar otros elementos para la planta o mediante enzimas agilizar la asimilación de estos por las plantas y así estas acumulan gran cantidad de nutrientes lo que se refleja en el peso seco. En la figura 7 se observó también que las bacterias con alto potencial solubilizador de fósforo no son las que más contribuyen en la acumulación de biomasa en la planta, esto puede deberse a que son bacterias especializadas en otras funciones como solo solubilización de fósforo. Se presentan diferencias significativas entre las bacterias para la variable de peso seco.



**Figura 8.** Contenido de Fósforo en los tubérculos de papa a los 115dds con la presencia de las diferentes bacterias evaluadas

En la figura anterior se muestra los resultados obtenidos del análisis de fósforo en tubérculos a los 115 días después de la siembra, las bacterias que presentan mayor capacidad de solubilización de fósforo en las pruebas anteriores son las que más promueven la acumulación de fósforo en tubérculos de papa, la bacteria 008 que tiene buenos resultados como promotora de crecimiento no contribuyen significativamente con la acumulación de fósforo en los tubérculos ya que entre esta bacteria y el control no existen diferencias significativas para esta variable.

## CONCLUSIONES

- Las bacterias que son más promisorias como solubilizadoras de fósforo son 059, 064, 006 y 012.
- La bacteria 006 es la más eficiente solubilizadora de fósforo, teniendo valores iguales de solubilización que el testigo comercial a base de *Pseudomonas sp.*
- La bacteria 018 es una buena promotora de crecimiento y podrían ser evaluados los mecanismos que utiliza para promover el crecimiento de las plantas.
- La evaluación en diferentes medios de cultivo con diferentes fuentes insolubles de fósforo determina la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir en diferentes pH de suelo.
- El aislamiento de microorganismos promotores de crecimiento de zonas específicas puede asegurar el éxito de un biofertilizante especializado para cada región o zona.

### 1.1.2 Colección, identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo, asociadas al cultivo de maíz en el municipio de Simijaca

#### Metodología

##### Obtención y Procesamiento de las muestras

Se tomaron muestras de suelos de áreas agrícolas de pequeños productores de maíz de la región de Simijaca. Estas se secaron en un horno y se tamizaron con malla de 2 mm para posteriormente realizar los distintos ensayos.

Se determinó la abundancia de la microflora de los suelos, con la técnica de las diluciones decimales y siembra en Caja de Petri, utilizando el medio Agar nutritivo y 4 placas por dilución sembrada. Se cuantificaron las bacterias con la misma técnica y siembra en medio Agar PDA (100 mg L<sup>-1</sup>). Se incubaron las muestras a 30°C durante 2-3 días.

##### Aislamiento y determinación de capacidad Fosfato solubilizadora

En la cámara de flujo, se aislaron cada uno de los microorganismos encontrados, en cajas con medio Pikosvskaya, en cada caja con este medio se esparcieron 8 microorganismos, para un total de 14 cajas de medio Pikosvskaya para aislar todos los microorganismos, que posteriormente fueron llevadas a la cámara de incubación para crecimiento de las colonias.

Se aislaron los microorganismos que presentaron solubilización del medio Pikosvskaya, donde se seleccionaron colonias de microorganismos que presentaban un halo transparente a su alrededor, ya que el medio Pikosvskaya tiene una coloración blanca. A estos microorganismos se les realizaron diferentes pruebas de selección donde se incluyen Crecimiento en medios Pikosvskaya modificado, medición Índices de Solubilización, Cuantificación de Fosforo solubilizado, y pruebas de Microorganismos de promotores de crecimiento y patogenicidad.

##### Caracterización de Microorganismos

La caracterización de la morfología microscópica de las colonias se realizó por medio de la tinción de Gram según Bergey's, 1956. Para la caracterización de las bacterias se utilizaron los Sistemas de Identificación BD BBL Crystal™ que están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores.

##### Ensayos en Invernadero

En la Tabla 8, se presentan los diferentes tratamientos aplicados para la siembra de plantas de Maíz, en pruebas de Invernadero.

**Tabla 8.** Tratamientos para Bacterias Solubilizadoras de Fósforo en plantas de Maíz

<b>T1</b>	Bacteria 1	1122
<b>T2</b>	Bacteria 2	3114
<b>T3</b>	Bacteria 3	3211
<b>T4</b>	Bacteria 4	4214
<b>T5</b>	Bacteria 5	5111
<b>T6</b>	Testigo Comercial	FosfoRiz
<b>T7</b>	Testigo Absoluto	

El Diseño estadístico que se utilizó en la evaluación de las bacterias solubilizadoras de Fósforo fue completamente aleatorizado con siete tratamientos y cuatro repeticiones; en la fase de invernadero se evaluaron variables como altura planta, Número de hojas por planta y Diámetro de Tallo.

## Resultados

Se realizó el conteo de los microorganismos que aparecieron después de la siembra en la dilución del suelo, microorganismos que diferían en sus características morfológicas.

En primera instancia se aislaron los 109 microorganismos en medio *Pikovskaya*, para determinar su capacidad solubilizadora. Las cajas petril con las 109 bacterias se encubaron por 76 horas a 25°C hasta la aparición de halos transparentes alrededor de las unidades formadoras de colonias con el fin de tener un diagnostico inicial de las poblaciones microbianas de interés.

El resultado nos muestra que de 109 microorganismos aislados, 37 bacterias presentaron capacidad Fosfato-Solubilizadora en el medio; a continuación se presentan las bacterias seleccionadas:

**Tabla 9.** Bacterias solubilizadoras del medio *Pikovskaya*.

No BACTERIA	NOMBRE BACTERIA	No BACTERIA	NOMBRE BACTERIA	No BACTERIA	NOMBRE BACTERIA
7	1117	28	1232	82	4211
10	1122	29	1233	83	4212
11	1131	30	1234	84	4213
12	1132	37	2117	85	4214
14	1134	44	2212	91	5111
15	1135	45	2213	99	5121
18	1213	46	2214	101	5123
16	1211	49	2223	105	5127
17	1212	51	3111	106	5211
23	1223	54	3114	107	5221
24	1224	62	3127	108	5222
25	1225	63	3211	109	5223
		67	3221		

Para identificar las bacterias se codificaron de la siguiente manera. Por ejemplo: **5124**; El **5** de la finca 5; El **1** de siembra en Medio con Agar Nutritivo (MAN); El **2** de la caja # dos de la siembra MAN; y El **4** de la bacteria enumerada como 4 de la caja # dos del MAN

### Prueba cualitativa de bacterias solubilizadoras de fósforo

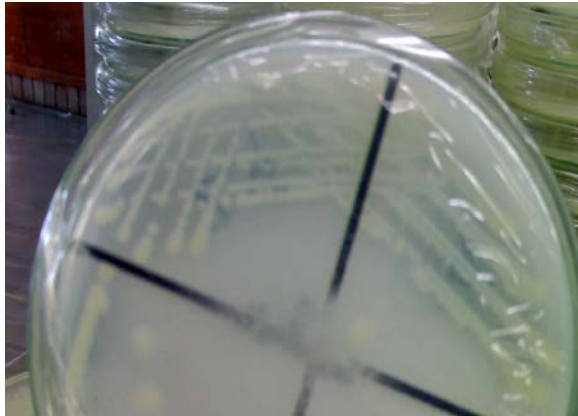
Las bacterias fueron aisladas nuevamente en medio *Pikovskaya*, individualmente, en la cámara de flujo, para determinar su potencial solubilizador. Se guardaron en la cámara de incubación para mirar su progreso en el medio posteriormente.

Por medio de la técnica de agotamiento que permitió obtener colonias puras para verificar su actividad fosfato solubilizadora por medio de los halos claros. Los valores del halo se determinaron por medio del Índice de Solubilización de Kumar & Narula.

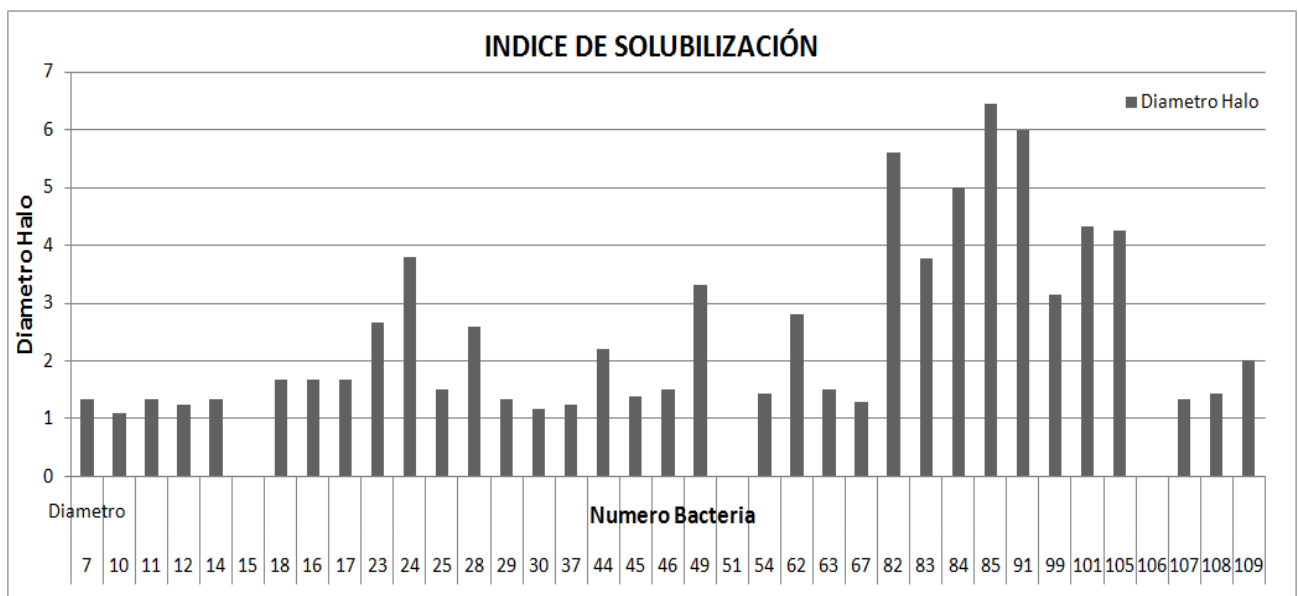
$$\text{Índice Solubilización} = A / B$$

Donde, A = Diámetro total (Diámetro de la Colonia + Diámetro del Halo)

B = Diámetro de la Colonia



**Fotografía 7.** Crecimiento de Microorganismos solubilizadores de fosforo, en medio Pikovskaya,



**Figura 9.** Determinación de Índice de solubilización para bacterias seleccionadas

Se obtuvo actividad solubilizadora en la mayoría de las cepas por medio de los halos de solubilización, donde se observa que bacterias 85, 91, 82, 63, 54 y 108 fueron las cepas más eficientes con una alta capacidad solubilizadora, ya que según trabajos realizados por Bobadilla y Rincón (2008) se tiene que Índices de Solubilización con valores entre 4 y 6 se consideran como alta capacidad de solubilizar el fósforo del medio

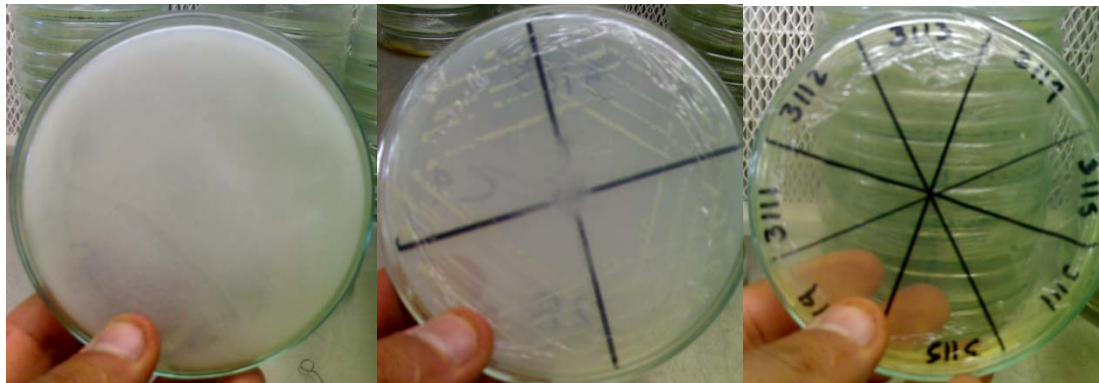


**Fotografía 8.** Halos formados por las bacterias

Es importante notar que las observaciones realizadas en la prueba de solubilización de fosfatos fueron con el fin de establecer, además de qué cepas producían índice de solubilización, la fuente de fósforo con el cual se obtuvieran los mayores índices de solubilización por parte de las cepas en el Agar *Pikovskaya*.

### Crecimiento de Bacterias en medio *Pikovskaya* modificado

Los siguientes fueron los resultados encontrados de crecimiento de las bacterias, según el medio *Pikovskaya*' s modificado con Fe y Al



Fotografías 9. *Pikovskaya* con Ca, *Pikovskaya* con Al, *Pikovskaya* con Fe; respectivamente



Fotografía 10. Preparación de medios de cultivo *Pikosvskaya*' s modificados con Fe, Al y Ca

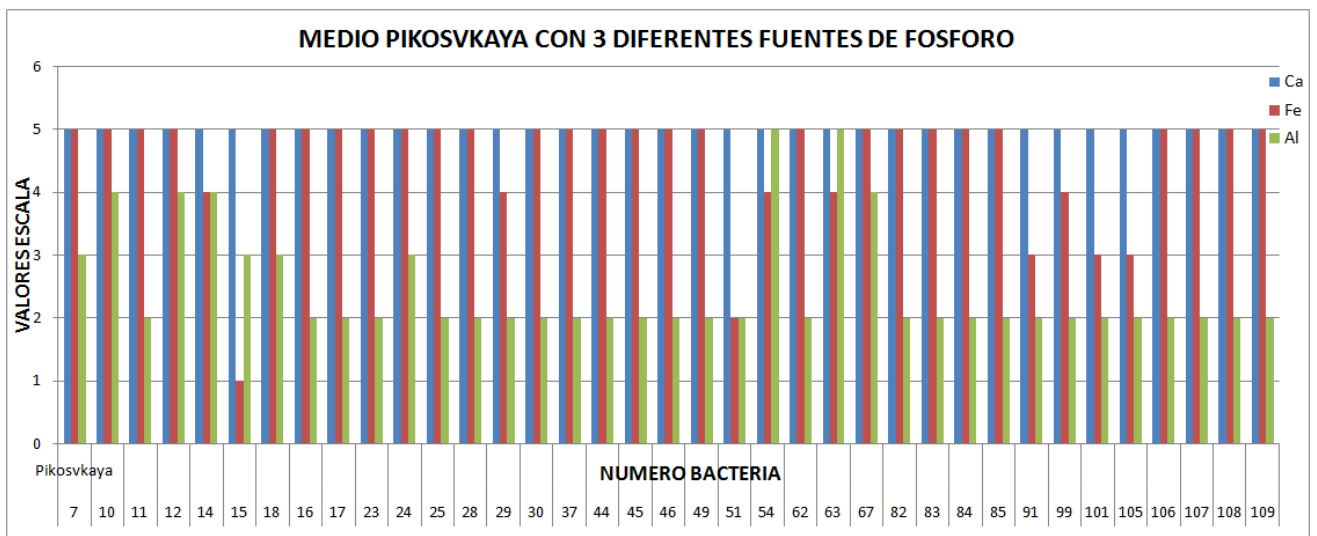


Figura 10. Evaluación de Bacterias en Medio *Pikosvskaya* Modificado

En la Figura 10 podemos observar la capacidad de crecimiento de las bacterias en medios con diferentes fuentes de fósforo, esto es importante ya que los suelos del municipio de Simijaca donde se cultiva el maíz predominan pH de 4 – 5.5 en zonas de ladera y 5 – 6 en zonas planas, y por sus características son suelos con contenidos altos de fosfatos de aluminio. Por ello, la capacidad de sobrevivir en estos medios depende la eficiencia de solubilización de dichos microorganismos.

**Tabla 10.** Escala para la Medición del crecimiento de Bacterias

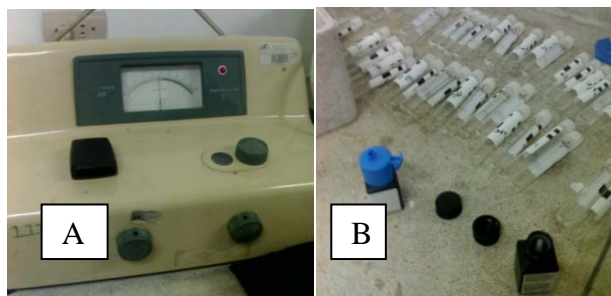
Valor	Concepto crecimiento	Descripción
1	No creció	Sin presencia de Colonia
2	Crecimiento Leve	Colonia delgada >1 mm* y opaca
3	Crecimiento Regular	Colonia entre 1-2 mm* y opaca
4	Crecimiento Bueno	Colonia 1-2 mm* y bien definida
5	Crecimiento Excelente	Colonia <2 mm* y bien definida

\*Diámetro de la colonia

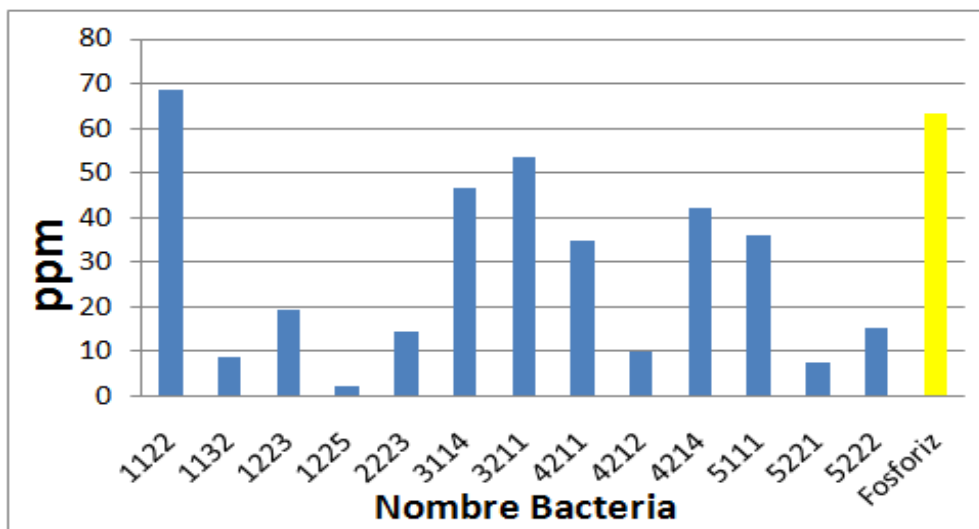
Bacterias como 10, 12, 14, 54, 63 y 67 tienen una muy alta capacidad de crecer en medios ácidos, lo que indica que se adaptarían muy fácilmente a suelos con pH bajos. Además presentan buen crecimiento en medios con pH básicos por lo que facilitaría la solubilización del fósforo en diferentes condiciones de pH del suelo.

**Prueba cuantitativa de solubilización de Fosfatos**

Se determinó la cantidad de fósforo disponible por el método de Fosfomolibdeno, utilizando la prueba analítica SPECTROQUANT ® FÓSFORO (PMB) MERCK donde se inocularon 13 bacterias que presentan un buen comportamiento al momento de solubilizar en fósforo del medio.



**Fotografías 11.** Materiales para el método Fosfomolibdeno: **A.** Espectrofotómetro, **B.** Reactivos.



**Figura 11.** Concentración de Fósforo en ppm de bacterias solubilizadoras.

La bacteria 1122 (10) presenta una concentración de fósforo mayor que el testigo comercial y es significativa la diferencia con respecto a las demás bacterias. Los microorganismos 3211, 3114 y 4214 presentan una buena concentración de fósforo soluble, por lo que indica que estas bacterias son microorganismos que presentan potencial solubilizador de fósforo para el cultivo de Maíz en suelos de Simijaca.

### Actividad estimuladora de crecimiento vegetal

Se realizó una prueba de Patogenicidad en semillas de lechuga para determinar una posible inhibición de crecimiento en dichas semillas y así descartar otras bacterias que pueden llegar a ser posibles patógenos en las semillas de Maíz y retrasar el crecimiento de las plantas en un cultivo.

Las variables medidas con esta prueba fueron: % de germinación, desarrollo de las raíz, desarrollo aéreo y altura de las plantas. Adicionalmente para tener un control de la concentración se hizo una siembra de la bacteria en Agar con el fin de contar las unidades formadoras de colonia de cada concentración.

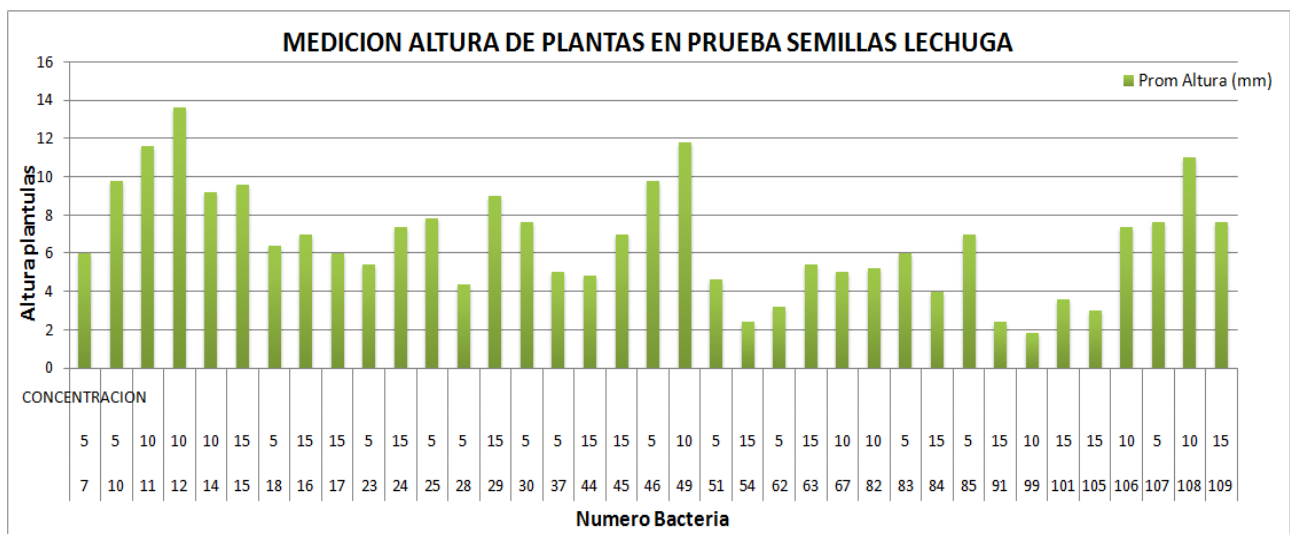


Figura 12. Altura plantas en prueba de semillas de lechuga

En la Figura 12 podemos determinar que ninguna bacteria inhibe el crecimiento de las plántulas, ya que dada la concentración se observó crecimiento; por otro lado se encontró que las bacterias 11, 12, 49 y 108 son posibles promotoras de crecimiento vegetal ya que presenta mayores longitudes en plántula de lechuga, mientras las bacterias 54, 62, 91, 99, 101 y 105 muestran bajo crecimiento.

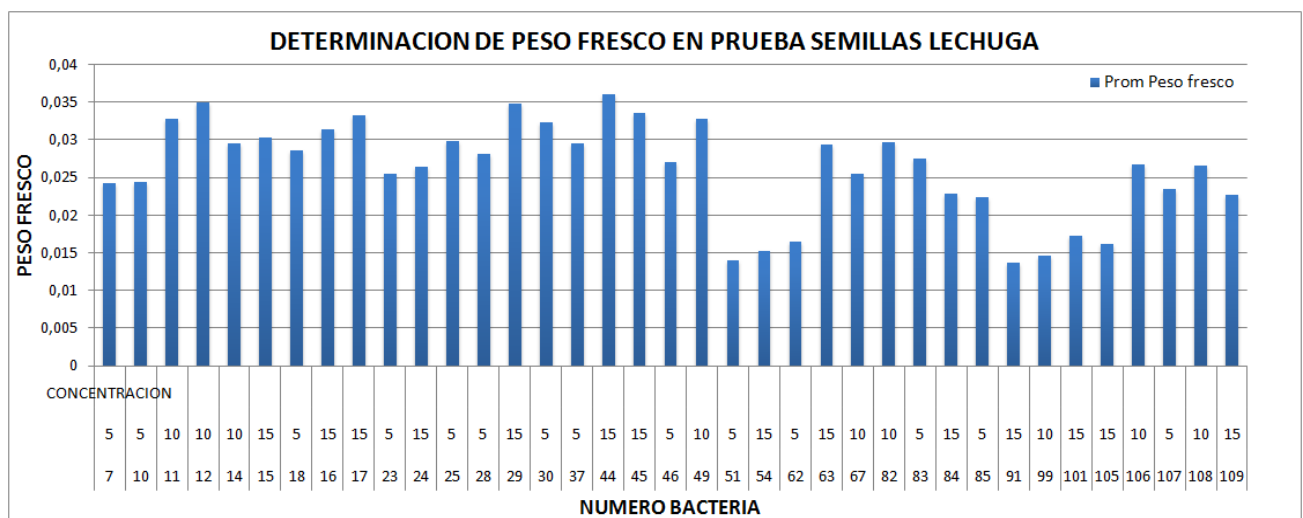


Figura 13. Peso fresco en plantas de lechuga



En la gráfica se aprecia que la mayoría de las bacterias presentan una ganancia de peso similar, sin embargo aunque estadísticamente no se evaluaron estos resultados, algunas bacterias codificadas con los números 51, 54, 62, 91, 99, 101 y 105 presentaron una notoria disminución de peso, por esto fue un criterio para ser descartadas.

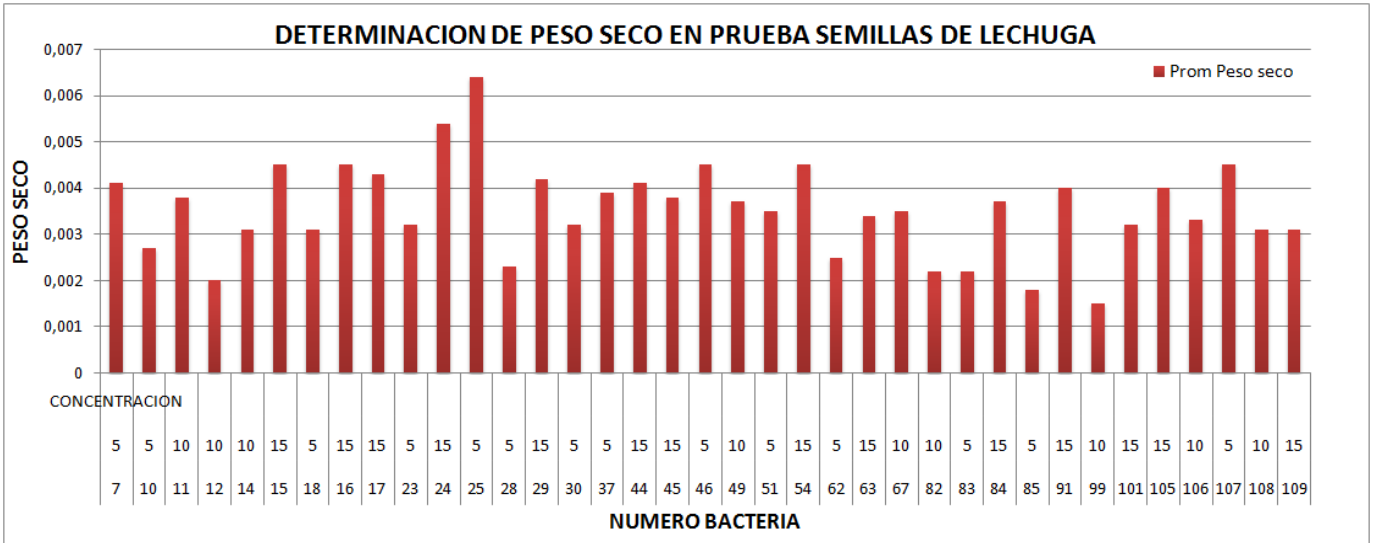
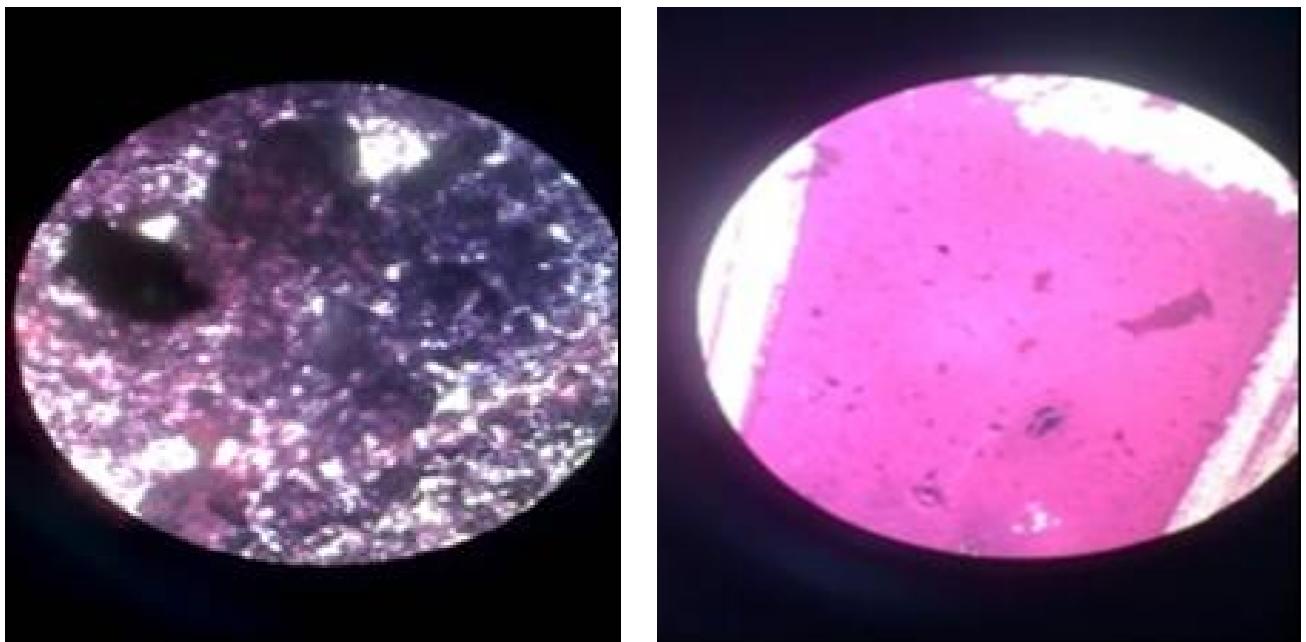


Figura 14. Determinación de Peso seco en plantas de lechuga

En las figuras 13 y 14, se destaca que las plántulas inoculadas con la bacteria 99 no acumularon una buena cantidad de agua en sus tejidos y, además, en la determinación de su peso seco presentó uno de los valores bajos. Por otra parte, se puede concluir que, dada la concentración, ninguna bacteria presenta capacidad patogénica en las plantas.

### Caracterización Microscópica y Tintorial

Se realizó la tinción de Gram para caracterizar las bacterias como Gram positivas o Gram negativas. Los resultados se muestran en la tabla 12. Esta tinción facilita la caracterización e identificación de los microorganismos.



Fotografías 12. Reacción Positiva y Negativa, respectivamente

**Tabla 11.** Coloración de Gram

No Bacteria	ID Bacteria	Reacción Gram
7	1117	Negativo
10	1122	Positivo
11	1131	Negativo
12	1132	Negativo
14	1134	Negativo
15	1135	Positivo
18	1213	Negativo
16	1211	Positivo
17	1212	Positivo
23	1223	Negativo
24	1224	Positivo
25	1225	Positivo
28	1232	Negativo
29	1233	Negativo
30	1234	Negativo
37	2117	Positivo
44	2212	Negativo
45	2213	Negativo
46	2214	Positivo
49	2223	Negativo
51	3111	Positivo
54	3114	Negativo
62	3127	Negativo
63	3211	Negativo
67	3221	Positivo
82	4211	Negativo
83	4212	Negativo
84	4213	Negativo
85	4214	Negativo
91	5111	Negativo
99	5121	Negativo
101	5123	Negativo
105	5127	Negativo
106	5211	Negativo
107	5221	Negativo
108	5222	Negativo
109	5223	Positivo

Las bacterias Gram positivas nos indican que poseen resistencia a antibióticos, por esto estas bacterias tienen más posibilidades de crecer en medios menos favorables.

### **Caracterización de bacterias por medio de BBL Crystal**

El reconocimiento de acuerdo con el metabolismo de los microorganismos solubilizadores de fosforo se llevo a cabo mediante el sistema de identificación BBL Crystal para bacterias entéricas/no fermentadoras realizando el montaje y lectura de las placas según las indicaciones, recomendaciones e instrucciones del productor.

**Tabla 12.** Caracterización Bioquímica de Bacterias solubilizadoras de Fosforo

COMPUESTO	ID BACTERIA	5123	4211	3211	1232	3114	5211	3127	5111	4214	2212	1223
		101	82	63	28	54	106	62	91	85	44	23
Arabinosa		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa		+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Inositol		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
p-n-p-fosfato		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
p-n-p a-B-glucósido		+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
p-n-p a-B-galactósido		-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Prolina Nitroanilinda		+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
p-n-p bis-fosfato		+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
p-n-p-xilósido		+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
p-n-p-a-arabinósido		-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-n-p fosforilcolina		-	-	+	+	+	+	V	+	+	-	-
p-n-p-B-glucurónido		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
p-n-p-N-acetil glucosamidina		+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
y-L-glucotamil p-nitroanilida		-	V	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Esculina		+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
p-nitro-DL-fenilalanina		+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Urea		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glicina		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido Malónico		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cloruro de Trifenil tetrazolio		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arginina		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lisina		+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

+ = Reacción positiva - = Reacción negativa V = Reacción Variable

Los resultados de la Tabla 12 se obtuvieron de la reacción de las bacterias frente a diferentes compuestos establecidos en el Kit, donde se evidenciaron procesos de fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos (Gilardi, 1990). A partir de estas reacciones se tiene algunos indicios sobre la identificación de las bacterias seleccionadas, las cuales pueden ser pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, inicialmente.

### Selección de Bacterias según pruebas de Laboratorio

Para la selección de las bacterias que se inocularon en la evaluación de invernadero, se asignaron porcentajes en cada una de las pruebas realizadas en laboratorio, donde se media el comportamiento de los microorganismos para finalmente seleccionar las bacterias que presentaran valores altos en los resultados de las pruebas de laboratorio, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 13.** Selección de bacterias para pruebas de Invernadero

NUMERO	NOMBRE BACTERIA	Indice Solubilización	Pikosvskaya Ca, Fe, Al	Prueba semillas Lechuga	SELECCIÓN	Prueba Fosfatasas
7	1117	21	87	69	59	
10	1122	59	93	70	74	100
11	1131	21	80	84	61	
12	1132	19	93	77	63	13
14	1134	21	87	74	61	
15	1135	0	60	81	47	
16	1211	26	87	64	59	
17	1212	26	80	77	61	
18	1213	26	80	66	57	
23	1223	41	80	65	62	28
24	1224	17	87	78	61	
25	1225	23	80	85	63	3
28	1232	40	80	57	59	
29	1233	21	73	82	59	
30	1234	18	80	74	57	
37	2117	19	80	70	56	
44	2212	34	80	70	61	
45	2213	21	80	76	59	
46	2214	23	80	79	61	
49	2223	51	80	84	72	21
51	3111	0	60	57	39	
54	3114	66	93	48	69	68
62	3127	44	80	42	55	
63	3211	78	93	63	78	78
67	3221	20	93	61	58	
82	4211	87	80	59	75	51
83	4212	59	80	59	66	14
84	4213	23	80	58	54	
85	4214	100	80	60	80	61
91	5111	93	67	49	70	52
99	5121	22	73	34	43	
101	5123	21	67	51	46	
105	5127	0	67	52	40	
106	5211	31	80	70	60	
107	5221	49	80	68	65	11
108	5222	67	80	71	73	22
109	5223	22	80	67	56	

Celdas Amarillas: Bacterias seleccionadas para prueba *Spectroquant Fosfato*

Celdas Azules: Bacterias seleccionadas para ensayos en invernadero

En la tabla 13 se muestra la selección de las bacterias que se utilizaron en la fase dos (Evaluación de invernadero), donde se identificaron las bacterias que presentaron buena eficiencia en las pruebas realizadas en Laboratorio, los valores están dados en %, por lo que inicialmente se realizó la selección de 13 bacterias para realizar la prueba *Spectroquant Fosfato*, de las cuales 5 fueron seleccionadas por su eficiencia en la solubilización de fósforo.

### Pruebas en invernadero

Según resultados del análisis de las pruebas de laboratorio que arroja la tabla 13, se seleccionaron las siguientes 5 bacterias para pruebas desarrolladas en invernadero:

1. 10 = 1122
2. 54 = 3114
3. 63 = 3211
4. 85 = 4214
5. 91 = 5111

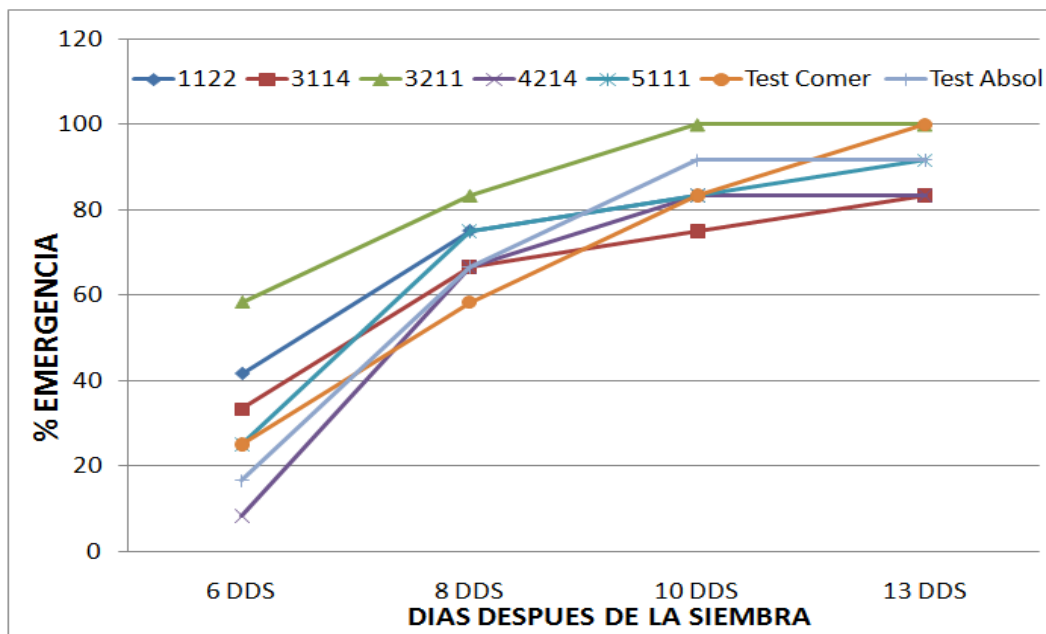
Para la siembra, en la evaluación de invernadero, se utilizaron 3 semillas de maíz por materia y cada una de estas se inoculó con 5 ml de las bacterias seleccionadas, según el tratamiento evaluado; para el testigo comercial se utilizó un producto denominado FOSFORIZ y el testigo absoluto no se inocularon las semillas.



**Fotografía 13.** Reactivos utilizados y forma de aplicación durante la incubación de las bacterias seleccionadas para pruebas en campo

## EVALUACION VARIABLES DE CRECIMIENTO

### Porcentaje de emergencia



**Figura 15.** Porcentaje de Emergencia de plantas de maíz en ensayo de invernadero

En el porcentaje de emergencia se destacó el tratamiento 3, donde se inocularon las semillas con la bacteria 3211, la cual promueve el crecimiento de las plantas por su potencial en cuanto a la estimulación al momento de la emergencia, ya que a partir de la lectura inicial (6 dds) presentó el mayor porcentaje de emergencia. En la lectura final (13 dds) se pudo observar que las semillas inoculadas con las bacterias 3211 y el producto FOSFORIZ presentaron el más alto porcentaje.

## Altura plantas

La altura de las plantas de Maíz presenta un crecimiento similar en los primeros días en todos los tratamientos, como se puede observar en la Figura 16, pero se destaca a la semana 10 un mayor crecimiento de las plantas inoculadas con la bacteria 3211, donde toma una mayor tendencia crecimiento con respecto a los demás tratamientos. La adecuada disponibilidad de nutrientes, especialmente a partir del momento en que los mismos son requeridos en mayores cantidades (aproximadamente 5 - 6 hojas desarrolladas), asegura un buen crecimiento foliar y una alta eficiencia de conversión de radiación interceptada (Andrade et al. 1996); por lo que se puede deducir que la bacteria 3211 realizó una mayor disponibilidad y aporte de nutrientes, específicamente P, para destacarse en el desarrollo de las plantas de Maíz.



Fotografías 14. Crecimiento vegetativo plantas de Maíz en ensayo de Invernadero

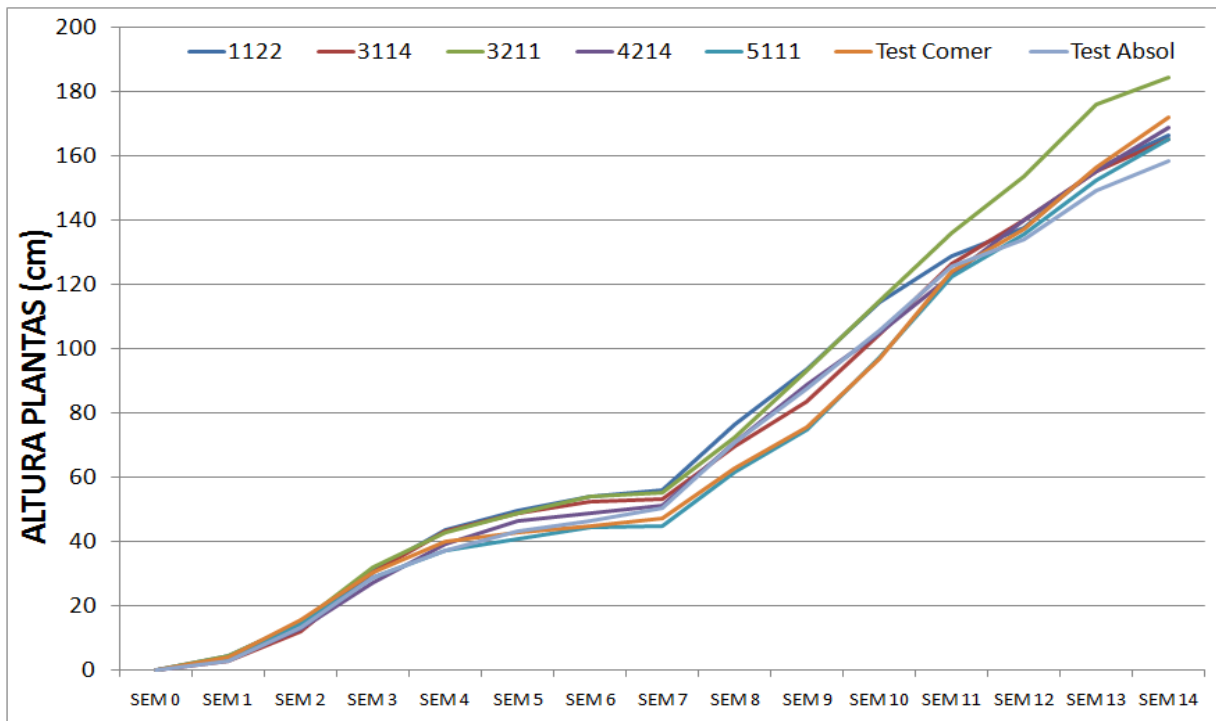


Figura 16. Medición de Altura en plantas de Maíz

En la altura que se observa en el tratamiento 3211, se evidencia alguna diferencia en esta variable, debido a la tendencia ejercida por el tratamiento.

## Diámetro de tallo

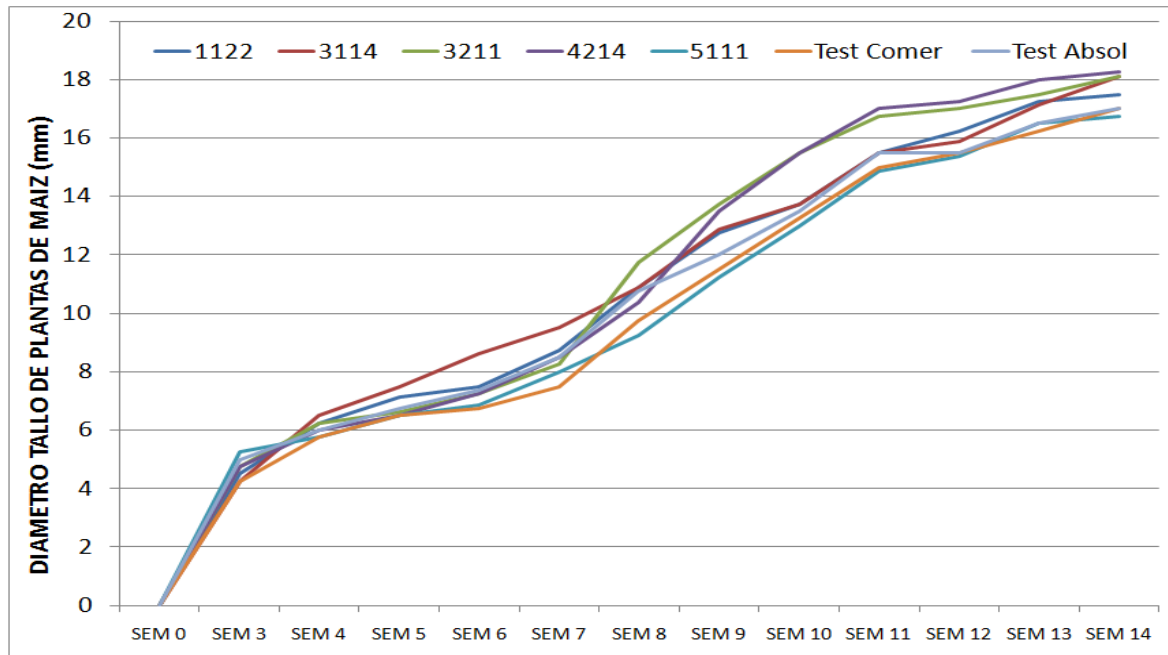


Figura 17. Medición Diámetro de tallo en plantas de Maíz

En la figura 17, se evidenció que los tratamientos inoculados con las bacterias 3211 y 4214 presentan una diferencia a partir de la semana 8 y 9, respectivamente, con respecto a los demás tratamientos, y esto se debe a la acumulación de biomasa que en este instante del ciclo de la planta las bacterias estimularon, además, el crecimiento vegetal por la fijación de otro nutriente o actuación de alguna sustancia. Con ello se puede correlacionar el efecto de la bacteria 3211 con la variable de altura donde presenta una tendencia similar en el desarrollo los órganos de la planta y además en las pruebas realizadas en laboratorio en la identificación de microorganismos promotores de crecimiento se tiene que la bacteria 3211 fue una de las que obtuvo buenos resultados en la acumulación de biomasa en los órganos de las plantas.

## Numero de hojas

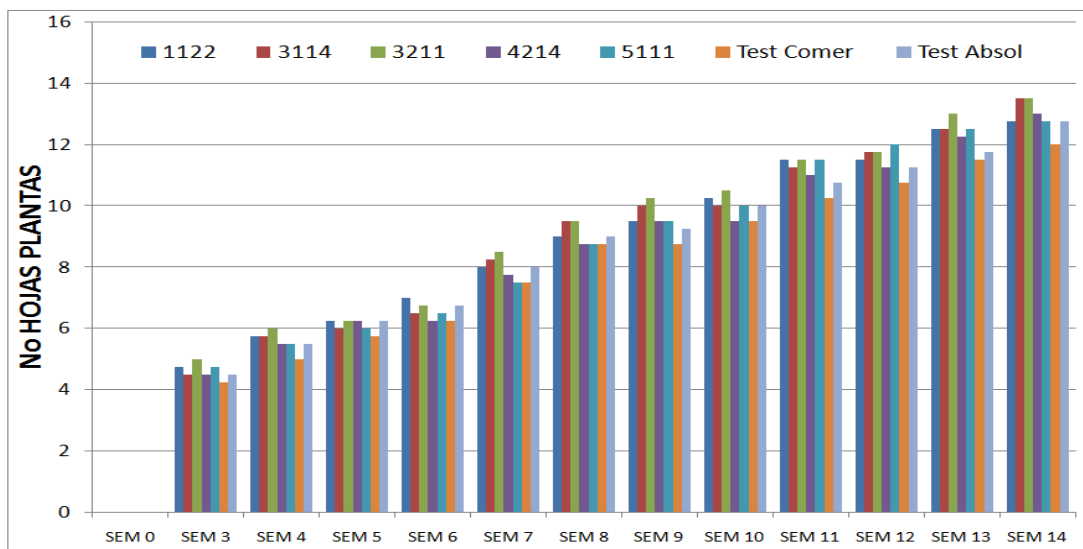


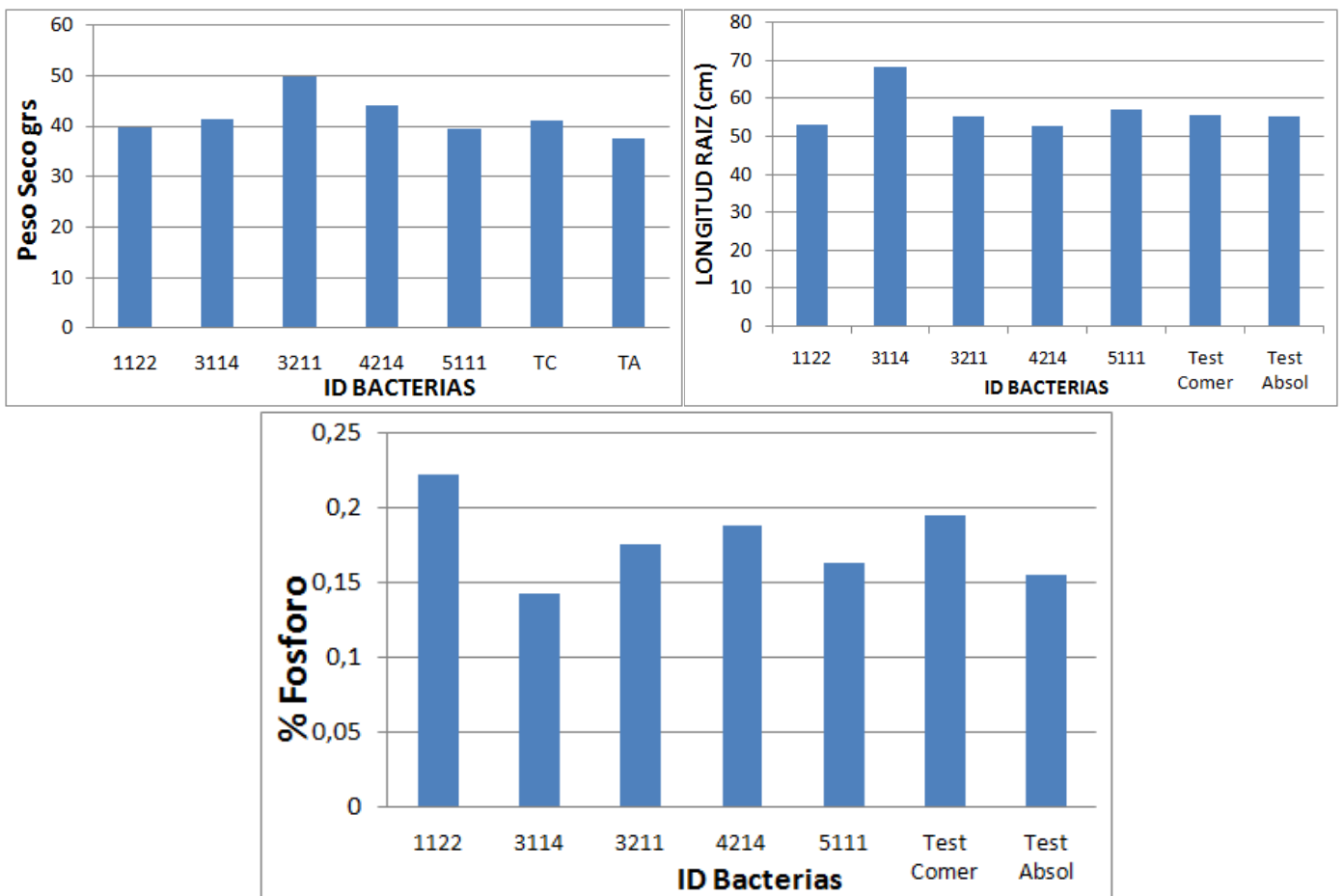
Figura 18. Medición de Numero de hojas en plantas de Maíz para cada tratamiento.

Dentro de esta variable de crecimiento, se observó en la figura 18, que los tratamientos testigos, presentaron menor cantidad de numero de hojas durante la mayoría del ciclo de la planta con respecto a los demás tratamientos donde se aplicaron bacterias nativas, por lo cual se puede deducir que las bacterias aisladas de las zonas maiceras de Simijaca promueven un eficiente desarrollo de tejido vegetal para la transformación de la nutrientes dentro del proceso de la fotosíntesis, donde se destacaron las bacterias 1122 y 3211.

En el análisis de las diferentes variables de crecimiento, se destaca la simbiosis que presento la bacteria 3211 en el desarrollo vegetativo de las plantas de Maíz, por lo que se presentó como una buena candidata para realizar evaluaciones en la zona maicera del municipio de Simijaca.

### Evaluación de variables de peso seco y longitud de raíz en planta, y determinación de la concentración de fosforo en hojas

Se puede observar, que las gráficas se evidencia los tratamientos son muy parejos, sin embargo es notorio en algunos casos que hay tendencia de ciertos tratamientos a ser mayores, como el caso de los tratamientos 3211 y 4214 en el peso seco, del tratamiento 3114 en la longitud de raíz o del tratamiento 1122 en la concentración de fosforo en tejido vegetal, además es muy interesante que la variable concentración de fósforo en hoja y longitud de raíz tienen comportamientos contrarios, es decir los tratamientos altos en uno son bajos en otro, al hacer un coeficiente de correlación entre estas dos variables nos da un valor de  $-0,72$  lo que indica una asociación del 72% entre las variables pero de manera inversa.



**Figura 19. Cuantificación y evaluación de variables:** Peso seco de plantas de Maíz, Longitud de raíz de los tratamientos utilizados en plantas de Maíz, Concentración de Fosforo en tejido vegetal.



## CONCLUSIONES

El suelo muestreado en los cultivos de Maíz del municipio de Simijaca presentaron una microbiota diversa donde se evidenciaron microorganismos promotores de crecimiento vegetal y solubilizadores de fosforo, unos pocos con un excelente potencial solubilizador como las bacterias 1122 y 3211, que según la clave de identificación por medio del sistema BBL Crystal pertenecen al género de *Pseudomonas*.

Las bacterias 1122 y 3211 son las más promisorias como microorganismos solubilizadores de fosforo para la zona de Simijaca, las cuales pueden constituir la base para la generación de un paquete tecnológico basado en microorganismos benéficos encaminados en su aplicación conjunta en sistemas productivos de Maíz.

El uso de las bacterias solubilizadoras de fosforo en plantas de maíz, no presentó diferencias significativas en relación al testigo absoluto en las variables de crecimiento evaluadas, pero si se encontró tendencia de mayor progreso en estas variables por parte de la bacteria 3211.

## Actividad. 1.2. Evaluación in vitro y maceta con organismos relacionados a los biofertilizantes.

### 1.2.1. Obtención y caracterización de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (HFMA) nativos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* l. var. porva) en el municipio de Saboyá (Boyacá, Colombia).

#### Introducción

La actividad económica principal del municipio de Saboyá es la agropecuaria, dentro de la cual cobran importancia el cultivo de la papa (31%) y el maíz (14%). La vereda Merchán es la de mayor extensión del municipio y la que presenta mayores volúmenes de producción de papa (64%) y maíz (22%). El maíz cultivado en Saboyá conocido como Porva Amarillo (tanto nativo como introducido), es el más usado en la región y en el municipio, presentando rendimientos muy bajos que fluctúan entre 1,8 y 2 ton·ha<sup>-1</sup>, es decir de 2 a 3 mazorcas por planta (Corporación PBA, 2010).

Los hongos micorrízicos arbusculares interactúan simbióticamente con cerca del 90% de las plantas terrestres formando diferentes tipos de asociaciones micorrízicas y aunque el número total de hongos del suelo involucrados en esta simbiosis es desconocido, han beneficiado muchas especies importantes en agricultura, como es el caso del maíz, al incrementar su adaptación a diferentes ambientes y con efectos positivos sobre la productividad del sistema (Serralde y Ramírez, 2004).

Existen especies de Hongos Formadores de Micorrizas Versículo-Arbusculares (HFMA) distribuidas en todos los ecosistemas y suelos, sin embargo, la cantidad y variedad de especies de estos hongos es muy heterogénea en cada sitio y aún la distribución puede variar en un mismo campo (Sieverding, 1986). Es así como bajo condiciones naturales de campo, casi todas las plantas cultivadas son colonizadas por HFMA, encontrando que la mayoría de los resultados reportados para dichos hongos se han efectuado experimentalmente bajo condiciones controladas en laboratorio o invernadero; destacando que la fisiología de la planta es afectada positivamente gracias a la simbiosis establecida (Salamanca y Silva, 1998).

En particular para maíz, se ha reportado que este tiene una mayor dependencia micorrízica en comparación con otras plantas como por ejemplo papa y trigo (Dalpe y Monreal, 2003), destacando que la caracterización de HFMA en su lugar de origen es necesaria para la evaluación de sus

poblaciones, diversidad y establecimiento de cepas nativas eficientes adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de una región determinada; las cuales son promisorias para su uso en planes de biofertilización que permitan mejorar la capacidad productiva de los cultivos (Sieverding, 1986; Sánchez *et al.*, 2007). En este sentido, Montilla *et al.* (2005) sugieren que el éxito de las inoculaciones con HFMA está relacionado no solo con la eficiencia de la cepa a aplicar, también con la cantidad y tipo de propágulos nativos.

Por las anteriores razones en el presente estudio se efectuó caracterización de morfotipos de HFMA nativos asociados a plantas de maíz Porva provenientes de fincas de Saboyá (Boyacá - Colombia), debido a la necesidad de obtener una caracterización inicial de cepas nativas presentes en un ambiente edáfo-climático específico.

## Metodología

Los HFMA se obtuvieron a partir de muestras de suelo tomadas en dos fincas del municipio de Saboya, departamento de Boyacá - Colombia, con cultivos de maíz de cinco meses después de emergencia y manejo agronómico contrastante.

Se seleccionaron dos fincas para la toma de muestras y selección de morfotipos; la finca “Carrizo” y la finca “La Granja” debido a sus diferencias contrastantes en cuanto al manejo agronómico intensivo de maquinaria y agro insumos en el cultivo de maíz porva amarillo.

Se tomaron tres muestras compuestas de suelo y raíces de maíz por finca, efectuando clareo y tinción de las raíces (Phillips y Hayman, 1970; con modificaciones de Sieverding, 1983 y Vierheilig *et al.*, 1998), extracción (Gerdeman y Nicolson, 1963; modificada por Sieverding, 1983) y cuantificación del porcentaje de colonización (Nicolson, 1960 y Baylis, 1967; modificados por Sieverding, 1983); caracterizando los morfotipos presentes (Schenk y Pérez, 1990).

## Resultados

### Caracterización físico - química de los suelos de las fincas seleccionadas en el municipio de Saboyá (Boyacá, Colombia).

La caracterización del suelo de las dos fincas seleccionadas en Saboyá, finca “Carrizo” y finca “La Granja” indicó por medio de un análisis de suelo que se muestra a continuación:

**Tabla 14.** Análisis químico de los elementos mayores y menores de los suelos de dos fincas en la vereda Merchán Bajo del municipio de Saboyá, Boyacá (2010). Se destacan parámetros que se relacionan con la simbiosis micorrízica.

FINCA	pH	CO	MO	P	Fe	Mn	Cu	Zn	B		
		(%)	(CO·1,72)							mg·kg <sup>-1</sup>	
Carrizo	4,5	9,45	16,25	13,1	64,4	1,10	0,38	5,61	0,19		
La Granja	5,1	10,2	17,54	4,96	71,6	0,89	0,01	0,81	0,23		
FINCA				Al	Ca	Mg	K				
				meq/100g							
Carrizo				4,41	1,06	0,18	0,25				
La Granja				1,7	5,29	0,89	0,62				

El pH entre muy fuertemente ácido y fuertemente ácido, siendo más ácido en la finca “Carrizo”, probablemente por las adiciones constantes de urea. La materia orgánica presentó un contenido alto en las dos fincas. El contenido de fósforo (P) presentó amplia diferencia, siendo bajo en las dos fincas, sin embargo presentó mayor contenido en la finca “Carrizo”. Con respecto al calcio (Ca) se observaron deficiencias en la finca “Carrizo” y un contenido medio en la finca “La Granja”. El magnesio (Mg) presentó contenidos bajos en las dos fincas y en cuanto al potasio (K) se observó

un valor medio en la finca “Carrizo” y alto en “La Granja”. El análisis físico indicó que los suelos de las dos fincas presentan una textura franco-arenosa (FA).

### Evaluación de la colonización radical con HFMA

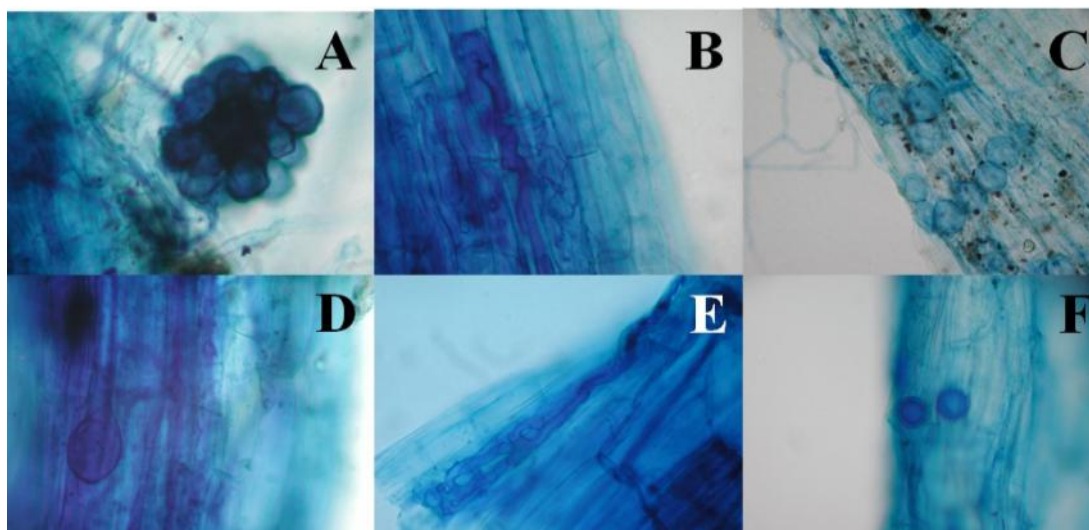
En términos generales, para el porcentaje de colonización según el análisis de varianza, se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para las variables de colonización radical por vesículas y por esporas intraradicales; destacando que para la finca “La Granja” se observaron los mayores valores de colonización por vesículas y por esporas intraradicales.

**Tabla 15.** Porcentajes de colonización de raíces de maíz Porva por HFMA nativos obtenidos en las fincas evaluadas de Saboyá (Boyacá, Colombia).

Finca	%Total	%Arbúsculos	%Vesículas	% Hifas extra radicales	% Hifas intra radicales	% Esporas
Carrizo	88,4 a (5,0)	17,667 a (4,1)	8,267 b (2,8)	67,867 a (5,1)	68,267 a (1,4)	1,2 b (0,9)
La Granja	82,7 a (11,6)	19,8 a (20,3)	15,867 a (16,1)	59,6 a (12,7)	62,067 a (19,8)	5,467 a (2,2)

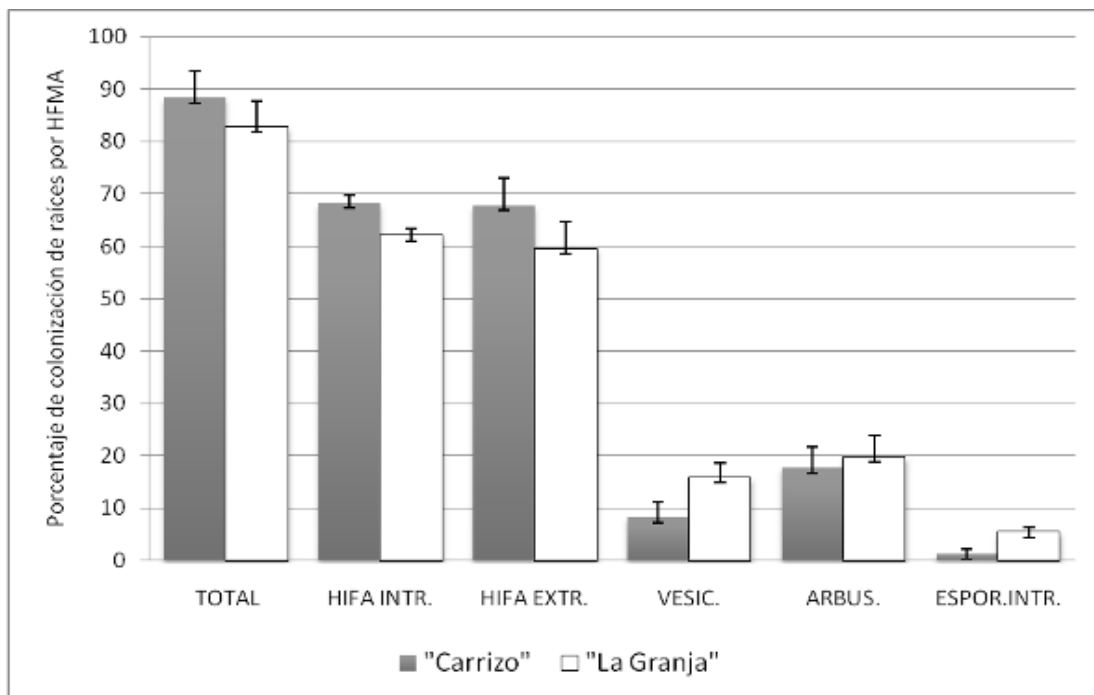
Nota: La desviación estándar aparece entre paréntesis. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas para promedios de colonización total y por estructura (PCE), de acuerdo prueba de Tukey con una confianza del 95%.

Los valores de porcentaje de colonización total para las fincas obtenidos podrían considerarse aceptables para las dos fincas, debido a que en estudios realizados por Carrenho *et al.* (2001) en maíz var. IAC-Taiúba, durante tres años en Brasil, la colonización radical estuvo entre 56,7% y 87%. Resultados similares encontró Singh (2001) en experimentos realizados en la Universidad de Agricultura y Tecnología de Pant Nagar (India), en donde se inoculó maíz con *Gigaspora margarita*, *Glomus fasciculatum* y una mezcla de HFMA, observando valores de 54%, 50%, y 58% de colonización total de raíces respectivamente; mientras que en estudios reportados por Hetrick *et al.* (1984) solo se obtuvo una variación del porcentaje de colonización entre 2% y 8,7% en maíz cultivado en cuatro diferentes áreas en el estado de Kansas (EE.UU.). Para variedades de maíz “ICA-Sikuani” y “Clavito” en suelos ácidos de los llanos orientales, Serralde y Ramírez (2004) observaron valores superiores al 83% para el porcentaje de colonización total, indicando que la simbiosis fue altamente activa.



**Fotografía 15.** Estructuras HFMA en raíces de maíz en las muestras evaluadas. En la fila superior se observan raíces de maíz Porva de la finca “Carrizo” colonizadas por: **A.** células auxiliares del género *Scutellospora*, **B.** arbúsculos e hifas intraradicales y **C.** esporas intraradicales (800X). En la fila inferior se observan raíces de maíz Porva de la finca “La Granja” colonizadas por: **D.** vesículas, **E.** arbúsculos y **F.** esporas intraradicales.

La simbiosis con HFMA en campo se encontró bien desarrollada, presentando todas las estructuras típicas de la colonización. A partir de las muestras de raíces de maíz variedad Porva se pudieron observar varias estructuras propias de los HFMA, para las estructuras encontradas en la finca "Carrizo", así como para la finca "La Granja". En la finca "Carrizo" se presentaron estructuras que caracterizan la familia *Gigasporineae*, encontrando al cuantificar la colonización radical solamente una célula auxiliar con exterior equinulado, que pertenece únicamente a micorrizas del género *Gigaspora*. De acuerdo con Walker (1992) la formación de estas estructuras, depende de la identidad del hongo, así los HFMA pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas y producen en su lugar, células auxiliares sobre el micelio externo o raramente dentro de la raíz.



**Figura 20.** Porcentaje de colonización total y por estructura de HFMA en raíces de maíz variedad porva en dos fincas de Saboyá (Boyacá, Colombia).

Los resultados obtenidos en las fincas del municipio de Saboyá para colonización total de raíces coincidieron con lo observado por Roveda y Polo (2007), quienes encontraron que a menores concentraciones de fósforo disponible en el suelo, existe un mayor número de plantas micorrizadas. Adicionalmente, dichos autores reportaron que la presencia de vesículas se incrementa con la concentración de fósforo, mientras que el número de esporas disminuye.

Aunque la colonización por hifas externas no presentó diferencias significativas entre las fincas, si puede tomarse como una variable indirecta del establecimiento de la simbiosis, ya que los valores fueron siempre superiores al 59% y muy similares a los de la colonización intraradical en las dos fincas (68,267% y 62,067%), siendo además una muestra de la exploración del suelo por parte de éstas, ya que el micelio externo aumenta la superficie radical, siendo capaz de proveer activamente a la planta de P y otros macro y micro nutrientes (Zuleta, 2003).

La colonización radical por parte de arbusculos no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), sin embargo tuvo valores de colonización aceptables (17,7% en la finca "Carrizo" y 19,8 en la finca "La Granja"), de acuerdo a lo reportado por McGonigle *et al.* (1999) para Ontario (Canadá) con un máximo de 68% de colonización radical por arbusculos después de dos ciclos de monocultivo de maíz a los treinta y dos días después de la siembra. Adicionalmente al comparar estos valores con los de colonización por vesículas (8,267% en la finca "Carrizo" y 15,867% en la finca "La Granja") y por esporas internas (1,2% en la finca "Carrizo" y 5,467%. en la finca "La Granja").

Por lo tanto se puede inferir que la colonización por vesículas generó una medida objetiva del estado de la simbiosis, mejor establecida en “La Granja” debido a que las bajas concentraciones de fósforo disponible en el suelo ayudaron a que se desarrollara una simbiosis en donde los HFMA formaron más estructuras de reserva, mejorando la toma de nutrientes. Esto muestra que la fertilización a través de un análisis de suelo presenta ventajas con respecto al manejo tradicional, como el realizado en la finca “Carrizo”, que a través de adiciones frecuentes de fertilizantes de síntesis han aumentado los niveles de fósforo en el suelo afectando entre otros factores, la relación simbiótica entre las plantas de maíz y los HFMA. Al analizar la colonización por arbusculos como otro indicador de la intensidad de la simbiosis micorrízica, aunque no se obtuvieron valores significativamente diferentes entre fincas ( $p < 0,05$ ), se presentaron valores adecuados de colonización 17,6% y 19,8% para “Carrizo” y “La Granja,” respectivamente, lo cual es importante, ya que es allí donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre la planta y el HFMA.

### Cantidad total de esporas y por géneros de HFMA obtenidas

En la finca “La Granja” se encontraron 5.946,7 esporas·100 g<sup>-1</sup> de suelo seco a partir de las muestras tomadas, una menor cantidad se reportó para la finca “Carrizo” con 4.657,8 esporas·100 g<sup>-1</sup> de suelo seco. Posteriores análisis estadísticos permitieron concluir que hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el número de esporas·100 g<sup>-1</sup> de suelo seco encontradas en los dos sitios de estudio. Se encontraron en total 83 morfotipos de HFMA nativos asociados con el cultivo de maíz Porva (Tabla N° 16), se agruparon según su homogeneidad en cuanto a forma, color, estructura superficial, tamaño de la espora y la presencia, forma y coloración de la conexión hifal. Autores citados por Serralde y Ramírez (2004) encontraron en maíz entre 3 y 15 especies nativas de HFMA, entre tanto, dichos autores reportaron en total 24 morfotipos nativos en suelos ácidos de los llanos orientales en variedades de maíz ICA-Sikuani V-110 y Clavito.

**Tabla 16.** Morfotipos caracterizados en las fincas estudiadas en Saboyá, Colombia. Frecuencia y número de esporas·100g<sup>-1</sup> de suelo seco. Se resaltan los morfotipos seleccionados para la siguiente etapa del proceso de investigación.

Morfotipo N°	GENERO	MORFOTIPO	FRECUENCIA (%) (N=18)	FRECUENCIA CARRIZO (%) (N=9)	FRECUENCIA GRANJA (%) (N=9)	PROMEDIO (esporas·100g <sup>-1</sup> Suelo seco) CARRIZO	PROMEDIO (esporas·100g <sup>-1</sup> Suelo seco) GRANJA
1	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp1	66,7	88,9	44,4	150,6	82,8
2	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp2	61,1	88,9	33,3	27,8	3,3
3	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp3	38,9	44,4	33,3	16,7	21,7
4	<b><i>Glomus</i></b>	<b><i>Glomus</i> sp4</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>290,0</b>	<b>175,6</b>
5	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp5	11,1	11,1	11,1	7,8	2,2
6	<b><i>Glomus</i></b>	<b><i>Glomus</i> sp6</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>948,9</b>	<b>565,0</b>
7	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp7	5,6	0,0	11,1		0,6
8	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp8	33,3	22,2	44,4	1,1	5,0
9	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp9	55,6	88,9	22,2	8,3	1,1
10	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp10	77,8	88,9	66,7	63,9	44,4
11	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp11	22,2	0,0	44,4		3,3
12	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp12	5,6	0,0	11,1		0,6
13	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp13	44,4	55,6	33,3	15,0	1,7
14	<b><i>Glomus</i></b>	<b><i>Glomus</i> sp14</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>70,6</b>	<b>328,9</b>
15	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp15	33,3	44,4	22,2	3,9	26,1
16	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp16	38,9	22,2	55,6	1,1	13,3
17	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp17	33,3	11,1	55,6	0,6	33,9
18	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp18	16,7	11,1	22,2	0,6	8,9
19	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp19	50,0	55,6	44,4	38,3	20,6

20	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp20	27,8	33,3	22,2	3,3	19,4
21	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp21	33,3	22,2	44,4	1,7	17,8
22	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp22	22,2	11,1	33,3	0,6	1,7
23	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp23	33,3	22,2	44,4	2,2	2,2
24	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp24	27,8	11,1	44,4	23,3	22,8
25	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp25	61,1	66,7	55,6	60,6	106,7
26	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp26	55,6	44,4	66,7	8,9	146,1
27	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp27	16,7	11,1	22,2	2,2	1,1
28	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp28	5,6	0,0	11,1		0,6
29	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp29	77,8	66,7	88,9	31,1	62,8
30	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp30	61,1	55,6	66,7	111,7	68,3
31	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp31	50,0	33,3	66,7	15,6	328,3
32	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp32	88,9	77,8	100,0	357,2	471,1
33	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp33	94,4	100,0	88,9	520,0	414,4
34	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp34	88,9	100,0	77,8	167,2	112,2
35	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp35	72,2	77,8	66,7	30,0	22,8
36	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp36	72,2	77,8	66,7	36,7	37,2
37	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp37	33,3	22,2	44,4	1,1	3,3
38	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp38	27,8	11,1	44,4	0,6	2,2
39	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp39	94,4	88,9	100,0	205,0	457,8
40	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp40	100,0	100,0	100,0	648,3	1878,3
41	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp41	11,1	22,2	0,0	1,1	
42	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp42	11,1	22,2	0,0	19,4	
43	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp43	5,6	11,1	0,0	0,6	
44	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp44	11,1	11,1	11,1	0,6	0,6
45	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp45	11,1	11,1	11,1	55,6	9,4
46	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp46	5,6	0,0	11,1		18,9
47	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp1	22,2	22,2	22,2	18,3	2,2
48	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp2	22,2	11,1	33,3	0,6	7,8
49	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp3	44,4	55,6	33,3	13,3	12,8
50	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp4	38,9	44,4	33,3	37,8	5,0
51	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp5	11,1	0,0	22,2		1,1
52	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp6	55,6	66,7	44,4	39,4	3,9
53	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp7	83,3	77,8	88,9	26,7	98,3
54	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp8	33,3	22,2	44,4	20,6	5,0
55	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp9	50,0	44,4	55,6	17,8	5,0
56	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp10	88,9	100,0	77,8	48,3	19,4
57	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp11	22,2	0,0	44,4		11,7
58	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp12	16,7	0,0	33,3		2,8
59	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp13	16,7	33,3	0,0	5,0	
60	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp14	11,1	0,0	22,2		1,1
61	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp15	44,4	33,3	55,6	3,9	11,1
62	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp16	5,6	11,1	0,0	0,6	
63	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp17	50,0	66,7	33,3	30,6	5,0
64	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp18	33,3	33,3	33,3	6,7	7,8
65	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp19	11,1	22,2	0,0	1,1	

66	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp20	33,3	44,4	22,2	16,7	2,2
67	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp21	22,2	11,1	33,3	0,6	2,8
68	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp22	11,1	22,2	0,0	7,2	
69	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp23	16,7	11,1	22,2	7,8	1,7
70	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp24	5,6	0,0	11,1		0,6
71	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 1	11,1	22,2	0,0	2,2	
72	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 2	61,1	88,9	33,3	18,9	4,4
73	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 3	27,8	44,4	11,1	6,7	0,6
74	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 4	16,7	22,2	11,1	1,1	0,6
75	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 5	22,2	33,3	11,1	5,6	0,6
76	<i>Gigaspora</i>	<i>Gigasporasp</i> 6	11,1	22,2	0,0	1,7	
77	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp1	33,3	44,4	22,2	12,2	1,7
78	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp2	94,4	100,0	88,9	341,1	182,8
79	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp3	11,1	11,1	11,1	1,1	0,6
80	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp4	5,6	11,1	0,0	0,6	
81	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp5	11,1	11,1	11,1	3,9	0,6
82	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora</i> sp6	22,2	33,3	11,1	10,6	1,1
83	<i>Entrophospora</i>	<i>Entrophospora</i> sp1	5,6	0,0	11,1		1,7

En cuanto a abundancia relativa el género *Acaulospora* este ocupó el segundo lugar después de *Glomus*, con índices de 0,065 y 0,035 para la finca “Carrizo” y “La Granja”, respectivamente. Además presentó número de morfotipos similar en las dos fincas evaluadas, sin embargo, hubo dos morfotipos representativos como *Acaulospora* sp. 7 con un promedio de 62,5 esporas·100 g<sup>-1</sup> y *Acaulospora* sp. 10 con 33,9 esporas·100 g<sup>-1</sup>.

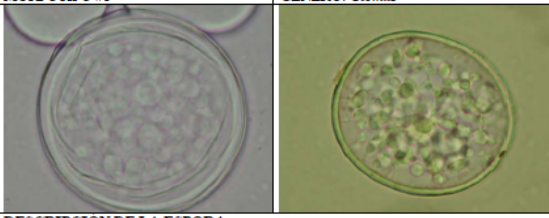
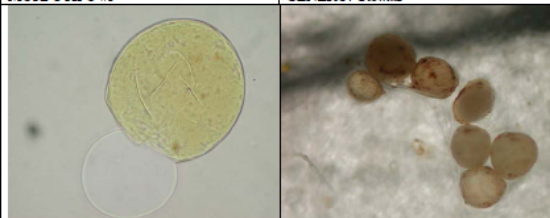

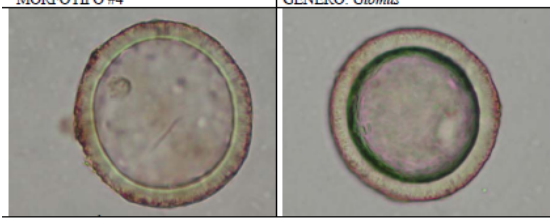
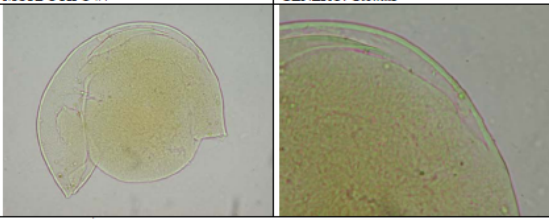
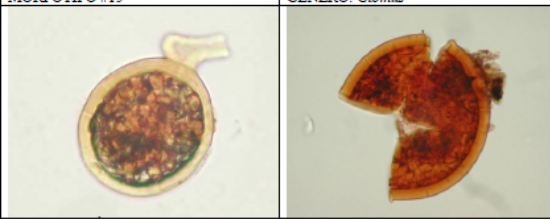
Para el género *Gigaspora*, tuvo una baja participación en número de esporas·100 g<sup>-1</sup> encontradas en las fincas evaluadas con el 0,04% de las esporas extraídas. Dentro de los morfotipos de este género se encontraron para el siempre valores más altos en la finca “Carrizo”, destacándose el morfotipo caracterizado como *Gigaspora* sp. 2. Serralde y Ramírez (2004) encontraron el género *Gigaspora* representado por 4 morfotipos, similar al observado en este estudio, en donde se encontraron 6 morfotipos de este género en “Carrizo” y 4 morfotipos en “La Granja”. En este género se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a número de esporas·100 g<sup>-1</sup> para el morfotipo *Gigaspora* sp. 2, con un promedio de 11,7 esporas·100 g<sup>-1</sup>.

Por otra parte, el número de esporas·100 g<sup>-1</sup> de suelo seco de los morfotipos nativos del género *Scutellospora* en general fue bajo con respecto a los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, exceptuando el morfotipo *Scutellospora* sp. 2, para el cual se obtuvieron los mayores valores en este género (341,1 esporas·100 g<sup>-1</sup> en “Carrizo” y 182,8 esporas·100 g<sup>-1</sup> en la finca “La Granja”). De acuerdo con esto, se puede afirmar que a pesar de que los morfotipos correspondientes a *Scutellospora* no hayan presentado una cantidad de esporas similar a la de *Glomus* y *Acaulospora*, presentan un grado alto de simbiosis en la finca “Carrizo” con frecuencia del 100%, en comparación con la finca “La Granja”, que tuvo una frecuencia de 88,9%, de igual forma alta.

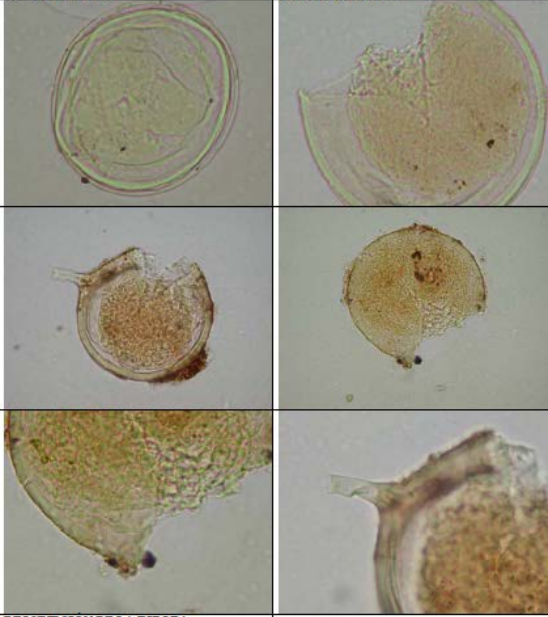
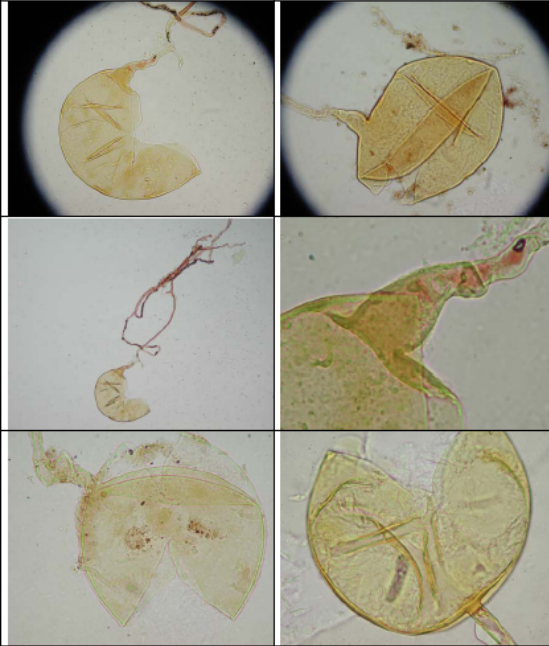
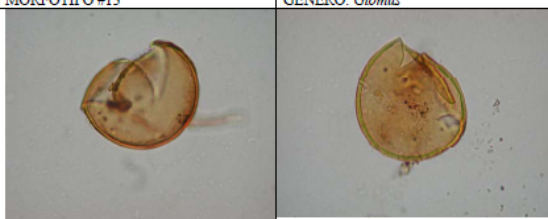
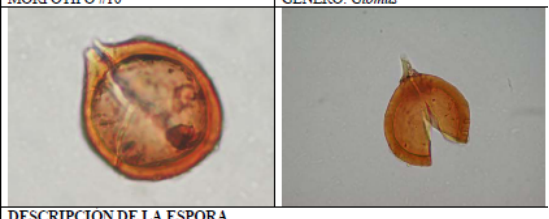
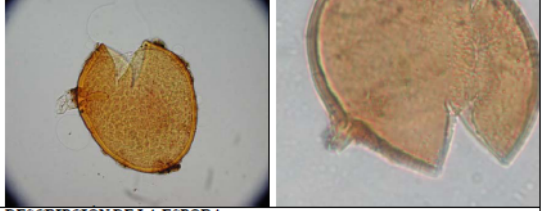

En cuanto al género *Entrophospora* solo se encontró un morfotipo en la finca “La Granja” con 15 esporas ·100 g<sup>-1</sup>, presentando un valor bajo y poco representativo, coincidiendo con lo reportado por Serralde y Ramírez (1994) que observaron como géneros menos frecuentes a *Entrophospora* y *Scutellospora*, en los que sólo se identificó un morfotipo y de la misma forma que en el presente estudio, no se encontraron esporas características del género *Sclerocystis*.

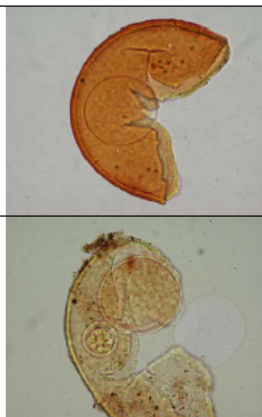
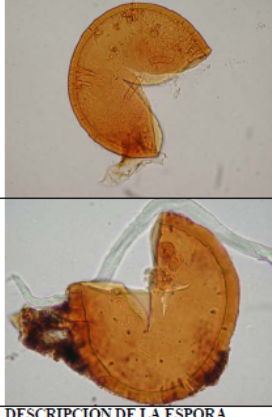
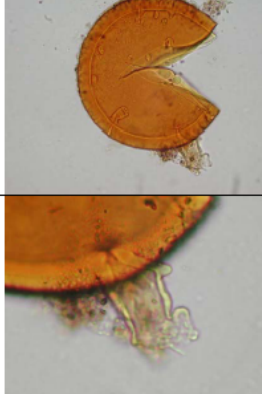
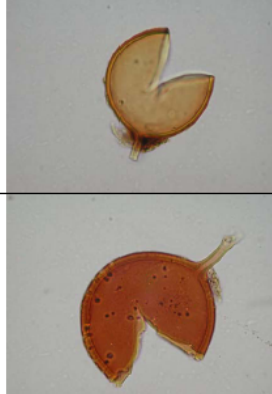
## Caracterización morfológica y descripción de cada uno de los morfotipos encontrados en el municipio de Saboyá (Boyacá).

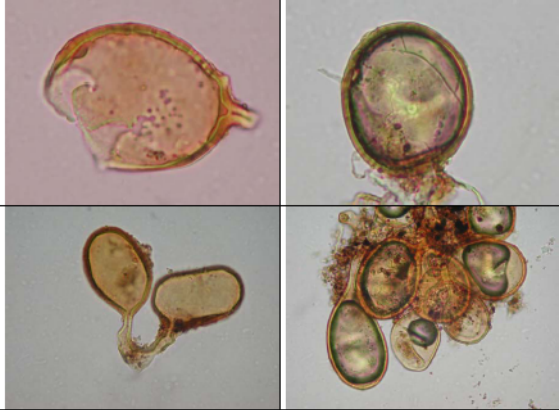
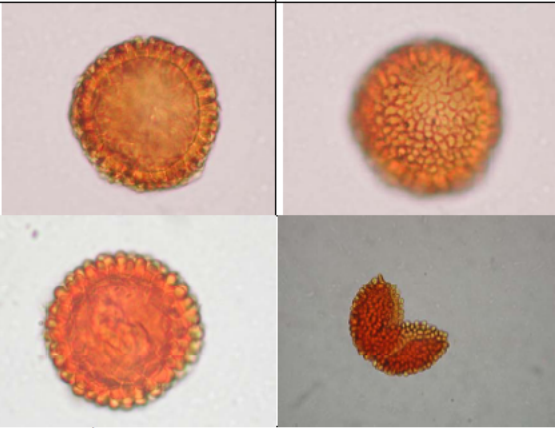
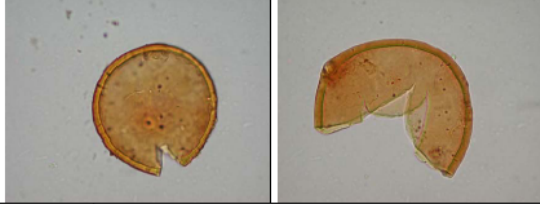
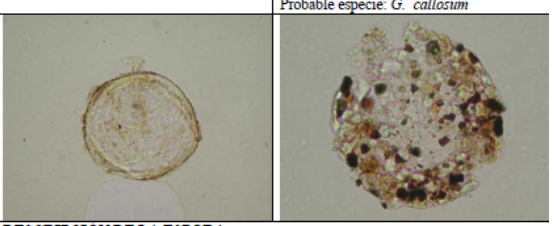

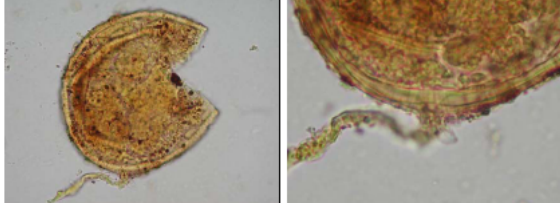
A continuación se muestran imágenes y una descripción detallada de los morfotipos encontrados en las fincas muestreadas del municipio de Saboya:

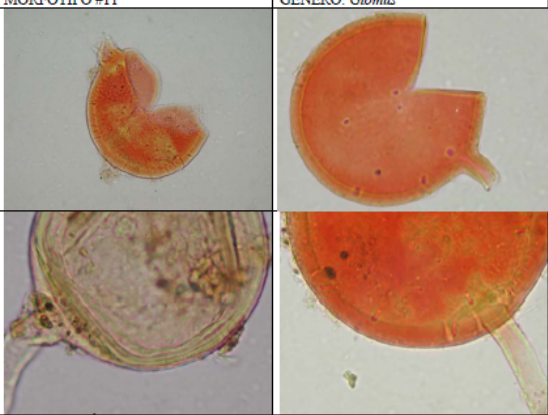
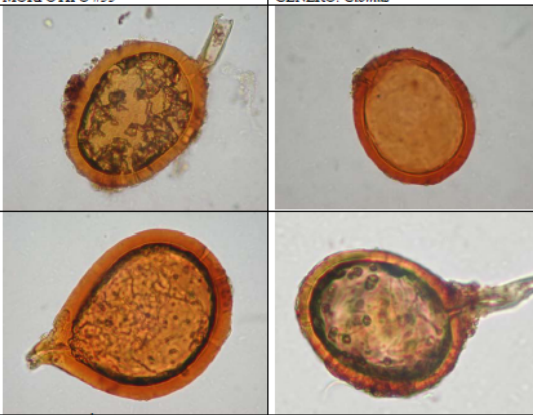
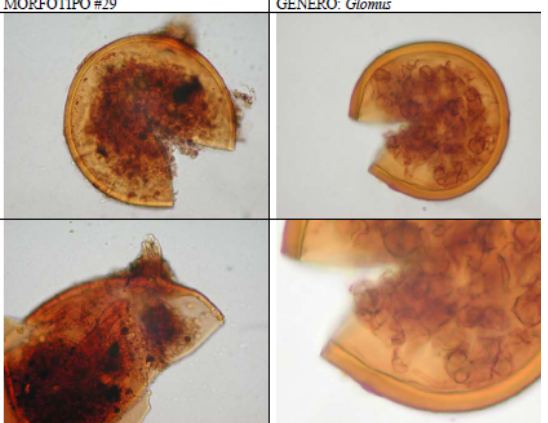
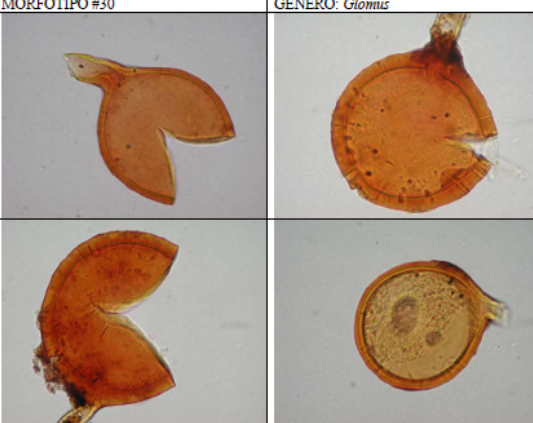
<p>MORFOTIPO #1</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa a subglobosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina</li> <li>• P.V.L.G.: hialina</li> <li>• Melzer: amarillo verdoso (10.0.40.0)</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 51-102 CONTENIDO DE LA ESPORA: globular ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 1.24 Nº DE CAPAS: 2 CONEXION HIFAL: No se observa</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #3</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa a subglobosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: amarilla hialina</li> <li>• P.V.L.G.: amarilla hialina</li> <li>• Melzer: amarillo hialino</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 51-112 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado-aceitoso ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 1.5 Nº DE CAPAS: 3 CONEXION HIFAL: no se observa</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #2</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa a subglobosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina</li> <li>• P.V.L.G.: hialina</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 51-68 CONTENIDO DE LA ESPORA: granular-aceitoso ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 1.24 CONEXION HIFAL: no se observa</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #4</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialino a crema pálido (0.0.10.0)</li> <li>• P.V.L.G.: crema a amarillo pálido-marrón (0.10.30.10)</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 51-68 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: reticulada Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 8 Nº DE CAPAS: 3 CONEXION HIFAL: no se observa OBSERVACIONES: Múltiples canales en pared. Con micilago.</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #7</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: subglobosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina-amarilla</li> <li>• P.V.L.G.: hialina-amarilla</li> <li>• Melzer: amarillo-café pálido (0.0.80.0)</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 85-110 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 2 Nº DE CAPAS: 1 CONEXION HIFAL: no se observa OBSERVACIONES:</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #15</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: subglobosa COLOR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: amarillo-café (0.40.100.10)</li> <li>• P.V.L.G.: 20.60.60.0</li> </ul> <p>DIÁMETRO (µm): 34-68 CONTENIDO DE LA ESPORA: granular ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 5 Nº DE CAPAS: 3 DIÁMETRO DEL PORO (µm): 3 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 7 OBSERVACIONES:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Hifa con protuberancia y curvatura en ángulo de 90°</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>

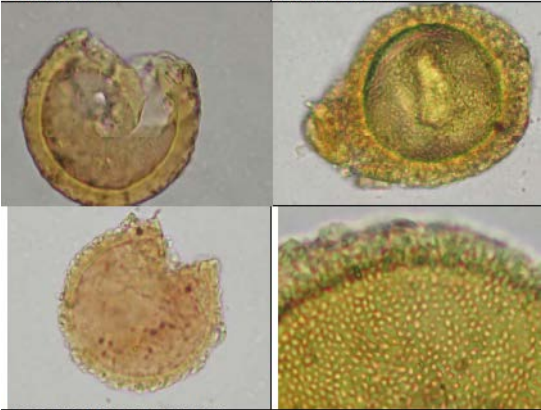
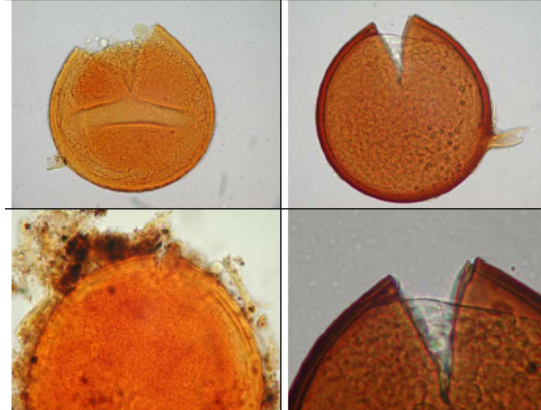
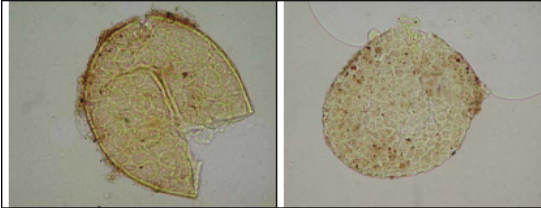
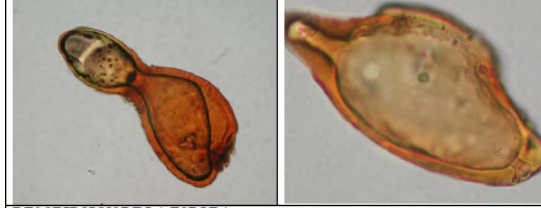
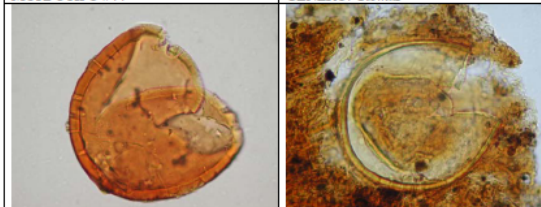
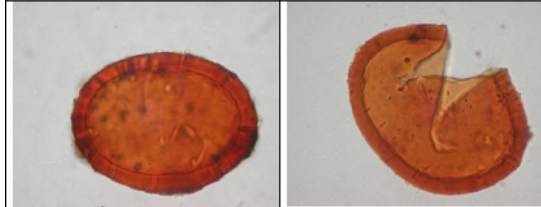


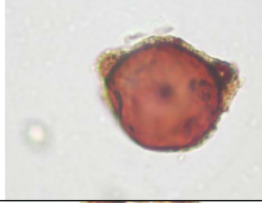
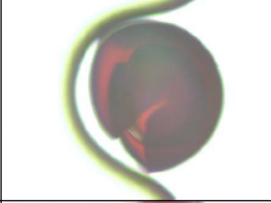
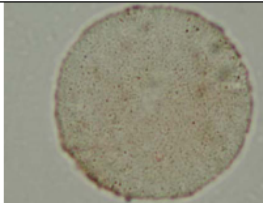
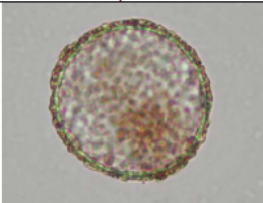
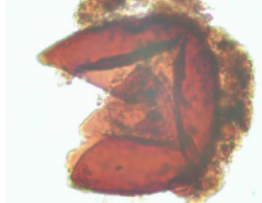
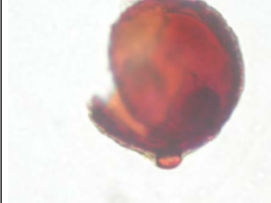

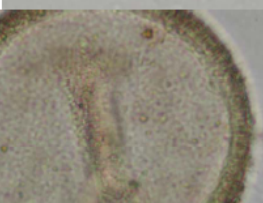
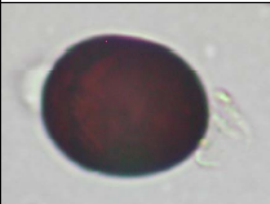
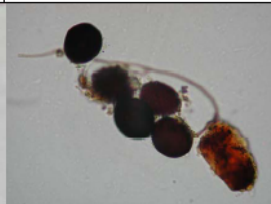



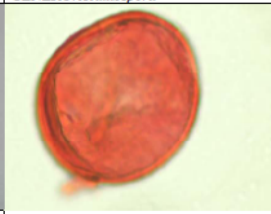


<p><b>MORFOTIPO #5</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialino a crema pálido (0.0.10.0)</li> <li>• P.V.L.G.: crema a amarillo pálido-marrón (0.10.30.10)</li> <li>• Melzer: crema a amarillo pálido-marrón (0.10.30.10) a naranja pálido-café (0.30.60.0)</li> </ul>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-95  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 5  <b>Nº DE CAPAS:</b> 3  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 5  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 4  <b>OBSERVACIONES:</b> Reacción a Melzer negativa. Con septo. Con mmicilago y detritus adheridos</p>	<p><b>MORFOTIPO #8</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: amarillo pálido (0.0.20.0) - Amarillo-marrón oscuro (0.10.60.0)</li> <li>• P.V.L.G.: amarillo-café (0.10.80.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 85-119 x 136-175  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado</p>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p> <p><b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº PAREDES:</b> 1- Nº DE CAPAS: 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 2-48  <b>CONEXIÓN HIFAL:</b> la base hifal es más ancha 20-23 µm, mientras en el extremo de la hifa se estrecha a 7 µm.  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 22-25  <b>OBSERVACIONES:</b> Con mmicilago. Con hifa muy larga. Reacción a Melzer: el interior de la hifa se torna color café-rojizo</p>
<p><b>MORFOTIPO #13</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.40.60.0</li> <li>• P.V.L.G.:</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-68  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 2.48  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p>	<p><b>MORFOTIPO #10</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: naranja-café oscuro (0.20.100.0)</li> <li>• P.V.L.G.: 0.40.30.10</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-68  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> granular aceitoso  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 3 y 7 en la base hifal  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 6  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 2  <b>OBSERVACIONES:</b> Reacción a Melzer negativa. La pared se engrosa al acercarse a la base hifal</p>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p>
<p><b>MORFOTIPO #19</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> ovoide  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: Naranja-café pálido (0.30.60.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 102 x 153  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> globular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 8  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 2  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 20  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 1  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Hifa aparece en un costado</li> </ul>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p>	<p><b>MORFOTIPO #22</b></p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa a subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: hialino</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-70  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 8  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 3  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> no se observa  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer:</li> </ul>	<p><b>GENERO:</b> <i>Glomus</i></p>

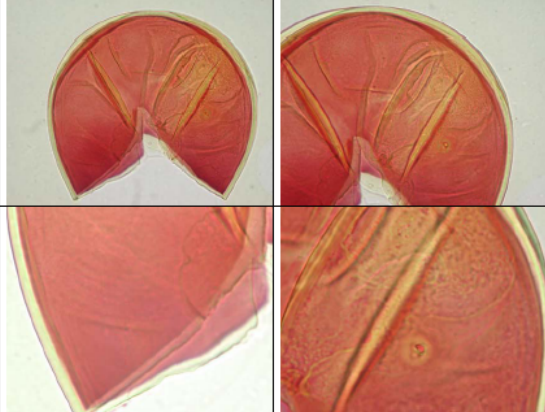
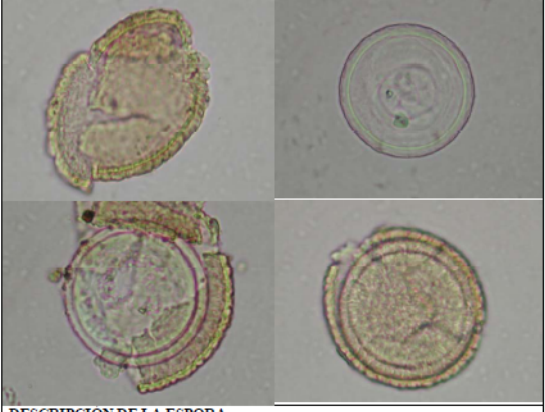
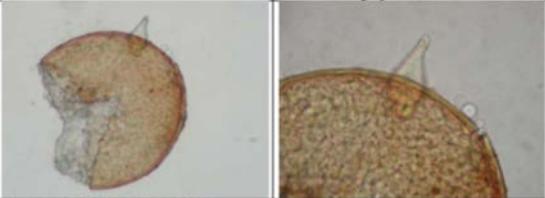
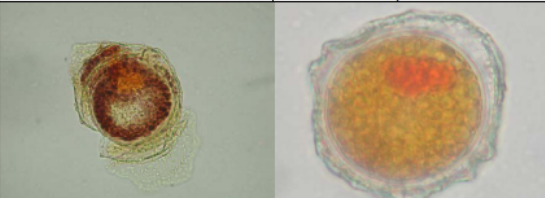
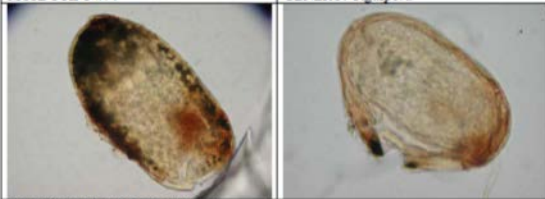
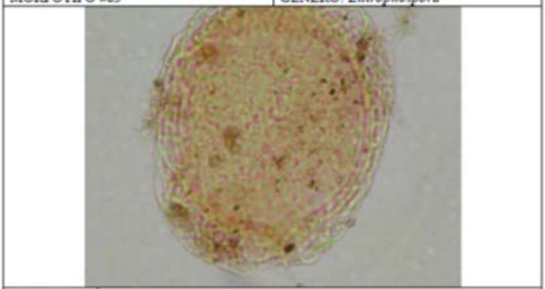
<p>MORFOTIPO #23</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i> Probable especie: <i>G. microaggregatum</i></p>	<p>MORFOTIPO #21</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa Encontradas en el interior de esporas del género <i>Glomus</i> COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina</li> <li>• P.V.L.G.: crema a amarillo verdoso</li> </ul>           DIÁMETRO (µm): 20-40            CONTENIDO DE LA ESPORA: globular            ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa            Nº DE PAREDES: 1            TAMAÑO PARED (µm): 1            OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa a subglobosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.40.100.0 - 0.60.100.10</li> <li>• P.V.L.G.: 0.30.100.0 - 0.60.70.10</li> </ul>           DIÁMETRO (µm): 85-119            CONTENIDO DE LA ESPORA: granular            ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa            Nº DE PAREDES: 1            TAMAÑO PARED (µm): 6-7            DIÁMETRO DEL PORO (µm): 2            DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 13-15            TAMAÑO PARED HIFA (µm): 5 en la base y 2 hacia el extremo            OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Hifa ramificada</li> <li>• Con septo</li> </ul> </p>	
<p>MORFOTIPO #20</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #24</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.60.100.0</li> </ul>           DIÁMETRO (µm): 85-102            CONTENIDO DE LA ESPORA: aceitoso            ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa            Nº DE PAREDES: 1            TAMAÑO PARED (µm): 11            DIÁMETRO DEL PORO (µm): 1            DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 18            TAMAÑO PARED HIFA (µm): 2            OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Hifa con protuberancia</li> <li>• Canales en pared</li> </ul> </p>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa a subglobosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.10.70.10</li> <li>• P.V.L.G.: 0.20.80.0</li> </ul>           DIÁMETRO (µm): 68-119            CONTENIDO DE LA ESPORA: globular            ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa            Nº DE PAREDES: 1            TAMAÑO PARED (µm): 5            DIÁMETRO DEL PORO (µm): 3            DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 7            TAMAÑO PARED HIFA (µm): 3 en la base y 1 en el extremo            OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Canales en pared</li> <li>• Con mucilago</li> </ul> </p>	

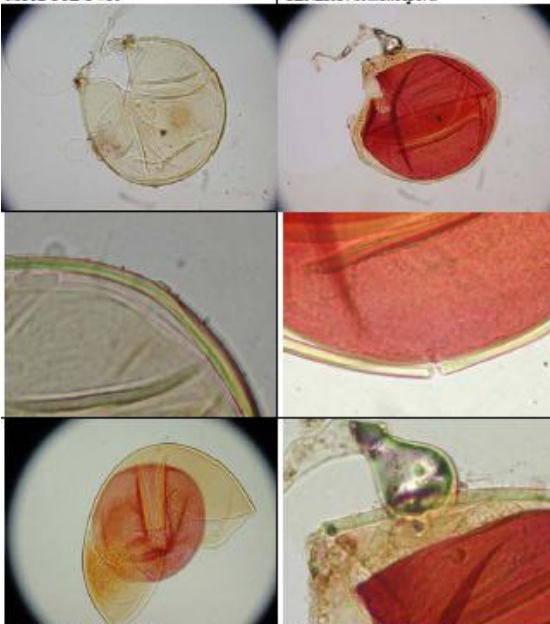
<p>MORFOTIPO #6</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: elipsoide COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema pálido (0.0.10.0) a rosa pálido (0.20.60.0)</li> <li>• P.V.L.G.: Amarillo-marrón oscuro (0.10.60.0) a crema a amarillo pálido-marrón (0.10.30.10)</li> <li>• Melzer: naranja pálido-café (0.30.60.0)</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 17-45 x 50-65 CONTENIDO DE LA ESPORA: aceitoso ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 2.5-4 Nº DE CAPAS: 3 CONEXIÓN HIFAL: con septo en la base hifal, más ancha en la base y delgada en el extremo. DIÁMETRO HIFA (µm): 5 en la base y 1.5 hacia el extremo. DIÁMETRO DEL PORO (µm): 1 OBSERVACIONES: Con mucilago., Reacción a Melzer negativa, Esporas solitarias o en agregados</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #14</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.60.60.0</li> <li>• P.V.L.G.: 20.60.60.0 a 0.60.80.0</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 51 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentación undulata Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 7 OBSERVACIONES: Reacción a Melzer: negativa</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #39</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.20.100.0</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 68-85 CONTENIDO DE LA ESPORA: globular-aceitoso ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 6-7 DIÁMETRO DEL PORO (µm): 2 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 10 TAMAÑO PARED HIFA (µm): 1 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #25</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: globosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.30.70.10</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 51-80 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 2 DIÁMETRO DEL PORO (µm): 3 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 4 TAMAÑO PARED HIFA (µm): &lt;1 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con mucilago y detritus</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i> Probable especie: <i>G. callosum</i></p>
<p>MORFOTIPO #28</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: subglobosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.0.5.0</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 27 CONTENIDO DE LA ESPORA: aceitoso ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 1 DIÁMETRO DEL PORO (µm): 1-1.5 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 3 TAMAÑO PARED HIFA (µm): 1 LARGO DE LA HIFA (µm): 35 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con hendidura</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #12</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA FORMA: subglobosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• P.V.L.G.: naranja-café oscuro (0.60.100.0)</li> </ul> </p> <p>DIÁMETRO (µm): 115 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 4 Nº DE CAPAS: 3 DIÁMETRO DEL PORO (µm): 1 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 3 LONGITUD DE LA HIFA (µm): 60 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con septo</li> <li>• Con mucilago y detritus</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>

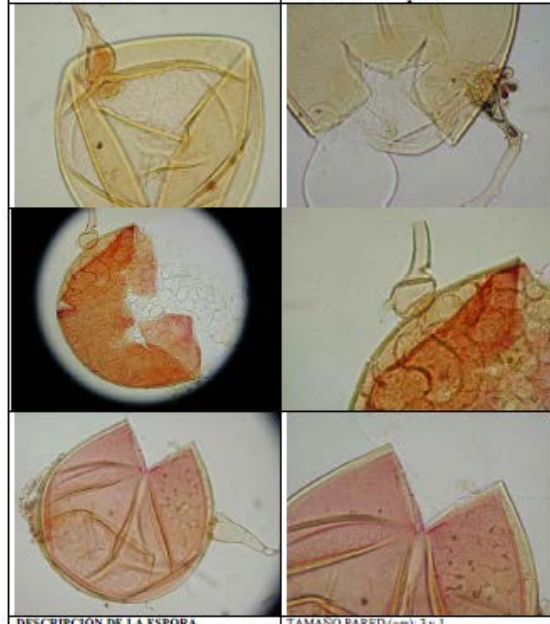
<p>MORFOTIPO #11</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #33</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema ligeramente oscuro (0.0.40.0)</li> <li>• P.V.L.G.: naranja-café (0.30.80.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-68  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 4-6  <b>Nº DE CAPAS:</b> 3  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 4-6  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 8  <b>OBSERVACIONES:</b> Reacción a Melzer: la pared se torna color rosado-rojizo pálido. La pared de la espora es continua y es la misma pared de la hifa que está en posición recta, a 90°.</p>		<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.20.100.0 - 20.80.70.10</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51 x 119  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 7  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 2  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 10-11  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 1  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Canales en pared</li> <li>• Con hifa desarrollada lateralmente</li> </ul>	
<p>MORFOTIPO #29</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #30</p> 	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 20.80.100.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b>  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> granular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 7-9  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 3-4  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 8  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 2  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: Negativa</li> <li>• Presenta gránulos color café oscuro en el interior</li> </ul>		<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua:</li> <li>• P.V.L.G.: Naranja pálido-café (0.60.60.0) - (0.40.70.10 - 0.60.70.10 - 0.60.80.0 - 0.60.50.10 - 0.30.60.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 85-102  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 6  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 1-3  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 15  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 1-1.5  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Canales en pared</li> </ul>	

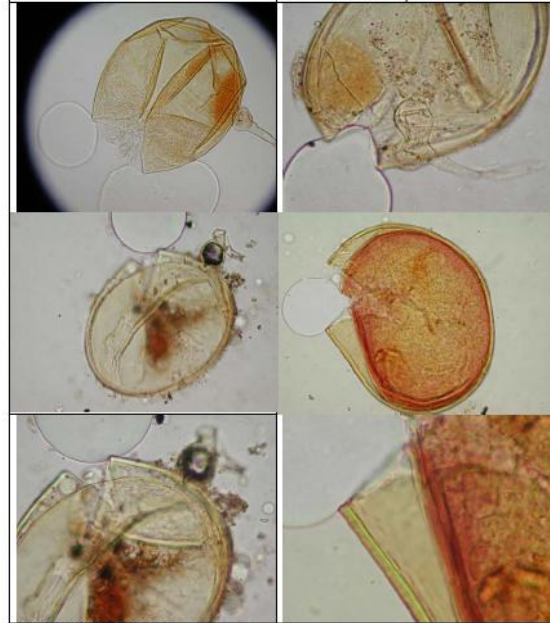
<p>MORFOTIPO #27</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 0.0.60.0 a rosa pálido (0.40.20.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51-60          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 7-9          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con mucilago y detritus</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #18</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 20.40.80.0 - 20.80.100.0</li> <li>• P.V.LG.: 20.60.60.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-153          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1</p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p> <p>TAMAÑO PARED (µm): 5          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 3          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 10          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 1          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con septo</li> <li>• Con mucilago y detritus</li> </ul> </p>
<p>MORFOTIPO #41</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa a subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.5.0</li> <li>• P.V.LG.: 20.40.100.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-85          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 2          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared se torna color crema ligeramente oscuro (0.0.40.0)</li> <li>• No se observa conexión hifal</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #37</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: amigdaliforme          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 0.30.60.0- Naranja palido-café 0.60.100.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68 x 85-119          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 8          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 6-10          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 40 en la base y 62-65 en el extremo          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 3          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #44</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: subglobosa          Esporas encontradas dentro de la raíz          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 0.60.80.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 85          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa, con abundante mucilago          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 7-9          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 9          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #36</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: elipsoide          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 20.80.50.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51-90 x 115-135          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 8-10          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• No presenta conexión hifal</li> <li>• Con mucilago</li> <li>• Con canales en pared</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>

MORFOTIPO #31	GENERO: <i>Glomus</i>	MORFOTIPO #67	GENERO: <i>Acaulospora</i>
			
			
<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: rojizo-café oscuro (0.80.60.0 - 40.80.80.09 a café oscuro (40.80.50.10))</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-68  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 1  <b>TAMAÑO PROTUBERANCIA (µm):</b> 5  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Presenta una o dos protuberancias en extremos</li> </ul>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 10.0.20.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 102  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 7 (ext) y 2 (int)  <b>DIÁMETRO CICATRIZ (µm):</b> 5 con forma circular  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul>	
MORFOTIPO #46	GENERO: <i>Glomus</i>	MORFOTIPO #43	GENERO: <i>Glomus</i>
			
<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: negro</li> <li>• P.V.L.G.: café oscuro (60.80.20.10)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 20 x 30  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 0.2  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 2  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 0.2  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Esporas en agregados &gt;10 esporas</li> </ul>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: crema (0.0.15.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 136-140  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> globular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 1  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 21  <b>LONGITUD DE LA HIFA (µm):</b> 150  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 0.25  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la hifa se toma color rosa oscuro (0.40.20.0)</li> <li>• No se observa poro</li> </ul>	
MORFOTIPO #47	GENERO: <i>Acaulospora</i>	MORFOTIPO #50	GENERO: <i>Acaulospora</i>
			
<p><b>AUMENTO:</b>  <b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa a subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialino a crema pálido (0.0.10.0)</li> <li>• P.V.L.G.: crema a amarillo pálido-marrón (0.10.30.10)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 51-73  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 3  <b>TAMAÑO PAREDES (µm):</b> 5  <b>Nº DE CAPAS:</b> 2  <b>CONEXION HIFAL:</b> SI  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 2  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: pared externa se toma color rojo a rojo-vino tinto (20.80.60.0-20.80.30.10).</li> </ul>		<p><b>AUMENTO:</b>  <b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: pálido (0.0.5.0) a crema ligeramente oscuro (0.0.40.0)</li> <li>• P.V.L.G.: café (20.40.100.0)</li> <li>• Melzer: pared interna se toma de color (0.40.20.0 a naranja-café (0.60.40.0))</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 68-110  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado aceitoso  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº PAREDES:</b> 3  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 6  <b>Nº DE CAPAS:</b> 3, 2 y 2  <b>CICATRIZ:</b> circular a ovoide de 5-10 µm  <b>OBSERVACIONES:</b></p>	

<p>MORFOTIPO #62</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: Hialina</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 136-150          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 2          TAMAÑO PARED (µm): 4          DIÁMETRO CICATRIZ (µm): 4-5          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: Pared interior se toma color rojizo</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>	<p>MORFOTIPO #63</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.20.20.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51-68          CONTENIDO DE LA ESPORA: granular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada          Nº DE PAREDES: 2          TAMAÑO PARED (µm): 3-4 y 3          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• No se observa cicatriz</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #71</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa a subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.20.60.0 rosa pálido</li> <li>• P.V.L.G.: 40.60.80.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 153-240          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 3.72          Nº DE CAPAS: 3          DIÁMETRO DEL BULBO SUSPENSOR (µm): 18          OBSERVACIONES: formación de verrugas en la superficie interna.</p>	<p>GENERO: <i>Gigaspora</i></p>	<p>MORFOTIPO #65</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: amarillo-naranja (0.30.60.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51          CONTENIDO DE LA ESPORA: granular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada          Nº DE PAREDES: 2          TAMAÑO PARED (µm): 1 y 2          ESPESOR PERIDIUM HIFAL (µm): entre 3 y 9          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: pared interna se toma color café-vino tinto (40.60.40.0)</li> <li>• Con peridium hifal</li> <li>• Presenta una mancha color amarillo-naranja intenso (0.60.80.0)</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #74</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: cilíndrica          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema ligeramente oscuro 0.0.40.0</li> <li>• P.V.L.G.: 0.30.80.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 85-119 x 136-238          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 6          Nº DE CAPAS: 3          BULBO SUSPENSOR: no se observa          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Formación de verrugas en la superficie interna, capa interior de la pared</li> <li>• Mancha rojiza en un extremo de la espora</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Gigaspora</i></p>	<p>MORFOTIPO #83</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.20.0</li> <li>• P.V.L.G.:</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 60 x 70          CONTENIDO DE LA ESPORA: granular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada          Nº DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 5          TAMAÑO CICATRIZ (µm): no se observa          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared externa se toma rosa pálido</li> <li>• Con mucilago y detritus en pared externa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Entrophospora</i></p>


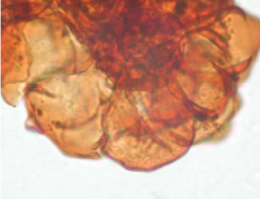


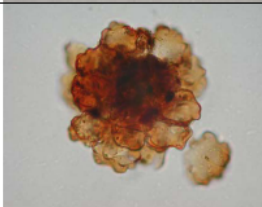
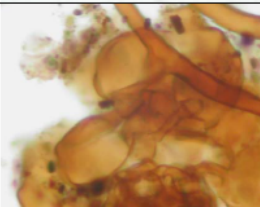


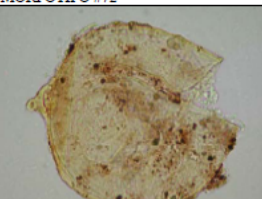
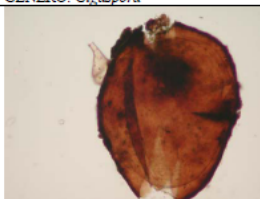
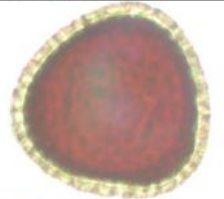
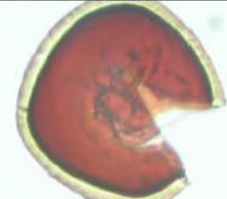
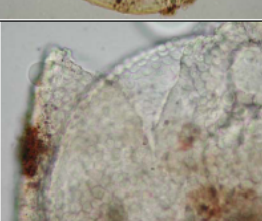
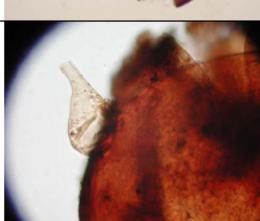
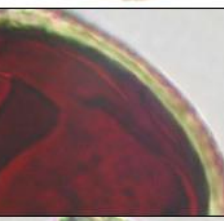
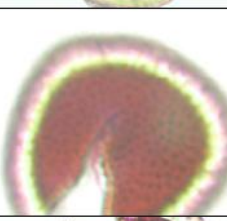
MORFOTIPO #81	GENERO: <i>Scutellospora</i>
	
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> ovoide  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.5.0 brillante</li> <li>• P.V.L.G.: 0.0.20.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 136 x 170</p>	<p><b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 3  <b>DIÁMETRO BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 28  <b>OBSERVACIONES:</b> Reacción a Melzer: pared externa se torna color rojo</p>

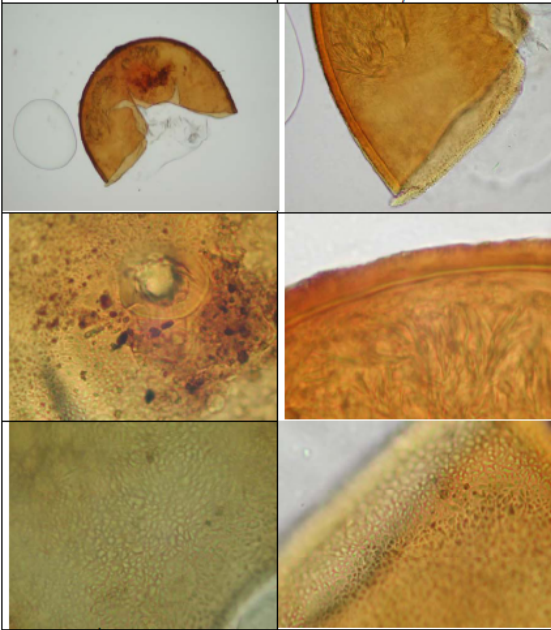
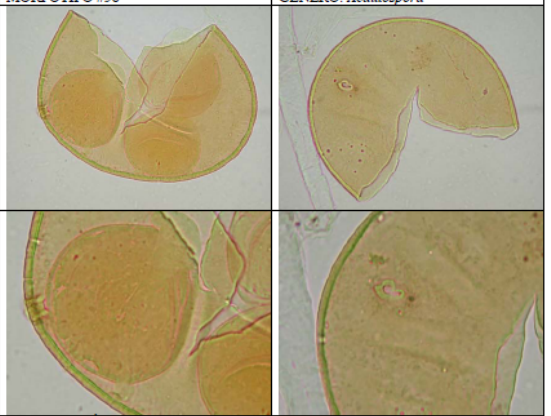
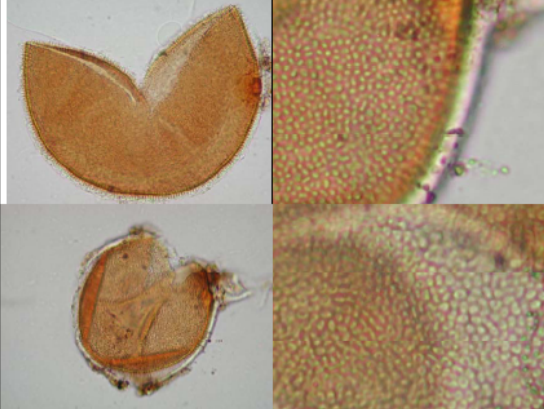
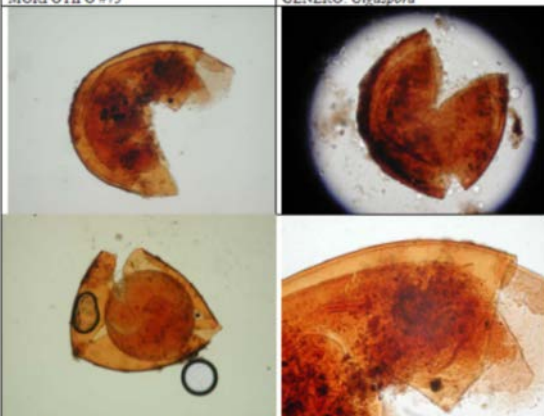
MORFOTIPO #82	GENERO: <i>Scutellospora</i>
	
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.40.0</li> <li>• P.V.L.G.: 10.0.20.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 153-204  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> globular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2</p>	<p><b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 3 y 1  <b>DIÁMETRO DEL BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 30  <b>TAMAÑO PARED DEL BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 1-1.5  <b>OBSERVACIONES:</b>          Reacción a Melzer: la pared interna se torna color rojo a rosa-rojizo. Presenta una protuberancia en el bulbo suspensor de 7 µm de ancho por 6-10 µm de largo</p>

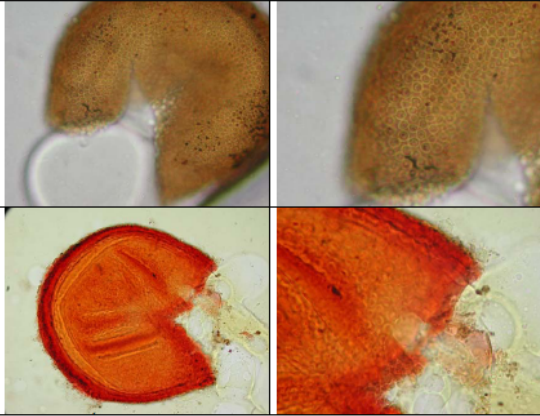
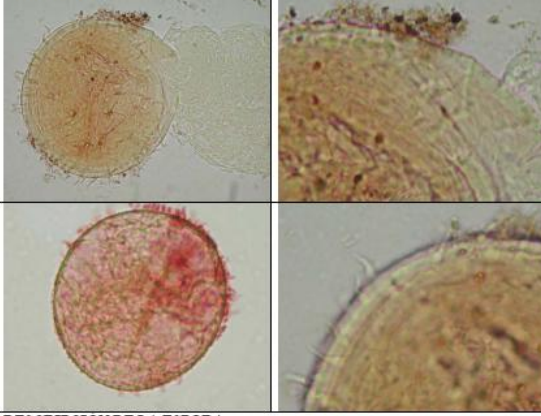
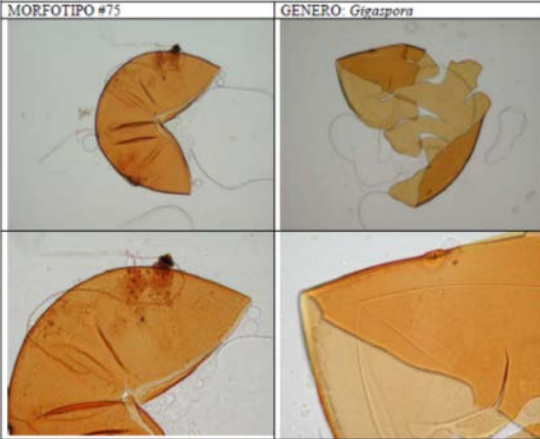
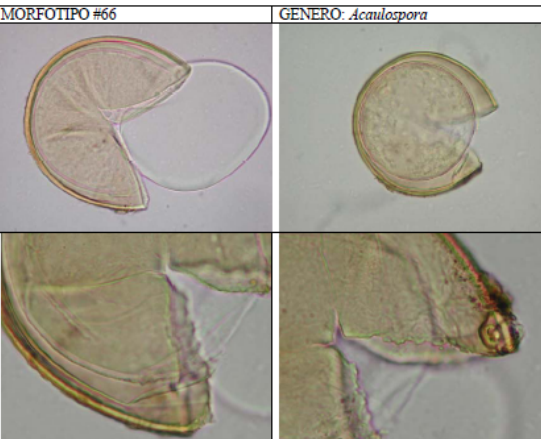
MORFOTIPO #77	GENERO: <i>Scutellospora</i>
	
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> ovoide  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema pálido (0.0.10.0) a amarillo-naranja oscuro (0.10.60.0)</li> <li>• P.V.L.G.: amarillo pálido-naranja (0.10.30.10) a naranja-café pálido (0.20.40.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 10-102 x 67-187  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> granular acetoso  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa</p>	<p><b>Nº PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 5  <b>DIÁMETRO BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 25-29  <b>TAMAÑO PARED DEL BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 3  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción al Melzer: Pared interior se torna color naranja-café a morado pálido</li> <li>• Con mucilago y detritus adheridos a pared externa</li> </ul>

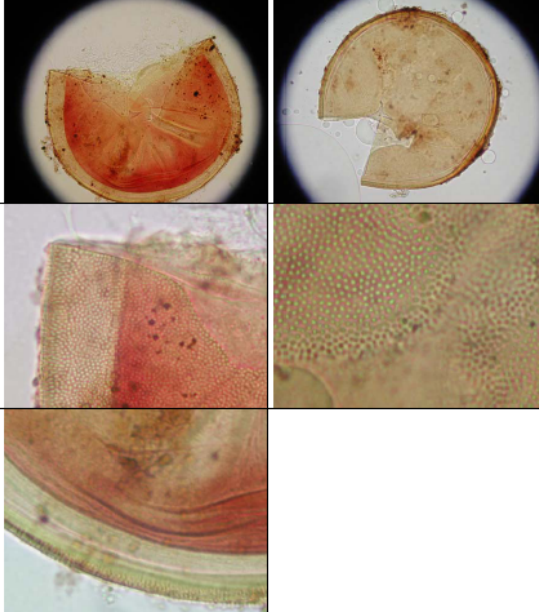
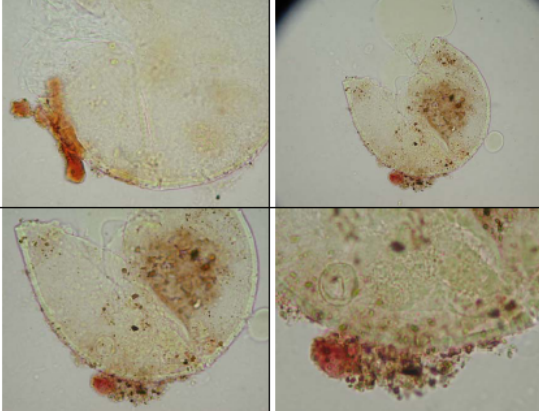
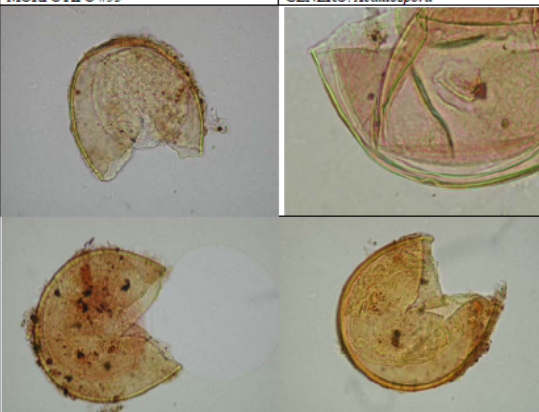
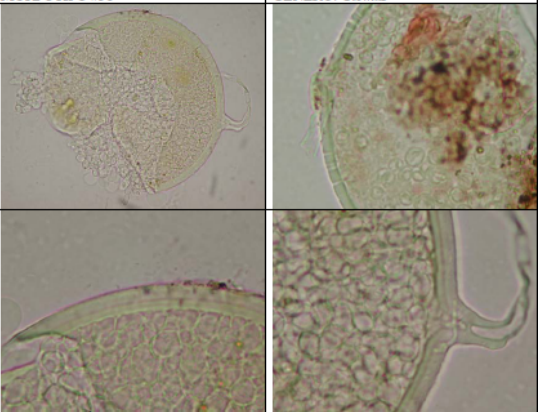
MORFOTIPO #79	GENERO: <i>Scutellospora</i>
	
<p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> ovoide  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.10.40.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 187-225  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 7 y 6  <b>DIÁMETRO DEL BULBO SUSPENSOR (µm):</b> 18  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: positiva</li> <li>• Con mucilago</li> <li>• Con escudo germinativo</li> <li>• Hifa larga, enrollada y con protuberancias de 4-9 µm de alto y 9-10 µm de ancho</li> </ul>	

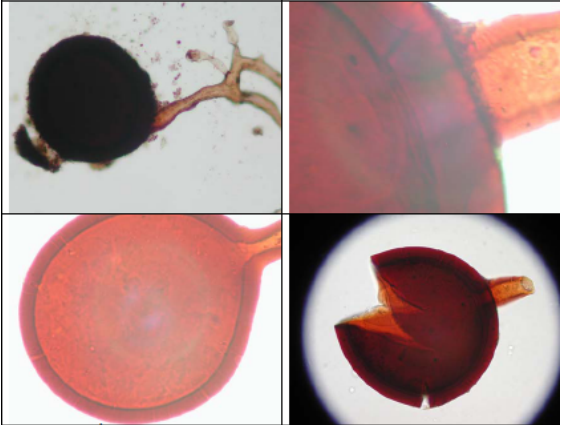
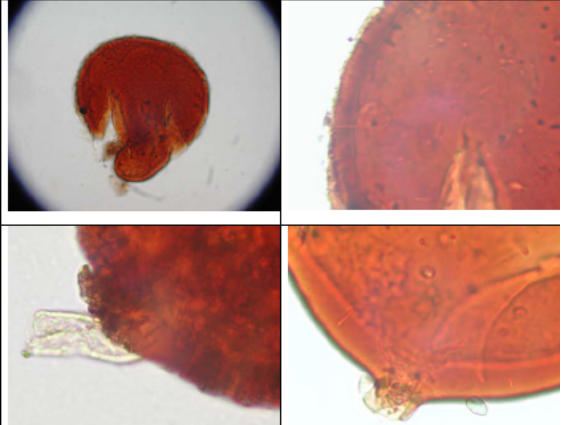
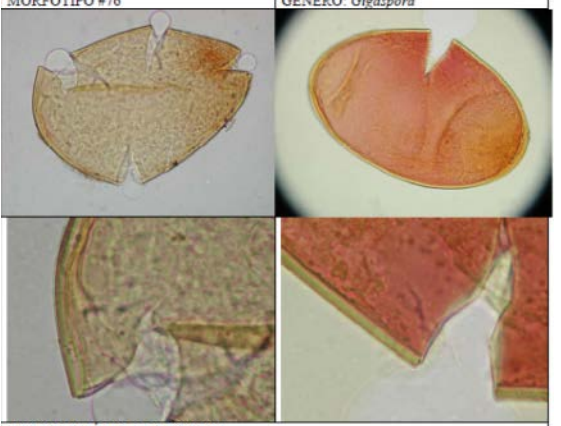
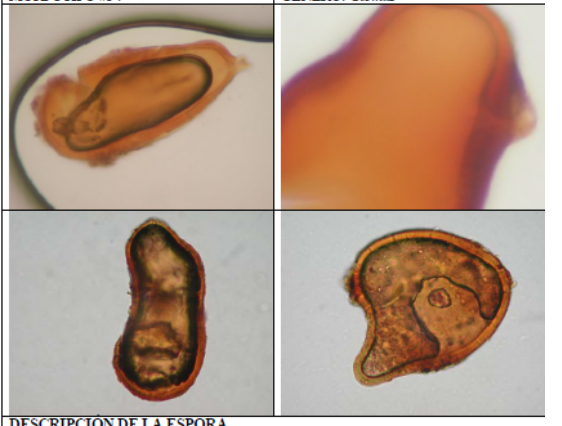


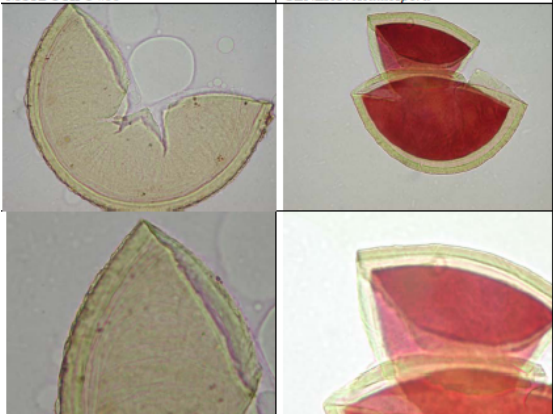
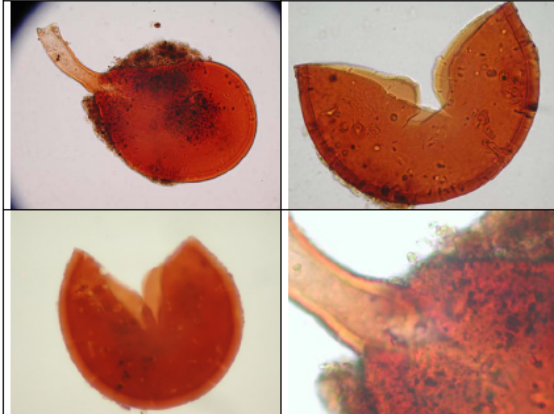
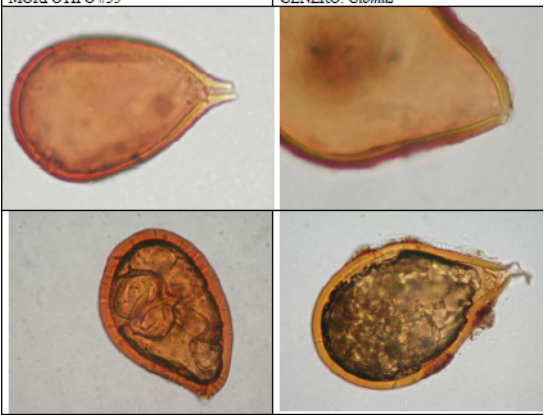
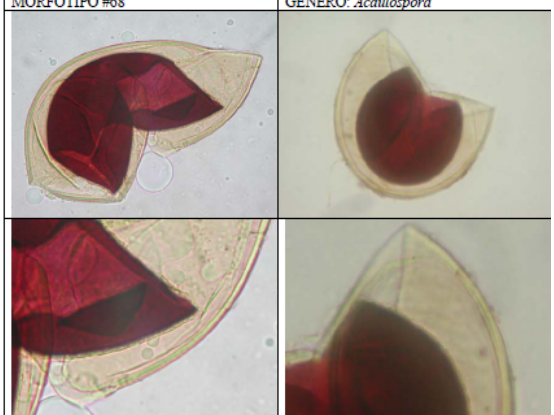
MORFOTIPO #78	GENERO: <i>Scutellospora</i>	MORFOTIPO #64	GENERO: <i>Acaulospora</i>
			
			
<p><b>DESCRIPCION</b> Células en agregados, entre 1-12 TAMAÑO CELULAS (µm): 30-45 FORMA: clavada con protuberancias poco profundas de 5-7 µm de ancho x 0.5-3 µm de alto COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Agua y P.V.L.G.: castaño pálido (0-40-80-0) a castaño oscuro (0-60-100-10)</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 68-85 CONTENIDO DE LA ESPORA: globular ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): &lt;1 DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 4-7 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción a Melzer: negativa</li> <li>Hifas largas color castaño pálido (0-40-80-0) a castaño oscuro (0-60-100-10) y enrolladas.</li> <li>Con mucilago y detritus</li> </ul> </p>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Agua y P.V.L.G.: hialina transparente brillante</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 85 CONTENIDO DE LA ESPORA: granular-acetoso</p> <p><b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa Nº DE PAREDES: 3 TAMAÑO PARED (µm): 3 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción a Melzer: la pared interna se torna color amarillo (0.0.20.0) – crema ligeramente oscuro (0.0.40.0) a rosa pálido (0.20.20.0)</li> </ul> </p>	
MORFOTIPO #72	GENERO: <i>Gigaspora</i>	MORFOTIPO #61	GENERO: <i>Acaulospora</i>
			
			
<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: subglobosa COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Agua: Crema pálido (0.0.10.0) a (0.10.40.0 - 0.30.70.10)</li> <li>P.V.L.G.: crema (0.0.15.0) a (40.80.70.10)</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 102-272 CONTENIDO DE LA ESPORA: globular ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa</p> <p>Nº DE PAREDES: 1 TAMAÑO PARED (µm): 8 Nº DE CAPAS: 3 DIÁMETRO BULBO SUSPENSOR (µm): 15 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción a Melzer: negativa</li> <li>Formación de verrugas en la superficie interna, capa interior de la pared</li> <li>Con abundante mucilago y detritus adheridos</li> </ul> </p>		<p><b>DESCRIPCION DE LA ESPORA</b> FORMA: Triangular COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Agua y P.V.L.G.: 20.80.60.0 - 40.80.80.0</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 51-85 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada Nº DE PAREDES: 2</p> <p>TAMAÑO PARED (µm): 5-7 y &lt;1 OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción a Melzer: negativa</li> <li>Pared externa color hialino amarillo-verdoso (0.0.20.0), ornamentada y la pared interna color purpura-café (40.80.30.10)</li> <li>No se observa cicatriz</li> </ul> </p>	


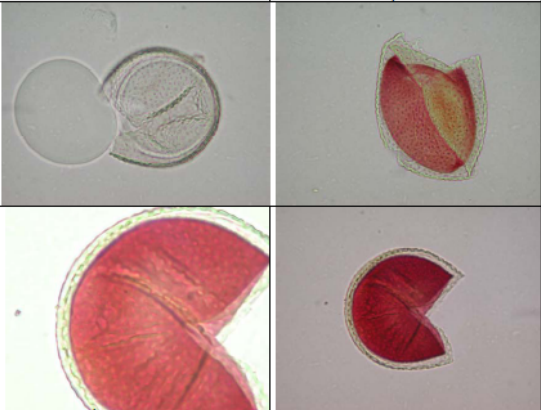
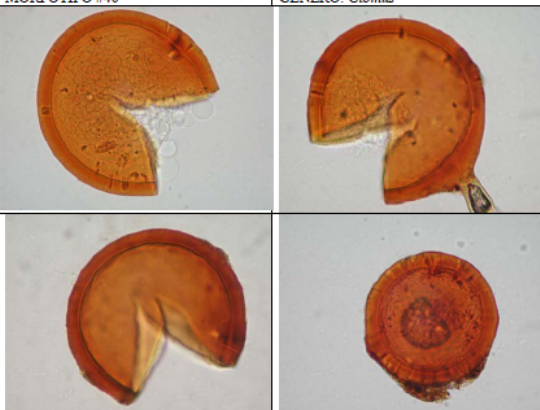
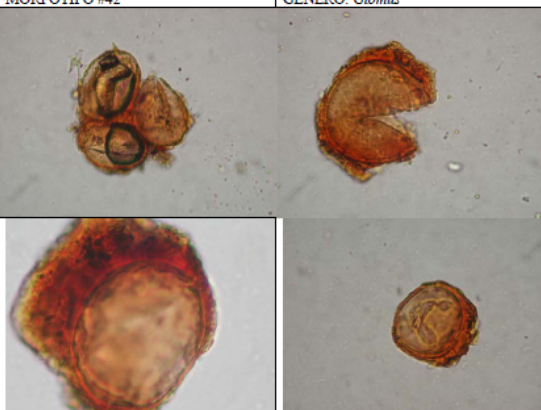
<p>MORFOTIPO #70</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 20.40.80.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 208-350  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado</p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p> <p><b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> ornamentada  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 14  <b>DIÁMETRO DE LA CICATRIZ (µm):</b> 30 con forma circular  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con mucilago y detritus adheridos</li> </ul>
<p>MORFOTIPO #58</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema ligeramente oscuro 0.0.40.0</li> <li>• P.V.L.G.: 0.0.80.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 85-150  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> aceitoso  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 2.48  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 6-11 de forma ovoide  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• No conserva la hifa</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #57</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 20.40.100.0</li> <li>• P.V.L.G.: Naranja-café pálido (0.30.60.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 102-130  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> ornamentada  <b>Nº DE PAREDES:</b> 3  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 7  <b>TAMAÑO CICATRIZ (µm):</b> 8-12 con forma circular  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #73</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 20.60.80.0 a 20.80.70.10</li> <li>• P.V.L.G.: 40.80.70.10</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 187-385  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> granular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 4 y 3  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con mucilago y detritus</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Gigaspora</i></p>

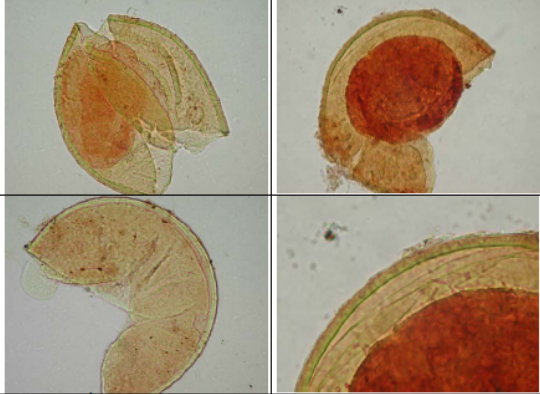

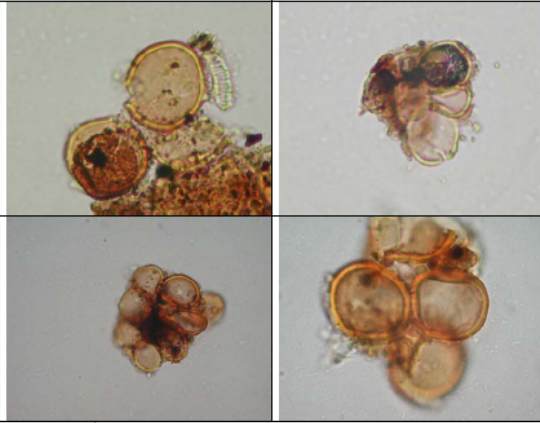
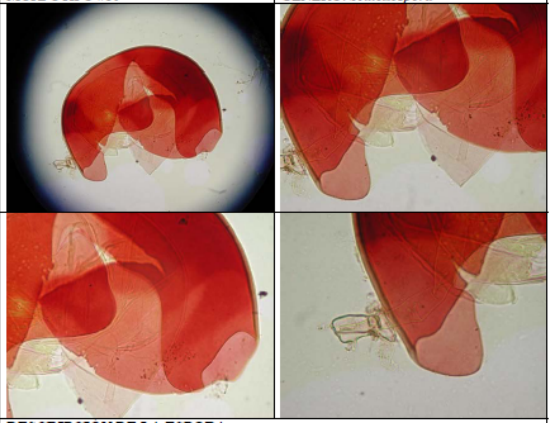
<p>MORFOTIPO #59</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina-opaca a 0.40.80.0</li> <li>• P.V.L.G.: 0.40.80.0 – 20.60.70.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 136-310          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular-aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentación paulinae          Nº DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 10, 7 y 5          CICATRIZ: no se observa          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared se torna color naranja intenso 0.60.60.0</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>	<p>MORFOTIPO #60</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: blanca (0.0.5.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 85-119          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: equimulada          Nº DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 9          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenta espinas en la pared externa</li> <li>• Reacción a Melzer: la pared externa y las espinas se toman color rosado</li> <li>• No se observa cicatriz</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #75</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.60.60.0 - 0.60.100.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 255-340          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 6          DIÁMETRO DEL BULBO SUSPENSOR (µm): 15          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Gigaspora</i></p>	<p>MORFOTIPO #66</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: rosa pálido brillante</li> <li>• P.V.L.G.: (0.20.20.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm):          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado-aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 2          TAMAÑO PARED (µm): 3 (ext) y 2 (int)          DIÁMETRO CICATRIZ (µm): 12 con forma circular          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>

<p>MORFOTIPO #51</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.10.80.0</li> <li>• P.V.L.G.: 0.10.80.0</li> <li>• Melzer:</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 205-260</p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p> <p><b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> ornamentada "punteada"  <b>Nº PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 11  <b>Nº DE CAPAS:</b> 3 y 3  <b>CICATRIZ:</b> ovoide de 10-15 µm  <b>OBSERVACIONES:</b> Reacción positiva a Melzer en pared interna (germinación). Con mucilago</p>	<p>MORFOTIPO #48</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> subglobosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema (0.0.15.0),</li> <li>• P.V.L.G.: (0.0.20.0), (0.20.20.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 102-185  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa con mucilago  <b>Nº DE PAREDES:</b> 2  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 5  <b>Nº DE CAPAS PARED EXTERNA:</b> 3  <b>DIÁMETRO DE LA CICATRIZ (µm):</b> 5  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La pared externa se toma blanca, mientras la interna se toma color amarillo claro (0.0.60.0).</li> <li>• Se observa cicatriz circular de 5-8 µm</li> <li>• Reacción negativa a Melzer</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>
<p>MORFOTIPO #53</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.5.0</li> <li>• P.V.L.G.: 0.20.100.10-20.40.100.0</li> <li>• Melzer: Pared interna se toma rosa pálido (0.30.20.0)</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 68-117  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> reticulado  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 3  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 2  <b>CICATRIZ:</b> ovoide de 7-15 µm  <b>CONEXIÓN HIFAL:</b> no se observa  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con mucilago</li> <li>• Reacción a Melzer: Pared interna se toma rosa palido</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>	<p>MORFOTIPO #38</p>  <p><b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b>  <b>FORMA:</b> globosa  <b>COLOR:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: crema (0.0.5.0 - 0.0.15.0)</li> <li>• P.V.L.G.: 0.10.40.0</li> </ul> <p><b>DIÁMETRO (µm):</b> 102-170  <b>CONTENIDO DE LA ESPORA:</b> granular  <b>ESTRUCTURA SUPERFICIAL:</b> lisa  <b>Nº DE PAREDES:</b> 1  <b>TAMAÑO PARED (µm):</b> 9  <b>DIÁMETRO DEL PORO (µm):</b> 2.5  <b>DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):</b> 6  <b>TAMAÑO PARED HIFA (µm):</b> 0.5-1  <b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con septo</li> </ul>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>







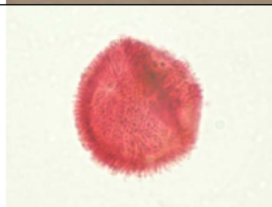
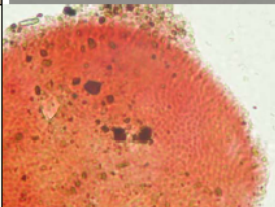
<p>MORFOTIPO #16</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 40.80.50.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 155-186          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 10          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 7          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 25-30          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Esporas solitarias o en racimos de 3-5</li> <li>• Presenta canales en pared</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #17</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 20.80.50.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 136 x 153          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular-aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 14          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 5          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 14          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 1          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con canales en pared</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #76</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: ovoide          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.0.20.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 102 x 255          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 5          Nº DE CAPAS: 3          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la capa interna de la pared se tiñe color rosado-rojizo (0.60.20.0)</li> <li>• No se observa bulbo suspensor</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Gigaspora</i></p>	<p>MORFOTIPO #34</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: piriforme-irregular          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.20.100.0 - 20.80.70.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 85 x 136          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 6          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 2          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Canales en pared</li> <li>• Con hifa desarrollada lateralmente</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>

<p>MORFOTIPO #55</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.20.0 a 0.10.70.10</li> <li>• P.V.LG.: purpura claro (20.80.40.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-112          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular-aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          N° DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 6          CICATRIZ: circular de 7 µm          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared interna se toma color rojo intenso</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>	<p>MORFOTIPO #26</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 20.80.60.0 - 40.80.70.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-160          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          N° DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 9          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 5          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 20          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 2-3          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>
<p>MORFOTIPO #35</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: amigdaliforme          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.LG.: 0.20.100.0 - 20.80.70.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 34-68 x 68-85          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          N° DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 4          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 3-4          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 12          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 2          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #68</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: pálido (0.0.5.0)</li> <li>• P.V.LG.: 0.0.20.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-104          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          N° DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 2.5, 0.5 y 1          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared interna se toma color rojo-purpura (40.80.20.0)</li> <li>• No se observa la cicatriz</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>

<p>MORFOFIPO #32</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: elipsoide-cilíndrica          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.20.100.0 -20.80.70.10</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 34-68 x 85-221          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 5-6          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Canales en pared</li> <li>• No se observa conexión hifal</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOFIPO #49</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialino a (0.0.5.0 - 0.0.15.0)</li> <li>• P.V.L.G.: (10.0.20.0)</li> <li>• Melzer: La pared interna se torna rojiza a (40.60.20.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51-102          CONTENIDO DE LA ESPORA: aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada-"paulinae"          Nº DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 4.5          Nº DE CAPAS: 2,1,1          CICATRIZ: no se observa          OBSERVACIONES:</p>	<p>GENERO: <i>Acanthospora</i></p>
<p>MORFOFIPO #40</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: globosa a subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 20.80.60.0 - 20.80.100.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-119          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular-aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 9-10          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 4          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm): 20          TAMAÑO PARED HIFA (µm): 1-2          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Con canales en pared</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOFIPO #42</p>  <p>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA          FORMA: lentiforme          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.60.60.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 51          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: borde irregular con abundante mucilago          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm):          DIÁMETRO DEL PORO (µm):          DIÁMETRO DE LA HIFA (µm):          TAMAÑO PARED HIFA (µm):          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Pueden ser solitarias o en agregados de 3 esporas</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>

<p>MORFOTIPO #54</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: Rosa pálido 0.20.60.0</li> <li>• P.V.L.G.: Naranja pálido-café (0.30.60.0), (20.80.100.0 - 20.80.100.10)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 85-150          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 3          TAMAÑO PARED (µm): 6          CICATRIZ: circular de 6-11 µm          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: Pared interna se toma rosa pálido a naranja-rojizo</li> <li>• Dos cicatrices contiguas, a 50 µm, una más grande que la otra</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Acaulospora</i></p>	<p>MORFOTIPO #9</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: subglobosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: 0.0.15.0 crema</li> <li>• P.V.L.G.: crema ligeramente oscuro 0.0.40.0</li> <li>• Melzer: 0.60.30.10 - 20.80.40.0</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 68-190          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa       </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p> <p>Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 2.48          Nº DE CAPAS: 2          CONECCION HIFAL: la pared de la hifa con un ancho de 9 µm se forma con la continuidad de la pared de la espora.          DIÁMETRO DEL PORO (µm): 9          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hifa muy larga, hasta 200 µm</li> <li>• Esporas en racimo o individuales</li> </ul> </p>
<p>MORFOTIPO #45</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: globosa          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: ligeramente rosado (0.20.20.0)</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 25-30          CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa, con abundante mucilago          Nº DE PAREDES: 1          TAMAÑO PARED (µm): 2          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> <li>• Esporas solitarias o en agregados de 5-10 esporas</li> <li>• No se observa hifa</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Glomus</i></p>	<p>MORFOTIPO #80</p>  <p>DESCRIPCION DE LA ESPORA          FORMA: ovoide          COLOR:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina</li> </ul>         DIÁMETRO (µm): 238-250          CONTENIDO DE LA ESPORA: globular aceitoso          ESTRUCTURA SUPERFICIAL: lisa          Nº DE PAREDES: 2          TAMAÑO PARED (µm): 5-6          DIÁMETRO BULBO SUSPENSOR (µm): 15          TAMAÑO PARED BULBO SUSPENSOR (µm): &lt;1          OBSERVACIONES:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: la pared se toma color rojo</li> </ul> </p>	<p>GENERO: <i>Scutellospora</i></p>

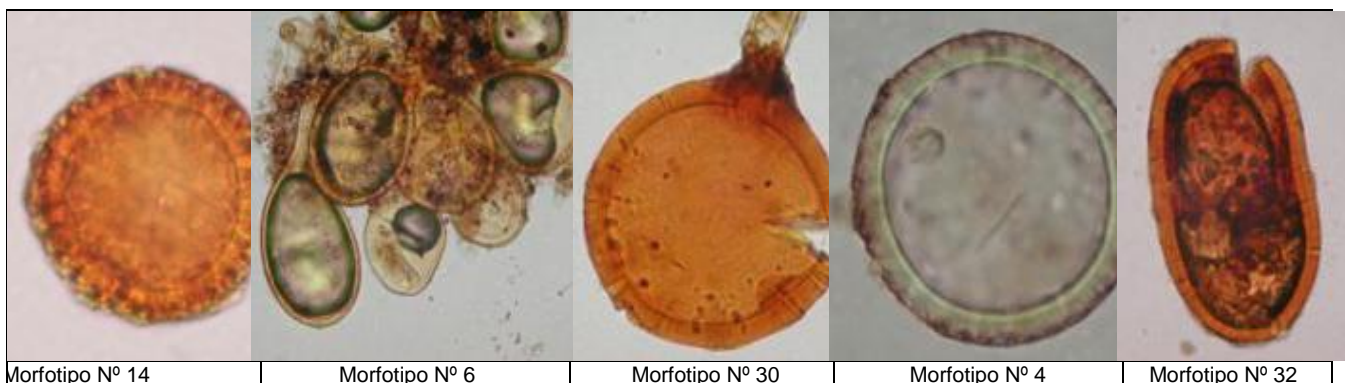


MORFOTIPO #56	GENERO: <i>Acaulospora</i>	MORFOTIPO #69	GENERO: <i>Acaulospora</i>
			
			
<b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b> FORMA: elipsoide COLOR: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y P.V.L.G.: 0.0.60.0 - 0.0.80.0 a 0.60.60.0</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 34-51 x 51-68 CONTENIDO DE LA ESPORA: granular ESTRUCTURA SUPERFICIAL: ornamentada N° DE PAREDES: 3 TAMAÑO PARED (µm): 3.5 TAMAÑO CICATRIZ (µm): 4 OBSERVACIONES: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: negativa</li> </ul>		<b>DESCRIPCIÓN DE LA ESPORA</b> FORMA: globosa COLOR: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua: hialina opaca</li> <li>• P.V.L.G.: pálido (0.0.5.0)</li> </ul> DIÁMETRO (µm): 51-85 CONTENIDO DE LA ESPORA: reticulado ESTRUCTURA SUPERFICIAL: equimulada N° DE PAREDES: 2 TAMAÑO PARED (µm): 1.5 y 0.5 OBSERVACIONES: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción a Melzer: pared externa se torna color rojizo-purpuro (20.60.20.0)</li> </ul>	

### Conservación y multiplicación en campo de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (HFMA) nativos seleccionados.

Con base en trabajo anterior realizado en el laboratorio se seleccionaron los cinco morfotipos de HFMA nativos con mayor frecuencia y mayor número de esporas·100 g<sup>-1</sup> de suelo seco, para ser multiplicados en plantas de maíz ubicadas en un espacio con adecuaciones para establecer un banco de propagación de micorrizas nativas en Saboya.

Esta etapa involucró de forma constante, la participación de los agricultores vinculados a la organización SAT-Alameda (Saboyá), en un trabajo que valoró la toma de decisiones en consenso con los productores de maíz, acerca de los diferentes materiales, insumos y procesos para propagar micorrizas tanto nativas como foraneas (inoculo comercial).



**Fotografía 16.** Esporas representativas de morfotipos nativos de HFMA seleccionados de acuerdo a frecuencia superior al 95% y mayor N° de esporas /100 g de suelo seco.



**Fotografía 17.** Proceso de inoculación de esporas de morfotipos seleccionados en plantas de maíz pregerminadas.

Es así como se hizo el montaje de un ensayo con 6 tratamientos y 5 repeticiones, a continuación los tratamientos utilizados y su distribución. La cantidad de esporas utilizadas en cada tratamiento corresponde a 100 para los morfotipos con menor diámetro (4, 6 y 14) mientras que para los de mayor tamaño correspondieron 40 esporas (Morfotipos 30 y 32)

**Tabla 17.** Tratamientos con morfotipos nativos de micorrizas y su distribución espacial.

Tratamiento	DISTRIBUCIÓN ESPACIAL		
T1 corresponde a morfotipo N° 4	T3R1	T6R2	T4R4
T2 corresponde a morfotipo N° 6	T4R3	T5R3	T3R3
T3 corresponde a morfotipo N° 14	T5R2	T5R1	T2R4
T4 corresponde al testigo sin inoculación	T6R1	T6R5	T4R1
T5 corresponde a morfotipo N° 30	T2R1	T1R5	T2R5
T6 corresponde a morfotipo N° 32	T1R3	T4R5	T3R4
	T3R2	T4R2	T3R5
	T5R4	T2R2	T1R4
	T1R1	T6R3	T2R3
	T6R4	T1R2	T5R5

Al momento de la siembra y a los 30 dds se le realizó la aplicación de solución nutritiva Hoaglad modificada con 20 ml por planta.



**Fotografía 18.** Aplicación de solución nutritiva en ensayo de multiplicación de micorrizas nativas.

En el momento de la cosecha se tomaron muestras foliares para análisis del contenido de fósforo foliar, con lo cual se encontró que los morfotipos 14 y 32 fueron los que más ayudaron a una toma

eficiente de fósforo por parte de las plantas de maíz, dejando como menos eficiente al morfotipo 6 con el mismo valor que el testigo. Tal vez esto se deba a la velocidad en que se desarrolla cada tipo de micorriza, siendo más lento el proceso en el morfotipo menos eficiente en este ensayo. Sin embargo luego de la cosecha se han seguido multiplicando, por parte de los productores, en la planta de producción de micorrizas, cada morfotipo de forma separada, al tiempo que se está seleccionando esporas de cada muestra para obtener a futuro un cultivo puro de cada uno de estos 5 y evaluar las combinaciones más eficientes que puedan ser utilizadas en el cultivo de maíz.

**Tabla 18.** Resultados análisis de fósforo foliar de plantas de maíz inoculadas con 5 morfotipos de micorrizas nativas, provenientes de suelos de Saboyá.

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Fósforo foliar (%)	0.14	0.13	0.16	0.13	0.14	0.16

### 1.2.2. Colección, identificación y caracterización de aislamientos nativos del hongo *Trichoderma sp* en Soracá - Boyacá, como alternativa en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa criolla.

#### Introducción

En Colombia el cultivo de papa es uno de los más importantes debido a su alto consumo e importancia social y cultural. *Rhizoctonia solani* es una de las enfermedades que ataca este cultivo, algunos autores documentan que las pérdidas pueden estar entre el 5- 15% (Nustez, 2002).

El uso de de *Trichoderma* como un agente potencial de Biocontrol de enfermedades de plantas en control integrado ha sido muy discutido. *Trichoderma* es un género presente en suelos tratados con dosis casi letales de fungicidas, produce antibióticos, compite por nutrientes y actúa como mico parásito, jugando un papel importante en el control integrado (Wells 1988, Esquivel 1991).

Las especies del género *Trichoderma sp* son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en material en descomposición en suelo, en donde comprenden una porción significativa de la biomasa total de hongos (Danielson y Davey, 1973, Osono, 2005), como resultado de su prevalencia en suelo, este organismo se halla involucrado en diferentes tipos de interacciones biotróficas que incluyen descomposición, parasitismo y endofitismo (Harman et al. 2004). El género *Trichoderma*, según (Samuels, 2006), agrupa alrededor de 80 especies, (Druzhinina et al., 2006), basados en datos moleculares incluyen hasta 100 especies, en su mayoría asociadas a estados telomórficos en los géneros *Hyprocrea* y *Podostroma*. (Ver fig. 3).

Las especies del género *Trichoderma sp* son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en material en descomposición en suelo, en donde comprenden una porción significativa de la biomasa total de hongos (Danielson y Davey, 1973, Osono, 2005); como resultado de su prevalencia en suelo, este organismo se halla involucrado en diferentes tipos de interacciones biotróficas que incluyen descomposición, parasitismo y endofitismo (Harman et al. 2004). El género *Trichoderma* consta de diversas especies de hongos que tienen la capacidad de parasitar a otros hongos que causan enfermedades en plantas, tal como *Rhizoctonia solani*.

Con el fin de estudiar el potencial de control biológico de aislamientos de hongos antagónicos nativos de suelos de Colombia, con este trabajo se evaluó la eficacia del control biológico de *Trichoderma sp* a partir de muestras nativas de algunas localidades Colombianas, contra uno de los agentes causales de *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de invernadero y en campo.

## Metodología

1. Se tomaron varias muestras de suelo y parte de raíces de cultivos de papa de cultivos de papa de Soracá – Boyacá y Sibaté – Cundinamarca, áreas donde se presenta alta infestación o presencia de *Rhizoctonia solani*.
2. Posteriormente en laboratorio, para la obtención de aislamientos nativos de *Trichoderma spp.* se procedió a tomar de cada muestra 1g de suelo, la solución pasó por un proceso de purificados en medio selectivo modificado (Elad et al., 1981) hasta obtener colonias puras, que fueron conservadas en los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia.
3. Para la selección de aislamientos de *Trichoderma sp.* con potencial de biocontrol se utilizó la metodología de plantas trampa inicialmente en frijol, para selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* con potencial de biocontrolador (Hoyos et al., 2001).
4. Una vez finalizado el experimento con frijol (Var. Diacol Andina) en el cual fueron inoculadas plantas con el patógeno *Rhizoctonia solani* utilizando diferentes cepas de *Trichoderma sp.*, se realizaron los aislamientos de las partes lesionadas (base tallo y tallo) para cumplir con los postulados de Koch, donde el organismo asociado con una enfermedad puede ser aislado en cultivo puro, además este microorganismo debe ser reaislado del hospedero e inoculado y debe mostrar las mismas características en cultivo que se aisló anteriormente (Agrios, 2002).
5. Por lo anterior se preparó un medio de cultivo denominado Nora y Ko específico para *Rhizoctonia solani* es decir que en este medio solo crecerá este microorganismo.

Se realizaron cortes de las partes lesionadas del tallo y base del tallo que presentaban los síntomas de la enfermedad, y se colocaron los trozos sobre el medio para evaluar el posterior crecimiento del hongo (*Rhizoctonia solani*).

Los trozos de material vegetal obtenidos a partir de los cortes realizados de las partes lesionadas del tallo y base del tallo de la planta de frijol que presentaba los síntomas de la enfermedad, se colocaron sobre el medio para evaluar el posterior crecimiento del hongo (*Rhizoctonia solani*).

6. Una vez analizadas las diferentes causas que pudieron hacer no exitoso el experimento en frijol, se realizó un nuevo experimento utilizando como material vegetal papa criolla Var. Colombia y como patógeno el inóculo de *Rhizoctonia solani* perteneciente al grupo de anastomosis 4A3P (AG3) Cogua, y como sustrato una mezcla de turba y suelo esterilizado.

## Resultados

### Control de la patogenicidad de *R. solani* en plantas de frijol

Se realizaron 4 muestreos después de la inoculación o aplicación de los tratamientos:



Fotografía 19. Incubadora para *Trichoderma sp* y *Rhizoctonia sp*

Los resultados que se obtuvieron durante los muestreos realizados sobre las plantas de frijol, muestran que en la mayoría de tratamientos se observó infección a diferente escala, los tratamientos que mostraron mejores resultados fueron el T-36 y T-37 y los que presentaron los peores resultados fueron el T-96 y T-807.

**Tabla 19:** Resultados de diferentes muestreos de frijol, nos indican el número de plantas que presentaron sintomatología

Tratamiento	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
T-07	0	4	7	7
T-36	1	5	5	6
T-37	0	3	3	6
T-41	0	7	7	9
T-48	0	5	7	8
T-51	0	5	7	7
T-96	0	3	5	9
T-807	0	7	9	10
TESTIGO RELATIVO	0	9	11	12
TESTIGO ABSOLUTO	0	0	0	0

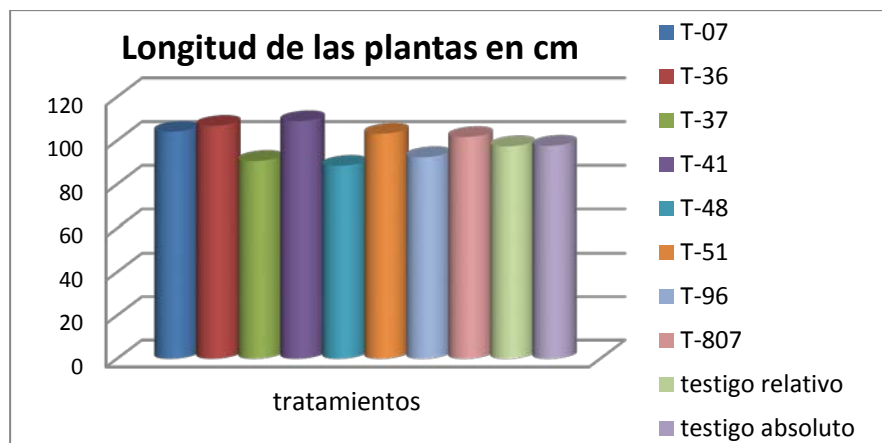
La sintomatología que se tomó como planta infectada por el patógeno *R. solani* mostradas en la fotografía 20, se ratificó a través del aislamiento del patógeno a partir de raíces y base del tallo de las plantas presumiblemente enfermas.

Los síntomas que presentaron las plantas de frijol por la presumible infección causada por *R. solani* fueron los siguientes:



**Fotografías 20.** Planta infectada por el patógeno *R. solani*

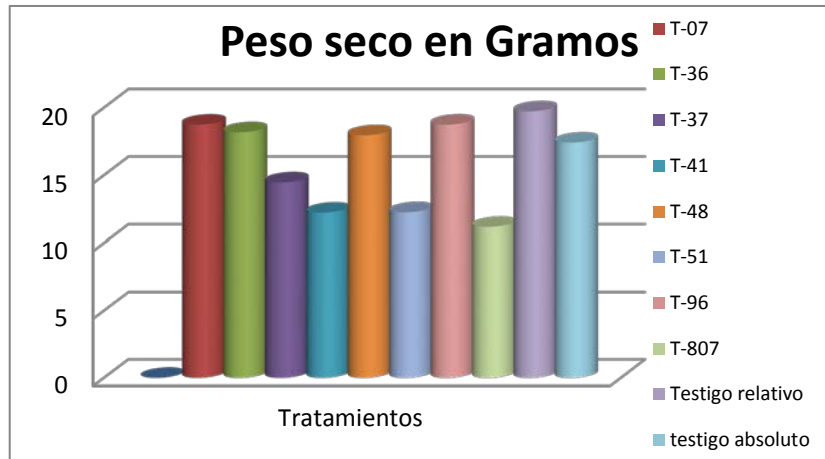
### Crecimiento Plantas



**Figura 21.** Media de la longitud de la plantas de los diferentes tratamientos

La grafica 21 nos indica que en cuanto a longitud las plantas muestran resultados similares, destacando la longitud media presente en los tratamientos T-07, T-36, T-41, T-51 y T-807, las cuales presentaron la mayor longitud, evidenciándose un efecto benéfico generado posiblemente por el efecto de la cepa de *Trichoderma sp.* Correspondiente a cada tratamiento, cabe la pena resaltar que para que no haya alteración de datos, se trabajó con turba sin nutrientes y así se evitó que la nutrición afecte los resultados obtenidos parcialmente.

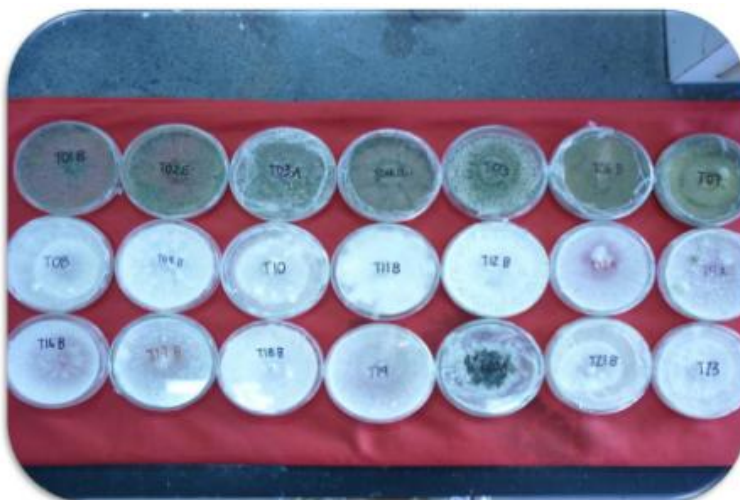
**Peso seco**



**Figura 22.** media de los pesos secos de las plantas de los diferentes tratamientos expresados en Gramos.

Aquí podemos ver que la mayor cantidad de materia seca la presentó el tratamiento relativo, esto se generó debido a que el lugar donde estaba ubicado este tratamiento, el golpe de sol era menos fuerte que en las demás plantas, hecho que ocasionó mayor retención de agua en la turba, lo que generó una mayor eficiencia de estas plantas con respecto a los demás tratamientos. A esta conclusión se llega debido a que al momento de hacer los muestreos y de aplicar agua se observaba que la turba de este tratamiento conservaba humedad mientras que las otras estaban totalmente secas.

En cuanto a los tratamientos de *Trichoderma sp* se puede observar que el T-07, T-36, T-48 y T-96 presentaron buenos resultados en cuanto a la variable peso seco, resultados a tener en cuenta, ya que cepas como T-07 y T-36 presentaron buenos resultados en las variables a analizar, sumado a que el T-36 presentó el menor número de plantas con la sintomatología convirtiéndose en una de las cepas con mejores resultados en las evaluaciones realizadas.



**Fotografías 28.** Cepas de *Trichoderma sp* evaluadas en el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de frijol.



**Fotografías 21.** Inoculación de *R. solani* a través de una solución madre de micelio aplicado a la base del tallo de plantas de frijol y cámara húmeda.

### Comprobación resultados prueba patogenicidad en frijol

En la prueba realizada para comprobar la patogenicidad en el experimento con plántulas de frijol, no se evidenció estructuras del hongo patógeno (*Rhizoctonia solani*) en las observaciones realizadas a los 8 días a las incubaciones de trozos de material vegetal de las partes lesionadas del tallo y base del tallo de la planta de frijol que presentaba los posibles síntomas de la enfermedad. Se realizó este mismo procedimiento 3 veces sin encontrar algún resultado de crecimiento del hongo patógeno, se realizaron improntas sobre el medio para observar si alguna estructura del patógeno crecía sobre el medio, pero sin éxito.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se plantearon discusiones sobre esta situación y se analizaron los siguientes aspectos:

- La variedad de frijol usada durante la experimentación no es susceptible al ataque del patógeno, a pesar de ser una planta que expresa síntomas con facilidad. Se indagó acerca de la variedad y se determinó que es susceptible al patógeno *Sclerotinia sclerotium* mas no *Rhizoctonia solani*. Es posible que el frijol haya experimentado una resistencia al momento de ser inoculado con *Rhizoctonia solani*.
- Los síntomas evidenciados sobre la base del tallo y tallo son asociados al método de inoculación y una respuesta a la herida ocasionada durante este proceso. Ya que en primera medida se realizó un pequeño corte sobre le epidermis de la base del tallo y posteriormente se inyectó una solución que contenía micelio del patógeno. Es posible que en el momento de ocasionar la herida se haya causado una lesión sobre los haces vasculares de la planta haciendo que el tejido subsiguiente a la perforación se evidenciara una necrosis. Se tomó la decisión de realizar la inoculación por herida para generar un chancro característico producto de la infección por *Rhizoctonia solani*.
- El sustrato donde se realizó el experimento fue turba Klasman sin nutrientes, lo que garantiza que *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma* sp sean los “únicos” microorganismos presentes. Es posible que los contenidos de materia orgánica presente en el sustrato sean muy inferiores a los que se presentan en campo lo cual imposibilita su pleno establecimiento, aunque era de esperarse que el hongo se estableciera dentro del tejido de la planta, pero muchos de los

microorganismos pasan por un periodo de adaptabilidad o establecimiento y al no facilitarse este proceso es posible que el patógeno haya muerto.

- Otro factor que pudo limitar la evaluación, fue que en el momento de preparar el inoculo se haya realizado una mezcla de diferentes aislamientos provenientes de diferentes zonas paperas del país, por tal motivo es posible que se hayan mezclado diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* que no son patogénicas para la papa, es decir que su patogenicidad en papa criolla no se encontraba totalmente comprobada.

## Diseño experimental

Se realizó un DCA, utilizando 27 aislamientos de *Trichoderma* sp y 3 aislamientos de *Rhizoctonia solani*. Los tratamientos constaron de tres repeticiones cada uno y son los siguientes:

T1: Plantas inoculadas con el patógeno y el controlador biológico

T2: Plantas inoculadas con el patógeno

T3: Tratamiento testigo sin ninguna inoculación

El T1 consta de la interacción de cada aislamiento de *Trichoderma* sp con cada aislamiento de *Rhizoctonia solani*, así:

**Tabla 20.** Diseño experimental

Aislamiento <i>Trichoderma</i> spp.	Aislamientos <i>Rhizoctonia solani</i>	Tratamiento
1	1-2-3	A
2	1-2-3	B
3	1-2-3	C
4	1-2-3	D
5	1-2-3	E
6	1-2-3	F
7	1-2-3	G
8	1-2-3	H
9	1-2-3	I
10	1-2-3	J
11	1-2-3	K
12	1-2-3	L
13	1-2-3	M
14	1-2-3	N
15	1-2-3	O
16	1-2-3	P
17	1-2-3	Q
18	1-2-3	R
19	1-2-3	S
20	1-2-3	T
21	1-2-3	U
22	1-2-3	V
23	1-2-3	W
24	1-2-3	X
25	1-2-3	Y
26	1-2-3	Z
27	1-2-3	AA

El número total de unidades experimentales será de 273 plantas, obtenidas así: 243 del T1, 15 del T2 y 15 del T3 arregladas como ya se menciono en un DCA.



Estas plantas se sembraron a partir de semilla de *Solanum phureja*, las cuales se colocaron en bolsas plásticas negras con capacidad de 1kg. En cada bolsa se colocó suelo tomado del invernadero en cantidad aproximada de 750g previamente esterilizado en autoclave y manipulado según los tratamientos planteados. Los suelos con inóculo se dejaron en condiciones de aislamiento de contaminantes externos para así asegurar el crecimiento tanto del patógeno como del controlador biológico por espacio de 8 días. Pasado este tiempo se sembró la papa y se procedió a revisar su desarrollo controlando su riego, y evaluando presencia de síntomas visibles de la enfermedad en las plantas en crecimiento.

Se realizó un muestreo destructivo al observar emergencia en todas las plantas a una altura aproximada de 30 cm.



**Fotografía 22.** Disposición de los tratamientos en campo

**Tabla 21.** Disposición de los tratamientos en lugar de ensayo

T1A	T1B	T1C	T1D	T1E	T1F	T1G	T1H	T1I	T1J
T1A	T1B	T1C	T1D	T1E	T1F	T1G	T1H	T1I	T1J
T1A	T1B	T1C	T1D	T1E	T1F	T1G	T1H	T1I	T1J
T1K	T1L	T1M	T1N	T1O	T1P	T1Q	T1R	T1S	T1T
T1K	T1L	T1M	T1N	T1O	T1P	T1Q	T1R	T1S	T1T
T1K	T1L	T1M	T1N	T1O	T1P	T1Q	T1R	T1S	T1T
T1U	T1V	T1W	T1X	T1Y	T1Z	T1AA	T2	T3	
T1U	T1V	T1W	T1X	T1Y	T1Z	T1AA	T2	T3	
T1U	T1V	T1W	T1X	T1Y	T1Z	T1AA	T2	T3	

Finalmente, los resultados arrojaron 4 cepas de *Trichoderma* con potencial bio control, T 48, T 51, T 07 y T Com con valores de 30%, 28%, 26% 22% de incidencia de las lesiones, en observaciones que se realizaron (36 dds y 43 dds).

### **1.2.3. Evaluación de la eficiencia de control de los nemátodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* como controlador biológico de *Clavipalpus ursinus* (Coleóptero: Melolonthidae) plaga de importancia en papa.**

#### **Introducción**

El cultivo de papa criolla *Solanum phureja* en el municipio de Subachoque, se ve limitado por la presencia de muchos insectos plaga, entre los cuales encontramos la chisa o gallina ciega *Clavipalpus ursinus* (Coleóptero: Melolonthidae), ésta es una plaga de importancia económica debido a que consume las raíces de las plantas debilitándolas e interrumpiendo el ciclo fisiológico o dañando el producto final; en este caso la papa genera pérdidas económicas hasta del 100 %.

El control de esta plaga mediante insecticidas sintéticos, aunque puede reducir la población del insecto, no es muy efectivo ni recomendable, no solo por los costos, sino también por la destrucción de los enemigos naturales que controlan otras plagas asociadas a cultivos y el deterioro ambiental que causa su uso frecuente y el deterioro a la salud humana (Bellotti et al.; Carballo y Saunders 1990 citados por Melo et al 2006). Dentro de la búsqueda de enemigos naturales, que comparten los hábitats crípticos de la plaga se pueden destacar los entomopatógenos, siendo uno de los más importantes, los nematodos.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la actividad fue realizada para evaluar la eficiencia de tres especies de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, y *Steinernema carpocapsae*) en larvas de tres estadios larvales, procedentes de cultivos de papa del municipio de Subachoque, Cundinamarca, Colombia.

#### **Metodología**

El proyecto se realizó en laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia en la ciudad de Bogotá. Las larvas de la plaga a controlar *Clavipalpus ursinus* se colectaron en áreas de cultivo de papa el municipio de Subachoque en el departamento de Cundinamarca. Las capturas se realizaron manualmente y fueron transportadas en vasos con suelo a Bogotá para establecer el pie de la cría en el invernadero de la UNAL.

Estas larvas fueron conservadas en invernadero para diferenciar el instar (tamaño) sobre el cual se aplicaron los tratamientos. Cada larva de chisa fue puesta en vasos individuales para evitar canibalismo entre ellas con sus respectivas tapas y sustrato de materia viva con frijol, debido a que esta es una plaga obligada.

Los microorganismos controladores y los nemátodos de *Heterorhabditis bacteriophora*, fueron criados en un laboratorio acondicionado de la Universidad Nacional de Colombia y multiplicados en vivo en larvas de la polilla de cera *Galleria mellonella* (Lepidóptero: Gallerinae: Pyralidae).

#### **Relación de parasitismo:**

Para establecer la relación de parasitismo que existe entre el nemátodo y la plaga, se realizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con cuatro tratamientos: uno sin ninguna aplicación, el segundo con *Heterorhabditis*, el otro con otra especie de *Heterorhabditis* y finalmente con *Steinernema* y tres repeticiones por cada tratamiento variando la cantidad de nemátodos.

En cada uno de los tratamientos se dejaron divididas las larvas de chisa en vasos plásticos individuales clasificadas según el instar en el que se encuentren (tamaño), y en cada vaso se puso una cantidad determinada del nemátodo (con varias concentraciones, por ejemplo 100, 500 y 1000 nemas por larva), de ahí se estableció la cantidad de larvas parasitadas y no parasitadas. Lo

anterior permitió determinar en que instar fue más efectivo el control ejercido por el nemátodo; para esto se llevaron registros en formularios.

Luego de saber en qué instar fue más efectivo el nivel de parasitismo, se procedió a mirar cuantas de las larvas parasitadas murieron debido a la acción del nemátodo. Para esto se llevaron registros en formularios previamente definidos. Se realizó un análisis Probit para establecer la concentración letal L50 y L90.

## Resultados

Luego de la aplicación de los tratamientos de control, en las observaciones realizadas en el microscopio para el conteo de nematodos se encontraron valores diversos en la parasitación y penetración del nematodo en las larvas.

**Tabla 22.** Número promedio de nematodos de las especies *S. feltiae* y *Steinernema* sp encontrados en el lavado superficial y dentro de la larva en las diferentes concentraciones.

ESPECIE	Concentración de Nematodos (IJs/2ml)	Nematodos Promedio en el Lavado Superficial de la Larva	Nematodos dentro de la Larva
<i>S. feltiae</i>	450	6,33	5,20
	300	5,84	5,43
	150	5,32	5,29
	0	0	0
<i>Steinernema</i> sp.	450	3,72	3,24
	300	3,47	2,78
	150	3,10	2,46
	0	0	0

### Nemátodos dentro de la larva

Los resultados observados en la Tabla 22 sobre la cantidad de nematodos encontrados dentro de la larva, fueron inferiores a los encontrados por Triviño, Luque y Parada citados por Parada (2006) en larvas de *Galleria mellonella*, quienes obtuvieron cantidades de penetración entre 6 a 32 nematodos por larva, posiblemente porque la cepa del nematodo es más específica en *G. mellonella*.



**Fotografía 23.** IJ de *Steinernema feltiae* encontrado dentro de chisa de segundo instar de *C. ursinus*.

Los nematodos fueron fácilmente identificados al interior de la larva, en el lavado superficial y en la caja de Siracusa se evidenciaron los nematodos individualmente como se muestra en la figura, observándose alrededor de ella algunas partes sobrantes de la disección del insecto.

## Nematodos en el lavado superficial

En el lavado superficial de la chisa, se observaban los nematodos individualizados, lo cual facilitaba el conteo en la caja de Siracusa; en ninguna de las observaciones se encontraron grupos de nematodos.



**Fotografía 24.** IJ de *Steinernema feltiae* encontrado en el lavado superficial de una larva de *C. ursinus* de 3 instar.

Se encontró que generalmente igual que con *S. feltiae*, no se presentaron en grupos si no individualizados y fue difícil capturar más de uno como se muestra en la figura; lo cual facilitaba su conteo, en la caja de Siracusa.



**Fotografía 25.** Nematodo *Steinernema* sp. Aislamiento del valle del cauca.

Durante las observaciones realizadas se encontraron diversos resultados; como por ejemplo: larvas muertas totalmente secas por dentro, que se presume hayan muerto por una enfermedad

viral, comunicación personal Gaigl 2009. De igual manera se encontraron larvas enfermas aparentemente producto del inicio de la parasitación ejercida por el nematodo.



**Fotografía 26.** Larva de *Clavipalpus ursinus* muerta y totalmente seca por dentro, posiblemente por una infección viral.



**Fotografía 27.** Larvas del segundo instar de chisas enfermas con manchas rojas en abdomen y tórax respectivamente.

Las manchas que se observan en la imagen anterior eran manchas rojas y con relieve, estas larvas se notaban enfermas por el poco movimiento que presentaban, en la disección de estas larvas se examinaba con rigor las partes afectadas con manchas y se encontraban nematodos dentro de la larva justo en donde estaba afectada.

Generalmente los nematodos ingresaban a la chisa por medio de los espiráculos ya que fue más evidente encontrar los nematodos hacia la parte de los espiráculos, en el tracto digestivo no se evidenciaba ninguna afectación, por lo cual es difícil afirmar que el ingreso se hiciera por vía oral; igualmente *C. ursinus* se caracteriza por tener mandíbulas agresivas que reaccionan ante la presencia de individuos extraños, por esta razón el nematodo ingresa directamente más fácil por espiráculos.



**Fotografía 28.** Tracto digestivo de *C. ursinus* sin afecciones causadas por nematodos

Se encontraron larvas parasitadas por nematodos que eran evidentemente positivas a este debido al cambio en la consistencia de su cuerpo y en la coloración como se muestra en la fotografía 29.



**Fotografía 29.** Larva del segundo instar de *C.ursinus* aparentemente parasitada por *Steinernema* sp.

Los síntomas observados se apoyan en Sáenz (2003) quien afirma que las larvas de *C. ursinus* - muertas por entomopatógenos, se tornan de color marrón oscuro. Estas variaciones están determinadas por la coloración natural del insecto, la cantidad de luz que refleja la cutícula y el grado de infestación (Woodring y Kaya (1988) citados por Sáenz (2003)). Además las larvas se tornan flácidas y no toman mal olor.

#### **Pruebas de Patogenicidad de *Steinernema feltiae* y *Steinernema* sp.**

Mediante el diseño experimental, se evaluaron las diferencias entre cada una de las concentraciones con respecto al lavado superficial y a los nematodos dentro de la larva.

La concentración de nematodos de *Steinernema feltiae* no fue relevante frente a la cantidad de nematodos en el lavado superficial de la larva y tampoco lo fue en la cantidad de nematodos que se encontraban dentro de la misma.

De igual manera la mortalidad no presentó diferencias estadísticamente significativas; no obstante la más baja se encontró en el testigo y en la concentración de 150 IJs/2ml. La mayor mortalidad se encontró en la concentración de 300 IJs/2ml pero sin diferencias estadísticas con las demás.

**Tabla 23.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* causada por *S. feltiae* en cuatro concentraciones diferentes. (Letras diferentes indican diferencias significativas según pruebas de Tukey (P=0,05)).

CONCENTRACIONES	MEDIAS (% MORTALIDAD)
450 IJs/2ml	11,7 %a
300 IJs/2ml	16,7 %ab
150 IJs/2ml	6,7 %ac
Testigo	6,67%ac

A diferencia de los resultados expuestos en la Tabla 23, Sáenz (2003) encontró mayores porcentajes de mortalidad con un 88% en larvas de *C. ursinus* en un periodo de 48 a 72 horas.

El porcentaje de mortalidad de las larvas testigo y las larvas a las que se les aplicó concentración de 150IJs/2ml fueron prácticamente iguales. Esto se debe al estrés ocasionado en las larvas en el traslado de campo al laboratorio, o a condiciones netamente biológicas del insecto; ya que se esperaría que el porcentaje de mortalidad en el testigo fuera nula.

Los resultados obtenidos en esta investigación discrepan con los encontrados por Mafla *et al.* 2006 quienes encontraron un 100% de mortalidad con una concentración de 150 nematodos/ml al evaluar la eficiencia de *Steinernema* sp frente a larvas de *Ancognatha scarabaeoides* en condiciones de laboratorio.

Existieron bajos resultados frente a otras investigaciones realizadas con nematodos de *Steinernema feltiae* como la que realizaron Parada *et al.* (2006), en la cual encontraron un porcentaje de mortalidad del 65% y 50% trabajando concentraciones similares.

Al comparar con los resultados obtenidos por Koppenhöfer y Fuzy (2004) citados por Parada *et al.* (2006), en el cual se evaluaron nematodos de esta misma especie en chisas de *Anomala orientalis* y *P. japónica*, se encontraron mortalidades que alcanzaron hasta el 98%. Esta situación posiblemente se puede deber a la biología del insecto y a los mecanismos de defensa que el usa al sentirse parasitado (comunicación personal Parada S, J.C).

Melo *et al.* (2006), afirman que uno de los mecanismos de defensa de los insectos ante la presencia de nematodos es la melanización de estos. Los mismos autores afirman que este fenómeno se presenta en los insectos como un mecanismo de acción dado por una respuesta inmune de tipo celular, asociada a la producción o absorción de fenol-oxidasas.

El instar de la larva tampoco fue un factor relevante frente a la mortalidad de las larvas, aunque se presentó un mayor porcentaje en larvas de instar dos en la concentración de 300IJs/2ml, no se registran diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 24.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* en sus tres instares causados por las tres concentraciones de nematodos de *S.feltiae*, comparado con las larvas testigo.

CONCENTRACIONES	% MORTALIDAD		
	INSTAR 1	INSTAR 2	INSATR 3
Testigo	3.67%	2%	1%
150IJs/2ml	1.66%	1.66%	3.33%
300IJs/2ml	3.33%	8.33%	5%
450IJs/2ml	1.66%	5%	5%

En los porcentajes de mortalidad de la Tabla 24 encontramos que para la concentración de 150IJs/2ml fue de 1.66% a 3.33% encontrándose la mayor mortalidad en el instar tres, para 300IJs/2ml la mortalidad presentó porcentajes entre 3.33% y 8.33% encontrándose la mortalidad más alta en el instar dos, en la concentración de 450IJs/2ml el mayor porcentaje de mortalidad se encontró en los instares dos y tres con un 5% a diferencia del instar uno que presentó porcentaje

de 1.66%, por ultimo en las larvas sin ninguna aplicación de nematodos se encontró una alta mortalidad en el instar uno con un valor de 3.67% encontrándose valores del 2% y 1% en los instares dos y tres respectivamente.

**Tabla 25.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* en cuatro tiempos de evaluación (dda) causados por las tres concentraciones de nematodos de *S. feltiae* comparado con las larvas testigo.

CONCENTRACIONES	% MORTALIDAD			
	DIA 4	DIA 8	DIA 12	DIA 16
Testigo	2%	3.66%	4.33%	11.33%
150IJs/2ml	0%	0%	13.33%	13.33%
300IJs/2ml	13.33%	6.66%	26.66%	20%
450IJs/2ml	6.66%	6.66%	13.33%	20%

La Tabla anterior muestra valores que discrepan con los resultados obtenidos por Sáenz (2003) en el cual se afirma que los periodos largos de exposición del hospedante carecen de efecto en la mortalidad de *C. ursinus* ya que todas las larvas murieron a las 48 horas, en comparación con este estudio en el cual el tiempo de exposición fue un factor de importancia, ya que en general la mayor mortalidad se presentó a los 16 (dda).

En las pruebas realizadas con nematodos de *Steinernema* sp se encontró que la mortalidad fue alta en relación a la causada por *S. feltiae* en la concentración de 150 IJs/2ml con un 15%.

**Tabla 26.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* causada por *Steinernema* sp.

CONCENTRACIONES	MEDIAS (% MORTALIDAD)
450IJs/2ml	6,67%a
300 IJs/2ml	3,3%ab
150 IJs/2ml	15,0%c
Testigo	0,00%b

No se encontraron diferencias significativas en porcentaje de mortalidad con las concentraciones de 300IJs/2ml y 450IJs/2ml. La mayor mortalidad se encontró en la concentración de 150IJs/2ml con diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás tratamientos. El menor porcentaje de mortalidad se encontró en la concentración de 300IJs/2ml sin diferencias estadísticas con respecto al testigo.

Comparando la efectividad de los dos nematodos evaluados no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos pero si es evidente la mayor efectividad de *Steinernema* sp frente a *S. feltiae* en la concentración de 150neo/2ml, pero esta ultima presenta mayores porcentajes de mortalidad a concentraciones más altas.

Melo et. al. (2006) encontraron mayores porcentajes de mortalidad a mayores concentraciones de nematodos inoculados obteniendo un 65% de mortalidad con concentraciones de 400IJs/ml, 50% con 200IJs/ml, 29% con 50IJs/ml y 15% con 25IJs/ml usando la especie de nematodo *Steinernema scarabaei* en larvas de *Phyllophaga pos bicolor*.

La Tabla 27 permite observar la variación de la mortalidad en los diferentes instares de las larvas de *C. ursinus*. Las larvas sin ninguna aplicación de nematodos no presentaron mortalidad en ningún instar, en la concentración de 150IJs/2ml se encontraron valores entre 3.33% y 8.33% en el cual el mayor porcentaje estuvo en el instar dos. En la aplicación de 300IJs/2ml los valores estuvieron entre 0% y 3.33% y por ultimo para 450IJs/2ml la mayor mortalidad estuvo en el instar dos con un valor de 3.33%.



**Tabla 27.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* en sus tres instares causados por las tres concentraciones de nematodos de *Steinernema* sp comparado con las larvas testigo.

CONCENTRACIONES	% MORTALIDAD		
	INSTAR 1	INSTAR 2	INSTAR 3
Testigo	0%	0%	0%
150IJs/2ml	5%	8.33%	3.33%
300IJs/2ml	0%	3.33%	1.66%
450IJs/2ml	1.66%	3.33%	1.66%

El estado de desarrollo influye significativamente en la efectividad de los nematodos entomopatógenos, sin poder generalizar, ya que diferentes estudios muestran que esto depende de la especie de chisa y el nematodo; resultados obtenidos en *P. japónica* con *Heterorhabditis bacteriophora* mostraron su mayor penetración en el instar tres, mientras que *Anomala orientalis* mostró un aumento de la susceptibilidad de la larva dos frente a la larva tres, con la misma especie de nematodo (Koppenhöfer y Fuzy 2004; Wang y Gaugler 1998; citados por Melo et al. (2007)). Lo anterior concuerda con esta investigación debido a que la mortalidad fue mayor en el instar dos teniendo valores bajos en el instar tres.

Jackson y Brooks (1995) citados por Melo et al (2007), aseguran que esta susceptibilidad del hospedero también ha sido atribuida primariamente al tamaño de los orificios naturales que son punto de entrada de los nematodos (espiráculos, ano y boca).

**Tabla 28.** Porcentaje de mortalidad de *C. ursinus* en cuatro tiempos de evaluación (dda) causados por las tres concentraciones de nematodos de *Steinernema* sp comparado con las larvas testigo

CONCENTRACIONES	% MORTALIDAD			
	DIA 4	DIA 8	DIA 12	DIA 16
Testigo	0%	0%	0%	0%
150IJs/2ml	0%	0%	26.66%	40%
300IJs/2ml	0%	0%	6.66%	13.33%
450IJs/2ml	0%	0%	0%	26.66%

En las evaluaciones realizadas a los 4, 8, 12 y 16 (dda) para la aplicación de *Steinernema* sp se encontraron valores que evidenciaron como este nematodo funciona mejor a mayor tiempo de exposición del hospedero como se muestra en la Tabla 28.

Los resultados obtenidos mostraron valores nulos para las evaluaciones realizadas a los cuatro y ocho (dda). En la concentración de 150IJs/2ml la mayor mortalidad se encontró a los 16 (dda) con 40% y 26.66% a los 12 (dda), esta mortalidad fue alta comparada con la encontrada en la evaluación a los 12 y 16 (dda) para la concentración de 300IJs/2ml en la cual el porcentaje de mortalidad estuvo entre 6.66% y 13.33% respectivamente; y en la concentración de 450IJs/2ml solo se encontró mortalidad 16 (dda) con 26.66%.

Epsky y Capinera (1993) citados por Corredor et al. (2006) en evaluaciones realizadas en *Tecia solanivora* encontraron que *S. carpocapsae* a las 48 y 72 horas después de la aplicación presenta mayor numero de nematodos dentro del insecto trampa, valores que contradicen los resultados obtenidos en este estudio ya que esta investigación demostró que la mayor mortalidad de las larvas se presenta entre los 12 y 16 (dda).

Al evaluar las variables de la relación de parasitismo se encontró que la mayor capacidad efectiva de penetración (CEP) la presenta *S. feltiae* en la concentración de 150IJs/2ml con un 100% y la menor la tiene *Steinernema* sp con un 79% para igual concentración.

**Tabla 29.** Resultados de la evaluación de las variables de parasitismo y mortalidad ejercidos por *S. feltiae* y *Steinernema* sp. Sobre larvas de *C. Ursinus*.

ESPECIE	Concentración (IJs/2ml)	A	CEP	CPH	Mortalidad
<i>Steinernema feltiae</i>	450	0,3%	82%	1,16%	11,7%
	300	0,1%	93%	1,81%	16,7%
	150	0,0%	100%	3,53%	6,7%
	Testigo				6,67%
<i>Steinernema</i> sp.	450	0,1%	87%	0,72%	6,67%
	300	0,2%	80%	0,93%	3,33%
	150	0,4%	79%	1,64%	15%
	Testigo				0%

Con *S. feltiae* se encontró una capacidad de alcance (A) entre 0,0 % y 0,3% en las concentraciones de 150IJs/2ml y 450IJs/2ml. Con *Steinernema* sp se encontró que la capacidad de alcance fue al contrario de *S. feltiae* es decir que hubo una mayor capacidad de alcance (A) a menor concentración del nematodo.

Respecto a la capacidad efectiva de penetración (CEP) en *Steinernema feltiae* se encontraron valores entre el 82% para la concentración de 450IJs/2ml y 100% para la concentración de 150IJs/2ml. Nuevamente, contrario a lo observado con *S. feltiae* en esta variable la tendencia de la capacidad efectiva de penetración (CEP) de *Steinernema* sp disminuyó a medida que aumentaba la concentración, encontrándose un 87% para la concentración de 450IJs/2ml y 79% en la concentración de 150IJs/2ml.

En la Tabla 29 se observa la capacidad de penetración de hábitat (CPh) con *Steinernema feltiae* fue de 1,16% para la concentración de 450IJs/2ml, 1,81% en la concentración de 300IJs/2ml y 3,53% en la concentración de 150 IJs/2ml; en *Steinernema* sp se encontraron valores que aumentaban al disminuir la concentración estando entre 0,72% para la concentración de 450IJs/2ml y 1,64% para 150IJs/2ml.

Al encontrar que existe un muy alto valor de CEP (Capacidad Efectiva de Penetración del nematodo) comparado con el valor de A (Capacidad de Alcance del nematodo) se comprobó que estos nematodos son muy efectivos debido a que estos llegan al hospedero en este caso las larvas de primero segundo y tercer instar. Estos nematodos no se quedan en la superficie si no que penetran rápidamente, con lo cual se comprobó que *Steinernema feltiae* tiene los mayores valores de penetración frente a *Steinernema* sp.

Esto demuestra que posiblemente *Steinernema* sp. sea más susceptible a los mecanismos de defensa de *C. ursinus* cuando el nematodo ya ha penetrado. Estos mecanismos de defensa inmunológicos y mecánicos de *C. ursinus* le impide a los nematodos entomopatógenos (nep) desarrollarse y matar la larva; lo cual explica los altos valores de penetración frente a los bajos porcentajes de mortalidad.

Melo et al., (2007) explican que entre los grados de susceptibilidad se mencionan características de tipo morfológico, fisiológico y hasta genético; que existen variaciones inter-específicas en los mecanismos de defensa; el tamaño y comportamiento del hospedero; el diámetro menor de los espiráculos en larvas jóvenes; y las placas sobre estos que impiden la penetración del nematodo son entre otros algunos de los mecanismos de defensa que impiden el desarrollo del nematodo en las larvas.

## CONCLUSIONES

- Trabajar con nematodos de cepas propias de Colombia es importante debido a que estos ya han sido sometidos a procesos de adaptabilidad lo cual facilitó esta investigación.
- Es importante trabajar sobre el estado larval del insecto hospedero debido a que se facilita el manejo, la biología del insecto es menos agresiva en este estado, y además este es el estado más perjudicial en los cultivos.
- Al evaluar la eficiencia de estos nematodos provenientes de cepas colombianas como control sobre larvas de *C.ursinus* se observa que hubo un control muy bajo en cuanto a mortalidad, debido principalmente a los mecanismos de defensa propios de insectos del orden Coleóptera, pero alto en cuanto a tasa de penetración se refiere.
- En cuanto a la mortalidad y la relación de parasitismo ejercida por las dos especies se puede decir que fue un buen resultado ya que aunque estas variables ya se habían estudiado para estos nematodos es la primera vez que se realizan estas pruebas con larvas de *Clavipalpus ursinus*; lo que deja estos entomopatógenos en un lugar promisorio para el control de estas larvas.

**Objetivo específico No 2:** Adaptar y desarrollar técnicas caseras ajustadas a las condiciones locales para la producción de biofertilizantes con microorganismos y abonos mejorados para mejorar la fertilidad del suelo y los ingresos de los agricultores.

## **Actividad 2.4. Evaluación de técnicas para producción de Bioabonos fermentados (Bioles y preparación de abono tipo Bocashi).**

### **Introducción**

Todos estos componentes de la materia viva sufren una serie de transformaciones que originan lo que conocemos como materia orgánica propiamente dicha, que consiste en un material dinámico (termodinámicamente inestable), ligado a los ciclos del carbono, nitrógeno, del fósforo y del azufre, a la reducción del hierro y el manganeso en el suelo y a otros muchos procesos y que puede llegar a estabilizarse en función de los parámetros ambientales (temperatura, pH, humedad, contenido iónico, poblaciones de microorganismos, etc.).

El Biol es un fitoestimulante de origen orgánico; es un preparado líquido que se produce en un "biofermentador" casero. Es el producto de la descomposición anaeróbica de desechos orgánicos por microorganismos eficientes y la adición de algunos elementos que no son de síntesis química, que posteriormente van a servir como fuente de fertilización, nutrición y control fitosanitario a las plantas. Siendo el biol una fuente orgánica de fitorreguladores, a diferencia de los nutrientes en pequeñas cantidades, es capaz de promover actividades fisiológicas y estimular el desarrollo de las plantas, sirviendo para actividades agronómicas.

Bocashi, es un término japonés que significa abono orgánico fermentado, que se logra siguiendo un proceso de fermentación acelerada, con la ayuda de microorganismos benéficos, que pueden tomar la materia orgánica del suelo y hacerla entrar en el mundo vivo, gracias a la energía química de la tierra. Este proceso permite aprovechar en forma eficiente los residuos orgánicos (paja de cosechas, tamos, raquis de banano y plátano, desecho de frutas, estiércoles) de un cultivo cualquiera y provee un insumo de bajo costo.

### **Metodología**

Con participación activa de los agricultores, se mejoró el proceso en la producción de abono orgánico, con la realización de las siguientes actividades:

- ✓ A partir de talleres – teórico prácticos, se dieron a conocer conceptos en la producción de abonos orgánicos. Con algunos grupos se trabajaron temas específicos como: factores fisicoquímicos a tener en cuenta en la preparación del abono orgánico, caracterización y aporte de las materias primas en la mezcla del abono, y etapas del proceso de compostaje.
- ✓ Caracterización general del proceso de producción del abono desarrollado por los agricultores, evaluando: materias primas, origen y cantidades de la mezcla, proceso de preparación, el tiempo de producción, tamaño de la pila entre otros.
- ✓ Se realizaron análisis de laboratorio de las características físico químicas y de calidad del abono, con el fin de valorar la calidad y buscar posibles mejoras, comparando los resultados con estándares establecidos de calidad de abono orgánico en el país.
- ✓ Se realizaron visitas o giras de campo con los agricultores a plantas de producción de abono orgánico a nivel local, para tomar experiencias positivas que puedan afianzar el proceso de fabricación tecnificada de abono orgánico tipo Bocashi.

## Resultados

### 2.4.1. Evaluación de técnicas para producción de abono tipo Bocashi en el municipio de Ventaquemada

#### Abono Solido – Orgánico (Bocashi)

En el municipio de Ventaquemada, se realizó el acompañamiento al grupo de productores que venían desarrollando procesos de producción de Bioinsumos, evaluando participativamente las técnicas aplicadas en ese momento. Se evaluaron parámetros de temperatura y humedad, utilización de materias primas y se analizó la relación de C/N para ajustar las cantidades de materiales a utilizarse.



**Fotografía 27.** Elaboración de Abono tipo Bocashi en Ventaquemada

Se efectuaron análisis fisicoquímicos del abono que se elabora tradicionalmente en Ventaquemada, cumpliendo con la mayoría de los parámetros de calidad según norma técnica Colombiana NTC para abonos orgánicos. En general, el abono presentaba un buen aspecto, pero para mejorar su calidad técnica se ajustaron algunos porcentajes de la mezcla de las materias primas y en el proceso de elaboración del abono.

#### Caracterización del proceso de producción y/o fórmula del Abono Bocashi



**Fotografías 28.** Pesaje de los materiales utilizados en el abono Bocashi en la planta local Ventaquemada

A partir de los primeros resultados de la caracterización fisicoquímica del abono Bocashi, se implementó concertadamente algunas mejoras en la fórmula del abono como: Uso de Calfos como aporte de fósforo, suero de leche y los microorganismos eficientes nativos para acelerar la

descomposición de los materiales, igualmente se balanceó la cantidad de los materiales procurando una relación de Carbono / Nitrógeno cercana a 30.

**Tabla 30.** Resultados del análisis físico y químico del abono tipo Bocashi y parámetros de calidad de la NTC

PARAMETRO	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	NTC Abono Orgánico
Densidad aparente seca g/ml		0.418	0.316	< 0.6 g/cm <sup>3</sup>
pH pasta saturada		6.89	6.99	4 – 9
C.E. (Extracto saturado) mS/cm		5.53	8.46	
Humedad % *		59.25	29.64	20 – 35%
Cenizas % *		22.74	45.63	<60%
C.I.C meq/100gr		23	32.08	>30
N total % P/P	1,6	0.48	0.76	>1% declarado
Potasio total % P/P		0.30	0.47	
K <sub>2</sub> O % P/P	0.58	0.36	0,57	>1% declarado
Calcio Total % P/P		1.80	3.05	
CaO % P/P	1,7	2,52	4.26	
Magnesio Total % P/P	0.22	0.09	0.46	
Fosforo Total % P/P		0.20	0.53	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> % P/P	0.04	0.46	1.22	>1% declarado
Azufre % P/P		0.053	0.19	
Boro % P/P		0.015	0.005	
Cobre % P/P		0.001	0.001	
Manganeso % P/P		0.024	0.018	
Hierro % P/P		0.66	0.48	
Zinc % P/P		0.004	0.008	
Sodio % P/P		0.24	0.422	
Carbono orgánico Oxidable % P/P	18.5	7.47	11.87	> 15%
Relación C/N		15.40	15.62	<20
Retención de Humedad % P/P		46.25	80.21	Mínimo su propio peso
Perdidas x volatilización % *		18.01	24.73	

\* Suma de estos parámetros debe ser 100% - NTC

Para ello, los materiales fueron pesados en una carretilla asignando un peso promedio para cada material, a partir de esto se contó el número de carretillas usado en la fórmula tradicional mejorada del abono así:

**Tabla 31.** Materiales para preparación abono Bocashi en Ventaquemada

Materiales	Peso carretilla (Kg)	No carretillas	Peso total material (Kg)
Rumen de ganado	100	273	27300
Equinasa (con aserrín)	50	177	8850
Pluma	16	21	336
Caña de maíz	7	15	105
Hoja de acacia	30	17	510

Los demás elementos fueron:

Materiales	Unidad	Cantidad	Peso total material (Kg)
Cal Dolomita	Bulto 50k	15	750
Cal Agrícola	Bulto 50k	15	750
Calfos	Bulto 50k	15	750
Levadura	Libra (500g)	15	7.5
Melaza	Kilo	150	150
Suero de leche	Cantina 20L	3	60 Litros
Micro. Nativos (Biol)	Litro	100	100 L
Cascarilla de arroz	Bulto (50K)	20	1000
Tierra negra	Viaje	1	7000



**Fotografías 29.** Suero y microorganismos nativos utilizados en la preparación del abono Bocashi

Finalmente, se tomaron registros de temperatura del abono por medio de un termómetro en las diferentes fases de fermentación para así determinar los momentos y números de volteos para realizarle a la mezcla, procurando que la temperatura no sobrepase los 50°C, afectando la calidad final del abono.



**Fotografía 30.** Control de Temperatura en el proceso del abono

### 2.1.2. Evaluación de técnicas para producción de abono líquido orgánico en el municipio de Ventaquemada.

Con la participación de los agricultores de Ventaquemada y Turmequé, se realizó la preparación del abono líquido orgánico, tipo biol, por medio de talleres teórico prácticos.



**Fotografía 31.** Taller participativo de preparación del abono líquido tipo (biol) en Ventaquemada

Los productores de esta zona utilizan los siguientes materiales para la elaboración de sus biofertilizantes: Rumen de Bovino, Suero, Melaza, Microorganismos Nativos y algún tipo de mineral

según la utilización de este (Ceniza, Harina de hueso, Roca fosfórica). Actualmente los productores de la zona, están elaborando diferentes tipos de biofertilizantes como Supermagro, Super4 y Biol básico el cual se utiliza en la elaboración de Abono Orgánico tipo Bocashi para incrementar la actividad microbiológica en este.

### Análisis físico químico de los abonos

Los resultados de los análisis fisicoquímicos de calidad realizados del abono líquido tradicional elaborado por los agricultores, muestra diferencias significativas, sobretodo, en valores de potasio soluble, magnesio y fósforo, en el ajuste de materiales para el cumplimiento de la NTC para abonos orgánicos.

**Tabla 32.** Resultados del análisis físico y químico de los abonos líquidos orgánicos según parámetros de calidad de la Norma Técnica para Abono Líquido Orgánico

PARAMETRO	Análisis 1	Análisis 2	NTC Liquido – orgánico mineral
Densidad a 20° C g/MI	1.082	1.0466	Reportar
pH en 10%	7.12	6.89	Reportar
C.E en 10° Ms/cm	1.27	3.41	Reportar
Humedad gr/L	978.60	922.70	
Potasio gr/L	0.71	4.60	Reportar
N Total	0.71	0.42	40
K2O gr/L	0.85	5.50	40
Calcio gr/L	1.50	2.30	
CaO gr/L	2.10	3.22	Reportar
Magnesio gr/L	0.29	1.60	Reportar
MgO gr/L	0.48	2.66	Reportar
Fosforo gr/L	0.13	0.33	Reportar
P2O5 gr/L	0.30	0.77	40
Azufre gr/L	0.56	5.10	
Boro gr/L	0.13	0.25	
Cobre gr/L	0.08	0.27	
Manganeso gr/L	0.12	0.74	
Hierro gr/L	0.31	1.30	
Zinc gr/L	0.36	2.80	
Sodio gr/L	0.57	1.52	
C. Orgánico oxidable gr/L	5.10	10.30	>20
Rel(C/N)	7.18	24.52	
Sólidos Suspendidos Totales g/L	7.51	30.72	

### Captura de microorganismos nativos



**Fotografía 32.** Microorganismos nativos capturados en zona de paramo en Ventaquemada.

Se realizó por parte de los agricultores la captura de microorganismos eficientes nativos en una zona boscosa de paramo de Ventaquemada, estos microorganismos fueron identificados,



caracterizados y cuantificados en un análisis de laboratorio. Estos microorganismos nativos fueron activados, replicados y conservados por los agricultores, microorganismos que posteriormente fueron utilizados en la preparación de Bioles y abono Bocashi.

**Tabla 33.** Identificación de los microorganismos nativos capturados en una zona boscosa de paramo en Ventaquemada

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR	POBLACION
<i>Penicillium sp.</i>	Moho verde	27 x 10 E1 UFC/mL
Levaduras	Levaduras	62 x 10 E5 UFC/mL
Bacterias mesófilas Aerobias		12 x 10 E7 UFC/mL
<i>Pseudomonas sp</i>		< 10 UFC/mL
Bacterias anaerobias		79 x 10 E4 UFC/mL
Antinomycetes		< 10 UFC/mL
Azotobacter sp		60 x 10 E4 UFC/mL
Azospirillum		35 x 10 E4 UFC/mL

Los microorganismos nativos que fueron encontrados, principalmente, son: levaduras, bacterias, antinomycetes, posiblemente solubilizadores de fosforo y fijadores de nitrógeno. No se encontraron patógenos de importancia. Estos microorganismos nativos se están utilizando para enriquecer la microbiota del abono Bocashi.

### 2.4.3. Evaluación de técnicas para producción de abono tipo Bocashi en el municipio de Simijaca.

En el municipio de Simijaca, se realizaron actividades de elaboración de Abono Orgánico tipo Bocashi, donde se utilizó la siguiente fórmula:



**Fotografías 33.** Alistamiento de materiales para abono orgánico

- 20 Bultos de estiércol fresco disponible (Vaca).
- 20 Bultos de Rastrojo picado (Residuos de Cosecha).
- 20 Bultos de tierra virgen sin piedras ni terrones (Se reemplaza con Bocashi).
- 6 Bultos de carbón vegetal en partículas pequeñas.
- 1 Bulto de Ceniza de fogón.
- 1 Bulto de Calfos (Otro mineral como harina de rocas).
- 2 Libras de levadura en barra (Se reemplaza por EM Nativo).
- 4 Litros de suero.

- 4 kilos de melaza.
- Agua (Prueba del puño, terrón seco quebradizo +/- 40 a 50% de Humedad).



**Fotografías 34.** Elaboración de Abono tipo Bocashi en Simijaca

En los talleres técnicos participativos los productores estandarizaron una fórmula para la elaboración de abono en la zona, donde se utilizaron materiales fáciles de conseguir y se reemplazó con materiales como ceniza de fogón, Maíz fermentado, suero, y Microorganismos nativos.



**Fotografías 35.** Evaluación participativa de los productores en la producción de Bioinsumos

### Captura de microorganismos para uso en Bioinsumos



**Fotografía 36.** Captura de Microorganismos en zonas Boscosas de Simijaca

El procedimiento que se realizó en la captura de microorganismos nativos con los productores de la zona fue el siguiente:

- Se pesó una libra de arroz y se puso a cocinar en agua hasta que quedó bien espesa, se maceró, se repartió en dos recipientes plásticos (jarra plástica) y se tapó con una muselina (malla mosquitera).
- Posteriormente, se llevó a una zona boscosa de páramo y se enterró a una profundidad de 10 cm. Allí por más 21 días se dejó en reposo y durante ese tiempo de espera, se capturaron una gran cantidad y diversidad microorganismos presentes en el suelo de la zona boscosa de páramo, para ser activados, replicados y utilizados posteriormente en elaboración de abonos.
- Actualmente los productores de Simijaca están utilizando los abonos orgánicos tipo Bocashi en cultivos como Maíz, Papa y algunas hortalizas.

#### **2.1.4. Evaluación de técnicas para producción de Bioles en el municipio de Simijaca, Cundinamarca.**

A través de taller teórico – prácticos, se dieron a conocer técnicas para la producción de Bioles. Con participación activa de los agricultores se realizó actividades contempladas en los protocolos de producción de Bioles, protocolos validados por agricultores Colombianos en la Costa Atlántica y algunas regiones de la zona andina que están vinculados con el trabajo de Mejoramiento Técnico Participativo de la Corporación PBA.



**Fotografía 37.** Evaluación de técnicas para elaboración de Biofertilizantes con productores de Simijaca

El proceso que se realizó con los productores del municipio de Simijaca para la producción de Bioles son las siguientes:

#### **Preparación del Biol, para lo cual es necesario:**

1. Tener el tanque adecuadamente preparado con el dispositivo.
2. Tener agua limpia en cantidad suficiente
3. Vaciar al tanque entre 20 – 40 kg de estiércol fresco.
4. Agregar 4 litros de suero dulce o leche
5. Adicionar 4 litros de melaza
6. Adicionar 4 litros de ME activados y replicados
8. Adicionar 50 g de sal gruesa
9. Adicionar 5 libras de ceniza

10. Completar con agua limpia hasta un nivel dejando una cámara de aire

También se adicionaron al biol, elementos (no de síntesis química), según necesidades específicas, así:

Boro	2.5 kg / 200 litros
Magnesio	3.0 kg / 200 litros
Cobre	450 g / 200 litros
Manganeso	450 g / 200 litros
Roca Fosfórica	7.0 Kg / 200 litros
Potasio	7.0 kg / 200 litros
Cobalto	75 g / 200 litros
Zinc	3.0 kg / 200 litros

Para la utilización de este Biol, se debe colar o filtrar para desechar lo que no es líquido y evitar problemas en equipos de aplicación de este Biofertilizante. Finalmente puede aplicarse a la plantación con bomba de espalda o en el agua de riego. El producto terminado puede permanecer almacenado por 3 a 4 meses aproximadamente.



Fotografía 38. Biofertilizantes productores de Simijaca

**Dosis que se establecieron con los agricultores para los sistemas productivos**

Según literatura consultada, en la aplicación hay que utilizar una parte del Biol puro con cuatro partes de agua, pero con los agricultores de la zona se recomienda utilizar dosis más bajas, así:

*1-3 Litros de Biol por bomba de 20 Litros.*

Los abonos elaborados con los agricultores en los talleres y los tradicionalmente elaborados, son utilizados para la fertilización foliar de los cultivos de la zona como el Maíz con buenos resultados y logrando reducir significativamente los fertilizantes químicos.

### 2.1.5. Evaluación de técnicas para producción de abonos líquidos y Sólidos orgánicos en el municipio de Soracá.

Durante los últimos 4 años los productores de Quinua del municipio de Soracá, Chivata y Siachoque en Boyacá, han venido trabajando en torno al cultivo de Quinua iniciando con un inventario, una recolección, caracterización, multiplicación y selección de los diferentes materiales de quinua presentes en la zona, se diseño e implementó un plan de manejo integrado (M.I.P.E), con controladores biológicos y botánicos.

A nivel biofísico, los suelos de la región están escarpados y degradados a causa de procesos de rocería aplicados para implementar cultivos. Esto ha dificultando la conservación de la humedad y ha ocasionado esterilidad e improductividad en los suelos. Mediante el estudio de suelos se ha detectado la explotación inadecuada, el uso indiscriminado de productos químicos, la baja rentabilidad y calidad de los productos agrícolas, el deterioro de los recursos ambientales como es el proceso degradativo de los suelos. Todos estos factores han incidido en el deterioro de la calidad de vida de la población.

#### Abono Orgánico tipo Bocashi

Se diseñó participativamente un protocolo para la elaboración de Bioinsumos, planillas de seguimiento para la toma de costos de producción y se elaboraron tres mezclas diferentes de abonos sólidos con el fin de evaluar su efectividad en campo frente al cultivo de quínoa y otros cultivos de rotación en la zona. Las cuatro mezclas fueron:


Tabla 34. Mezclas a evaluar

MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3
<b>Bocashi 50%</b>	Gallinaza 50 %	Abono Vacuno 50%
<b>Lombriabono 50%</b>	Calfos 10%	Aplicación de supermagro a la mezcla.
<b>Aplicación de supermagro en aspersión.</b>	Levadura 50 Gramos mezclados con EM 100 ml.	Gallinaza 50%
		Tamo de cebada
		Calfos



Fotografía 39. Elaboración de mezclas de abonos y elaboración y volteo 1er ciclo de Producción.

Cada una de estas mezclas fueron elaboradas siguiendo el mismo proceso de elaboración de abono solido tipo Bocashi, en la actualidad se encuentra en proceso de estandarización por parte de los productores.



RESISTENCIA TÉCNICA AGROPECUARIA  
AGUAS  
SUELOS  
INDUSTRIAS  
CONTROL DE CALIDAD


**Análisis de Control de Calidad**  
No. CCF 13617

EMPRESA: Agropecuaria Seccional Soraca  
DIRECCIÓN: Soraca Parque Principal  
CIUDAD: Soraca - Boyaca  
NIT: 966.110.373-9

IDENTIFICACION: SUPERMAGRO  
DESCRIPCION: Abono Orgánico líquido  
CARACTERISTICAS: Líquido negro

OTROS DATOS: Procedencia: SORACA, BOYACA

Muestra: 20110617  
Preparación: 20110617  
Análisis: 20110626  
Orden de T. #: 44034



RESISTENCIA TÉCNICA AGROPECUARIA  
AGUAS  
SUELOS  
INDUSTRIAS  
CONTROL DE CALIDAD

**Análisis de Control de Calidad**  
No. CCF 13616

EMPRESA: Agropecuaria Seccional Soraca  
DIRECCIÓN: Soraca Parque Principal  
CIUDAD: Soraca - Boyaca  
NIT: 966.110.373-9

DESCRIPCION: Abono Orgánico Sólido  
IDENTIFICACION: BOKASHI  
CARACTERISTICAS: Producto particulado café

OTROS DATOS: Procedencia: SORACA, BOYACA

**REPORTE EN BASE HUMEDA**

CEMENTIDAD # 20%	1.0556 g/ml	METODOS ANALITICOS	
pH en 10%	6.27	LBC 38 Potenciométrica	
C.E. en 1:200	0.18 mS/cm	LBC 41 Potenciométrica	
N TOTAL	2.99 g/L	LBC 41 Potenciométrica	
POTASIO	4.30 g/L	K2O	8.18 g/L
CALCIO	1.50 g/L	CaO	2.10 g/L
MANGANESO	0.43 g/L	MgO	0.71 g/L
FOSFORO	0.33 g/L	PP05	0.50 g/L
AZUFRE	2.40 g/L		
BORO	0.20 g/L		
COBRE	0.46 g/L		
MANGANESO	0.021 g/L		
HIERRO	1.10 g/L		
ZINC	1.10 g/L		
SODIO	0.78 g/L		
C.ORGANICO OXIDABLE TOTAL	25.80 g/L		
PERICLOR	12.80		
SOLIDOS SUSPEND. TOTALES	1.38 g/L		

NOTA: Los elementos reportados son analizados en H2O

Prohíbase la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original y en copia una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el laboratorio y no a otras submuestras de la misma procedencia.

Elkin Darío Matano Reina  
Jefe Control de Calidad; T.P. 9184

**REPORTE EN BASE HUMEDA**

Densidad Aparato Dato	0.950 g/ml	METODOS ANALITICOS	
pH en Pasta Saturada	7.52	LBC 43 Gravimétrica	
C.E. en Extracto Saturación	18.88 mS/cm	LBC 41 Potenciométrica	
HUMEDAD	34.20 % P/P	LBC 30 Gravimétrica	
CENIZAS	67.46 % P/P	LBC 21 Gravimétrica	
Residuo insoluble en agua	44.09 % P/P	LBC 21 Gravimétrica	
C.I.C	23.94 mg/100gr	NTC 5167 Volumétrica	
N TOTAL	0.70 % P/P	Suma de Nitrógenos	
POTASIO TOTAL	0.01 % P/P	K2O Total	1.09 % P/P
CALCIO TOTAL	1.22 % P/P	CaO Total	1.73 % P/P
MANGANESO TOTAL	0.22 % P/P	MgO Total	0.36 % P/P
FOSFORO TOTAL	0.30 % P/P	P205 Total	0.68 % P/P
AZUFRE	0.17 % P/P		
BORO	0.010 % P/P		
COBRE	0.004 % P/P		
MANGANESICO	0.02 % P/P		
HIERRO:	1.80 % P/P		
ZINC	0.011 % P/P		
SODIO	0.052 % P/P		
Carbono Orgánico Oxidable Total	8.34 % P/P		
Rel (C/N)	10.90		
Retención de Humedad	80.92 % P/P		
Pérdidas por Volatilización	18.29 % P/P		

NOTA: Los elementos reportados son analizados en H2O

Prohíbase la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original y en copia una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el laboratorio y no a otras submuestras de la misma procedencia.

Elkin Darío Matano Reina  
Jefe Control de Calidad; T.P. 9184

Fotografías 40. Analisis Bromatologicos supermagro y abono solido tipo Bocashi.

### Biofertilizante SuperMagro

El biofertilizante líquido Supermagro se elabora con Estiércol fresco de Vacas sanas, Melaza o panela derretida, Microorganismos EM o leche/suero, Calfos, harina de rocas o Minerales de Paz del rio, sulfatos de (Zinc, Boro, Manganeseo, Nitrógeno, Hierro, Cobre, Molibdeno), se agrega un sulfato cada 4 días revolviéndolo todos los días en un periodos de 28 días; este biofertilizante permite balancear los nutrientes no presentes en el abono solido y que combina 7 sulfatos de elementos menores y mayores fermentados aeróbicamente, lo cual facilita la absorción por parte de las plantas.



Fotografía 41. Elaboracion de Supermagro en Soracá

De toda la experiencia desarrollada durante los últimos años, con el desarrollo del proyecto, en la parte de producción, manejo y aplicación de abonos orgánicos en el cultivo de Quínoa sobresalen los siguientes logros:

- Los abonos Orgánicos además de nutrir los cultivos, nos recupera y reactiva la vida en el suelo, fortalece las plantas frente al ataque de plagas y enfermedades.
- Contar con una análisis Bromatológico de los abonos, nos permite conocer la composición nutricional y mejorar el proceso en la elaboración de Abonos.
- Contamos con abonos que permiten la diversificación de materiales y materias primas, permitiéndonos generar nuevas y mejores fórmulas de bioabonos.
- Bajar costos de producción y obtener productos con mayores valores nutricionales y orgánicos.
- Bajos costos para su elaboración (por aprovechar algunos desechos de la finca).
- Confianza del consumidor al comprar productos de quinoa fertilizados con abonos orgánicos.

### 2.1.6. Propagación de micorrizas en Saboyá por medio de técnicas caseras ajustadas a las condiciones de la zona.

#### Preparación y desinfección del sustrato

Se realizaron ensayos con tres tipos de sustrato, sugeridos por los agricultores, primero con solo suelo, segundo con suelo - arena pasada por tamiz de 5 mm - cascarilla (en proporciones iguales) y el tercero con suelo - arena pasada por malla de 2 mm. Se concluyó que en el primer ensayo se tenía una colonización de raíces de 85% a 100%

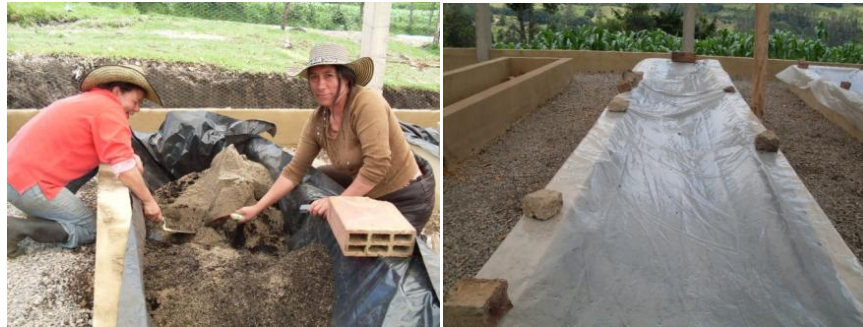
Sin embargo se encontró dificultad en conseguir el suelo sin cultivar, la espera para solarizar una alta cantidad de suelo (480 kg por cada cajón) y en épocas lluviosas el espacio necesario para exponerlo al sol sin que se humedezca demasiado. En el segundo ensayo, incluyendo cascarilla, se obtuvo una colonización promedio de 82%, sin embargo es un sustrato que no retiene humedad, se deseca rápidamente, es difícil conseguir la cascarilla quemada en la zona (para reducir presencia de patógenos) y tiene los menores valores de colonización. El tercer ensayo fue el seleccionado, ya que retiene bien el agua, no demanda mucho espacio y sus porcentajes de colonización están por encima del 90%.

De esta forma, el sustrato que se utilizó fue una mezcla de mitad suelo (preferiblemente suelo virgen) y mitad arena lavada de río, pasados por una malla o zaranda con orificios de 2 milímetros y medidas de 1 metro x 50 centímetros, descartando restos de plantas, raíces, piedras y terrones; dejando partículas finas, para un mejor desarrollo de las micorrizas.



Fotografías 42. Tamizado y preparación de suelo para solarización.

Para reducir la cantidad de microorganismos patógenos en el sustrato se realizó una solarización al suelo antes de mezclar con la arena, en un sitio abierto en donde se recibiera sol directo. Para esto se ubicó el suelo sobre un plástico preferiblemente transparente (calibre 8), dejando una capa de suelo de 10 a 15 cm de altura y un metro de ancho, el largo depende de la cantidad a utilizar. Se Agregó agua con regadera hasta dejarlo levemente húmedo y se envolvió en el plástico dejándolo bien cerrado para evitar la entrada de agua y aire.



**Fotografías 43.** Preparación y desinfección del sustrato para multiplicación de micorrizas en plantas trampa.

En un período de 15 a 20 días después de poner a solarizar el suelo, se dejó secar y se mezcló con la arena (pasada por la malla o zaranda) en cantidades iguales (proporción 1 a 1 en volumen) dentro de los cajones de ladrillo.

Estando el sustrato en los cajones o en bolsas se procedió a complementar la desinfección con una mezcla de yodo agrícola y extracto de ruda, estos productos se aplicaron con fumigadora y equipo de protección, en chorrillo al suelo (drench) hasta dejar el sustrato a capacidad de campo para reducir patógenos como nematodos, hongos y bacterias.

### Tratamiento de semillas de plantas trampa

Las plantas trampa son plantas en donde se multiplicaran rápidamente las micorrizas. Primero se deben seleccionar semillas de maíz uniformes en tamaño, luego desinfectarlas así:

PLANTA	DESINFECTANTE	DURACIÓN DEL REMOJO	ENJUAGUES CON AGUA
Maíz	9 partes de agua + 1 parte de cloro	45 minutos	3
Rye grass	Mitad cloro, mitad agua	5 minutos	3
Frijol y arveja	99 partes de agua + 1 parte de cloro	15 minutos	5

**Después de desinfectar:** Dejar las semillas de maíz sobre papel absorbente húmedo por 5-8 días para estimular germinación.



**1. Remojo**



**2. enjuague**



**3. Germinación**

**Fotografías 44.** Protocolo de desinfección de semillas.



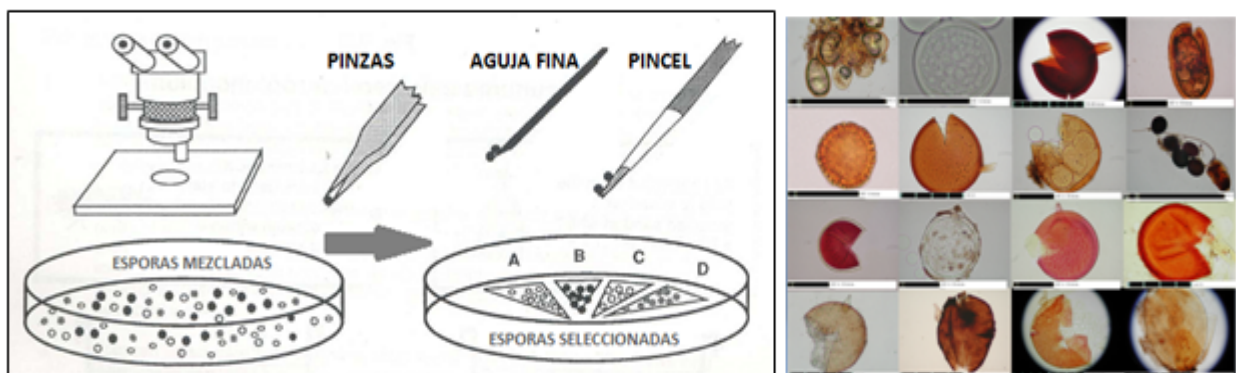
## Aplicación del inóculo

Se puede hacer de dos formas, dependiendo el material con que se cuente, la primera puede ser con esporas aisladas del suelo y la segunda por medio de suelo mezclado con micorizas en donde se encuentran sus estructuras (esporas, micelio o hifas y raíces colonizadas por micorizas).

### 1. Inoculación por medio de esporas aisladas del suelo.

Este procedimiento se realiza en dos fases, una en laboratorio y otra en campo.

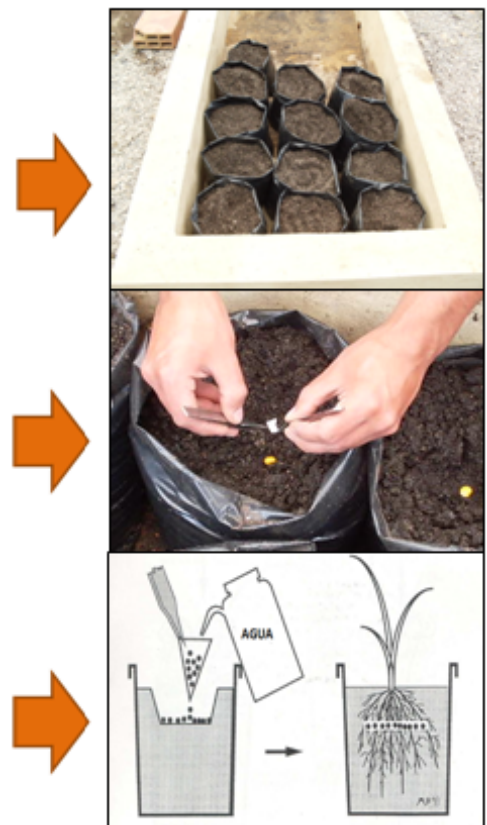
**a) En laboratorio:** Previamente se extraen del suelo las esporas de micorizas y se ubican sobre trozos de papel, que están dentro de cajas de vidrio planas (llamadas cajas de Petri). Por medio de instrumentos como microscopio, pinzas o pinzas de punta fina se seleccionan las esporas que se presenten en mayores cantidades y que estén presentes frecuentemente en el suelo.



Fotografías 45. Separación de esporas en laboratorio

### b) En campo:

- Primero se toman bolsas plásticas color negro de 30 x 40 cm y se llenan con la mezcla de suelo ya solarizado + arena en proporciones iguales (en volumen 50% suelo y 50% arena).
- Luego se desinfecta el sustrato (suelo + arena) de acuerdo a lo visto anteriormente (con extracto de ruda y yodo agrícola).
- Se cubren con plástico transparente, se dejan drenar y reposar por 15 días.
- Después en cada bolsa se abre un hueco y se ponen 2 semillas ya germinadas, con una raíz de más de 5 milímetros.
- Por cada bolsa, se toma con pinzas un trozo de papel que contiene esporas.
- Se dejan caer unas gotas de agua sobre el papel para desprender las esporas, directamente sobre la raíz y cubrir las semillas con suelo.



Fotografías 46. Aplicación de esporas en campo.

## 2. Inoculación por medio de suelo micorrizado.

- Este procedimiento se realiza dentro de los cajones de madera o ladrillo que deben estar cubiertos por plástico negro (calibre 8).
- Llenar el cajón con la mezcla de sustrato hasta una altura de 25 a 30 centímetros, se desinfecta (ver sección desinfección de sustrato), se cubre y se deja en reposo por 15 días.
- Cuadricular cada 15 cm y en cada punto hacer un agujero y abonar con compost, bokashi o humus.
- Agregar 20 gramos del inóculo de micorrizas elaborado el ciclo anterior (suelo + esporas + raíces picadas) al fondo del agujero.
- Luego sembrar 5 semillas de pasto Rye grass, o 2 semillas de maíz, arveja o fríjol ya desinfectadas por cada agujero.
- Cubrir las semillas con suelo.



**Fotografías 47.** Aplicación de inóculo comercial de micorrizas esporas para plantas trampa.

## Mantenimiento del cultivo trampa

- Se recomienda abonar con Compost, Bokashi o humus al momento de la siembra con 50 o 100 gramos.
- Se puede complementar la nutrición de las plantas con bio-fertilizantes líquidos (Bioles), aplicados al follaje.
- Se debe mantener la humedad constante durante todo el ciclo.
- Hacer un monitoreo constante del estado de las plantas trampa
- Se recomienda hacer manejo de plagas y/o enfermedades de forma preventiva, mecánica o cultural.
- Evitar al máximo la aplicación de pesticidas de origen químico.
- No hay que preocuparse por qué las plantas trampa no crezcan mucho, lo importante es un buen desarrollo de raíces.



**Fotografía 48.** Aplicación de solución nutritiva a plantas trampa de maíz

## Cosecha

A los cuatro meses se suspendió el riego por espacio de 15 a 20 días con el fin de inducir la esporulación de las micorrizas. Se podaron las plantas a ras de suelo. Se cortaron las raíces en

pequeños trozos para luego realizar una mezcla con el suelo de la bolsa. El inoculo obtenido se puede conservar en el refrigerador hasta por seis meses.



**Fotografías 49.** Cosecha y empaque de suelo micorrizado.

Se realizaron ensayos con gramíneas y leguminosas, encontrándose como mejores alternativas el maíz, la arveja y el frijol, cada uno con porcentajes de colonización de raíces mayores al 80%. Este proceso se realiza de forma escalonada gracias a la disponibilidad de cajones en la planta, de esta forma se están cosechando suelos con micorrizas cada 3 meses.



**Fotografías 50.** Plantas de pasto Rye grass, frijol, arveja y maíz en camas de producción de micorrizas.

**Objetivo específico 4.** Diseñar e implementar plantas piloto ajustadas a las condiciones locales para la producción de Bioinsumos.

#### **Actividad 4.1 Implementación de una planta piloto de producción Bioinsumos**

##### **Introducción**

En la región agrícola de la zona Cundiboyacense se encuentran cultivos comerciales de papa, zanahoria, frijol y hortalizas, generalmente, con un manejo convencional caracterizado por un amplio uso de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades, y una alta dependencia de abonos químicos que genera unos altos costos de producción, acides y muerte de los microorganismos del suelo.

Numerosos investigadores han reconocido efectos beneficiosos en la aplicación de la materia orgánica en el suelo, en cuanto a las mejoras observadas con respecto a las características químicas, físicas y biológicas del mismo. La materia orgánica forma parte del ciclo del nitrógeno, del azufre y del fósforo, contribuye a la asimilación de nutrientes, mejora la estructura y la retención de agua del suelo y da soporte a todo un mundo de microorganismos cuya actividad resulta beneficiosa para el cultivo.

Para recuperar progresivamente estos suelos agrícolas y disminuir la dependencia de los abonos químicos para la producción de cultivos, se adecuaron espacio para la producción de abonos orgánicos en esta zona; aprovechando la experiencia de algunos como productores de abono, algunos los materiales locales de origen animal (residuos orgánicos de los firográficos municipales) y como fuente vegetal varios residuos de cosecha.

##### **4.1.1. Acondicionamiento de un espacio para establecer procesos de innovación en la producción y uso de Abono tipo Bocashi y abonos líquidos en Ventaquemada**

Se realizaron visitas a plantas de producción de abono orgánico a nivel local con agricultores de Ventaquemada, para observar el tamaño de estas plantas, la cantidad de producción de abono, materiales y tamaño de la estructura de la planta, características técnicas de temperatura, aireación, pendiente, condiciones del piso, desagües etc., con lo cual se buscó escoger un diseño de planta, de bajo costo que se pueda ajustar a las condiciones locales de fabricación del abono orgánico tipo Bocashi en Ventaquemada. Diseño de planta que busca remplazar el espacio rústico de condiciones no deseables donde habitualmente se elaboraba el abono.

Con el acompañamiento de personal técnico especializado y participación de los agricultores, se evaluaron diferentes propuestas de diseño, presupuestos y características técnicas para plantas de producción de abono orgánico y abonos líquidos.

Se escogió una propuesta de diseño de planta, ajustada a las condiciones locales y necesidades de los agricultores. La propuesta se ejecutó con el aporte económico del proyecto de Bioinsumos Fontagro, además de aporte económico y de mano de obra de los propios agricultores.

##### **Resultados**

Se mejoró el espacio para la producción de abonos orgánicos tipo Bocashi y abonos líquidos tipo Biol, con el aporte económico y acompañamiento técnico del presente proyecto y el aporte económico y de mano de obra de los propios agricultores.

**Seguimiento fotográfico de las actividades realizadas para la adecuación de espacios para procesos de innovación en la producción de abonos orgánicos en Ventaquemada.**

1. Selección del sitio para el acondicionamiento de un espacio para la innovación en el procesamiento y uso de abonos.



**Fotografía 51.** Selección participativa del sitio

La selección del lote se realizó en compañía de los agricultores para el acondicionamiento de la planta con el concepto favorable de un funcionario del Instituto Colombiano de desarrollo Agropecuario ICA.

2. Trabajos de explanación para el acondicionamiento del espacio de la planta.



**Fotografías 52.** Sitio y trazado de ejes para la adecuación del espacio

Con los agricultores se realizó la medición del área y trazado de los ejes por donde se instalarían las bases estructurales de la planta.

### 3. Llegada de materiales al sitio



**Fotografías 53.** Explanación y llegada de los primeros materiales al sitio

### 4. Fundición de bases y montaje de las columnas para el acondicionamiento del espacio de procesamiento de abonos.



**Fotografías 54.** Columnas de la planta

### 5. Espacio acondicionado para los procesos de innovación en la producción de abonos tipo Bocashi.



**Fotografías 55.** Vista general de la planta

En la vista general de la planta, se aprecian los módulos estructurales para procesamiento de material.

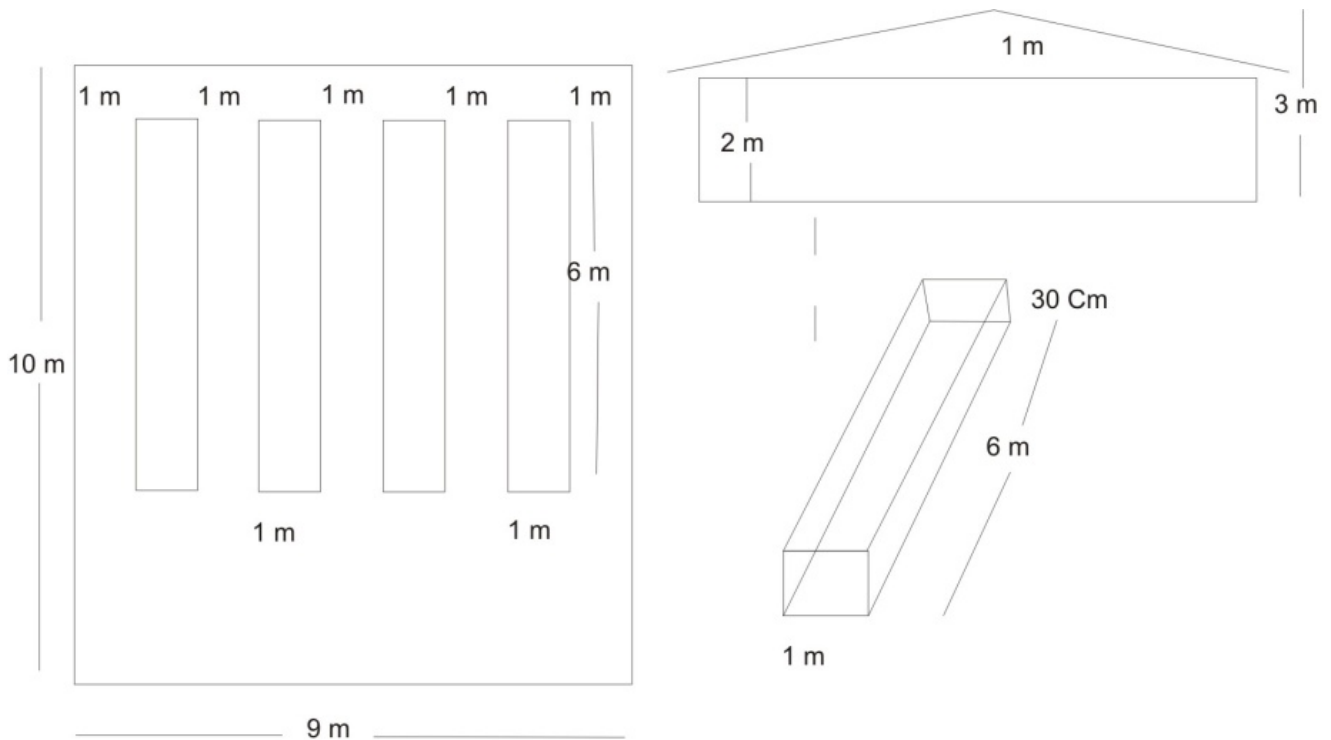
Debido a la alta producción de abono orgánico sólido por parte de los productores de Ventaquemada, optaron por realizar una ampliación de madera y plástico, con recursos de los agricultores, para incrementar y facilitar el proceso de producción.



**Fotografías 56.** Ampliación de espacio para producción de abono orgánico y Productores del grupo de trabajo Orgánicos & Asociados de Ventaquemada, conformados a partir de la ejecución del proyecto.

#### **4.1.2. Acondicionamiento de un espacio para la innovación en la producción de Micorrizas en el municipio de Saboya, Boyacá.**

Con la participación de los agricultores, se evaluaron dos propuestas de diseño, presupuestos y características técnicas para plantas de producción de micorrizas.



**Figura 23.** Diseño básico para el acondicionamiento de un espacio para la producción de Micorrizas en Saboya.

## Resultados

Se escogió un diseño de planta de micorrizas, ajustada a las condiciones locales y necesidades de los agricultores de Saboya. Además, se discutió con los asociados las cotizaciones presentadas por dos constructores y se escogió la mejor propuesta. El seguimiento de la adecuación del espacio para la producción de Micorrizas fue realizado por parte de los productores de la asociación y por el acompañamiento técnico del presente proyecto.

## Seguimiento fotográfico de las actividades realizadas en la adecuación del espacio para la producción de Micorrizas

Adecuación del terreno y Llegada de materiales





Montaje de bases y camas



Instalación de cubierta con madera y teja plástica



Vista Frontal y lateral del espacio acondicionado



**Fotografías 57.** Seguimiento a la adecuación del espacio para la producción de Abono Micorrizas.

Se adecuó un espacio para facilitar la producción de hongos benéficos MICORRIZA, donde se evaluaron varias cepas y especies hospederas de la zona de manera participativa con los productores de la zona y el acompañamiento técnico del presente proyecto. Esta adecuación se realizó con un aporte económico del proyecto y la mano de obra de los productores.



**Fotografías 58.** Elaboración de sustratos y producción de Hongo MICORRIZA por parte de los productores de Saboya.

### 4.1.3. Acondicionamiento de un espacio para la innovación en la producción de Abonos orgánicos en Soracá

#### Metodología

Mediante la reunión constante con los productores y a través del comité directivo de la organización se evaluaron diferentes propuestas de diseño, presupuestos, materiales y características técnicas para la adecuación de la primera planta de producción de Bioinsumos (Lombriabono, Supermagro, Caldos Minerales, Purines, Hidrolatos, Abono Orgánico tipo Bocashi y producción de hongo Micorriza) en la zona.

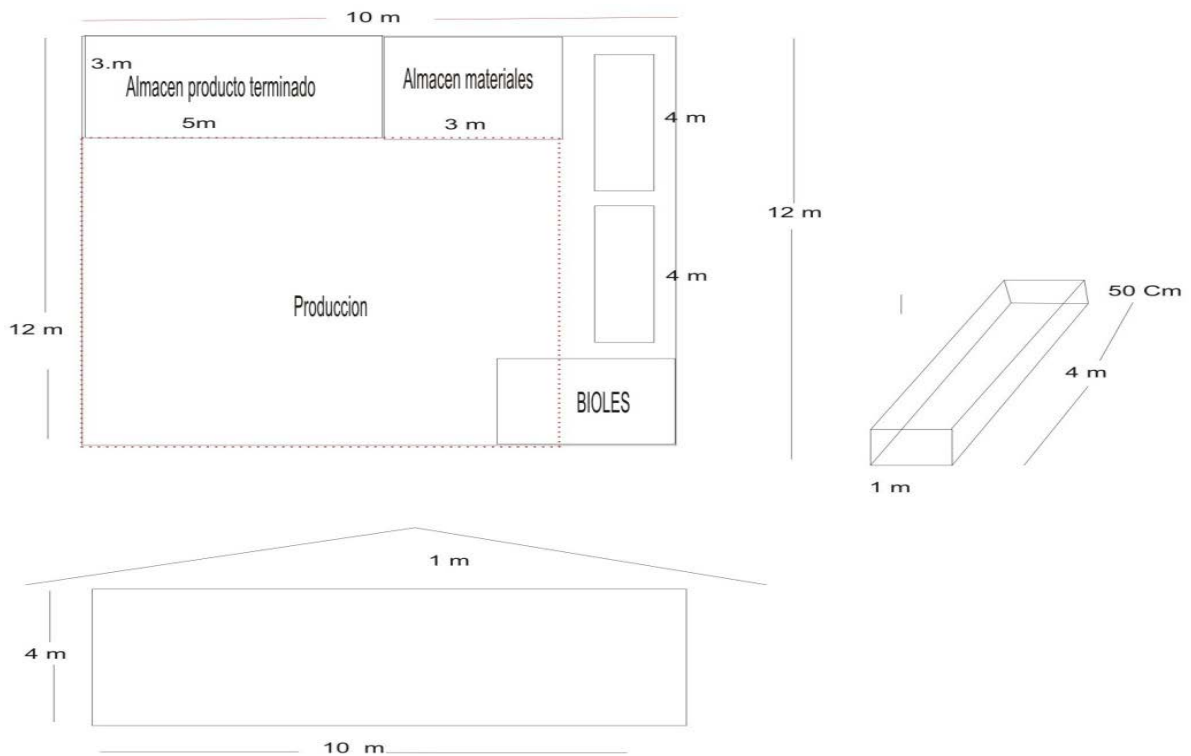


Figura 24. Diseño básico en la adecuación del espacio para la producción de Abonos orgánicos en Soracá.

#### Resultados



Fotografía 59. Multiplicación de Hongo MICORRIZA por parte de los productores de Soracá

Se llegó a un consenso general en el diseño, materiales, distribución de espacios y persona idónea con experiencia para la adecuación del espacio; se ajustó el diseño inicial para la producción, a pequeña escala, del hongo Micorriza. Como la organización no cuenta con lote propio se escogió participativamente un predio donde se establece conjuntamente un comodato a 7 años, lote donde actualmente se elaboran los Bioinsumos. Los aportes para la adecuación del espacio fue del proyecto y cada productor aportó tres días laborales y algunos materiales e insumos; la planta cuenta con un área de producción de 120 m<sup>2</sup>.



**Fotografías 60.** Imágenes en la Adecuación del espacio para producción de Bioinsumos en Soracá

#### **4.1.4. Implementación de una Bodega de almacenamiento y producción de Abonos orgánicos líquidos en Simijaca**

Con la participación de los productores, se evidenció la necesidad de disponer y ajustar un sitio para el almacenamiento de los Bioinsumos líquidos que se venían desarrollando en la zona para la utilización en los diferentes cultivos, por ello se seleccionó participativamente un espacio para adecuar el sitio de almacenamiento para los Bioinsumos, y queden de fácil disposición para los productores beneficiados.

#### **Actividades en la adecuación del espacio para el almacenamiento de Bioinsumos líquidos**



**Fotografías 61.** Actividades en la Adecuación de Bodega para Bioinsumos en Simijaca

Esta actividad se ejecutó con recursos del proyecto y con la mano de obra aportada por parte de la Asociación de Productores Agroforestales de Simijaca y Susa, donde se elaboró un diseño básico participativo que satisficiera la necesidad de almacenar Bioinsumos como Biofertilizante líquido, Microorganismos benéficos nativos, Caldos Minerales, Biofungicidas, Bioplaguicidas y algunos estimuladores biológicos.

## **Actividad 4.2. Establecimiento de procesos y costos de producción de Bioinsumos.**

### **Introducción.**

El abono Bocashi proviene de una tecnología tradicional japonesa, es un abono casero muy seguro y eficiente que contiene, todos los elementos necesarios y muchos microorganismos benéficos. Este abono ha sido experimentado por muchos agricultores de Colombia y Latinoamérica. En cada lugar varía la forma de preparar los Bioinsumos y los ingredientes a usarse, resultado de la prueba-error y el conocimiento tradicional de los campesinos.

Numerosos investigadores han reconocido efectos beneficiosos de los abonos orgánicos en el suelo y al medio ambiente, en cuanto a las mejoras observadas con respecto a las características químicas, físicas, biológicas y disminución en la carga de contaminación de los productos agrícolas y ecosistemas donde se producen. Las ventajas que los agricultores experimentan con la fabricación de los Bioinsumos son:

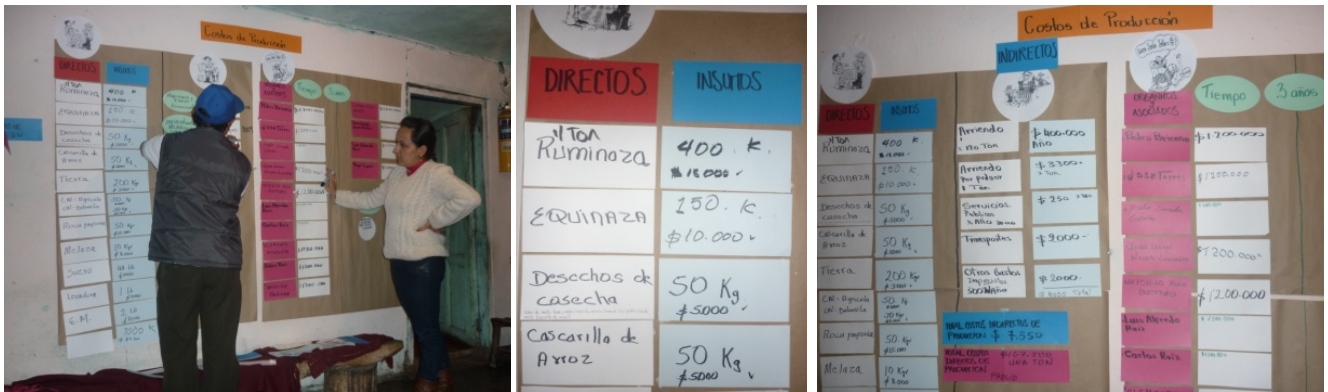
- Materiales baratos y fáciles de conseguir (independencia).
- Fáciles de hacer y guardar (apropiación tecnológica por los agricultores).

- Costos bajos, comparados con los precios de los insumos químicos.
- Eliminan factores de riesgos para la salud de los trabajadores agrícolas.
- No contaminan el medio ambiente.
- Respetan la fauna y la flora.
- Los bioinsumos, en general, son más completos, al incorporar a los suelos los macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento vigoroso de las plantas.

#### 4.2.1. Establecimiento de procesos y costos de producción del abono Bocashi en el municipio de Ventaquemada.

### Metodología

Atraves de talleres participativos con los productores en la evaluación de costos de producción se identificaron variables que podrían ser ajustadas para el mejoramiento del proceso de producción del abono orgánico elaborado en la zona, donde se reemplazaron materiales más económicos e implementaron técnicas que redujera costos de mano de obra, esta última, tiene una alta participación en los costos de producción de abono orgánico



Fotografías 62. Evaluación de costos de producción para identificar variables por modificar

### Manejo de Propiedades físicas del Abono

En el proceso del compostaje la aireación juega un papel fundamental en la óptima descomposición de los materiales empleados. Uno de los métodos más utilizados para la aireación es el volteo manual que presenta como dificultad gran demanda de mano de obra lo que representa un aumento en los costos de producción, según Restrepo, partiendo del principio de que los materiales se encuentren en el lugar de trabajo se emplea aproximadamente 20 horas de trabajo para elaborar tres toneladas de abono.

Realizando un análisis participativo en los costos de producción de abono se evidenció un alto costo en la mano de obra para realizar el volteo del abono, por ello determinaron soluciones tecnológicas de bajo costos para optimizar el proceso de producción de abono, como la implementación de túneles de aireación en las pilas de abono.



**Fotografías 63.** Trabajo participativo con túneles para aireación en pilas de Abono

Para la adecuación de los túneles de ventilación en madera, forma de trapecio, se tuvieron en cuenta las siguientes dimensiones: 4 m de longitud, 0.50 m de ancho y 0,60 m de altura, con aberturas laterales y superior para aireación de la masa del abono



**Fotografías 64.** Evaluación con productores de Ventaquemada en pilas de Abono Orgánico para reducción de mano de obra en costos de producción

A partir de los resultados observados y evaluados por parte de los agricultores se ha podido regular la temperatura con la implementación de estos túneles en las pilas de abono, evitando altas temperaturas que nos afecten el proceso de fermentación en el abono, las temperaturas han oscilado entre los 37° y 45° C. Cuando la temperatura sobrepasa los 50° C se realiza un volteo para regularla y se han tenido problemas con el exceso de humedad en la pila, pero aun así, hasta el momento se logró reducir en la evaluación un 76% en costos de mano de obra para producción de abono.

#### **4.2.2. Establecimiento de procesos y costos de producción del abono Bocashi en el municipio de Fómeque.**

A partir de un procedimiento estandarizado de producción de abono adoptado por los agricultores de Fómeque, se realizó un análisis de los costos de producción del abono en forma tradicional teniendo en cuenta el costo de materias primas, transporte y mano de obra.

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó una mejora tecnológica en la forma de producción del abono mediante el uso de una máquina picadora moledora, adaptada a las necesidades de producción de la planta de abono en Fómeque.

## Resultados

Participativamente se evaluaron los costos de producción del abono, con la tecnología y mano de obra acostumbrada, así:

**Tabla 35.** Análisis económico del Abono Fόμεque.

Rubro	Valor \$	Participación %
Costos materiales e insumos:	\$452.000	50%
Empaques:	\$74.000	8%
Mano de Obra	\$343.000	38%
Transporte	\$ 20.0000	2%
<b>Total</b>	<b>\$900,226</b>	<b>100%</b>

Con este análisis se aprecia que la participación de mano de obra es alta, y que una de las actividades que mas requiere mano de obra -fuera de los volteos-, es la actividad de picado del material y empaque.



**Fotografías 65.** Análisis económico participativo del costo de materiales y costo de mano de obra

## Implementación de una máquina picadora

Con participación de los agricultores, se escogió un diseño de maquina picadora moledora, con una capacidad apropiada a las condiciones locales de producción y el tipo de materiales a manejar.



**Fotografía 66.** Procedimiento tradicional para el picado del material vegetal utilizado para el abono.



**Fotografías 67.** Picado del material vegetal inicial y molido del abono terminado con la máquina.

Con la implementación de la maquina picadora se facilitó la homogeneidad de las materias primas que se aplican al momento de elaborar el abono, materiales que es necesario picar. Además se logró sacar un abono de mejores condiciones, ya que cuando se empaca el abono se pasa por la picadora para que nos queden partículas pequeñas y no quede abono que no se puede aprovechar eficientemente cuando existe presencia de partículas grandes.

#### **4.2.3. Establecimiento de procesos y costos de producción del abono Bocashi en el municipio de Soracá.**

Para la producción de insumos en las diferentes fincas de los pequeños productores de quinua, se realizaron varios ejercicios para el levantamiento de costos de producción de insumos. Los costos de producción de una tonelada de abono solido tipo Bocashi eran de 500,000 pesos los valores más altos eran la mano de obra de la preparación y volteo, el picado del tamo de quinua, el empackado; eso significaba que el costo de venta al consumidor final se encontraba en un valor de \$ 25,000 por bulto de 50 kg, los cual no permitía la competitividad del abono frente a otros Abonos Orgánicos presentes en la zona con valores entre 13,0000 y 15,0000 pesos por bulto de 50KG.

Posterior a la adquisición del molino picador los costos bajaron un poco y mejoró el tamaño de la granulometría del abono solido. Igualmente producto de las diferentes experiencias ganadas del proceso de preparación del abono, más el aprendizaje de los diferentes encuentros con otros productores de otros municipios y departamentos así como con Algunos expertos del tema, se redujeron el numero de volteos en la preparación del abono pasando de 12 volteos a 6 durante todo el proceso de fabricación del abono. Se bajaron los costos de producción a \$ 200,000/tonelada, para un costo a consumidor final entre 12,000 a 14,000.



**Fotografías 68.** Mejoramiento en el proceso de producción de Abono solido Tipo Bocashi.



#### 4.2.4. Establecimiento de procesos y costos de producción del abono Bocashi en el municipio de Granada.

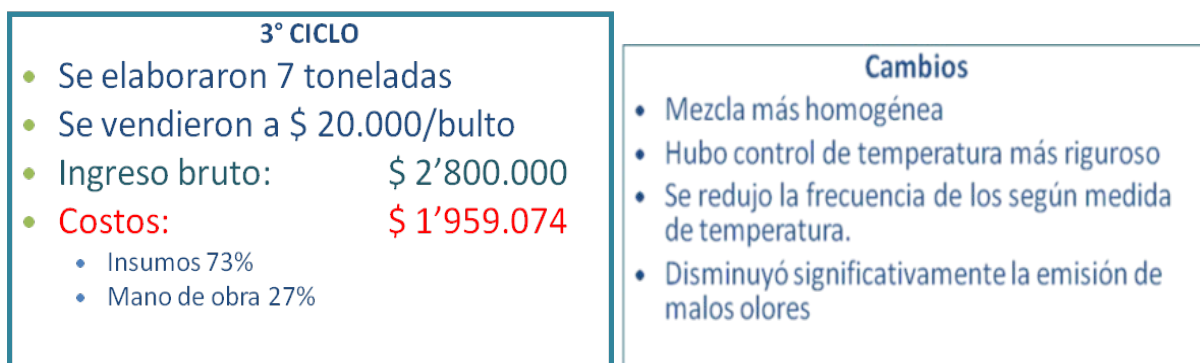
Se realizaron 3 ciclos de producción en donde se generó la experiencia suficiente para que se realizaran mejoras en el proceso llevando a mejorar la eficiencia, las características físicas y el aporte nutricional del abono. Adicionalmente se mejoró la rentabilidad y se ha podido obtener en el último ciclo una base para compra de materiales y hacer auto-sostenible la planta de abonos, de esta forma se está iniciando un nuevo lote con base en las ganancias obtenidas en el lote N° 3.

**Tabla 36.** Materiales utilizados durante el proceso de elaboración de Bocashi en Granada, **Cuadro azul:** Materiales con buenos resultados / **Cuadro rojo:** Materiales descartados por sus escasos beneficios o dificultad de conseguir.

<p><b>Formula final:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porquinaza</li> <li>• Gallinaza</li> <li>• Rumen (sistema digestivo ganado)</li> <li>• Roca fosfórica</li> <li>• Levadura</li> <li>• Concentrado para terneros</li> <li>• Melaza</li> <li>• Microorganismos Eficientes (EM)</li> <li>• Residuos de sustrato para Champiñón</li> </ul>	<p><b>Se ensayó con:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tallos de papa criolla</li> <li>• Viruta de madera</li> <li>• Estiércol fresco de res</li> <li>• Cal</li> <li>• Carbón vegetal</li> <li>• Suelo</li> <li>• Hojas y ramas de eucalipto</li> </ul>
---	--

Las diferentes sesiones de capacitación a los asociados de ASOAGRA Y CRIOLLA ORO en la preparación de Bocashi y de abonos líquidos, se llevaron a cabo para la evaluación de diferentes materiales e insumos utilizados en la preparación, además para establecer un comité de abonos para organizar la participación, estimar costos de producción, rentabilidad y unificar el proceso de elaboración.

<p><b>1° CICLO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se elaboraron 10 toneladas</li> <li>• Se vendieron a \$8.000/bulto</li> <li>• <b>Ingreso bruto: \$ 2'000.000</b></li> <li>• <b>Costos: \$ 2'016.347</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insumos 78%</li> <li>• Mano de obra 22%</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bultos 38 Kg</li> <li>• Sin zarandear</li> <li>• Empaque en fibra</li> <li>• Zarandeo manual</li> <li>• <b>Pérdida de \$ 16.347</b></li> </ul>
<p><b>2° CICLO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se elaboraron 5.9 toneladas</li> <li>• Se vendieron a \$18.500/bulto</li> <li>• <b>Ingreso bruto \$ 2'164.500</b></li> <li>• <b>Costos: \$ 2'115.200</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insumos 76%</li> <li>• Mano de obra 24%</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bultos 50 kg</li> <li>• Cernido</li> <li>• Empaque en bolsa de polietileno y fibra</li> <li>• Zarandeo manual</li> <li>• <b>Ganancia de \$ 49.300</b></li> </ul>



**Figura 25.** Evaluación del proceso en la producción de Abono Orgánico por parte de productores del Municipio de Granada.

Gracias a la experiencia acumulada en el proceso se identificaron aspectos relevantes en la producción, en los que se han tomado medidas para mejorar.

En la Figura 25 se puede observar que cada vez va aumentando el uso de mano de obra, para lo cual se implementó el uso de máquina moladora. De forma complementaria se adquirió un molinopicador para obtener un abono más homogéneo en las características físicas, con mejor presentación y con bajos costos de producción ya que la maquina facilita el proceso de selección de acuerdo al tamaño de partícula, labor que antes se realizaba manualmente acarreado mayores gastos en mano de obra. Así el zarandeado manual alcanzaba para que entre tres personas obtuvieran 250 kg/día de abono procesado, con la máquina se alcanza a moler y empacar por parte de dos personas hasta 1 ton/día.



**Fotografías 69.** Preparación, molienda y empaque del tercer lote de abono Bocashi

Como ventajas de este proceso se tiene:

- Participación activa de los asociados de CRIOLLA ORO y ASOAGRA en:
  - Mezcla de componentes, volteos y empaque
- Se logró mejorar la calidad FÍSICA del producto
- Se integró a la comunidad en torno a esta labor
- Se adquirió experiencia y conocimiento de los beneficios del proceso
- Se fomentó el trabajo en equipo

### **Logros: Mejoramiento de los procesos con la adquisición de maquinas picadoras**

- Estandarización de mezclas, materiales, tiempos y costos de producción por cada lote de producción.

- Contar con un molino picador eficiente y de fácil manipulación, que nos permitirá mejorar en tiempo, costos y calidad de nuestros productos.



**Fotografía 70.** Empaque de Bocashi por parte de agricultores, molido con maquinas picadoras.

**Objetivo específico 5:** Evaluar participativamente con pequeños horticultores a pequeña escala el uso potencial de los Bioinsumos desarrollados.

### **Actividad 5.1. Evaluar participativamente los Bioinsumos desarrollados.**

#### **5.1.1. Evaluar participativamente bacterias solubilizadoras de fosforo en el cultivo de Papa en Ventaquemada.**

#### **Metodología**

Para la evaluación en campo se tomaron tres bacterias solubilizadoras de fosforo del estudio en laboratorio que fueron (006, 059 y la 064), las cuales presentaron mejor capacidad de solubilización de fosforo y arrojaron las mejores respuestas en el ensayo de invernadero.

Las bacterias mencionadas se cultivaron en caldo nutritivo, un medio líquido que les proporciona todos los nutrientes, se dejaron crecer por 7 días y posteriormente se replicaron en medio Pikovskaya sin agar por 10 días, se determinó una concentración de  $10^9$ , las bacterias se cultivaron cada una de forma individual y mezclándolas, posteriormente fueron llevadas a campo.

**Tabla 37.** Tratamientos utilizados en campo

<b>Tratamientos</b>
T1 = bacteria 006
T2 = bacteria 012
T3 = bacteria 064
T4 = mezcla (006-012)
T5 = mezcla (006-064)
T6 = mezcla (012-064)
T7= mezcla (006-012-064)
T8 = control sin bacteria

La siembra se llevó a cabo el 28 de septiembre de 2010, la variedad que se sembró fue D- Capiro. Las parcelas se distribuyeron completamente al azar. Cada unidad experimental es un surco con 10 plantas a las cuales se les evaluara el porcentaje de germinación, el crecimiento mensual, peso seco y fresco de los tejidos vegetales a los 20, 50, 80 y 120 días después de la siembra. Para estas evaluaciones se tomas tres para cada muestreo, los muestreo de análisis foliar son destructivos.

En este núcleo se evaluó la utilización de microorganismos para solubilización de Fosforo presente en el suelo y fuese absorbido fácilmente por las raíces de las plantas. Estos microorganismos fueron evaluados previamente en invernadero donde se seleccionaron las bacterias que presentaron mejores resultados.

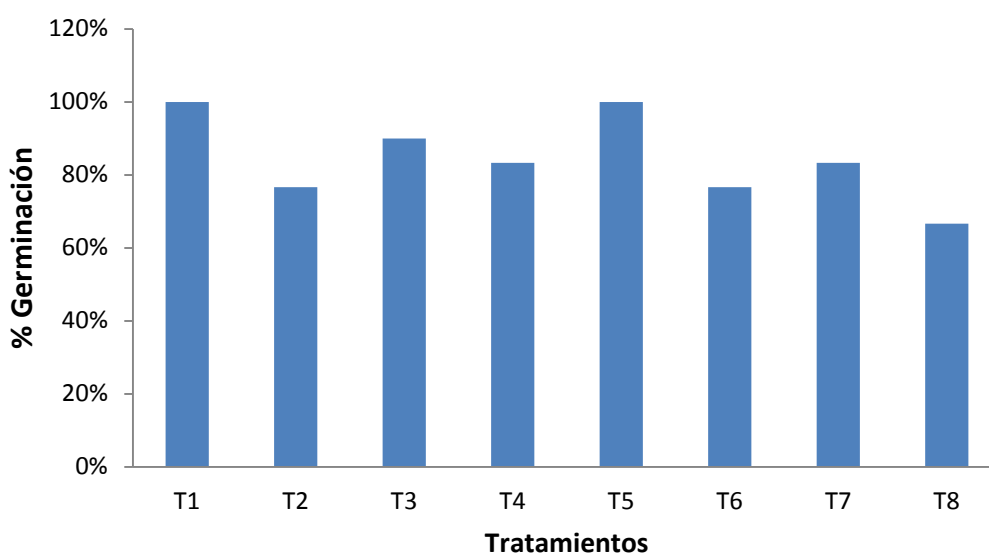
#### **Resultados**

Dentro de este núcleo investigativo, se realizó un taller de esterilización de sustratos con los productores de Orgánicos & Asociados donde se utilizaron los siguientes materiales: 2 canecas metálicas con tapa, Abono Bocashi y termómetro. El objetivo del taller fue utilizar el abono Bocashi como vehículo de las bacterias al momento de inocularlo para llevarlo a campo, por lo que es necesario eliminar la mayor cantidad de microorganismos que posee el abono Bocashi, a esterilizar, para permitir un adecuado crecimiento de la bacteria en el sustrato y no se genere competencia entre los microorganismos; para inocularlo posteriormente al lote principal de Abono.



**Fotografías 71.** Inoculación directa de Bacterias al momento de la siembra en el cultivo de Papa.

### Evaluación del Porcentaje de Germinación en el NIP con Bacterias solubilizadoras de fósforo



**Figura 26.** % Germinación de plantas de papa inoculadas con diferentes bacterias.

Se observa el porcentaje de germinación de plantas de papa a los 20 días después de la siembra, para esta variable los mejores resultados los presentó la bacteria 006 y el polinoculo 006-064, con el 100% de germinación, mientras que el tratamiento sin bacteria tiene una germinación de 67%, la bacteria 012 presentó el porcentaje más bajo de germinación del 77% al igual que la mezcla 012-064, esto puede deberse a que la bacteria 006 es una de las más eficientes solubilizadoras de fósforo del estudio y la eficiencia de la bacteria 012 es menor.

### Evaluación de la Altura en plantas de los NIP's con Bacterias solubilizadoras de P

En la evaluación del incremento en la altura de las plantas durante todo el ciclo en cada uno de los tratamientos, se puede observar el tratamiento que obtuvo mejores resultados fue T1 de la bacteria 006 sin mezcla alguna y muestra diferencias significativas con respecto al control (T8). El tratamiento que menor altura obtuvo fue el tratamiento 6 (012-064) sin embargo el resultado fue superior al del control sin tener diferencias significativas.

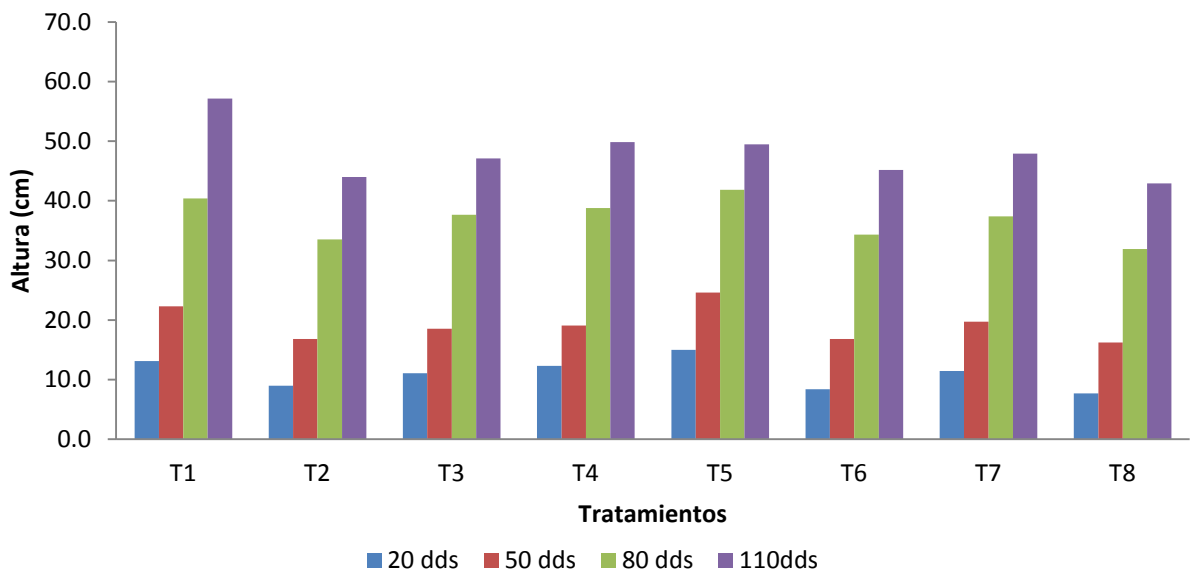


Figura 27. Evolución de la altura de plantas de papa durante el ciclo de cultivo inoculadas con bacterias

### Peso Fresco Tubérculos

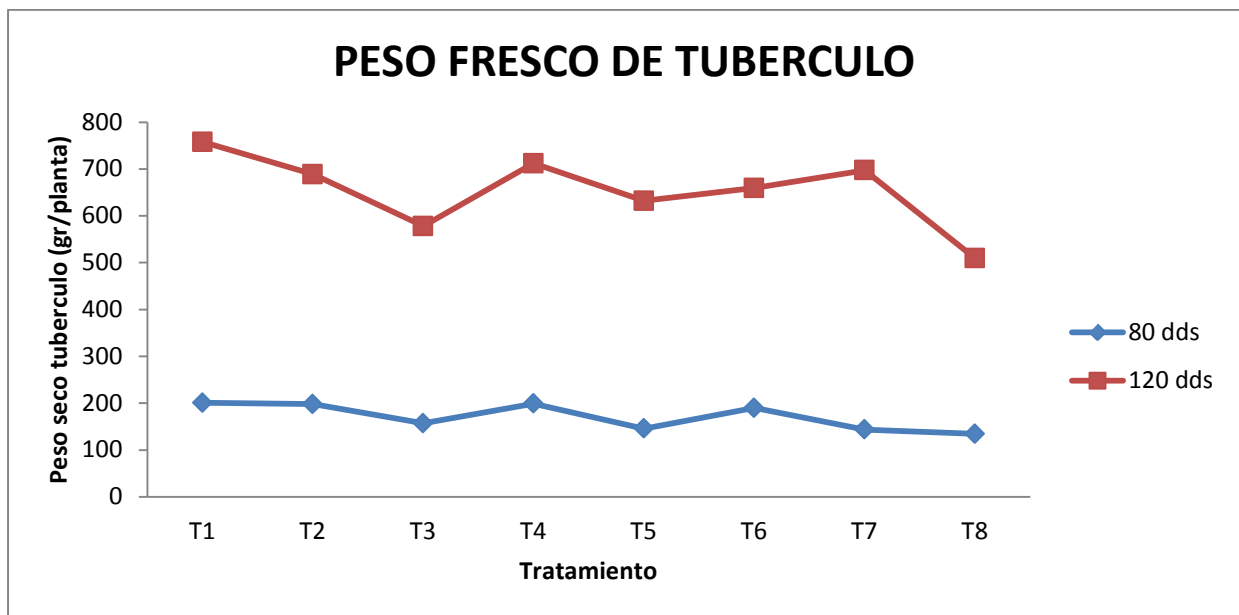


Figura 28. Peso seco de tubérculos a los 80 y 120 días después de la siembra de los diferentes tratamientos

En la figura 28 podemos observar el incremento del peso fresco del tubérculo a los 80 y 120 dds, se presentan mejores resultados en el T1 seguido de T4 en los cuales está presente la bacteria 006, los buenos resultados pueden deberse a la capacidad de solubilización de la bacteria 006 lo que hace más eficiente la fertilización fosfórica en el cultivo.

### Rendimiento de los Tratamientos aplicados al NIP.

Esta variable fue determinada a partir del peso fresco de los diferentes tratamientos a los 120 dds, en donde se pesó la cantidad de tubérculos presentes en los tratamientos y se extrapolo a una hectárea, se puede observar que independientemente del tratamiento existe un incremento en el

rendimiento con la aplicación de los solubilizadores de fosforo, se puede observar que no existen grandes diferencias en los rendimientos entre tratamientos pero si, con respecto, al control.

**Tabla 38.** Resultados obtenidos en el NIP donde se evaluaron Bacterias solubilizadoras de Fosforo seleccionadas en el primer objetivo

Rendimiento ton/ha	
T1	21,74
T2	20,67
T3	17,34
T4	20,36
T5	18,96
T6	19,78
T7	20,92
T8	15,29

## CONCLUSIONES DEL TRABAJO DESARROLLADO

- La bacteria 006 es la que presenta mejores resultados en todas las variables, lo que la convierte en la bacteria más eficiente para el cultivo de la papa.
- La mezcla de la bacteria 006 con cualquiera de las otras dos bacterias disminuyen la capacidad solubilizadora de esta.
- Independientemente de la bacteria que sea aplicada, el uso de estos microorganismos en el cultivo de la papa aumenta el rendimiento considerablemente.
- Para facilidad en la aplicación de estos microorganismos, se puede inocular esta bacteria al abono orgánico producido en Ventaquemada.



**Fotografías 72.** Inoculación de Abono Orgánico con Bacterias solubilizadoras de Fosforo.

**5.1.2. Evaluar participativamente el uso de Bacterias solubilizadoras de fosforo asociadas al cultivo de Maíz con agricultores de la Asociación Agroforestal Simisu de Simijaca y Susa, Departamento de Cundinamarca**

## Metodología

En la implementación de núcleos de investigación participativa para la utilización y evaluación de las bacteria solubilizadoras de fosforo asociadas a cultivos de maíz, las cuales fueron evaluadas inicialmente en la Universidad Nacional, donde se seleccionaron las bacterias 1122, 3114, 3211, 4214 y 5111 para ser inoculadas al momento de la siembra de maíz.

Se realizó la siembra de maíz en lotes de propiedad de los productores de la asociación, el lote 1 en la finca de José Belarmino Fraile y lote 2 en la finca de Álvaro Aguilar. En cada lote se implementaron 7 tratamientos con dos repeticiones, completamente al azar, cada repetición con 20 unidades experimentales. Las bacterias a evaluar se aplicaron al sitio de siembra de las semillas, cada sitio tenía 3 semillas.

Se aplicaron los siguientes tratamientos en los lotes seleccionados:

- Tratamiento 1 = Bacteria 1122
- Tratamiento 2 = Bacteria 3114
- Tratamiento 3 = Bacteria 3211
- Tratamiento 4 = Bacteria 4214
- Tratamiento 5 = Bacteria 5111
- Tratamiento 6 = FOSFORIZ
- Tratamiento 7 = TESTIGO ABSOLUTO



**Fotografías 73.** Semilla de Maíz utilizada y lote de evaluación de bacterias

Las variables de rendimiento que se evaluaron dentro de los NIP, con los productores de la Asociación es el peso de 100 granos por tratamiento y Número de mazorcas por planta.

Dentro de los manejos agronómicos que se realizaron a los NIP's fueron aporque y control químico del gusano cogollero, para el desarrollar un plan de abonamiento se tuvo en cuenta los valores del análisis de suelo con reporte de una buena cantidad de P con un valor de 55 ppm, pero generalmente no es disponible para la planta, por ello la importancia que juegan las bacterias que se evaluaron en la zona para que este mineral sea disponible para la planta. No se utilizaron fertilizantes fosfatados para esta evaluación.

## Resultados

### Seguimiento de Núcleos de Investigación Participativa



**Siembra lotes de maíz con productores**



**Bacterias para la inoculación de la semilla de maíz.**



**Plantas de Maíz durante el ciclo del cultivo**



**Cosecha de NIP's**



**Evaluación de Variables de rendimiento**



**Fotografías 74. Acompañamiento técnico participativo en el NIP de Bacterias solubilizadoras de Fosforo**

En la evaluación de estos NIP's se presentaron algunos inconvenientes con las condiciones climatológicas, por lo que los suelos presentaron encharcamiento y las plantas de Maíz evidenciaron algunos inconvenientes como bajo crecimiento en los meses iniciales del ciclo vegetativo y baja producción, se realizó un conteo del número de mazorcas por planta en la mayoría de las parcelas y se estimó un promedio de 2 mazorcas por planta en general, ya que se pudo observar plantas, en los diferentes tratamientos, que no tenían mazorcas debido a que se presentaron sectores de los lotes evaluados con encharcamientos durante el ciclo del cultivo, provocando esta situación.

Después de realizar la cosecha se evaluó participativamente la otra variable de rendimiento, para determinar la biomasa generada en las mazorcas, con la aplicación de los tratamientos:

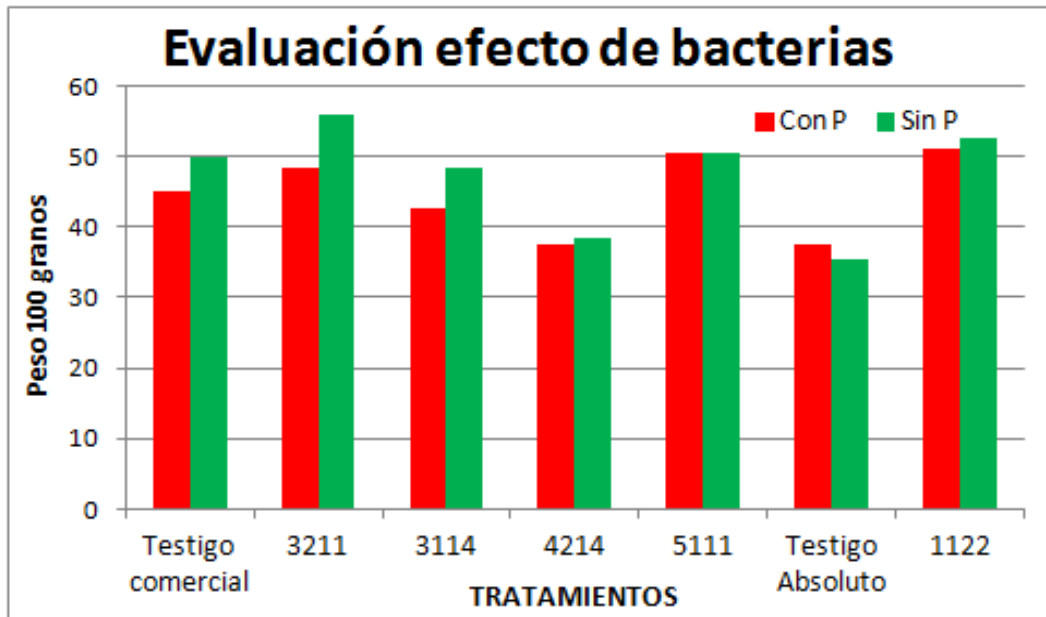


Figura 29. Evaluación de peso 100 granos por tratamiento

Finalmente se puede verificar que la bacteria 3211, perteneciente al género *Pseudomonas*, presenta un buen comportamiento en la disponibilidad del fósforo presente en el suelo para que la planta lo tome de la mejor manera y tenga un desarrollo adecuado; este resultado se toma fuerza debido al comportamiento de esta bacteria en condiciones controladas, expuesta anteriormente en el Objetivo 1. Este comportamiento se debe comprobar en otro ciclo del cultivo debido a las condiciones adversas que se presentaron al momento de la evaluación, este ensayo se ejecutó por parte de los productores donde aplicaron metodología desarrollada en el núcleo anterior, para comprobar los resultados arrojados en esta evaluación.

Se trabajó con los productores un protocolo sencillo para conservar, multiplicar y aplicar la bacteria que mejor se comportó (3211, *Pseudomonas*) donde se fabricó un EM a base de este microorganismo y se recomendó aplicaciones por medio de biofertilizantes inoculados con este EM, producido por Agricultores de la Asociación.



**Fotografías 75.** Manejo de Bacterias solubilizadoras de Fosforo con Productores de Simijaca

**5.1.3. Evaluación participativa del abono orgánico Bocashi desarrollado en Ventaquemada por parte de los productores de Orgánicos & Asociados.**

**Metodología**

Se acordó con los productores del grupo de abonos Orgánicos & Asociados, Organización Social conformada a través del proceso, la implementación de núcleos de investigación participativa para la evaluación de las diferentes dosis de abono elaborado en la planta acompañado con una parte de abono químico utilizado convencionalmente; las parcelas se ubicaron en las fincas de los señores Luis Alfredo Ruiz y José Torres.

Dentro de esta actividad, se realizó la siembra de 50 Kilos de papa pastusa donde se evaluaron diferentes dosis de abono tipo Bocashi y abono químico al momento de la siembra. Se implementó un diseño experimental completamente al azar de 5 tratamientos con 3 repeticiones y 30 unidades experimentales, los tratamientos fueron 50% Abono químico y 50% Abono Orgánico, 75% Abono químico y 25% Abono Bocashi, 75% Abono Bocashi y 25% abono químico, 100% abono químico, y 100% Abono Bocashi. Las cantidades se utilizaron según análisis de suelo, requerimiento del cultivo y cantidades nutricionales de los abonos.

Las labores del cultivo como deshierbe, aporque y las aplicaciones de insumos para el control fitosanitario fueron realizados por parte de los productores y según las condiciones que se presentaran durante el ciclo del cultivo

TRAT <sub>1</sub> REP <sub>1</sub>	TRAT <sub>4</sub> REP <sub>1</sub>	TRAT <sub>2</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>5</sub> REP <sub>3</sub>	TRAT <sub>2</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>3</sub> REP <sub>1</sub>
TRAT <sub>5</sub> REP <sub>1</sub>	TRAT <sub>3</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>1</sub> REP <sub>3</sub>	TRAT <sub>4</sub> REP <sub>3</sub>	TRAT <sub>4</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>1</sub> REP <sub>1</sub>
TRAT <sub>2</sub> REP <sub>1</sub>	TRAT <sub>1</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>5</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>3</sub> REP <sub>4</sub>	TRAT <sub>3</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>5</sub> REP <sub>1</sub>
TRAT <sub>3</sub> REP <sub>1</sub>	TRAT <sub>3</sub> REP <sub>3</sub>	TRAT <sub>4</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>2</sub> REP <sub>3</sub>	TRAT <sub>1</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>2</sub> REP <sub>1</sub>
				TRAT <sub>5</sub> REP <sub>2</sub>	TRAT <sub>4</sub> REP <sub>1</sub>

**Figura 30.** Diseños aplicado a los Núcleos de Investigación Participativa 1 y 2, respectivamente.

Tabla 39. Tratamientos aplicados

DOSIS/ TRATAMIENTO	ABONO QUIMICO	ABONO BOCASHI
Tratamiento 1	75 %	25 %
Tratamiento 2	50 %	50 %
Tratamiento 3	25 %	75 %
Tratamiento 4	100 %	0 %
Tratamiento 5	0 %	100 %

## Resultados



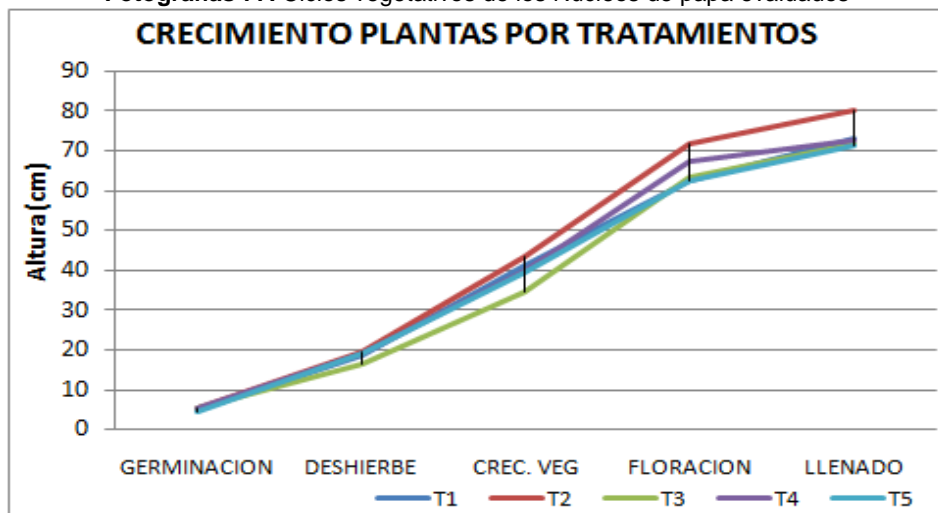
Fotografías 76. Siembra de lotes seleccionados participativamente donde se evaluó el abono Bocashi en Ventaquemada

Se observó que los tratamientos aplicados en los lotes evaluados, T3 y T5 en los cultivos presentaron un porcentaje de emergencia de 95% a los 15 DDS. Además, las plantas presentaron un porte vigoroso y gran cantidad de follaje.





**Fotografías 77.** Ciclos vegetativos de los Núcleos de papa evaluados



**Figura 31.** Medición de altura en plantas de lotes de papa

En esta grafica se puede observar que no se presentan diferencias significativas durante el ciclo de los cultivos, pero existe una mayor tendencia de crecimiento en el tratamiento 2. Este tratamiento a partir de los 35 dds, aproximadamente, tiende a presentar mayor crecimiento respecto a los demás tratamientos.



**Fotografía 78.** Selección tubérculos

Para NIP´S se evaluaron diferentes variables de rendimiento como el peso de los tubérculos de las plantas por cada tratamiento, el peso de los tubérculos por tratamientos y el numero de tubérculos

por tratamientos; para cada una de estas variables se seleccionaran los diferentes portes de papa (Guesa 1era, Pareja 2da, Riche 3era).



Fotografías 79. Cosecha NIP's

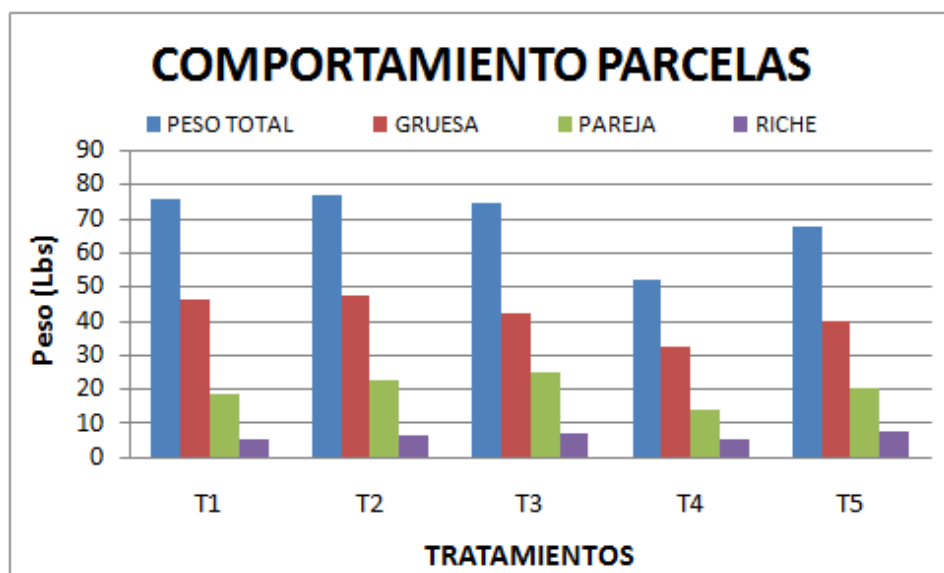


Figura 32. Medición de peso de parcelas según categorías en los NIP's de papa

En la figura 32 se observa el comportamiento del peso de los tubérculos, por tratamiento, nos muestra que los tratamientos donde se realizó una fertilización combinada con abono químico y orgánico presenta una mejor producción de tubérculos, destacándose el tratamiento 2 donde

presenta una mayor producción de tubérculos de los tres portes y del porte de primera. Aquí se contrarresta el resultado con el comportamiento en el crecimiento de las plantas durante el ciclo, ya que se destacó también el tratamiento 2.



Fotografías 80. Pesaje del lote cosechado por tratamientos

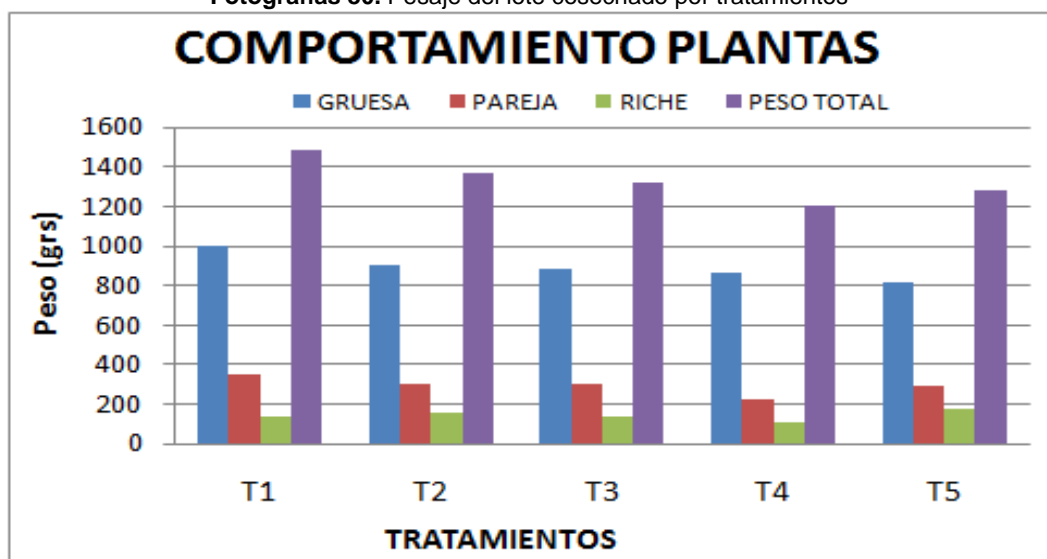
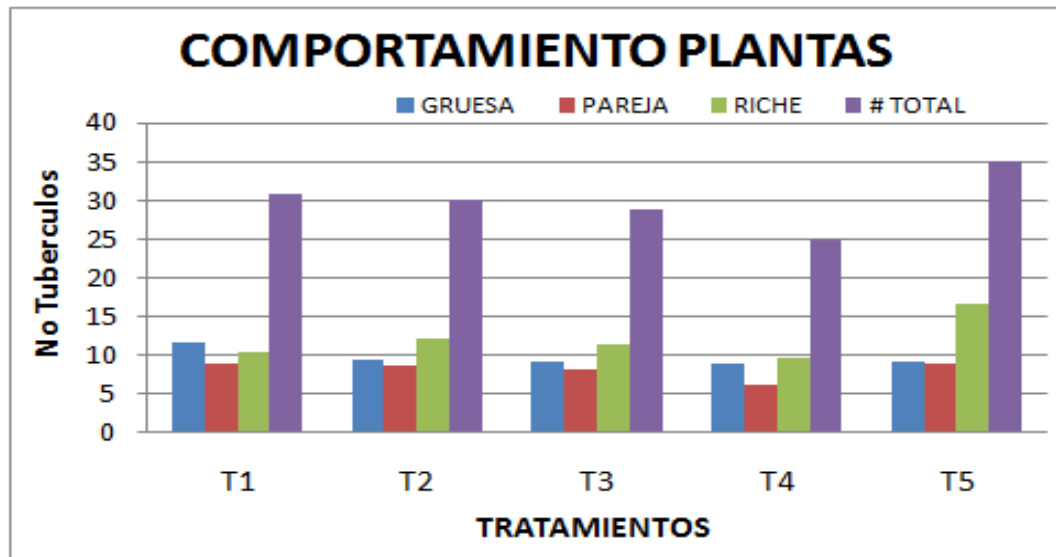


Figura 33. Medición de peso tubérculos por plantas de NIP's de papa

En esta variable se evaluó el comportamiento de las plantas según el tratamiento aplicado, donde se observa que el tratamiento 1 presenta un mayor peso de los tubérculos por planta, ya que presenta tubérculos con buena biomasa con respecto a los demás tratamientos evaluados.



**Figura 34.** Conteo de Numero de Tubérculos por comportamiento en tratamientos

En esta grafica se evalúa, de nuevo, el comportamiento de las plantas según el tratamiento aplicado, donde el tratamiento que presenta mayor número de tubérculos por planta es el tratamiento 5, tratamiento donde se aplico solamente abono Bocashi. Pero presentan mayor número de tubérculos de tercer porte. Se puede deducir que este abono Bocashi presenta buenas condiciones para producción de tubérculos por planta pero es deficiente en el aporte de potasio a la planta ya que presenta tubérculos con poca biomasa.

Finalmente se concluyó con los productores que el mejor tratamiento para producción de papa comercial fue donde se utilizo el 50% de fertilización química y 50% de fertilización orgánica, debido a los resultados en pesos y números de tubérculos evaluados participativamente. Además, este grupo lo conforman varios productores de semilla de papa certificada, donde se pudo deducir que para el manejo de la fertilización de lotes para producción de semilla se puede aplicar los tratamientos 1 o 5 por la cantidad de tubérculos que se seleccionan como semilla.

### **Utilización del abono orgánico Bocashi desarrollado en Ventaquemada para la conservación de Papas Nativas.**

#### **Metodología**

En la implementación de núcleos de investigación participativa para la utilización y evaluación del abono orgánico elaborado en la planta acompañado con una parte de abono químico utilizado convencionalmente (75% Orgánico y 25% Químico); las parcelas se ubicaron en la finca del señor José Torres, finca donde también se encuentra ubicada la planta de Abonos.

Se realizó la siembra de 12 variedades nativas de papa (Tocana rosada, pastusa Palinegra, Tocana Roja, Andina Ventaquemada, Tuquerreña 1, Uva, Punto Rojo, Pampa Blanca, Bola de Sal, Ratona, Lizaraza Grande, Tocana Negra) y 2 variedades comerciales (Corpoica Mary, Clon 51).

La cantidad de abono que se dispuso fue de 1 bulto de abono por bulto de semilla de papa (criterio de siembra convencional por productores), aplicando por planta 75 gr de abono, siendo este valor el 100% del total de abono utilizado al momento de la siembra; para la aplicación del abono en cada una de las parcelas de papas nativas se utilizo unos vasos que fueron pesados y con la cantidad de abono exacta por sitio en las parcelas.





**Fotografías 81.** Aplicación de abono en siembra de papas nativas

## Resultados

En la implementación del núcleo de investigación participativa en la utilización del abono orgánico, la evaluación del abono estuvo a cargo de los productores asociados de la planta donde se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la germinación de las plantas emergieron pronto y estas presentan un porte vigoroso.
- Las plantas de papa presentaban buena cantidad de tallos y hojas, presentado un aspecto frondoso.
- Dentro de las labores culturales, no se realizó reabono de las parcelas y la producción fue buena.



**Fotografía 82.** Plantas de papas nativas en lote fertilizado con abono Bocashi de Ventaquemada

Otras conclusiones percibidas de las parcelas:

- Los productores determinaron la importancia de la conservación de semillas nativas de papa, debido a las diferentes propiedades que presentan estos materiales para posteriores investigaciones en la búsqueda de semillas mejoradas y a la diversificación de semillas nativas.
- Se obtuvieron 400 kilos en tubérculos de papas nativas y comerciales.
- De la variedad Corpoica Mary se cosecharon tubérculos de mejor porte y tamaño, por lo que se cataloga como una variedad para ser cultivada a mayor escala e iniciar una fuerte incursión en el mercado.



**Fotografías 83.** Cosecha de parcelas papas nativas fertilizadas con abono Bocashi de Ventaquemada.

#### 5.1.4. Utilización del abono orgánico Bocashi y Biofertilizante Supermagro desarrollado en el Municipio de Soracá para la producción de quinua.

Con miras a mejorar la producción por área sembrada de quinua de variedades dulces y amargas, aunque es un cultivo no tan extenso en el municipio si ha venido despertando un gran interés comercial por sus valores nutricionales y medicinales; se diseña participativamente un plan de Abonamiento utilizando aplicaciones edáficas de abonos sólido (Bocashi) y líquido (Supermagro) en algunas aplicaciones Foliar del Biofertilizantes de acuerdo a los diferentes estados fenológicos del cultivo.

#### Plan de abonamiento sostenible para Quinua

**Tabla 40.** Plan de fertilización orgánica en el cultivo de Quinua

ETAPA CULTIVO	PRODUCTO	DOSIS	FRECUENCIA	FORMA	DAÑO
V <sub>0</sub> = Siembra	Bocashi o Abimgra.	1 Tn/Ha	Una vez	Al fondo del surco	Si se presentan daños en el cultivo ocasionados por : - Lluvias fuertes - Heladas - Ataque de insectos - Enfermedades
V <sub>2</sub> = Dos hojas a V <sub>3</sub> = 4 a 6 hojas	SuperMagro	1 Lt	Una vez	Foliar – a las hojas	
V <sub>4</sub> =Ramificaciones	SuperMagro	2 Lt	Una vez	Al suelo – inyectado en banda	
R <sub>5</sub> = Panojamiento	SuperMagro	1 Lt	Una vez	Foliar – a las hojas	

R <sub>7</sub> =Grano lechoso	SuperMagro	2 Lt	Una vez	Foliar – a las hojas	de Ortiga y un vaso de melaza previamente disuelto.
-------------------------------	------------	------	---------	----------------------	---

Este plan cuenta con la combinación de un abono solido tipo Bocashi que se elabora por parte de cada uno de los productores en sus fincas, utilizando materias primas como el residuo del tamo de la quinua, cebada, maíz y pasto seco; abonos de animales de la finca (ovejas, vacas, cerdos, conejos), cenizas de leña, harina de rocas, Calfos, melaza o panela, Microorganismos EM, levadura o guarapo, tierra virgen (porción de abono maduro), Harina de leguminosas, Agua sin cloro o supermagro en aspersión realizando la Prueba de puño para el porcentaje de humedad.



**Fotografías 84.** Aplicación de Abono Orgánico en siembra de Quinua

Actualmente se encuentran en proceso de evaluación en campo en un lote de producción de quinua. Igualmente se elaboro el primer lote de producción de abono de 10 toneladas utilizando (tamo de cebada, tamo de quínoa, estiércoles vacuno y Equinasa, EM, melaza, rocas fosfóricas entre otras).

Logros más representativos del proceso:

- Beneficiar más de 40 familias de productores de quinua de los municipios de Soracá, Chivata y Siachoque en Boyacá inicialmente.
- Disminución en 100 % de fertilizantes químicos en quínoa y praderas.
- Ganar consumidores a nivel de la zona con el cultivo de papa, ya que vienen aplicando abonos sólidos traídos de otros departamentos y municipios, lo cual hace que se incrementen los costos de producción del cultivo.
- En cultivos como papa criolla se ha disminuido un 30% los fertilizantes químicos.
- Mayor diversificación de abonos y materias primas para un mayor equilibrio en el suelo.
- El trabajo entorno a abonos nos ayuda a trabajar en equipo y consolidarnos como organización.

**5.1.5. Evaluación participativa con la Asociación de Productores de Fómeque ASPROCAF de técnicas para producción de bioles y su utilización en el cultivo de Habichuela.**

Se preparó un abono liquido tipo Biol con la participación activa de los agricultores en la planta local de su propiedad. Este biol se distribuyó entre los agricultores para ser evaluado bajo sus propios criterios en los cultivos de la región.



**Fotografía 85.** Preparación participativa del abono líquido en Fómeque.

Se realizó una evaluación preliminar de la aplicación del Biol inicialmente preparado, a partir de las observaciones realizadas por los propios agricultores en sus cultivos, en la cual se destaca:

- Dosis: 10 litros por caneca de 200 litros (1 L / 20 Litros)
- Modo de aplicación: tasa o pocillo por planta, se aprovecha la totalidad de los sedimentos del Biol y no se arriesga el follaje por una posible intoxicación.
- Características observadas: Color verde intenso de la habichuela, en la cual se aplico el abono líquido.
- Frondosidad: mayor volumen de hojas y de frutos
- Vigor: plantas con un mayor porte y mas Frondosas.
- Toxicidad: No se observo toxicidad en las aplicaciones realizadas en habichuela y mora.



**Fotografías 86.** Cultivos de habichuela de diferentes veredas en Fómeque, donde se utilizo y evaluó el Biofertilizante.

Posteriormente se realizó una nueva preparación del abono líquido tipo Biol con la participación activa de los agricultores, este Biol se está evaluando de manera técnica en la parcela de habichuela.



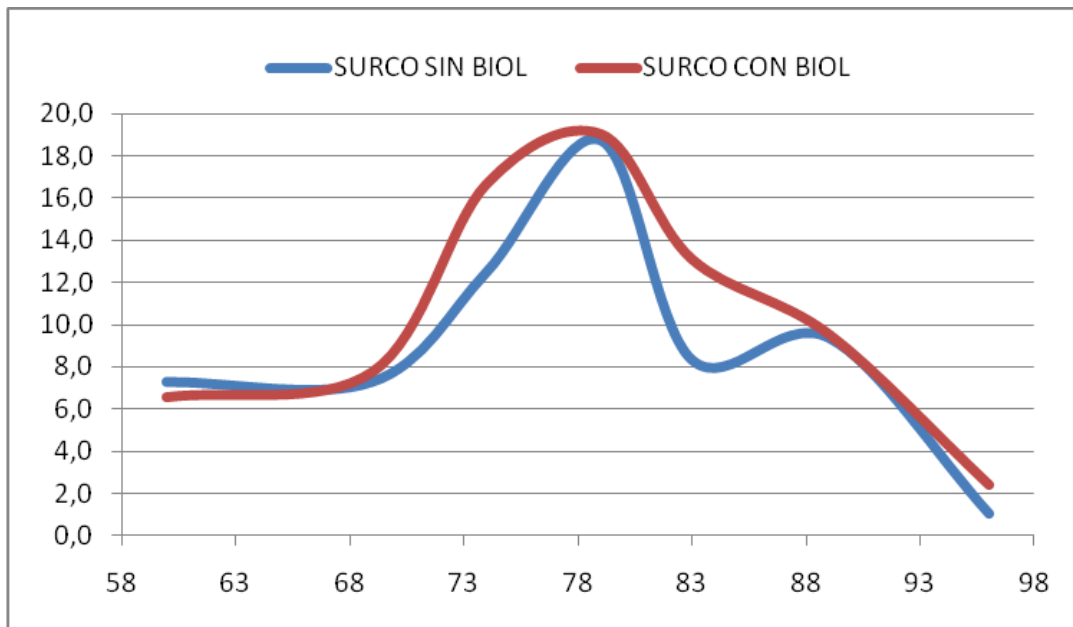
**Fotografías 87.** Parcela habichuela en aplicación de Biol

Con los conocimientos adquiridos en el tema de la elaboración de bioles los socios de la organización tienen la capacidad de producir biol a partir de una fórmula que ha sido aprobada, ya que los materiales utilizados son de fácil acceso en la zona. Se utilizó un área experimental de 2000 m<sup>2</sup> (aprox.), con 35 surcos, de los cuales se tenían 12 sin aplicación del Biol. La aplicación se realizó en aspersión foliar, cada 15 días con ½ litro de Biol por cada 20 litros de agua. Después de los 80 dde se presentaron lluvias continuas, por tanto se aplicó el Biol cada 8 días. Se llevó a cabo la toma participativa de datos de producción por parte del agricultor separando la producción con y sin biol.



**Fotografías 88.** Producción de cultivo con Biol (Vereda Gramal)

En el cultivo se demostró que la aplicación de biol como método de fertilización ayuda en la producción pero sin embargo se debe complementar con otros productos. Como resultado de las observaciones cualitativas del agricultor en el tratamiento con Biol se obtuvo mayor vigor en plantas, más robustas y con menor incidencia de plagas, lo cual se tradujo en una disminución en la utilización de insumos para el control de plagas y enfermedades lo que para el agricultor representa menores costos de producción.



**Figura 35.** Producción de habichuela en kg por surco de 25 m, tratados con y sin Biol de acuerdo a los **dde**.

Cuantitativamente se obtuvo una producción más sostenida en el punto de mayor volumen de cosecha, es decir se presentó una estimulación por parte del Biol para tener una extracción y asimilación continua de nutrientes del suelo.

#### **5.1.6. Evaluar participativamente con agricultores de la Asociación de Productores de Granada, ASOAGRA, el control de Gusano Blanco (*Premnotrypes vorax*) con el hongo *Beauveria bassiana* en el cultivo de papa criolla.**

### **Introducción**

El gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Coleoptera: Curculionidae) es una de las 14 especies del complejo denominado “gorgojos de los Andes” que atacan el cultivo de la papa. Esta especie se encuentra distribuida en Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú donde se registra como una de las plagas clave del cultivo (Alcázar y Cisneros, 1999). El gusano blanco en su estado adulto se alimenta principalmente de las hojas de la papa, pero el daño de importancia económica es ocasionado por las larvas, que al alimentarse de los tubérculos hacen galerías que afectan la calidad del producto. Las pérdidas en rendimiento ocasionadas por el gusano blanco oscilan entre 5% y 50% dependiendo del nivel de población y del manejo del cultivo (Niño et al., 2004).

Con el fin de disminuir los daños causados por *P. vorax*, se han propuesto varios métodos para su manejo como la utilización de barreras vegetales, las prácticas culturales y la aplicación de bioplaguicidas (Calvache, 1985; Yabar, 1988; Calvache y Posada, 1991; Torres et al., 2004). No obstante, la medida más utilizada por los agricultores es el uso de insecticidas químicos como

carbamatos, piretroides y organofosforados (Torres et al., 2004). En la mayoría de los casos, los insecticidas son aplicados sin justificación técnica y sólo con el criterio de proteger la cosecha contra el eventual ataque de la plaga (López-Ávila, 2003). Esta situación ha originado problemas de contaminación ambiental, crecimiento de plagas secundarias y efectos nocivos para la salud de los agricultores (Crissman et al., 1994; Yanggen et al., 2003). Frente a este panorama, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el manejo de la plaga, como lo es el control biológico del insecto mediante *Beauveria bassiana*, el cual representa una alternativa económica y ecológicamente sostenible de controlar el gusano blanco.

## Metodología

### Primera fase de experimentación

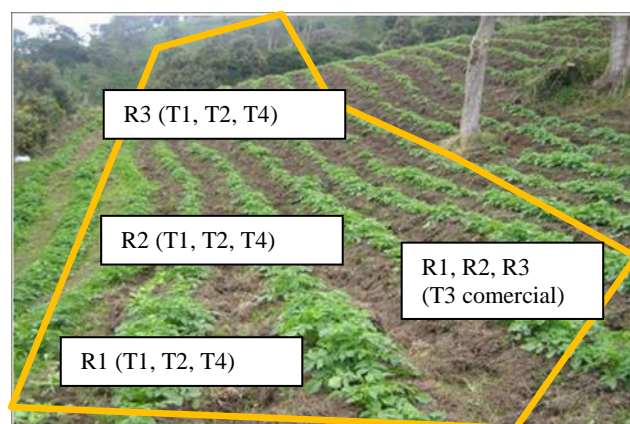
En un proceso anterior de aislamiento en zonas productoras de papa de Boyacá y Cundinamarca, se ha obtenido una cepa específica del hongo *Beauveria bassiana*, que ha tenido buenos resultados en el control del Gusano Blanco y tolerancia a nivel de laboratorio a los principales fungicidas usados en papa. Cepa que se usó a nivel de campo para evaluar su eficacia de control.

El presente ensayo se realizó en zona rural del municipio de Granada, Cundinamarca, a una altitud aproximada de 2850 m.s.n.m, temperatura promedio de 9 °C, con una precipitación de 2000mm. Esta variable pluviométrica, unida a la temperatura y a la evapotranspiración, nos define zonas de vida, que para el caso de Granada se clasifican como bosque muy húmedo, montano bajo.

### Montaje del ensayo

El cultivo se estableció usando como material de siembra semillas de papa criolla variedad Colombia. Se estableció en la finca de la asociación de agricultores del municipio de Granada en la vereda de sabaneta.

### Establecimiento de los tratamientos



**Fotografía 89.** Imagen zona de cultivo de papa criolla donde se establecieron los tratamientos de control del Gusano Blanco en el municipio de Granada.

Se monitoreó a lo largo del ciclo del cultivo la población de adultos y la presencia de larvas de la plaga, a través de trampas de paso con atrayente, trampas de caída y muestreos manuales. Un mes antes de la siembra se ubicaron 4 trampas distribuidas aleatoriamente en el lote. Estas trampas se utilizaron para monitorear los adultos de gusano blanco. Utilizamos un cebo atrayente

(tubérculos y plantas de papa criolla), un cebo insecticida granulado (carbaryl 1%) y un costal para cubrir la trampa. Las trampas las revisamos semanalmente hasta el primer mes del cultivo y cada 15 días desde el primero hasta el cuarto mes del cultivo.

### Preparación del hongo



**Fotografía 90.** Preparación de los tratamientos con *Beauveria bassiana* para el control de Gusano Blanco.

El Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, suministró el hongo en una formulación granulado dispersable en dosis de 5gr por paquete a una concentración de 1010 conidios/g, cantidad que se disuelve 1gr por cada litro de agua

### Evaluación de Lanza inyectora en la aplicación de productos para control de Insectos-plaga

Para la aplicación del tratamiento (T1) se utilizó un instrumento que consta de 1 boquilla con cuatro puntos de descarga, los puntos de descarga están ubicados para realizar una descarga horizontal y se separan cada una a 90°. La lanza puede penetrar hasta 60 cm por debajo del suelo según requerimientos de la aplicación (Villalobos, 2009).



**Fotografía 91.** Imagen lanza inyectora utilizada en la aplicación del Tratamiento (T1) con el hongo *Beauveria bassiana*



## Aplicación de los tratamientos y Método de aplicación del hongo

- Para el Tratamiento uno (T1), se realizaron tres aplicaciones: 1 en la emergencia del cultivo, 2 en el momento del aporque y 3 después de la floración. Las aplicaciones se realizaron con la lanza inyectora (T1) entre planta y planta a 0.15 m de cada una y a 0.15 y 0.10m de profundidad a una dosis de 30ml de suspensión por cada planta, se inyectaron en dos puntos por planta cada una de 15ml.
- Para el Tratamiento dos (T2), fueron realizadas 2 aplicaciones en drench a cada planta, la concentración de la solución fue la misma usada en el tratamiento uno. Este tratamiento también se realizó con 3 aplicaciones, en la emergencia del cultivo, en el momento del aporque y después de floración.
- Para el tratamiento tres T3, se realizaron aplicaciones en mezcla de clorpirifos y thiametoxam + lambdacihalotrina con la dosis comercial recomendada para estos dos productos. La aplicación se realizó con bomba de espalda y se hicieron 2 aplicaciones: en el momento de la deshierba y después del aporque.
- Para el Tratamiento 4 T4, se hicieron las mismas aplicaciones que en el tratamiento uno y el tratamiento dos con bomba de espalda convencional, aplicando solamente agua.



Fotografía 92. Método de aplicación del Tratamiento (T1) con lanza inyectora utilizando el hongo *Beauveria bassiana*

## Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con análisis estadístico ANAVA. Se probaron cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno para un total de 12 unidades experimentales. La unidad experimental del ensayo fueron parcelas de 4m x 5m. La densidad de siembra fue de 0.9 m entre surcos x 0.3 m entre plantas para un total de 240 m<sup>2</sup>. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico (SAS 9.0) y prueba de Tukey.

## Tratamientos

Tabla 41. Tratamientos usados en el trabajo de control del daño por Gusano Blanco en papa.

	TRATAMIENTOS	DOSIS
T1	Solución ( <i>Beauveria bassiana</i> ) con lanza inyectora	1g/Litro
T2	Solución ( <i>Beauveria bassiana</i> ) aplicada con bomba de espalda – tradicional	1g/Litro
T3	Testigo comercial (tradicional)	
T4	Testigo absoluto (sin tratamiento de control)	

## VARIABLES EVALUADAS

Se tomaron como variables de respuesta la incidencia y la severidad de daño por tubérculo.

### ✓ Incidencia

La incidencia se midió contando los tubérculos con síntomas de daño causado por Gusano Blanco teniendo en cuenta el daño causado por polilla guatemalteca ya que los daños son diferentes. El porcentaje de incidencia se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de incidencia} = \frac{\text{No. total de tubérculos afectados}}{\text{No. total de tubérculos}} \times 100$$

### ✓ Severidad

La severidad se evaluó teniendo en cuenta la siguiente Escala de severidad en el daño causado por *P. vorax*

**Tabla 42.** Escala de severidad del daño por larvas de Gusano Blanco.

ESCALA DE SEVERIDAD	
NIVEL	Presencia de daño en el tubérculo
1	1/4
2	1/2
3	3/4
4	Totalmente Afectado

Para cada tratamiento se midió la severidad de la siguiente manera:

$$\% \text{ de severidad} = \frac{\text{No. total de tubérculos afectados por niveles}}{\text{No. total de tubérculos afectados}} \times 100$$

## Segunda fase de experimentación

A partir de los resultados observados en la primera fase de experimentación en la evaluación del control de Gusano Blanco (*Premnotrypes vorax*) con el hongo *Beauveria bassiana* en el cultivo de papa criolla en el municipio de Granada, resultados que mostraron que el mejor tratamiento T1 con lanza inyectora, logro un control del daño evidente, observándose valores de incidencia solo del 30%; estadísticamente fue diferente al testigo absoluto donde la incidencia del daño fue mayor, un 90%.

Con el fin de mejorar los resultados del trabajo realizado, se acordó con los productores de Granada ampliar la investigación, realizando las siguientes actividades:

- Se desarrolló un ensayo preliminar de laboratorio aplicando distintas dosis del hongo *Bauveria bassiana* (0,5 ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml y 30ml) en grupos de 10 tubérculos de papa criolla, con un grupo control con solo agua, para observar el efecto que podría tener la aplicación directa del hongo sobre la brotación de los tubérculos antes de llevar a cabo el trabajo de control en campo.
- Posteriormente, en el área experimental, se hará la evaluación, para corroborar, el control de *P. Vorax* con el hongo *Bauveria bassiana* ya probada con la lanza inyectora con el tratamiento que redujo en mayor porcentaje la incidencia del insecto en los tubérculos, y paralelamente se correlacionará el efecto frente a un hongo entomopatógeno, del mercado, que tenga un eficaz control en Gusano Blanco.

## Resultados

### Resultados primera fase de experimentación

Para evaluar los resultados de cada tratamiento se tomó el 10% de cada unidad experimental. Las plantas se eligieron aleatoriamente evitando tomar muestras de los extremos de la parcela para reducir el efecto de borde. Una vez cosechados los tubérculos se lavaron con agua y se llevaron al laboratorio para realizar las mediciones de incidencia y severidad.



**Fotografía 93.** Cosecha y evaluación participativa de los resultados de control del daño de tubérculos por larvas de Gusano blanco con los tratamientos evaluados

En la evaluación participativa en campo, el tratamiento (T1) con lanza inyectora aplicando el hongo (*Bauveria bassiana*) mostró un menor daño frente al daño observado en el tratamiento testigo absoluto sin ningún producto de control.

### Incidencia del daño

Igualmente, se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,030$ ), entre los tubérculos sanos y los tubérculos afectados, y no existen diferencias entre la misma clase de tubérculos ni entre las repeticiones, esto quiere decir que el efecto que causó la lanza inyectora fue positivo, aumentando el número de tubérculos sanos con respecto a los demás tratamientos evaluados.

El tratamiento T1 (lanza inyectora y *Bauveria bassiana*) mostró una menor incidencia del daño por larvas de Gusano blanco cercana a un 30% en los tubérculos evaluados, comparada con la incidencia del daño cercana al 90% observada en el testigo absoluto T4 (Sin control).

El uso de la lanza inyectora para la aplicación de el hongo *B. bassiana* mostro un mayor control con respecto a los demás tratamientos.

Según la ANOVA, en el tratamiento testigo (T4) existen diferencias significativas entre tubérculos sanos y tubérculos afectados y no existen diferencias entre repeticiones. Se puede observar que el control (químico o biológico) tiene efectos positivos con respecto a la incidencia de *P. vorax*, ya que disminuye las perdidas por daño en calidad y competitividad en los tubérculos de papa criolla.

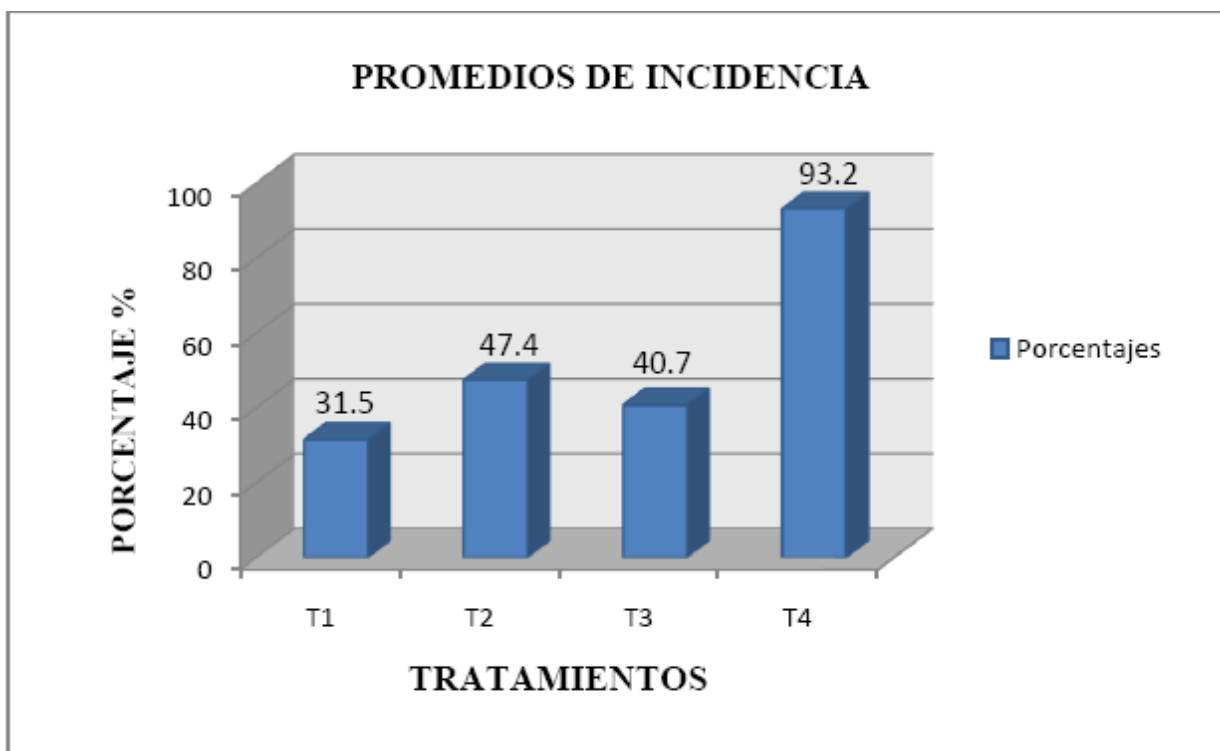


Figura 36. Porcentaje promedio de incidencia presentado en los 4 tratamientos evaluados.

Según prueba de Tukey existe diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre la aplicación de *B. bassiana* con lanza inyectora (T1) y los demás tratamientos evaluados, esto quiere decir que la lanza inyectora tuvo un efecto positivo mayor, mientras que *B. bassiana* aplicado con bomba de espalda convencional (T2) y el testigo comercial (T3) no mostraron diferencias significativas. Para el testigo absoluto (T4) se encontraron diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos evaluados considerando que el testigo fue el de mayor incidencia de daño

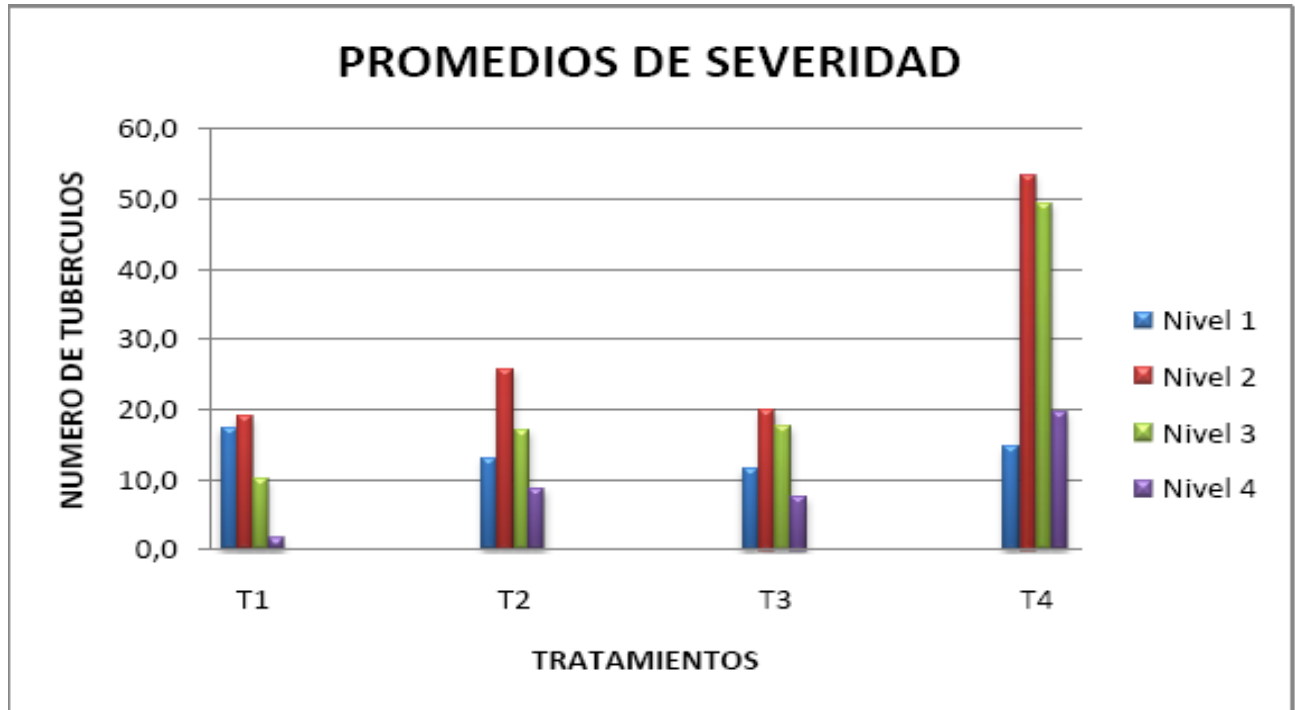
#### Severidad del daño

Tabla 43. Numero de tubérculos por cada nivel de severidad del daño observado por repetición y tratamiento.

TRATAMIENTO	SEVERIDAD											
	T1			T2			T3			T4		
REPETICION	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
NIVEL												
1	21	17	14	14	10	15	9	11	15	14	19	11
2	18	21	18	28	23	26	24	14	22	49	59	52
3	8	14	8	12	17	22	19	16	18	52	40	56
4	0	3	2	8	6	12	6	7	10	21	16	22
TOTAL	47	55	42	62	56	75	58	48	65	136	134	141

En la tabla 43 se presentan los datos analizados para los resultados de severidad, los totales fueron tomados de la cantidad total de tubérculos afectados en incidencia. Cada nivel representa la severidad del daño observada por tubérculo según la tabla de la escala de severidad.

Existe diferencia significativa entre niveles, ( $P= 0,001$ ) esto quiere decir que para la aplicación de *B. bassiana* con lanza inyectora la severidad alcanzó los mayores valores para los niveles de daño 1 y 2, y no se encontró diferencia significativa entre las repeticiones.



**Figura 37.** Porcentaje de severidad presentado en los 4 tratamientos evaluados.

En la gráfica 37 se observa que los niveles 2 y 3 fueron los más frecuentes en todos los tratamientos evaluados, aunque el testigo absoluto alcanzó un porcentaje alto con respecto a los demás. Los niveles 1 y 4 se mantuvieron como los más bajos y no muestran grandes variaciones entre cada uno de los tratamientos. Esto quiere decir que para la evaluación de severidad no existen diferencias significativas entre ningún tratamiento ya que una vez que el gusano blanco llega al tubérculo este lo afectará de manera indiferente.

### **Resultados segunda fase de experimentación**

Se observó que la aplicación del biocontrolador *Bauveria bassiana* en las diferentes dosis evaluadas (0,5 ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml y 30ml), no tuvo ningún efecto diferenciador sobre su brotación, pues el porcentaje de brotación fue muy similar para todas las dosis (0,5 ml: 70%, 10ml: 70%, 15ml: 80%, 20ml: 80%, 25ml: 80% y 30ml: 70% ) y el control con agua (90%).



**Fotografías 94.** Imágenes de la brotación observada con las diferentes dosis de hongo aplicadas y el testigo

### Implementación NIP para evaluar efecto de Hongos entomopatogenos sobre *P. Vorax*

Se implementó un cultivo donde se sembró una carga de semilla de papa criolla variedad Galeras, teniendo en cuenta las labores y el manejo realizado habitualmente los agricultores (aporque, deshierbe, fertilización entre otras), el área utilizada fue de 700 m<sup>2</sup>, la cual fue dividida en 28 unidades experimentales cada una de 5 m\*5m. La densidad de siembra fue de 0.9 m entre surcos x 0.3 m entre plantas.



**Figura 95.** Siembra de papa criolla finca la esmeralda

### Manejo de los tratamientos:

**Tabla 44.** Tratamientos aplicados al cultivo de papa criolla

TRATAMIENTO	PRODUCTO
Tratamiento 1	Aplicación de <i>Beauveria b</i> con lanza inyectora
Tratamiento 2	Aplicación de <i>Metarhizium a</i> con lanza inyectora
Tratamiento 3	Aplicación de ENGEO con lanza inyectora
Tratamiento 4	Aplicación de <i>Beauveria b</i> tipo Drench
Tratamiento 5	Aplicación de <i>Metarhizium a</i> tipo Drench
Tratamiento 6	Aplicación de ENGEO tipo Drench

Se realizaron las aplicaciones en tres momentos del cultivo en la emergencia, en el aporque y después de la floración pues son en estos momentos donde posiblemente puede verse más afectado el insecto plaga.

Se realizaron monitoreos a lo largo del periodo del cultivo la población de adultos y presencia de larvas del insecto plaga, a través de observación y captura manual para verificar la presencia de

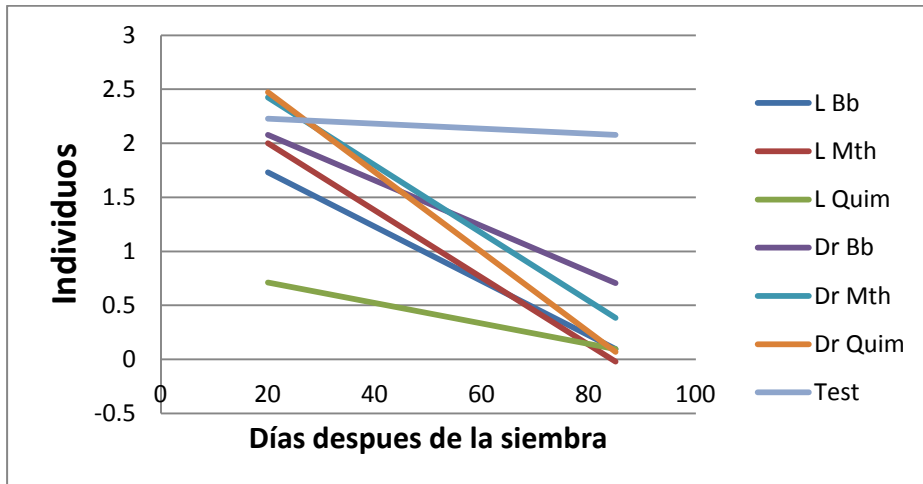
este insecto en el lote y el efecto de los tratamientos. Dos semanas antes de la siembra se ubicaron 4 trampas distribuidas aleatoriamente en el lote. Estas trampas se utilizaron para monitorear los adultos de gusano blanco. Se utilizó un cebo atrayente (tubérculos y plantas de papa criolla). Dentro de esta evaluación se presentaron condiciones climatológicas que pudieron afectar notoriamente los resultados en este ensayo.



**Figura 96.** Muestreo de suelo en los diferentes tratamientos en el cultivo de criolla e insectos encontrados

El monitoreo de larvas se ejecutó por medio de excavaciones a 0.2 m en el suelo en un área de 0.3 m x 0.3 m. En este espacio se buscó individuos de gusano blanco y se realizó el conteo por sitio. Para cada tratamiento se escogió un sitio de monitoreo en forma aleatoria. Este monitoreo se realizó cada dos semanas. Los individuos fueron recolectados y analizados en el laboratorio de la facultad de agronomía para evaluar la presencia de los hongos entomopatógenos en los individuos muertos.

Se puede observar en la grafica que la presencia del insecto en el lote disminuía notoriamente de acuerdo con aplicación de algún tipo de control, con el transcurrir del tiempo.



**Figura 38.** Comportamiento de individuos en cada tratamiento durante la época del cultivo

No se presentaron diferencias significativas en los tratamientos donde se utilizaron los hongos (*B bassiana* y *M. anisopliae*), debido a que en los meses de octubre y noviembre se presentaron altas precipitaciones, las cuales no fueron favorables para que los entomopatógenos desarrollaran su ciclo biológico regular y lograran un efecto biosida sobre el insecto-plaga. Haciendo referencia al hecho anterior, en estudios realizados por Fajardo (1995), sobre la incidencia de la lluvia en las esporas de *B bassiana* usadas para el control de broca, indican que el efecto de la lluvia simulada reduce significativamente las concentraciones de *B bassiana*

## Cosecha del núcleo

Se eligieron aleatoriamente 3 plantas, evitando tomar muestras de los extremos de la parcela para reducir el efecto de borde. Una vez cosechados los tubérculos se llevaron al laboratorio para realizar las mediciones de peso, tamaño, incidencia y severidad.



**Fotografía 97.** Evaluación de incidencia y severidad del daño hecho por *P. vorax*.



**Fotografías 98.** Cosecha del lote del ensayo con los productores de ASOAGRA.



## Evaluación de Incidencia en el NIP

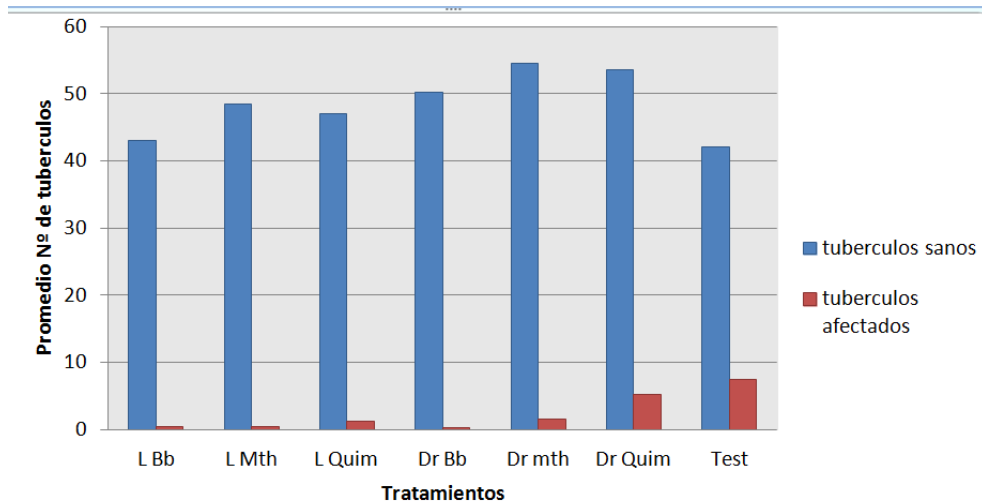


Figura 39. Incidencia *P. vorax* en tubérculos cosechados por tratamiento establecido en el cultivo.

Aunque no hubo diferencia significativa entre los tratamientos en general, los tratamientos 6 (drench químico) y el testigo fueron los que presentaron mas tubérculos afectados en comparación con el tratamiento 4 (*B. bassiana* tipo drench) el cual tuvo una incidencia del 0,25% de tubérculos afectados debido posiblemente a que las esporas desarrolladas infectaron algunas larvas antes de entrar al tubérculo, el cual evitó el daño y sirvió como fuente de inóculo para posteriores infecciones.

## Evaluación de severidad en tubérculos en el NIP

Se encontró que en el tratamiento 3 (Lanza químico) y el tratamiento 6 (drench químico), había mayor severidad, ya que presentó mas tubérculos afectados por planta, posiblemente porque este tipo de insecticida no alcanzó a afectar las larvas antes de entrar al tubérculo y por ello pudieron terminar su ciclo biológico dentro del mismo y producir este tipo de daño. Con relación a los tratamientos que utilizaron hongos entomopatógenos tuvieron nivel de severidad baja posiblemente porque las esporas de estos hongos si afectaron y traspasaron su hipodermis afectando las larvas en su primer instar.

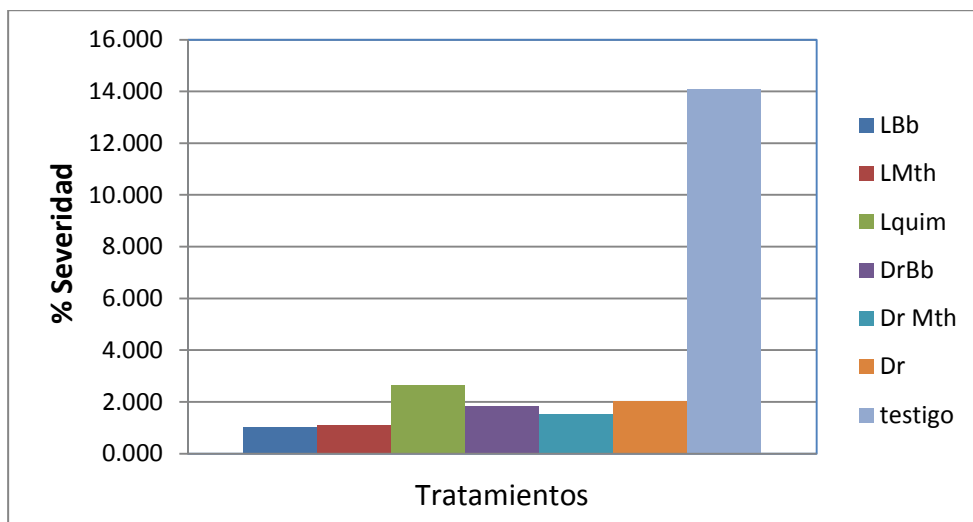


Figura 40. Severidad ocasionada por *P. vorax* en tubérculos cosechados por tratamiento establecido en el cultivo.

## Calidad y rendimiento de tubérculo cosechado

El tratamiento que se comportó relativamente mejor como lo muestra la figura 41 fue el tratamiento 4 (*B. bassiana* tipo drench) presentado buen rendimiento en tubérculos de primera. Además se corrobora con los resultados evaluados en la figura 42 donde se presenta que el 50,5% de los tubérculos son de tipo primera (gruesa), seguido de un 39,8 % de primera (mediana), y con solo un 9,2% riche (pequeña), quizás contribuyó el estado del suelo pues según Muñoz (2002), la papa prefiere suelos ligeros o semi-ligeros, sílico- arcillosos, ricos en materia orgánica y con un subsuelo profundo. Soporta pH ácidos entre 5 y 6.2, además explica Bastidas *et al.*, 2009 que una característica de un buen entomopatógeno es su habilidad para resistir condiciones físicas, para el caso de *B. bassiana* factores como la radiación solar, la temperatura y la humedad relativa disminuyen su viabilidad; aunque presenta habilidad para causar epizootias siendo capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo y así persistir

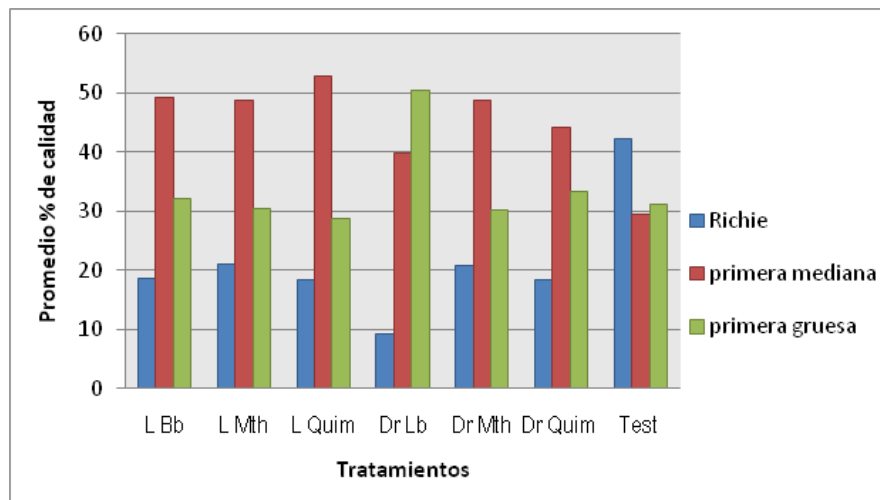


Figura 41. Calidad de tubérculos cosechados por tratamiento establecido en el cultivo

Lo anterior contrasta con lo ocurrido en el cultivo pues a finales del mes de octubre de 2011 comenzó la temporada de lluvia generando posiblemente una disminución en la formación de tubérculos para que llegaran a una homogeneidad en tipo primera gruesa, por ello una estabilidad en la primera mediana generalmente en todos los tratamientos pero destacándose el tratamiento 4 (drench *B. bassiana*) que obtuvo notablemente su mayor aporte en primera gruesa y también un buen rendimiento con relación a los demás tratamientos.

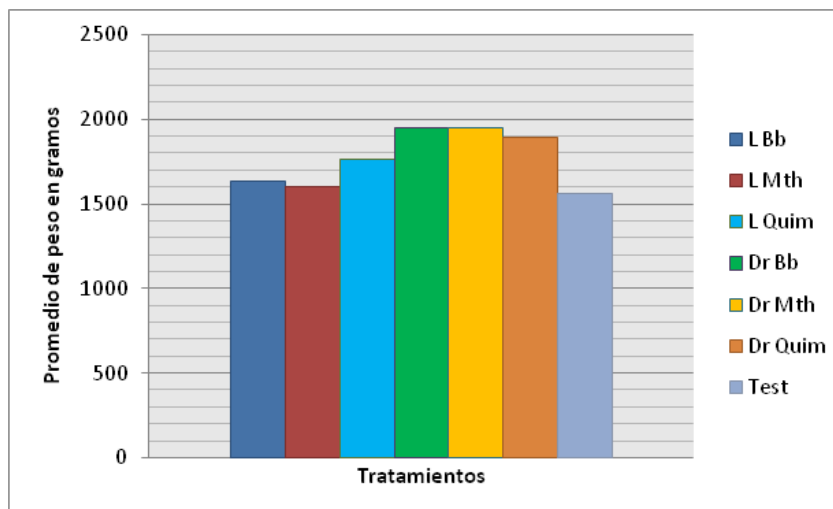


Figura 42. Rendimiento de tubérculos cosechados por tratamiento establecido en el cultivo

## **CONCLUSIONES del efecto de hongos entomopatogenos sobre *P. Vorax* a partir de una evaluación participativa con los productores de Granada**

- En los NIP's establecidos en la zona para evaluar el efecto de *Bauveria bassiana* sobre el insecto plaga *Premnotrypes Vorax* en el cultivo de Papa Criolla presentaron resultados positivos en la aplicación de este hongo, donde se evidenciar que se puede sustituir el control convencional con este manejo biológico. También se deduce que la forma de aplicación de este hongo se realiza según las condiciones Climatológicas que se presenten en la zona (Pluviosidad), ya que en el primer ensayo, en condiciones de baja intensidad de lluvias, se observó un buen resultado con la lanza inyectora y con una alta intensidad de lluvias se realizó un mejor control del insecto aplicando el Hongo en forma de Drench.
- Aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos, el tratamiento que mejor se comportó en cuanto a rendimiento, e incidencia, fue drench *Bauveria bassiana* debido a que es un entomopatógeno persistente ante condiciones climáticas adversas.
- La incidencia *P. vorax* de en la producción final del cultivo no fue significativa en los diferentes tratamientos donde se utilizaron los hongos entomopatogenos
- Uno de los factores que afecto en general todos los tratamientos fue la temporada de lluvia presente en los últimos meses del cultivo lo que provoco una recolección de los tubérculos una semana antes de lo programado.
- Se observó una diferencia significativa del testigo absoluto con respecto a los demás tratamientos evaluados, en el parámetro de severidad lo que quiere decir que el control del gusano blanco ya sea químico, biológico o cultural tiene un efecto positivo para atenuar el daño causado por el gusano blanco.
- *M. anisopliae*. no tuvo efectos positivos como controlador de *P. vorax* en esta zona, aunque se evidenció su estabilización en el suelo el cual no tenia presencia de este tipo de organismo antes de las aplicaciones.

### **5.1.7. Evaluar participativamente con agricultores de la Asociación de Productores de Granada, ASOAGRA, la aplicación de dos cepas de *Trichoderma* como control de *Rhizoctonia solani* en un cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*).**

#### **Introducción**

El género *Trichoderma* comprende un gran número de cepas que actúan como controladores biológicos, además sus cepas son relativamente fáciles de aislar y cultivar, además de que los aislamientos crecen rápidamente en diferentes sustratos, produciendo metabolitos con actividad antibiótica demostrable (Grondona, *et al.* 1997), así resulta un controlador biológico contra una amplia gama de patógenos, basado en múltiples mecanismos de acción antagonica dependiendo de la cepa (Benítez, *et al.* 2004).

Investigaciones en laboratorio evidencian el antagonismo de cepas de *Trichoderma* sobre *R. solani*, por ejemplo, el trabajo realizado por Shalini *et al.* (2007), demuestra un mecanismo de adaptación de *Trichoderma* parasitando *R. solani* por competencia y un segundo mecanismo que se basa en las formación de pequeñas vellosidades o mechones (tufts) que limitan el crecimiento del patógeno. Por otro lado, Harman *et al.* (1981); citado por Agamez, *et al.* (2009) afirma que *Trichoderma* envuelve el hongo patógeno y penetra sus células ocasionando un daño extensivo a nivel celular (pared, membrana y desorden citoplasmático), principalmente en los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros. Adicionalmente, las cepas

de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagonizados (Tovar, 2008).

Los estudios que demuestran el mico parasitismo de *Trichoderma* sp. se han realizado en su mayor parte en laboratorio, pero en campo no se han obtenido resultados significativos, sin embargo Wilson *et al.*, 2008 sugieren que el *T. harzianum* y de otras especies de *Trichoderma* reducen el chancro negro de los tubérculos y disminuye la proporción de tubérculos pequeños, acorde a estudios que demuestran estos resultados en condiciones controladas y de campo (Beagle-Ristaino y Papavizas, 1985; Tsrer *et al.*, 2001; Brewer y Larkin, 2005; citados por Wilson *et al.* 2008).

De este modo, el objetivo de esta investigación en campo fue determinar el efecto de dos cepas de *Trichoderma* probadas previamente en laboratorio como bio-controladoras de *R. solani*, en un cultivo de papa criolla en campo abierto con historial de infección, estableciendo las variables que pueden influir en un antagonismo eficaz en dichas condiciones, teniendo en cuenta tres tiempos de aplicación. En esta investigación, se determinaron 4 cepas de *Trichoderma* que presentaba buen control sobre *R. solani*; por inconvenientes de contaminación en el momento de la conservación en laboratorio de las cepas se seleccionaron las cepas T 48 y T 07, para realizar la evaluación participativa en campo.

## Metodología

### a) Activación y Reproducción de cepas

Se utilizaron las cepas de *Trichoderma*, T 48 y T 07, evaluadas inicialmente en los laboratorios de la Universidad Nacional, las cuales fueron identificadas como *T. viride* y *T. harzianum* respectivamente.

Se prepararon dos medios de cultivo, uno líquido y uno sólido para cada una de las cepas. El medio líquido se realizó con peptona al 1% y celulosa al 0.5%. El medio de cultivo sólido se elaboró con 200 g de arroz y 133.7 ml de agua destilada (Chavez-García, 2006). Estos medios se introdujeron en la autoclave a 121°C durante 7 minutos.

Medio líquido  
Peptona



Medio sólido  
Arroz



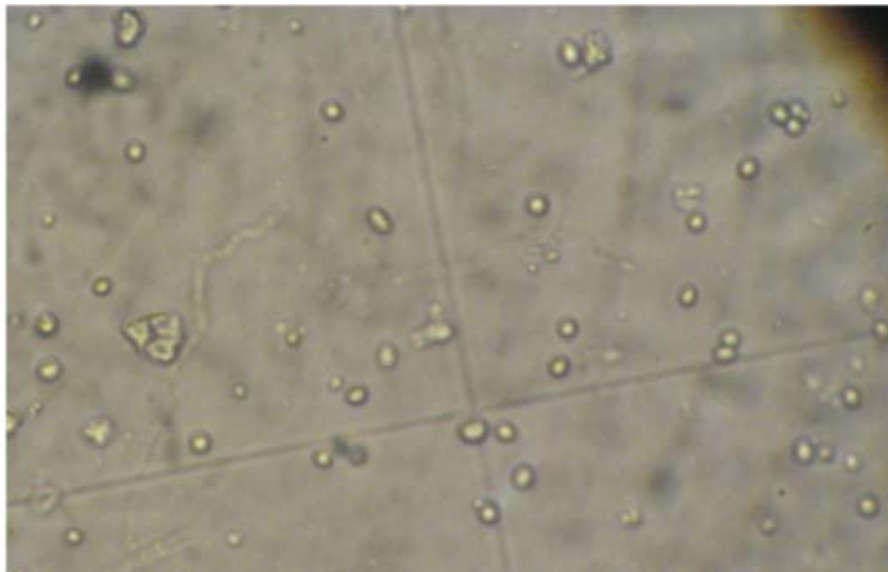
**Fotografías 99.** Medios nutritivos para cultivo de cepas de *Trichoderma*.

Después de dejar crecer *Trichoderma* en caja Petri por espacio de 10 días, se tomó un cuarto de medio por caja Petri y se introdujo en los medios de cultivo ya preparados, que posteriormente fueron llevados a incubación en cheiker (medio líquido) e incubadora a 28°C por espacio de 12

días. Transcurrido el tiempo se realizó una mezcla de los dos medios de cultivo con el fin de proliferar el hongo en mayor medida (revolver con imán). A continuación se tomaron 100 ml de *Trichoderma* crecida en medio mixto (solución concentrada del hongo) y se vertió en un envase esterilizado, utilizando un colador para evitar filtraciones de arroz, agregando 900 ml (90%) de agua destilada esterilizada para el posterior conteo de conidios.

#### b) Determinación de dosis

Se realizó un conteo de conidios/ml para *T. viride* y *T. harzianum* utilizando la cámara de Neubauer, con un microscopio en aumento de 40X. Se determinó un total de aproximadamente  $1 \times 10^9$  conidios/ml para cada especie, cuyo valor se encuentra dentro de los utilizados en productos comerciales del hongo. De este modo se aceptó la cantidad de conidios presente en la solución concentrada del hongo con el fin de aplicar en campo con una dosis de 400L/ha.



**Fotografía 100.** Conteo de UFC en Cámara de Neubauer, para encontrar dosis adecuada.

#### c) Experimento en campo

El experimento se llevó a cabo en el municipio de Granada en un lote con historial de presencia de *R. solani*. Se estableció un diseño de bloques completamente al azar, en un área de 240 m<sup>2</sup>, con 8 tratamientos y 3 repeticiones, utilizando las dos cepas de *Trichoderma* con diferentes tiempos de aplicación. Estos fueron comparados con un control químico y un tratamiento testigo, del siguiente modo:

1. *T. harzianum* "fase inicial del cultivo"
2. *T. harzianum* "fase inicial" y aporque
3. *T. harzianum* "fase inicial", aporque y floración
4. *T. viride* en "fase inicial del cultivo"
5. *T. viride* en "fase inicial" y aporque
6. *T. viride* en "fase inicial" y aporque Carbendazim
7. Control químico (Carbendazim)
8. Testigo (sin control a *R. solani*)

Cada repetición abarcaba bloques de dos camas y 4 plantas por cama (8 plantas); cada repetición se separaba de las otras por una cama sin tratamiento y cada bloque se separaba por 2 plantas/cama con el fin de disminuir el efecto borde. Los tratamientos fueron debidamente marcados y separados con fibras plásticas a 50 cm del suelo.



**Fotografía 101.** Distribución de tratamientos en lote cultivado con papa criolla.

La primera aplicación se realizó en una “fase inicial”, que correspondió en este ensayo a los 40 dds, la de aporque se ejecutó a los 50 dds y la de floración a los 80 dds.



**Fotografía 102.** Lanza inyectora para incorporar las cepas de *Trichoderma* al suelo.

Previo al aporque, se realizó una evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad en campo, a través de la observación de los tallos, tomando el número de tallos afectados por planta y midiendo la longitud del chancro (mancha café ocasionada por *R. solani*) así como el diámetro del tallo afectado y su porcentaje de infección (25, 50, 75 y 100%); de este modo se obtuvo un valor de severidad en razón al área ocupada por el chancro en mm<sup>2</sup>.

#### d) Manejo de productos en el cultivo

Se realizó fertilización edáfica únicamente en la siembra, y se utilizó un producto de fertilización foliar llamado Enford® a base de N y P (250 g/200 L). Esta aplicación se realizó antes de la labor de aporque. Posteriormente se realizó una aplicación foliar de aminoácidos (500 cc/200 L).

Para el control de enfermedades como la gota, se realizaron aplicaciones foliares de clorotalonil (250cc/200L), mancozeb (1000g/200L) y cymoxanil (500g/200L) en todo el cultivo, sin embargo en las parcela en estudio se omitió la aplicación de cymoxanil, ya que no se encontraban referencias bibliográficas que demostraran su compatibilidad con *Trichoderma spp.*

#### e) Cosecha

La cosecha se realizó a los 120 dds, empacando en bolsas cada tratamiento con sus respectivas repeticiones. Esta producción fue llevada a laboratorio para su posterior análisis.

#### f) Análisis poscosecha

El análisis de la cosecha se realizó en el laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia; la producción a analizar fue previamente lavada y secada al aire libre. Como primera medida se tomó el peso total de cada bloque cosechado. Posteriormente se midió el número de tubérculos cosechados por tratamiento con su respectivo diámetro, estableciendo el valor de severidad de *R. solani* basada en la escala (1-5-10-15) realizada por C-James (1971).



Fotografías 103. Evaluación pos cosecha en laboratorio.

#### g) Análisis de datos

Los análisis de datos se realizaron por medio de pruebas de Normalidad de Kolmogorov y Shapiro wilk y pruebas de Homocedasticidad de Levene y Bartlett. Posteriormente se realizó el análisis de varianza de BCA para cada variable y las variables con efecto de tratamiento se realizaron pruebas LSD para encontrar dicho efecto. Por último se obtuvieron graficas de promedios de cada variable.

## Resultados

La tabla 45 presenta los valores de probabilidad, y determina si hubo o no diferencias entre los tratamientos evaluados

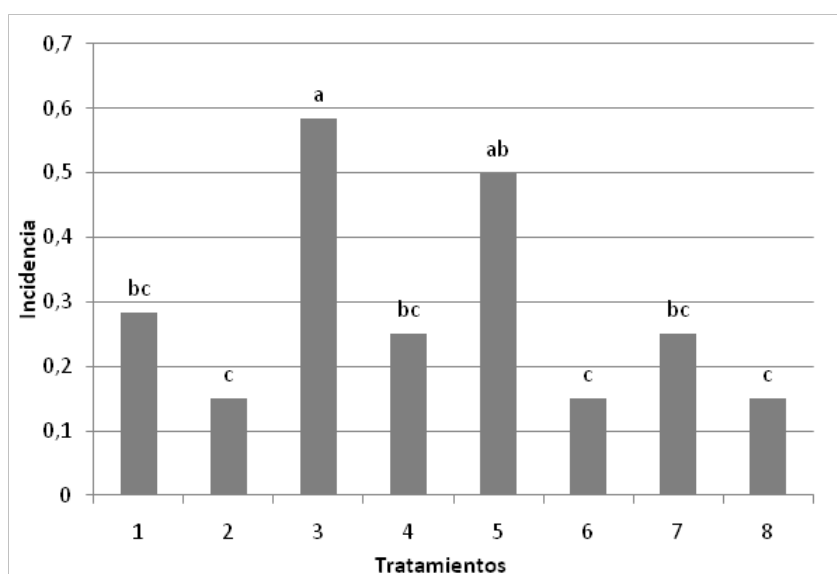
Variable	Probabilidad	Diferencias entre tratamientos
<b>Evaluación en campo</b>		
Número de tallos	0,77	NO
Incidencia de <i>R. Solani</i>	0,04	SI
# tallos afectados por planta	0,04	SI
Severidad chancro/tallo	0,48	NO
<b>Evaluación poscosecha</b>		
Número de tubérculos	0,03	SI
Diámetro del tubérculo	0,7	NO
Severidad	0,3	NO

**Tabla 45.** Valores de probabilidad arrojados por el análisis de varianza

### a) Evaluación en campo

El número de tallos por planta varió de 4 a 11 tallos en el área de ensayo al momento de la evaluación, sin mostrar diferencias significativas por tratamiento, lo que puede hacer referencia a un desarrollo homogéneo de las plantas evaluadas, con una equilibrada toma de recursos disponibles del suelo (agua y nutrientes inorgánicos) y de la atmósfera (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y RFA), (Rodríguez, *et al.* 2003), descartando que la acumulación de materia seca y el rendimiento por tratamiento dependa de esta variable.

La prueba LSD para la incidencia de *R. solani* muestra diferencias entre tratamientos en el momento de la evaluación, donde se evidencia mayor incidencia de la enfermedad en las áreas donde se sería aplicada *T. harzianum* en las 3 fases del cultivo (siembra, aporque y floración) y en donde sería aplicada *T. viride* en 2 fases (siembra y aporque), sin embargo esto puede mostrar un estado inicial de la enfermedad sobre el cultivo, y no el efecto de tratamiento, ya que en el momento de la evaluación de tallos no se habían culminado las aplicaciones, confirmando únicamente la presencia del patógeno en el lote de evaluación, que en condiciones naturales resulta heterogénea.



**Figura 43.** Incidencia de *R. solani* en tallos de las plantas del cultivo papa criolla a los 48 días después de siembra (dds)



EL número de tallos que presentaron lesión presentó un comportamiento muy similar a la medida de incidencia, ya que las plantas que presentaron la enfermedad poseían de 1 a 2 tallos afectados, dando una relación aproximada de 1:1 (Incidencia:un tallo por planta).

Para el caso de la severidad en tallos no se observó diferencia en el área (mm<sup>2</sup>) afectada con el chancro, debido probablemente a que la evaluación se realizó 48 dds, justo antes de efectuar la labor de aporque; en este momento el crecimiento del patógeno resultó homogéneo, esto puede deberse a que los esclerocios y los micelios del hongo germinan y afectan los tejidos jóvenes (ubicados en la parte inferior de los brotes en emergencia y estolones) de las plantas (Torres, 1997) y en el momento de la evaluación no disponía de estos para poder seguir aumentando su crecimiento en la parte aérea, teniendo en cuenta la edad de las plantas.

### b) Análisis postcosecha.

El peso de la producción no mostró efecto de tratamientos, sin embargo el número de tubérculos tuvo diferencias estadísticamente significativas con una probabilidad de 0,03 donde los tratamientos con *T. harzianum* en siembra, *T. viride* en siembra y aporque y el tratamiento químico obtuvieron mayor número de tubérculos, siendo los tratamientos con *T. harzianum* en siembra y aporque y *T. viride* en siembra los que presentaron menor número (Figura 44).

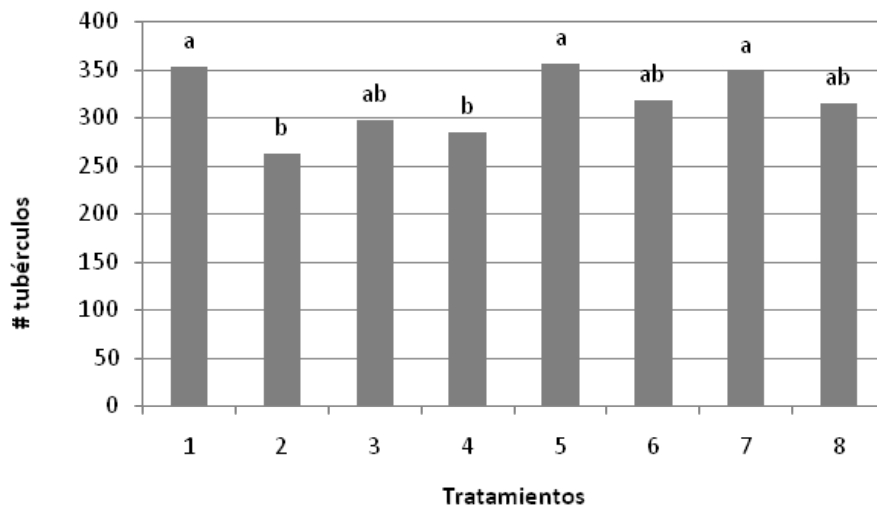


Figura 44. Diferencias en el número de tubérculos cosechados por tratamiento

Para el análisis de diámetro del tubérculo y de severidad por *R. solani* inicialmente se tomó como si cada unidad fuera un sub-muestreo, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con valores de probabilidad de 0,77 y 0,38 respectivamente. Posteriormente se tomó el promedio de cada repetición obteniendo los mismos resultados.

Aunque los pesos por tratamientos resultaron muy similares, las diferencias por tratamiento en el número de tubérculos indica que existen diferencias de tamaño que no se evidencian en los resultados de diámetro por promedio, pero en la comercialización directa al consumidor puede ser más notoria, siendo más favorable aquellos con menor número de tubérculos de mayor tamaño.

Sin embargo, la variable de número de tubérculos no necesariamente puede atribuirse los efectos de tratamiento, ya que no se muestra un patrón que pueda determinar que las diferencias presentadas en la evaluación se deba a las aplicaciones realizadas en el experimento, teniendo en cuenta que se trata de un sistema productivo en campo, donde influyen más variables que las que se desean evaluar.

Para el caso de la severidad, los resultados indican que los tratamientos químico y biológicos no son eficaces para el control de *R. solani* en las condiciones del ensayo, sin embargo se pueden denotar las variables que deben ser controladas para que el antagonismo que las dos cepas de *Trichoderma* presentan *in vitro* se manifieste en condiciones de campo.

Además de tener en cuenta las condiciones edáficas, resulta de gran importancia el tiempo de aplicación, ya que el hongo antagonista debe ingresar al sistema biológico donde se encuentra establecido el patógeno que se desea controlar, de este modo y considerando el tiempo que demoran las cepas de *Trichoderma* en establecerse en la rizósfera, resulta más eficiente realizar la primera aplicación antes de la siembra.

Teniendo en cuenta que en el presente ensayo la primera aplicación se realizó 40 dds por disponibilidad de las cepas y no obtuvo el control deseado; así, se demuestra la importancia del momento de aplicación que puede resultar en el control significativo de hongos patógenos, como es el caso de *R. solani*, que disminuyó de manera considerable al realizar aplicaciones de *Trichoderma* spp. antes de la siembra en cultivos como zanahoria, frijol, tomate, clavel y papa (Tovar, 2008).

Por otro lado, teniendo en cuenta las condiciones ambientales, cabe mencionar el fenómeno de la niña presente durante la ejecución del ensayo, que a pesar de un control integrado de diferentes enfermedades, por las fuertes lluvias presentadas al final del ciclo (100 dds) el área experimental se vio altamente afectada por tizón tardío o gota (*Phytophthora infestans*), probablemente debido a la no aplicación de fungicidas con ingrediente activo cymoxanil.

Esta enfermedad presenta manchas redondeadas de color marrón en hojas y tallos, ocasionando un daño indirecto, ya que al reducirse las funciones fotosintéticas hay una disminución en el rendimiento (Urquijo y Landaluze, 1961; citado por Rodríguez *et al.* 2010). Sin embargo, cuando la enfermedad desarrolló una incidencia y severidad cercana al 80%, el cultivo se encontraba culminando la fase de floración plena donde las hojas realizan su mayor actividad fotosintética y comenzando la etapa de maduración de los tubérculos donde las actividad fotosintética disminuye (Rodríguez *et al.* 2010), de este modo, el tamaño de tubérculos y por lo tanto el peso final de la producción alcanzaron a ser afectados por la enfermedad.

## **Conclusiones del trabajo desarrollado en campo**

- La aplicación de *T. harzianum* y *T. viride* no presentó un control significativo en este ensayo, debido probablemente omisión de la aplicación pre-siembra o siembra. Adicionalmente el tratamiento químico con Carbendazim no presentó un control sobre *R. solani*.
- La gota (*P. infestans*) al ser una de las enfermedades más limitantes del cultivo de papa criolla debe ser controlada eficazmente durante todas las etapas del cultivo. Para esto se puede recomendar la aplicación foliar de diferentes cepas de *Trichoderma* que han demostrado un control eficiente del patógeno junto a un manejo integrado (Pérez y Forbes, 2008, Ramón, *et al.* 2011)
- Para lograr establecer las mejores condiciones que denoten la dosis precisa, los tiempos de aplicación necesarios y el correcto manejo integrado que incluya el control de otras enfermedades, se recomienda realizar repeticiones del ensayo en diferentes épocas del año que pueden presentar condiciones ambientales variadas con diferentes influencias sobre el cultivo.

**Objetivo específico 6:** Difundir el conocimiento y experiencias probadas con investigadores de otros países, técnicos locales y agricultores en las zonas piloto de cada país.

**Actividad. 6.3. Compartir la tecnología desarrollada con grupos de agricultores participantes en el proyecto.**

## **Introducción**

Es importante anotar que las actividades desarrolladas dentro del Proyecto, se realizaron con el enfoque de Innovación Participativa (IP), tendiente a generar y/o adaptar soluciones prácticas de desarrollo tecnológico acompañadas de procesos de acompañamiento social, organizativo y empresarial que propendan por que las comunidades rurales se apropien y lideren sus propios procesos de desarrollo sostenible.

Los procesos basados en IP buscan recuperar el conocimiento tradicional de los agricultores y desarrollar sus capacidades para experimentar, analizar, innovar y discernir sobre sus problemas y la mejor manera de solucionarlos. Estos procesos, a la vez, permiten ampliar los conocimientos de los pequeños agricultores y facilitan la adopción de las tecnologías generadas y de los productos tecnológicos obtenidos. Asimismo, el desarrollo y aplicación de esta metodología promueve la participación de los pequeños agricultores en todas las fases de los programas y proyectos: desde la identificación de los problemas, la formulación de los proyectos y la determinación de las soluciones, hasta la evaluación y seguimiento.

Con el apoyo de programas de capacitación en crecimiento personal y desarrollo de habilidades grupales, la metodología de IP busca que las comunidades rurales recuperen la confianza en sus capacidades, conocimientos y experiencias, y de esta manera se decidan a participar organizada y activamente en los procesos de investigación y, con base en éstos, emprendan actividades de innovación tecnológica y empresarial.

Estos aspectos son fundamentales para que las comunidades participantes se apropien del proyecto y que en conjunto con los investigadores profesionales, las comunidades adopten las tecnologías de producción y uso de bioinsumos en sus cultivos para que logren reducir sus costos de producción, conservar sus tierras y generar nuevos negocios comunitarios que coadyuven al desarrollo regional.

## **Metodología**

Siguiendo la metodología de Innovación Participativa (IP), se desarrollaron las siguientes actividades con las organizaciones de campesinos vinculadas con el trabajo de la Corporación PBA, las cuales participaron activamente en el desarrollo de las actividades del proyecto:

### **- Socialización de las actividades del proyecto :**

Mediante la realización de talleres participativos se socializaron las actividades del proyecto de manera amplia a las comunidades, tomando decisiones y realizando planes participativos para el desarrollo de las actividades.

- ***Selección participativa del problema de producción***

Los mismos agricultores seleccionaron participativamente los problemas agronómicos de producción más relevante en su región y a partir de allí se propuso una solución a través del uso de Bioinsumos.

- ***Socialización del avances y progresos de las actividades de investigación y su relación con otras iniciativas:***

Es importante mencionar la existencia de los Comités Directivos – conformados por líderes de productores y entidades de acompañamiento- en los cuales se programaron participativamente las actividades del proyecto y evaluaron los resultados. De igual forma, se propició un acompañamiento para que los agricultores se apropiaran de los procesos, y participaran y lideraran las actividades. Los comités directivos fueron dirigidos por los mismos productores quienes mostraban los avances del proceso. De igual forma, las organizaciones contaron con subcomités de trabajo con base en las áreas que manejan en el marco de la Innovación Rural Participativa.

Esta estructura organizativa se había venido consolidando a través de los proyectos del Programa Andino, financiados y acompañados por la Corporación PBA y entidades aliadas de investigación. Las organizaciones identificaron actividades nuevas y complementarias no cubiertas dentro de este Programa, que fueron adelantadas en este proyecto, las cuales se ejecutaron aprovechando el funcionamiento de estas estructuras organizativas. Esto permitió contar con una participación activa y una apropiación por parte de los productores, garantizando la sostenibilidad de los procesos emprendidos.

- ***Acompañamiento social***

De igual forma, con estos grupos de agricultores de los municipios de Granada, Sibaté, Saboyá, Subachoque, Ventaquemada y Soracá se realizaron procesos de acompañamiento socio empresarial a través de las metodologías de Empoderamiento para pequeños Productores Rurales (EPPR) y Desarrollo Organizativo para la Innovación – DOI, los cuales permitieron recuperar la confianza en las capacidades de los agricultores para que se decidan a liderar procesos de investigación y desarrollo empresarial orientados a contribuir con el bienestar de su región. Estos aspectos fueron indispensables para garantizar la apropiación, aplicación y sostenibilidad de los procesos de innovación tecnológica que se adelantó con esta propuesta. De igual forma se realizaron intercambios y reuniones regionales, para que los productores de las diferentes regiones compartieran conocimientos y se enriquezcan mutuamente.

- ***Intercambio de experiencias***

Los productores de las zonas de trabajo, donde se llevaron a cabo las investigaciones en el desarrollo de Bioinsumos, realizaron visitas o intercambios de experiencias con productores de otras zonas del país donde existen experiencias positivas con el uso de abonos orgánicos y uso de bioplaguicidas, igualmente los productores visitaron los laboratorios y centros experimentales donde se llevaron a cabo procesos de investigación, en este caso las instalaciones de la Universidad Nacional donde se evaluaron la mayoría de los Bioinsumos desarrollados con este proyecto.

## Resultados

Todas actividades técnicas del proyecto se desarrollaron con un enfoque de Innovación Participativa (IP) y con participación activa de los agricultores.

### Logros de Desarrollo Organizativo que se destacan en la ejecución del Proyecto

En el desarrollo de este proyecto, cabe destacar que como resultado del acompañamiento social y técnico, los productores de varios grupos de Ventaquemada decidieron conformar la organización denominada Orgánicos & Asociados de Ventaquemada, compuesta por 14 socios representantes de 3 organizaciones en la zona, (que están ejecutando procesos de Innovación Rural con la corporación PBA), quienes vienen produciendo y utilizando el abono orgánico en la zona. De acuerdo al acompañamiento realizado por parte de la Corporación PBA se logró evidenciar el empoderamiento y crecimiento organizacional lo cual ha permitido generar un desarrollo de trabajo en equipo en el proceso para producción de Bioinsumos y un aporte al mejoramiento de su calidad de vida. De igual forma estas actividades sociales garantizaron la sostenibilidad de los procesos de investigación e innovación emprendidos, generando un impacto más allá del esperado. Hoy en día Orgánicos & Asociados, funciona de manera autónoma y sostenible como una empresa que produce los abonos para los socios (la mayoría paperos), quienes cambiaron la fertilización netamente química (3 bultos por una carga de papa) a una producción mas limpia (dos bultos de abono orgánico x uno de químico por cada carga de papa).



**Fotografías 104.** Grupos de agricultores conformados y empoderados de los procesos de Innovación tecnológica durante la ejecución del proyecto (Orgánicos & Asociados IZQ. Grupo Soracá DER.).

Es significativo mencionar que durante este proceso cada uno de los participantes fortaleció sus capacidades de liderazgo, trabajo en equipo, autoestima, comunicación, lo que permitió identificar nuevos líderes y nuevas potencialidades para la comunidad.



**Fotografías 105.** Desarrollo organizativo de pequeños productores en torno al proceso de producción de Bioinsumos.

De otro lado, se logró un empoderamiento y crecimiento organizacional del proceso de la Asociación ASPROCAF del municipio de Fómez, quienes se especializaron en la producción limpia, proyectados a una producción Orgánica, con el uso de los Bioinsumos producidos y mejorados participativamente en la planta de la organización. Por último, se destaca el aprendizaje y la implementación del proceso en el desarrollo de Bioinsumos por parte del grupo de Agrosolidaria, seccional Soracá, donde la mayoría de los asociados son mujeres.

### **Socialización del avance y progreso de las actividades de investigación**



**Fotografía 106.** Socialización de los resultados de obtenidos en las investigaciones de laboratorio.

Los avances del desarrollo de las actividades del proyecto, fueron socializados en los diferentes comités directivos y/o con la realización de talleres técnicos participativos por parte de los investigadores, donde se daban a conocer, de forma dinámica, el desarrollo de las investigaciones en las fases de Laboratorio; por otro lado, se discutían metodologías desarrolladas con los agricultores en campo, generando un intercambio de saberes entre la comunidad.



**Fotografías 107.** Socialización de avances por parte de los productores en la producción de Bioinsumos



**Fotografías 108.** Agricultores e investigadores compartiendo experiencias con relación al uso de los microorganismos, en los laboratorios de la Universidad Nacional.

Además se participó de diferentes encuentros nacionales, como lo fueron El 37º Congreso de la Sociedad Colombiana de entomología, El VI Simposio Nacional de Agroecología y el 3º Congreso Colombiano de Microbiología, donde se dieron a conocer los procesos de desarrollo en Bioinsumos en las diferentes zonas donde se ejecutó este proyecto.



Fotografías 109. Participación en Congresos Nacionales en la socialización de diferentes actividades.

## Encuentro de productores para el intercambio de experiencias, conocimientos y avances en el proceso de innovación en la producción y uso de bioinsumos

Se realizó un primer encuentro de Experiencias sobre Bioinsumos en el municipio de Ventaquemada, Boyacá, en el mes de julio/11 con productores que tiene un proceso en el desarrollo de Bioinsumos de diferentes localidades de la región Cundiboyacense del país, donde se socializaron las actividades realizadas por cada grupo y se discutieron los avances de los diferentes proyectos desarrollados en cada zona. Se conto con la participación de 65 productores de los municipios de Aquitania, Tipacoque, Soracá, Fómeque, Granada, Sibaté, Boyacá, Simijaca, Ruralidad de Bogotá, Turmequé, Sogamoso y Ventaquemada.

# 1° INTERCAMBIO DE EXPERIENCIAS SOBRE BIOINSUMOS

## GRUPOS PARTICIPANTES

Centro Ecológico M y C	Agrosolidaria Soracá	Asoparcela Aquitania
Asprocaf Fómeque	Criolla Oro Sibaté	Asoagra Granada

## GRUPOS INVITADOS

COINPACOL Soracá	EAT El Porvenir Simijaca	Agrosolidaria Tipacoque
Tubérculos Andinos Turmequé		
GPL Tota Aquitania	GPL Crucero Sogamoso	GLP Usme
		GLP Ciudad Bolívar







Fotografía 110. Presentación del encuentro de agricultores en Ventaquemada, Boyacá.



Este encuentro permitió la generación de un debate sobre los diferentes procesos que se desarrollan en cada zona, el enriquecimiento del conocimiento por parte de los participantes y la solución a diferentes problemáticas de algunos grupos de trabajo.



**Fotografía 111.** Integración de productores en el Encuentro

### **Intercambio de experiencias**

Los agricultores conocieron el proceso investigativo que se desarrolla en los laboratorios y compartieron su experiencia y expectativas frente al uso de los Bioinsumos. Dentro de este intercambio se han vinculado al intercambio de experiencias mediante la Redes del Consorcio Andino, y más específicamente la Red de Bioinsumos donde se plantean diversos problemas y procesos en la producción de Bioinsumos por parte de los productores de los 4 países andinos vinculados actualmente en el Consorcio Andino.



**Fotografías 112.** Intercambio de experiencias con otras organizaciones en la producción de Bioinsumos

A partir de los intercambios de experiencias realizadas entre los Productores se han conocido nuevas técnicas en el desarrollo y evaluación de Bioinsumos, donde algunos productores tomaron la iniciativa de replicar estas técnicas en la zona con los productores que hacen parte de su Equipo de trabajo. Además se participó de seminarios en Agricultura Orgánica para mejorar técnicas en la producción de abonos orgánicos.




Fotografías 113. Participación de los productores en seminarios de Agricultura Orgánica

Dentro de las nuevas técnicas que vienen desarrollando los productores están:

- Elaboración de Caldos Minerales
- Desarrollo de Purines e Hidrolatos
- Implementación casera para producción de hongo Micorriza
- Consecución de minerales para enriquecer los Bioinsumos, como harina de hueso
- Procesamiento del abono para elaborar Bocashi liquido
- Aprovechamiento de Azucares para estimular el crecimiento vegetativo como Te de frutas

Finalmente en los intercambios de experiencias vividos por los agricultores, se elaboraron cartillas y manuales didácticos para el uso potencial de microorganismos y diversas tecnologías para la producción de Bioinsumos con los agricultores

## CARTILLA DE CALDOS MINERALES



*« Un mayor o menor ataque a las plantas provocado por insectos y microorganismos, depende de su estado de equilibrio nutricional.»*

Jairo Hernández Rivera

Esta cartilla no es un recetario, sólo son algunas ideas prácticas. Experimente, adapte e invente, que aporte a la independencia.

### Caldo Bordelés

**Ingredientes:**

Para preparar 100 litros:

- 1 Kg. de sulfato de cobre.
- 1 Kg. de cal hidratada.
- 2 Tinajas plásticas (una de ellas debe ser de 100 litros).
- 1 Machete o pedazo de hierro.

**Manera de prepararse:**


1. Disuelva en la tina A. en 10 litros de agua el sulfato de cobre.
2. En la tina B. en 90 litros de agua diluya la cal.
3. Agregue el sulfato de cobre (tina A) sobre la (tina B) que tiene la cal apagada (nunca al revés) y revuelva constantemente.
4. Compruebe si la acidez es óptima, sumergiendo un machete en el caldo por un minuto, aérelo y observe. Si la hoja se oxida requiere más cal sino, está listo.

Se usa inmediatamente después de prepararlo.  
Se puede conservar hasta por 3 días.

**Modo de usarlo**

- ✓ Este caldo se diluye en agua, 3 partes de agua por una parte de caldo para cultivos como ajo, cebolla, tomate, remolacha.
- ✓ En cultivos como el frijol y repollo se utiliza, una parte de caldo por una parte de agua.

**Mezcla 2:1**



- Agua
- Zanahoria
- Cilantro
- Café
- Hidrolatos

✓ En cultivos como la papa y la zanahoria cuando tengan 30 cm. de altura aplique el caldo bordelés puro (sin diluir) o diluido en dos partes de caldo por una de agua.

✓ El caldo bordelés se utiliza como fungistático en cultivos.

✓ Se puede aplicar cada dos o tres semanas. Puede alternarse con caldo visosa.

✓ Se aplica al follaje, principalmente al envés de las hojas.

**Recomendaciones:**

1. No haga aplicaciones en plantas pequeñas recién germinadas ni en florecimiento.
2. El suelo debe estar húmedo antes de aplicarlo.
3. Utilice siempre aspersor con boquilla plástica, nunca metálica.
4. Para la aplicación del caldo bordelés no se debe usar equipos con los que se haya aplicado venenos.
5. Para preparar pasta bordelés se necesita: 2 Kg. de sulfato de cobre, 1 Kg. de cal y 12 Litros de agua.
6. El caldo bordelés con permanganato de potasio se puede preparar agregando, a 100 litros de caldo bordelés, 100 gr. de permanganato de potasio.

### Caldo Visosa

**Ingredientes:**

Para preparar 100 litros:

- 500 Gr. de sulfato de cobre.
- 500 Gr. de cal hidratada.
- 600 Gr. de sulfato de zinc.
- 400 Gr. de sulfato de magnesio.
- 400 Gr. de ácido bórico.
- 2 Tinajas plásticas (una de ellas de 100 litros).
- 1 Machete o pedazo de hierro.
- 100 Litros de agua.

Fotografías 114. Cartillas para el uso de Bioinsumos desarrolladas con agricultores



**Fotografías 115.** Participación de los productores en seminarios y talleres de Agricultura Orgánica  
**Acompañamiento social**

Los pequeños productores consolidaron estructuras organizativas, operativas y funcionales, que incluyen al área de bioinsumos como un subcomité de trabajo.

Las comunidades se reúnen en comités directivos liderados por ellos mismos donde se planea y se realiza el seguimiento a las actividades de manera coordinada entre todos los actores.

Los agricultores se apropiaron de las actividades del proyecto, mejorando su conocimiento y la aplicación en su diario vivir. Los productores mejoran su autoestima y desarrollaron capacidades de trabajo en equipo.

Los productores desarrollaron capacidades para la investigación, y aportaron sus ideas y conocimiento para el buen desarrollo de los procesos.



**Fotografías 116.** Desarrollo organizativo de pequeños productores en torno al proceso de producción de Bioinsumos.

Los productores aprendieron a determinar sus costos de producción y desarrollaron capacidades para la elaboración de planes de negocios.

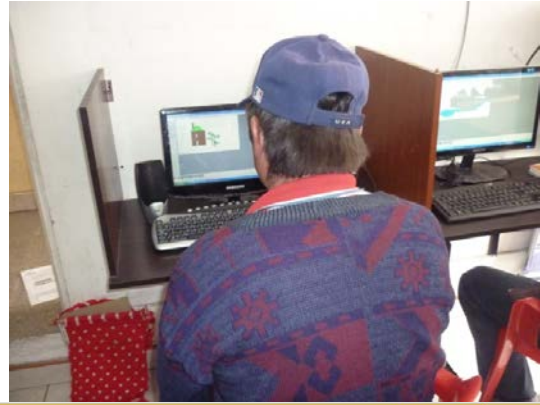
Durante el proceso realizado en el desarrollo del proyecto, las organizaciones se fortalecieron en las metodologías DOI y EPPR, desarrollando un proceso enriquecedor, que permitió la articulación y empoderamiento de cada uno de los productores, así mismo la de sus familias y la misma comunidad.



**Fotografías 117.** Construcción familiar y grupal, en talleres sociales.

De otro lado, se promovió el interés de que los agricultores se motiven en participar del proceso de alfabetización digital, permitiendo un mejor desarrollo en su calidad de vida y, por supuesto, estar en los espacios de comunicación de la actualidad, logrando que sus procesos de mercadeo e investigación se amplíen y sean más innovadores para el mundo actual.

Los productores, por medio de talleres de alfabetización digital, se han vinculado a las redes de la plataforma del Consorcio Andino donde la mayoría se vincularon a la red bioinsumos para conocer experiencias de otras organizaciones por medio de Videos, documentos, comentarios y discusiones que hacen parte la plataforma virtual en la pagina del Consorcio.



**Fotografías 118.** Taller de alfabetización digital y Participación en redes virtuales

De acuerdo al trabajo desarrollado, se evidenció la necesidad de comenzar a plantear y formular las estrategias que permitan en algunos grupos de trabajo organizarse legalmente para un mejor desarrollo en los procesos, es el caso del grupo de Orgánicos & Asociados. Por este motivo se construyó de forma participativa los estatutos, las reglas de trabajo, la revisión de qué tipo de organización desean trabajar y todo cuanto implica este proceso.

Así mismo se desarrolló un previo trabajo para que cada agricultor adquiera la responsabilidad y el compromiso que merece la participación en una organización establecida; también que cada uno de ellos juegue un papel fundamental e importante en cada uno de los procesos y toma de decisiones de los mismos.

Los productores se empoderaron de sus procesos y contribuyeron al desarrollo de cada una de sus necesidades en el trabajo individual y grupal, aportando de una manera u otra a darles una solución viable y oportuna, mostrando que cada uno de los proyectos merece una inversión de parte y parte, y es responsabilidad de todos y para todos.

# **Proyecto: Desarrollo de bioinsumos para la producción sostenible de hortalizas con pequeños agricultores para una soberanía alimentaria en Los Andes**

## **PRODUCTO 1 Bolivia**

### **DESARROLLO DE UN CEPARIO EN CADA PAIS DEL CONSORCIO Y CARACTERIZARLOS**

**Aislamiento y evaluación de cepas del Altiplano por su eficiencia a la fijación de nitrógeno**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

Doscientos sesenta cepas de bacterias endófitas de quinua fueron aisladas de tres colectas del Altiplano Sur de Bolivia correspondiendo a las comunidades de Quillacas, Challapata, Salinas de García Mendoza y Santiago de Huari del Departamento de Oruro. Las cepas fueron probadas para detectar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Se encontraron treinta y un aislados potenciales para la fijación de nitrógeno. Debiéndose caracterizar las cepas fijadoras de nitrógeno para su posterior evaluación en campo.

**Palabras claves:** Bacterias endófitas, fijadoras de nitrógeno

#### **1. Objetivo:**

Determinar que cepas de endófitas de quinua de la colección de la Fundación PROINPA tienen la capacidad de fijar nitrógeno.

#### **2. Hipótesis**

Las bacterias que viven en tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente (endófitas) son capaces de fijar nitrógeno.

#### **3. Revisión de literatura**

La fijación biológica de nitrógeno o reducción de  $N_2$  a  $NH_4$ , es un proceso que pueden llevar a cabo solo algunos procariontes gracias a que poseen el complejo enzimático conocido como nitrogenasa, la cual está formada por dos proteínas: una proteína que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene molibdeno Mo es la más ampliamente distribuida (G. Espín, 2006).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, ocupan un nicho ecológico indispensable ya que suplen de nitrógeno fijado al ciclo global del nitrógeno. Gracias a este papel los diazótrofes están presentes en virtualmente todos los ecosistemas, con representantes en ambientes tan variados como

la superficie de los océanos (*Tricodesmium*), los nódulos de las raíces de las plantas (*Rhizobium*), y en suelos aeróbicos como es el caso de *Azotobacter* (G. Espín, 2006).

Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno son de vida libre, es decir que no requieren una planta huésped para llevar a cabo este proceso, al contrario de las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, que sólo pueden llevar a cabo este proceso en asociación con algunas plantas a través del proceso de simbiosis. Entre las bacterias capaces de fijar nitrógeno de vida libre se encuentran: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Klebsiella*, *Bacillus polymyxa*, *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. (Magallón P. y Dion P., 2009)

Los *Azotobacter* son bacterias Gram negativas, con sensibilidad a pH ácidos, alto contenido de sales y temperaturas superiores a 35°C. No son considerados como buenos competidores para la utilización de las fuentes de carbono y otros nutrientes en los suelos. Tienen capacidad para fijar hasta 10 mg de N por cada gramo de carbohidrato utilizado. Los *Azotobacter* son bacterias heterotróficas y aeróbicas que fijan nitrógeno en forma libre. Son muy comunes en el agua, el suelo y la superficie de las plantas, tanto de sus partes aéreas como de sus raíces. En unos experimentos de campo, se demostró un efecto favorable de la inoculación de plantas con *Azotobacter*. (Magallón P. y Dion P., 2009)

Por las características mencionadas anteriormente de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, el presente trabajo se enfocará a seleccionar las mejores cepas bolivianas como una alternativa económica ecológicamente limpia frente a la fijación química. Siendo que la fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del nitrógeno en la práctica agrícola, ya que la cantidad de nitrógeno disponible en la mayoría de los suelos cultivados es baja, es de vital importancia el aislar cepas eficientes y promisorias para los cultivos.

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.1. Materiales

##### 4.1.1. Material biológico

Cepario de la Fundación PROINPA. Colección de bacterias endófitas de quinua de tres colectas. Las bacterias endófitas de quinua 1 corresponden a las comunidades de Quillacas y Challapata de la Provincia Abaroa del Departamento de Oruro (Tabla 1); la colecta fue realizada por el Ing. Oscar Navia cuando las plantas estaban en formación del fruto (figura 1) campaña 2008.

Tabla 1. Bacterias Endófitas de Quinua 1

Código	Localidad	Características de la planta
1	Quillacas	Hojas medianas planta verde claro 1/2 enferma
2	Quillacas	Hojas medianas planta verde claro 1/4 enferma
3	Quillacas	Hojas medianas planta verde amarillo
4	Quillacas	Hojas grandes planta 1/2 enferma
5	Quillacas	Hojas normales planta sana
6	Challapata	Hojas normales planta enferma
7	Challapata	Hojas grandes y medianas planta 1/2 enferma
8	Quillacas	Hojas pequeñas planta 1/2 enferma
9	Quillacas	Hojas grandes planta 1/2 enferma
10	Challapata	Hojas muy grandes planta 1/5 enferma
11	Challapata	Hojas pequeñas planta enferma



Figura 1. Plantas de Quinoa campaña 2008.

En cuanto a las bacterias endófitas 2 y 3 corresponden a las comunidades de Salinas de García Mendoza de la Provincia Ladislao Cabrera y Santiago de Huari de la Provincia Sebastian Pagador del departamento de Oruro (Tabla 2). Las bacterias endófitas 2 corresponden al inicio del cultivo (Figura 2) la colecta fue realizada en Noviembre del 2009. Las bacterias endófitas 3 corresponden a la mitad del desarrollo del cultivo (Figura 3) la colecta fue realizada en Enero del 2010. La persona encargada del muestreo fue el Ing. Samuel Villca.

Tabla 2. Bacterias Endófitas 2 y 3.

Código	Lugar	Otros
1	Salinas de García Mendoza Cerro del Hotel Sukorani	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano
2	Salinas de García Mendoza Agua Mineral Cerro	Sembrado a tractor sin aplicación de pesticidas
3	Salinas de García Mendoza Faldas del Cerro Viscachera	Sin aplicación de pesticidas
4	Salinas de García Mendoza Cerro Viscachera Parada Z	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano
5	Salinas de García Mendoza Pitca falda del Cerro	Sin aplicación de insecticidas sembrado a tractor Parcela 1
6	Salinas de García Mendoza Pitca cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
7	Salinas de García Mendoza Tambillo cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano Parcela 1
8	Salinas de García Mendoza Tambillo cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
9	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 1
10	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
11	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 3



12	Salinas de García Mendoza Quillacas cerca al pueblo Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 1
13	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 2
14	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 3
15	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 4
16	Santiago de Huari Cerca del pueblo Pampa	Posible aplicación de pesticidas sembrado a tractor presenta mayor precipitación



Figura 2. Plantas de quinua al inicio de la campaña 2010



Figura 3. Plantas de quinua en la mitad del desarrollo del cultivo campaña 2010.

#### 4.1.2. Material de laboratorio

Marcador, parafilm, incubadora a 28°C, autoclave, medio Burk y TSA, placas petri, Cámara de Flujo laminar, mechero, asas de siembra, libreta de apuntes, lapicero, cámara figuragráfica.

#### 4.2. METODO

La metodología de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se tomó en base al protocolo utilizado por Magallón P. y Dion P., 2009 con algunas modificaciones de acuerdo al material disponible en el laboratorio.

Se reactivaron las cepas en estudio en medio TSA hasta alcanzar una población abundante.

Se sembró la bacteria a probar en una placa que contenga el medio de cultivo Burk.

Se incubaron las placas por 5 - 15 días a 28°C. El tiempo de incubación puede variar dependiendo del genero de bacteria con que se trabaje por esta razón se realizó un seguimiento diario de la prueba.

#### 5. Resultados

Se registraron como positivas las cepas que crecieron en el medio de cultivo (Figura 4).

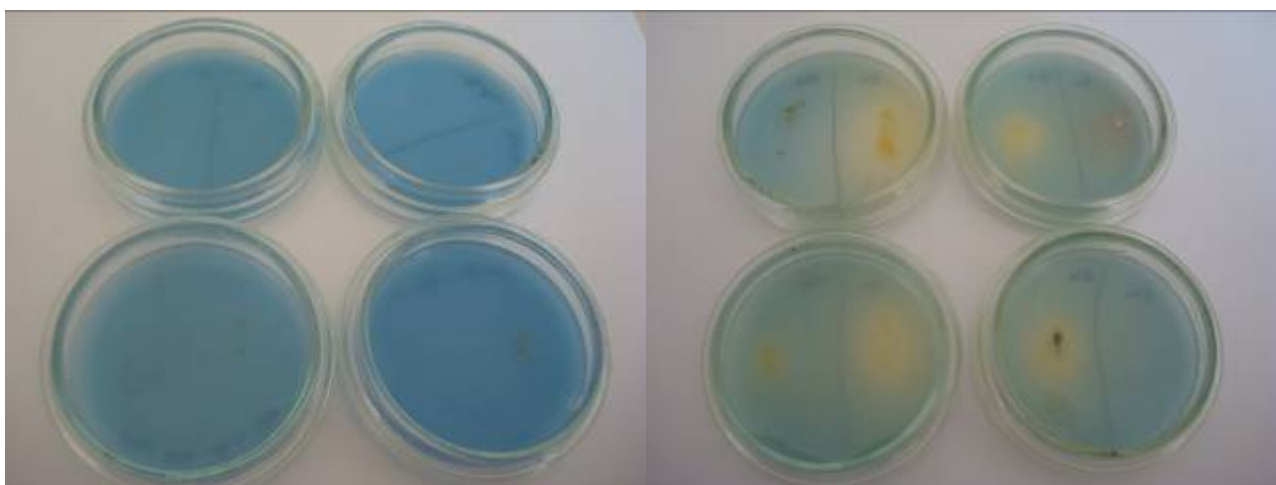


Figura 4. Cepas en la prueba de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

En el cepario se cuenta con una colección de bacterias endófitas de quinua las cuales no fueron caracterizadas por genero sino que se esta haciendo una selección de acuerdo a las características como promotoras de crecimiento. Siendo una prueba importante la selección de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre Tablas 3,4 y 5.

La tabla 3 muestra que de los cien aislados de endófitas de quinua 1, cuatro aislados son bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Tabla 3. Bacterias endófitas de quinua 1

Código	Nitrógeno	Código	Nitrógeno	Código	Nitrógeno
Hoja 1 a	-	Hoja 11 b	+ a	Raiz 6 Mc	-
Hoja 1 b	-	Hoja 11 c	-	Raiz 7 a	-
Hoja 1 Ma	-	Hoja 11 Ma	-	Raiz 7 b	-
Hoja 1 Mb	-	Hoja 11 Mb	- a	Raiz 7 c	-
Hoja 2	-	Raiz 1 a	-	Raiz 7 d	-
Hoja 3 a	-	Raiz 1 b	-	Raiz 7 Ma	-
Hoja 3 b	-	Raiz 1 M	-	Raiz 7 Mb	-
Hoja 3 c	-	Raiz 2 a	-	Raiz 7 Mc	-
Hoja 3 M	- a	Raiz 2 b	-	Raiz 8 a	-
Hoja 4 a	-	Raiz 2 Ma	-	Raiz 8 b	-
Hoja 4 b	-	Raiz 2 Mb	-	Raiz 8 Ma	a
Hoja 4 c	-	Raiz 2 Mc	-	Raiz 8 Mb	-
Hoja 4 M	-	Raiz 3 a	-	Raiz 8 Mc	-
Hoja 5 a	-	Raiz 3 b	-	Raiz 8 Md	-
Hoja 5 b	+	Raiz 3 c	-	Raiz 9	-
Hoja 5 c	-	Raiz 3 Ma	-	Raiz 9 Ma	-
Hoja 5 Ma	-	Raiz 3 Mb	-	Raiz 9 Mb	-
Hoja 5 Mb	-	Raiz 3 Mc	-	Raiz 9 Mc	-

Hoja 6 a	-	Raiz 3 Md	+	Raiz 10	-
Hoja 6 b	-	Raiz 4 a	-	Raiz 10 Ma	-
Hoja 6 Ma	- a	Raiz 4 b	-	Raiz 10 Mb	-
Hoja 6 Mb	-	Raiz 4 c	-	Raiz 11 a	-
Hoja 7 a	-	Raiz 4 Ma	-	Raiz 11 b	-
Hoja 7 b	-	Raiz 4 Mb	-	Raiz 11 Ma	-
Hoja 7 c	-	Raiz 4 Mc	-	Raiz 11 Mb	-
Hoja 8 a	-	Raiz 5 a	-	Raiz 11 Mc	-
Hoja 8 b	-	Raiz 5 b	-	Tallo 5 M	-
Hoja 8 M	-	Raiz 5 c	-	Tallo 6 Ma	-
Hoja 9 a	-	Raiz 5 Ma	-	Tallo 6 Mb	-
Hoja 9 b	-	Raiz 5 Mb	-	Tallo 9 Ma	-
Hoja 9 c	-	Raiz 6	-	Tallo 9 Mb	-
Hoja 10 M	+ a	Raiz 6 Ma	-	Tallo 10 M	-
Hoja 11 a	-	Raiz 6 Mb	a	Tallo 11 Ma	-
				Tallo 11 Mb	-

La tabla 4, muestra las bacterias endófitas 2 que corresponden a un segundo muestreo. Se obtuvieron treinta y siete aislados de los cuales doce son bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Tabla 4. Bacterias endófitas de Quinua 2

Código	Nitrógeno	Código	Nitrógeno
1	-	10 b	-
2 a	+	10 c	-
2 b	-	10 d	+ a
2 c	-	11 a	-
3 a	+	11 b	-
3 b	-	11 c	+ a
3 c	-	12	-
3 d	-	13	-
4	-	13 a	+
5	-	13 b	+
6 a	+	14 a	-
6 b	+	14 b	+ a
7	-	14 c	+ a
8 a	-	14 d	-
8 b	+ a	15	-
9 a	-	16 a	- a
9 b	-	16 b	+ a
9 c	-	16 c	-
10 a	-		

La tabla 5, corresponde al tercer muestreo de bacterias endófitas de quinua (Figura 5) del cual se obtuvo ciento veinte y tres aislados bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre quince aislados.

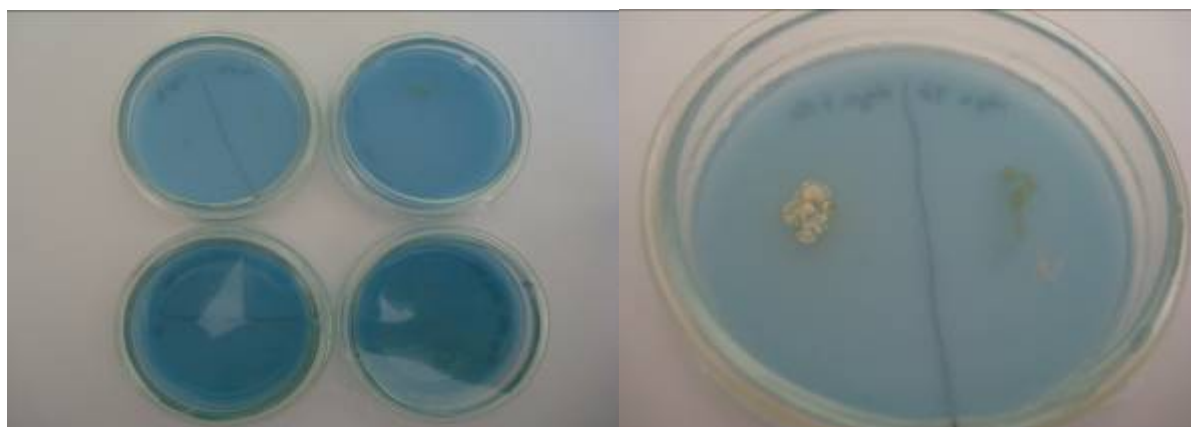


Figura 5. Bacterias endófitas de quinua en la prueba de fijación de nitrógeno.

Tabla 5. Bacterias Endófitas de Quinua 3

Código	Nitrógeno	Código	Nitrógeno	Código	Nitrógeno
1a	-	8g	-	16e	-
1b	-	9a	-	17a	-
1c	-	9b	-	17b	-
1d	-	9c	-	17c	-
1e	-	9d	-	17d	-
1f	-	9e	-	17e	-
1g	-	10a	-	1a (h)	+
2a	-	10b	-	1b (h)	+
2b	-	10c	-	1c (h)	-
2c	-	10d	+	2a (h)	-
3a	-	11a	-	2b (h)	-
3b	+	11b	-	2c (h)	++
3c	-	11c	-	3a (h)	-
3d	-	11d	+	3b (h)	-
3e	-	11e	+	4a (h)	-
3f	-	12a	-	4b (h)	-
3g	-	12b	-	4c (h)	-
3h	-	12c	-	5a (h)	-
4a	-	12d	-	5b (h)	-
5a	- a	12e	-	6a (h)	-

5b	-	12f	-	6b (h)	-
5c	-	13a	-	7a (h)	-
5d	-	13b	++	8a (h)	-
5e	- a	13c	-	8b (h)	-
5f	-	13d	-	8c (h)	+
5g	-	13e	-	8d (h)	-
5h	-	13f	-	8e (h)	-
6a	-	13g	-	9a (h)	-
6b	-	13h	-	9b (h)	+
6c	-	14a	-	10a (h)	-
6d	+	14b	-	11a (h)	-
6e	-	14c	-	11b (h)	+
6f	-	15a	-	11c (h)	-
7a	-	15b	-	12a (h)	-
7b	-	15c	-	13a (h)	+
8a	-	15d	-	13b (h)	-
8b	-	15e	-	14 (h)	-
8c	-	16a	-	15a (h)	-
8d	-	16b	-	16a (h)	-
8e	-	16c	-	17a (h)	+
8f	-	16d	- a	17b (h)	+

## 6. Discusión

Doscientos sesenta cepas de bacterias endófitas de quinua fueron aisladas de cuarenta y tres muestras de quinua, de veinte y siete parcelas del altiplano sur de Bolivia. Lo que indica que se pueden aislar bacterias endófitas de quinua. Una alternativa para aumentar el contenido en nitrógeno del suelo es la utilización de biofertilizantes formados a partir de microorganismos fijadores de nitrógeno. El rol de los microorganismos fijadores en la mejora de la fertilidad del suelo es conocido desde hace más de una centuria (Bashan, 1998). Por lo tanto, las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno son un potencial para la formulación de biofertilizantes como promotores de crecimiento.

Usar cepas de bacterias endófitas aisladas de la planta como promotoras de crecimiento se ha convertido en una importante tendencia en microbiología. Todos los aislados que dieron positivo para la fijación de nitrógeno tienen un potencial como promotoras de crecimiento, este potencial deberá ser investigado más a fondo para obtener las mejores cepas que se desarrollen en campo. Este es la primera etapa para obtener bacterias fijadoras de nitrógeno pero se necesita probar en invernadero para luego ser probadas en campo en escalas mayores.

## 7. Conclusiones

- De doscientos sesenta aislados de bacterias endófitas de quinua se detectaron treinta y un aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

- Por los resultados obtenidos de la prueba de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se concluye que el cepario de la Fundación PROINPA cuenta con bacterias fijadoras de nitrógeno.

## 8. Recomendaciones

- Se recomienda la identificación molecular de estas bacterias seleccionadas y su aplicación en ensayos en invernadero, ya que nos permitirá avanzar en el estudio de las mismas como potenciales herramientas de inoculación en los suelos con deficiencias de nitrógeno.

## 9. Bibliografía consultada

- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture Biotechnology Advances, Vol. 16, No. 4, pp. 729-770.1998
- Guadalupe Espín, 2006. Biología de *Azotobacter vinelandii* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
- Paola Magallón Servin y Patrice Dion, 2009. Manual curso Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia. Université Laval, Québec, Canada.
- CIP, 2008. Protocolos de trabajo con bacterias PGPR.47-50p. Lima Perú

### Evaluación de cepas por su eficiencia en la solubilización de fósforo

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros, Marlen Angulo y Claudia Gutierrez

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

Se probaron cincuenta y seis aislados de *Azotobacter*, treinta y seis aislados de *Rhizobium* y doscientos sesenta cepas de bacterias endófitas de quinua que fueron aisladas de tres colectas del Altiplano Sur de Bolivia correspondiendo a las comunidades de Quillacas, Challapata, Salinas de García Mendoza y Santiago de Huari del Departamento de Oruro. Las cepas fueron probadas para detectar bacterias solubilizadoras de fosfato. Dando como resultado: de los aislados de *Azotobacter* solo una es solubilizadora de fosfato. En el caso de las *Rhizobias* de haba estas son más eficientes ya que se encontraron quince solubilizadoras de fosfato teniendo esta doble función de solubilización de fosfato y captación de nitrógeno atmosférico. Las bacterias endófitas de quinua se obtuvieron setenta y dos solubilizadoras de fosfatos. Concluyendo que el cepario de la Fundación PROINPA cuenta con bacterias solubilizadoras de fosfato.

**Palabras claves:** Solubilizadoras de fosfato, *Azotobacter*, *Rhizobias*, bacterias endófitas.

## 10. Objetivos:

Determinar que microorganismos del cepario de la Fundación PROINPA tienen la capacidad de solubilización de fosfato.

## 11. Hipótesis

## 12. Revisión de literatura

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos. En el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander, 1980).

Debido a la poca movilidad del fósforo en el suelo y a su baja concentración en la solución del suelo, fertilizantes con fósforo son aplicados a suelos agrícolas. El resultado de la acumulación de gran cantidad de fósforo total en el suelo, es de 20-80% en forma orgánica (CIP, 2008).

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.*, 2001). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas (Illmer y Schinner, 1992).

La disponibilidad de fósforo en el suelo depende principalmente de la actividad microbiana. La solubilización de fosfato mineral y orgánico se produce por la capacidad que presentan las PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) de producir fosfatasas (mineralización) o por solubilización de fosfatos inorgánicos no disponibles con ácidos orgánicos (CIP, 2008).

Si bien muchos géneros bacterianos presentan esta capacidad para solubilizar fósforo inorgánico, es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que tengan otras propiedades de promoción de crecimiento vegetal, como por ejemplo, capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Se han aislado microorganismos como *Azospirillum lipoferum* o *Azotobacter chroococcum* que además de ser fijadores libres de nitrógeno, son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante la solubilización de fosfatos inorgánicos (Murty y Ladha, 1988; Kundu y Gaur, 1980). Además, distintas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, bacterias del suelo que fijan nitrógeno en asociación simbiótica con distintas leguminosas, poseen capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder y Chakrabarty, 1993; Surange y Kumar, 1993). Por estas razones es importante saber si los microorganismos del cepario de la Fundación PROINPA cuentan con la capacidad de solubilización de fosfatos.

### 13. Materiales y métodos

#### 4.1. Materiales

##### 4.1.1. Material biológico

Cepario de la Fundación PROINPA. Colección de bacterias endófitas de quinua de tres colectas. Las bacterias endófitas de quinua 1 corresponden a las comunidades de Quillacas y Challapata de la Provincia Abaroa del Departamento de Oruro (Tabla 1); la colecta fue realizada por el Ing. Oscar Navia cuando las plantas estaban en formación del fruto (figura 1) campaña 2008.

Tabla 1. Bacterias Endofitas de Quinua 1

Código	Localidad	Características de la planta
1	Quillacas	Hojas medianas planta verde claro 1/2 enferma
2	Quillacas	Hojas medianas planta verde claro 1/4 enferma
3	Quillacas	Hojas medianas planta verde amarillo
4	Quillacas	Hojas grandes planta 1/2 enferma
5	Quillacas	Hojas normales planta sana
6	Challapata	Hojas normales planta enferma
7	Challapata	Hojas grandes y medianas planta 1/2 enferma
8	Quillacas	Hojas pequeñas planta 1/2 enferma
9	Quillacas	Hojas grandes planta 1/2 enferma

10	Challapata	Hojas muy grandes planta 1/5 enferma
11	Challapata	Hojas pequeñas planta enferma



Figura 1. Plantas de Quinoa campaña 2008

En cuanto a las bacterias endófitas 2 y 3 corresponden a las comunidades de Salinas de García Mendoza de la Provincia Cabrera y Santiago de Huari de la Provincia Sebastian Pagador del departamento de Oruro (Tabla 2). Las bacterias endófitas 2 corresponden al inicio del cultivo (Figura 2) la colecta fue realizada en Noviembre del 2009. Las bacterias endófitas 3 corresponden a la mitad del desarrollo del cultivo (Figura 3) la colecta fue realizada en Enero del 2010. La persona encargada del muestreo fue el Ing. Samuel Villca.

Tabla 2. Bacterias Endófitas 2 y 3.

Código	Lugar	Otros
1	Salinas de García Mendoza Cerro del Hotel Sukorani	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano
2	Salinas de García Mendoza Agua Mineral Cerro	Sembrado a tractor sin aplicación de pesticidas
3	Salinas de García Mendoza Faldas del Cerro Viscachera	Sin aplicación de pesticidas
4	Salinas de García Mendoza Cerro Viscachera Parada Z	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano
5	Salinas de García Mendoza Pitca falda del Cerro	Sin aplicación de insecticidas sembrado a tractor Parcela 1



6	Salinas de García Mendoza Pitca cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
7	Salinas de García Mendoza Tambillo cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a mano Parcela 1
8	Salinas de García Mendoza Tambillo cerca del camino	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
9	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 1
10	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 2
11	Salinas de García Mendoza Villa Esperanza Pampa	Sin aplicación de pesticidas sembrado a tractor Parcela 3
12	Salinas de García Mendoza Quillacas cerca al pueblo Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 1
13	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 2
14	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 3
15	Salinas de García Mendoza Quillacas Pampa	Sin aplicación de pesticidas Phisnado sembrado a mano Parcela 4
16	Santiago de Huari Cerca del pueblo Pampa	Posible aplicación de pesticidas sembrado a tractor presenta mayor precipitación



Figura 2. Plantas de quinua al inicio de la campaña 2010



Figura 3. Plantas de quinua en la mitad del desarrollo del cultivo campaña 2010.

El material biológico utilizado en el caso de Azotobacter fueron los aislamientos del cepario de la Fundación PROINPA procedentes de diferentes pisos ecológicos (Trópico, Chaco Boreal, Valle, Puna y Altiplano) de Bolivia.

El material biológico utilizado para las Rhizobias son parte de la colección del cepario de la Fundación PROINPA estas cepas son procedentes de diferentes pisos ecológicos de los departamentos de La Paz, Potosí y Cochabamba.

#### 4.1.2. Material de laboratorio

Marcador, parafilm, incubadora a 28°C, autoclave, medio NBRIP, medios de crecimiento específicos de acuerdo al género de la bacteria, placas petri, Cámara de Flujo laminar, mechero, asas de siembra, libreta de apuntes, lapicero.

#### 4.2. Método

La metodología de solubilizadores de fosfatos se tomó en base al protocolo utilizado por Nautiyal (1999) descrita en el manual de Protocolos de trabajo con bacterias PGPR CIP, 2008. Con algunas modificaciones de acuerdo al material disponible en el laboratorio.

Se reactivaron las cepas en estudio en su respectivo medio de crecimiento hasta alcanzar una población conocida (depende del género).

Se sembró la bacteria a probar en una placa que contenga el medio de cultivo National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) con fosfato tricalcico.

Se incubaron las placas por 5 - 15 días a 28°C. El tiempo de incubación puede variar dependiendo del genero de bacteria con que se trabaje por esta razón se realizo un seguimiento diario de la prueba.

#### 14. Resultados

Se registraron como positivas las cepas que crecieron en el medio de cultivo y presentaron el halo transparente alrededor de la colonia indicador de solubilización de fosfato (Figura 4).

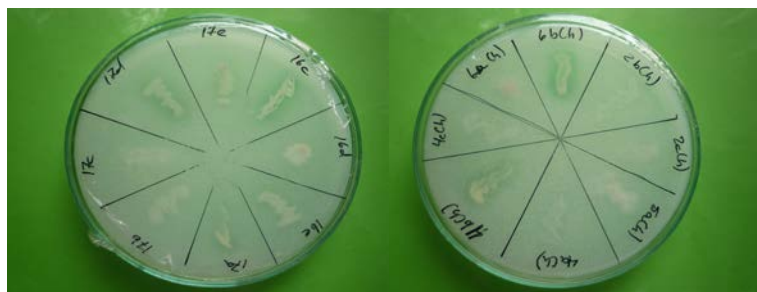


Figura 4. Cepas en la prueba de solubilización de fosfato.

En la tabla 3 se muestra las cepas de azotobacter, de un total de cincuenta y seis aislados solo el aislado BP-AZT0037 es solubilizador de fosfato, este tiene especial importancia ya que también fija nitrógeno del ambiente.

Tabla 3. Cepas de azotobacter

<b>AZOTOBACTER</b>			
<b>Código</b>	<b>Sol P</b>	<b>Código</b>	<b>Sol P</b>
BP-AZT0001	-	BP-AZT0029	-
BP-AZT0002	-	BP-AZT0030	-
BP-AZT0003	-	BP-AZT0031	-
BP-AZT0004	-	BP-AZT0032	-
BP-AZT0005	-	BP-AZT0033	-
BP-AZT0006	-	BP-AZT0034	-
BP-AZT0007	-	BP-AZT0035	-
BP-AZT0008	-	BP-AZT0036	-
BP-AZT0009	-	BP-AZT0037	+
BP-AZT0010	-	BP-AZT0038	-
BP-AZT0011	-	BP-AZT0039	-
BP-AZT0012	-	BP-AZT0040	-
BP-AZT0013	-	BP-AZT0041	-
BP-AZT0014	-	BP-AZT0042	-
BP-AZT0015	-	BP-AZT0043	-
BP-AZT0016	-	BP-AZT0044	-
BP-AZT0017	-	BP-AZT0045	-
BP-AZT0018	-	BP-AZT0046	-
BP-AZT0019	-	BP-AZT0047	-
BP-AZT0020	-	BP-AZT0048	-
BP-AZT0021	-	BP-AZT0049	-
BP-AZT0022	-	BP-AZT0050	-
BP-AZT0023	-	BP-AZT0051	-
BP-AZT0024	-	BP-AZT0052	-
BP-AZT0025	-	BP-AZT0053	-
BP-AZT0026	-	BP-AZT0054	-
BP-AZT0027	-	BP-AZT0055	-
BP-AZT0028	-	BP-AZT0056	-

La tabla 4 muestra las cepas de *Rhizobium* de haba de la colección, dando como positivas quince cepas de las treinta y seis existentes. Las cepas positivas muestran la capacidad de solubilizar fosfatos y de fijar Nitrógeno (porque son cepas de *Rhizobium*), haciendo que estas sean de mayor importancia para su utilización como bacterias promotoras de crecimiento.

Tabla 4. Cepas de *Rhizobium*

<b>RHIZOBIUM</b>			
<b>Código</b>	<b>Sol P</b>	<b>Código</b>	<b>Sol P</b>
BP-R0001	-	BP-R0024	-
BP-R0002	-	BP-R0025	-
BP-R0003	-	BP-R0026	+
BP-R0004	+	BP-R0027	-

BP-R0005	-	BP-R0028	+
BP-R0006	-	BP-R0029	-
BP-R0007	-	BP-R0030	-
BP-R0008	+	BP-R0031	+
BP-R0009	+	BP-R0032	-
BP-R0010	no hay cepa	BP-R0033	-
BP-R0011	-	BP-R0034	-
BP-R0012	-	BP-R0035	-
BP-R0013	-	BP-R0036	-
BP-R0014	-	BP-R0037	-
BP-R0015	+	BP-R0038	-
BP-R0016	-	BP-R0039	+
BP-R0017	-	BP-R0040	+
BP-R0018	-	BP-R0041	+
BP-R0019	+	BP-R0042	+
BP-R0020	-	BP-R0043	-
BP-R0021	+	BP-R0044	-
BP-R0022	-	BP-R0045	+
BP-R0023	-	BP-R0046	+

En el cepario se cuenta con una colección de bacterias endófitas de quinua las cuales no fueron caracterizadas por genero sino que se esta haciendo una selección de acuerdo a las características como promotoras de crecimiento. Siendo una prueba importante la solubilización de fosfato Tablas 3,4 y 5.

La tabla 5 muestra que de los cien aislados de endófitas de quinua 1. Veintisiete aislados son solubilizadores de fosfato.

Tabla 5. Bacterias endófitas de quinua 1

<b>Endófitas Quinua 1</b>					
<b>Código</b>	<b>Sol P</b>	<b>Código</b>	<b>Sol P</b>	<b>Código</b>	<b>Sol P</b>
Hoja 1 a	-	Hoja 11 b	-	Raíz 6 Mc	+
Hoja 1 b	-	Hoja 11 c	-	Raíz 7 a	-
Hoja 1 Ma	-	Hoja 11 Ma	-	Raíz 7 b	-
Hoja 1 Mb	+	Hoja 11 Mb	+	Raíz 7 c	-
Hoja 2	-	Raíz 1 a	+	Raíz 7 d	-
Hoja 3 a	-	Raíz 1 b	-	Raíz 7 Ma	-
Hoja 3 b	+	Raíz 1 M	-	Raíz 7 Mb	-
Hoja 3 c	-	Raíz 2	-	Raíz 7 Mc	-
Hoja 3 M	-	Raíz 2 a	-	Raíz 8 a	-
Hoja 4 a	-	Raíz 2 Ma	-	Raíz 8 b	-
Hoja 4 b	+	Raíz 2 Mb	-	Raíz 8 Ma	+
Hoja 4 c	+	Raíz 2 Mc	-	Raíz 8 Mb	+
Hoja 4 M	-	Raíz 3 a	+	Raíz 8 Mc	-

Hoja 5 a	+	Raíz 3 b	-	Raíz 8 Md	+
Hoja 5 b	-	Raíz 3 c	+	Raíz 9	-
Hoja 5 c	-	Raíz 3 Ma	-	Raíz 9 Ma	+
Hoja 5 M	-	Raíz 3 Mb	+	Raíz 9 Mb	+
Hoja 5 Ma	-	Raíz 3 Mc	-	Raíz 9 Mc	-
Hoja 6 a	-	Raíz 3 Md	+	Raíz 10	-
Hoja 6 b	-	Raíz 4 b	-	Raíz 10 Ma	+
Hoja 6 Ma	-	Raíz 4 a	-	Raíz 10 Mb	-
Hoja 6 Mb	-	Raíz 4 c	-	Raíz 11 a	-
Hoja 7 a	-	Raíz 4 Ma	-	Raíz 11 b	+
Hoja 7 b	-	Raíz 4 Mb	+	Raíz 11 Ma	-
Hoja 7 c	-	Raíz 4 Mc	-	Raíz 11 Mb	-
Hoja 8 a	-	Raíz 5 a	+	Raíz 11 Mc	+
Hoja 8 b	-	Raíz 5 b	+	Tallo 5 M	-
Hoja 8 M	-	Raíz 5 c	+	Tallo 6 Ma	-
Hoja 9 a	-	Raíz 5 Ma	-	Tallo 6 Mb	-
Hoja 9 b	-	Raíz 5 Mb	+	Tallo 9 Ma	-
Hoja 9 c	-	Raíz 6	-	Tallo 9 Mb	-
Hoja 10 M	-	Raíz 6 Ma	-	Tallo 10 M	-
Hoja 11 a	-	Raíz 6 Mb	+	Tallo 11 Ma	-
				Tallo 11 Mb	+

La tabla 6, muestra las bacterias endófitas 2 que corresponden a un segundo muestreo. Se obtuvieron treinta y siete aislados de los cuales seis solubilizan fosfato.

Tabla 6. Bacterias endófitas de Quinua 2

<b>Endófitas Quinua 2</b>			
<b>Código</b>	<b>Sol P</b>	<b>Código</b>	<b>Sol P</b>
1	-	10 b	-
2 a	-	10 c	-
2 b	-	10 d	-
2 c	-	11 a	-
3 a	-	11 b	-
3 b	-	11 c	+
3 c	-	12	+
3 d	-	13	-
4	-	13a	-
5	-	13b	-
6 <sup>a</sup>	-	14 a	+

6b	-	14 b	+
7	-	14 c	-
8 a	-	14 d	-
8 b	+	15	-
9 a	-	16 a	-
9 b	-	16 b	+
9 c	-	16 c	-
10 a	-		

La tabla 7, corresponde al tercer muestreo de bacterias endófitas de quinua (Figura 5) del cual se obtuvo ciento veinte y tres aislados siendo solubilizadores de fosfato treinta y nueve.



Figura 5. Bacterias endófitas de quinua en la prueba de solubilización de Fosfato.

Tabla 7. Bacterias Endófitas de Quinua 3

Endófitas Quinua 3					
Código	Sol P	Código	Sol P	Código	Sol P
1 <sup>a</sup>	+	8g	+	16e	-
1b	+	9a	-	17a	+
1c	-	9b	-	17b	-
1d	-	9c	+	17c	-
1e	-	9d	-	17d	+
1f	-	9e	+	17e	+
1g	-	10a	-	1a (h)	-
2 <sup>a</sup>	-	10b	-	1b (h)	-

2b	-	10c	-	1c (h)	-
2c	-	10d	-	2a (h)	-
3 <sup>a</sup>	+	11a	-	2b (h)	+
3b	-	11b	-	2c (h)	-
3c	+	11c	-	3a (h)	-
3d	+	11d	-	3b (h)	-
3e	+	11e	-	4a (h)	-
3f	-	12a	-	4b (h)	+
3g	-	12b	+	4c (h)	-
3h	+	12c	+	5a (h)	-
4 <sup>a</sup>	-	12d	+	5b (h)	-
5 <sup>a</sup>	+	12e	-	6a (h)	-
5b	+	12f	+	6b (h)	+
5c	+	13a	-	7a (h)	-
5d	+	13b	-	8a (h)	-
5e	-	13c	-	8b (h)	-
5f	-	13d	+	8c (h)	-
5g	-	13e	-	8d (h)	-
5h	-	13f	-	8e (h)	-
6 <sup>a</sup>	-	13g	+	9a (h)	-
6b	-	13h	+	9b (h)	-
6c	-	14a	+	10a (h)	-
6d	-	14b	+	11a (h)	-
6e	-	14c	+	11b (h)	-
6f	-	15a	+	11c (h)	-
7 <sup>a</sup>	-	15b	+	12a (h)	-
7b	+	15c	+	13a (h)	-
8 <sup>a</sup>	-	15d	-	13b (h)	-
8b	-	15e	+	14 (h)	+
8c	-	16a	-	15a (h)	-
8d	+	16b	-	16a (h)	+
8e	-	16c	+	17a (h)	-
8f	-	16d	-	17b (h)	-

## 15. Discusión

En la mayoría de la literatura concerniente a la solubilización microbiana de fósforo se reportan estudios con bacterias y hongos micorrizicos (Lapeyrie *et al.*, 1991; Chabot *et al.*, 1993; Toro *et al.*, 1997; Beat-Yosef *et al.*, 1999). Sin embargo, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium* sp. y *Azotobacter* sp. pueden presentar una especificidad funcional (Silvera *et al.*) o no, por lo que se hizo esta prueba de la cual resultaron positivas quince aislados de *Rhizobium* sp. y uno de *Azotobacter* sp. las cuales tienen potencialidades como fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos.

Las bacterias endófitas tienen ventaja sobre las bacterias rizosféricas, de la gran variedad de nutrientes que disponen, así como de la protección que les brinda la planta de las condiciones adversas del medio (Roziky *et al.* 1999; Reinhold & Hurek 1998). Siendo las bacterias endófitas muy importantes para las plantas especialmente de aquellas que crecen en condiciones extremas. Se realizó la prueba de solubilizadoras de fosfatos obteniéndose setenta y dos aislados que fueron positivos.

## **16. Conclusiones**

- Por la prueba de solubilización de fosfato se muestra que las cepas de azotobacter del cepario de la Fundación PROINPA, no son solubilizadoras de fosfato exceptuando una.
- Esta prueba de solubilización de fosfato en el caso de las rhizobias de haba es más eficiente ya que se encontraron quince solubilizadoras de fosfato teniendo esta doble función de solubilización de fosfato y captación de nitrógeno atmosférico.
- En el caso de las bacterias endófitas de quinua se obtuvieron doscientos sesenta aislados de los cuales setenta y dos son solubilizadores de fosfatos.
- Por los resultados obtenidos de la prueba de solubilización de fosfato se concluye que el cepario de la Fundación PROINPA cuenta con bacterias solubilizadoras de fosfato.

## **17. Recomendaciones**

- Se recomienda hacer una prueba con todas las bacterias solubilizadoras de fosfato para medir el halo de solubilización, viendo la capacidad de cada cepa para la solubilización de fosfatos.
- Se recomienda la identificación molecular de estas bacterias seleccionadas y su aplicación en ensayos en invernadero, ya que nos permitirá avanzar en el estudio de las mismas como potenciales herramientas de inoculación en los suelos con deficiencias de fósforo.

## **18. Bibliografía consultada**

- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. (p. 355-371). *En: Introducción a la microbiología del suelo*. AGT editor, México, 491 p.
- Bar-Yosef, B.; Rogers, R.; Wolfram, J. & Richman, E. (1999). *Pseudomonas cepacia* – mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 1703-1708.
- Silvera C., Zúñiga D., Loli O. Capacidad solubilizadora del fosforo por cepas de rhizobium, aisladas de los nodulos del frijol caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) *Anales Científicos –UNALM*.
- CIP, 2008. Protocolos de trabajo con bacterias PGPR. 47-50p. Lima Perú.
- Chabot, R.; Antoun, H. & Cescas, M. (1993). Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39: 941-947.
- Halder, A K & PK Chakrabartty. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.
- Illmer, P & F Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.



- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowilz, R.M. 1989. Free-Living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Tibtech. Conf. on Plant Pathogenic Bacter. Vol. 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France 7:39-44.
- Lapeyrie, F.; Ranger, J. & Vairelles, D. (1991). Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. Can. J. Bot. 69: 342-346.
- Murty, MG & JK Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil*. 108:281-285.
- Nautiyal C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 265 – 270.
- Peix, A; AA Rivas-Boyer; PF Mateos; C Rodríguez-Barrueco; E Martínez-Molina & E Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. 6: 139-144.
- Rozycki, H.; Dahm, H.; Strzelczy K, E.; Li, C. y 1999. Diazotrophic bacteria in root free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus ruber* L.). Applied Soil Ecology 12: 239-250.
- Surange, S & N Kumar. 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 31:855-857.

### **Evaluación de cepas bacterianas PGPR por su habilidad para generar ácido indol acético (AIA)**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

Se probaron ciento dos aislados bacterianos para la detección del ácido indol acético. Cincuenta y seis aislados de *Azotobacter* y cuarenta y seis aislados de *Rhizobias* de haba. Dando como resultado: los aislados de *Azotobacter* veinte seis presentan producción de AIA. En el caso de las *Rhizobias* de haba estas son menos eficientes ya que solo dos presentan producción de AIA. Concluyendo que el cepario de la Fundación PROINPA cuenta con bacterias promisorias para la producción de la fitohormona AIA.

**Palabras claves:** *Azotobacter*, *Rhizobias*, ácido indol acético

#### **19. Objetivos:**

El objetivo de este trabajo es encontrar bacterias productoras de ácido indol acético.

#### **20. Hipótesis**

#### **21. Revisión de literatura**

El Ácido indol acético es una fitohormona que actúa a nivel de los ápices entre sus efectos se encuentra: La inhibición del desarrollo de las yemas axiales, dando origen a un fenómeno que se

conoce como dominancia apical, promueve el figurotropismo positivo y estimula el desarrollo de raíces laterales y adventicias.

En general se ha comprobado que muchas bacterias PGPR que promueven el crecimiento vegetal también producen ácido indol acético lo que nos puede indicar que el AIA es una característica importante para poder evaluar posibles bacterias PGPR.

Para esta prueba es muy importante considerar que el AIA es un metabolito secundario producido por algunas bacterias en el periodo estacionario de crecimiento por esta razón el tiempo de incubación del caldo va a depender de la curva de crecimiento de la bacteria, se tendrá que dejar el tiempo suficiente para asegurarse que llegue a la fase estacionaria.

## **22. Materiales y métodos**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Material biológico**

Se realizó con todas las cepas de *Rhizobium* sp. y *Azotobacter* sp. del cepario de la Fundación PROINPA.

#### **4.1.2. Material de laboratorio**

Tubos de vidrio con tapa, gradillas, marcador, parafilm, incubadora a 28°C, autoclave, reactivo de Salkowski, L-Triptófano, medios de cultivo LMA y LG, placas petri, placa de Elisa, micropipetas, tips para pipetor, pipetas, asas de siembra, sacabocado, marcador y libreta de apuntes.

### **4.2. Método**

#### **4.2.1. Preparación de los microorganismos para su revelado**

Se utilizará la metodología propuesta por Gordon S., 1950 adaptada a cada tipo de bacteria. Para esta prueba es muy importante considerar que el AIA es un metabolito secundario producido por algunas bacterias en el periodo estacionario de crecimiento por esta razón el tiempo de incubación del caldo va a depender de la curva de crecimiento de la bacteria, se tendrá que dejar el tiempo suficiente para asegurarse que llegue a la fase estacionaria.

Para este propósito se reactivaron las cepas en estudio en su medio específico.

Se sembró una colonia de cada cepa en un tubo con medio líquido específico, suplementado con 5mM de L-Triptófano para cada microorganismo. Las cuales se incubaron aproximadamente por 5 - 7 días a 28°C.

Cuando las colonias llegaron a su estado estacional se prepararon para su centrifugado. Se las centrifugó a 5000 r.p.m. por 5 minutos con el fin de obtener un revelado limpio. Se descartó el pelet y se utilizó el sobrenadante.

#### **4.2.2. Revelado de los microorganismos**

Para el revelado del AIA se tomó una alícuota de 75 µL del caldo bacteriano centrifugado respectivo y se adicionó 225 µL del reactivo de Salkowski. Se homogenizó con cuidado incubándolo por 30 minutos en oscuridad. Figura 1.



Figura 1. Dosificación del caldo bacteriano con el reactivo de Salkowski.

Se reportó como positivo el medio que viró de amarillo claro a tonos rojizos.

Se observaron diferentes tonalidades de rosados hasta rojos, los resultados que se expresaron de esta prueba son cualitativos, expresando la intensidad de color por signos de mas (+). Figura 2

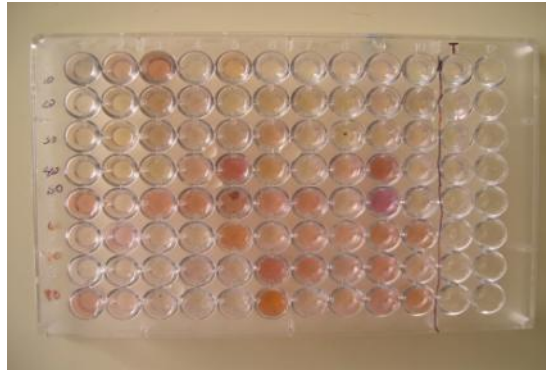


Figura 2. Revelado del AIA.

Se emplearon controles negativos de los medios líquidos de LMA y LG. Figura 2.

### 23. Resultados

Siendo esta una prueba cualitativa se encontraron 28 microorganismos que en su revelado dan positivo es decir que producen la fitohormona de ácido indol acético de un total de 102 cepas. Cuadro 1.

Cuadro 1. Cepas evaluadas para la producción de AIA.

Cepa	Producción de AIA	Cepa	Producción de AIA
BP-AZT0001	+	BP-R0001	-
BP-AZT0002	+	BP-R0002	-
BP-AZT0003	-	BP-R0003	-
BP-AZT0004	+	BP-R0004	-
BP-AZT0005	-	BP-R0005	-
BP-AZT0006	+	BP-R0006	-
BP-AZT0007	+	BP-R0007	-
BP-AZT0008	-	BP-R0008	-
BP-AZT0009	+	BP-R0009	-
BP-AZT0010	+	BP-R0010	-
BP-AZT0011	+	BP-R0011	-
BP-AZT0012	+	BP-R0012	-
BP-AZT0013	-	BP-R0013	-
BP-AZT0014	-	BP-R0014	-
BP-AZT0015	+	BP-R0015	-
BP-AZT0016	+	BP-R0016	-
BP-AZT0017	-	BP-R0017	-
BP-AZT0018	-	BP-R0018	-

BP-AZT0019	-	BP-R0019	+
BP-AZT0020	-	BP-R0020	-
BP-AZT0021	+	BP-R0021	-
BP-AZT0022	+	BP-R0022	-
BP-AZT0023	+	BP-R0023	-
BP-AZT0024	-	BP-R0024	-
BP-AZT0025	-	BP-R0025	-
BP-AZT0026	-	BP-R0026	-
BP-AZT0027	-	BP-R0027	-
BP-AZT0028	+	BP-R0028	-
BP-AZT0029	-	BP-R0029	-
BP-AZT0030	-	BP-R0030	-
BP-AZT0031	-	BP-R0031	-
BP-AZT0032	+	BP-R0032	-
BP-AZT0033	-	BP-R0033	-
BP-AZT0034	+	BP-R0034	-
BP-AZT0035	+	BP-R0035	-
BP-AZT0036	-	BP-R0036	++
BP-AZT0037	-	BP-R0037	-
BP-AZT0038	-	BP-R0038	-
BP-AZT0039	+	BP-R0039	-
BP-AZT0040	+	BP-R0040	-
BP-AZT0041	+	BP-R0041	-
BP-AZT0042	+	BP-R0042	-
BP-AZT0043	-	BP-R0043	-
BP-AZT0044	-	BP-R0044	-
BP-AZT0045	+	BP-R0045	-
BP-AZT0046	-	BP-R0046	-
BP-AZT0047	-		
BP-AZT0048	-		
BP-AZT0049	+		
BP-AZT0050	-		
BP-AZT0051	-		
BP-AZT0052	-		
BP-AZT0053	++		
BP-AZT0054	-		
BP-AZT0055	-		
BP-AZT0056	++		

En el cuadro 1 se muestra que de las 56 cepas de azotobacter evaluadas, 26 presentan la producción del ácido indol acético. De las 26 cepas positivas resaltan dos, la cepa BP-AZT0053 y BP-AZT0056 las cuales tienen doble positivo (++) porque son las que presentaron rojo intenso en la prueba.

Por otro lado de las 46 cepas de rizobias evaluadas, solamente dos presentan la producción del ácido indol acético. La cepa BP-R0019 y la cepa BP-R0036 teniendo esta doble positivo (++) ya que presentó mayor intensidad en su coloración durante el revelado.

## **24. Discusión**

En recientes artículos se han reportado al rededor de 89 tipos de giberelinas producidas por diazotróficos (microorganismos fijadores de nitrógeno). Gracias a distintos experimentos se ha observado la producción de giberelinas por *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium leguminosarium* bv phaseoli, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformes* (Dobbelaere et al., 2003).

Corroborando lo anteriormente citado se obtuvieron veinte seis aislados de azotobacter y dos de rizobias que producen la fitohormona de ácido indol acético.

## **25. Conclusiones**

- Con la prueba cualitativa de AIA que se revelaron 102 aislados bacterianos de los cuales se obtuvieron 28 aislados productores de la fitohormona AIA
- De las 56 cepas de *Azotobacter* evaluadas, 26 presentan producción de AIA. Por lo que se concluye que el microorganismo *Azotobacter* tiene mayor probabilidad de producir esta fitohormona.
- De las 46 cepas de rizobias evaluadas 2 presentan producción de AIA. Por lo que se concluye que las rizobias no son promisorias para la producción de la fitohormona AIA.

## **26. Recomendaciones**

- Se recomienda hacer pruebas en vivero para la selección de la mejor cepa productora de AIA.
- Se recomienda seguir la selección de cepas productoras de AIA.

## **27. Bibliografía consultada**

- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y.. 2003. Plant Growth - Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* (22) 107-149.
- Gordon, S., Weber, R. 1950. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26: 192 -195.

## **Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* POR SU EFICIENCIA A LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO**

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Violeta Angulo y Mayra Claros**

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:**

Se probaron 43 cepas de *Bacillus sp.* para la solubilización de Fósforo inorgánico. Se obtuvo una única cepa BP-B 0018 positiva en medio sólido. Los resultados en el medio líquido fueron negativos, si bien las bacterias registraron crecimiento manifestado a través de la turbidez ninguna de las 43 cepas vió el color de violeta a amarillo. Se realizaron evaluaciones en invernadero durante cuatro semanas antes de la evaluación destructiva, realizada en la quinta semana. Los resultados revelan que no existieron diferencias estadísticamente significativas para las variables altura de planta y número de hojas desarrolladas de con las diferentes cepas. Las variables de respuesta diámetro de bulbo, longitud de bulbo, longitud de raíz, y número de hojas no tuvieron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo las variables peso de planta y volumen de bulbo si presentaron diferencias estadísticamente significativas. Con relación al peso de la planta y volumen de bulbo, las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016 se muestran como las más eficientes. Cabe mencionar que la cepa BP-B 0018 fue la única cepa que presentó solubilización de fósforo *in Vitro* y no así las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016. Por tanto se concluye que la solubilización de fósforo en condiciones *in Vitro* dio únicamente una cepa positiva la BP-B 0018, en medio sólido, la cual no resultó efectiva en medio líquido y en invernadero las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016 registraron diferencias significativas tanto en el peso de planta y volumen de bulbo de rábano.

**Palabras claves:** *Bacillus sp.*, solubilización de Fósforo inorgánico.

### **28. Objetivos:**

Determinación de la solubilización de Fósforo inorgánico con *Bacillus sp.* a través de pruebas *in Vitro* tanto en medio de cultivo líquido como sólido.

Determinación de la solubilización de Fósforo inorgánico a través de pruebas sobre plantas de rábano (*Raphanus sativus*) inoculadas con *Bacillus sp.* en condiciones de invernadero.

### **29. Hipótesis**

No existe solubilización de fósforo inorgánico con *Bacillus sp.* *in Vitro* o en plantas de rábano (*Raphanus sativus*) en condiciones de invernadero.

### **30. Revisión de literatura**

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander 1980). Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg<sup>-1</sup>. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez & Fraga 1999).

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.* 2001). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer & Schinner 1992).

Ahora bien, los grupos microbianos capaces de solubilizar el fósforo edáfico son varios y entre ellos los de mayor relevancia son los hongos muchos de los cuales son patógenos como el *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sclerotium*. Un segundo grupo lo constituyen los *Actinomycetes* grandes productores de sustancias antibióticas y las bacterias entre las que podemos mencionar a *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Oviedo e Iglesias, 2005).

Por tanto es importante realizar evaluaciones con bacterias del género *Bacillus*, las cuales son bacterias con potencial para solubilizar fósforo y también con estructuras de resistencia a las condiciones ambientales adversas.

### **31. Materiales y métodos**

#### **4.1 Materiales**

Los materiales empleados fueron los siguientes:

##### **4.1.1 Equipos**

- Autoclave
- Estufa de cultivo
- Shaker de incubación
- Micropipetores
- Agitador de tubos
- Cámara de flujo laminar

##### **4.1.2 Reactivos y medios de cultivo**

- Medio NBRIP agar
- Medio NBRIP caldo
- Azul de bromofenol
- Caldo TSB

##### **4.1.3 Material biológico**

- Cepas de *Bacillus sp.*
- Semillas de *Raphanus sativus*

##### **4.1.4 Otros materiales**

- Macetas de 2 Kg de capacidad

#### **4.2 Métodos**

La metodología empleada fue la siguiente:

##### **4.2.1 Solubilización de fósforo *in Vitro***

###### **4.2.1.1 Solubilización en medio sólido**

- Todas las cepas aisladas de *Bacillus* fueron cultivadas en el medio NBRIP agar a 37 °C por el lapso de 2 días (Figura 1).
- Al cabo de ese tiempo se evaluó la formación de un halo de solubilización del fósforo alrededor de las colonias como una reacción positiva.



**Figura. 1** Placas con medio NBRIP sólido incubadas en estufa a 37°C

#### 4.2.1.2 Solubilización en medio líquido

- Todas las cepas aisladas de *Bacillus* fueron sembradas en el medio NBRIP líquido con azul de bromofenol como indicador de pH por el lapso de 2 días e incubadas a 28 °C, 100rpm y en condiciones de oscuridad (Figuras 2 y 3).



**Figuras 2 y 3.** Siembra e incubación en medio NBRIP líquido

- Al cabo de ese tiempo se observó si la coloración cambió de violeta a amarilla como reacción positiva.

#### 4.2.2 Solubilización de fósforo en invernadero

- Se procedió a la multiplicación de 44 cepas de *Bacillus sp.* en caldo TSB, durante 7 días a 28 °C y 100rpm.
- Después del crecimiento se prosiguió a retirar la capa superficial de aquellas que formaron biofilm, con el fin de no interferir en la cuantificación de la concentración bacteriana (Figura 4).





**Figura 4.** Separación del biofilm

- Posteriormente se procedió a la cuantificación de las bacterias mediante conteo en hematócmetro y la estandarización del inóculo a la concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml (Figuras 5, 6, 7 y 8), mediante centrifugación o diluciones.



**Figuras 5 y 6.** Recuento de esporas y concentración del inóculo



### Figuras 7 y 8. Estandarización del inóculo

- Posteriormente se realizó la desinfección de semillas de rábano de la variedad Crimson giant (variedad empleada por ser de crecimiento rápido), en etanol al 70% durante cinco minutos, hipoclorito de sodio al 3% durante 10 min y enjuagado con agua destilada estéril tres veces (Figuras 9 y 10). Las semillas fueron puestas a continuación en cámaras húmedas con el fin de determinar el porcentaje de germinación (Figura 11).



Figuras 9 y 10. Variedad de rábanos empleada y desinfección de semillas

- Una vez obtenido el porcentaje de germinación se procedió nuevamente a la desinfección de las semillas mediante similar procedimiento.

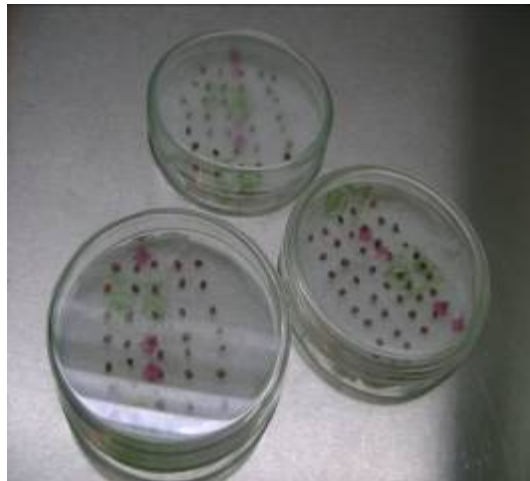


Figura 11. Semillas de rábanos en cámara húmeda para la germinación.

- Las semillas posteriormente fueron sumergidas en Carboximetilcelulosa (CMC) con el fin de que esta actúe como un adherente, mediante agitación suave durante una hora y posteriormente escurridas en una placa estéril para su inoculación a las diferentes cepas (Figuras 12 y 13).



**Fig. 12 y 13.** Inmersión de las semillas en Carboximetilcelulosa y su posterior escurrimiento en gasa

- Después las semillas fueron sumergidas en la solución bacteriana de las 44 cepas (Figuras 14 y 15) y agitadas suavemente en condiciones de oscuridad por unas cuatro horas (Figuras 16 y 17).



**Figuras 14 y 15.** Inmersión de las semillas en el inóculo bacteriano



**Figuras 16 y 17.** Agitación de las semillas inoculadas

- A continuación se prepararon macetas con 2 Kg de suelo (Figuras 18 y 19), sin esterilizar y puestas bajo condiciones de semisombra en invernadero, las cuales posteriormente fueron regadas y dejadas en reposo para el asentamiento del exceso de agua.
- Luego con la ayuda de pinzas estériles se sembraron tres semillas de rábano inoculadas por tratamiento (Figuras 20 y 21).



**Figuras 18 y 19.** Preparación de las macetas y regado de la tierra

- Se realizó el envío de una muestra del suelo empleado al laboratorio de suelos de La Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias para su análisis fisicoquímico con el fin de determinar los niveles de fósforo disponible presentes en el suelo en el momento de la siembra.



**Figuras 20 y 21.** Sembrado de las semillas inoculadas

- Una vez germinadas las semillas se procedió al raleamiento es decir se dejó solamente una planta de rábano por maceta.
- Posteriormente se realizó la evaluación semanal de las plántulas de rábano (Figuras 22 y 23) hasta las cinco semanas, cuando se realizó la evaluación final (Figuras 24 y 25).



**Figuras 22 y 23.** Medición del largo de la planta a la 1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> semana

#### **4.3. Tratamientos**

Los tratamientos fueron las 43 cepas de *Bacillus sp.* aisladas de diferentes regiones de Bolivia, más un testigo.

#### **4.4. Diseño experimental**

El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones de cada tratamiento.

Siendo las unidades experimentales las macetas con una planta de rábano cada una de las cepas, se probaron un total de 43 cepas con 3 repeticiones cada una, más un control sin inoculante, siendo un total de 132 unidades experimentales.

#### 4.5. Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron la altura de la planta y número de hojas en forma semanal además de largo de raíz, diámetro de bulbo, largo de bulbo, peso de planta y volumen de bulbo en la evaluación destructiva final (Figuras 24 a la 31).



**Figuras 24 y 25.** Medición del largo de la planta y número de hojas en la evaluación final



**Figuras 26 y 27.** Medición del largo de raíz y ancho de bulbo



Figuras 28 y 29. Evaluación de largo de bulbos y su posterior lavado



Figuras 30 y 31. Evaluación del volumen del bulbo y del peso de la planta

#### 4.6 Análisis estadístico

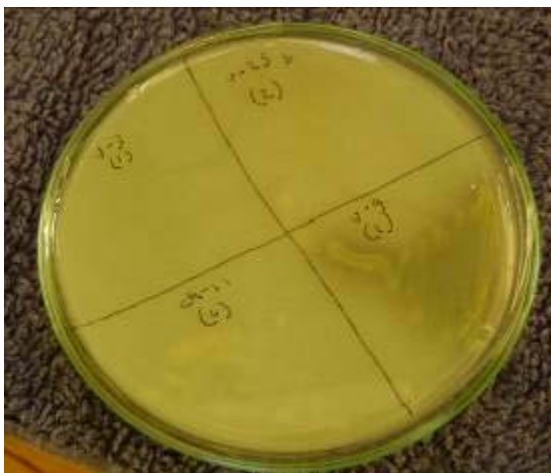
Se realizó un análisis de comparación de medias con un grado de libertad a través del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

### 32. Resultados y Discusión

#### 5.2.1 Solubilización de fósforo *in Vitro*

##### 5.2.1.1 Solubilización en medio sólido

De las 42 cepas probadas solamente una dio como resultado la formación del halo característico de solubilización de fósforo, la cepa BP-B 0018 (Figura 32), proveniente del departamento de Santa Cruz de la Sierra, provincia Manuel María Caballero de un cultivo de tomate.



**Figura 32.** Formación del halo de solubilización de fósforo en una bacteria positiva.

#### 5.2.1.2. Solubilización en medio sólido

Los resultados en el medio líquido fueron negativos, si bien las bacterias registraron crecimiento manifestado a través de la turbidez ninguna de las 43 cepas viro el color de violeta a amarillo (Figura 33), Magallon y Dion (2009) señalan que existen microorganismos que logran solubilizar el fósforo en medio sólido y no así en medio líquido y viceversa.



**Figura 33.** Crecimiento en el medio NBRIP

#### 5.2.2. Solubilización de fósforo en invernadero

La prueba de germinación reveló un 100% de germinación de las semillas de las plantas de rábano.

Se realizaron evaluaciones en invernadero durante cuatro semanas antes de la evaluación destructiva, realizada en la quinta semana, para determinar el número de hojas y la altura de planta, el análisis para la variable altura de planta (Cuadro 1), revela que no existieron diferencias estadísticamente significativas para la variable altura de planta con las diferentes cepas ( $P < 0,01$ ),



las plantas fueron creciendo en forma pareja a lo largo de las cuatro semanas, con los diferentes tratamientos.

**Cuadro 1.** Cuadro de análisis de Varianza para altura de planta

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Trt	42	0,24	0,31	1

Con relación al número de hojas desarrolladas (Cuadro 2), tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas en las plantas tratadas con las 44 cepas ( $Pr < 0,01$ ), por tanto las plantas mostraron un similar número de brotes durante las cuatro semanas de evaluación.

**Cuadro 2.** Cuadro de análisis de Varianza para número de hojas de la planta

Source	DF	Mean Square	Pr > ChiSq
Trt	42	3,72	1

El análisis destructivo para la quinta semana de siembra es resumido en el (Cuadro 3).

Las variables de respuesta diámetro de bulbo, longitud de bulbo, longitud de raíz, número de hojas y altura de planta no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $Pr < 0,01$ ).

Si embargo las variables peso de planta y volumen de bulbo si presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $Pr < 0,01$ ).

Con relación al peso de la planta, las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016 se muestran como las más eficientes (Cuadro 4) y (Figura 34), la primera pertenece a la región del Altiplano, departamento Oruro provincia Ladislao Cabrera, comunidad Salinas de Garci Mendoza y cultivo de quinua y la segunda a la región del Altiplano, Departamento Santa Cruz, Provincia Manuel Ma. Caballero, comunidad Expansión y cultivo de frijol

**Cuadro 4.** Comparación de medias para la variable peso de la planta

Cepas	Media	Nivel de significancia
BP-Bs 0029		
BP-Bs 0016		
BP-Bs 0021	36,60	a
BP-Bs 0031	36,38	b
BP-Bs 0040	35,62	c
BP-Bs 0040	35,49	c
BP-Bs 0040	34,58	c

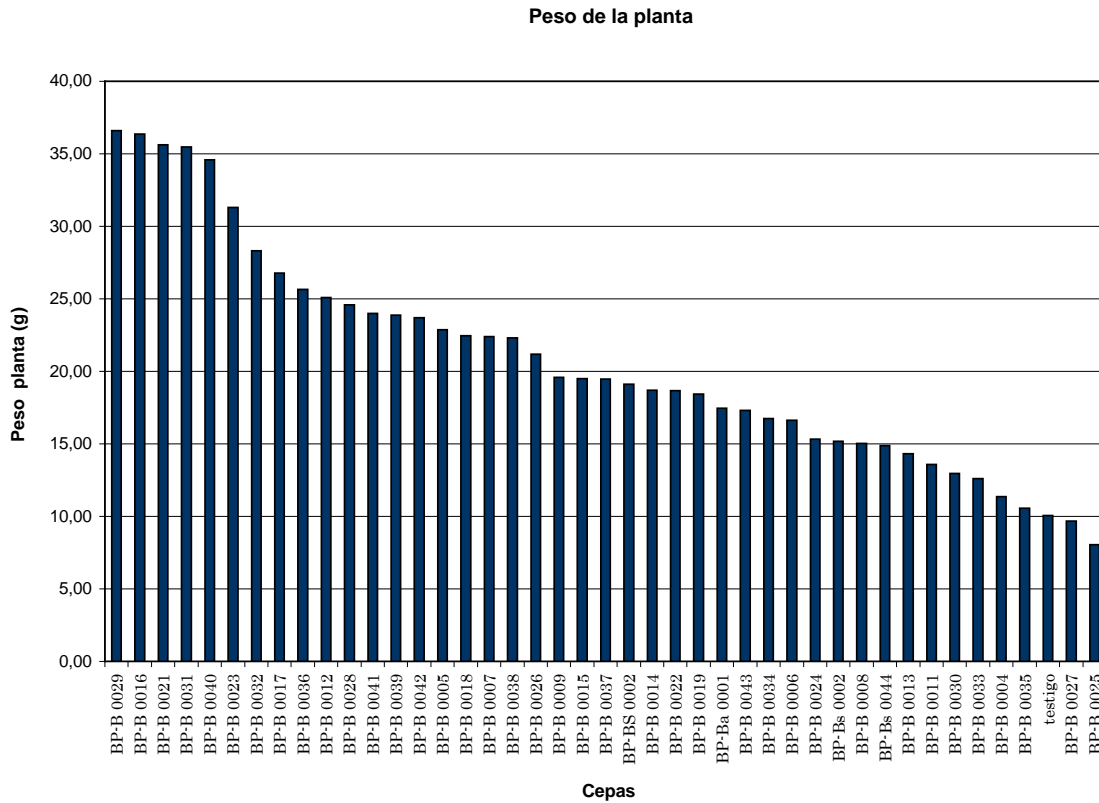
Cabe mencionar que la cepa BP-B 0018 fue la única cepa que presentó solubilización de fósforo *in Vitro* y no así las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016.

**Cuadro 3.** Cuadro de análisis de varianza para el análisis destructivo

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Numero de Hojas</b>	<b>Altura de planta</b>	<b>de Peso de planta</b>	<b>de Longitud radicular</b>	<b>Diámetro de bulbo</b>	<b>Longitud de bulbo</b>	<b>de Volumen de Bulbo</b>
Cepas	42	0,016 ns	4,474 ns	123,084**	6,667 ns	0,425 ns	1,102 ns	103,252**
Error	57	0,025	3,097	29,200	3,692	0,527	0,765	39,247
media		20.68						
CV		26.12						

\*\* significativo al 0.01 nivel de probabilidad

ns no significatvo

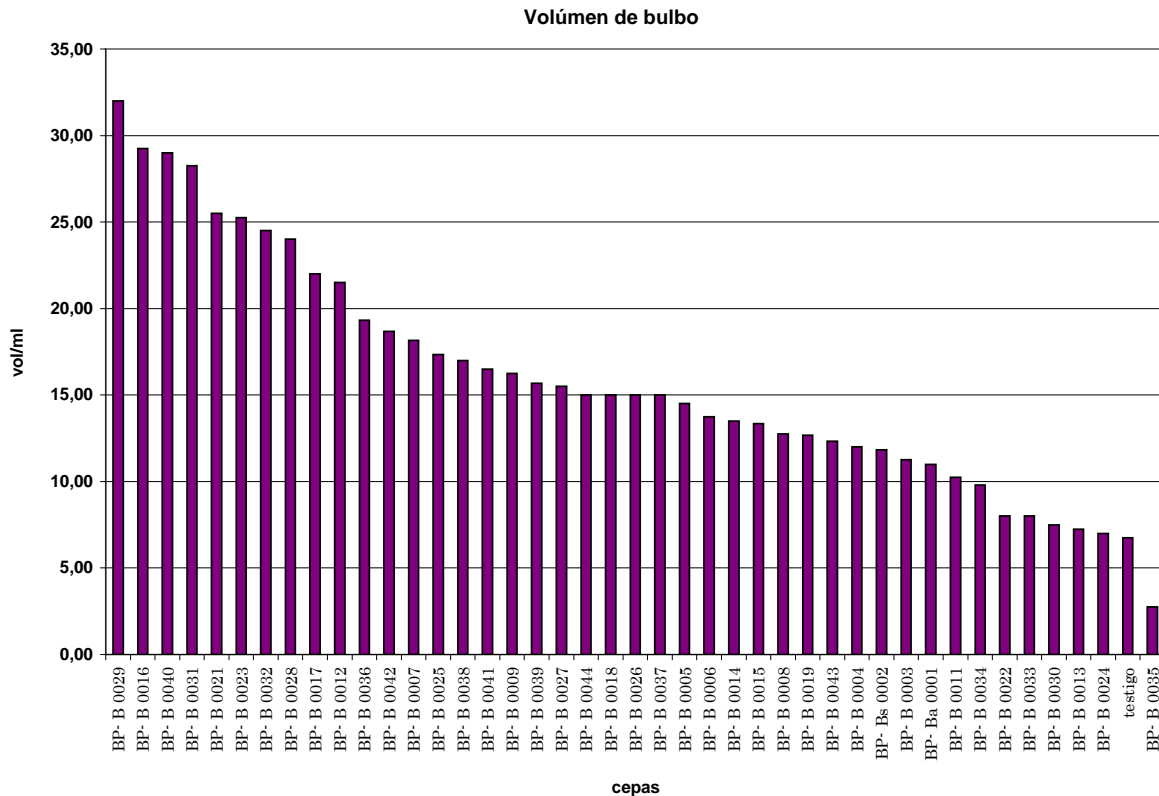


**Figura 34.** Comparación de medias del peso de las plantas inoculadas con las diferentes cepas probadas

El volumen de bulbo también fue una variable en la que se registraron cepas con diferencias estadísticamente significativas, una vez más las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016 se registraron como las mejores (Cuadro 4) y (Figura 34)

**Cuadro 4.** Comparación de medias para la variable volumen de bulbo

Cepas	Medias	Nivel de significancia
BP-Bs 0029	32,00	a
BP-Bs 0016		
BP-Bs 0040		
BP-Bs 0031	29,25	b
BP-Bs 0021	29,00	c
	28,25	c
	25,50	d



**Figura 35.** Comparación de medias del volumen del bulbo de las plantas inoculadas con las diferentes cepas

### 33. Conclusiones y Recomendaciones

Por tanto se concluye que la solubilización de fósforo en condiciones *in Vitro* dio únicamente una cepa positiva la BP-B 0018, en medio sólido, la cual no resultó efectiva en medio líquido y en invernadero las cepas BP-Bs 0029 y BP-Bs 0016 registraron diferencias significativas tanto en el peso de planta y volumen de bulbo de rábano, perfilándose como potenciales promotoras de crecimiento vegetal.

### 34. Bibliografía consultada

Alexander M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. (En: Introducción a la microbiología del suelo). AGT editor, México, p.: 355-371. 491 p.

Illmer P, Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:389-395.

Oviedo, M., E. Iglesias, 2005. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Universidad Nacional del nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Peix A, Rivas-Boyero A A, Mateos P F, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velazquez E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.

Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.

## Anexo 1

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMON  
FAC. de CIENCIAS AGRICOLAS y PECUARIAS  
"Marlín Cárdenas"  
Dpto. de Ingeniería Agrícola

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS

### ANALISIS FISICO-QUIMICO DE SUELOS



Interesado: **FUNDACION PROINPA**  
Proyecto: Tesis de Grado Resp. Walker Arandia  
Procedencia: El Paso - Quillacollo.

Nº. LAB.		1496		
Identificación		suelo		
Prof.	cm	0-15		
<b>TEXTURA</b>				
% Arcilla				
% Limo				
% Arena				
Densidad Aparente	g/cm <sup>3</sup>			
pH 1:2,5 (suelo-agua)		6.6		
C.E Milimhos/cm 1:2:5 (suelo/agua)		0.234		
Cationes Intercambiables me/100 g	Calcio			
	Magnesio			
	Sodio			
	Potasio	1.02		
T.B.I	me/100g			
C.I.C.	me/100g			
<b>% Saturación de Bases</b>				
Materia orgánica	%	3.26		
Nitrógeno total (Nt)	%	0.198		
Fósforo disponible **	ppm	16.2		
Fósforo total	ppm	1315.0		
<b>Relación C:N</b>				

C.E. = Conductividad eléctrica

TEXTURA: F = Franco; Y = Arcilla; L = Limo; A = Arena

C.I.C. = Capacidad de intercambio catiónico

T.B.I. = Total de bases intercambiables

\* Método:

\*\* Método: OLSEN Modif.

Fecha: Cbba., Diciembre de 2009

Dir. Avda. Petrolera Km 4,5 Tel.: 4237506-FAX: 4762385-Cbba.  
Email: lab.suelos@agr.umss.edu.bo

*Ing. Alfredo Cáceres C.*  
JEFE (EC. de ANALISIS y CALIDAD)  
LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS  
F. C. A. y P. UMSS



### Aislamiento de *Bacillus* de diferentes suelos de Bolivia

Responsable: Noel Ortuño

Equipo técnico: Angulo Fernández Violeta Carmen

#### Resumen

Se procesaron un total de 60 muestras de suelos de diferentes ecoregiones bolivianas y de diferentes cultivos agrícolas con el fin de aislar bacterias del género *Bacillus*, obteniéndose

recuentos comprendidos entre  $10^5$  y  $10^7$  ufc/g de suelo, dando los recuento más elevados los aislamientos de las regiones del trópico y valle y los más bajos de la puna y altiplano. Para seleccionar bacterias con características de *Bacillus subtilis*, se procedieron a realizar pruebas de identificación morfológica y bioquímicas: tinción de gram, pH de 5,7 y temperatura de 45 °C, pruebas de catalasa y degradación del almidón. Obteniéndose un total de 7 cepas con todas las características de posibles cepas de *B. subtilis*.

**Palabras claves:**

*Bacillus subtilis*, aislamiento, identificación, pruebas bioquímicas.

**35. Hipótesis**

- *Bacillus subtilis* se halla presente en suelos de diferentes ecoregiones bolivianas.

**36. Objetivos**

- Aislar cepas de *Bacillus sp.* de muestras de suelos de las provincias biogeográficas del Chaco, Altiplano, Puna y Valle.  
Realizar pruebas morfológicas y bioquímicas para la confirmación de la especie de las cepas.  
Realizar pruebas de solubilización de fósforo en las cepas aisladas.  
Conformar un cepario de los aislados de *B. subtilis* efectivos

**37. Revisión de literatura**

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo (Fernández, 2001).

*Bacillus subtilis* es una bacteria inocua comúnmente recuperada de agua, suelo, aire y residuos de plantas en descomposición. Esta bacteria produce una endospora que le permite soportar condiciones extremas de calor y desecación en el medio ambiente. *B. subtilis* produce una variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustrato natural y contribuir al ciclo de los nutrientes. Sin embargo bajo ciertas condiciones el organismo no es biológicamente activo pero existe en la forma de espora. (Alexander, 1977). *B. subtilis* es considerado un organismo benigno y no representa una amenaza que cause enfermedad. No es considerada patogénica o tóxica a humanos, animales o plantas.

Con respecto a *B. subtilis*, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Friddaman y Rossal (1993) observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas (Fernández, 2001).

*B. subtilis* tiene las siguientes propiedades en relación con la planta:

- Competición. Compete por sustrato en la rizosfera y filosfera con los patógenos de las plantas.
- Antibiosis. Produce antibióticos del tipo Bacilysin e Iturin que son altamente fungo tóxicos.
- Promotor de crecimiento. La bacteria al establecerse en el sistema radical lo protege y estimula la absorción de nutrientes.
- Inducción a resistencia. Al instalarse en las raíces y hojas induce a la planta a producir fitoalexinas que le dan resistencia a las plantas al ataque de hongos, bacterias y nematodos patógenos <http://productos-plantisana.com/bacillussubtilis.aspx>

### **38. Materiales y métodos**

#### **4.1 Toma de muestras de suelo**

El muestreo fue realizado dentro del marco del proyecto bioinsumos y se tomaron analizaron las muestras de los siguientes pisos ecológicos y localidades.

#### **4.2 Aislamiento de nuevas cepas de *Bacillus***

El procedimiento de aislamiento de las bacterias se realizó de la siguiente manera para cada una de las 60 muestras de suelo:

- Se pesó un gramo de muestra de suelo
- Se resuspendió la muestra en matraces Erlenmeyer de 25 ml. de capacidad con 9 ml de buffer y se procedió a la agitación durante 24 horas con el fin de liberar las bacterias de las partículas coloidales del suelo (Fig 1).



**Figura 1.** Agitación de las muestras de suelo en buffer por 24 horas.

- A continuación se procedió a filtrar la suspensión de suelo con vendas de gasa previamente esterilizadas a manera de filtro a vasos de precipitación estériles, con el fin de separar las partículas de tierra que puedan impedir el posterior correcto pipeteo (Figura 2).



**Figura 2.** Filtración de las muestras de suelo mediante el uso de vendas de gasa como filtros.

- Posteriormente se tomó un ml de filtrado de cada una de las cepas y se sometieron estas a un choque térmico de 80 °C por el lapso de 12 minutos (Fig 3).





**Figura 3.** Choque térmico de las muestras a 80°C durante 12 minutos.

- Posteriormente se realizaron diluciones de esta suspensión y se realizó la siembra en placas con agar TSA (Figura 4).



**Figura 4.** Siembra de las muestras en agar TSA con la ayuda del triángulo de Drigalsky.

- Las placas fueron incubadas a 28°C por 48 horas realizándose lecturas de la densidad bacteriana a las 24 y 48 horas.
- Se seleccionaron colonias con características de *Bacillus subtilis*

#### 4. 2.1 Aislamiento de *B. subtilis*

Las colonias de bacterias seleccionadas con características de *Bacillus subtilis* fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas:

#### **a) Tinción de Gram**

Esta tinción distingue entre dos amplios grupos de bacterias, según la composición de la pared celular, las Gram (-), que no retienen el complejo cristal violeta-iodo después de la decoloración con alcohol, y aparecen teñidas de rojo, y las Gram (+), que sí lo retienen, y aparecen teñidas de azul oscuro o morado (Masson, 1995).

El proceso de tinción se realizó a cultivos bacterianos jóvenes de 24 horas de incubación en caldo nutriente de la siguiente manera:

- Se preparó un frotis y posterior fijación en calor cuando este ya estuvo seco.
- Se tiñó con cristal violeta genciana por un minuto.
- Se retiró el cristal y se aplicó lugol por un minuto.
- Se aplicó alcohol decolorante hasta eliminar la coloración anterior.
- Se lavaron las muestras con chorro de grifo suave
- Se tiñeron las muestras con colorante safranina. Durante 30 seg a 1 min.
- Se lavó con agua y se secó.
- Finalmente se realizaron las observaciones al microscopio.

#### **b) Prueba de la actividad Catalasa y Amilasa**

Algunas bacterias contienen flavoproteínas que reducen  $O_2$ , resultando en la producción de Peróxido de Hidrógeno  $H_2O_2$  ó superoxidasa  $O_2^-$ , siendo estos muy tóxicos por se agentes tóxicos muy fuertes, por tanto muchas bacterias poseen enzimas que generan protección contra estos efectos, las enzimas superoxidasa dismutasa y también las catalasa o peroxidasa catalizan la destrucción del superóxido y peróxido de hidrógeno respectivamente.

Muchas bacterias producen enzimas llamadas hidrolasas, estas moléculas catalizan la ruptura de las moléculas orgánicas en pequeñas moléculas en la presencia de agua. El yodo es empleado para indicar la presencia de almidón, el cual en contacto con el almidón se torna púrpura, el almidón hidrolizado no produce cambios de color. Si aparece un área clara en la región de la aplicación del yodo en placas que contienen almidón y crecimiento bacteriano, la  $\alpha$ -amilasa ha sido producida por la bacteria (Harley y Prescott, 1990).

El proceso de revelado de la actividad catalasa y amilasa fue realizado de la siguiente manera:

Las cepas fueron incubadas en agar nutriente con almidón soluble al 1% por 24 horas a 28°C.

- Para la catalasa se revelaron con la adición de una gota de agua oxigenada al 30%, considerándose positivas aquellas cepas cuyas colonias formaron burbujas como liberación O<sub>2</sub>.
- Posteriormente se añadió lugol- yodo, para el revelado de la actividad amilasa, considerándose como positivas aquellas cepas que presentaron un halo alrededor de sus colonias.



**Figura 5.** Revelado de la actividad amilasa.

### **c) pH y temperatura**

*Bacillus subtilis* es una bacteria capaz de crecer a pH de 5,7 y a temperatura de 45 grados (Schaad *et al.*, 2001), siendo el procedimiento para la siguiente prueba:

- Se sembró en caldo TSB con pH de 5,7 las cepas a confirmar y se incubó a 45°C por el lapso de 5 días, considerándose como positivo la turbidez del medio.



**Figura 6.** Tubos con caldo TSB a pH de 5,7

### 3.3 Diseño experimental

Se tenían 60 muestras de las cuales se procesaron primeramente 50 muestras proveniente de las regiones Ecológicas de Chaco, Altiplano, Puna, Valles y Trópico de Bolivia (Cuadro 1):

**Cuadro 1.** Códigos y Origen de las diferentes muestras de suelo.

	<b>Trópico</b>		<b>Chaco Boreal</b>		<b>Valle</b>
<b>Código</b>	<b>Departamento</b>	Ch-1	Chuquisaca	V-1	Cochabamba
T-2	La Paz	Ch-2	Chuquisaca	V-2	Cochabamba
T-3	La Paz	Ch-4	Tarija	V-3	Cochabamba
T-4	La Paz	Ch-5	Tarija	V-4	Cochabamba
T-5	La Paz	Ch-6	Tarija	V-5	Tarija
T-6	La Paz	Ch-7	Tarija	V-6	Santa Cruz
T-7	La Paz	Ch-9	Tarija	V-7	Santa Cruz
T-8	La Paz	Ch-10	Tarija	V-8	Santa Cruz
T-9	Cochabamba	Ch-11	Tarija	V-9	Santa Cruz
T-10	Cochabamba	Ch-12	Tarija	V-10	Santa Cruz
T-11	Cochabamba	Ch-13	Tarija	V-11	Santa Cruz
T-12	Cochabamba	Ch-14		V-12	Santa Cruz
T-13	Cochabamba	Ch-13	Tarija	V-13	Santa Cruz
T-14	Cochabamba	Ch-14		V-14	Santa Cruz
T-15	Cochabamba		<b>Puna</b>	V-15	Santa Cruz
T-16	Cochabamba	P-1	La Paz	V-16	Santa Cruz
T-17	Cochabamba	P-2	La Paz	V-17	Santa Cruz
T-18	Cochabamba	P-3	La Paz	V-18	Santa Cruz
	<b>Altiplano</b>	P-4	La Paz	V-19	Santa Cruz
A-1	Oruro	P-5	Cochabamba	V-20	Cochabamba

A-2	Oruro	P-6	La Paz	V-21	Cochabamba
A-3	Oruro	P-7	La Paz	V-22	Cochabamba
		P-8	La Paz	V-23	Cochabamba
		P-9	La Paz	V-24	Cochabamba
		P-10	La Paz	V-25	Cochabamba
		P-11	La Paz	V-26	Cochabamba
		P-12	La Paz	V-27	Cochabamba
		P-13	La Paz		
		P-14	Potosí		

Las 50 muestras de suelo se analizaron en cinco bloques espaciales en el tiempo, tomándose 10 muestras en cada oportunidad. El muestreo se realizó al azar y en función al número de muestras de cada región se sacaron las siguientes cantidades en cada muestreo (Cuadro 2):

**Cuadro 2.** Nº de muestras tomadas en cada bloque

<b>Regional</b>	<b>Nº de muestras</b>
Trópico	2
Chaco	2
Valle	3
Puna	2
Altiplano	1

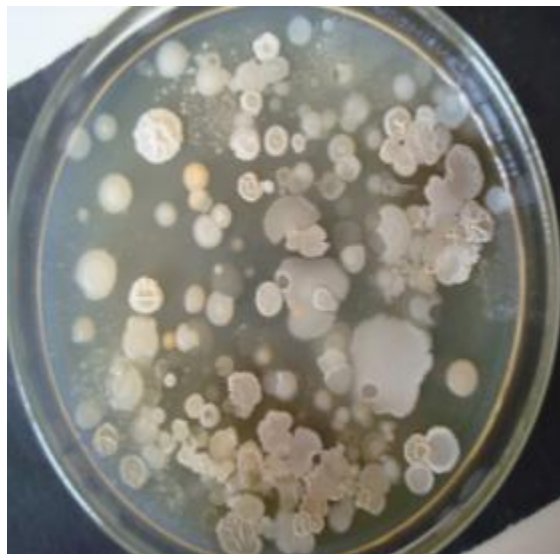
Posteriormente en un sexto bloque se procesaron 10 muestras provenientes del Altiplano.

### **39. Resultados**

Las densidades de las colonias de bacterias obtenidas mostraron una marcada diferencia en las diferentes ecoregiones a las mismas diluciones (Fig.7 y Fig 8):



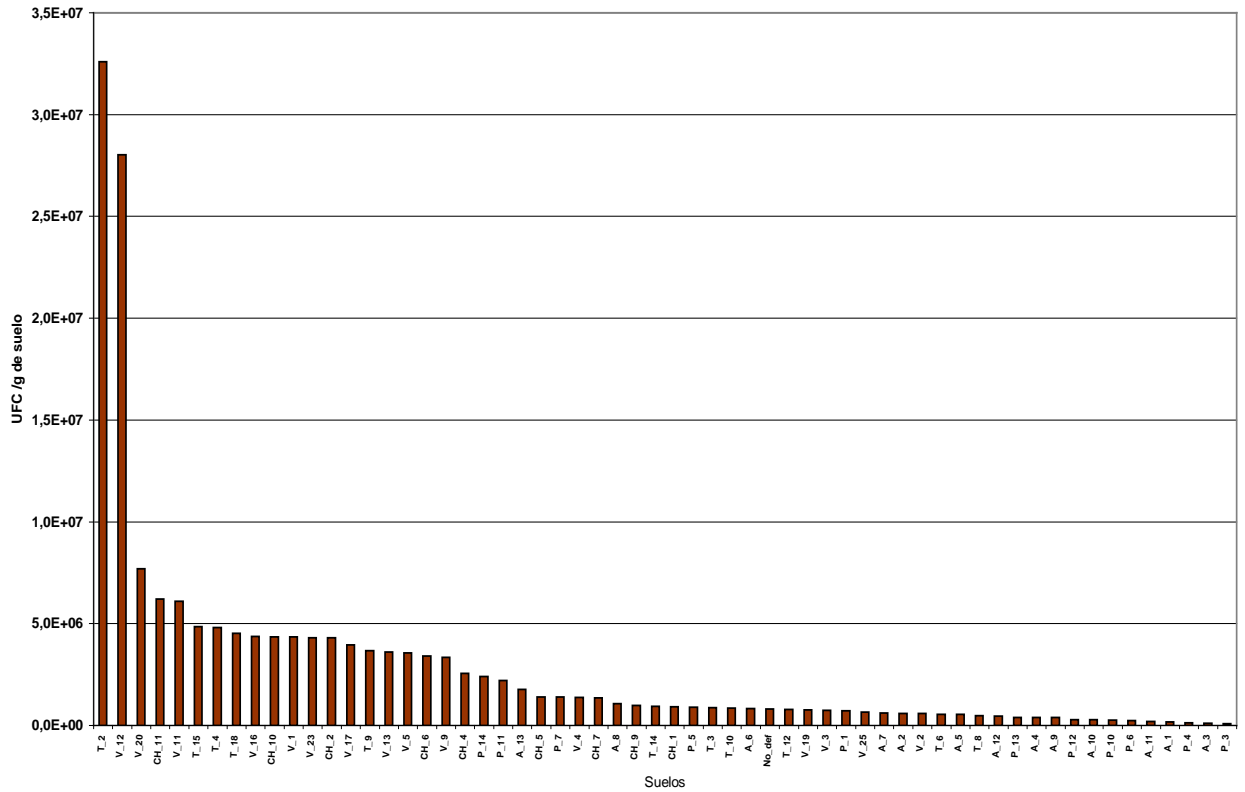
**Figura 7.** Observación de colonias de un suelo del Altiplano a la dilución  $10^{-3}$



**Figura 8.** Observación de colonias de un suelo de Trópico a la dilución  $10^{-3}$

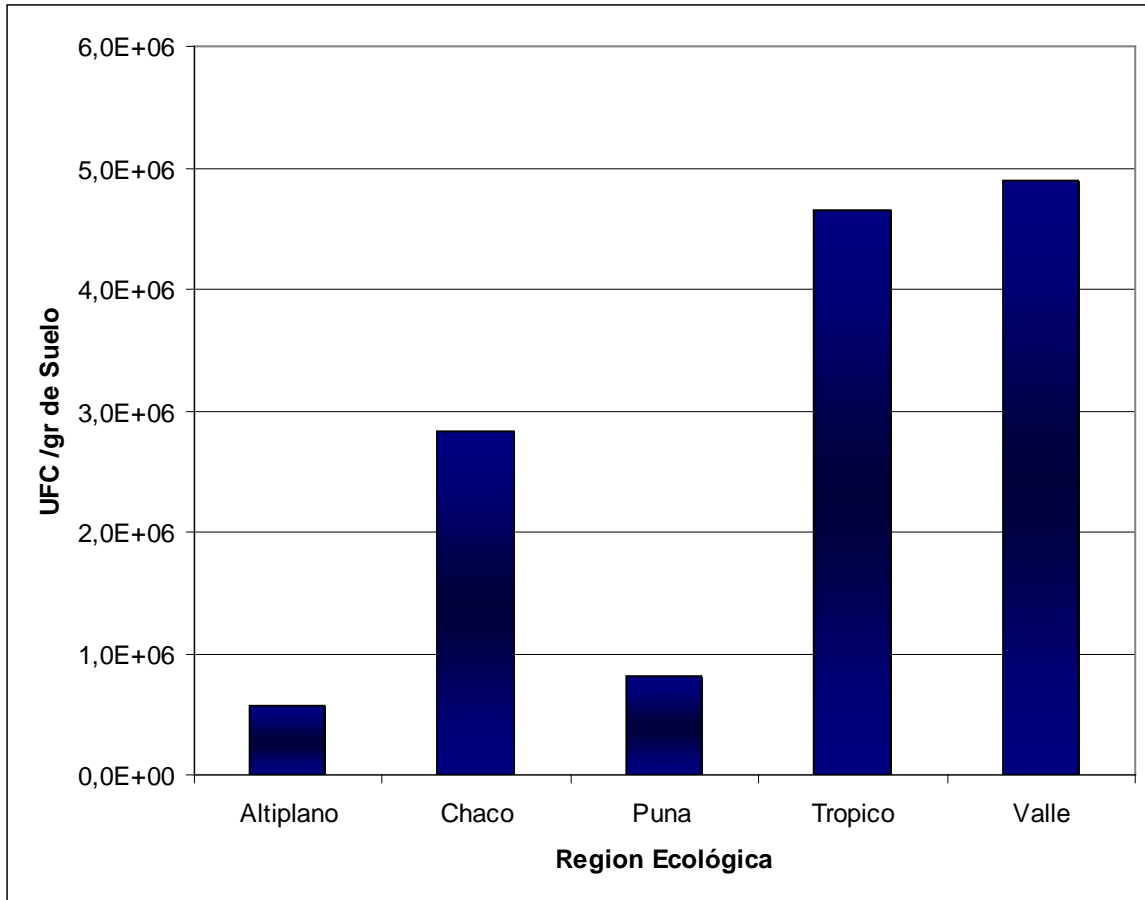
En la (Figura 9) se observa los niveles de producción de UFC/g de suelo de bacterias del género *Bacillus* en las muestras de suelo de las diferentes ecoregiones.

Las muestras de suelo con mayor producción microbiana fueron la T- 12 y la V-12, la primera de la región de trópico, provincia Chapare del Departamento de Cochabamba, de un cultivo de Arracacha. La segunda muestra fue obtenida de la región del Valle, del Departamento de Santa Cruz de un cultivo de tomate.



**Figura 9.** Niveles de UFC/g de *Bacillus* crecidos de las diferentes muestras de suelo.

Los valores observados en promedio fueron de  $10^5$  a  $10^7$  UFC/g de suelo siendo las regiones de mayor densidad bacteriana la región ecológica de los valles y el trópico seguido por el chaco y finalmente las regiones de puna y altiplano (Figura 10).



**Figura 10.** Densidad microbiana de acuerdo a las diferentes provincias ecológicas.

Las colonias con características morfológicas similares a *B. subtilis* fueron sometidas a las pruebas bioquímicas.

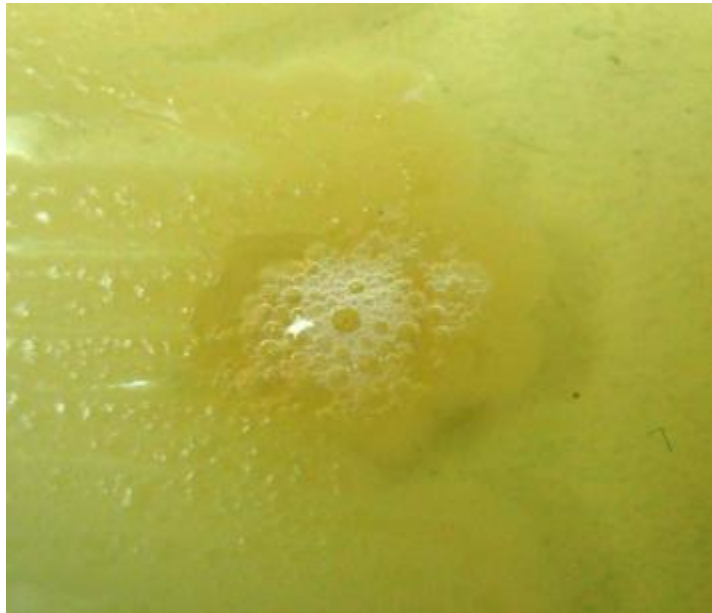
**a) Tinción de Gram**

Las pruebas realizadas con tinción de Gram fueron invalidadas debido a problemas con los colorantes empleados.

**b) Prueba de la actividad catalasa y amilasa**

Las bacterias que dieron positivo en los test de actividad catalasa y amilasa presentaron las siguientes características: formación de burbujas como liberación de O<sub>2</sub> al medio (Figura 11), para la catalasa y formación de un halo alrededor de la colonia para la actividad amilasa (Fig. 12).





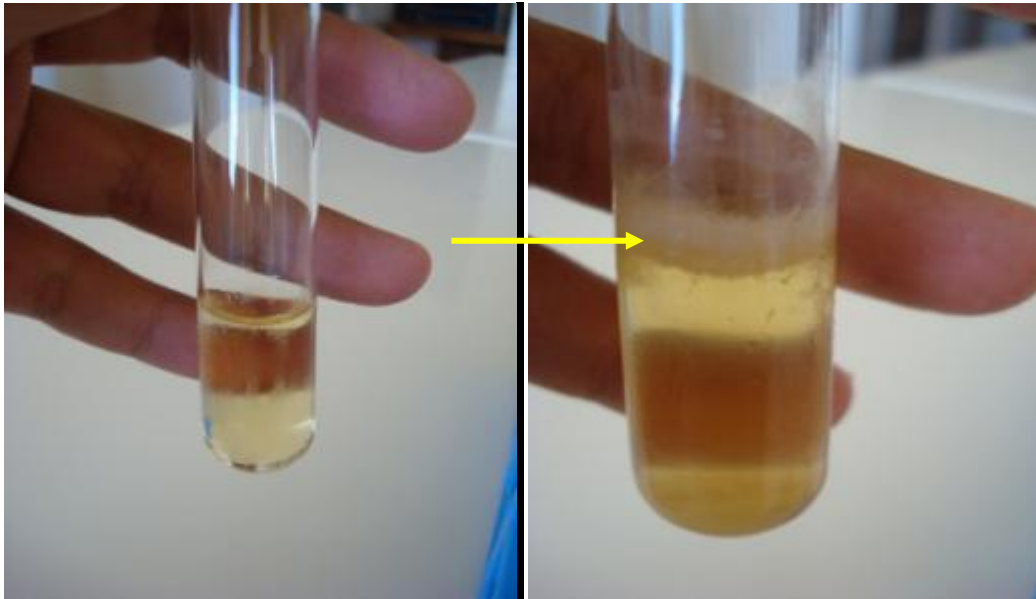
**Figura 11.** Reacción positiva a la prueba de la catalasa



**Figura 12.** Formación del halo como reacción positiva a la prueba de amilasa en la parte superior de la placa y abajo reacción negativa.

### **c) pH y temperatura**

Las pruebas realizadas a pH 5,7 y 45 °C dieron lugar a la formación de turbidez y en algunos casos la formación de una película a nivel superficial (Figura 13), en las bacterias que dieron positivo.



**Figura 13.** Crecimiento bacteriano en caldo LB a 5,7 de pH y 45° C

La tabla muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en todas aquellas cepas consideradas como posible *B. subtilis*.

Finalmente las características morfológicas fueron evaluadas nuevamente (Cuadro 1) (Figura 14), seleccionado de forma más estricta la similitud con las colonias de la cepa de *B. subtilis* comercial.

**Cuadro 1.** Características morfológicas de las colonias de las cepas aisladas

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Forma	Redondeada a irregular
Color	Mate
Elevación	Plana con ondulaciones
Textura	Seca
Bordes	Ondulados



**Figura 14.** Colonia de una de las cepas aislada

El cuadro 2 resume las pruebas realizadas para las cepas, enfatizando aquellas cepas que son consideradas como posibles *B. subtilis* al cumplir todas las condiciones ensayadas.

**Cuadro 2.** Resumen de los resultados de las pruebas bioquímicas y morfológicas realizadas.

<b>Codificación</b>	<b>Amilasa</b>	<b>Catalasa</b>	<b>pH 5,7 y 45°C</b>	<b>Colonias características</b>
V-16	-	+	-	
V-16	-	+	+	
V-16	-	+	+	
<b>A-1</b>	+	+	+	+
CH-1	-	+	+	
P-1	+	+	+	
V-3	-	+	+	
CH-9	-	+	+	
V-9	-	+	+	
V-9	-	+	+	
<b>V-25</b>	+	+	+	+
V-25	-	+	+	
<b>V-25</b>	+	+	+	+
<b>P-11</b>	+	+	+	+
<b>CH-11</b>	+	+	+	+
A-2	-	+	+	
T-18	-	+	+	
CH-10	-	+	-	
V-4	-	+	+	
CH-6	-	+	+	
CH-6	-	+	+	
CH-6	+	+	+	
P-7	+	+	+	
CH-7	-	+	-	

V-20	-	+	-	
V-20	-	+	+	
V-20	+	+	+	+
P-6	+	+	+	
V-11	+	+	+	
V-17	+	+	+	
V-17	-	+	+	
V-17	+	-	+	
CH-2	-	+	+	
CH-2	-	+	+	
T-6	-	+	+	
V-19	-	+	+	
CH-5	+	+	+	
A-5	+	+	+	
A-13	+	+	+	+

De esta forma se seleccionaron 7 cepas que cumplieron todas las pruebas ensayadas como posibles cepas de *B. subtilis*, las cuales provienen de las siguientes regiones (Cuadro 3):

**Cuadro 3.** Origen de las cepas seleccionadas

Código	Nº de cepas	Región	Cultivo
A-1	1	Altiplano	Quinoa
V-25	2	Valle	Maíz- Frijol
P-11	1	Puna	Haba
CH-11	1	Chaco	Maíz
V-20	1	Valle	--
A-13	1	Altiplano	Haba

De las cepas seleccionadas cabe mencionar que dos proceden del Altiplano Boliviano de cultivos de quinua y haba siendo esta zona de baja densidad bacteriana.

Quedando pendiente el trabajo de formación del cepario, una vez obtenidos los resultados de confirmación de especie de las cepas seleccionadas.

#### **40. Discusión**

Alexander (1977) señala que la población de *Bacillus* se estima en niveles de  $10^6$  a  $10^7$  bacterias por gramo de suelo, datos que corroboran los encontrados en este trabajo.

Con relación a la caracterización bioquímica Schaad y Schun, 2002, indican que *Bacillus subtilis* es una bacteria con reacción positiva a la prueba de tinción de Gram, con crecimiento positivo a 45 °C, pH 5,7 y 7% de Cloruro de Sodio así como a las pruebas de reacción a la amilasa.

A nivel morfológico *Bacillus subtilis* es una bacteria con características de bastón Gram-positivo, forma *B. subtilis* forma en los medios de cultivo colonias que son opacas y pueden arrugarse, su coloración va del crema al castaño, lo cual concuerda con las colonias seleccionadas. Se encuentra en tierra y pudriendo material de plantas y no es patógeno.

([http://www.arrowscientific.com.au/Bacillus\\_subtilis.html](http://www.arrowscientific.com.au/Bacillus_subtilis.html))

Las pruebas de solubilización de fósforo es un proceso que se encuentra en ejecución, así como la conformación del cepario con aquellas cepas eficaces.

#### **41. Conclusiones**

Se concluye que existen seis cepas con algunas de las características bioquímicas de *B. subtilis*, siendo necesaria la realización de pruebas complementarias para poder confirmar la especie.

#### **42. Recomendaciones**

Deben realizarse pruebas de antagonismo y de solubilización de fósforo en invernadero con las presuntivas cepas *B. subtilis*.

#### **43. Bibliografía consultada**

Fernández, O., 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de plagas. Costa Rica. 62:96-100.

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (Eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd. Ed. APS Press, St Paul, Minnesota. 373 pp.

([http://www.arrowscientific.com.au/Bacillus\\_subtilis.html](http://www.arrowscientific.com.au/Bacillus_subtilis.html))

### **Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* de diferentes zonas del país**

Responsable: Violeta Angulo y Noel Ortuño

#### **Resumen**

Se analizaron 60 muestras de suelos de diferentes ecoregiones de Bolivia: altiplano, trópico chaco, valle, puna y de diferentes cultivos agrícolas con el fin de aislar cepas de *B. thuringiensis* a través de características morfológicas y microscópicas, obteniéndose un total de 29

cepas con características de *Bt*, de las cuales 8 correspondieron al trópico, 6 al valle, 6 al altiplano, 5 al chaco y 4 a la puna Boliviana

**Palabras claves:**

*Bacillus thuringiensis*, aislamiento, suelos.

**44. Hipótesis**

*Bacillus thuringiensis* tiene una amplia presencia en los suelos bolivianos muestreados.

**45. Objetivos**

- Aislar cepas de *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelos de las provincias biogeográficas del Chaco, Altiplano, Puna y Valle  
Realizar pruebas morfológicas y microscópicas para la confirmación de la especie de las cepas.  
Determinar la patogenicidad de las cepas aisladas sobre plagas agrícolas de interés.  
Conformar un cepario de *B. thuringiensis* los aislados de efectivos.

**46. Revisión de literatura**

El microorganismo más utilizado como bioinsecticida y extendido comercialmente en todo el mundo es *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), una bacteria esporígena descubierta en 1901 por el científico japonés Ishiwata, y redescubierta diez años más tarde por el científico alemán Berliner quien le asignó el nombre con el que ahora se le conoce (Caballero y Ferré, 2001).

*B. thuringiensis* está presente en diversos ambientes y es fácilmente aislado a partir de diferentes sustratos por medios relativamente rápidos y eficientes (Polanczyk, 2004).

*B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. (Feitelson, 1993; Soberón y Bravo, 2003).

En virtud de su posición taxonómica *Bt* es considerado un microorganismo asociado al suelo, hasta el momento, no se conoce con precisión el papel que desempeña en el suelo. Se sabe que puede germinar y completar su ciclo allí sin intervención de ningún insecto, no corresponde a un organismo patógeno obligado, más bien es un patógeno facultativo, prefiriendo suelos neutros o moderadamente ácidos (Saleh, 1970; Iriarte y Caballero, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se han aclarado suficientemente las demás condiciones bajo las que se multiplica en la naturaleza ni como interactúa con el resto de la flora edáfica.

#### **47. Materiales y métodos**

En base a la colección de suelos del proyecto BIOTOP se procedió al aislamiento de *Bacillus thuringiensis* de 60 muestras de suelo:

- Se pesó un gramo de muestra de suelo
- Se resuspendió la muestra en matraces Erlenmeyer de 25 ml. de capacidad con 9 ml de buffer y se procedió a la agitación durante 24 horas con el fin de liberar las bacterias de las partículas coloidales del suelo.
- A continuación se procedió a filtrar la suspensión de suelo con vendas de gasa previamente esterilizadas a manera de filtro a vasos de precipitación estériles, con el fin de separar las partículas de tierra que puedan impedir el posterior correcto pipeteo.
- Posteriormente se tomó un ml de filtrado de cada una de las cepas y se sometieron estas a un choque térmico de 80 °C por el lapso de 12 minutos.
- Posteriormente se realizaron diluciones de esta suspensión y se realizó la siembra en placas con agar TSA.
- Las placas fueron incubadas a 28°C por 48 horas realizándose lecturas de la densidad bacteriana a las 24 y 48 horas.

Se seleccionaron colonias con características morfológicas de *Bacillus thuringiensis* y se realizó el aislamiento.

Las cepas seleccionadas fueron sembradas a caldo LB (Luria Bertani) e incubadas por 48 horas a 28°C, para posteriormente ser observadas con microscopio óptico de contraste de fases y determinar como positivas aquellas cepas que formen el cristal el cual es birrefringente con contraste de fases.

#### **4.1 Diseño experimental**

Se tenían 60 muestras de las cuales se procesaron primeramente 50 muestras proveniente de las regiones Ecológicas de Chaco, Altiplano, Puna, Valles y Trópico de Bolivia.

Las 50 muestras de suelo se analizaron en cinco bloques espaciales en el tiempo, tomándose 10 muestras en cada oportunidad. El muestreo se realizó al azar y en función al número de muestras de cada región, se procesaron 2 muestras del trópico, 2 del chaco, 2 del Valle, 2 de Puna y una de Altiplano en cada bloque

Posteriormente en un sexto bloque debido a su reciente muestreo se procesaron 10 muestras provenientes del Altiplano.

#### **48. Resultados**

Las colonias de las cepas seleccionadas presentaron las siguientes características morfológicas Cuadro 1 y figura 1:

**Cuadro 1.** Características morfológicas de las colonias de las cepas aisladas

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Forma	Redondeada a irregular
Color	Blanco a crema
Elevación	Plana
Textura	cremosa
Bordes	Redondeados



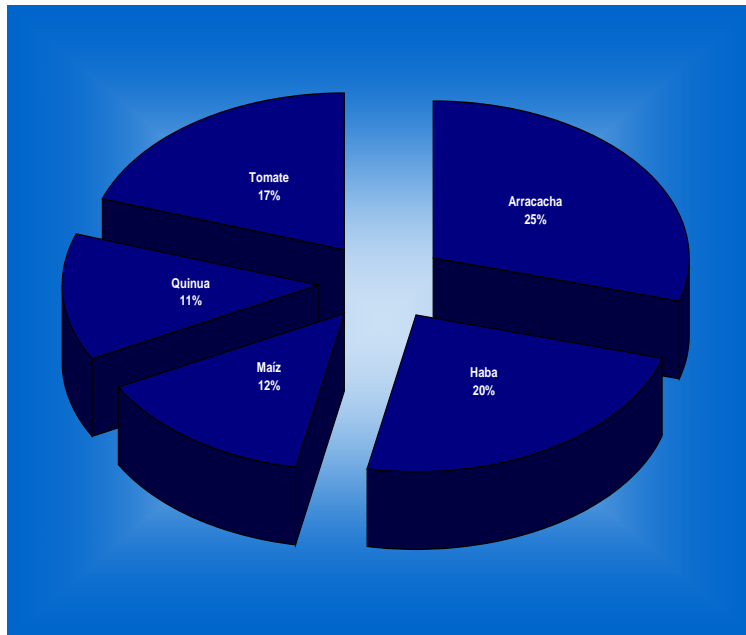
**Figura 1.** Aspecto de las colonias aisladas como *B. thuringiensis*

El estudio microscópico de contraste de fases, que se caracteriza por mostrar la birrefringencia de los cristales dentro de la célula en estado de formación, reveló la presencia de 29



cepas con características de *B. thuringiensis*, de las cuales 8 corresponden al trópico, 6 al valle, 6 al altiplano, 5 al chaco y 4 a la puna.

Las cepas aisladas se obtuvieron de un 25% del total de suelos de cultivos de arracacha analizados, de un total de 20% de los suelos de haba analizados, un 17% de los suelos de cultivos de tomate procesados, un 12 % de los suelos de maíz analizados y un 11% de los suelos de quinua analizados Figura 2.



**Figura 2.** Porcentaje de muestras con *B. thuringiensis* en relación al total de cada cultivo.

La medida de la patogenicidad de las cepas mediante bioensayos es un proceso en vías de desarrollo para su posterior conservación a través de la estandarización de formas de almacenamiento, que permitan la correcta preservación de las cepas patógenas.

#### **49. Discusión**

Al haberse obtenido un 50% de aislamientos de *B. thuringiensis* del total de suelos analizados Villegas *et al.* (2006) señalan que las esporas de *Bt* se aíslan con relativa facilidad de diversos ambientes Scribd (2006), indica que el suelo actúa como un sumidero para las esporas de *Bt* provenientes de la actividad de insectos y de hojas caídas. Por tanto *Bt* en virtud de su posición taxonómica y de su ciclo biológico es considerado un microorganismo asociado al suelo, donde las esporas mantienen su viabilidad por años (Iriarte y Caballero, 2001).

Con relación a las características morfológicas y microscópicas halladas en estas cepas, son corroboradas por los trabajos de Iriarte y Caballero (2001) que indican que *B. thuringiensis* en agar nutritivo forma colonias circulares de borde irregular, perfil plano y color marfil claro. Fernández (2005), menciona que las colonias de *B. thuringiensis* son blancas a blancas cremoso con bordes ramificados y de consistencia ligeramente costrosa.

Polanczyk *et al.* (2004), explican que en su investigación la morfología de las colonias de *B. thuringiensis* halladas presentaron ciertas modificaciones siendo en su mayoría (98,5%) de forma circular y de bordes ondulados y estas en su totalidad no presentaron pigmentación, lucieron opacas y con estructura densa. Sosa- Gómez *et al.* (1998) también describen las colonias con ausencia de pigmentación, bordes ondulados y opacas de aspecto.

Con relación a las características microscópicas (Iriarte y Caballero, 2001), el cristal paraesporal es birrefringente aunque normalmente en menor grado que la espora, la observación de ambas estructuras en la célula mediante microscopía óptica de contraste de fases es la técnica de identificación comúnmente utilizada para el aislamiento, presentando el cristal diversidad de formas.

## **50. Conclusiones**

Se logró el aislamiento de 29 cepas de *Bt* de las 60 diferentes muestras de suelo bolivianas, en base a las características morfológicas y microscópicas seleccionadas.

## **51. Recomendaciones**

Se recomienda la multiplicación de las cepas halladas para determinar el potencial de multiplicación y la realización de pruebas de patogenicidad sobre diferentes plagas de interés agrícola.

## **52. Bibliografía**

Caballero, P. y J. Ferré. 2001. Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. Universidad Pública de Navarra. Phytoma-España. pp. 9-10.

Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. En: L.Kim (ed) Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp 63-71.

- Fernández, O. 2005. Producción de *Bacillus thuringiensis* nueva alternativa de control biológico. I Curso Internacional teórico práctico. 144 p.
- Iriarte, J., y P. Caballero. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis* En: "Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas". (P. Caballero y J. Ferré, edit.). Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra / Phytoma. Cap. 1.:15-44.
- Polanczyk, R.A. 2004. Estudios de *Bacillus thuringiensis* Berliner Visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E- Smith). Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Ciencias, Área de Concentración: Entomología. São Paulo-Brasil.145 p.
- Saleh, S. M., R. F. Harris and O. N. Allen. 1970. Recovery of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* from field soils. J. Invertebr. Pathol. 15:55-59.
- Soberón, M. y A. Bravo. 2003. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Departamento de Microbiología Molecular/ Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. (Online: 03-04-06). [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_16/Capitulo16.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_16/Capitulo16.pdf)
- Sosa-Gómez, D. R., M.S. Tirano y S.B Alves. 1998. Caraterização de entomopatógenos In: S.B. Alves, Controle microbiano de insetos. São Paulo: FEALQ. 22: 731-764.
- Scribd. 2006. *Bacillus thuringiensis*. (Online: 03-05-08).
- Villegas, M. J., R. D. Guillen, M. H. Martínez y J. M. Sánchez-Yáñez. 2006. Aislamiento y supervivencia de esporas *Bacillus thuringiensis* en maíz en almacén y en el ambiente. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México.

Aislamiento de entomopatógenos aislados de suelos de diferentes ecorregiones de Bolivia

Responsable: Noel Ortuño  
 Equipo técnico: Mayra Claros  
 Instituciones colaboradoras o socias:

## Compendio:

La mayor parte de los insectos que atacan a las plantas cultivadas tienen enemigos naturales que los parasitan y matan, produciendo así una reducción considerable en su población. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es el de aislar la mayor cantidad de hongos entomopatógenos de diferentes suelos en diferentes ecorregiones de Bolivia. En este trabajo se utilizaron larvas del último estadio del lepidóptero *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae) como insectos cebo. Se evaluaron 74 suelos de los cuales se obtuvieron 81 aislados. Se caracterizaron 16 aislados obteniendo algunos hongos entomopatógenos entre los cuales tenemos *Beauveria sp.* y *Verticillium sp.* y en otros casos hongos no relevantes. Por lo que se demuestra que es viable aislar hongos entomopatógenos, con el uso de insectos cebo de diferentes muestras de suelos.

**Palabras claves:** Hongos Entomopatógenos, *Galleria mellonella*

53. **Objetivo:** Obtención de hongos entomopatógenos

54. **Hipótesis:** Todos los suelos albergan microorganismos y todos los organismos vivos tienen enemigos naturales.

55. **Revisión de literatura**

La mayor parte de los insectos que atacan a las plantas cultivadas tienen enemigos naturales que los parasitan y matan, produciendo así una reducción considerable en su población. El uso de hongos entomopatógenos para la exterminación de tales insectos constituye, por lo tanto, un componente importante de control, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan para este propósito. (Cañedo V. & Ames T., 2004)

Dentro de los más importantes se mencionan: *Metarhizium spp*, *Beauveria spp*, *Aschersonia spp*, *Entomophthora spp*, *Zoophthora spp*, *Erynia spp*, *Eryniopsis spp*, *Akanthomyces spp*, *Fusarium spp*, *Hirsutella spp*, *Hymenostilbe spp*, *Paecilomyces spp* y *Verticillium spp*, pertenecientes a la [clase](#) Zygomycetes e Hyphomycetes (López y Hans Börjes, 2001).

56. **Materiales y métodos**

### 4.1. Material Biológico

Población de larvas del último estadio del lepidóptero *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae), conocido también como "polillas de la cera".

Muestras de suelos de diferentes regiones.

### 4.2. Material de laboratorio

Cámara de flujo laminar, microscopio, estereoscopio, autoclave, agua destilada, alcohol, algodón, papa, azúcar, agar, haza de platino, bisturí, balanza, placas Petri, cámara fotográfica, libreta de registro, marcador, mechero, parafilm, papel aluminio, papel toalla, recipientes de plástico, porta y cubre objetos, incubadora, recipientes de cría, termómetro, dieta de gallerias y humidificador.

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Cría de *Galleria mellonella*

La cría de *G. mellonella* se realizó a partir de colmenas infectadas de dicha plaga. Se vio por conveniente sustituir la dieta por una preformulada en base de comida de perro y miel.

También se obtuvieron adultos para aumentar la cría, poniéndolos en frascos de ovoposición.

Obtuviendo un ciclo de cría permanente.

#### 4.3.2. Evaluación de suelos

Para la obtención de hongos entomopatógenos del suelo se siguieron los siguientes pasos:

- Se humedecieron las muestras de suelo (aprox. 250 cm<sup>3</sup>) agregando agua (aprox. 60% de humedad).
- Se colocaron 5 larvas de larvas de *G. mellonella* sobre la superficie de la muestra, tapando el recipiente.
- Invertir el recipiente, incubar por 15 días.
- Pasado el tiempo seleccionar las larvas del suelo, verificando la causa de la muerte, si estas empuparon, el suelo no contiene hongos entomopatógenos. Las enfermas se pasaron a cámaras húmedas, previamente su desinfección trabajando en ambiente aséptico. Se dejaron las mismas por 7 días. Foto1
- A los 7 días, se pasaron los hongos a PDA, para su desarrollo. Foto 2.
- Al cabo de 3 a 4 días se purificaron, hasta la obtención de colonias puras.



Foto 1. Cámaras húmedas



Foto 2. Hongo en PDA.

## 57. Resultados

Se evaluaron 74 suelos de diferentes ecorregiones (cuadro 1). De los cuales se obtuvieron 81 aislados.

Se caracterizaron 16 aislados obteniendo algunos hongos entomopatógenos y en otros casos hongos no relevantes (cuadro 1).

Cuadro 1. Suelos de diferentes ecorregiones

# Libro	# Suelo	Datos	Caracterización
VM-3			
VM-4	4		
	4a		
VM-7	7		
VM-9	9		Posible fusarium
	9 trat		
VM-10	10		
VM-11	11		
	11a		
	11b		
	11 trat		
VM-12			
VM-13	13		
	13a		
	13b		
	13c		
VM-14			Penicillium
VM-15	15		Penicillium
	15 trat		
VM-16			Verticillum "lecani"
VM-17	17 gor		Verticillum
VM-18	18		Mucor + Aspergillus
	18 gor		Verticillum
VM-19	19		Aspergillus
	19a		
VM-20	20		
VM-20B			
VM-21	21		
	21a		
VM-22	22		Fusarium
VM-22B			
	22a		
VM-23	23		
	23a		Probable Veticillum
VM-24			
VM-5,6			
VM-5,6B	56 B		
VM-S/N			
		Metarhizum	
		Sankayani Bajo	Trichocladiun +
		Sankayani Bajo	Beauveria
		Beauveria yungas	
		Beauveria 5A	
26	1	Alto Beni	

36	2	Alto Beni - San Juan	
32	3	Alto Beni - San	
31	4	Alto Beni Bo1	
9		Churiocani Isl. Sol	
2		Quipaquipani	
19		Punata	
17		Pairumani	
3		Variedad	
10		Chirapaca Isla del	
16		Chuacocani	
11		Chuacocani Ceci	
8		Churapaca Usluyo	
6		Chuacocani G.	
21		Punata	
12		Salinas de Garcia	
1		Tiraque	
14		Colomi	
7		Cañacota	
21		Jischa Falsuri	
13		Salinas	
5		Chirapaca G. C.	
20		Hichuraya Viacha	
15		Chirapaca	
	Ing Crespo	Loc: Walljere	Beauveria
TJ-Gh-01		Loc: Cortaderal,	
TJ-Gh-02		Loc: Villa Ingavi	
TJ-Gh-03		Loc: Barrio Negro	
TJ-Gh-04		Loc: Lagunitas	
TJ-Gh-05		Loc: Laime Prov:	
TJ-Gh-06		Loc: San Martin	
TJ-Gh-07		Loc: Fuerte Viejo	
TJ-SF-1		Loc: Tarija Prov:	
TJ-SA1		Loc: San Antonio	
Tja-10		Loc: Prov:	
Maiz - 11		Loc: Prov:	
S/N 12		Sin Datos	
CBBA-TM-1		Loc: Tablas Monte	
CBBA-TM-2		Com:Tablas Monte	
CBBA-TM-3		Com:Tablas Monte	
CBBA-TM-4		Com: Los Alisos	
CBBA-TM-5		Com: Los Alisos	
CBBA-TM-6		Com: Pukara Churu	
CBBA-TM-7		Com: Rancho	
CBBA-TM-8		Com:Tablas Monte	
CBBA-TM-9		Com:Tablas Monte	

## 58. Discusión

- Desde el punto de vista económico, el uso de hongos entomopatógenos es una alternativa al alza de los agroquímicos.
- Los hongos entomopatógenos son muy importantes en el impacto de la producción orgánica, abriéndose mas mercados para su comercialización.
- Es muy importante la selección de los aislamientos, para ver su patogenicidad y virulencia. Para las diferentes ecorregiones.

## 59. Conclusiones

- Es viable aislar hongos entomopatógenos, con el uso de insectos cebo de diferentes muestras de suelos.
- Es muy importante la selección de los aislamientos, para ver su patogenicidad y virulencia. Para las diferentes ecorregiones.

## 60. Recomendaciones

- Se deberá comenzar a ajustar protocolos establecidos para la multiplicación masiva de los mismos.
- Se deberá caracterizar los diferentes aislados obtenidos.
- Se deberá probar la patogenicidad y virulencia de los aislados en diferentes plagas.
- Se deberá seguir extrayendo diferentes entomopatógenos de suelo para tener mayor diversidad de microorganismos con que trabajar.

## 61. Bibliografía consultada

CAÑEDO V. Y AMES T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. CIP. Lima – Perú.

<http://www.monografias.com/trabajos17/formulacion-de-hongos/formulacion-de-hongos.shtml>

### **Aislamientos de endófitos del cultivo de quinua en el Altiplano boliviano**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:**

Uno de los grandes retos que enfrenta la humanidad es proteger el medio ambiente y al mismo tiempo satisfacer las necesidades de la población mundial, por lo que se impone el tránsito hacia una agricultura ecológica sostenible. Las bacterias endófitas tienen menor competencia que las bacterias rizosféricas para tomar sus nutrientes y por lo tanto podrían brindar cualquier beneficio directamente a la planta hospedera. Por las condiciones extremas en que se cultiva la Quinua en el Altiplano Boliviano y con el propósito de ayudar a mejorar la producción, el objetivo de este trabajo fue de aislar las bacterias endófitas de este cultivo. Se trabajó con once plantas de las cuales siete pertenecían a la localidad de Quillacas y cuatro a la localidad de Challapata poblaciones de la provincia Avaroa del departamento de Oruro. Se obtuvieron 104 aislados. De los cuales 55 de raíz, 8 de tallo y 41 de hoja, por lo que se concluyó que es viable aislar bacterias endófitas de plantas de la zona altiplánica. Actualmente están siendo caracterizados los diferentes aislados obtenidos para posteriormente hacer pruebas de eficiencia.

**Palabras claves:** Bacterias endófitas

1. **Objetivo:** Obtener bacterias endófitas en el cultivo de la Quinua del Altiplano Boliviano.



2. **Hipótesis:** Las bacterias que viven en tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente (endófitas) son capaces de estimular el crecimiento de las plantas.

### 3. **Revisión de literatura**

Uno de los grandes retos que enfrenta la humanidad es proteger el medio ambiente y al mismo tiempo satisfacer las necesidades de la población mundial, por lo que se impone el tránsito hacia una agricultura ecológica sostenible. En este contexto, resulta de suma importancia el estudio y explotación de los efectos beneficiosos que puede ejercer la microbiota endófitas sobre las plantas de interés agrícola. (Boddey, 1995)

Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida (Quispel, 1992). En general, los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (Reinhold-Hurek, y T. Hurek. 1998).

Se piensa que las bacterias endófitas, al estar en una asociación íntima con las plantas, podrían tener efectos benéficos de mayor trascendencia en comparación con las bacterias que viven en la zona influenciada por la raíz (rizosféricas). Las bacterias endófitas tienen menor competencia que las bacterias rizosféricas para tomar sus nutrientes y por lo tanto podrían brindar cualquier beneficio directamente a la planta hospedera. (Rojas, J. y Caballero, J, 2003)

### 4. **Materiales y métodos**

#### 4.1 Materiales

##### 4.1.1. Material biológico

Se colectaron diferentes muestras de quinua de las localidades de Quillacas y Challapata poblaciones de la provincia Avaroa del departamento de Oruro. (Tabla 1.)

Tabla 1. Lugares de recolección

Muestra #	Localidad	Tratamiento
1	Quillacas	Con
2	Quillacas	Sin
3	Quillacas	Sin
4	Quillacas	Con
5	Quillacas	Con
6	Challapata	Con
7	Challapata	Con
8	Quillacas	Con
9	Quillacas	Con
10	Challapata	Con
11	Challapata	Sin

##### 4.1.2. Material de laboratorio

Bolsas plásticas de alta densidad de diferentes medidas, conservadora, heladera, solución Buffer Fosfato 0.1M, pión, estufa, medio TSA, cámara de Flujo Laminar, agitador orbital, autoclave, agua destilada, alcohol, erlenmeyers de 25 ml, medio, placas petri, asa de platino, papel aluminio, parafilm, cámara fotográfica, libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero.

##### 4.2. Metodología:

- Se evaluaron once plantas de las cuales siete pertenecían a la localidad de Quillacas y cuatro a la localidad de Challapata. (Foto 1.)



Foto 1. Material vegetal de quinua

- Las muestras fueron guardadas en bolsas plásticas, mantenidas frías en conservadora durante el transporte al laboratorio y almacenadas a 10°C hasta procesarlas.
- Para aislar endófitas, porciones pequeñas de hojas y raíces fueron agitadas en 15 ml de buffer fosfato de potasio a 0.1 M (BFP) durante 3 horas, posteriormente esta solución fue descartada para quitar las epifitas conectadas a la superficie de hoja. Con 10 ml BFP se trituro el material vegetal dentro de una bolsa con ayuda de un pilón. A la solución resultante se hizo un choque térmico de 75°C por 15 minutos para aislar solo las bacterias que forman endosporas. Posteriormente se sembraron en placas con TSA (Tryptona Soya Agar) y se incubaron a 28°C. (Foto 2)



Foto 2. Proceso de aislamiento de bacterias endófitas que forman espores

- Para aislar endófitas que no forman endosporas, las porciones pequeñas de hojas y raíces fueron agitadas en 15 ml de buffer fosfato de potasio a 0.1 M (BFP) durante 2 horas, posteriormente esta solución fue descartada para quitar las epifitas conectadas a la

superficie de hoja. Este material lavado directamente se ubico en placas con medio TSA y se incubo a 28°C. (Foto 3)



Foto 3. Proceso de aislado de bacterias endófitas que no forman esporas

- Una vez crecidas las colonias bacterianas se aislaron en tubos con TSA para posteriores pruebas y caracterización. (Foto 4)

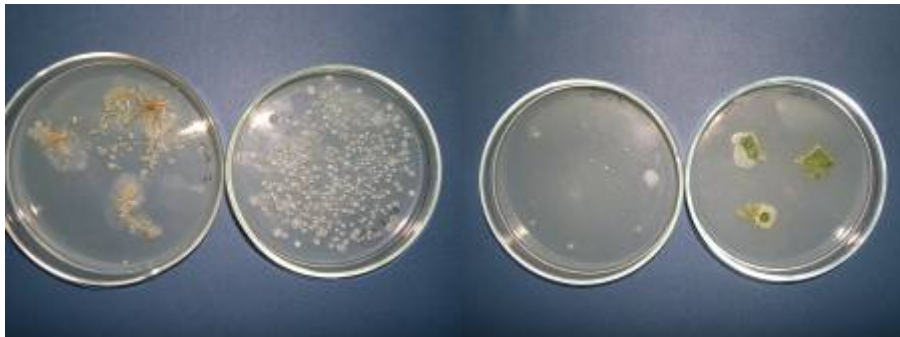


Foto 4. Colonias bacterianas endófitas.

## 5. Resultados

Se obtuvieron 104 aislados. De los cuales 55 de raíz, 8 de tallo y 41 de hoja.

## 6. Discusión

Es muy importante recopilar la mayor cantidad de información sobre el lugar donde se colectaron las muestras para hacer una correcta interpretación de los resultados.

## 7. Conclusiones

Es viable aislar bacterias endófitas de plantas de la zona altiplánica.

## 8. Recomendaciones

Una vez caracterizados los aislados hacer pruebas de eficiencia.

## 9. Bibliografía consultada

Bodey, R. 1995. Biological Nitrogen Fixation in Sugarcane: A key for energetically viable bio fuel production. *Critical Rev. In Plant Sci.* 14: 263-279.

Quispel, A. 1992. A search for signals in endophytic microorganisms, p. 471-491. In Verma, D. P. S. (ed.), *Molecular signals in plant-microbe communications*, CRC press. Boca Raton.

Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.

Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J. 2003, Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth, *Microbial Ecology*, 46, 454-464 pp

## **Identificación y caracterización molecular de microorganismos benéficos**

Responsable: Jose Antonio Castillo, Ph.D.

### **- Introducción y objetivos.**

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes de este y son los responsables de mantener el suelo saludable. En un solo gramo de tierra, podemos encontrar miles de diferentes especies de microorganismos muchos de los cuales son beneficiosos para los cultivos agrícolas.

Estos microorganismos beneficiosos son bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta y una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal.

La "Biofertilización" consiste en aumentar el número de microorganismos que aportan nutrientes al suelo (solubilizando algunos elementos esenciales, fijando nitrógeno, etc) para que de esta forma se pueda reducir la pérdida de nutrientes del suelo, acelerar el crecimiento vegetal, remediar suelos pobres en nutrientes, etc.

Por otro lado, existen microorganismos que actúan como agentes de control biológico, con lo que se reduce el impacto deletéreo de plagas (insectos, nematodos, etc) y enfermedades (enfermedades producidas por bacterias y hongos principalmente) en cultivos agrícolas.

La Fundación Proinpa viene investigando recursos microbianos bolivianos con propiedades biopesticidas y biofertilizantes. De esta manera, se podrá desarrollar y producir insumos que colaboren a la producción agricultura libre de pesticidas y fertilizantes químicos o sintéticos.

Este documento constituye un informe del progreso que se ha realizado hasta la fecha en la Fundación Proinpa en la identificación y caracterización por técnicas moleculares de microorganismos beneficiosos para la agricultura por sus propiedades biofertilizantes o biocontroladoras de plagas.

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar por medios moleculares la colección de microorganismos benéficos que la Fundación Proinpa posee en su laboratorio. Estos microorganismos benéficos fueron recolectados de ambientes naturales

y aislados hasta obtener cultivos puros. El análisis molecular persigue primeramente definir la ubicación taxonómica a la que corresponden los microorganismos, luego determinar el potencial biocontrolador (estudiando proteínas tóxicas) de algunas especies bacterianas y la relación genética que existe dentro de cada grupo de microorganismos (cuán diferentes o similares son los aislamientos microbianos entre sí en términos genéticos).

#### - Materiales y métodos.

Se han colectado muestras de microorganismos con potencial benéfico en diferentes localidades de Bolivia y se los ha cultivado en medios selectivos con el fin de aislar ejemplares con potencial biocontrolador o biofertilizante. Los protocolos empleados para el aislamiento de microorganismos benéficos permitieron obtener cepas puras de algunos microorganismos deseados. Así por ejemplo, se han obtenido diferentes aislamientos que presumiblemente pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Beauveria*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Micorrizas*. En este informe solo se detalla el trabajo ‘molecular’ realizado con los cuatro primeros géneros de microorganismos.

Para el reconocimiento de las especies de los aislamientos microbianos (ubicación taxonómica), se han empleado pruebas bioquímicas y/o fisiológicas (degradación de algún sustrato específico, cambio de pH, etc.); sin embargo la identificación definitiva de cada aislamiento más confiable y seguro a través del análisis molecular. Así, con el fin de determinar o confirmar la identidad de los microorganismos seleccionados, se procedió a extraer el ADN genómico de cada una de los microorganismos. Se han empleado diferentes protocolos para aislar ADN genómico de bacterias (*Bacillus* y *Azotobacter*) y de hongos (*Trichoderma* y *Beauveria*). Los protocolos de extracción y purificación de ADN están detallados en el Anexo 1.

Se ha amplificado por PCR regiones del genoma de cada microorganismo que son conservadas e indicadoras su identidad usando partidores cuyas secuencias fueron obtenidas de la literatura (Tabla 1, para la secuencia de los partidores ver Anexo 2). Los partidores fueron sintetizados en por Alpha DNA, Québec, Canada y se ha usado una DNA Polimerasa (Phusion, Finnzymes, Finlandia) que posee actividad correctora de errores con el fin de minimizar la introducción de mutaciones en los amplificados.

**Tabla 1.** Partidores utilizados para amplificar regiones específicas del genoma de los microorganismos.

Microorganismo	Partidores	Gen marcador	Referencia
<i>Beauveria</i>	ITS1F y ITS4	Región intergénica ITS1 y ITS2	Aquino de Muro et al 2005
<i>Trichoderma</i>	LR1 y SR6R EF1-728F y TEF1LLErev	ARNr 18S, ITS1, ITS2 y ARNr 5.8S gen <i>tef1</i>	Kullnig-Gradinger et al 2002 Nagy et al 2007
<i>Bacillus</i>	27A o 27C y 1488	ARNr 16S	Lane et al 1991
<i>Azotobacter</i>	27A o 27C y 1488	ARNr 16S	Lane et al 1991

Cada producto de PCR fue purificado con columnas Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA) antes de enviarlos al Centro de Secuenciación de la Universidad de Chicago, Chicago, IL, USA. Las secuencias obtenidas fueron cotejadas con las bases de datos usando el programa BLAST y para el caso de *Trichoderma*, usando también el programa TrichOKey (Druzhinina et al 2005).

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* fueron caracterizadas además por la presencia de genes insecticidas (Cry) en su genoma. Se ha realizado una exploración de 10 genes Cry por PCR usando partidores específicos para detectar familias de genes (Anexo 2).

## - Resultados y discusión.

### Identificación de especies.

La secuencia de los fragmentos de PCR permitió identificar con precisión algunos aislamientos microbianos:

**Trichoderma.** Se llegó a identificar a nivel de especie o género a algunos aislamientos de Trichoderma usando los partidores SR6RA/T y LR1 (Tabla 2). Estos partidores amplifican parte del gen que codifica al ARNr 18S, la región intergénica (ITS1 y ITS2) y el gen ARNr 5.8S. Las secuencias de algunos aislamientos solo permitieron confirmar el género pero la especie queda indefinida entre dos opciones (p.e. *T. asperellum* o *koningiopsis*). Para aclarar esta dualidad hemos amplificado un fragmento interno del gen *tef1* que codifica al factor de elongación 1 alfa usando los partidores EF1-728F y TEF1LLErev de cada aislamiento incierto. Se enviarán a secuenciar estos fragmentos y con la secuencia a obtenerse se determinará la especie a la que corresponde cada uno de los aislamientos en duda con la ayuda del programa TrichOKey. TrichOKey permite usar secuencias de diferentes genes marcadores para determinar la especie de Trichoderma a la que corresponde un aislamiento. Interesantemente, hemos encontrado dos aislamientos que corresponden a *T. harzianum*, una especie que es conocida por sus muy buenas propiedades fungicidas

**Azotobacter.** Se han analizado 10 muestras de un total de 36 aislamientos que se juzgaban como Azotobacter (Tabla 2). Lamentablemente el protocolo empleado para aislar selectivamente cepas de Azotobacter de muestras naturales no es tan eficiente como lo indican los mismos autores del protocolo y los resultados moleculares. La mayoría de los aislamientos corresponden al género Agrobacterium o Rhizobium, grupos muy emparentados. No hemos encontrado en este subgrupo ningún miembro de Azotobacter, sino solo un pariente cercano Azospirillum (aislamiento A10). Las especies de Azospirillum son organismos fijadores de nitrógeno, los cuales pueden vivir en asociación en la rizosfera de plantas beneficiándolas

Se continuará analizando los aislamientos restantes con el fin de encontrar cepas nativas de Azotobacter. Para este fin, ya se tienen amplificados los fragmentos necesarios para obtener las secuencias y se los enviará al centro de secuenciación pronto. Así mismo, se están obteniendo más muestras para obtener nuevos aislamientos de Azotobacter.

**Tabla 2.** Resultados de la identificación a nivel de género o especie de los microorganismos aislados.

Aislamiento	Identidad
<b>Azotobacter</b>	
Col1a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobium</i>
TM5bb	<i>Pseudomonas</i> sp o <i>Azospirillum</i> sp
TM5aa	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Tir1	<i>Rhizobium</i> sp
TM6a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TM7a	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
Pun1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
USA	<i>Rhizobium</i> o <i>Agrobacterium rhizogenes</i>

Chir1 *Agrobacterium larrymoorei*  
 Mon2 *Agrobacterium* o *Rhizobium*

**Trichoderma**

T1	No es Trichoderma
T3	No es Trichoderma
T5	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>
T6	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
T7	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
T8	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
T9	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
#36 Micelio blanco	No es Trichoderma
#36 Alto Beni	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
Lignorum esponjoso	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>
Lignorum polvoso	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
Pairumani	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>
Comercial	<i>Trichoderma asperellum</i> o <i>Trichoderma koningiopsis</i>

**Bacillus y Beauveria.** Se han establecido las condiciones de amplificación de los genes que se usarán para identificar a los aislamientos de Bacillus y Beauveria recolectados, sin embargo aun no se han enviado a secuenciar estos fragmentos de ADN. Luego de terminar la identidad de los aislamientos de Trichoderma y Azotobacter analizaremos los aislamientos de Bacillus y Beauveria.

**Genes Cry de *Bacillus thuringiensis*.**

Un total de 13 aislamientos de *Bacillus thuringiensis* fueron analizados para averiguar el espectro de actividad insecticida que estos poseen a nivel de las toxinas Cry ( $\delta$ -endotoxinas cristalinas). Diez genes Cry fueron analizados por PCR con el fin de determinar su presencia en los aislamientos bacterianos y para encontrar eventualmente nuevos genes Cry con propiedades diferentes a las ya descritas. Los resultados indican que la mayoría de los aislamientos bolivianos de *B. thuringiensis* con los cuales trabajamos presentan los genes Cry 1 y Cry 2 (Tabla 3 y Figura 1). La familia de genes Cry 1 son activos contra las larvas de insectos lepidópteros (pollillas y mariposas) y las toxinas Cry 2, afectan principalmente dípteros (moscas) pero también lepidópteros.

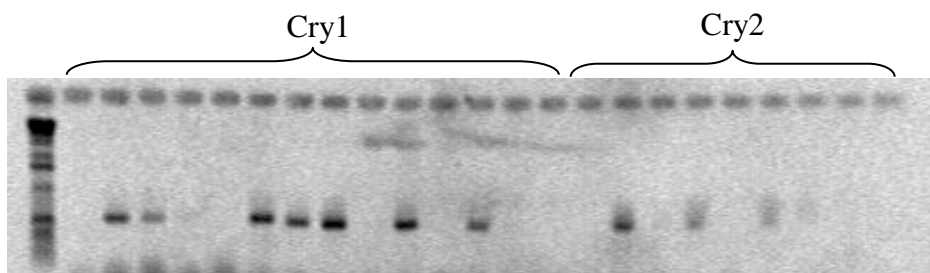
Si bien se han encontrado genes de las familias de toxinas Cry1 y Cry2, se debe continuar la caracterización para precisar los subgrupos a los que pertenecen estas toxinas y confirmar su actividad toxica realizando bioensayos en larvas de insectos. La exploración de toxinas Cry por PCR es muy útil para encontrar cepas bacterianas de *B. thuringiensis* con propiedades bioinsecticidas en trabajos que intentan encontrar nuevas cepas de *B. thuringiensis* o nuevas toxinas Cry.

**Tabla 3.** Presencia de genes Cry en los aislamientos bacterianos

Aislamiento bacteriano	Genes cry											
	1 <sup>A</sup>	1 <sup>B</sup>	2 <sup>D</sup>	2 <sup>C</sup>	3	4	5	7	8	9	10	11
0035	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
0014	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0020	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0034	No	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0011	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
0018	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0039	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No

0016	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0031	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
0004	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0015	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
0029	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
0002	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Partidores de acuerdo a: A= Bravo et al. 1998; B y C= Ben-Dov et al. 1997; D= Ibarra et al. 2003



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR que muestran la presencia del gene Cry1 y Cry2 en diferentes aislamientos bolivianos de *B. thuringiensis*.

## - Conclusiones

Se ha logrado determinar a nivel de especie o genero algunos aislamientos de *Trichoderma* y de *Azospirillum*. El trabajo de identificación continuará hasta determinar la especie de cada uno de los aislamientos microbianos de la colección.

Se han encontrado dos aislamientos de *Trichoderma harzianum*. Este descubrimiento es importante ya que con este microorganismo se puede desarrollar productos para el combate de hongos fitopatógenos.

Se ha determinado la diversidad de genes Cry que poseen los aislamientos bolivianos de *B. thuringiensis* coleccionados en la Fundación Proinpa. El espectro de genes Cry no es muy grande, sin embargo su actividad bioinsecticida puede ser intensa y específica para insectos locales, lo que harían de estas cepas muy importantes para controlar plagas que afectan algunos cultivos en Bolivia. Es necesario realizar bioensayos para confirmar su actividad bioinsecticida y su potencia y rango de acción.

## - Referencias bibliográficas.

Aquino de Muro M., Elliott S., Moore D., Bruce L., Parker B.L., Skinner M., Reid W. and El Bouhssini M. 2005 Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycol. Res.* 109: 294–306

Ben-

Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E. Dubitsky A., Berezina N. and Margalith Y. 1997 Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4883–4890



- Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Ortiz M., Lina L., Villalobos F.J., Peña G., Nuñez-Valdez M.E., Soberón M. and Quintero R. 1998 Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4965-4972.
- Druzhinina I., Koptchinski A., Komon M., Bissett J., Szakacs G. and Kubicek C.P. 2005 An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* 42:813–828
- Ibarra J.E., del Rincón M.C., Ordúz S., Noriega D., Benintende G., Monnerat R., Regis L., de Oliveira, C.M.F., Lanz H., Rodriguez M.H., Sánchez J., Peña G. and Bravo A. 2003 Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5269–5274
- Kullnig-Gradinger C.M., Szakacs G. and Kubicek C.P. 2002 Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*—a multigene approach. *Mycol. Res.* 106:757–767.
- Lane D.J. 1991 16S/23S sequencing. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.), pp. 115 –175. Chichester: John Wiley & Sons
- Nagy V., Seidl V., Szakacs G., Komon-Zelazowska M., Kubicek C.P. and Druzhinina I.S. 2007 Application of DNA Bar Codes for Screening of Industrially Important Fungi: the Haplotype of *Trichoderma harzianum* Sensu Stricto Indicates Superior Chitinase Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7048-7058.

## **Identificación y caracterización molecular de bacterias benéficas seleccionadas**

Responsable: Jose Antonio Castillo, Ph.D.  
Junio 2011

### **- Introducción y objetivos.**

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes de este y son los responsables de mantener el suelo saludable. En un solo gramo de tierra, podemos encontrar miles de diferentes especies de microorganismos muchos de los cuales son beneficiosos para los cultivos agrícolas.

Estos microorganismos beneficiosos son bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta y una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal.

La “Biofertilización” consiste en aumentar el número de microorganismos que aportan nutrientes al suelo (solubilizando algunos elementos esenciales, fijando nitrógeno, etc)

para que de esta forma se pueda reducir la pérdida de nutrientes del suelo, acelerar el crecimiento vegetal, remediar suelos pobres en nutrientes, etc.

Por otro lado, existen microorganismos que actúan como agentes de control biológico, con lo que se reduce el impacto deletéreo de plagas (insectos, nematodos, etc) y enfermedades (enfermedades producidas por bacterias y hongos principalmente) en cultivos agrícolas.

La Fundación Proinpa viene investigando recursos microbianos bolivianos con propiedades biopesticidas y biofertilizantes. De esta manera, se podrá desarrollar y producir insumos que colaboren a la producción agricultura libre de pesticidas y fertilizantes químicos o sintéticos.

Este documento constituye un informe del progreso que se ha realizado hasta la fecha en la Fundación Proinpa en la identificación y caracterización por técnicas moleculares de bacterias beneficiosas para la agricultura por sus propiedades biofertilizantes o biocontroladoras de plagas.

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar por medios moleculares los aislamientos seleccionados por su buena respuesta en promover el crecimiento vegetal o contribuir a la protección general de la planta. Estas bacterias benéficas fueron recolectadas en ambientes naturales y aisladas hasta obtener cultivos puros. Este análisis molecular persigue definir la ubicación taxonómica a la que corresponden las bacterias.

#### **- Materiales y métodos.**

Se han colectado muestras de bacterias con potencial benéfico en diferentes localidades de Bolivia y se las ha cultivado en medios selectivos con el fin de aislar ejemplares con potencial biocontrolador o biofertilizante. Los protocolos empleados para el aislamiento de microorganismos benéficos permitieron obtener cepas puras de algunas bacterias deseadas. En este informe se detalla el trabajo 'molecular' realizado con estos aislamientos bacterianos.

Para el reconocimiento de las especies de los aislamientos microbianos (ubicación taxonómica), se han empleado pruebas bioquímicas y/o fisiológicas (degradación de algún sustrato específico, cambio de pH, etc.); sin embargo la identificación definitiva de cada aislamiento más confiable y seguro a través del análisis molecular. Así, con el fin de determinar o confirmar la identidad de los microorganismos seleccionados, se procedió a extraer el ADN genómico de cada una de los microorganismos. Se ha empleado un protocolo para aislar ADN genómico de bacterias el cual está detallado en el Anexo 1.

Se ha amplificado por PCR regiones del genoma de cada aislamiento bacteriano que son conservadas e indicadoras su identidad usando partidores cuyas secuencias fueron obtenidas de la literatura (Lane et al 1991; para la secuencia de los partidores ver Anexo 2). Los partidores utilizados, 27A o 27C (partidor sentido) y 1488 (partidor antisentido) fueron sintetizados en por AlphaDNA, Québec, Canada y se ha usado una DNA Polimerasa (Phusion, Finnzymes, Finlandia) que posee actividad correctora de errores con el fin de minimizar la introducción de mutaciones en los amplificados.

Cada producto de PCR fue purificado con columnas Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA) antes de enviarlos al Centro de Secuenciación de la Universidad de Chicago, Chicago, IL,

USA. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999) y luego cotejadas con las bases de datos usando el programa BLAST (Altschul et al., 1990).

## - Resultados y discusión.

### Identificación de especies.

La secuencia de los fragmentos de PCR permitió identificar con precisión algunos aislamientos microbianos.

Se han analizado 11 aislamientos que se juzgaban como aislamientos bacterianos (Tabla 1). De estos 6 aislamientos corresponden a especies del genero *Bacillus*. De los demás aislamientos, 4 no se pudieron amplificar por PCR debido probablemente a la baja calidad del ADN extraído o a que estos aislamientos no son bacterias, por tanto no pueden ser amplificados con los partidores 27A/27C y 1488. Se intentará extraer y purificar ADN bacteriano de cultivos en caldo (medio liquido) como alternativa y se procederá a realizar las amplificaciones y secuenciaciones correspondientes.

**Tabla 1.** Resultados de la identificación a nivel de genero o especie de los

Aislamiento	Identidad
149	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus simplex</i>
154	<i>Bacillus pumilus</i>
143	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus simplex</i>
161	<i>Bacillus pumilus</i>
128	<i>Bacillus subtilis</i>
132	<i>Bacillus</i> sp. , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus aryabhatai</i>
12	Mala secuencia
47	No amplifica por PCR, es bacteria?
65	No amplifica por PCR, es bacteria?
73	No amplifica por PCR, es bacteria?
74	No amplifica por PCR, es bacteria?

### Conclusiones

Se ha logrado determinar a nivel de especie o genero aislamientos bacterianos. El trabajo de identificación continuará hasta determinar la especie de cada uno de los aislamientos microbianos de la colección.

Se han identificado varios aislamientos bacterianos los cuales pertenecen en su mayoría al género *Bacillus*.

### - Referencias bibliográficas.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95–98.

Lane D.J. 1991 16S/23S sequencing. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.), pp. 115–175. Chichester: John Wiley & Sons

## **Identificación y caracterización molecular de microorganismos relacionados a la quinua**

Responsable: Noel Ortuño

Equipo: José Antonio Castillo y Mayra Claros

### **- Introducción.**

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes de este y son los responsables de mantener el suelo saludable. En un solo gramo de tierra, podemos encontrar miles de diferentes especies de microorganismos muchos de los cuales son beneficiosos para los cultivos agrícolas.

Estos microorganismos beneficiosos son bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta y una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal.

La “Biofertilización” consiste en aumentar el número de microorganismos que aportan nutrientes al suelo (solubilizando algunos elementos esenciales, fijando nitrógeno, etc) para que de esta forma se pueda reducir la pérdida de nutrientes del suelo, acelerar el crecimiento vegetal, remediar suelos pobres en nutrientes, etc.

Por otro lado, existen microorganismos que actúan como agentes de control biológico, con lo que se reduce el impacto deletéreo de plagas (insectos, nematodos, etc) y enfermedades (enfermedades producidas por bacterias y hongos principalmente) en cultivos agrícolas.

La Fundación Proinpa viene investigando recursos microbianos bolivianos con propiedades biopesticidas y biofertilizantes. De esta manera, se podrá desarrollar y producir insumos que colaboren a la producción agrícola libre de pesticidas y fertilizantes químicos o sintéticos.

Este documento constituye un informe del progreso que se ha realizado hasta la fecha en la Fundación Proinpa en la identificación y caracterización por técnicas moleculares de microorganismos beneficiosos para la agricultura por sus propiedades biofertilizantes o biocontroladoras de plagas.

### **Objetivos:**

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar por medios moleculares la colección de microorganismos benéficos que la Fundación Proinpa posee en su laboratorio. Estos microorganismos benéficos fueron recolectados de ambientes naturales y aislados hasta obtener cultivos puros. El análisis molecular persigue primeramente

definir la ubicación taxonómica a la que corresponden los microorganismos, luego detectar la presencia de algunas especies microbianas en muestras vegetales o de suelo.

## - Materiales y métodos.

Identificación taxonómica de bacterias. Se han colectado muestras de bacterias con potencial benéfico en diferentes localidades de Bolivia y se los ha cultivado en medios selectivos con el fin de aislar ejemplares con potencial biocontrolador o biofertilizante. Los protocolos empleados para el aislamiento de bacterias benéficas permitieron obtener cepas puras. Así por ejemplo, se han obtenido diferentes aislamientos que presumiblemente pertenecen al género *Azotobacter* y por otro lado, se han aislado bacterias endófitas de raíces de Quínoa. Se ha realizado un análisis molecular para confirmar la identidad de los aislamientos de *Azotobacter* y de bacterias endófitas de Quínoa.

Para el reconocimiento de las especies de los aislamientos microbianos (ubicación taxonómica), se han empleado pruebas bioquímicas y/o fisiológicas (degradación de algún sustrato específico, cambio de pH, etc.); sin embargo la identificación definitiva de cada aislamiento más confiable y seguro a través del análisis molecular. Así, con el fin de determinar o confirmar la identidad de los microorganismos seleccionados, se procedió a extraer el ADN genómico de cada una de los microorganismos. Se han empleado diferentes protocolos para aislar ADN genómico de bacterias (*Azotobacter* y endófitos de Quínoa). Los protocolos de extracción y purificación de ADN están detallados en el Anexo 1.

Se ha amplificado por PCR regiones del genoma de cada microorganismo que son conservadas e indicadoras su identidad usando partidores cuyas secuencias fueron obtenidas de la literatura (Tabla 1, para la secuencia de los partidores ver Anexo 2). Los partidores fueron sintetizados en por Alpha DNA, Québec, Canada y se ha usado una DNA Polimerasa (Phusion, Finnzymes, Finlandia) que posee actividad correctora de errores con el fin de minimizar la introducción de mutaciones en los amplificados.

**Tabla 1.** Partidores utilizados para amplificar regiones específicas del genoma de los microorganismos.

Microorganismo	Partidores	Gen marcador	Referencia
Azotobacter y bacterias de Quínoa	27A o 27C y 1488	ARNr 16S	Lane et al 1991
Micorrizas	SSUmCf y LSUmBr	ARNr de la subunidad mayor, menor, 5.8S y región intergénica	Krüger et al 2009

Cada producto de PCR fue purificado con columnas Qiaquick (Qiagen, Valencia, CA) antes de enviarlos al Centro de Secuenciación de la Universidad de Chicago, Chicago, IL, USA. Las secuencias obtenidas fueron cotejadas con las bases de datos usando el programa BLAST.

Desarrollo de un método de detección de micorrizas. En este proyecto se ha buscado poner a punto una tecnología molecular que permita detectar micorrizas en raíces siguiendo el método de Krüger et al 2009. Brevemente, el ADN genómico se ha extraído usando un protocolo modificado de acuerdo a Allen *et al.*, 2006 (ver Anexo 1). Los partidores están detallados en el anexo 2. Se uso la enzima DNA Polymerase Phusion (Finnzymes, NEB, Ipswich, Massachusetts, USA) porque resiste altas temperaturas de

desnaturación. La reacción de amplificación se ha elaborado de la siguiente manera: en concentraciones finales: dNTP 200µM de cada uno, partidores 0,5 µM, enzima 0,02U/µl, buffer HF 1x. Las condiciones del PCR son: 99°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 99°C por 15 seg, 63°C por 30 seg y 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

## - Resultados y discusión.

### Identificación de especies.

La secuencia de los fragmentos de PCR permitió identificar con precisión algunos aislamientos microbianos:

### Azotobacter.

Durante este periodo se ha continuado analizando los aislamientos que se creían eran *Azotobacter* para identificarlos por medios moleculares. El resultado indica que ninguno de los aislamientos corresponden al género *Azotobacter* sino a principalmente *Rhizobium* y *Agrobacterium* (algunos de los cuales son también microorganismos fijadores de nitrógeno).

Nº	Cepa	Identidad
1	Tj-chi1a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2	GCh5b	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
3	Caña1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobiaceae bacterium</i>
4	Col1a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobium</i>
5	Tj-chi1b	<i>Uncultured alpha proteobacterium, Agrobacterium sp.</i>
6	Col1b	<i>Rhizobium sp</i> o <i>Agrobacterium sp</i>
7	TH2 = TM2	-
8	TM5ab	<i>Rhizobium sp</i> o <i>Agrobacterium sp</i> o <i>Blastobacter aggregatus</i>
9	TM5ba	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobium sp</i>
10	TM5bb	<i>Rhizobium sp</i>
11	TM5aa	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
12	GCh5ac	-
13	IT1 = IP1	<i>Flavobacterium</i> o <i>Pedobacter</i>
14	Min1a	<i>Rhizobium sp.</i>
15	Min1b	<i>Agrobacterium vitis</i> o <i>Rhizobium sp</i>
16	Alb1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobium sp.</i>
17	Tir1	<i>Rhizobium sp</i>
18	Hich1a	<i>Rhizobium sp</i>
19	Hich1b	<i>Enterobacter sp</i>
20	TM6b	-
21	TM6a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
22	TM7a	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
23	TM7b	<i>Pseudomonas sp.</i>
24	Pun1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
25	SM1	<i>Rhizobium sp. Agrobacterium sp. Agrobacterium larrymoorei</i>
26	GCh5aa	<i>Rhizobium sp.</i>
27	GCh5ab	<i>Agrobacterium sp.</i>
28	USA	<i>Rhizobium</i> o <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
29	Chu1	<i>Rhizobium sp</i>
30	Chir1	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>
31	Azotl	-
32	Mon2	<i>Agrobacterium</i> o <i>Rhizobium</i>

33	SPa1a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> o <i>Rhizobium</i>
34	SPa1b	<i>Rhizobium</i>
35	GCh1b	<i>Microbacterium</i> sp
36	GCh1a	<i>Pedobacter</i> o <i>Flavobacterium</i>

### Identificación de microorganismos endófitos de quínoa.

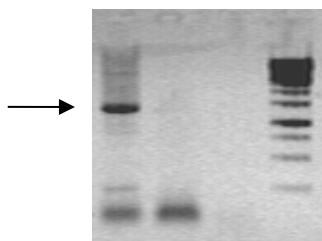
Analizando la secuencia de la región ribosomal del genoma de las bacterias aisladas de raíces de quínoa, se ha determinado la afiliación taxonómica de estas:

Nombre de cepa	Identificación
13 <sup>a</sup>	<i>Bacillus</i> sp (puede ser <i>thuringiensis</i> , <i>subtilis</i> , <i>cereus</i> , otro)
13b	<i>Bacillus subtilis</i>
14b	<i>Sinorhizobium fredii</i> , <i>Ensifer adhaerens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. o <i>Pantoea</i> sp
16b	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
3b	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i>
3c	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
3d	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> , <i>Bacillus vallismortis</i> , <i>B. subtilis</i>
6a	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
6b	<i>Bacillus subtilis</i>
Hoja 10 M	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> o <i>Paenibacillus</i> sp
Hoja 5b	<i>Bacillus pumilus</i>
Raiz 6Mb	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Raiz 8Ma	<i>Bacillus pumilus</i>
17	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Staphylococcus epidermidis</i>
2a	<i>Paenibacillus</i> sp.
15	<i>Paenibacillaceae</i> bacterium, <i>Paenibacillus odorifer</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.
9a	<i>Paenibacillus</i> sp
2c	<i>Paenibacillus</i> sp
3a	<i>Bacillus</i> sp

Raíz 3 Md	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>
Hoja 11 Mb	<i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus aryabhattai</i> , <i>Bacillus horikoshii</i>

### Desarrollo de un método de detección de micorrizas.

Existen métodos moleculares reportados en la literatura para detectar micorrizas en raíces de plantas. Esta tecnología permite rápidamente confirmar la presencia de micorrizas directamente en raíces de plantas. En este proyecto se ha buscado poner a punto una tecnología molecular que logre este objetivo. Como primer paso se siguió el método descrito por Renker et al 2003, sin embargo la detección no fue específica sino que el método detectó diferentes hongos no-micorrizicos. Posteriormente, Krüger et al., 2009 reportó similar resultado que el encontrado en el laboratorio de microbiología molecular de la Fundación PROINPA. En este sentido, se descarto el método de Renker et al 2003 y se trabajo con el descrito por Krüger et al., 2009 quienes afinaron un método para detectar géneros de la familia Glomeromycota (micorrizas). El trabajo con ADN genómico de hongos ofrece algunos retos difíciles de superar. Se puso a punto el método de detección de micorrizas siguiendo fielmente el protocolo descrito por Krüger y colaboradores (2009) con el fin de obtener amplificadas. Como templado se utilizo muestras de ADN obtenido de cultivos puros de *Glomus sp.* El método funciona y probó detectar hongos del género *Glomus* (Figura 1). Actualmente, se está trabajando para determinar la especificidad de este método y su aplicabilidad en muestras de raíces.



**Figura 1.** Reacción en cadena de la polimerasa con partidores SSUmCf-LSUmBr (fragmento de aprox. 1600 pb). Líneas: 1. ADN concentrado de *Glomus sp.*, 2. ADN diluido de *Glomus sp.* y 3. Control negativo (agua),

### Bibliografía.

- Allen GC, Flores-Vergara MA, Krasnyanski S, Kumar S, Thompson WF. (2006) A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols* 1: 2320–2325.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. (2009) DNA-based species-level detection of arbuscular mycorrhizal fungi: one PCR primer set for all AMF. *New Phytologist* 183: 212-223
- Lane D.J. (1991) 16S/23S sequencing. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.), pp. 115–175. Chichester: John Wiley & Sons
- Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F. (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13: 191–198.
- Wilson K. (1994) Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 2.4.1-2.4.5. *In* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K.



Struhl (ed.), Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, NY.

## **Identificación y caracterización molecular de microorganismos tipo *Bacillus***

Responsable: Jose Antonio Castillo, Ph.D.  
Agosto 2011

### **- Introducción y objetivos.**

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes de este y son los responsables de mantener el suelo saludable. En un solo gramo de tierra, podemos encontrar miles de diferentes especies de microorganismos muchos de los cuales son beneficiosos para los cultivos agrícolas.

Estos microorganismos beneficiosos son bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta y una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal.

La “Biofertilización” consiste en aumentar el número de microorganismos que aportan nutrientes al suelo (solubilizando algunos elementos esenciales, fijando nitrógeno, etc) para que de esta forma se pueda reducir la pérdida de nutrientes del suelo, acelerar el crecimiento vegetal, remediar suelos pobres en nutrientes, etc.

Por otro lado, existen microorganismos que actúan como agentes de control biológico, con lo que se reduce el impacto deletéreo de plagas (insectos, nematodos, etc) y enfermedades (enfermedades producidas por bacterias y hongos principalmente) en cultivos agrícolas.

La Fundación Proinpa viene investigando recursos microbianos bolivianos con propiedades biopesticidas y biofertilizantes. De esta manera, se podrá desarrollar y producir insumos que colaboren a la producción agricultura libre de pesticidas y fertilizantes químicos o sintéticos.

Este documento constituye un informe del progreso que se ha realizado hasta la fecha en la Fundación Proinpa en la identificación y caracterización por técnicas moleculares de microorganismos beneficiosos para la agricultura por sus propiedades biofertilizantes o biocontroladoras de plagas.

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar por medios moleculares los aislamientos seleccionados por su buena respuesta en promover el crecimiento vegetal o contribuir a la protección general de la planta. Estos microorganismos beneficiosos fueron recolectados en ambientes naturales y aislados hasta obtener cultivos puros. Este análisis molecular persigue definir la ubicación taxonómica a la que corresponden las bacterias.

### **- Materiales y métodos.**

Se han colectado muestras de microorganismos beneficiosos con potencial benéfico en diferentes localidades de Bolivia y se las ha cultivado en medios selectivos con el fin de aislar ejemplares con potencial biocontrolador o biofertilizante. Los protocolos empleados para el aislamiento de microorganismos benéficos permitieron obtener cepas puras de

algunas bacterias deseadas. En este informe se detalla el trabajo 'molecular' realizado con estos aislamientos bacterianos.

Para el reconocimiento de las especies de los aislamientos microbianos (ubicación taxonómica), se han empleado pruebas bioquímicas y/o fisiológicas (degradación de algún sustrato específico, cambio de pH, etc.); sin embargo la identificación definitiva de cada aislamiento más confiable y seguro a través del análisis molecular. Así, con el fin de determinar o confirmar la identidad de los microorganismos seleccionados, se procedió a extraer el ADN genómico de cada una de los microorganismos. Se ha empleado un protocolo para aislar ADN genómico de bacterias e independientemente de hongos los cuales están detallados en el Anexo 1.

Se ha amplificado por PCR regiones del genoma de cada aislamiento microbiano que son conservadas e indicadoras su identidad usando partidores cuyas secuencias fueron obtenidas de la literatura (Lane et al 1991; Krüger *et al.*, 2009, para la secuencia de los partidores ver Anexo 2). Estas regiones conservadas corresponden a genes que codifican el ARN ribosomal de la subunidad grande y pequeña de los ribosomas. Los partidores utilizados para bacterias fueron: 27A o 27C (partidor sentido) y 1488 o 1492 (partidor antisentido, Lane et al 1991) y para hongos (micorrizas) fueron SSUmCf1-3 y LSUmBr1-5 (Krüger *et al.*, 2009). Los partidores fueron sintetizados en por AlphaDNA, Québec, Canada y se ha usado una DNA Polimerasa (Phusion, Finnzymes, Finlandia) que posee actividad correctora de errores con el fin de minimizar la introducción de mutaciones en los amplificados.

Cada producto de PCR fue purificado con columnas GeneJet (Fermentas, USA) antes de enviarlos al Centro de Secuenciación de la Universidad de Chicago, Chicago, IL, USA. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999) y luego cotejadas con las bases de datos usando el programa BLAST (Altschul et al., 1990).

## - Resultados y discusión.

### Identificación de especies.

La secuencia de los fragmentos de PCR permitió identificar con precisión algunos aislamientos microbianos. Se han analizado 13 aislamientos que se juzgaban como aislamientos bacterianos (Tabla 1). De estos, ocho aislamientos corresponden a especies del género *Bacillus* y los demás aislamientos a diversos géneros.

**Tabla 1.** Resultados de la identificación a nivel de genero o especie de los

Aislamiento	Identidad
149	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus simplex</i>
154	<i>Bacillus pumilus</i>
143	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus simplex</i>
161	<i>Bacillus pumilus</i>
128	<i>Bacillus subtilis</i>
132	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus aryabhatai</i>
12	<i>Bacillus cereus</i>
47	<i>Pseudomonas sp</i>
65	<i>Stenotrophomonas sp</i> ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )
73	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
74	<i>Paenibacillus sp.</i>

131	<i>Bacillus sp (más probable Bacillus firmus)</i>
139	<i>Staphylococcus sp. (más probable Staphylococcus epidermidis)</i>

En términos de aislamientos de hongos, se hizo crecer en un medio sintético un aislamiento endófito de quinoa que posiblemente es una micorriza que establece una simbiosis con esta planta. Se han amplificado con los partidores SSUmCf1-3 y LSUmBr1-5 de forma conjunta como sugiere el artículo de Krüger y colaboradores (2009) y también usando los mismos partidores pero independientemente por parejas. Este último experimento ayudo a determinar que el aislamiento proveniente de quinoa estaría incluido en alguna de las siguientes familias Acaulosporaceae, Archaeosporaceae, Glomeraceae (GIGrA) o Pacisporaceae. Lamentablemente las secuencias de este aislamiento no salió suficientemente buena para determinar con exactitud el género al cual pertenece.

#### - Conclusiones

Se ha logrado determinar a nivel de especie o genero aislamientos bacterianos. La mayoría de estos pertenecen al género *Bacillus*.

Se ha logrado determinar a nivel de familia el aislamiento de hongos de raíces de quinoa. El trabajo de identificación continuará hasta determinar el género o la especie de este aislamiento.

#### - Referencias bibliográficas.

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95–98.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. (2009) DNA-based species-level detection of arbuscular mycorrhizal fungi: one PCR primer set for all AMF. New Phytologist 183: 212-223.
- Lane D.J. 1991 16S/23S sequencing. *In*: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (ed. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.), pp. 115 –175. Chichester: John Wiley & Sons.

#### **Comparación de aislamiento de bacterias endófitas de semilla y plántulas en diferentes cultivos de grano**

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Marlene Angulo y Mayra Claros**

#### **Compendio:**

Los microorganismos endofitos son aquellos que se encuentran en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales y son considerados promotores de crecimiento vegetal ya que también cumplen la función de proteger a los cultivos de plagas y da cierta tolerancia a estrés ambiental. Estos microorganismos pueden ser diversos en la cantidad de células viables (UFC), debidas

también a diferentes especies de cultivos como hospedero. Con el fin de determinar la cantidad de células que forman estos microorganismos, se utilizaron diferentes cultivos e dos estados, en semilla y plántula, en el cual se determinó que el cultivo de mayores unidades formadoras de colonia es la cebada en plántula, seguida del maíz también en plántula. Estos cultivos podrían considerarse hospederos de amplio espectro de bacterias endofitas.

**Palabras claves:** Endophytic bacteria, endofitismo

## **62. Objetivos:**

Determinar la cantidad de microorganismos endofitos en semilla y en plántula de diferentes especies cultivables.

## **63. Hipótesis**

Las unidades formadoras de colonia (UFC) fueron de la misma manera en cada cultivo y estado de semilla o plántula.

## **64. Revisión de literatura**

### **3.1 Microorganismos endófitos**

En definición son microorganismos que viven en los espacios intercelulares (se excluyen los patógenos) donde obtienen los nutrientes que necesitan, uno de los factores para el éxito del aislamiento de endófitos es la esterilización superficial, puesto que el exceso puede destruirlas o en deficiencia pueden ser contaminadas y a la vez depende la especie de la naturaleza del tejido vegetal (Magallon y Dion, 2009).

La diversidad de microorganismos endófitos se ve limitada por la falta de información acerca de la transmisión de la semilla a la planta, trabajos de estudios de diversidad como los de Ferreira *et al* (2008) sugieren que las bacterias endófitas en especies de Eucalyptus de semilla a la colonización en plántulas se transmite de manera vertical asegurando el apoyo de la comunidad bacteriana en la planta.

Estos microorganismos endófitos beneficiosos a la planta protegiéndolo de varias enfermedades, es por eso que su aplicación en el sector agrícola es de importancia, así, el proceso de aislamiento de las mismas depende fuertemente de la esterilización de la superficie del tejido vegetal, esto para posteriores evaluaciones en laboratorio y en campo que den una correcta información acerca del llamado endofitismo dentro de una especie de planta (Bacon y Hinton, 2007).

La relación entre la bacteria endófitas y la planta es simbiótica, la planta le suministra de nutrientes necesarios y la bacteria produce toxinas que a la planta le sirve como protección de ataque por insectos y enfermedades, las mismas ayudan también en la tolerancia de la planta a estrés de condiciones ambientales. Algunas variedades de especies de forraje son buenos hospederos de estas bacterias, ya que al ser producto de un proceso de mejoramiento a enfermedades, son las que presentan mayor infección (Markham, 2007).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Materiales**

Material vegetal:

Semilla de

- Cebada
- Maíz
- Haba
- Arveja
- Quinua
- Papa

Material de laboratorio:

Vasos de precipitado

Pipetas

Mortero de porcelana

Tubos ependorff

Pinzas

Bolsas de polietileno

Papel toalla

Placas petri

Reactivos:

Solución de hipoclorito al 1.2 %

Alcohol al 70%

Medio TSA al 10% y PDA

Solución salina al 1.2%

## Métodos

Estérilización de la semilla.-

Se colocaran las semillas en etanol al 70% por 1 min agitando constantemente, una vez eliminado se adicionara NaCl al 1.2 % por 15 min para las semillas de maíz, haba y arveja, también en agitación, luego se realizaran enjuagues con solución salina 4 veces. Posteriormente, se colocara con la ayuda de una pinza estéril las semillas en los morteros para poder macerarlos con 60 ml de solución salina, una vez macerado se realizara la primera dilución ( $10^{-1}$ ) el mismo será cultivado en medio sólido TSA y PDA.



Figura 1. Esterilización de plántulas germinadas.-

Se extraerán las plántulas y se colocaran en etanol al 70% por 1 min agitando constantemente, una vez eliminado se adicionara NaCl al 1.2 % por 15 min en constante agitación, también se eliminara el NaCl y se realizara el enjuague correspondiente con solución salina por 4 veces. La maceración se realizará en bolsas de polietileno con las raíces y la solución salina, luego se realizaran las diluciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) con la ayuda de una pipeta para luego ser cultivado en medio solidó TSA y PDA.



Figura 2. Crecimiento de plántulas estériles y evaluación.

### Diseño experimental.-

Cada unidad experimental constó de una placa petri con medio estéril, los tratamientos fueron:

- Cebada \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = C2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = C3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = CPL2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = CPL3
- Maiz    \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = M2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = M3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = MPL2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = MPL3
- Haba    \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = H2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = H3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = HPL2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = HPL3
- Arveja \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = A2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = A3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = APL2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = APL3
- Quinoa \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = Q2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = Q3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = QPL2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = QPL3
- Papa    \*semilla \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = P2  
                   \*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = P3  
       \*plántula \*dilución 2 ( $10^{-2}$ ) = PPL2

\*dilución 3 ( $10^{-3}$ ) = PPL3

Los mismos se aplicaran tanto en medio TSA como PDA con 2 repeticiones cada una arregladas en un diseño completamente aleatorio.

**Variable de respuesta.-**

Unidades Formadoras de Colonias (UFC).- De cada placa petri se realizo el recuento de las colonias formadas y se aplica la siguiente formula:  
 ó **UFC** = Recuento de la placa X factor de dilución ( $10^x$ )

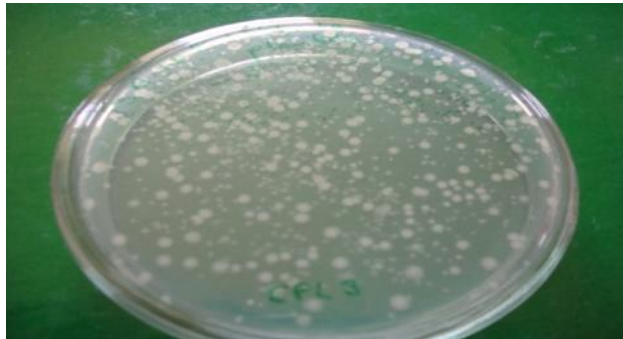


Figura 3. Recuento de colonias de bacterias en placas petri.

La variable evaluada se analizara bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$i = 1, 2, \dots, 6$  cultivos.

$j = 1, 2$  estados.

$Y_{ijk}$  valor observado de una variable de respuesta observado en el  $i$ -ésimo cultivo en el  $j$ -ésimo estado.

$\mu$  media general.

$\alpha_i$  efecto fijo del  $i$ -ésimo cultivo.

$\beta_j$  = efecto fijo del  $j$ -ésimo estado .

$\gamma_{ij}$  = efecto fijo de la interacción entre el  $i$ -ésimo cultivo y el  $j$ -ésimo estado.

$\epsilon_{ijk}$  efecto aleatorio de los residuales NIID ( $0, \sigma^2_e$ )

En base al modelo estadístico se realizaran el análisis de varianza para probar la hipótesis de los efectos fijos y la estimación de los componentes de varianza, calculando así las medias utilizando el proc glm del SAS versión 9.



**Cuadro 1. Cuadro de análisis de varianza**

F.V.	GI	SSC	CM	E(CM)	F
Tratamiento	t-1	SCt	Mt	$\sum_{j=1}^t (\bar{y}_{.j} - \bar{y}_{..})^2$	Mt/Me
Error	(r-1)(t-1)	SCres	Me	$\sum_{j=1}^t \sum_{i=1}^{r-1} (y_{ij} - \bar{y}_{.j})^2$	
Total	rt-1	SCT			

En caso de que los tratamientos fueran diferentes (significativos) se realizaron las comparaciones de medias entre tratamientos para determinar el o los mejores tratamientos.

**RESULTADOS.-**

Unidades formadoras de colonia (UFC)

La variable UFC fue diferente entre cultivos ( $Pr < 0.01$ ), al menos uno de los cultivos es de diferente UFC (Cuadro 1), dato esperado debido a que los microorganismos endófitos difieren de acuerdo a las especies de cultivo, ya que algunos son de hospedero específico.

Cuadro 2. Análisis de varianza de cultivos y estado (semilla y plántula).

F.V.	GI	SC	F	Pr > F
cult	7	1,59E+19	37.48	<.0001
est	1	1,26E+19	29.82	<.0001
cult*est	7	5,96587E+11	14.09	<.0001

De acuerdo a la figura 1, la cantidad de células fue mayor en cebada seguido del maíz y de menor cantidad de células en los cultivos de haba, arveja, papa y quínoa, lo que indica que la de mayor UFC en cebada y maíz podrían ser hospederos de diferentes microorganismos endófitos, sin embargo, los cultivos de haba, arveja, papa y quínoa podrían ser hospederos específicos de microorganismos endófitos también específicos.

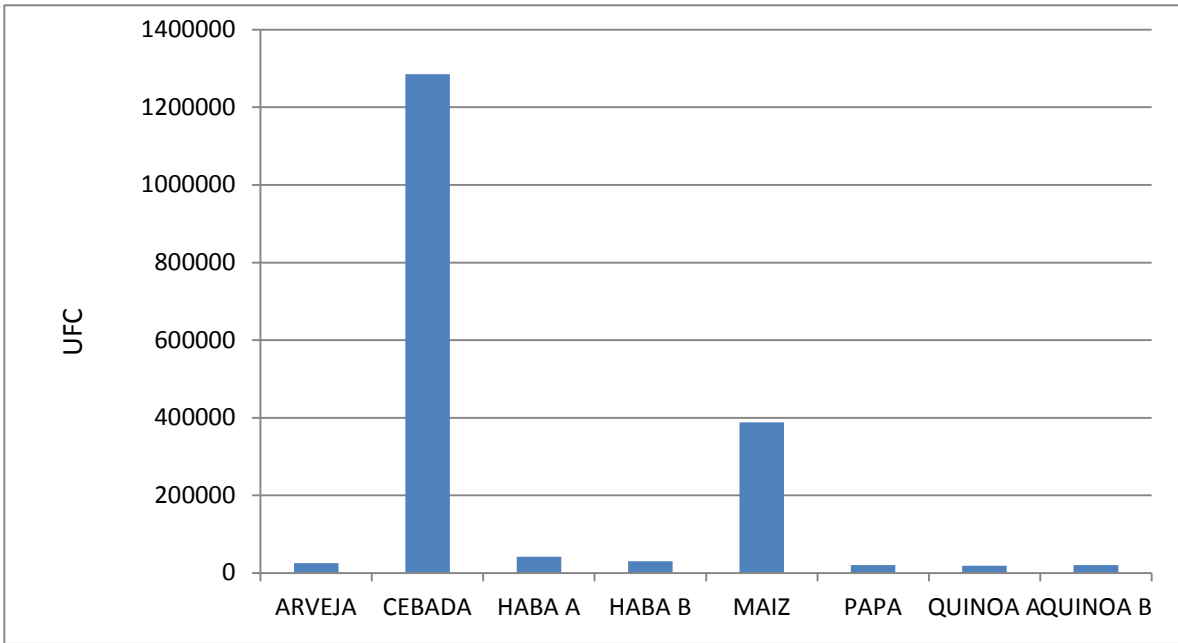


Figura 4. Número de unidades formadoras de colonia (UFC) por cultivo. Las letras A y B indican diferentes genotipos por cultivo.



Figura 5. Izquierda: UFC de cebada semilla y derecha: en plántula (medio TSA).

El estado del cultivo en semilla y plántula fue diferente ( $Pr < 0.01$ ), las unidades formadoras de colonia fue mayor en plántula en comparación a la semilla, lo que indica que podría presentarse mayor diversidad por la cantidad de endófitos en plántula por la activación de la semilla con la humedad. Así, la semilla en estado latente no hospeda una cantidad de células bacterianas representativa del cultivo.

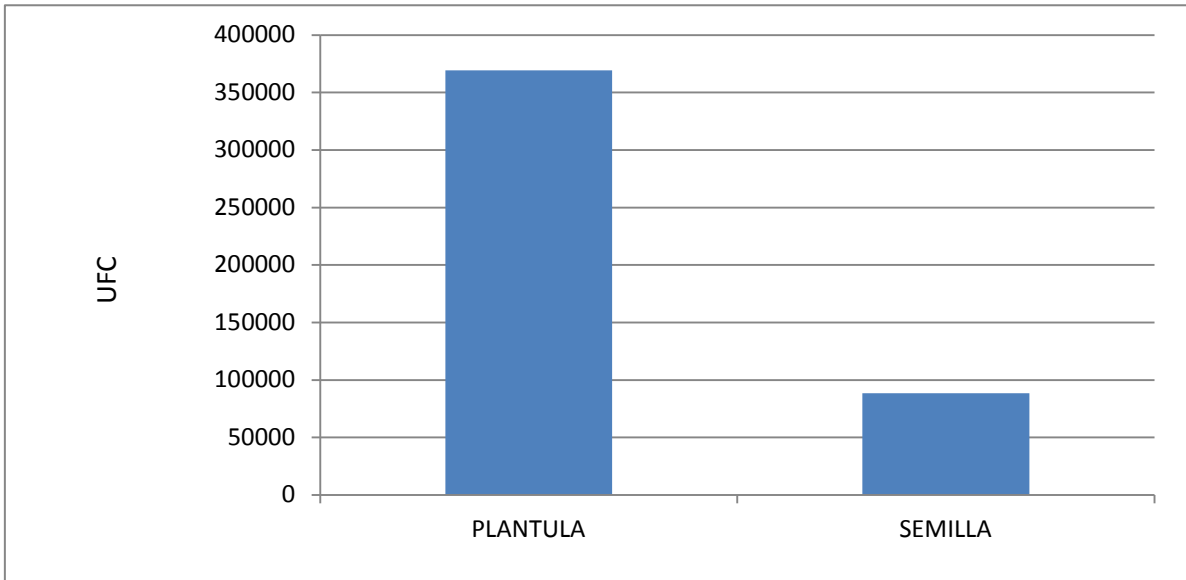


Figura 6. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) en semilla y plántula.

La interacción cultivo por estado de crecimiento presentó diferencias significativas (Cuadro 2) lo que indica que existe un cultivo con un estado en semilla o plántula con mayor unidades formadoras de colonia (UFC), de acuerdo a la figuras 6 y 7, el cultivo de cebada en plántula tuvo la mayor cantidad de microorganismos endófitos en comparación al resto de los cultivos, esto sugiere que la mayor diversidad podría encontrarse en el el cultivo de cebada en campo después de la emergencia.

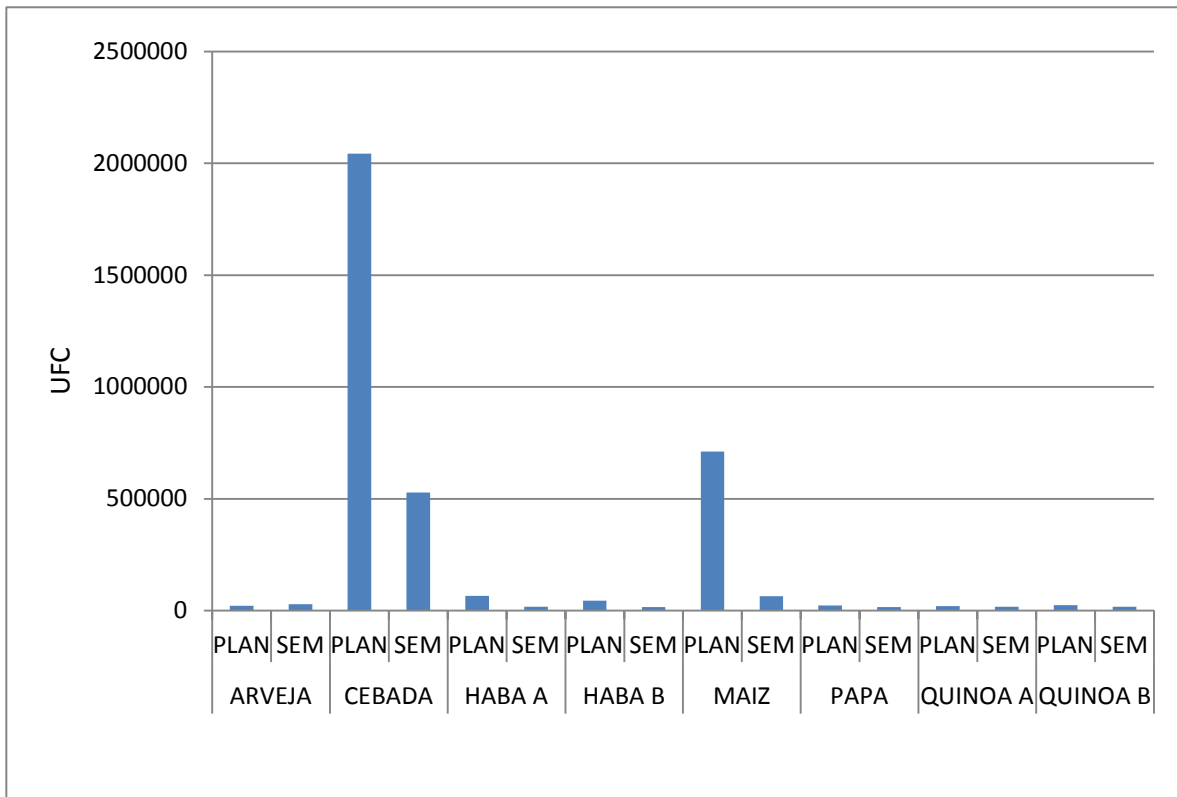


Figura 7. Comparación de medias de UFC por cultivo y por estado semilla-plántula.

#### CONCLUSION.-

Las unidades formadoras de colonia fueron mayores en el cultivo de cebada en plántula y no en semilla.

#### BIBLIOGRAFIA.-

- 1) MAGALLON P. Y DION P., 2009, Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia, FUNDACION PROINPA, Cochabamba-Bolivia.
- 2) Ferreira A., Quecine M. C., Laçava P. T., Oda S., Azevedo J. L., Araújo W. L., 2008, Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*, Universidade de São Paulo, Brazil.
- 3) Bacon, C.W., Hinton, D.M., 2007, Isolation, in Planta Detection, and Uses of Endophytic Bacteria for Plant Protection, In: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., Stetzenbach, L.D., editors. Manual of Environmental Microbiology. 3rd Edition. Washington, DC:ASM Press. p. 638-651.
- 4) Markham S.A., Pirelli G., Craig A.M., 2007, Endophyte toxins in grass seed fields and straw, Department of Biomedical Sciences, Oregon Estate University, United States.

# **MICROORGANISMOS DE SUELO DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), QUINUA (*Chenopodium quinoa*) Y CAÑAHUA (*Chenopodium pallidicaule*)**

Responsables: Marlene Angulo y Noel Ortuño

## **I.- INTRODUCCION.-**

Los microorganismos están en todas partes, prácticamente sin excepción, se estudia los microorganismos del suelo debido a que son los responsables de la mayor parte de la actividad que allí tiene lugar. Estos procesos microbianos abarcan diferentes puntos de vista: biogeoquímico que estudia la interacción de los compuestos geoquímicos y los organismos vivos del suelo, a nivel nutricional de cómo reciclan los estos los compuestos del suelo, y desde el punto de vista ecológico que muestra de que manera interaccionan los microorganismos con el ambiente y con otros microbios (Coyne, 2000).

En un suelo agrícola están presentes alrededor de  $10^{10}$  organismos por gramo de suelo y constituyen aproximadamente 1500 Kg por Ha, un gramo de suelo fértil puede contener 5 m de micelio fúngico,  $10^8$  células bacterianas y  $10^6$  esporos de actinomicetos (Carrillo, 2003). La importancia de los microorganismos del suelo en los principales cultivos de la zona andina de Bolivia radica en las condiciones climáticas adversas a la que están sujetos tanto el cultivo como los microorganismos involucrados en su rizosfera, para lo cual, el siguiente trabajo persigue el siguiente objetivo: determinar el comportamiento microbiano del suelo de los cultivos de papa, quinua y cañahua bajo el efecto de la aplicación de 8 tratamientos diferentes para cada situación en la estación Experimental de Quipaquipani.

## **II.- REVISION DE LITERATURA.-**

### **2.1. El suelo como organismo vivo.-**

El suelo constituye un consorcio de células vivas en una matriz orgánico – mineral, las mismas no son constantes, varían en el tiempo y el lugar; no obstante cuando se manipulan sus características de modo que afecten el crecimiento de las plantas (cómo el arado, el drenaje, la incorporación de materia orgánica, la fumigación y la fertilización), lo que constituye la esencia de la agricultura. Estas medidas afectan a los microorganismos y a su vez al crecimiento de las plantas (Coyne, 1999).

### **2.2. La rizosfera.-**

La zona del suelo que esta en contacto directo con las raíces es el lugar donde se llevan a cabo las interacciones entre la planta y los microorganismos. Así, los que se ubican en la rizosfera corresponde a la que se encuentra inmediatamente bajo la influencia de las raíces y es un nicho rico en nutrientes; las planta adquieren la mayoría de los nutrientes por medio de las raíces y liberan a su vez moléculas como: amino ácidos, hormonas, ácidos orgánicos, azúcares y vitaminas, de esta manera los microorganismos pueden ayudar a la planta y desarrollar con esta una relación de beneficio mutuo (Magallon y Dion, 2009). El efecto que se produce en la planta también resulta de las diferentes relaciones con bacterias en cuanto a la producción de hormonas a través de las raíces que se encuentran en la rizosfera, como también de hongos y algas (Ahmad *et al.*, 2005).

## **III.- MATERIALES Y METODOS.-**

Los 8 tratamientos con 3 repeticiones se hicieron un total de 24 muestras de papa y 24 de quinua, los cuales fueron procesados bajo la técnica descrita por Magallon y Dion (2009). Se pesaron 1 gramo de cada muestra y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina esteril al 0.85 %, procediendo a realizar las diluciones seriadas en tubos endorff conteniendo 900 ul de solución salina esteril. Posteriormente se sembraron 100 ul

de las soluciones seriadas en cajas petri conteniendo medio de cultivo TSA para el conteo de bacterias totales (en unidades formadoras de colonia UFC) y en medio PDA para hongos totales (UFC), los mismos fueron incubados entre 28 y 30 °C, la evaluación de bacterias totales se realizo a las 24 y 48 horas luego de sembrado y para los hongos totales se evaluó a las 72 y 120 horas debido a que los hongos tardan mas en desarrollarse. Los datos de UFC fueron evaluados bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + \phi_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

i= 1, 2, 3 Muestreo.

j= 1, 2, 3 bloques.

k= 1, 2, 3....., 8 tratamientos.

$Y_{ijk}$  = Unidades Formadoras de Colonia observado en el j-esimó bloque donde se asigno el tratamiento que resulta de la combinación entre el i-ésimo muestreo y el k-ésimo tratamiento.

$\mu$  = media general.

$\alpha_i$  = efecto fijo del i-ésimo muestreo.

$\beta_j$  = efecto aleatorio de los bloques.

$$\delta_j \sim NIID(0, \sigma_r^2)$$

$\tau_{ij}$  = efecto fijo de los tratamientos.

$\phi_{ik}$  = efecto fijo de la interaccion entre el i-esimo muestreo y el k-esimo tratamiento.

$\varepsilon_{ijk}$  = efecto aleatorio de los residuales.

$$\varepsilon_{ijk} \sim NIID(0, \sigma_e^2)$$

De acuerdo al modelo definido, se realizó el análisis de varianzas y comparación de medias para determinar las diferencias entre los tratamientos utilizando el PROC GLM del SAS.

#### IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.-

##### a) Cultivo de quinua

##### Bacterias totales.

Las unidades formadoras de colonia (UFC/gr de suelo) fueron diferentes entre los muestreos (Pr<0.05), explicando de esta manera el comportamiento de las poblaciones bacterianas durante el ciclo del cultivo de la quinua, así, del primer al segundo muestreo que coincide con el estado masoso de la quinua, la población bacteriana incremento notablemente (hasta 1.07E+07 UFC/gr de suelo), disminuyendo el mismo al tercer muestreo (Fig. 1).

De la misma manera, hubo diferencias significativas entre tratamientos, lo que indica que hubo efecto de los tratamientos sobre las poblaciones bacterianas, los mismos, fueron diferentes también en cada muestreo (interacción muestreo\*tratamiento Pr<0.05).

Cuadro 1. ANVA sobre bacterias totales.

F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
MUESTREO	2	896,9736134	448,4868067	152,34	<.0001	**

BLOQUE	2	7,9797236	3,9898618	1,36	0,268	
TRATAMIENTO	7	54,5278414	7,7896916	2,65	0,0219	*
MUESTR*TRATAM	14	131,8510928	9,4179352	3,2	0,0015	*

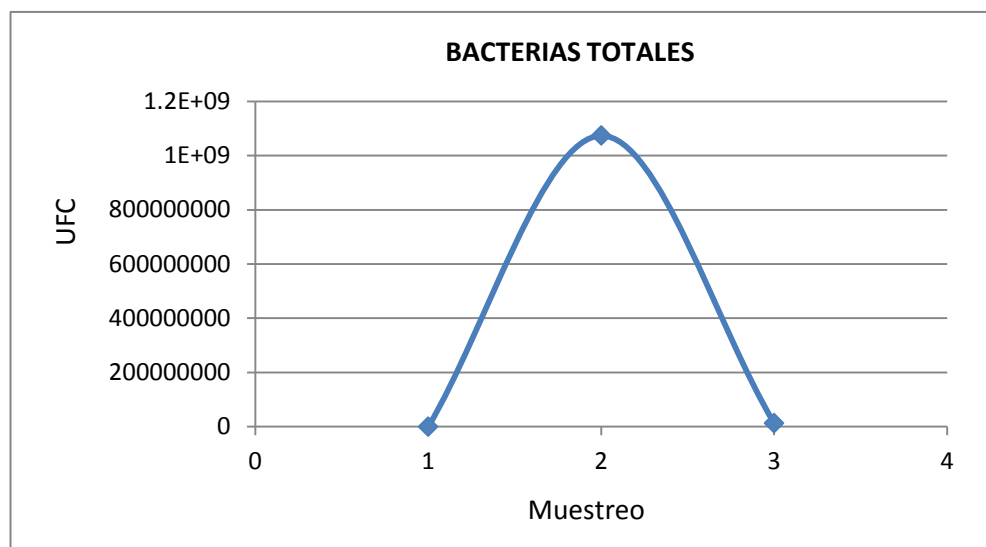


Figura 1. UFC de bacterias totales en base a los muestreos.

Al primer y tercer muestreo, las UFC's de las poblaciones bacterianas fueron los mismos entre los tratamientos (igual al testigo absoluto), demostrando que al inicio y a la cosecha del cultivo no hubo efecto de la aplicación de los mismos. Sin embargo, al segundo muestreo, los tratamientos 2, 3, 5, 6 y 8 fueron los que mostraron mayores poblaciones bacterianas entre  $7E+09 - 9E+09$ , mientras que el testigo y los tratamientos 7 y 4 oscilaron entre  $2E+07 - 4E+07$ , esto indica que el tratamiento 6 seguido del tratamiento 5 ( $9E+09$  UFC/gr de suelo) con cinco aplicaciones cada 15 días de estiércol + tricobal + acaritop + fungitop + vigortop + biobat + fertisol son los responsables del incremento y la mayor actividad bacteriana en estado masoso de la quinua, así, los tratamientos 8, 3 y 2 (entre  $7E+09 - 8E+09$  UFC/gr de suelo) con 4 aplicaciones cada 20 días de estiércol + tricobal + acaritop + fungitop + vigortop + biobat + fertisol son de la misma manera al aplicar solo estiércol y estiércol + tricobal al momento de la siembra.



Figura 2. Diferencias entre tratamientos al segundo muestreo.

### Hongos totales

Las UFC's de hongos, fueron diferentes entre los muestreos y no así entre tratamientos y la interacción (muestreo\*tratamiento), lo que significa que no hubo efecto de los tratamientos sobre las poblaciones hongos, ya que estos fueron igual al testigo absoluto. Sin embargo, las poblaciones de los hongos incrementaron del primer al segundo muestreo (hasta 1,07E+03 UFC/gr de suelo), similar al comportamiento en bacterias.

Cuadro 2. ANVA sobre hongos totales.

F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
MUESTREO	2	86,34287723	43,17143862	256,07	<.0001	**
BLOQUE	2	1,55806917	0,77903458	4,62	0,0148	
TRATAMIENTO	7	1,9566558	0,27952226	1,66	0,1434	NS
MUESTR*TRATAM	14	1,624901	0,11606436	0,69	0,7735	NS

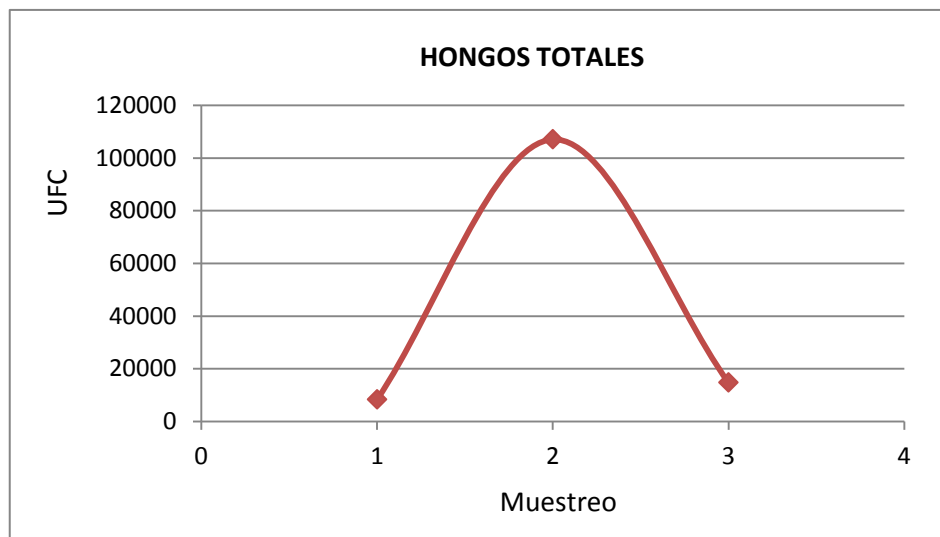


Figura 3. UFC de hongos en base a los muestreos.



## b) Cultivo de papa

### Bacterias totales.

De acuerdo al Cuadro 3, las UFC's fueron diferentes en al menos uno de los muestreos, pero, entre tratamientos y la interacción no fue diferente, asumiendo que las poblaciones bacterianas en papa no fueron afectadas por los tratamientos.

En base a la figura 4, las poblaciones bacterianas incrementaron significativamente hasta el tercer muestreo, es decir, hasta el momento de la cosecha.

Cuadro 3. ANVA sobre bacterias totales.

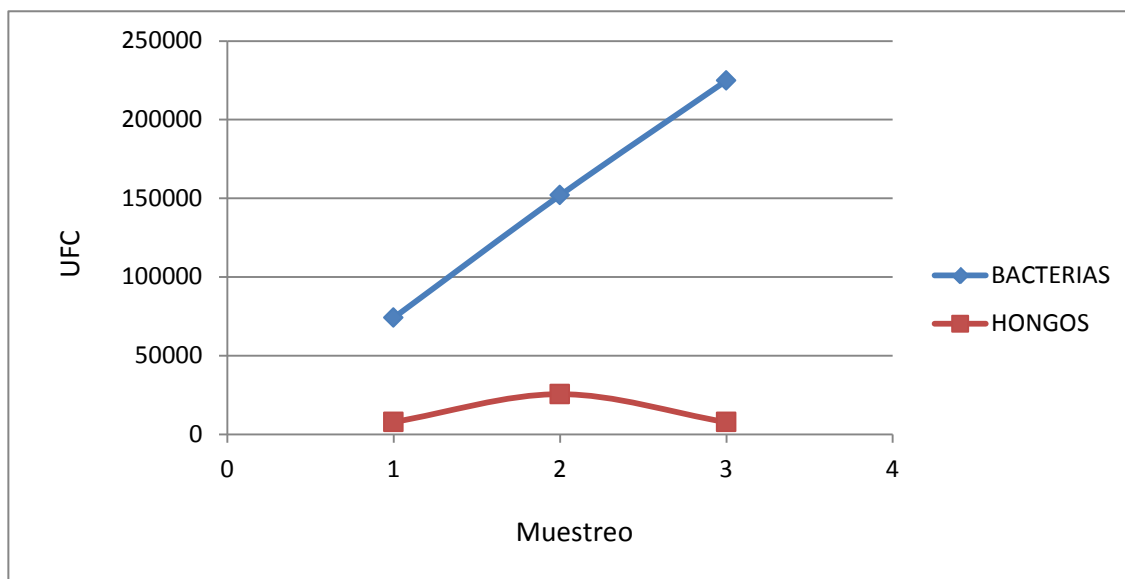
F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
MUESTREO	2	14,48978894	7,24489447	12,48	<.0001	**
BLOQUE	2	1,28045415	0,64022708	1,1	0,3408	
TRATAMIENTO	7	2,47344616	0,35334945	0,61	0,7454	NS
MUESTR*TRATAM	14	3,50879959	0,25062854	0,43	0,9551	NS

### Hongos totales

El cuadro 4 indica, de la misma manera, que hubo diferencias entre muestreos y no así entre tratamientos y la interacción; las poblaciones de hongos tampoco se vieron afectadas por los tratamientos. Así, se vio un incremento al segundo muestreo (hasta 2E+04 UFC/gr de suelo), coincidiendo este con la etapa de floración del cultivo (Figura 4).

Cuadro 4. ANVA sobre hongos totales.

F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
FECHA	2	22,42019580	11,2100979	22,45	<.0001	**
BLOQUE	2	2,98421977	1,49210989	2,99	0,0602	
TRATAMIENTO	7	3,77172102	0,53881729	1,08	0,3921	NS
FECHA*TRATAMIENTO	14	12,19442838	0,8710306	1,74	0,0789	NS



**c) Cultivo de cañahua**

**Bacterias totales**

En cañahua, solamente entre muestreos las bacterias totales fueron diferentes (cuadro. 5), sin embargo, estas son las mismas entre tratamientos y dentro de los muestreos; entre los muestreos (Figura. 4), las bacterias totales en el segundo muestreo fueron mayores en comparación al inicio del ciclo del cultivo y a la cosecha, este segundo muestreo coincide con el estado lechoso del grano de cañahua, siendo paralelo tanto el ciclo del cultivo y el ciclo de vida de las bacterias de la rhyzosfera. A pesar de no haber diferencias significativas entre tratamientos, el tratamiento 4 que constituye de la alternancia de la aplicación de vigortop – fertilisol - vigortop - fertilisol con una dosis de 1 lt /20lt, fue la que represento relativamente incrementos en las poblaciones bacterianas (Figura 5).

Cuadro 5. ANVA sobre bacterias totales.

F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
MUESTREO	2	572.814218	286.4071088	93.99	0.0001	**
BLOQUE	2	25.4513857	12.72569287	4.18	0.0217	
TRATAMIENTO	7	21.0724852	3.01035502	0.99	0.4521	NS
MUESTR*TRATAM	14	56.7547843	4.05391316	1.33	0.2281	NS

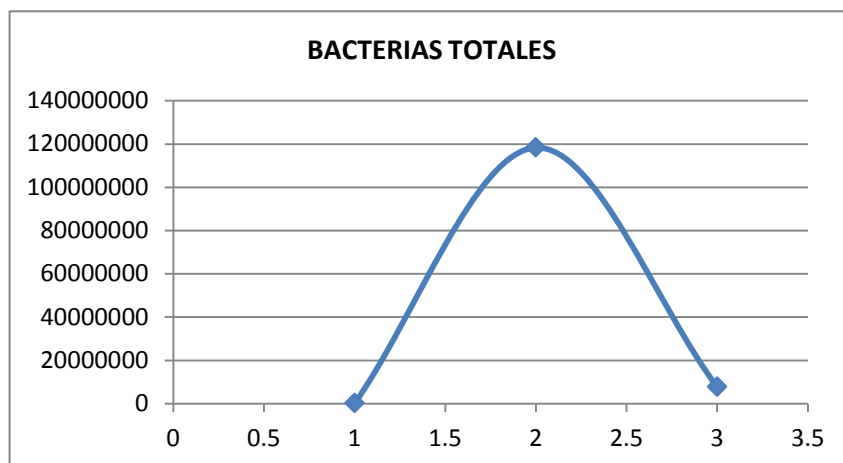


Figura 4. UFC de bacterias totales en base a los muestreos.

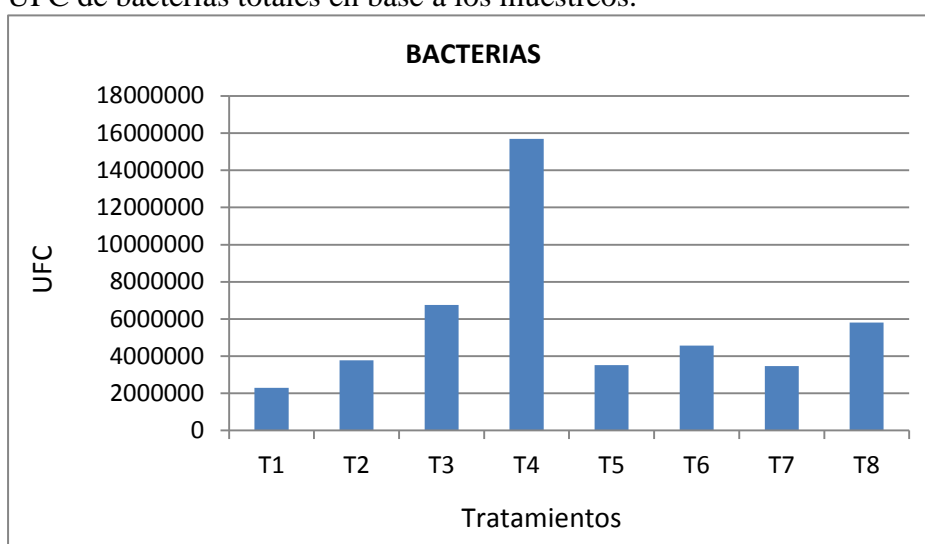


Figura 5. Bacterias totales entre los diferentes tratamientos.

### Hongos totales

Al igual que en bacterias totales, entre muestreos, las poblaciones fungicas de la rizosfera de raíces de cañahua fueron diferentes (cuadro 6), estas se presentan de manera creciente desde el inicio del ciclo del cultivo hasta la cosecha (Figura. 6), esto podría atribuirse a que las poblaciones de hongos mantengan un ciclo continuo debido a que terminan de asimilar sus reservas. Asi mismo, las poblaciones de hongos totales tuvieron un comportamiento igual como indica la figura 7, lo que indica que no hubo efecto de los tratamientos.

Cuadro 6. ANVA sobre hongos totales.

F.V.	GL	SC	CM	F	Pr > F	
MUESTREO	2	92.9433344	46.47166718	64.24	0.0001	**
BLOQUE	2	0.26975977	0.13487988	0.19	0.8305	
TRATAMIENTO	7	1.42426053	0.20346579	0.28	0.9581	NS
MUESTR*TRATAM	14	6.46023853	0.46144561	0.64	0.8189	NS

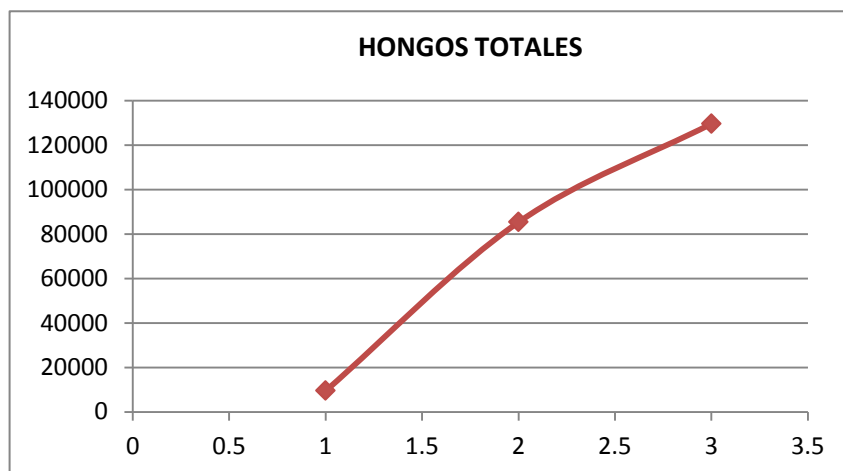


Figura 6. UFC de hongos en base a los muestreos.

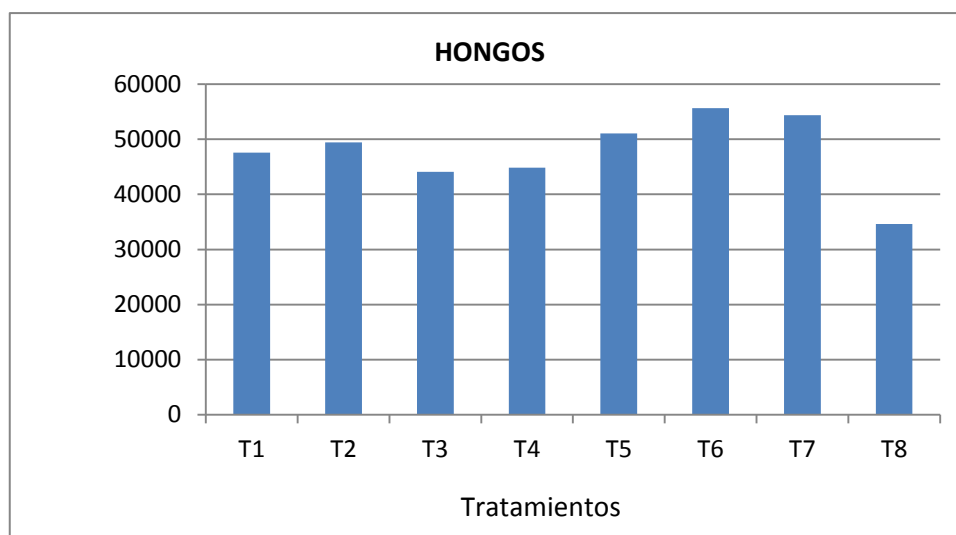


Figura 7. Hongos totales entre los diferentes tratamientos.

## V.-DISCUSION.

Según Cao *et al.* (2010) los biofertilizantes son muy utilizados en la agricultura orgánica de manera preventiva, estas pueden estar clasificadas en microbiológicos (aquellos que incluyen microorganismos benéficos como bacterias, hongos, nematodos y virus) o bioquímicos (estos incluyen extractos de plantas, feromonas, fitohormonas, bicarbonato de potasio y enzimas que son un ingrediente activo) según el principio activo. Las aplicaciones frecuentes, es decir cada 15 días de biofertilizantes en quinua incluyen productos como el Tricobal (*Trichoderma* + *Bacillus subtilis*) y Biobat (*Bacillus thuringiensis*) los cuales incrementaron las poblaciones bacterianas de la rizosfera en la etapa masosa del grano. Sin embargo, no ocurrió de la misma manera con la población de hongos, los mismos se manifestaron de igual manera que el testigo. El efecto de la incorporación de biofertilizantes a base de microorganismos en el cultivo de la quinua fue significativo frente a lo manejado tradicionalmente por los productores, pudiendo mostrarse mayores rendimientos y vigor de la planta con la utilización de biofertilizantes ([http://www.infoquinua.bo/fileponencias/a\\_NAVIA Oscar Incorporo](http://www.infoquinua.bo/fileponencias/a_NAVIA_Oscar_Incorpo)).

En papa, tanto para bacterias como para hongos, no se vieron diferencias significativas, pudiendo estos microorganismos, no haber encontrado el medio adecuado en la rizosfera (Santillana, 2006), por lo que los tratamientos no surgieron efecto sobre las poblaciones bacterianas y fungosas.

En cañahua, al igual que en la papa, los tratamientos no surgieron efecto sobre las poblaciones microbianas, funcionando mejor los biofertilizantes como el Acaritop y Fertisol.

## VI.- CONCLUSION.

La dinámica de las poblaciones bacterianas y fungicas variaron durante el ciclo de cada cultivo siendo estas mayores en la etapa de floración. Las bacterias totales en el suelo de quinua fue el que presento diferencias ante la aplicación de los biofertilizantes cada 15 días de estiércol + tricobal + acaritop + fungitop + vigortop + biobat + fertisol fueron los que aumentaron la dinámica poblacional de bacterias. En papa la población microbiana fueron de la misma manera para cada uno de los tratamientos. En cañahua tampoco se presentaron diferencias en la aplicación de los biofertilizantes pudiendo resaltar la aplicación alternada de acaritop y fertisol incremento las poblaciones bacterianas.

## VII.- BIBLIOGRAFIA.

Ahmad F., Ahmad I., Khan N., 2005, [Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan](#) In: Turk 29 (2005) 29-34

Cao C., Park S., McSpadden B, 2010, Biopesticide controls of plant diseases: resources and products for organic farmers in Ohio, Department of plant pathology, Ohio State University.

Coyne N., 2000, Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio, Ed. Paraninfo, Madrid – España.

Magallon C., Dion P., 2009, Importancia de los microorganismos de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia, Universidad Laval, FUNDACION PROINPA, Cochabamba-Bolivia.

[http://www.infoquinua.bo/fileponencias/a\\_NAVIA](http://www.infoquinua.bo/fileponencias/a_NAVIA) Oscar Incorpo

## ASLAMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS DEL RIZOPLANO EN LOS CULTIVOS DE PAPA Y QUINUA

**Responsables: Mayra Claros, Claudia Gutierrez y Noel Ortuño**

### 1.- INTRODUCCION

El término rizósfera es generalmente aceptado como la zona del suelo que rodea inmediatamente las raíces y es influenciado biológica y físicamente por las mismas. Este medio ambiente es extremadamente complejo y es una región de intensa actividad biológica (Kleupfel, 1993). El término rizoplano es considerado como la parte exterior de la raíz inmediatamente adyacente al suelo, es decir, constituye la superficie de las raíces. La mayor o menor cantidad de microorganismos en estas áreas va a depender de la cantidad de nutrientes exudados por las plantas que se encuentran en las mismas (Martín, 1977).

La zona del suelo que está en contacto directo con las raíces es el lugar donde se llevan a cabo las interacciones entre la planta y los microorganismos. Las plantas adquieren la mayoría de los nutrientes por medio de las raíces y liberan a través de estas un gran número de moléculas como: amino ácidos, hormonas, ácidos orgánicos, azúcares y vitaminas. Por su parte, los microorganismos pueden ayudar a la planta y desarrollar con esta una relación de beneficio mutuo. (Magallón P. y Dion P., 2009)

La comunidad de la rizósfera está compuesta principalmente por microorganismos no patogénicos, pero las intensas interacciones biológicas entre microorganismos dañinos, benéficos y neutrales, pueden guiar a la eliminación o supresión de los patógenos y bajo ciertas condiciones, ellos pueden ser benéficos. En muchos casos la rizósfera puede ser considerada como la zona buffer microbiológica en la cual la microflora sirve para proteger la planta de los ataques de los patógenos (Martín, 1977).

Martin menciona que la manipulación de las poblaciones de bacterias y hongos en el suelo dentro de los cultivos es fundamental para que los microorganismos endófitos puedan ser utilizados en la producción de cultivos.

## 2.- OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es de aislar las bacterias y hongos del rizoplano de los cultivos de papa (variedad Polonia) y quinua para su posterior uso como promotores de crecimiento. Así como determinar la cantidad de microorganismos presentes.

## 3.- MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1. Material biológico

Las plantas colectadas se detallan a continuación en el cuadro 1 (Figura 1.)

Cuadro 1. Especificaciones de las muestras

Código	Cultivo	Localidad	Municipio	Departamento
1	Papa var. Polonia Rep. 1	Vencalla	Mocomoco	La Paz
2	Papa var. Polonia Rep. 2	Vencalla	Mocomoco	La Paz
3	Papa var. Polonia	Romer Kota	Sica Sica	La Paz
4	Papa var. Polonia	Romer Kota	Sica Sica	La Paz
5	Quinua 1-1 Par. A	Crucero Belen	El Choro	Oruro
6	Quinua 3-1 Par. C	Crucero Belen	El Choro	Oruro
7	Quinua 2-1 Par..B	Crucero Belen	El Choro	Oruro
8	Quinua 1-2 Par. A	Crucero Belen	El Choro	Oruro
9	Quinua 4-2 Par. D	Crucero Belen	El Choro	Oruro
10	Quinua 4-1 Par. D	Crucero Belen	El Choro	Oruro
11	Quinua 2-2 Par. B	Crucero Belen	El Choro	Oruro
12	Quinua 3-2 Par. C	Crucero Belen	El Choro	Oruro



Figura 1. Recepción de muestras

Las muestras fueron guardadas en bolsas plásticas, mantenidas frías en conservadoras durante el transporte al laboratorio y almacenadas a 6°C hasta procesarlas.

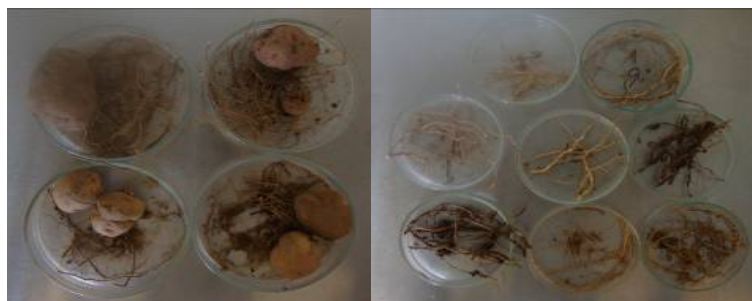
### 3.1.2. Material de laboratorio

Cámara de Flujo Laminar, autoclave, agua destilada, alcohol, hipoclorito de sodio, medio TSA y PDA, solución salina al 0,85%, bisturí, bolsas de polipropileno, balanza, cajas petri, cámara Figuragráfica, vasos de precipitado de 50 ml., erlenmeyer de 1000 ml, libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero, parafilm, papel aluminio, tubos eppendorf.

### 3.2. METODOS

Se utilizó el protocolo del manual de microbiología de Dion et.al., 2009. Modificándolo de acuerdo al material disponible del laboratorio.

Se sacudió ligeramente las raíces para quitar el exceso de suelo no rizosférico. Figura 2.



Se enjuagaron las muestras con solución salina (0.85% NaCl) con la finalidad de eliminar el resto de suelo no rizosférico. Figura 3.



Figura3. Eliminación del suelo no rizosférico

Se pasaron las raíces a vasos de precipitado estériles con solución salina (0.85% NaCl) y se los puso al shaker por 15 min. Figura 4.



Para asegurar una mejor extracción de los microorganismos se pasaron a bolsas de polipropileno estériles junto con 1,5 ml de la solución de enjuague de los vasos y se las restregó por el lapso de 1 minuto con ambas manos como muestra la Figura 5.



Posteriormente se sacó una alícuota madre de 1ml de la cual se hicieron cuatro diluciones. La dilución -3 y -4 se sembró para la obtención bacterias y la dilución -1 y -2 se sembraron para la obtención de hongos. La siembra se la realizo por vertido como muestra la Figura 6.





Figura 6. Siembra por vertido

Se cultivaron las bacterias en medio TSA a 28 °C por 48 hrs. Los hongos fueron cultivados en medio PDA a 22 °C por el lapso de 7 días.

Una vez crecidas las colonias bacterianas se aislaron en tubos con TSA para posteriores pruebas y caracterización. Lo mismo para el caso de hongos, en tubos con PDA.

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1. Bacterias Totales

Se evaluaron 12 plantas para la extracción de bacterias epifitas. Donde la concentración total de las bacterias epifitas se detalla en el cuadro 2, teniendo poblaciones considerables con las que se podrá trabajar.

Cuadro 2. Bacterias totales

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ufc/gr</b>
1	1,10E+05
2	4,00E+05
3	3,23E+06
4	1,60E+05
5	4,70E+05
6	2,80E+05
7	5,20E+05
8	1,30E+05
9	1,70E+05
10	1,19E+06
11	4,00E+04
12	1,30E+05

## 4.2. Hongos Totales

Se evaluaron 12 plantas para la extracción de hongos epifitos. Donde la concentración total de los hongos epifitos se detalla en el cuadro 3. Dando como resultado hongos ambientales y dos posibles *Trichoderma* spp. en las muestras 6 y 12 como se muestra en la Figura 7.

Cuadro 3. Hongos totales

Muestra	Concentración ufc/gr
1	1,16E+04
2	1,03E+04
3	4,20E+03
4	2,60E+03
5	6,00E+02
6	1,70E+03
7	8,50E+03
8	4,00E+01
9	5,20E+02
10	7,20E+02
11	2,40E+02
12	8,00E+01



### 4.3 Aislados Totales

Se evaluaron 12 plantas de la zona altiplánica. Donde se obtuvo de las cuatro muestras de papa Polonia ocho aislados de bacterias. En el caso de las muestras de quinua se obtuvieron 24 aislados de bacterias y 3 posibles *Trichoderma* spp. Todos los aislados son de microorganismos exófitos de raíz.

### 5. CONCLUSIONES

Se puede concluir que es viable aislar bacterias y hongos epifitos de raíces de plantas de papa de variedad Polonia y de plantas de quinua de la zona altiplánica.

### 6. RECOMENDACIONES

Para la selección de las mejores bacterias Epifitas promotoras de crecimiento se deberá realizar diferentes pruebas de laboratorio.

Las mejores cepas de PGPR deberán ser evaluadas en condiciones controladas tanto en invernadero y como en campo para su validación.

Las mejores cepas de PGPR deberán ser caracterizadas molecularmente.

### 5.- BIBLIOGRAFIA

- Dion P., Magallón P. 2009. Manual de microbiología agrícola "Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia, Université Laval, Québec, Canada. 90: 31-32.
- Kleupfel, D. 1993. The behavior and tracking of bacteria in rhizosphere. Ann. Rev. Phytopathol. 31:441-472.
- Martin, A. 1977. Introduction to Soil. Microbiology. Wiley. New York.

### PURIFICACION Y DESARROLLO DE UN CEPARIO DE MICORRIZAS NATIVAS AISLADAS DE SUELOS DE DIFERENTES ZONAS DE BOLIVIA.

Responsable: Claudia Gutierrez, Mayra Claros y Noel Ortuño

#### 65. Introducción

Las micorrizas en su condición de simbiontes benéficos se han convertido en un componente importante en los ciclos y procesos de producción, por eso es que se ha convertido en un punto importante de investigación para producción de insumos orgánicos.

Numerosos trabajos experimentales han puesto de manifiesto las ventajas que se le atribuyen a las micorrizas, entre las cuales se encuentran: 1) las plantas soportan condiciones de clima adversas, la elevación de la temperatura en el suelo, la presencia de agentes contaminantes y además mejoran la resistencia al transplante (Linderman 1989); 2) aumentan la resistencia al ataque de hongos y nemátodos de las raíces (Bagyaraj 1984); 3) mejoran la absorción de agua y aumentan la resistencia del huésped a la sequía (Hardie y Leyton 1981).

Para este trabajo se contaba con dos materiales de partida: 1) cepas ya aisladas y conservadas en refrigeración y 2) suelos traídos de diferentes ecoregiones del país los que se analizan para ver presencia o ausencia y su posterior extracción.

#### 66. Objetivos:

- Aislar y multiplicar micorrizas de suelos de diferentes zonas del país para establecer un cepario de conservación en frío y otro *in situ* y de micorrizas nativas.
- Reactivar, multiplicar y establecer cepas aisladas existentes en conservación en frío a cepario de conservación *in situ*.

#### 67. Materiales y métodos

##### 3.1. Material Biológico

- Cepas aisladas de micorrizas conservadas en sustratos en frío.
- Esporas puras aisladas de micorrizas conservadas en eppendorfs en frío.
- Muestras de suelos de diferentes regiones de Bolivia.

##### 3.2. Material de laboratorio

Microscopio, estereoscopio, tubos falcon de 50 cc. jeringa común de 10 ml para limpieza estereoscópica de las esporas, jeringa de insulina, pizeta, porta y cubre objetos, balde plástico, papel filtro, placas petri de plástico, tijera, marcador indeleble, lápiz, libreta de apuntes, agua destilada, agua común, solución de sacarosa al 70 %, juego de tamices (450  $\mu\text{m}$  – 120  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$ ), Contómetro, alcohol, algodón, cámara Figuragráfica, centrifuga a 3350 rpm en ángulo libre con capacidad para tubos de 50 cc, bomba de vacío.

##### 3.3. Métodos

###### 3.3.1 Extracción de esporas de suelo

Se siguió el protocolo de extracción de esporas de suelo que corresponde al procedimiento desarrollado por el Dr. Ewald Sieverding en 1984, en el proyecto Micorriza – CIAT

- Se tomaron muestras paralelas de 20 gramos de suelo previamente tamizada a 2 mm (Tamiz No. 10). Una para procesarla al momento (extracción) y la otra para estimar la humedad del suelo. (Estas muestras se dejan en condiciones ambiente por 72 horas y se pesan.)
- Se pasaron la muestra por tamices superpuestos, de tamaños de poro 450  $\mu\text{m}$  – 120  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$ . Con abundante agua eliminamos impurezas y partículas de tamaños inferiores las cuales dificultan el trabajo de separación.
- Se recogió cuidadosamente lo que quedó sobre los tamices intermedios (120  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$ ) con una espátula de punta fina y fueron pasadas a tubos para centrifuga de 50 ml (previamente marcados) en forma individual. El material restante se pasó con ayuda de una pizeta y agua. El volumen del tubo con muestra y agua fue de 30 ml, agitados con ayuda de una espátula de punta fina.
- Con la jeringa se tomaron aproximadamente 40 ml de sacarosa al 70% y cuando la muestra ya no presentaba agitación se adicionaron a presión al fondo de cada tubo preparado, hasta completar 45 ml. La jeringa fue lavada superficialmente con agua, después de cada adición.
- Con mucho cuidado se llevaron los tubos a una centrifuga con ángulo libre (previamente se equilibraron los pesos de los frascos con agua común) y se centrifugaron a 3350 rpm por 4 minutos. Se observó una separación clara en tres fases: agua – sacarosa – suelo

- Con una jeringa se extrajo la fase intermedia de los tubos – sacarosa, principalmente el material contenido en el límite sacarosa – agua, donde se acumulan las esporas, tomando todo lo existente hasta la unión de la fase acuosa con el suelo.
- Se pasaron a un tamiz de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  y se lavaron con agua de llave. Con ayuda de la pizeta se vació el material restante sobre el papel filtro cortado en discos puesto en el embudo de la bomba de vacío; se extrajo toda la parte líquida y se recogieron los filtros a una caja de Petri para la observación de presencia o ausencia. Una vez confirmada la presencia, estas extracciones fueron reactivadas y posteriormente multiplicadas.



**Figura1.** Observación de esporas al estereoscopio

### 3.3.2. Reactivación y multiplicación de cepas conservadas en frío.

La reactivación se realizó inoculando de igual manera tanto las esporas puras, los sustratos con cepas aisladas que estaban conservadas en frío así como las extracciones recientes a las raíces de plántulas de cebada previamente germinadas en pequeñas macetas con sustrato estéril que fueron regadas periódicamente.



**Figura 2.** Inoculación a la planta

Una vez desarrolladas las plantas y antes de espigar fueron cortadas y se esperó una semana para la cosecha del sustrato.



**Figura 3.** Rellenado de macetas con sustrato



Figura 4. Plantas inoculadas en desarrollo

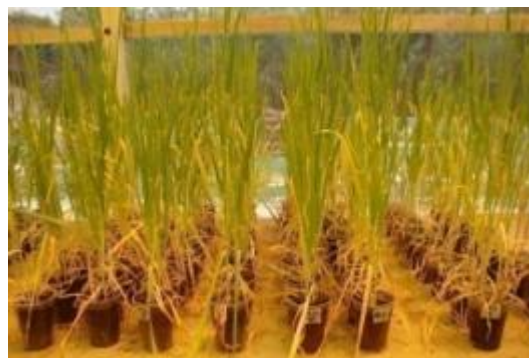


Figura 5. Plantas listas para el corte

Se cosechó el sustrato y se realizó el proceso de extracción para observar presencia o ausencia de esporas micorrícicas y una vez confirmada la presencia se procedió a la multiplicación pasando el sustrato que se tenía a macetas mas grandes, aumentando más tierra estéril y recultivando cebada nuevamente.

## 68. Resultados

Se evaluaron hasta el momento 65 suelos de diferentes regiones de los cuales por extracción se obtuvieron 61 aislados.

Se reactivaron 38 cepas que estaban en sustratos conservadas en frio para su refrescamiento.

Se reactivaron 15 cepas que estaban conservadas en eppendorf como esporas puras en seco y en agua.

Se obtuvieron en total 114 cepas aisladas listas para pruebas de competencia.

Cuadro 1. Cepas actualmente conservadas en frio.

Código entrega	Codigo suelo origen	Datos
BPM - 0001	LMB – 2-3-(2)1	Aislado Boliviano
BPM - 0002	LMB – 2-3-(2)2	Aislado Boliviano
BPM - 0003	LMB – 2-3-(2)3a	Aislado Boliviano
BPM - 0004	LMB – 2-3-(2)5	Aislado Boliviano
BPM - 0005	LMB 3-(2)4	Aislado Boliviano
BPM - 0006	LMC 1-2-3	Aislado Boliviano
BPM - 0007	LMC 1-2-(4)1	Aislado Boliviano
BPM - 0008	LMC 1-2-(4)2	Aislado Boliviano
BPM - 0009	LMC 1-2-(4)2	Aislado Boliviano
BPM - 0010	LMD 1-2-(1)1	Aislado Boliviano
BPM - 0011	LMD – 1-2-(1)2	Aislado Boliviano
BPM - 0012	LMD 1-2(1)4	Aislado Boliviano
BPM - 0013	LMD – 1-2(3)1	Aislado Boliviano
BPM - 0014	LME – 1-3(2)1	Aislado Boliviano
BPM - 0015	LME – 1-3(3)2	Aislado Boliviano
BPM - 0016	LME – 1-3(5)1	Aislado Boliviano
BPM - 0017	LME – 1-3(5)2	Aislado Boliviano
BPM - 0018	LME – 1-3-6	Aislado Boliviano
BPM - 0019	LME – 1-3(6)1	Aislado Boliviano
BPM - 0020	M4	Aislado Boliviano
BPM - 0021	M5	Aislado Boliviano
BPM - 0022	M6	Aislado Boliviano
BPM - 0023	M7	Aislado Boliviano
BPM - 0024	M8	Aislado Boliviano
BPM - 0025	S/N	Aislado Boliviano
BPM - 0026	TS – 1-3	Aislado Boliviano
BPM - 0027	TS – 1-3-5	Aislado Boliviano
BPM - 0028	TIRAQUE 5-1-(2)1	Aislado Boliviano

BPM - 0029	<i>Glomus etunicatum</i> (B-29)	Introducido
BPM - 0030	<i>Glomus etunicatum</i> (B-30)	Introducido
BPM - 0031	<i>Glomus intraradices</i> (B-16)	Introducido
BPM - 0032	<i>Glomus intraradices</i> (B-161)	Introducido
BPM - 0033	<i>Glomus mosseae</i> (B-28)	Introducido
BPM - 0034	<i>Glomus gigantea</i> - GGGT	Introducido
BPM - 0035	<i>Glomus fasciculatum</i> LFSC	Introducido
BPM - 0036	<i>Glomus manihot</i> LMNH	Introducido
BPM - 0037	E. Colombiana ECLB N° 1335	Introducido
BPM - 0038	M. Colombiana	Introducido
BPM - 0039	# 9	Aislado Boliviano
BPM - 0040	# 11	Aislado Boliviano
BPM - 0041	# 12	Aislado Boliviano
BPM - 0042	# 18	Aislado Boliviano
BPM - 0043	# 19	Aislado Boliviano
BPM - 0044	# 20 B	Aislado Boliviano
BPM - 0045	# 21	Aislado Boliviano
BPM - 0046	# 22 B	Aislado Boliviano
BPM - 0047	# 23	Aislado Boliviano
BPM - 0048	# 23 B	Aislado Boliviano
BPM - 0049	# 56	Aislado Boliviano
BPM - 0050	# 56 B	Aislado Boliviano
BPM - 0051	San Antonio 09	Aislado Boliviano
BPM - 0052	S/N 12	Aislado Boliviano
BPM - 0053	Tarija 01	Aislado Boliviano
BPM - 0054	Tarija 01 B	Aislado Boliviano
BPM - 0055	Tarija 03	Aislado Boliviano
BPM - 0056	Tarja - GCh 04	Aislado Boliviano
BPM - 0057	Tarija GCh 04 B	Aislado Boliviano
BPM - 0058	Tarija S Francisco 08	Aislado Boliviano
BPM - 0059	Tarija 10	Aislado Boliviano
BPM - 0060	Tarija 13	Aislado Boliviano
BPM - 0061	CM3	Aislado Boliviano
BPM - 0062	TM3	Aislado Boliviano
BPM - 0063	TM1	Aislado Boliviano
BPM - 0064	TM4	Aislado Boliviano
BPM - 0065	TM2	Aislado Boliviano
BPM - 0066	AM4	Aislado Boliviano
BPM - 0067	AM3	Aislado Boliviano
BPM - 0068	AM5	Aislado Boliviano
BPM - 0069	AM2	Aislado Boliviano
BPM - 0070	MM4	Aislado Boliviano
BPM - 0071	MM7	Aislado Boliviano
BPM - 0072	MM6	Aislado Boliviano
BPM - 0073	MM8	Aislado Boliviano
BPM - 0074	MM5	Aislado Boliviano
BPM - 0075	MM2	Aislado Boliviano
BPM - 0076	MM1	Aislado Boliviano
BPM - 0077	AM1	Aislado Boliviano
BPM - 0078	CM5	Aislado Boliviano
BPM - 0079	PM4	Aislado Boliviano
BPM - 0080	TM5	Aislado Boliviano
BPM - 0081	PM2	Aislado Boliviano
BPM - 0082	PM3	Aislado Boliviano
BPM - 0083	PM5	Aislado Boliviano
BPM - 0084	PM1	Aislado Boliviano
BPM - 0085	CM1	Aislado Boliviano

BPM - 0086	CM2	Aislado Boliviano
BPM - 0087	MM3	Aislado Boliviano
BPM - 0088	CM6	Aislado Boliviano
BPM - 0089	CM4	Aislado Boliviano
BPM - 0090		Aislado Boliviano
BPM - 0091		Aislado Boliviano
BPM - 0092		Aislado Boliviano
BPM - 0093		Aislado Boliviano
BPM - 0094		Aislado Boliviano
BPM - 0095		Aislado Boliviano
BPM - 0096		Aislado Boliviano
BPM - 0097		Aislado Boliviano
BPM - 0098		Aislado Boliviano
BPM - 0099		Aislado Boliviano
BPM - 0100		Aislado Boliviano
BPM - 0101		Aislado Boliviano
BPM - 0102		Aislado Boliviano
BPM - 0103		Aislado Boliviano
BPM - 0104		Aislado Boliviano
BPM - 0105		Aislado Boliviano
BPM - 0106		Aislado Boliviano
BPM - 0107		Aislado Boliviano
BPM - 0108		Aislado Boliviano
BPM - 0109		Aislado Boliviano
BPM - 0110		Aislado Boliviano
BPM - 0111		Aislado Boliviano
BPM - 0112		Aislado Boliviano
BPM - 0113		Aislado Boliviano
BPM - 0114		Aislado Boliviano

#### 69. Discusión

- Las micorrizas son muy importantes en el impacto de la producción orgánica, abriéndose mas mercados para su comercialización.
- Desde el punto de vista ecológico la utilización de hongos micorrícicos es una alternativa al uso de químicos dañinos al medio ambiente.
- Desde el punto de vista económico, el uso de hongos micorrícicos es una alternativa al alza de los abonos químicos.

#### 70. Conclusiones

- Es viable aislar hongos micorrícicos que podrían ser útiles para diferentes fines en diferentes cultivos.
- Las micorrizas están ampliamente distribuidos en los suelos de nuestro país, es difícil encontrar suelos con ausencia de las mismas.

#### 71. Recomendaciones

- Se deberá comenzar a ajustar protocolos establecidos para la multiplicación masiva de los mismos.
- Es muy importante realizar la selección de los aislamientos y someterlos a diferentes pruebas para ver sus potenciales usos.
- Se deberá caracterizar los diferentes aislados obtenidos.



- Se deberá seguir extrayendo diferentes hongos micorrizicos de suelo para tener mayor diversidad de microorganismos con que trabajar.

## 72. Bibliografía consultada

- Manjarrez, M. 2000. Biotecnología de la producción de inóculo micorrizico arbuscular y su control de calidad. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Pp 239 – 250
- Sieverding, E. 1984. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesiculo – arbuscular. Palmira, CIAT.

## PRODUCTO 2. Bolivia

### DESARROLLO DE BIOFERTILIZANTES PARA USO DE PEQUEÑOS HORTICULTORES PRODUCTO

#### SELECCION DE LAS MEJORES BACTERIAS FIJADORES DE NITROGENO DE VIDA LIBRE EN LOS CULTIVOS DE CEBOLLA (*Allium cepa*), CEBADA (*Hordium*) Y QUINUA (*Chenopodium quinoa*)

**Responsable:** Angelike Ducet y Mayra Claros

El nitrógeno es un elemento esencial para la planta que encontramos en la estructura del ADN, de las proteínas y por lo tanto de los ácidos animados. El aire está compuesto de 80% de N<sub>2</sub>, pero los dos átomos de nitrógeno son atados con tres enlaces, lo que vuelve la molécula inerte. Una planta puede sacar el nitrógeno del suelo solo en la forma NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig.1), por lo tanto necesita reacciones químicas como nitratación, nitrosación y también amonificación (*María Pereyra Cardozo, 2001*). Algunas bacterias pueden ayudar en la fijación biológica del nitrógeno (FBN), estas se ubican a cerca de la rizósfera ya que necesitan bastante material orgánica (sirve de nutrientes para las bacterias) para realizar esta función. (*Juliana Mayz-Figueroa 2004*). Por ejemplo, las bacterias de tipo *azotobacter* pueden fijar el nitrógeno de la atmosfera para dar NH<sub>3</sub> según la reacción siguiente:  

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16 ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16 Pi$$
Este informe presentará los resultados experimentales de la eficiencia de cinco bacterias de tipo *azotobacter* y de dos productos comerciales en la FBN.

#### **Objetivo**

Seleccionar las mejores bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en los cultivos de cebolla, trigo y quinua.

#### **Materiales y Método**

##### **Ubicación geográfica**

El ensayo se realizó en el laboratorio e invernadero de Microbiología Agrícola de la Fundación PROINPA, ubicada en la provincia Quillacollo del departamento de Cochabamba, que se encuentra a 15 Km. de la ciudad de Cochabamba, a una altitud de 2613 msnm y cuyas coordenadas geográficas son 17°21'00,7" latitud sur y 66° 15'40,6" longitud oeste. (Fig. 2)

## Material

### Material biológico

- Semilla de cebada, quinua y cebolla criollas
- Producto comercial: Dimamazos y Azotolam
- Cepas de azotobacter : Dazoto, Dimaniz, BP azto...47, A1, 12

### Material de invernadero

- Macetas
- Substrato estéril
- Agua
- Guantes
- Marcador
- Regla
- Libreta de apuntes
- Lapicero
- Cámara fotográfica
- Cuchillo
- Etiquetas de plástico

### Material de laboratorio

- Medio TSB
- Cámara de flujo laminar
- Matraces de 50 ml
- Micropipetas de 200 y 1000  $\mu$ l
- Puntas estériles
- Microscopio óptico
- *Hematocímetro*
- *Agua destilada*
- *Tubos eppendorf*
- *Vernier*
- *Probeta*
- *Balanza*

## Metodología

### 3.1. Preparación del medio de cultivo y siembra de los aislados

La preparación del medio de cultivo TSB consiste en pesar para un litro de medio 39 gr del medio comercial, mezclar bien enrasando con H<sub>2</sub>O destilada hasta 1000 cc.

Se procedió a la dosificación de los matraces con 25 ml del caldo de cultivo. Se taparon los matraces con papel aluminio y se autoclavaron durante 15 minutos a 20 psi de presión.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra del aislado de cada uno de los aislados asignados de la colección de la Fundación PROINPA; mediante un asa bacteriana.

Sellando cada matraz con plástico film con su debida identificación. Se incubaron a 28 ° C por espacio de una semana en agitador orbital.

### 3.2. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia

Para el conteo del número de colonias de bacterias que se desarrollan en la muestra después de cierto tiempo y temperatura de incubación, se usó la técnica de dilución y vaciado en placa de agar (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

La técnica consiste en realizar diluciones seriadas (en varias etapas), de diez en diez. Para realizar estas diluciones (Fig. 3 & 4), se añade 1 ml de la suspensión bacteriana a 9 ml (en medio estéril o solución salina, igualmente estéril). Se agita vigorosamente para diluir las células y el proceso se repite cuantas veces sea necesario. Las muestras diluidas se siembran directamente en la

superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa de Drigalsky de cristal estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie. Las placas se incuban a 28°C durante 24 horas. (Gamazo *et al.*, 2005)  
 Después de 24 horas se hace el conteo de las colonias, las placas a contar no deberán presentar menos de 30 ni más de 300 colonias porque se dificulta tener un conteo exacto. Calcular con estos datos el número inicial de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) aplicar la fórmula. (Gamazo *et al.*, 2005)

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{ml sembrados en placa}}$$



**Figura 4. Preparación de la placa de agar estéril**



**Figura 3. Diluciones seriadas**

### 3.3. Preparación del inóculo para la inoculación en invernadero

Las bacterias fueron contadas con el microscopio óptico y con *hematocímetro* a fin de saber las concentraciones y hacer las disoluciones necesarias para obtener las mismas concentraciones de bacterias para cada tratamiento.

Para obtener la misma concentración de bacterias por cada inoculación, hemos aplicado la fórmula siguiente:

$$NV = N'V'$$

N, la más pequeña concentración encontrada ( $6.2 \cdot 10^9$  UFC/ml)

V, el volumen querido para inocular (5mL)

→  $V' = NV/N'$ , con V' el volumen que hay que sacar y a completar con

V' (agua)'= 5-V'

### 3.4. Inoculación

El día D, se siembra la quinua, cebada y se planta las cebollas. Las semillas fueron inoculadas con 5 mL de inoculante para las cepas de azotobacter. Para el Azotolam comercial (polvo) se echa 0.5

g de polvo por planta. Las soluciones fueron echadas en un pequeño agujero realizado en el substrato después las semillas (Fig. 5).



**Figura 5: Preparación de la inoculación**

. Solo el producto comercial *Dimamazos* fue inoculado dos semanas (D+14) después de la siembra de la quinua y la cebada porque el producto indica que es necesario que tengan raíces para ser inoculado. Se mezcla 2.5 mL de agua con 2.5 mL de producto.

### **2.5. Variables de Respuesta**

Cada semana, se evaluara la altura de cada planta (Fig.6) en los tres cultivos. Para la cebolla además el número de hojas y puntas secas (Fig.7). Las evaluaciones son periódicas.



**Figura 6: Medida del tamaño de la planta**



**Figura 7: Determinación del núm. de hojas**

Además, por la cosecha (Fig.14), se evaluara la longitud de raíz (Fig.8), el volumen (Fig.13) y el peso de raíces, el peso de la planta (Fig. 9). Por la cebada, se contara el número de macollos también y por la cebolla, el diámetro de bulbo, cuello (Fig. 10), el peso (Fig. 11) y la longitud del bulbo (Fig.12).



**Figura 8: Medida de la longitud de raíz**



**Figura 9: Peso de la planta entera**



**Figura 10: Medida de los diámetros con un vernier**



**Figura 11 & 12: Peso y longitud del bulbo**



**Figure 13: Determinación del volumen de raíces**



**Figura 14 : cosecha de la quinua**

## 2.6. Diseño Experimental

Hay cinco tratamientos con bacterias y dos con productos comerciales. Para cada tratamiento, hemos realizado cinco repeticiones. Además, para tener una referencia, hemos hecho testigos, cinco para la cebada y la quinua y diez para las cebollas.

**Tratamientos y sus códigos:**

12→#12

Dimanoz→#D

Dazoto→#DA

BP azto→ #47

A1→#A1

Dinamazos comercial→#DZ

Azotolam comercial→#AZ

Testigo→ #T

AZOTOBACTER

PRODUCTO COMERCIAL

A saber que hemos sembrados para la quinua y la cebada, 3 semillas en cada macetas para aumentar las probabilidades que las semillas germinan, y cuando varios crecieron, los hemos diferenciado con un cordelito negro. Y para no tener la influencia de los parámetros de la ubicación de las macetas, hemos mezclado las macetas al azar la tercera semana.

## 2.6. Análisis estadístico

El porcentaje de crecimiento se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = N + \beta_i + \alpha_j + \varphi_{ij} + \tau_k + \pi_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

i el numero de bloques → i: 1:5

j el numero de cultivos → j:1:3

k el numero de tratamiento → kj:1:8

$Y_{ijk}$ : variable de respuesta observada en el i-esimo bloque donde se aplico el k-esimo tratamiento en el j-esimo cultivo

N: media general

$\beta_i$ : Efecto aleatorio del i-esimo bloque, N IID (0,  $\sigma^2_b$ )

$\alpha_j$ : Efecto fijo del j-esimo cultivo

$\varphi_{ij}$ : Efecto aleatorio de la interacion entre el j-esimo cultivo y el k-esimo bloque, NIID (0,  $\sigma^2_{ba}$ )

$\sigma^2_{ba}$ )

$\tau_k$ : Efecto fijo del k-esimo tratamiento

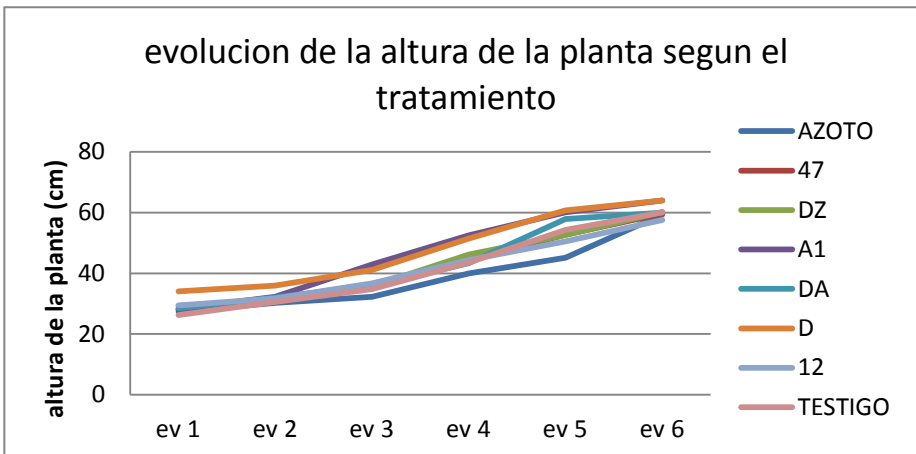
$\pi_{jk}$ : Efecto fijo de la interacion entre el j-esimo cultivo y el k-esimo tratamiento

$\varepsilon_{ijk}$ : Efecto aleatorio de los residuales NIID (0,  $\sigma^2_e$ )

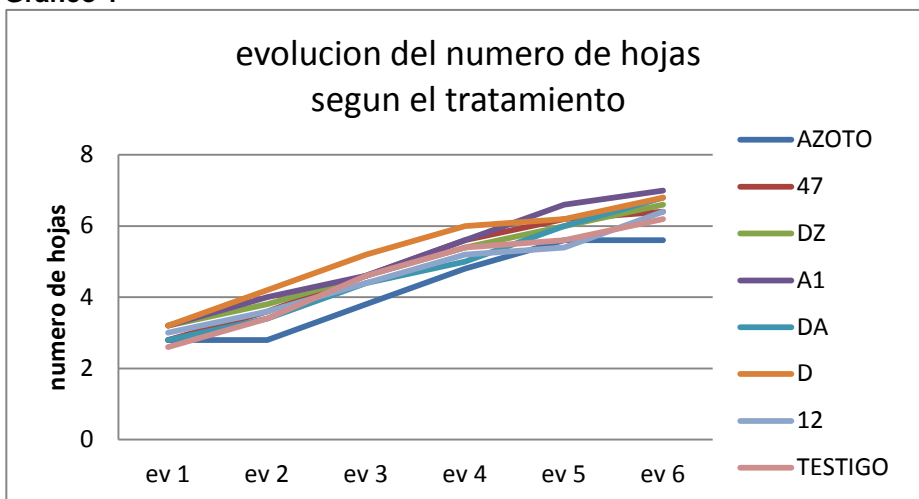
## Resultados

### Ensayo de cebolla

#### 1.1 Evaluaciones periódicas



**Grafico 1**



**Grafico 2**

Los tratamientos “D” y “A1” tienen un efecto más benéfico que los otros tratamientos en cuanto a la altura de planta (graf. 1) y el número de hojas (graf. 2). Al contrario, el “Azoto” no parece tener el efecto esperado.

### 1.2 Evaluación final

#### **Peso planta**

Para la variable “peso de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 1), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.0453$ ).

**Cuadro 1: Análisis de varianza para la variable “peso de planta”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Tratamiento	7	20,6318	2,9474	2,38	0,0453
Residual	31	17,5894	0,5674		
CV%	15,1532				
Media	26,9812				

En la figura 15, los tratamientos “47”, “A1”, “D”, “DA” y “DZ” tuvieron rendimientos similares (g/planta) y fueron los que tuvieron mayor rendimiento. Los rendimientos “12” y “azoto” tuvieron rendimiento similar a este del testigo.

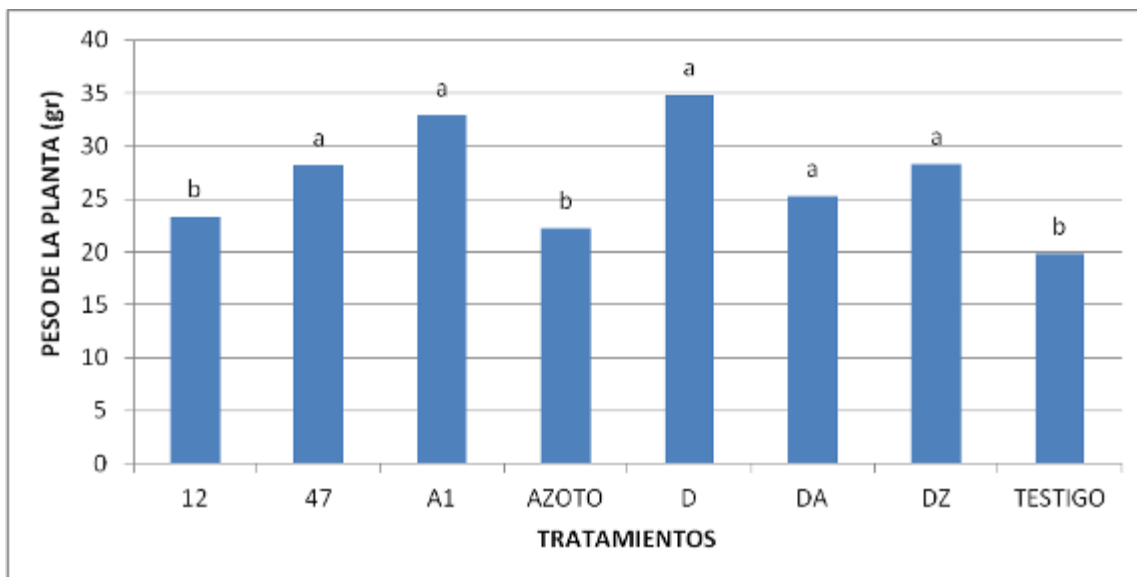


Figura 15: peso de planta según el tratamiento aplicado

✚ Peso bulbo

Para la variable “peso de bulbo”, el análisis de varianza (Cuadro 2), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.1255$ ). Por lo que los tratamientos tienen un efecto similar sobre el peso de bulbo.

**Cuadro 2: Análisis de varianza para la variable “peso de bulbo”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,0168	0,0042		
Tratamiento	7	6,976102	0,996586	1,81	0,1255
Residual	27,4	15,08644	0,5506		
CV%	28,9107				
Media	2,572				

Sin embargo, se puede constatar que los tratamientos “D” y “A1” tienen un efecto mayor que los otros tratamientos comparando las medias (Fig. 16)



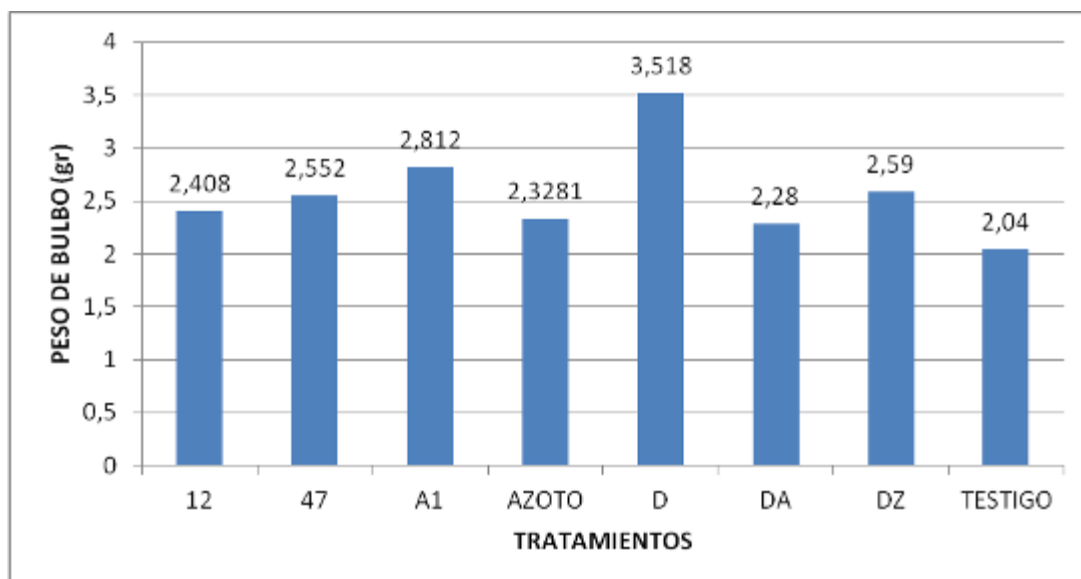


Figura 16: Peso de bulbo según el tratamiento aplicado.

✚ Longitud bulbo

Para la variable “longitud de bulbo”, el análisis de varianza (Cuadro 3), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.0416$ ).

**Cuadro 3: Análisis de varianza para la variable “longitud de bulbo”**

Fuentes de variacion	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	3,6632	0,9158		
Tratamiento	7	12,730088	1,818584	2,48	0,0416
Residual	27,1	19,87243	0,7333		
CV%	21,8641				
Media	3,9161				

La comparación de medias (fig. 17) muestra que todos los tratamientos tienen un efecto mayor en el desarrollo del bulbo, con excepción del tratamiento “12” en comparación al testigo.

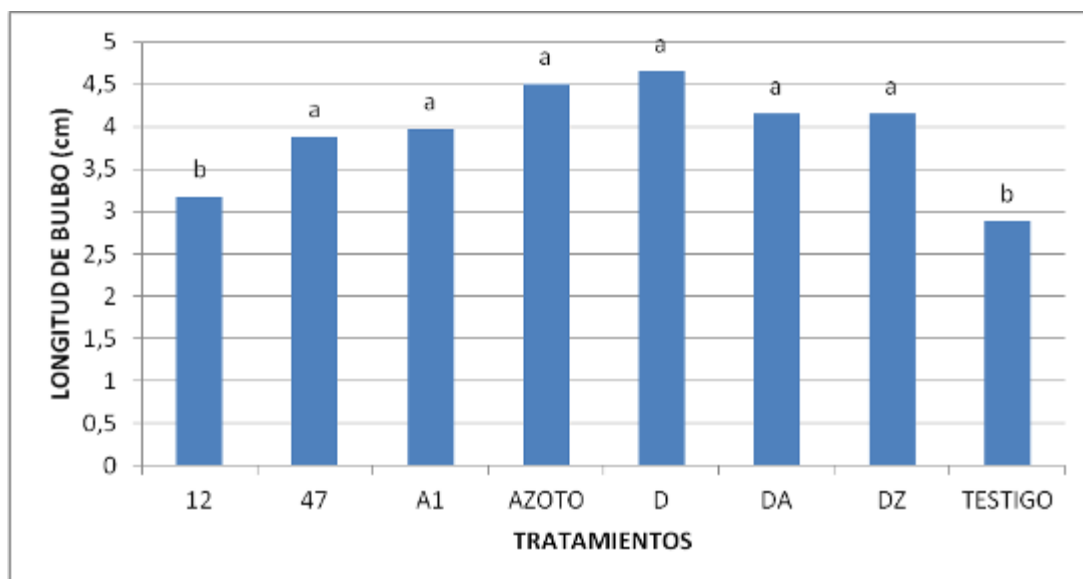


Figura 17: Longitud de bulbo según el tratamiento aplicado.

✚ Diámetro bulbo

Para la variable “diámetro de bulbo”, el análisis de varianza (Cuadro 4), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.0355$ ).

**Cuadro 4: Análisis de varianza para la variable “diámetro de bulbo”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Tratamiento	7	0,483336	0,069048	2,52	0,0355
Residual	31	0,8494	0,0274		
CV%	17,8876				
Media	0,982				

En la figura 18, se observa que los tratamientos “47”, “A1” “D” y “DZ” tienen comportamientos similares, con la predominancia de los tratamientos “D” y “A1”. En comparación al “Azoto”, “12” y el “Testigo”.

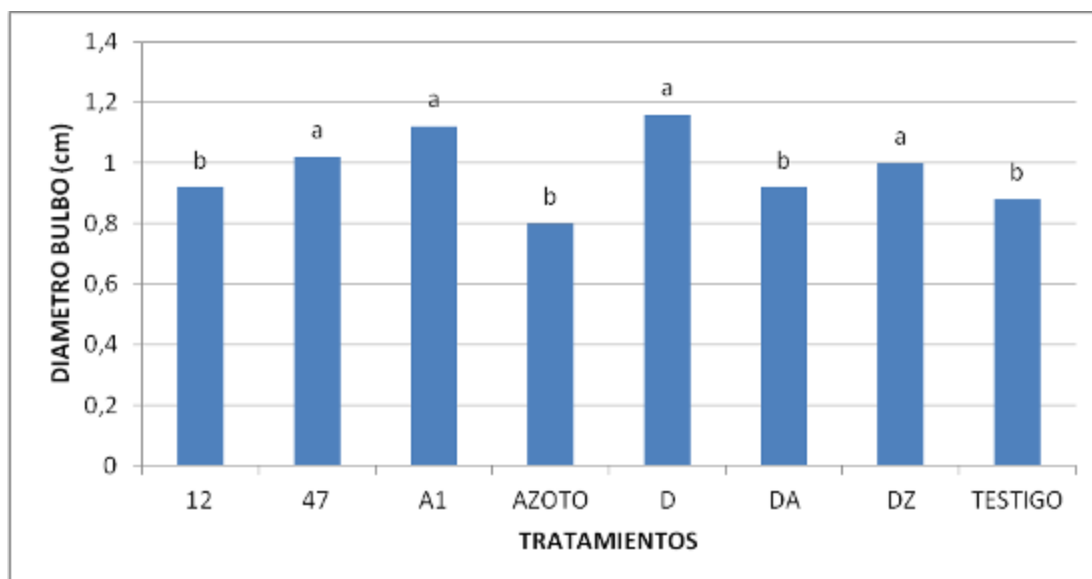


Figura 18 : Diámetro de bulbo según el tratamiento aplicado.



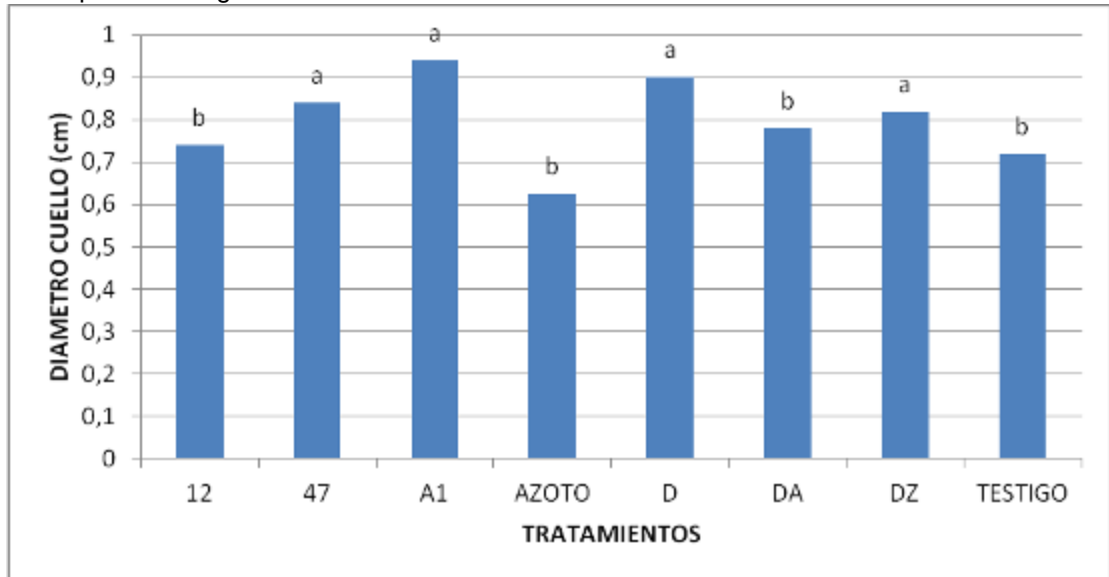
Figura 18 bis: Comparación "T-MC" y "D"  
 Diámetro cuello

Para la variable "diámetro de cuello", el análisis de varianza (Cuadro 5), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.0058$ ).

**Cuadro 5: Análisis de varianza para la variable "diámetro de cuello"**

Fuentes de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Tratamiento	7	0,3323005	0,0474715	3,61	0,0058
Residual	31	0,40765	0,01315		
CV%	14,7433				
Media	0,8				

Donde los tratamientos “47”, “A1”, “D” y “DZ” tuvieron un efecto mayor en comparación al “Azoto”, “12”, “DA” y el “Testigo” (fig. 19). Así mismo, se puede observar que el tratamiento “Azoto” tiene un efecto menor que el “Testigo”.



**Figura 19: Diámetro del cuello según el tratamiento aplicado.**

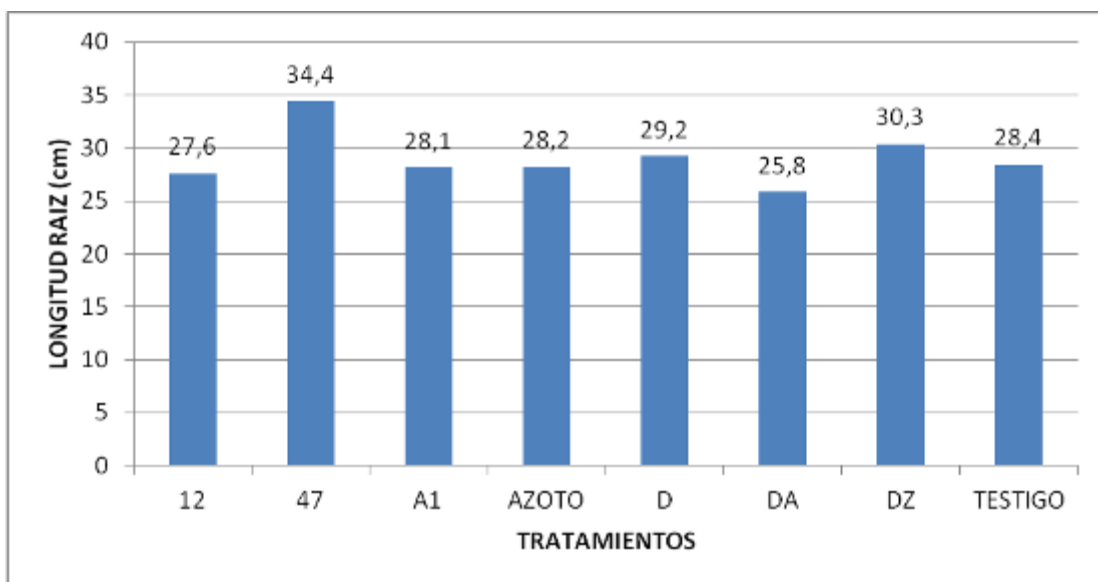
**✚ Longitud raíz**

Para la variable “longitud de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 6), no muestra diferencias significativas entre las variables bajo estudio (Pr= 0.383). Lo cual muestra que el desarrollo de la longitud radicular fue similar con l’aplicación de los diferentes bioinsumos.

**Cuadro 6: Análisis de varianza para la variable “longitud de raíz”**

Fuentes de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	18,1784	4,5446		
Tratamientos	7	224,012208	32,001744	1,11	0,383
Residual	28	807,2512	28,8304		
CV%	18,5151				
Media	29				

Sin embargo, se puede observar una predominancia del tratamiento “47” sobre la longitud de raíz, en comparación a los otros tratamientos. (Fig. 20)



**Figura 20: Longitud de raíz según el tratamiento aplicado.**

✚ **Volumen raíces**

Para la variable “volumen de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 7), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.6072$ ).

**Cuadro 7: Análisis de varianza para la variable “volumen de raíces”**

Fuentes de variación	Grado de libertad	Cuadrados medios	F	Pr > F
Bloque	4	0	0	
Tratamientos	7	33,647796	4,806828	0,78
Residual	31	191,0406	6,1626	0,6072
CV %	26,051			
Media	4,7			

Sin embargo, se puede observar .que los tratamientos “D”, “A1” y “DZ” tienen un efecto superior sobre el desarrollo de las raíces. (Fig. 21)

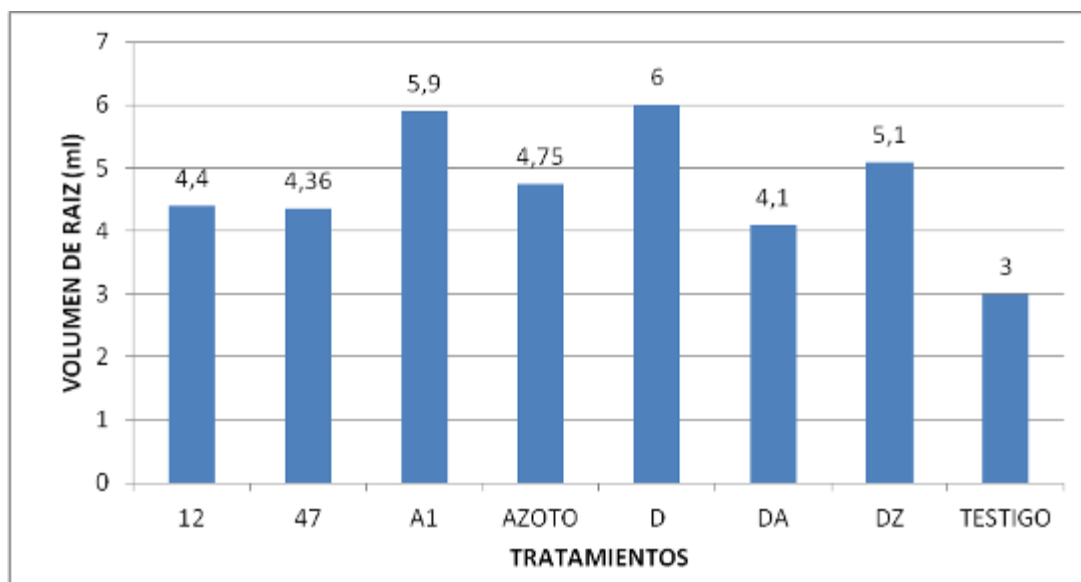


Figura 21: Volumen de raíz según el tratamiento.

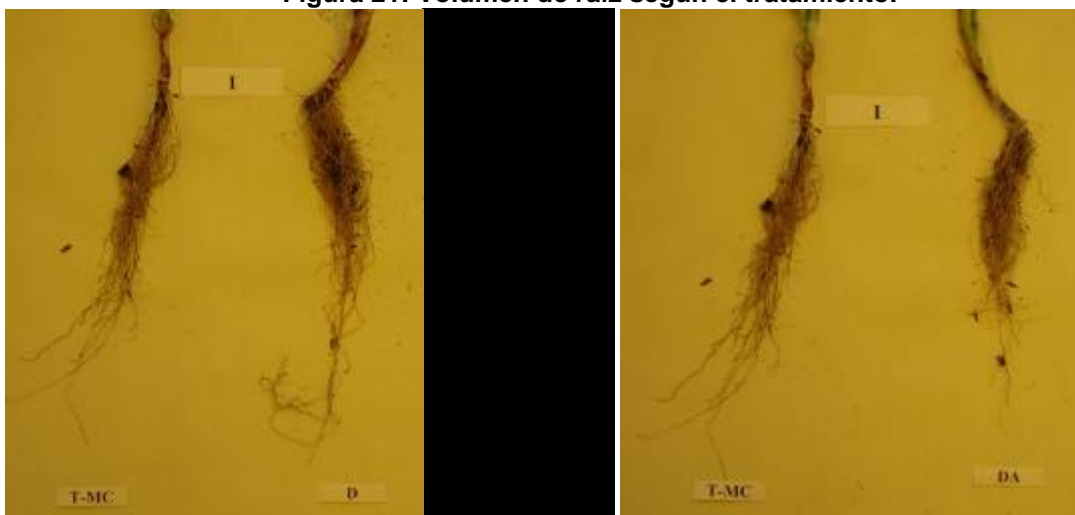


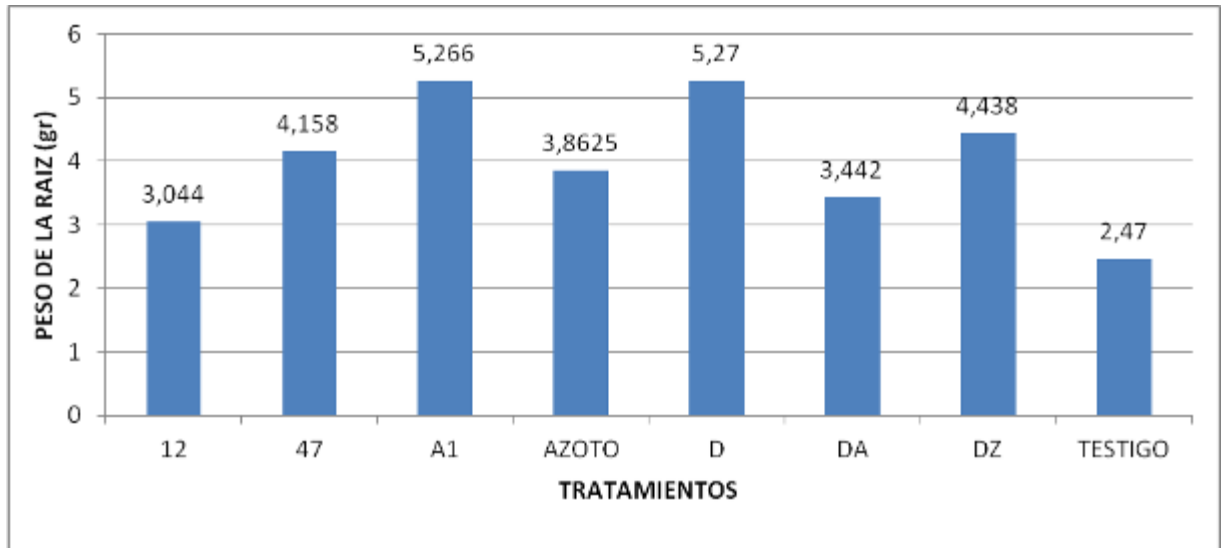
Figura 21 bis: Comparación del volumen de raíces entre “T-MC” y los trat. “D”, “DA”.  
 📏 Peso raíz

Para la variable “peso de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 8), no muestra diferencias significativas entre las variables bajo estudio (Pr= 0.3017).

**Cuadro 8: Análisis de varianza para la variable “peso raíz”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Trt	7	35,060382	5,008626	1,26	0,3017
Residual	31	123,2281	3,9751		

Aunque todos los tratamientos tuvieron un efecto superior al testigo, los tratamientos “A1”, “D” y “DZ” tienen mayor efecto que los otros bioinsumos (fig. 22)



**Figura 22: Peso de la raíz según el tratamiento aplicado.**

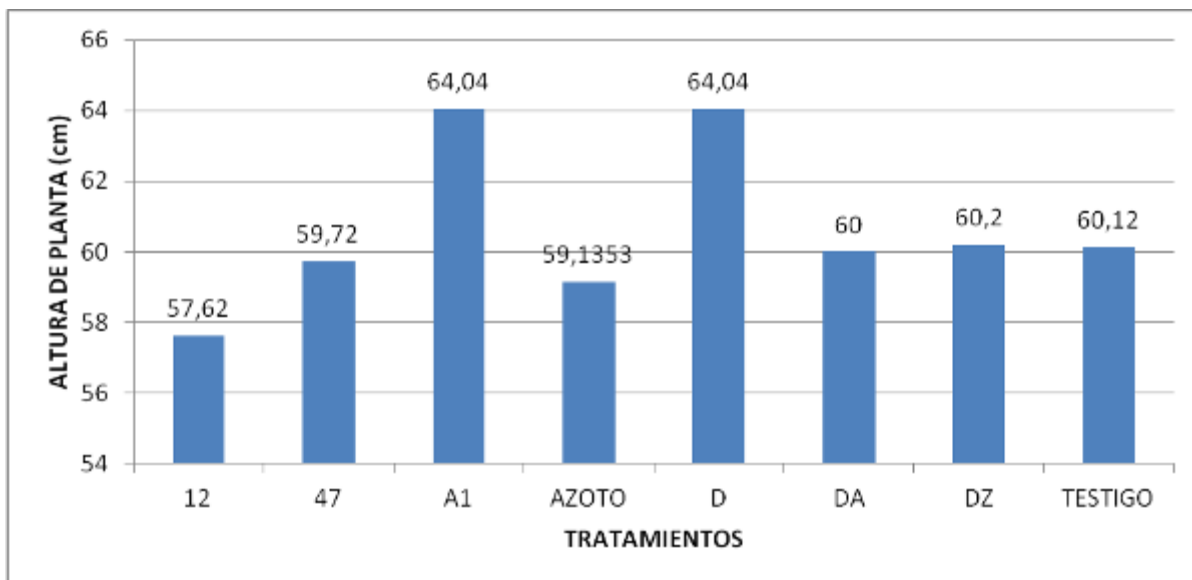
✚ **Altura planta**

Para la variable “altura de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 9), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.2459$ ). O sea cada tratamiento tiene un efecto similar.

**Cuadro 9: Análisis de varianza para la variable “altura planta”**

Fuentes de variacion	Grados de libertad	Suma de cudrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4				
Tratamientos	7	26,9		1,4	0,2459
Residual	26,9				
CV%	7,0236				
Media	60,6743				

Se puede observar, comparando las medias obtenidas, que los tratamientos “D”, “A1” tienen mejores repuestas en el desarrollo de la “altura de planta”. (fig. 23) A notar que los tratamientos “Azoto” y “12” tienen un efecto menor sobre el desarrollo de la planta.



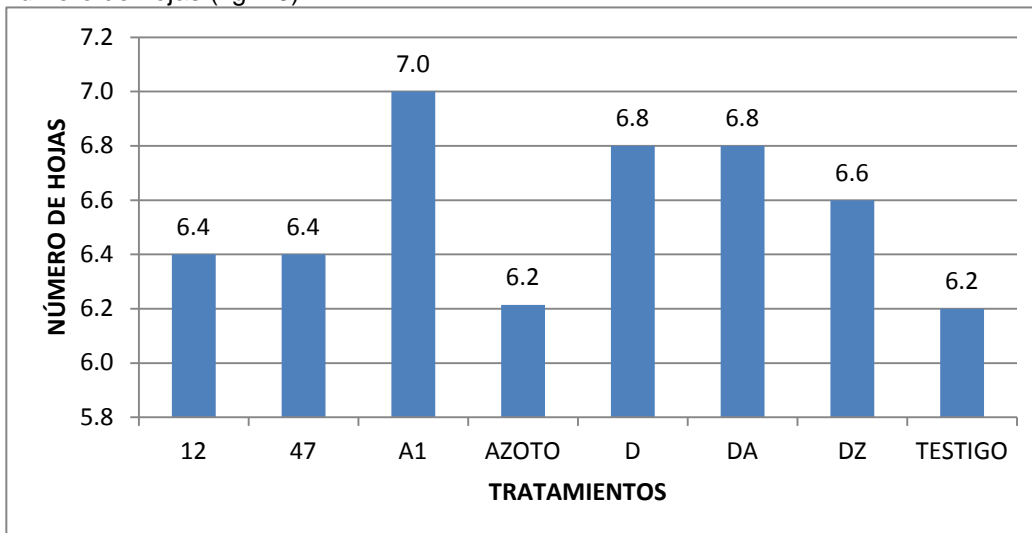
**Figura 22: Altura de planta según el tratamiento aplicado**  
 🌱 **Número de hojas**

Para la variable “numero de hojas”, tampoco, se observaron (Cuadro 10), diferencias significativas entre las variables bajo estudio ( $Pr = 0.74553$ ). O sea cada tratamiento tiene un efecto similar.

**Cuadro 10: Análisis de varianza para la variable “numero de hojas”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,1776	0,0444		
Tratamiento	7	2,945873	0,420839	0,61	0,7453
Residual	27	18,6273	0,6899		
CV%	12,63680				
Media	5,5641				

Sin embargo, los tratamientos “D” y “A1” permiten el desarrollo del mayor número de hojas en comparación, al testigo. Sin embargo la aplicación de “Azoto” permite el desarrollo del menor número de hojas (fig. 23)





**Figura 23: Número de hojas según el tratamiento aplicado.**

### 1.3. Conclusión del ensayo de cebolla

- Las variables siguientes tiene un efecto significativo, “peso de planta”, longitud de bulbo”, “diámetro de bulbo”, “diámetro de cuello.”
- El efecto superior, o mejor dicho, el tratamiento que tiene los mayores efectos es el tratamiento “D” ya que tiene los mayores efectos con las variables “peso de planta”, “peso de bulbo”, “diámetro de bulbo”, “diámetro de cuello”, “volumen de raíces”, “peso de raíces” y “numero de hojas”.
- El tratamiento “A1” tiene efectos relevantes también. En efecto, sus efectos son los segundos mayores, atrás de “D” con los parámetros siguientes: “peso de planta”, “peso de bulbo”, “diámetro de bulbo”, “volumen de raíces”, “peso de raíces”, “altura planta” , y tiene los mayores efectos con el “diámetro de cuello”, y “numero de hojas”.
- Se nota que el tratamiento « 47 » tuvo un efecto sobre la “longitud de raíz”
- Azoto tiene un efecto inferior sobre de varias variables, sobre peso de bulbo”, diámetro de bulbo”, diámetro de cuello”, “altura de planta” y “numero de hojas”.

### Ensayo de cebada

El azoto muestra un efecto menor que los otros bioinsumos sobre el desarrollo de plantas a través del tiempo. (graf. 3)

#### 2.1 Evaluación final

##### **Peso de la planta**

Para la variable “peso de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 11), muestra diferencias significativas entre los tratamientos bajo estudio (Pr= 0.038).

**Cuadro 11: Análisis de varianza para la variable “peso de planta”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,928	0,232		
Tratamiento	7	12,675432	1,810776	2,64	0,038
Residual	22,3	15,29557	0,6859		
CV%	12,0025				
Media	48,587				

Donde la aplicación de todos los tratamientos muestra un efecto superior sobre el peso de la planta con excepción del “DZ”. (Fig. 24)

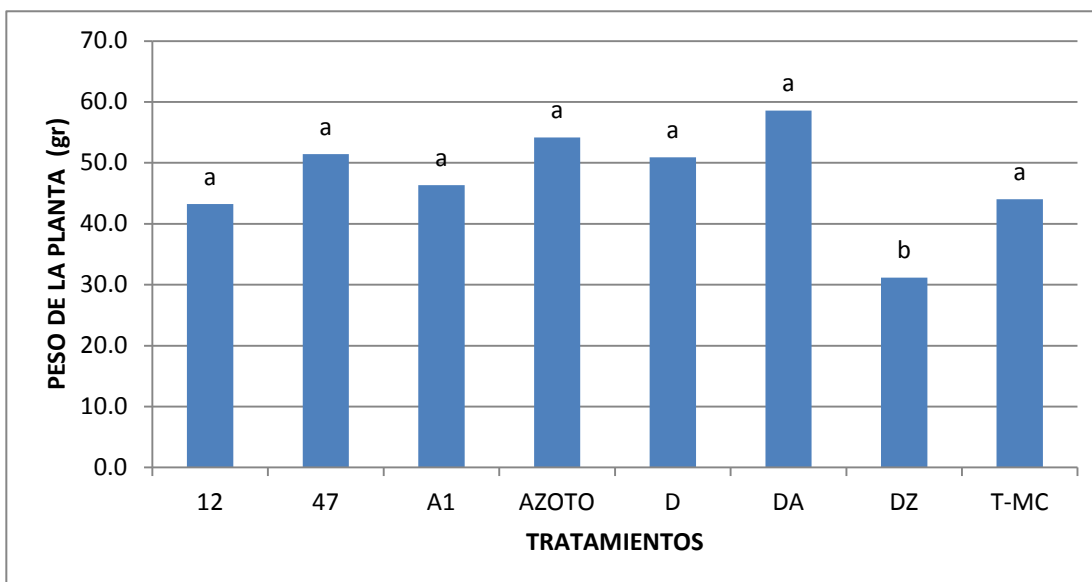


Figura 24: Peso de planta según el tratamiento aplicado.

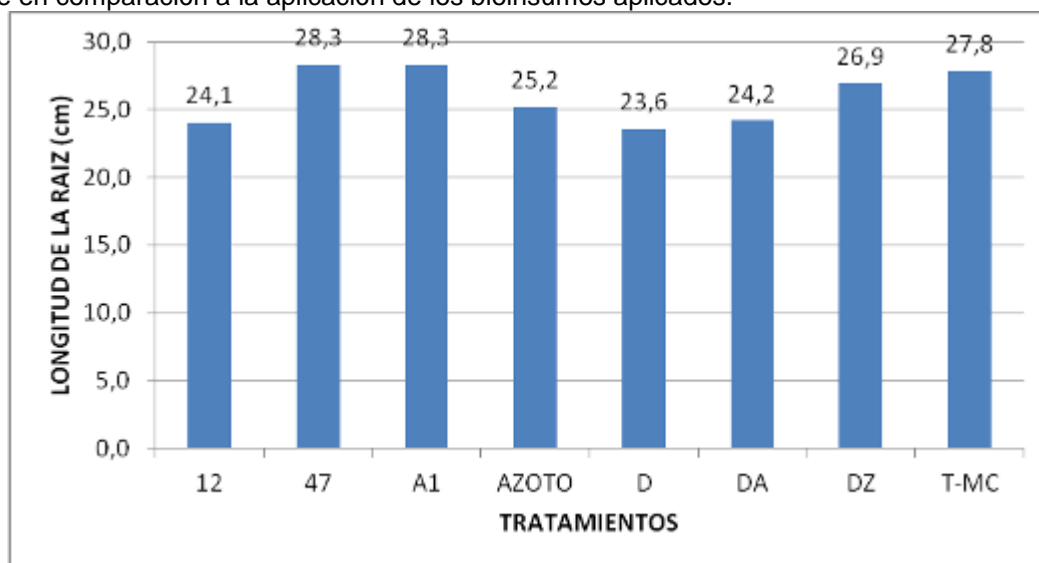
✚ Longitud de raíz

Para la variable “peso de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 12), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.805$ ).

**Cuadro 12: Análisis de varianza para la variable “longitud de raíz”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	20,7816	5,1954		
Tratamientos	7	117,711622	16,815946	0,53	0,805
Residual	22,7	720,23014	31,7282		
CV%	21,8435				
Media	25,8617				

Aunque el testigo muestra desarrollo superior de la longitud radicular (Fig. 25) la misma no fue diferente en comparación a la aplicación de los bioinsumos aplicados.



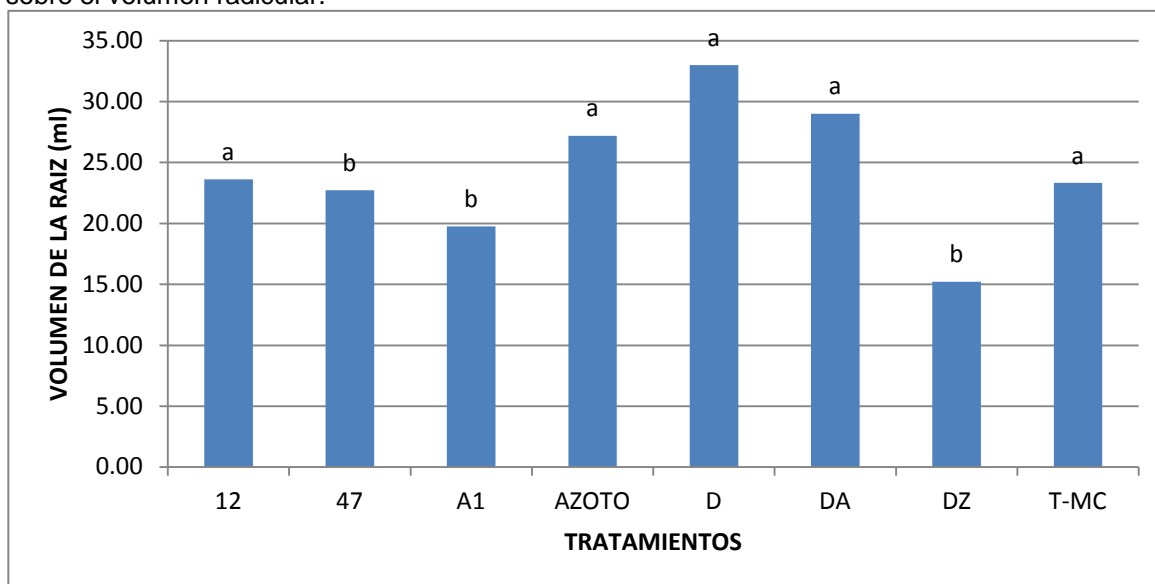
**Figura 25: longitud de raíz según el tratamiento aplicado**  
**Volumen de raíz**

Para la variable “volumen de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 13), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.0317).

**Cuadro 13: Análisis de varianza para la variable “volumen de raíz”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloques	4	9,5172	2,3793		
Tratamientos	7	945,0686	135,0098	2,77	0,0317
Residual	21,9	1067,406	48,74		
CV%	27,9174				
Media	24,7352				

Donde los tratamientos “D”, “DA”, “AZOTO” y el “12”, desarrollaron mayor volumen radicular. (Fig. 26) al igual que el testigo. Así mismo, los tratamientos “47”, “DZ” y “A1” tuvieron efecto inferior sobre el volumen radicular.



**Figura 26: volumen de raíz según el tratamiento aplicado.**



**Figura 26 bis : Comparación de los volúmenes de raíces.**

**✚ Peso de raíz**

Para la variable “peso de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 14), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.2904).

**Cuadro 14: Análisis de varianza para la variable “peso de raíz”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Tratamientos	7	9,27108	1,32444	1,3	0,2904
Residual	25	25,47	1,0188		
CV%	21,4503				
Media	23,0043				

Donde los tratamientos “12”, “47”, “DA”, “AZOTO”, “D” muestran un mayor desarrollo del peso radicular. (Fig. 27)

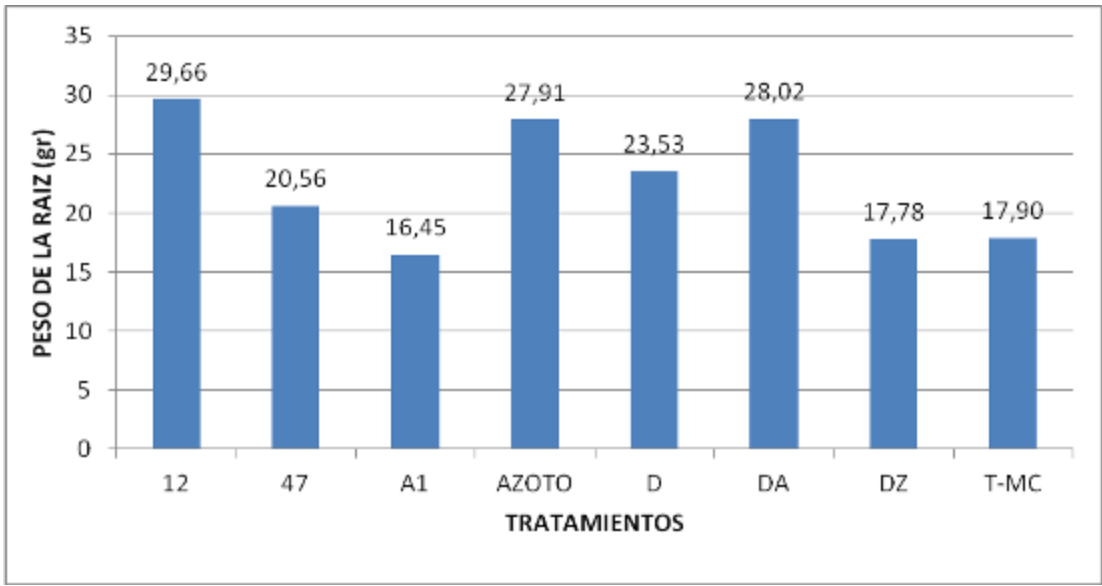


Figura 27: peso de raíz según el tratamiento aplicado

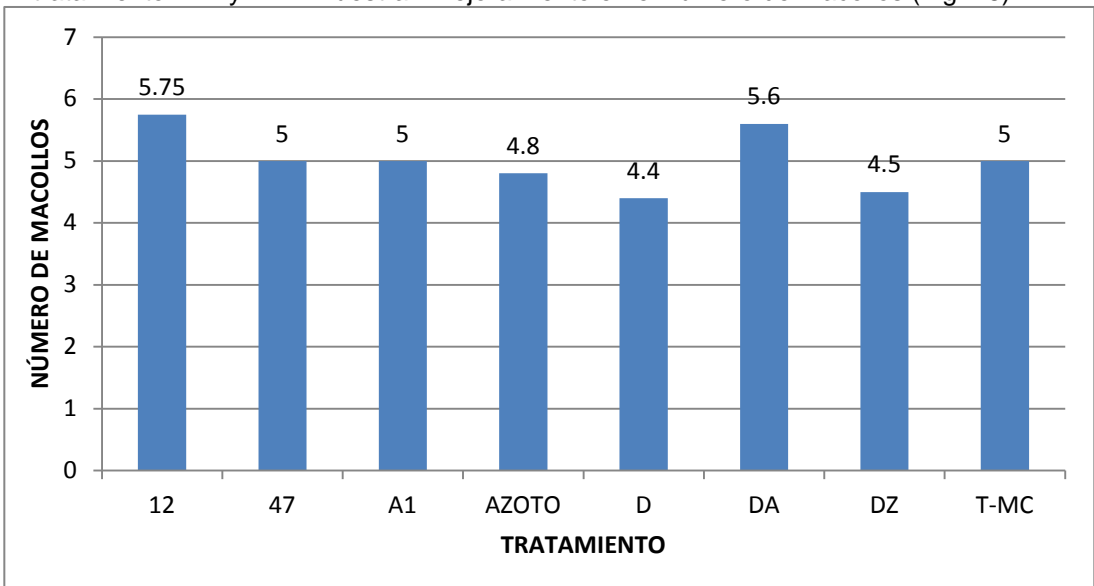
✚ Número de macollos

Para la variable “numero de macollos”, el análisis de varianza (Cuadro 15), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.912).

**Cuadro 15: Análisis de varianza para la variable “número de macollos”.**

Fuentes de variacion	Grados de libertad	Suma de cudrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0	0		
Tratamientos	7	7,067592	1,009656	0,37	0,912
Residual	26	70,9488	2,7288		
CV%	15,8143				
Media	5				

El tratamiento “12” y “DA” muestran mejoramiento en el numero de macollos (Fig. 28)



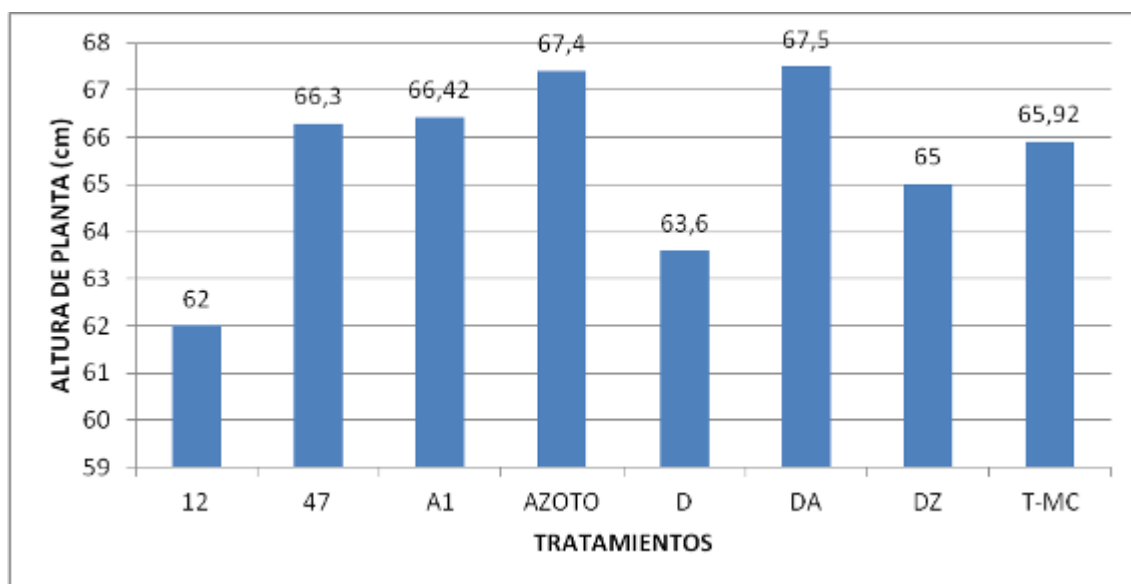
**Figura 28: Número de macollos según el tratamiento aplicado.**  
 ✚ **Altura planta**

Para la variable “altura de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 16), no muestra diferencias significativas entre la variable bajo estudio ( $Pr = 0.6309$ ).

**Cuadro 16: Análisis de varianza para la variable “altura de planta”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F	
Bloque	4	0	0			
Tratamientos	7	126,632625	18,090375	0,75	0,6309	Donde los tratamientos “47”, “A1”, “AZOTO” y el “DA”,
Residual	32	771,856	24,1205			desarrollaron mayor altura de planta (Fig.29) al igual que el testigo. Así mismo, los tratamientos “12”, “DZ” y “D” tuvieron efecto inferior sobre la altura de planta.

desarrollaron mayor altura de planta (Fig.29) al igual que el testigo. Así mismo, los tratamientos “12”, “DZ” y “D” tuvieron efecto inferior sobre la altura de planta.



**Figura 29: Altura de planta según el tratamiento aplicado.**

### 2.3 Conclusión del ensayo de cebada

- Dos variables tienen resultados significativos, el “peso de planta” y “el volumen de raíces”
- El tratamiento “DA” tiene efectos mayores con la variable “peso de planta”, “peso de raíces”, “numero de macollos y “altura de planta”.
- El tratamiento “12” tiene efectos mayores casi similar al tratamiento “DA” con las variables “peso de raíces”, “numero de macollos”.
- El tratamiento “DZ” tiene efecto menores sobre el “peso de planta” y el “volumen de raíces”.

**Ensayo de quinua**  
**3.1 Evaluación final**

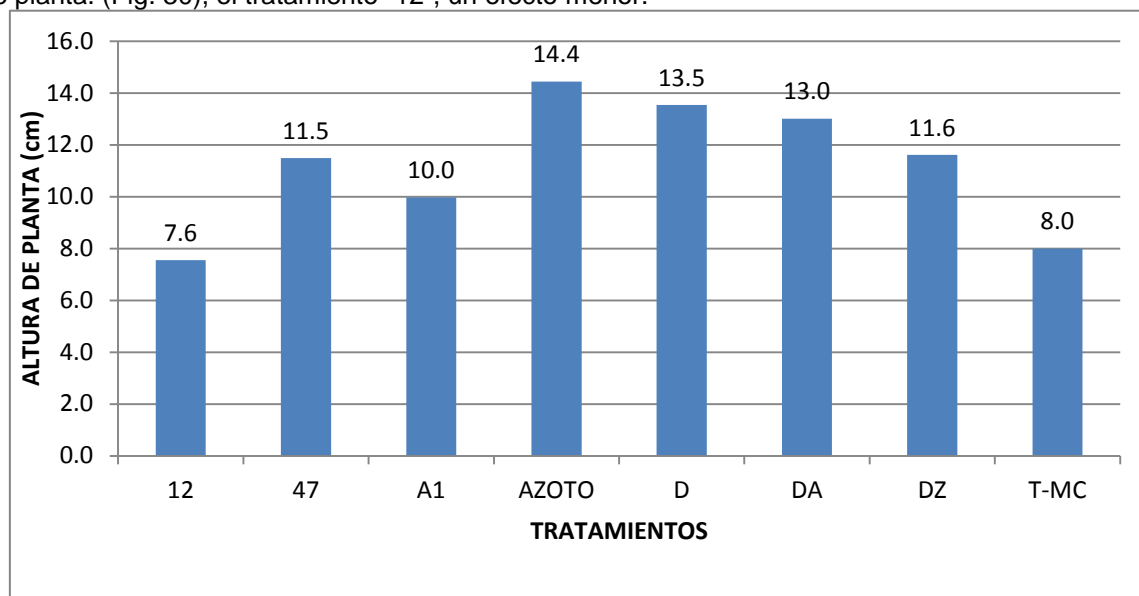
**✚ Peso planta**

Para la variable “peso de planta”, el análisis de varianza (Cuadro 1), muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.038).

**Cuadro 17: Análisis de varianza para la variable “peso de planta”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,5508	0,1377		
Tratamiento	7	5,576592	0,796656	1,12	0,3857
Residual	23,1	16,43103	0,7113		
CV%	26,1769				
Media	11,26,80				

Se observa que los tratamientos “47”, “Azoto”, “D”, “DA” y “DZ” tienen un efecto mayor sobre el peso de planta. (Fig. 30), el tratamiento “12”, un efecto menor.



**Figura 30: Peso de planta según el tratamiento aplicado.**

**✚ Peso raíz**

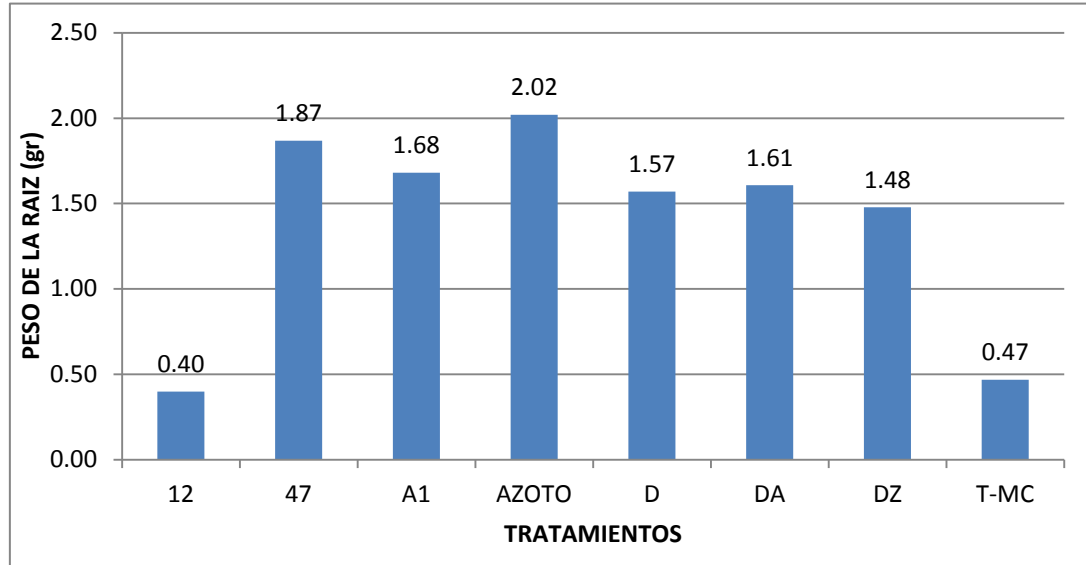
Para la variable “peso de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 18), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.2969).

**Cuadro 18: Análisis de varianza para la variable “peso de raíz”.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,31948	0,07987		
Tratamiento	7	1,99563	0,28509	1,29	0,2969
Residual	23,4	5,1714	0,221		
CV%	44,8284				

Media 1,3877

Donde la aplicación de todos los tratamientos muestra un efecto superior sobre el peso de raíces con excepción del "12". (Fig. 31) El tratamiento "Azoto" tiene el mayor efecto.



**Figura 31: peso de raíz según el tratamiento aplicado**  
**Volumen raíces**

Para la variable "peso de bulbo", el análisis de varianza (Cuadro 19), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio (Pr= 0.7706).

**Cuadro 19: Análisis de varianza para la variable "volumen de raíces"**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,15632	0,03908		
TRT	7	0,92967	0,13281	0,57	0,7706
Residual	23,6	5,4988	0,233		
CV%	42,2579				
Media	1,5457				

Se puede observar mejoramiento con todos los tratamientos, (Fig.32) y es el tratamiento "Azoto" que tiene el mayor efecto sobre el desarrollo de las raíces.



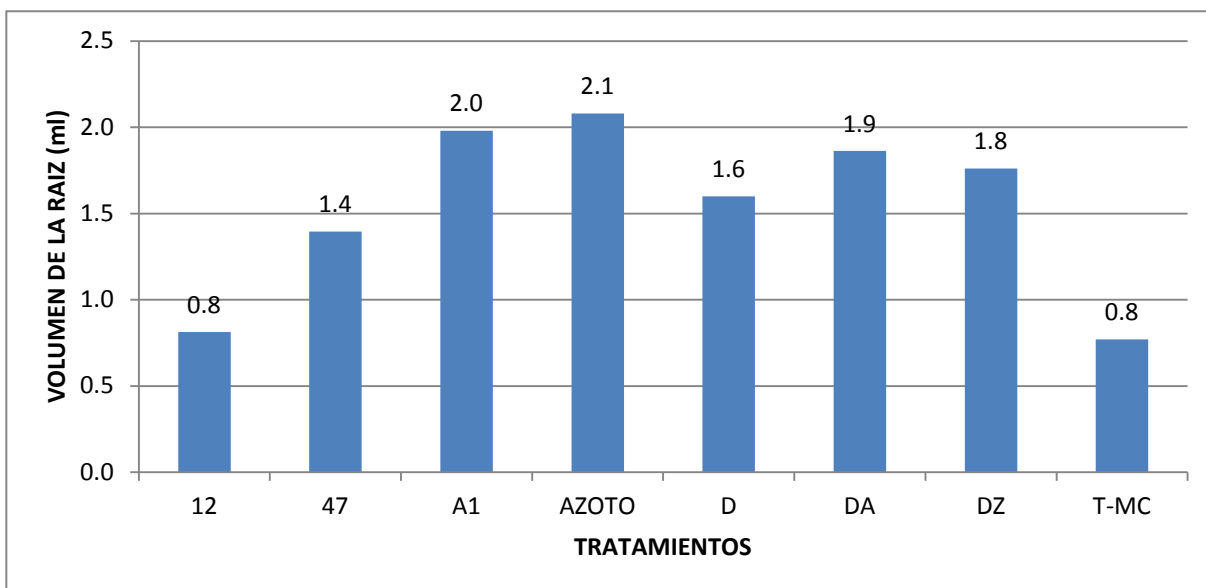


Figura 32: volumen de raíz según el tratamiento aplicado.

#### ✚ Longitud raíz

Para la variable “longitud de raíz”, el análisis de varianza (Cuadro 20), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr= 0.2871$ ).

#### **Cuadro 20: Análisis de varianza para la variable “longitud de raíces”**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	0,22496	0,05624		
Tratamiento	7	12,319895	1,759985	1,31	0,2871
Residual	23,7	31,84095	1,3435		
CV%	23,3568				
Media	26,0714				

Se puede observar que solo el tratamiento “D” permite mejorar la variable “longitud de raíz” (Fig. 33) El efecto menor se ve con el tratamiento “12”.

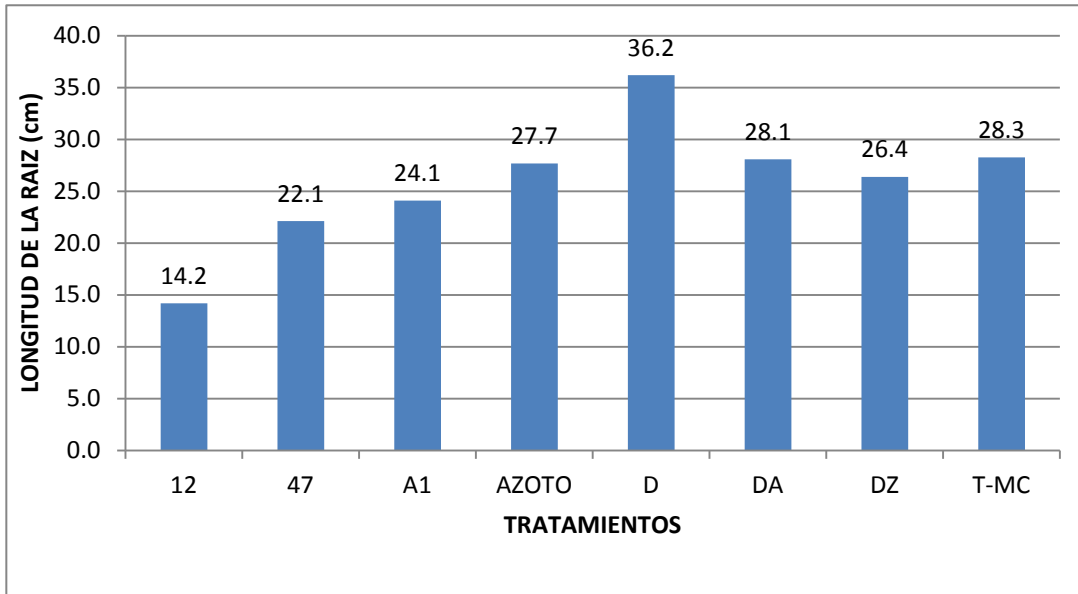


Figura 33: Longitud de raíz según el tratamiento aplicado.



Figura 33 bis. Comparación "T" y "D".

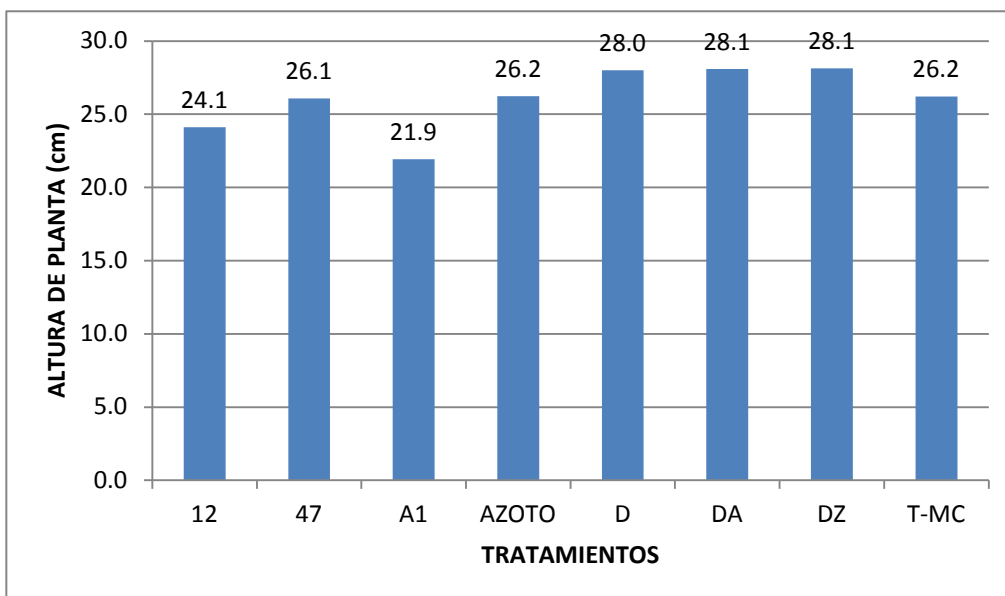
✚ **Altura planta**

Para la variable "altura de planta", el análisis de varianza (Cuadro 21), no muestra diferencias significativas con la variable bajo estudio ( $Pr = 0.3347$ ).

**Cuadro 21: Análisis de varianza para la variable "altura de planta"**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Bloque	4	11,7776	2,9444		
Tratamientos	7	152,83268	21,83324	1,21	0,3347
Residual	23,6	425,8384	18,044		
CV	16,3759				
Media	25,9971				

Los tratamientos "12" y "A1" tienen efectos menores para el desarrollo de la planta. Se observa que los tratamientos "D", "DA" y "DZ" tienen los mayores efectos por la altura de planta. (Fig. 34)



**Figura 34: altura de planta según el tratamiento aplicado**

### 3.3 Conclusión del ensayo de quinua

- Ningún variable tiene efectos significativos.
- Sin embargo, se observa que el “Azoto” tiene efectos mayores con el peso de la planta” y el “peso de raíces”; el tratamiento “D” mejora de manera relevante la longitud de raíz.

### Conclusión

Los efectos observados varían según la familia de planta, algunos bioinsumos tienen efectos mayores con una planta y efectos menores con otra (ejemplo del bioinsumo “Azotolam”).

### Bibliografía

- Ferrera-Cerrato R, González-Chávez MC, Rodríguez-Mendoza MN (1993) *Manual de Agromicrobiología*. Trillas. México. 142 pp.
- C. Gamazo, I. López-Goñi, R. Díaz, 2005. *Manual práctico de Microbiología*. 3ª edición. Editorial MASSON S.A. Barcelona, España.
- Mayz-Figueroa. *Fijación biológica de nitrógeno*, 2004. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 1-20.
- María Pereyra Cardozo, *Asimilación del nitrógeno en plantas*, 2001, *Facultad de Agronomía, Universidad de La Pampa* (disponible: <http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/16Asimilaci.pdf>)

### Efecto de seis cepas de Rhizobium en tres variedades de arveja

**Responsable:** Juan José Calisaya, Mayra Claros y Noel Ortuño

#### Compendio.

Con el objetivo de determinar el efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, se inocularon 7 aislados de rhizobium en el cultivo de la arveja. Los resultados muestran que la inoculación favoreció la formación de nódulos las mismas que tienden a desarrollarse casi en toda la raíz en comparación a los testigos que solo formaron nódulos en la parte intermedia y apical. Así mismo, la formación de nódulos favoreció el desarrollo de la planta aunque este efecto vario entre las variedades, Sin embargo, las cepas y1cd, criolla1b y criolla son las bacterias que se comportaron de forma similar entre las tres variedades. Por lo que estas bacterias podrían utilizarse como promotores de crecimiento en el cultivo de la arveja.

**Palabras Claves.** Rhizobium, Fijadoras de nitrógeno, Promotores de crecimiento

#### 1. Objetivo.

- Determinar el efecto de 7 cepas de rhizobium en tres variedades de arveja.

## 2. Hipótesis.

- Los aislados de rhizobium tienen el mismo efecto sobre las variedades.

## 3. Revisión bibliográfica.

La arveja es un cultivo ampliamente distribuido, por que las vainas verdes o las semillas secas son ricas en proteína y vitaminas. La arveja al igual que otras leguminosas es capaz de fijar y utilizar el nitrógeno atmosférico a través de la relación simbiótica con la bacteria Rhizobium. El cultivo así mejora el suelo, economiza la producción reduciendo el requerimiento y la adición de fertilizantes nitrogenados. Muchos investigadores han reportado los efectos benéficos de la inoculación con rhizobium (Rahman *et al.*, 1994; Solaiman, 1999). Así, Feng *et al.*, (1997) reportaron un incremento en el rendimiento de vainas por la inoculación con Rhizobium en la arveja. Así mismo, un incremento de 18% en el rendimiento de semillas fue observado con la inoculación de rhizobium (Tolkachev *et al.*, 1994). Por otra parte, Ahmed *et al.*, (2007) observaron mayor número de vainas. Resultados similares fueron reportados por Solaiman (1999) en garbanzo. Evans *et al.* (1993), Feng *et al.* (1997) en arveja.

Así mismo, Ahmed *et al.*, (2007) reportaron diferencias para longitud de vaina con la aplicación de Rhizobium en comparación a plantas no inoculadas. Resultados similares fueron reportados por Rabbani *et al.* (2005). Ahmed *et al.*, (2007) observaron también diferencias significativas para número de semillas por vaina los cuales fueron superiores a las plantas no inoculadas. Resultados similares fueron reportados por Rahman *et al.* (1994) en chickpea. Solaiman and Rabbani (2005) en arveja. Ahmed *et al.*, (2007) también reportaron diferencias para peso de 1000 semillas en arveja, Resultados similares fueron observados por Rabbani *et al.* (2005) en arveja.

Por otra parte, Erman *et al.* (2009), observaron diferencias para altura de planta número de tallos, número de nódulos, materia seca raíz y numero de vainas con la inoculación de rhizobium. Resultados similares fueron reportados por Jha y Singh (1996) e Idris y Sandhu (1981). Asi mismo, en otros estudios, He *et al.*, (2011), Santalla (2001); Giller (2001) y Fall *et al.*, (2003) observaron diferencias en la interacción entre Rhizobium y los cultivares. Por lo que la eficiencia de la fijación simbiótica depende del cultivar y el Rhizobium. Sin embargo, en el suelo se encuentran poblaciones silvestres de Rhizobium que compiten con las cepas inoculadas y las indígenas por nutrientes o por espacio (Li and Zhou 2002). Esto significa que las cepas introducidas tienen que competir con las silvestres. Aunque, la eficiencia de la fijación de nitrógeno y la habilidad de competir de una entrada no están necesariamente correlacionados (Romdhane, 2007).

## 4. Materiales y métodos.

### **Ubicación del ensayo.**

El ensayo se llevo a cado en los invernaderos de la FUNDACION PROINPA ubicada en la zona de El Paso.

### **Materiales de laboratorio.**

- 7 aislados de rhizobium.
- Placas Petri.
- Tubos epemdorf
- Micropipeta.
- Microscopio.
- Placa Newver.
- Camara de Flujo
- Bisturi

### **Materiales de campo.**

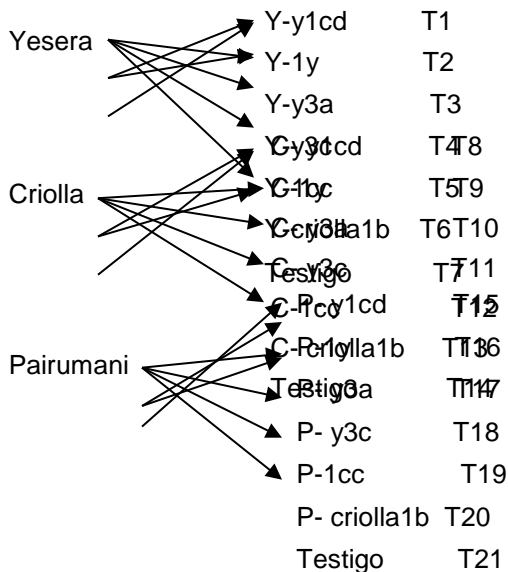
- Semilla de 3 variedades de arveja.
- Macetas de 2Kgr de capacidad.
- Suelo esterilizado.

- Fertilizante.
- Metro.

### Metodología.

#### Tratamientos.

Los tratamientos resultaron de la combinación de tres variedades de arveja con cada una de las cepas más un testigo, resultando un total de 21 tratamientos:



#### Diseño experimental.

Los 21 tratamientos fueron evaluados bajo el diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Donde la unidad experimental fue constituida por una maceta de 2 kilogramos de capacidad.

#### Procedimiento de laboratorio.

##### Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo LM se preparó 500 ml que contiene  $K_2HPO_4$  0,25 gr.,  $MgSO_4$  0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 500cc. Dividiéndolo en pequeños erlenmeyers de 50 ml para la multiplicación de cada aislado. Posteriormente el medio se autoclavo por 15 min. a 20 psi de presión.

##### Inoculación de rhizobium spp al medio LM

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyers. La duración de la prueba fue de 7 días y en el octavo día se hicieron las lecturas de la concentración de la cepa.

##### Conteo de conidios (Concentración)

Para el conteo de conidias se puso 1 ml del caldo de cultivo en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyó 1 a 2 veces más dependiendo de la concentración de la solución para luego observar en el hematocímetro para el conteo respectivo. Para el montaje de la suspensión se tomó 10 ml con una micropipeta colocando 5ml en cada ranura de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la

lectura en las dos cámaras, en los cuadrados más pequeños de  $0.0025 \text{ mm}^2$  cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\# \text{de conidias/ml} = \text{Suma de los 5C.S.} \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

### Procedimiento de campo.

El ensayo se realizó en macetas de 2 kilos de capacidad para lo cual se utilizó sustrato esterilizado con vapor de agua. La siembra se realizó colocando 4 semillas en la parte central de cada maceta; sin embargo, una semana después solo se dejó 2 plantas/maceta. La inoculación se realizó una semana después de la emergencia depositando 0,5 ml de rhizobium de los tubos eppendorf en el cuello de las 2 plantas (Figura 1).



**Figura 1. Inoculación de las plantas con bacteria fijadoras de nitrógeno.**

### Variables de respuesta.

Las variables de respuesta se evaluaron en el momento de la cosecha:

- **Altura de planta.** La cual se evaluó como la distancia en centímetros desde el cuello de la planta hasta el ápice vegetativo.



**Figura 2. Altura de planta de planta de arvejas inoculadas con rhizobium.**

- **Número de vainas.**
- **Número de nódulos/planta.** Número de nódulos se evaluó bajo una escala donde: **baja**= menos de 15 nódulos, **media**= entre 15-50 nódulos y **alta**=mayor a 50 nódulos desarrollados encada una de las plantas
- **Longitud de la raíz.** Esta variable se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice de la raíz.
- **Peso de la planta.** La cual se evaluó tomando el peso de la parte foliar de la planta.
- **Peso de la raíz.** La misma que se evaluó tomando el peso de la raíz.
- **Color de los nódulos.** Para la cual se observo la coloración de los nódulos.
- **Forma de los nódulos.** Para la cual se observo la forma de los nódulos en la planta.

#### **Análisis Estadístico.**

Los datos de las variables altura de planta, número de vainas, longitud de la raíz y peso de la raíz fueron evaluados bajo la distribución normal, previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el PROC MIXED del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{j(i)} + \gamma_k + \delta_{jk} + \varepsilon_{jk(i)}$$

Donde :

$i = 1,2,3,4$  bloques.

$j = 1,2,3$  variedades.

$k = 1,2,3,4,5,6,7,8$  cepas de Rhizobium

$y_{ijk}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  - esimo bloque donde se aplico la  $k$  - esima cepa de rizhobium a la  $j$ - esima variedad.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  - esimo bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo de la  $j$  - esima variedad de arveja.

$\gamma_k$  = Efecto fijo de la  $k$  - esima cepa de rizhobium.

$\delta_{jk}$  = Efecto fijo de la interaccion de la  $j$  - esima variedad y la  $k$  - esima cepa de rizhobium.

$\varepsilon_{jk(i)}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_e^2)$ .

Las variables cantidad, color, forma y posición de los nódulos fueron evaluados bajo los modelos multinomiales con el PROC CATMOD del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico.

$$\log \frac{\pi_{ijk}}{\pi_{ijc}} = \eta_k + \alpha_{ik} + \beta_{jk} + \gamma_{ijk}$$

$i = 1,2,3$  variedades

$j = 1,2,3,4,5,6,7,8$  cepas de Rhizobium

$k = 1,2,\dots, c$  categorías de respuesta

$\pi_{ij}$  = Probabilidad de que un individuo sea clasificada en la  $k$ -ésima respuesta con la aplicación de la  $j$ -ésima cepa de Rhizobium en la  $i$ -ésima variedad.

$\eta_k$  = Media general de logit de la  $k$ -ésima categoría de respuesta.

$\alpha_{ij}$  = Efecto fijo de la  $i$ -ésima variedad de arveja sobre la  $k$ -ésima categoría de respuesta.

$\beta_{jk}$  = Efecto fijo de la  $j$ -ésima cepa sobre la  $k$ -ésima respuesta.

$\gamma_{ijk}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima variedad y la  $j$ -ésima cepa sobre la  $k$ -ésima respuesta

## 5. Resultados.

### Cantidad de nódulos.

Para la variable cantidad de nódulos se observaron diferencias entre los aislados de rhizobium (Figura 3). Donde los 7 aislados desarrollaron nódulos en mayor proporción (>40%). Por otra parte, el testigo también presentó formación de nódulos aunque estos fueron en una proporción media (0,7). Por lo que el uso de las bacterias de rhizobium puede incrementar el desarrollo de los nódulos.

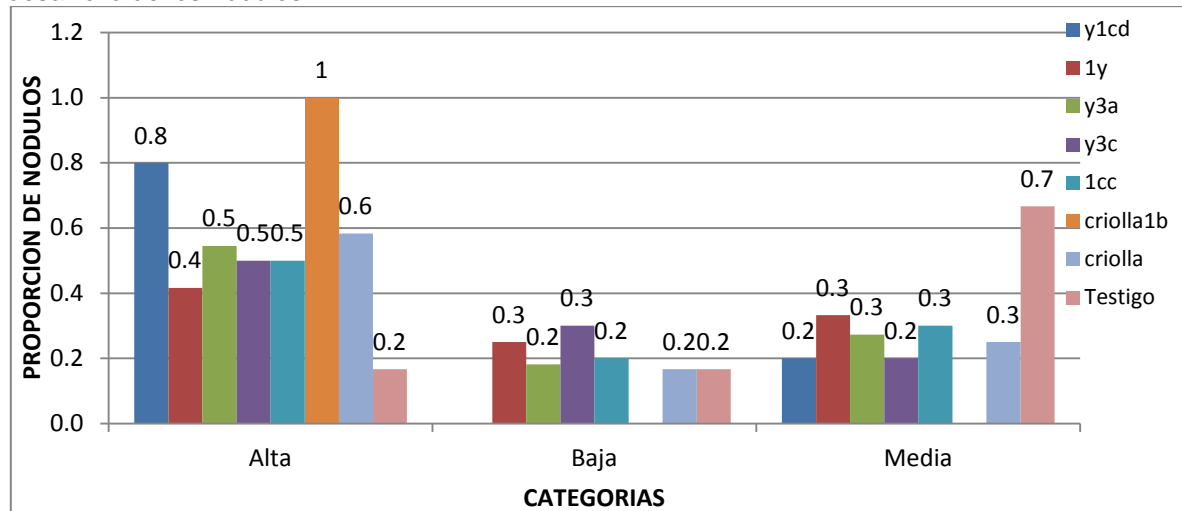


Figura 3. Formación de nódulos con la aplicación de 7 aislados de rhizobium.

### Ubicación de los nódulos.

Por otra parte, las bacterias **1cc**, **y1cd** desarrollaron mayor cantidad de nódulos en toda la raíz. **Criollo 1b** y **1y** desarrollaron mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia-apical. En cambio la bacteria **y3a** desarrollo mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia e intermedia-apical. La bacteria **criolla** desarrollo nódulos tanto en la parte basal, intermedia-apical y en toda la raíz. Por otra parte el testigo desarrollo nódulos en la parte intermedia apical (Figura 4, Figura 5). Aunque estos fueron en menor cantidad.





Figura 4. Formación de nódulos con siete aislados de rhizobium.

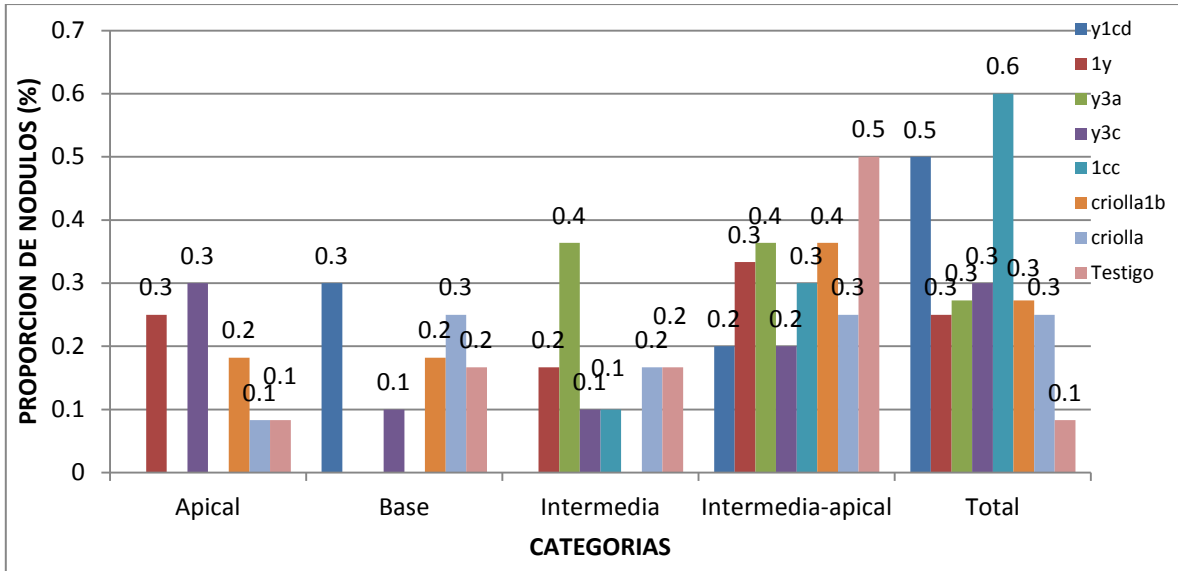


Figura 5. Ubicación de la formación de nódulos.

**Forma de los nódulos.**

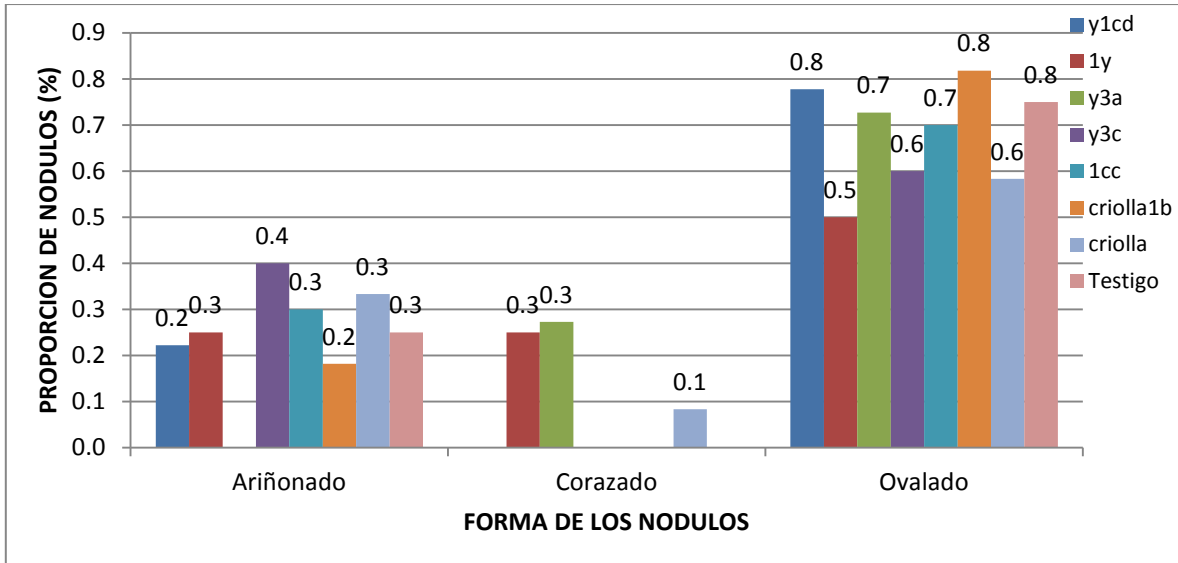
Por otra parte, se observó con mayor frecuencia nódulos de forma ovalada tanto en los aislados de rhizobium como en el testigo (Figura 5). Aunque los aislados **y1cd**, **1y**, **y3c**, **1cc**, **criolla1b**, **criolla** y el **testigo** desarrollaron nódulos de forma arriñonada (Figura 6). Sin embargo, Las bacterias **1y**, **y3a** y **criolla** también formaron nódulos de forma acorazado (Figura 7).



Figura 5. Nódulos de forma ovalada.



Figura 6. Nódulos de forma arriñonada.



**Figura 7. Forma nodular de siete aislados de rhizobium.**

**Color de los nódulos.**

Por otro parte, se observó en mayor proporción nódulos de color beige (Figura 8b) y blanco verdusco, tanto en los 7 aislados de rhizobium como en el testigo, es posible que la coloración puede ser influenciada con la edad de la planta, se obscureciéndose cuando se aproxima la senectud de la planta o cuando fueron cosechadas cuando las vainas estaban secas. Sin embargo, en el mismo estado fenológico también se observaron nódulos de color blanco (Figura 8a) y rosado, lo cual indica que la formación de nódulos nuevos es continua. En los aislados **y3a** y en la **criolla**, también se observaron nódulos de color verde. (Figura 9).



a

b



Figura 8. Color de los nódulos a) Blanco, b) beige.

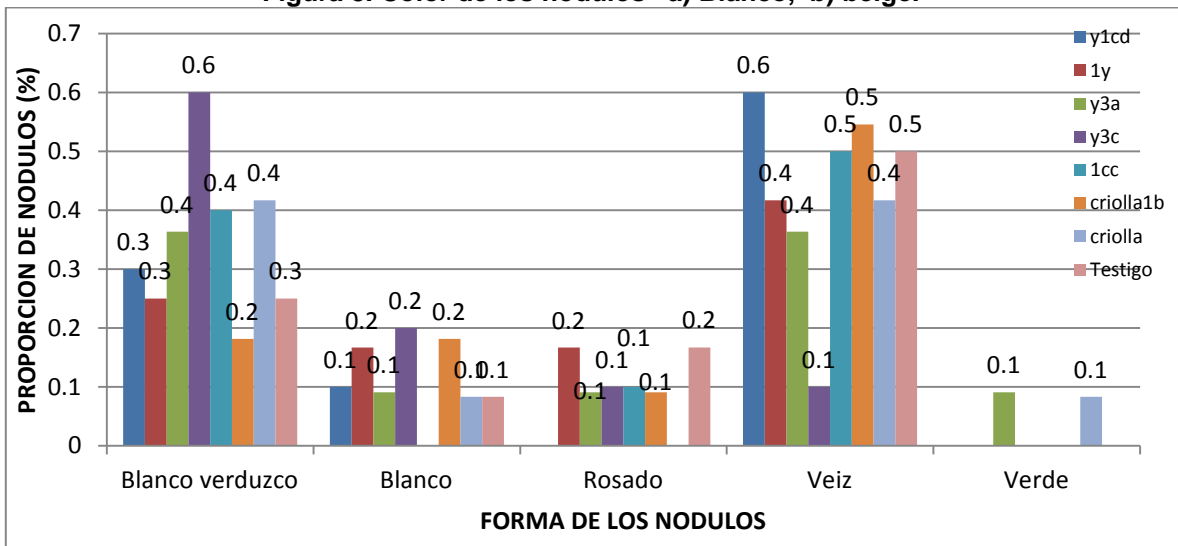


Figura 9. Color de los nódulos de 7 aislados de rhizobium.

### Variabes Agronómicas.

El cuadro de análisis de varianza muestra variación entre los bloques para todas las variables bajo estudio por lo que el diseño experimental fue apropiado (Cuadro 1).

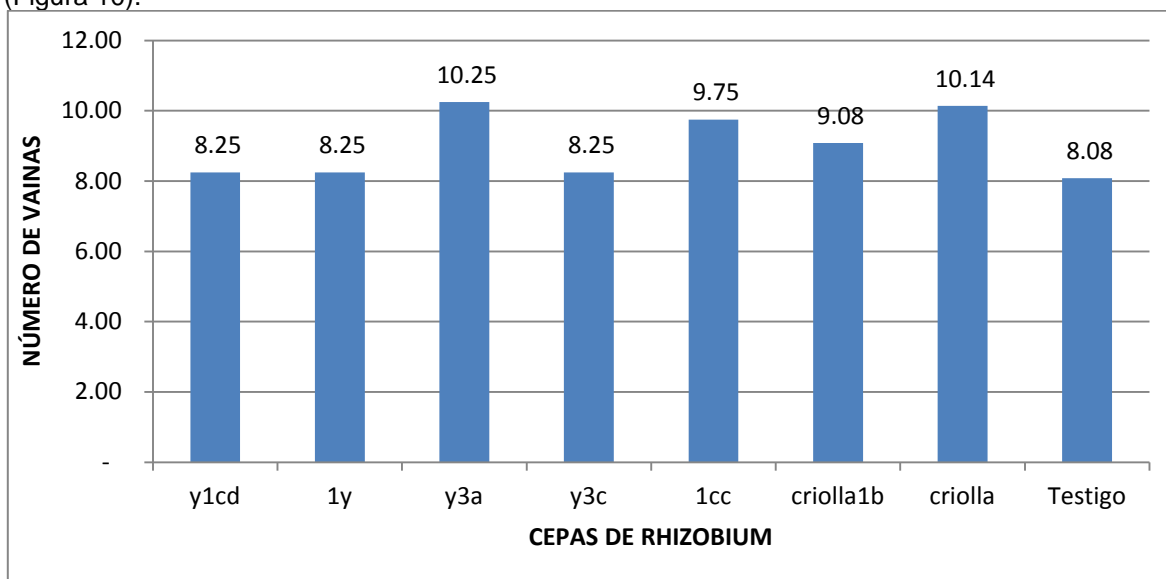
**Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza de 6 variables en el cultivo de la arveja.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Número de vainas	Altura de planta	Volumen de la raíz	Longitud de la vaina	Peso seco de la raíz	Peso seco foliar
Bloque	3	0,025	0,090	0,074	0,015	0,148	0,005
Variedades	2	1,252*	117,000**	6,872**	44,385**	330,550**	3,185**
Cepa	7	0,257	3,111	1,315	0,059	3,383	0,013
Variedad*Cepa	14	0,240	2,064	1,575*	0,223*	5,131**	0,084*
Residual	69	0,276	1,474	0,926	0,123	1,859	0,045
CV%		17,822	7,756	17,613	6,558	24,108	8,738
Media		9,010	249,250	31,096	5,348	5,566	11,849

\*,\*\* Significativo al 0,05 y 0,01 nivel de significancia.

### Vainas por planta.

Para la variable número de vainas no se estimaron diferencias entre los aislados ni entre la combinación de cepas\*variedades (Cuadro 1). Sin embargo, los 7 aislados de rhizobium favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de vainas en la planta en comparación al testigo (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de número de vainas.**

### Altura de planta.

Así mismo, no se estimaron diferencias entre las cepas y la interacción de cepas\*variedad para la variable altura de planta (Cuadro 1). Por lo que, la altura de planta fue similar con la aplicación de los aislados de rhizobium y el testigo (Figura 11). Aunque la altura de planta fue relativamente inferior al testigo con la inoculación de la bacteria **y1cd**, **1y**, **y3a** y **y3c**.

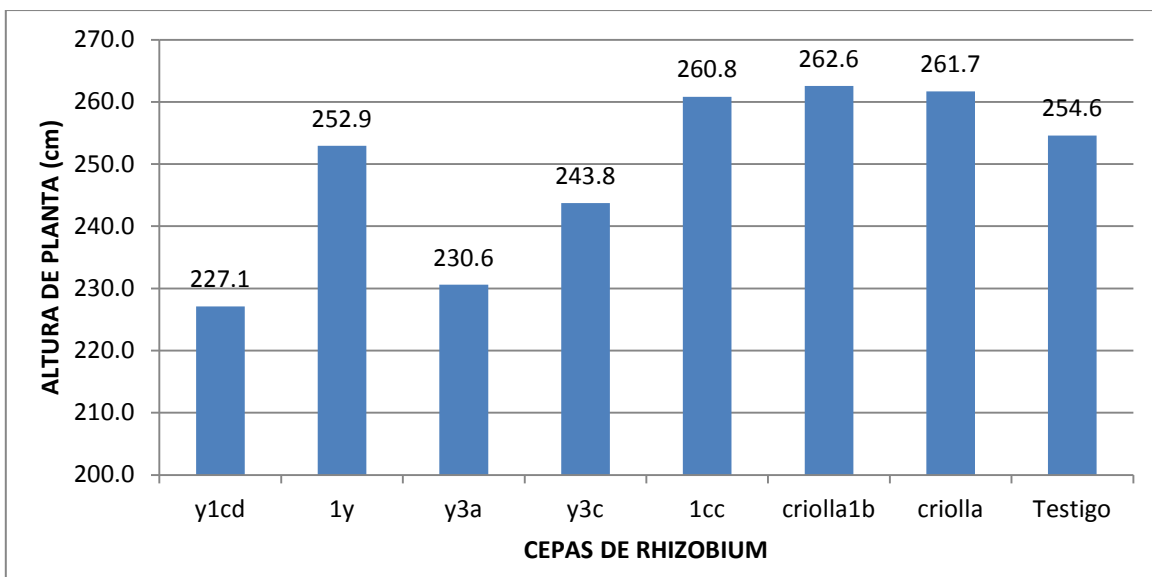


Figura 11. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de la altura de planta.

#### Volumen radicular.

Por otra parte, tampoco se estimaron diferencias entre los aislados de rhizobium para la variable volumen radicular (Cuadro 1). Sin embargo, las plantas a las que se inoculó rhizobium desarrollaron mayor volumen radicular en comparación al testigo (Figura 12).

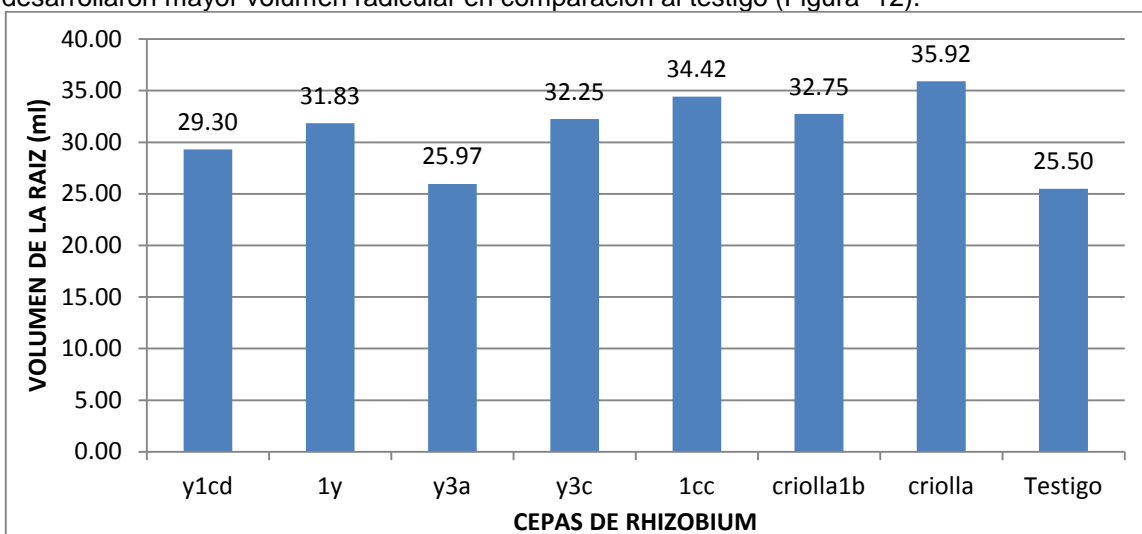
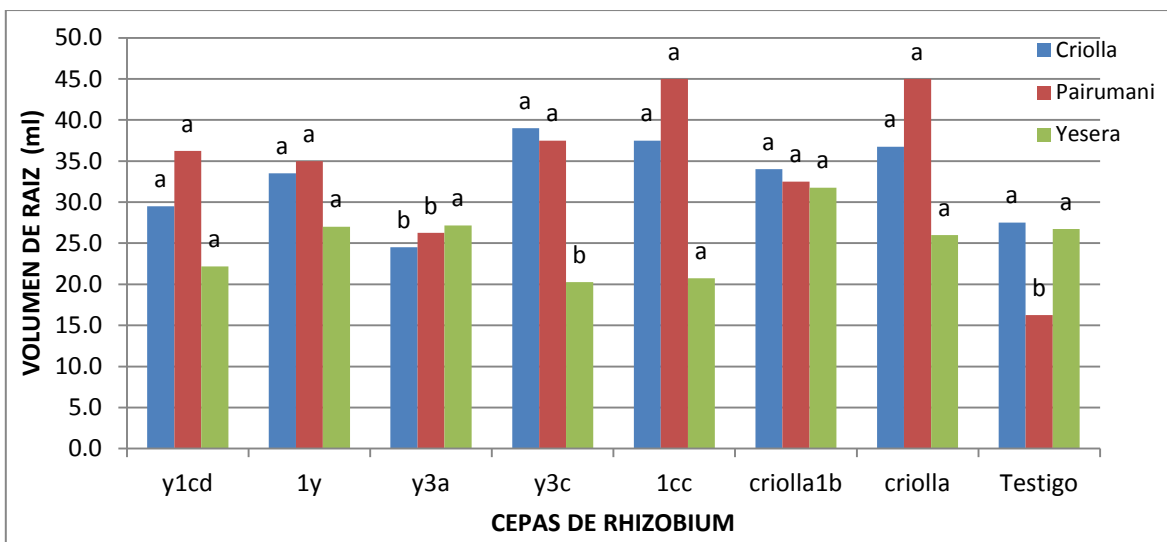


Figura 12. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de la altura de planta.

Sin embargo, se observó diferencias significativas para la interacción de Variedades\*cepas (Cuadro 1). Lo cual indica que algunas cepas responden mejor con alguna de las variedades. Donde todas las cepas tuvieron un efecto con la variedad criolla a excepción del aislado **y3a**. Sin embargo, en la variedad Pairumani la cepa **y3a** tuvo un menor efecto sobre el desarrollo de la raíz. En cambio en la variedad Yesera el aislado **y3c** mostró un menor efecto sobre el desarrollo radicular (Figura 13).

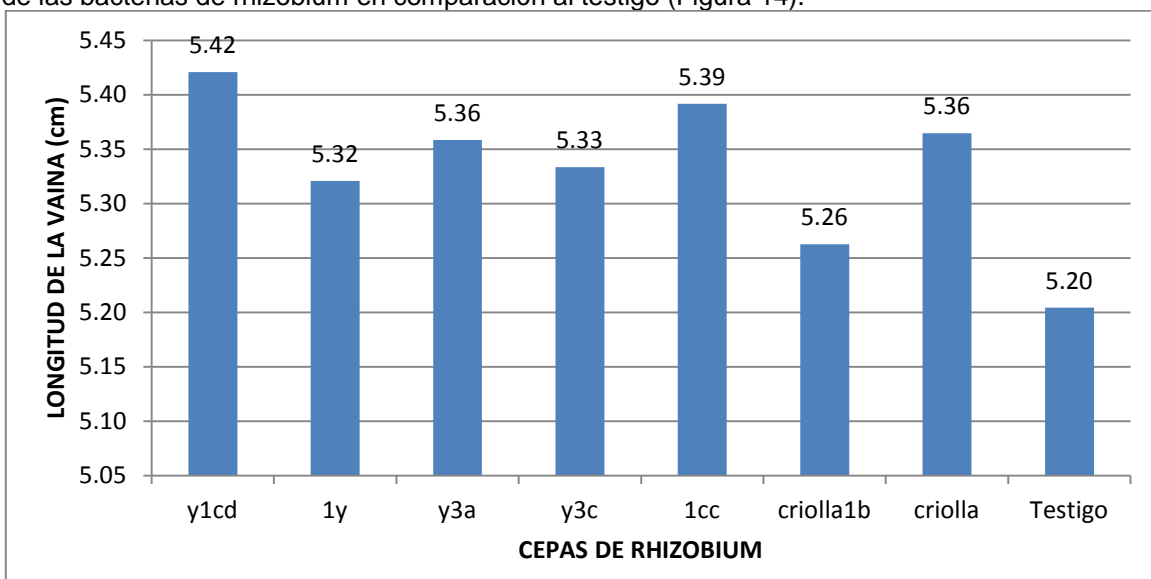


\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 13. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja**

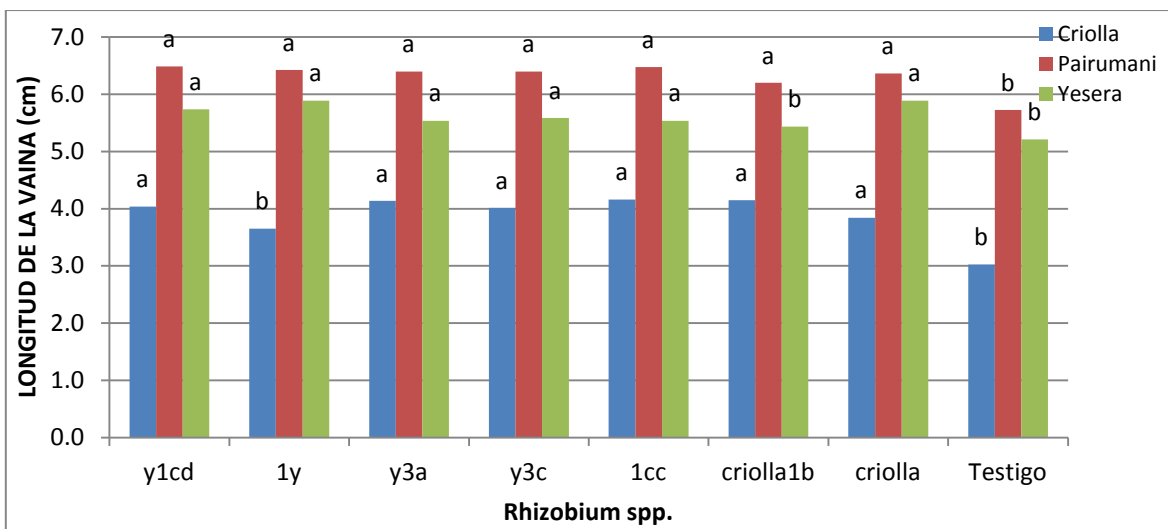
**Longitud radicular.**

Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las cepas para la variable longitud radicular (Cuadro 1). Sin embargo, se observó mayor longitud radicular con la inoculación de las bacterias de rhizobium en comparación al testigo (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre la longitud radicular.**

Sin embargo, se observó diferencias entre la interacción de cepas\*variedades (Cuadro 1). Lo cual muestra que la respuesta de las variedades varía a la inoculación con las cepas de rhizobium. Donde la variedad Pairumani respondió de forma similar a todos los aislados. En cambio la variedad Yesera respondió de forma similar a todos los biofertilizantes con excepción de la cepa **Criolla 1b**. Por otro lado, la variedad criolla también respondió a todos los aislados con excepción a la cepa **1y** (Figura 15).

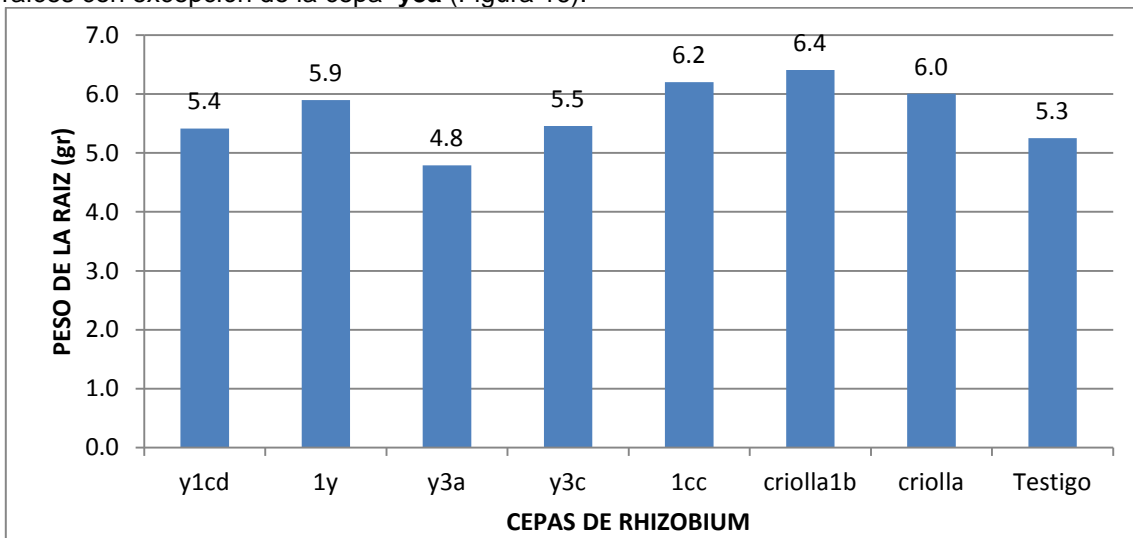


\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 15. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja**

#### Peso de la raíz

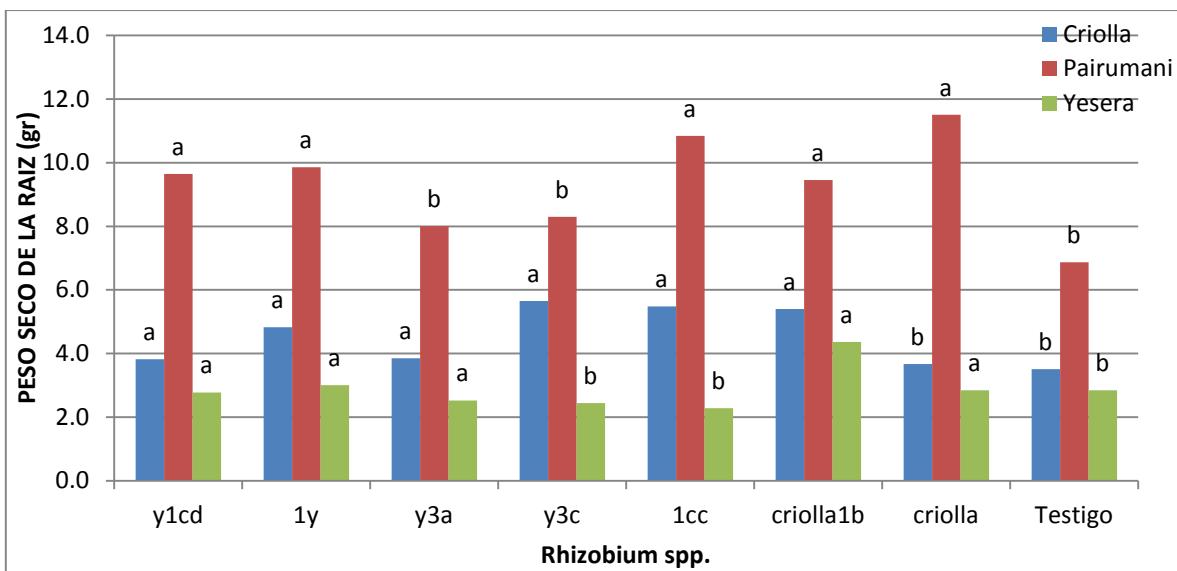
Para la variable peso de la raíz tampoco se estimaron efectos significativos (Cuadro 1). Sin embargo, la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno favorecieron mayor peso en las raíces con excepción de la cepa **y3a** (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el peso de la raíz.**

Sin embargo, se observaron diferencias de las bacterias entre las diferentes variedades (Cuadro 1). Por lo que el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno vario de una variedad a otra. Donde, las cepas **y1cd, 1y, 1cc, criolla1b** y **criolla** en la variedad Pairumani. **Y1cd, 1y, y3a, y3c, 1cc** y **criolla1b** en la variedad Criolla y la cepa **y1cd, 1y, y3a, criolla1b** y **criolla** en la variedad yesera favorecieron mayor desarrollo radicular en la planta (Figura 17).





\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

Figura 17. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja

#### Peso Foliar.

Para la variable peso de la planta tampoco se observaron diferencias significativas entre los diferentes aislados (Cuadro 1). Sin embargo, las cepas **Y3a**, **y3c**, **criolla1b** y **criolla** favorecieron relativamente mayor desarrollo radicular en comparación al testigo (Figura 18).

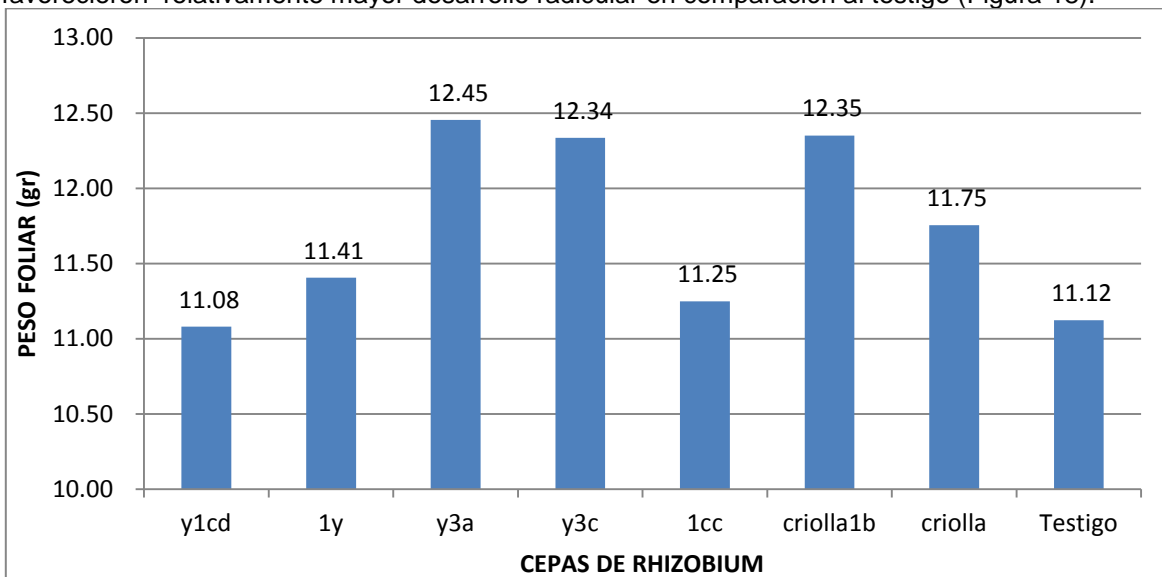
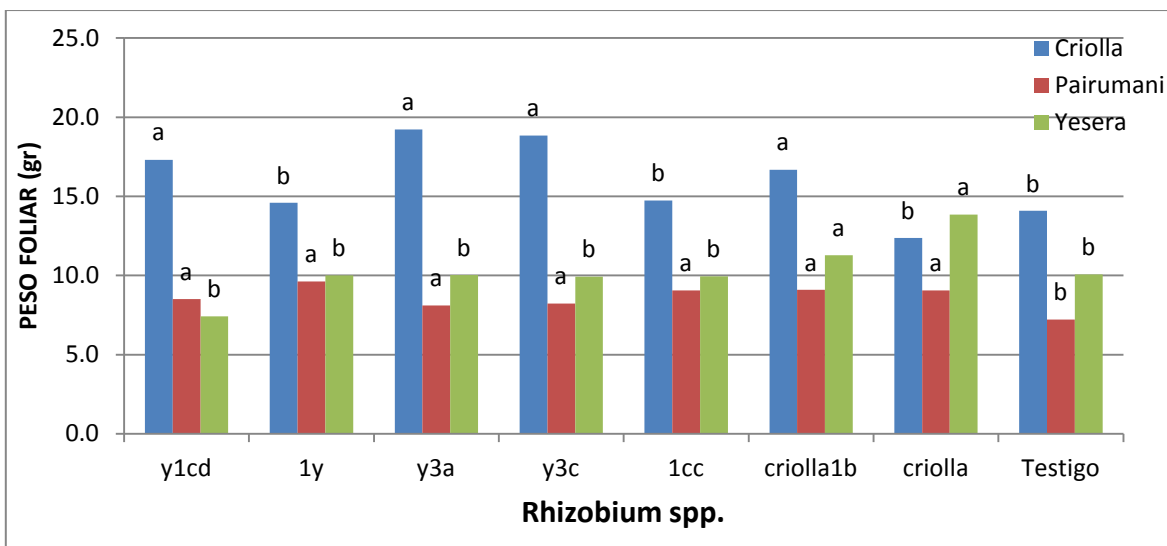


Figura 18. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el peso foliar de la planta.

Sin embargo, se observaron diferencias entre la interacción de variedades\*cepas de rhizobium (Cuadro 1). Lo cual indica que el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno varía de una variedad a otra. Donde las cepas **Y1cd**, **y3a**, **y3c** y **criolla1b** permitieron mayor desarrollo foliar en la variedad Criolla. **Y1cd**, **1y**, **y3a**, **y3c**, **1cc**, **criolla1b** y **criolla** en la variedad Pairumani. **Criolla1b** y **criolla** en la variedad Yesera permitieron un mayor desarrollo foliar (Figura 19). Lo cual muestra que existen específicas que pueden permitir un mayor desarrollo en las plantas.



\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 19. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja**

## 6. Discusión.

A través de los resultados se puede observar que la inoculación de los aislados de rhizobium favoreció la formación de nódulos en la planta respecto al testigo que aunque presente desarrollo de nódulos las mismas fueron en menor proporción a las plantas inoculadas. Así mismo, se puede observar que existe una variabilidad respecto a la ubicación donde los aislados tienen la facultad de desarrollar nódulos tanto en la parte intermedia, apical y en toda la raíz. Así mismo, aunque se observó en mayor proporción nódulos de forma ovalada, también se observó nódulos de forma arriñonada y acorazada. En cambio en el color se observó en mayor proporción nódulos de color verde posiblemente por que las plantas estaban casi secas, sin embargo también se observó nódulos de color blanco verdusco, blanco, rosado, y de color verde lo cual muestra que la formación de nódulos es un proceso continuo en la planta.

En cuanto a las variables Agronómicas, Aunque no se observaron diferencias las siete aislados favorecieron el desarrollo de la planta en comparación al testigo. Así mismo, la interacción entre las cepas y las variedades, muestra la importancia de seleccionar bacterias específicas para obtener mejores resultados con la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno. Así, a través de las variables estudiadas y las cepas Y1cd, criolla1b y criolla favorecieron el desarrollo de la planta en forma general a través de las 3 variedades. Lo cual puede ser debido a que estas bacterias favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de nódulos en las plantas. Resultados similares fueron reportados el efecto benéfico de la inoculación con rhizobias el cual incrementa la fijación de nitrógeno y con lo que favoreció el crecimiento de la planta y desarrollo de la planta en haba (Brockwell, et. al.; 1995), Soya (Ali, et. al., 1997) y garbanzo (Mohamed Ahmed, et. al., 2006).

## 7. Conclusiones.

- La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno favorece el desarrollo de la planta.
- La inoculación con rhizobium favorece el desarrollo de mayor cantidad de nódulos tanto en la parte intermedia-apical como en toda la extensión de la raíz.
- Se observó variación entre los aislados en forma y color.
- Las variedades presentan respuesta específica a algunas cepas de rhizobium.
- Los aislados Y1cd, criolla1b y criolla presentaron efectos benéficos generales a través de las 3 variedades.

## 8. Recomendaciones.

La interacción de las variedades y las cepas muestra claramente la importancia de seleccionar cepas adecuadas para las variedades comerciales y así poder obtener mayores beneficios. Así mismo, se recomienda realizar ensayos en combinación a biofertilizantes comerciales para ver si podrían obtenerse mejores beneficios a través de la combinación con otros microorganismos.

## 9. Bibliografía.

- Ali, A.E., T. Horiuchi and S. Miyagawa, 1997. Nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean plants (*Glycine max* Merr.) in soil supplemented chitin and chitosan. Japanese Journal of Crops Science, 66(1): 100-107.
- AHMED. R. R., A. R. M. SOLAIMAN, N. K. HALDER, M. A. SIDDIKY AND M. S. ISLAM. 2007. Efecto of inoculation methods of rhizobium on yield attributes, yield and protein content in seed of pea *J. Soil. Nature. 1 (3):30-35*
- Brockwell, J., P.J. Bottomley and J.E. Thies, 1995. Manipulation of rhizobia micro flora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil, 174: 143-180.
- Evans, J., C. Wallace, N. Dobrowolski, I. Pritchard and B. Sullivan. 1993. Requirement of field pea (*Pisum sativum*) for inoculation with *Rhizobium* and lime pelleting in soils of Western Australia. J. Exp. Agric. 33(6): 767-773.
- Fall L, Diouf D, Fall-Ndiaye MA, Badiane FA, Gueye M (2003). Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. Afr. J. Biotechnol. 2: 48-50.
- Feng, Y., C. Pan, D. Wang, Y. Li. and C. Wei. 1997. Isolation of nodule bacteria from *Pisum sativum* and the application of nitragine from the isolate. J. Trop. Sub Trop. Bot. 5(2): 47-53.
- Giller KE (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2nd Edn. CAB International Publishing: Wallingford, UK.
- He Yahui, Lizhuo Guo, Hutian Zhang and Gaobao Huang. 2011. Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming systems in the western Loess Plateau, China. African Journal of Biotechnology Vol. 10(18), pp. 3540-3548
- Idris, M. and G.R. Sandhu, 1981. Effect of Rhizobium inoculation on the dry matter, pod yield, grain protein and N<sub>2</sub> fixing efficiency of vegetable pea. J. Sci. Technol. (Pak), 5(1-2): 17-22.
- Jha, S.K. and V.P. Singh. 1996. Correlation for effectiveness of rhizobium leguminosarum in pea (*Pisum sativum* L.). J. Applied Biol., 6(1-2): 19-21.
- Krasova-Wade T, Ndoeye I, Braconnier S, Sarr B, de Lajudie P, Neyra M (2003). Diversity of indigenous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.)
- Li YG, Zhou JC (2002). The main factors influencing on symbiotic nitrogen fixation efficiency of rhizobia and genetic improvement. Microbiology. 29: 86-89.
- Mohamed Ahmed, T.H., M.E. Abdelgani and A.G. Osman, 2006. Responce of chick pea and common bean...., to rhizobial cross inoculation in River Nile State. Shendi University Journal, 3: 142-157. (In Arabic).
- Rahman, M. H. H., M. Z. Islam, M. A. H. Bhuiyan, D. Khanam, A. K. M. Hossain and A. F. M. Rahman. 1994. Effect of rhizobial inoculum with and without chemical fertilizers on chickpea in Haplaquepts. Bangladesh J. Agric. Sci. 21(2): 273-277.
- Rabbani, M. G., A. R. M. Solaiman, K. M. Hossain and T. Hossain. 2005. Effects of *Rhizobium* Inoculant, Nitrogen, Phosphorus and Molybdenum on Nodulation, Yield and Seed Protein in Pea. Korean J. Crop Sci. 50(2): 112-119.
- Romdhane SB, Tajini F, Trabelsi M, Aouani ME, Mhamdi R (2007). Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. World J. Microbiol Biotechnol. 23: 1195-1201.
- Santalla M, Amurrio JM, De Ron AM (2001). Symbiotic interactions between *Rhizobium leguminosarum* strains and elite cultivars of *Pisum sativum* L. J. Agron Crop Sci. 187: 59-68.
- SAS INSTITUTE. 2001. The SAS System for Windows. Version 9. SAS Inst., Cary, NC
- Solaiman, A. R. M. 1999. Nitrogenase activity, yield and yield contributing characters of chickpea as influenced by *Rhizobium* inoculant in presence and absence of nitrogen. Bangladesh J. Sci. Tech. 1(1): 141-144.

Tolkachev, N. Z., P. A. Donchenko, A. V. Knyazev, N. M. Kosenko and V. F. Patyka. 1994. Methods of enhancing the efficiency of legume-*Rhizobium* symbiosis. Fiziol. Biok. Kul Rast. 26(4): 344-351.

## **Efecto de la combinación de bacterias fijadoras de nitrógeno y biofertilizantes en el cultivo de haba**

**Responsable:** Juan José calisaya.

**Equipo técnico:** Noel Ortuño, Mayra Claros, Juan José calisaya.

### **Compendio.**

Con el objetivo de determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* spp. en combinación con diferentes biofertilizantes, se llevo el ensayo con la aplicación de 8 biofertilizantes y 3 aislados de *Rhizobium*. Los resultados muestran que tanto las bacterias como los biofertilizantes tuvieron un efecto positivo sobre el desarrollo de número de nódulos y por tanto el desarrollo de planta. Donde los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus desarrollaron un efecto superior en combinación con las tres bacterias. Asimismo, las 3 bacterias mostraron mayor desarrollo de nódulos en la posición intermedia-apical y toda la extensión de la raíz de la planta favoreciendo de esta manera el desarrollo de la planta.

**Palabras claves:** Biofertilizantes, fijadoras de nitrógeno, promotoras de crecimiento

### **1. Objetivo.**

- Determinar el efecto de *Rhizobium* spp. en combinación con diferentes biofertilizantes en el cultivo de haba.

### **2. Hipótesis.**

- Las bacterias fijadoras de nitrógeno interactúan de la misma manera con todos los biofertilizantes.

### **3. Revisión bibliográfica.**

El cultivo de haba es uno de los más importantes por su alto contenido de proteína. En este sentido, desde hace muchos años se llevan prácticas agrícolas para evitar el efecto de los productos químicos. Los sistemas de agricultura bio-organica es la reciente tendencia introducida para la obtención de productos sanos. La aplicación de biofertilizantes al suelo es el método común en la agricultura orgánica. En el ecosistema del suelo, microorganismos patogénicos y no patogénicos están en competición unos con otros (Sikora y Reimann, 2004). Así, cada suelo tiene un potencial antagonista contra patógenos específicos que evitan la diseminación de un patógeno (Sikora, 1992). Por lo que en ambientes naturales el control biológico resulta de la combinación de antagonistas en ves de una población alta de un simple antagonista. Así, la combinación de diferentes microorganismos podría imitar la situación natural lo cual podría ampliar el espectro de la actividad de biocontrol y por tanto la eficiencia del control (Duffy *et al.*, 1995).

La inoculación de las leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno promueven el crecimiento de la planta e incrementan el rendimiento (Sankaranayanan *et a.,/* 1995), porque las bacterias del genero rhizobium conviven en simbiosis con las leguminosas. Las mismas que producen fitohormonas, sideróforos que permiten el desarrollo de plantas así como la resistencia a los patógenos (Dileep-Kumar, 1999). Sin embargo, la fijación efectiva del nitrógeno producto de la fijación simbiótica entre las rhizobias y las leguminosas dependen principalmente de la bacteria, cultivar y el ambiente (Sorwli y Mytton (1986).

Por otro lado la pudrición de la semilla y las raíces del cultivo de haba han sido consideradas como factores que limitan el crecimiento y el rendimiento. Por lo que se han llevado varias investigaciones para reducir el impacto de las enfermedades incluyendo mejoramiento a la resistencia de la enfermedad (El- Gantiry *et al.*, 1994), control con fungicidas (Kh aled *et al.*, 1995)

y control biológico (Abdel, 1992). Sin embargo, se ha prestado gran atención a las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) como una alternativa a los productos químicos (Arora, 2001). Los hongos micorrizicos arbusculares son conocidos también por facilitar la disponibilidad de fósforo y otros nutrientes a la planta (Bodker *et al.*, 1998). Esta disponibilidad de nutrientes puede conducir a un escape o una tolerancia contra agentes patogénicos (Dehne, 1982). La superioridad nutricional de plantas inoculadas con micorrizas ha sido propuesta por ser un mecanismo para la reducción de las enfermedades radiculares (Bodker *et al.*, 1998). Las bacterias solubilizadoras de fósforo también pueden actuar con los rizobios durante el proceso de colonización de las raíces promoviendo la formación de nódulos y la fijación biológica del nitrógeno en las leguminosas (Brockwell *et al.*, 1995).

Así, Bardr El-Din *et al.*, (1987) reportaron que el número de nódulos y el peso de la materia seca de los nódulos, inoculados con bacterias de *Rhizobium* y *Glomus spp.* en el cultivo de la soya fueron superiores que cuando se inoculó solo *Rhizobium*. Rodelas *et al.*, (1998) también reportaron mayor cantidad de nódulos con la combinación de *Azotobacter* y *Rhizobium*. La materia seca de los nódulos fue incrementado hasta en 38% en comparación a las plantas que recibieron solo la inoculación de *Rhizobium*. Por lo que las interacciones ecológicas entre rizobios y otras bacterias del suelo han sido de interés en recientes años por sus implicaciones agronómicas. Así, muchos estudios reportaron mayor nodulación y crecimiento en una amplia variedad de forrajes y leguminosas de grano debido a la interacción entre *Rhizobium* y *Azospirillum* (Iruthayathas *et al.*, 1983; Yahalom *et al.*, 1987). Por otra parte, *Azotobacter* (particularmente *A. chroococcum*) ocurre ampliamente en los suelos agrícolas de regiones templadas y en suelos con pH cercano a lo neutral y pueden ser fácilmente encontrados en asociación con cereales y leguminosas (Kole *et al.*, 1988; Martínez- Toledo *et al.*, 1991). Sin embargo, la influencia de estas bacterias sobre la interacción de *Rhizobium*-leguminosas ha sido explorado en menor extensión particularmente en leguminosas de grano (Burns *et al.*, 1981).

#### **4. Materiales y Métodos.**

##### **Ubicación del ensayo.**

El ensayo se implementó en los invernaderos de la FUNDACION PROINPA ubicada en la zona de El Paso

##### **Materiales de laboratorio.**

- Cajas petri.
- Cámara de flujo.
- Micropipeta.
- 3 cepas de *Rhizobium*
- Tubos Eppendorf
- *Biobacillus*.
- Micorrizas.
- *Trichoderma*.
- Mibac.
- Tricobal.

##### **Materiales de campo.**

- Semilla de haba.
- Macetas de 2 kg.
- Regla.

##### **Metodología.**

## Tratamientos.

Los tratamientos a evaluar resultaron de la combinación de tres cepas de rizobium y 7 biofertilizantes:

Rh <sub>1</sub> +Bs	T1	Rh <sub>2</sub> +Bs	T9	Rh <sub>3</sub> +Bs	T17
Rh <sub>1</sub> +Mico	T2	Rh <sub>2</sub> +Mico	T10	Rh <sub>3</sub> +Mico	T18
Rh <sub>1</sub> +Tricho	T3	Rh <sub>2</sub> +Tricho	T11	Rh <sub>3</sub> +Tricho	T19
Rh <sub>1</sub> +Mibac	T4	Rh <sub>2</sub> +Mibac	T12	Rh <sub>3</sub> +Mibac	T20
Rh <sub>1</sub> +Trico	T5	Rh <sub>2</sub> +Trico	T13	Rh <sub>3</sub> +Trico	T21
Rh <sub>1</sub> +Trico+mibac	T6	Rh <sub>2</sub> +Trico+mibac	T14	Rh <sub>3</sub> +Trico+mibac	T22
Rh <sub>1</sub> +Trico+Micorriza+Bs	T7	Rh <sub>2</sub> +Trico+Micorriza+Bs	T15	Rh <sub>3</sub> +Trico+Micorriza+Bs	T23
Rh <sub>1</sub>	T8	Rh <sub>2</sub>	T16	Rh <sub>3</sub>	T24
				Testigo	T25

## Diseño experimental.

Los tratamientos fueron evaluados bajo el diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Donde la unidad experimental lo constituyo una maceta de 2 kgr de capacidad

### Procedimiento de laboratorio.

#### Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo LM se preparó 500 ml que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 gr., MgSO<sub>4</sub> 0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con H<sub>2</sub>O destilada hasta 500cc. Dividiéndolo en pequeños erlenmeyers de 50 ml para la multiplicación de cada aislado. Posteriormente el medio se autoclavo por 15 min. a 20 psi de presión.

#### Inoculación de rhizobium spp al medio LM

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyeres. La duración de la prueba fue de 7 días y en el octavo día se hicieron las lecturas de la concentración de la cepa.

#### Conteo de conidios (Concentración)

Para el conteo de conidias se puso 1 ml del caldo de cultivo en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyó 1 a 2 veces más dependiendo de la concentración de la solución para luego observar en el hematocímetro para el conteo respectivo. Para el montaje de la suspensión se tomó 10 ml con una micropipeta colocando 5ml en cada ranura de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la lectura en las dos cámaras, en los cuadrados más pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\#de\ conidias/ml = Suma\ de\ los\ 5C.S. \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

#### Procedimiento de campo.

La siembra se realizo en macetas de 2 kilogramos de capacidad depositando una semilla en la parte central de la planta momento en el que aplicaron además los biofertilizantes en las dosis recomendadas. Determinada la concentración (10x8) con la ayuda de la micropipeta se deposito 0,5 de solución en tubos epemdorf de cada una de las bacterias. La inoculación de las bacterias se realizo en el cuello de la planta cuando. Así mismo, los riegos se realizaron dependiendo a la necesidad del cultivo.

### **Variables de respuesta:**

Las variables de respuesta se evaluaron cuando las plantas presentaron vainas en madurez fisiológica las mismas que fueron.

**Altura de planta.** La cual se evaluó desde la base de la planta hasta el ápice vegetativo.

**Número de tallos.** Se evaluó como el número tallos desarrollados por la planta.

**Número de vainas.** Para lo cual se realizó el conteo de todas las vainas desarrolladas por la planta

**Longitud de la raíz.** La misma que se evaluó desde el cuello vegetativo hasta el ápice de la raíz

**Peso de la planta.** Para esta variable se realizó el pesado de la parte foliar de la planta

**Peso de la raíz.** Para lo cual se realizó el pesado de la parte radicular de la planta.

**Número de nódulos/planta.** Debido a la cantidad de nódulos desarrollados y la dificultad de realizar el conteo la cantidad de nódulos se evaluó bajo una escala donde: **baja**= menos de 15 nódulos, **media**=entre 15-50 nódulos y **alta**=mayor a 50 nódulos por planta.

**Posición de los nódulos.** La cual se evaluó como: **B**=en la parte superior cerca al cuello de la planta, **I**= cuando las plantas desarrollaron los nódulos desde la parte intermedia hacia la parte apical de la raíz y **A**= Cuando se observo el desarrollo de nódulos en la parte apical de la raíz y **T**= en toda la raíz.

**Materia seca de la raíz.** Para lo cual se procedió al secado de la parte radicular.

### **Análisis estadístico.**

Las variables altura de planta, número de tallos, número de vainas, longitud de la raíz, peso de la planta, peso de la raíz y materia seca de la raíz fueron analizados bajo la distribución normal previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el PROC MIXED del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \tau_k + \gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde :

$i = 1,2,3,4$  bloques.

$j = 1,2,3$  cepas de Rhizobium

$k = 1,2,3,\dots,9$  biofertilizantes

$y_{ijk}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  - esimo bloque donse se aplico la  $j$  - esima cepa de Rhizobium con el  $k$  - esimo biofertilizante.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  - esimo bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo de la  $j$  - esima cepa de Rhizobium.

$\tau_k$  = Efecto fijo del  $k$  - esimo biofertilizante.

$\gamma_{jk}$  = Efecto fijo de la interaccion entre el  $k$  - esimo biofertilizante y la  $j$  - esima cepa de Rhizobium.

$\varepsilon_{ijk}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_e^2)$

Las variables cantidad de nódulos y posición de los nódulos se evaluaron bajo los modelos multinomiales con el PROC CATMOD del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico.

$$\log \frac{\pi_{ijk}}{\pi_{ijc}} = \eta_k + \alpha_{ik} + \beta_{jk} + \gamma_{ijk}$$

$i = 1,2,3$  cepas de Rhizobium

$j = 1,2,3,\dots,9$  biofertilizantes

$k =$  baja, media, alta categorías de respuesta

$\pi_{ijk}$  = Probabilidad de que un individuo sea clasificada en la  $k$  - esima respuesta con la aplicación de la  $i$  - esima cepa de Rhizobium y el  $j$  - esimo biofertilizante.

$\eta_k$  = Media general de logit de la  $k$  - esima categoría de respuesta.

$\alpha_{ij}$  = Efecto fijo de la  $i$  - esima cepa de Rhizobium sobre la  $k$  - esima respuesta.

$\beta_{jk}$  = Efecto fijo del  $j$  - esimo biofertilizante sobre la  $k$  - esima respuesta.

$\gamma_{ijk}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$  - esima cepa de Rhizobium y el  $j$  - esimo biofertilizante sobre la  $k$  - esima respuesta

## 5. Resultados.

El cuadro de análisis de varianza muestra que existió variación entre bloques para las variables altura de planta, peso de la raíz y peso seco de la raíz; aunque no se estimó variación para las variables número de tallos, número de vainas y peso de la planta (Cuadro 1). Por lo que el diseño experimental fue apropiado.

**Cuadro 1. Cuadros medios del análisis de varianza para 6 variables en el cultivo de haba.**

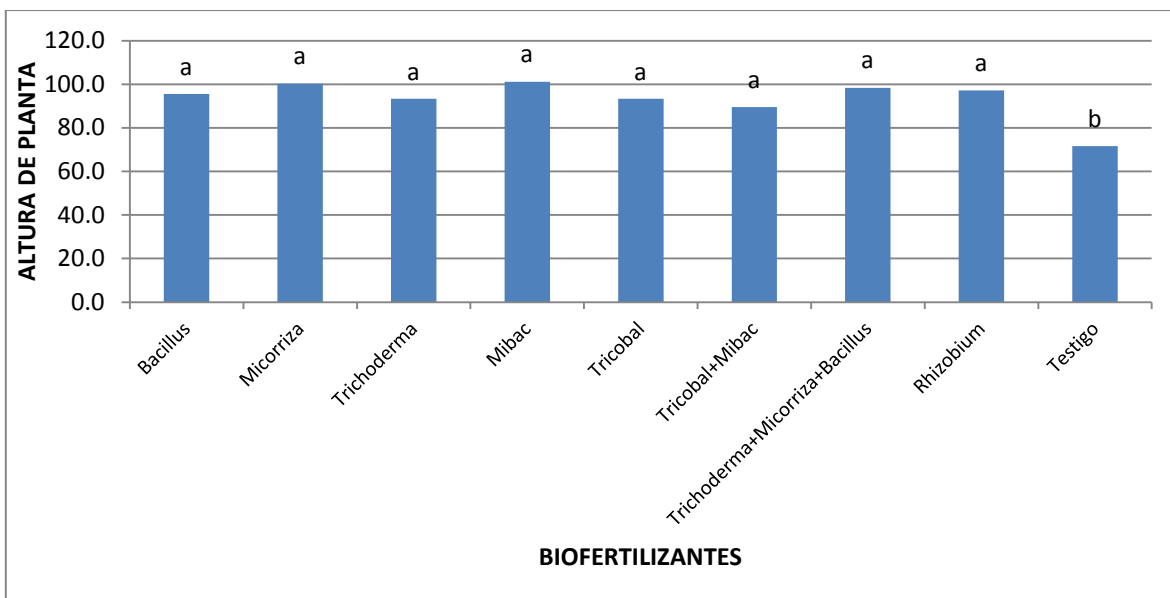
Fuentes de Variación	Grados de libertad	Altura de planta	Número de tallos	Número de vainas	Peso de la planta	Peso de la raíz	Peso seco de la raíz
Bloque	3	34,738	0,000	0,000	0,000	54,501	3,484
Biofertilizante	8	952,833**	21,578**	8,932**	12864,547**	9452,196**	489,617**
Cepa	3	2156,552**	21,906**	12,307**	19284,931**	12322,296**	625,554**
Biofertilizante*Cepa	24	579,173**	10,932**	7,096**	6265,819**	3960,738**	282,945**
Residual	95	266,900	4,095	4,962	1188,960	637,800	61,510
CV%		18,134	27,479	32,205	28,895	20,557	19,201
Media		93,308	6,103	3,056	112,204	124,638	19,659

\*\*Significativo al 0,01 nivel de significancia.

### Altura de planta.

Para la variable altura de planta se estimaron efectos significativos entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde la aplicación de los biofertilizantes y la aplicación de solo rhizobium permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo (Figura 1).

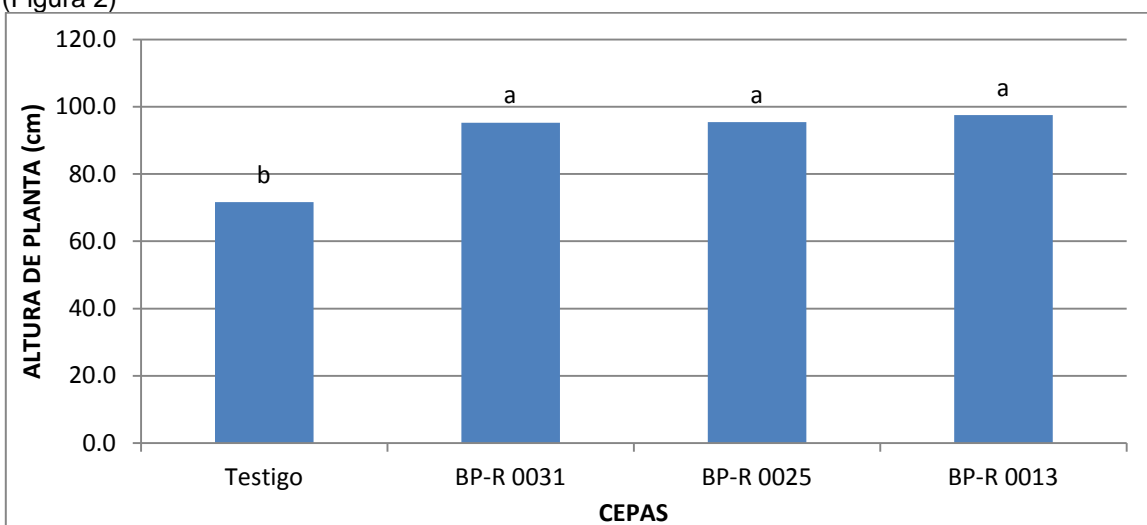




\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 1. Efecto de los biofertilizantes sobre la altura de la planta.

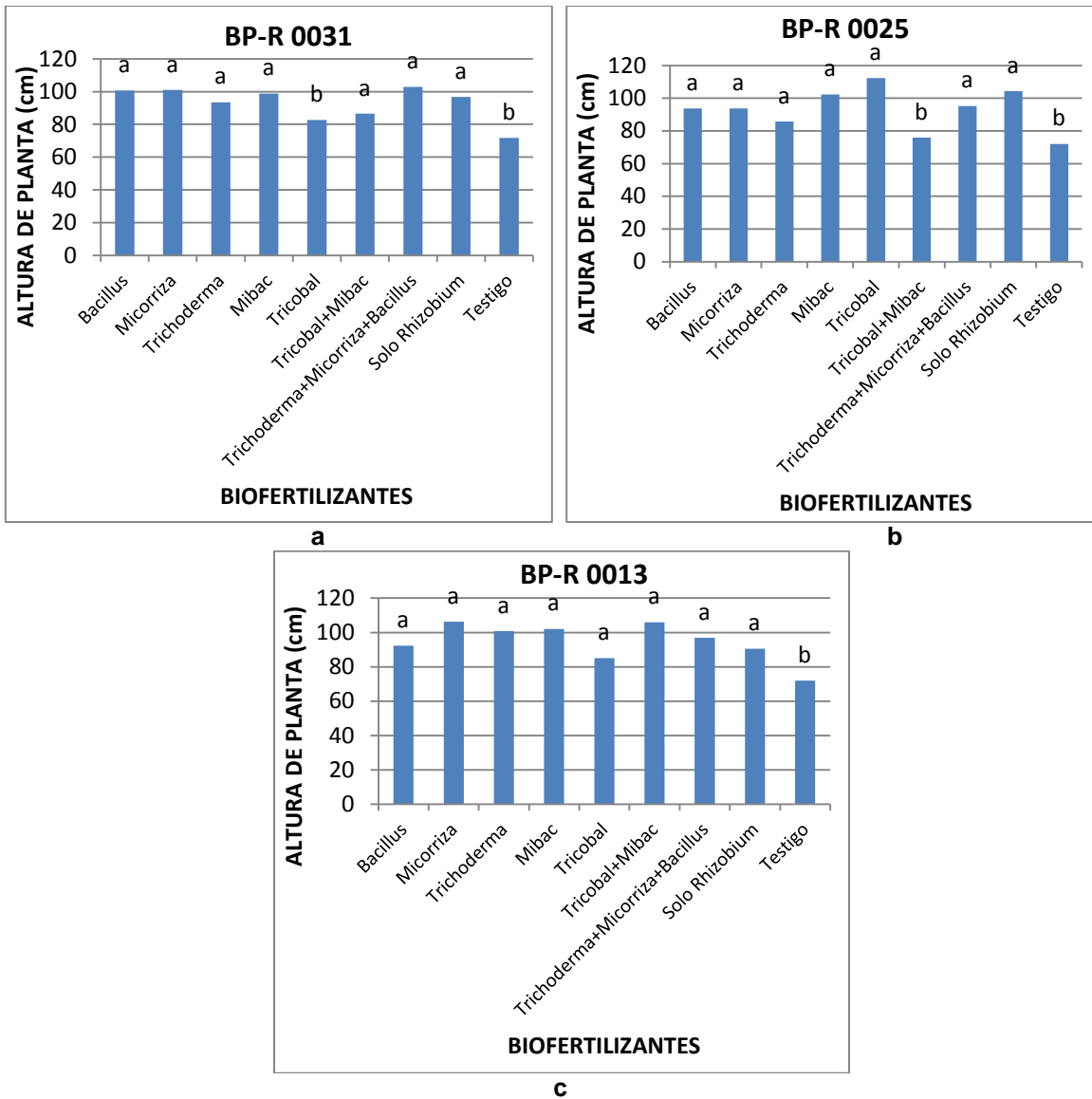
Así mismo, se estimaron diferencias entre las cepas sobre el desarrollo de la planta (Cuadro 1). Observándose, plantas más altas con la aplicación de las bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 que permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo (Figura 2)



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 2. Efecto de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo de la planta.

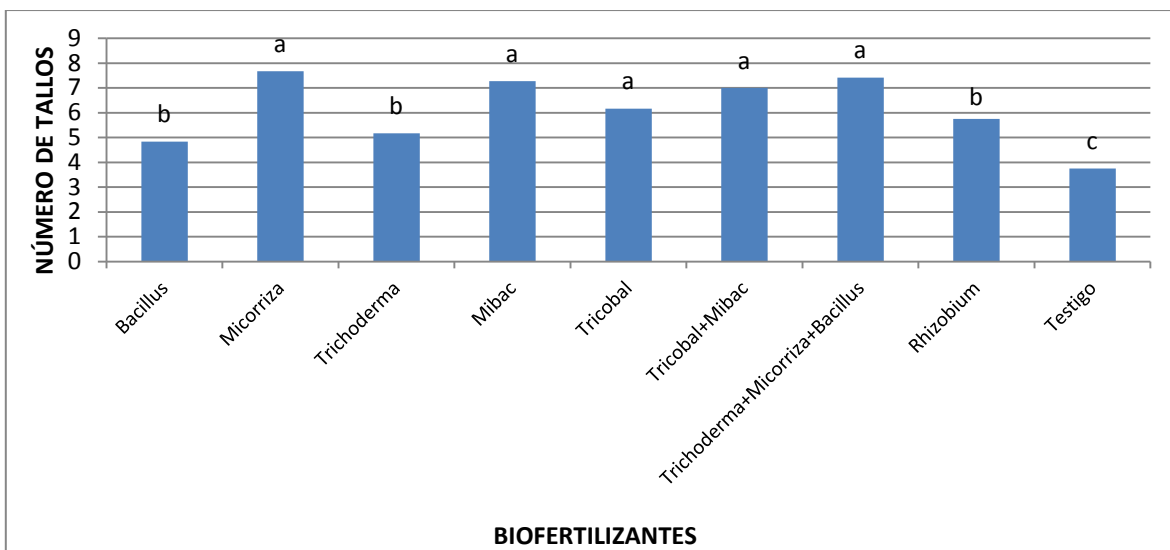
Por otra parte, también se observó diferencias entre la interacción de las cepas de rhizobium y los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde, los biofertilizantes en combinación con los diferentes cepas de rhizobium permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo; aunque, el biofertilizante Tricobal combinado con la bacteria BP-R 0031 (Figura 3a) y el biofertilizante Tricobal+Mibac combinado con el bacteria BP-R 0025 (Figura 3b) desarrollaron plantas más pequeñas que la combinación de los diferentes biofertilizantes y las bacterias de rhizobium.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
 Figura 3(a,b,c). Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes y cepas de rhizobium

**Número de tallos.**

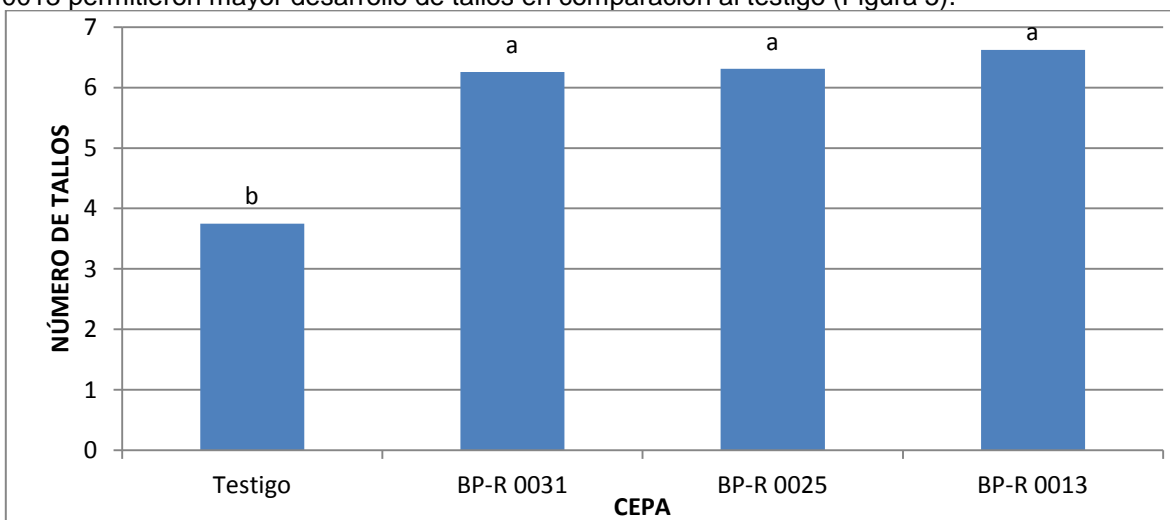
Para la variable número de tallos se estimaron diferencias significativas entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde, todos los biofertilizantes permitieron el desarrollo de mayor número de tallos en comparación al testigo. Sin embargo, los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+bacillus favorecieron el desarrollo de mayor número de tallos en comparación a la aplicación de Bacillus, Trichoderma y el Rhizobium (Figura 4).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 4. Efecto de los biofertilizantes sobre el desarrollo de número de tallos.**

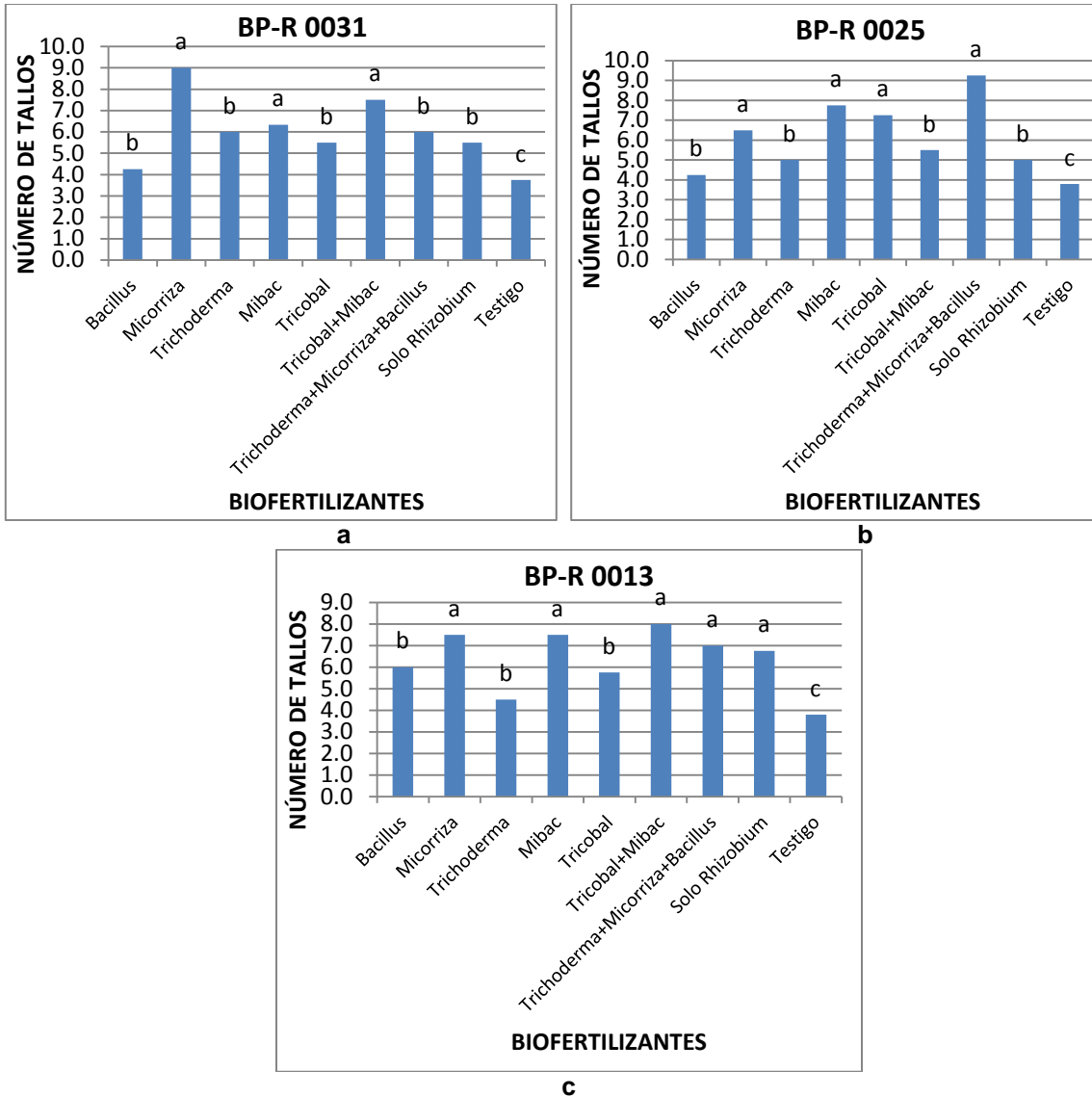
Así mismo, se observaron diferencias entre los diferentes cepas de rhizobium para la variable número de tallos (Cuadro 1). Donde las tres bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de tallos en comparación al testigo (Figura 5).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 5. Efecto de cepas de rhizobium sobre el desarrollo del número de tallos.**

También, se estimaron diferencias en desarrollo de los tallos entre la combinación de los biofertilizantes y las cepas de rhizobium (Cuadro 1). Si bien, todos los biofertilizantes en combinación con las cepas de rhizobium permitieron mayor desarrollo de tallos en comparación al testigo, los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac en combinación a la cepa BP-R 0031 (Figura 6a). Micorrizas, Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0025 (Figura 6b) y Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0013 (Figura 6c) permitieron mayor desarrollo de tallos.

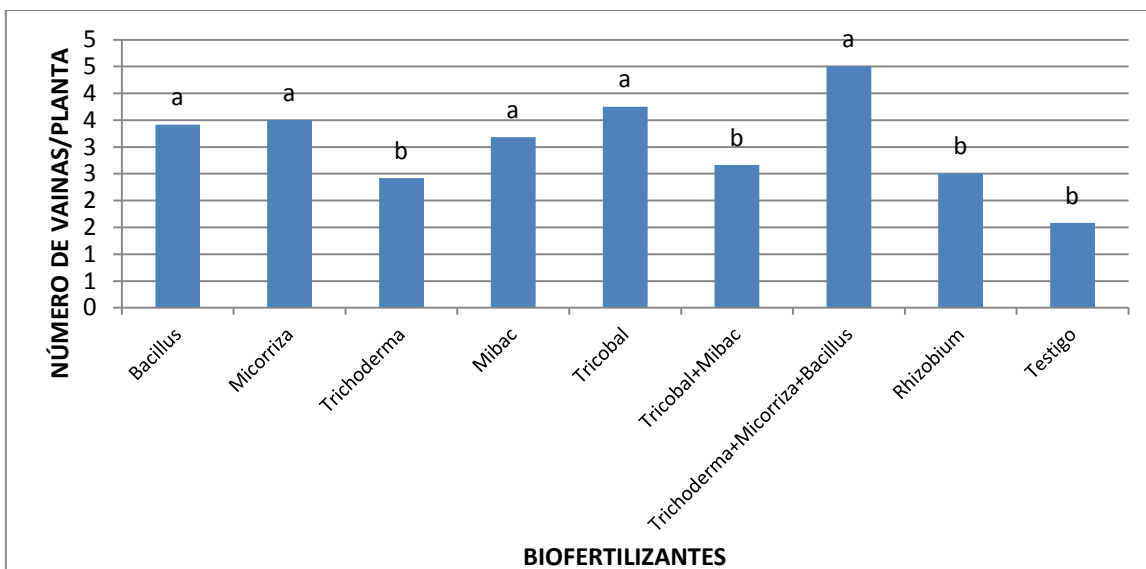


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 6(a,b,c). Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el desarrollo de tallos en el cultivo de haba.

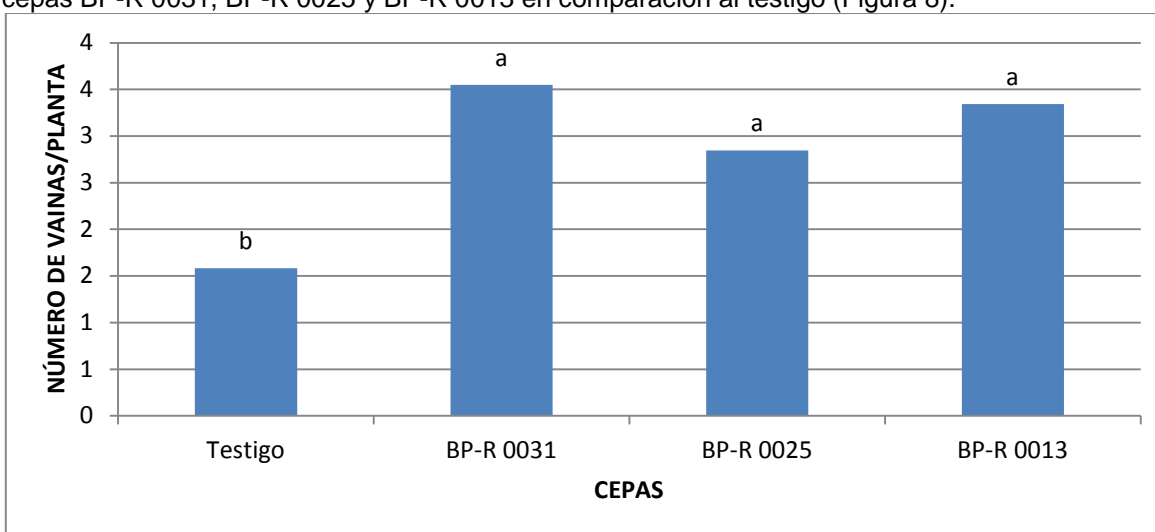
**Número de vainas/planta.**

Al igual que para las variables altura de planta y número de tallos se observó diferencias para número de vainas/planta con la aplicación de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde la aplicación de Trichoderma+Micorriza+Bacillus, Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac y Tricobal permitieron el desarrollo de mayor número de vainas en comparación a la sola aplicación de biofertilizantes Bacillus, Trichoderma, Rhizobium y el testigo (Figura 7). Aunque, la aplicación de todos los biofertilizantes permitió mayor desarrollo de vainas en comparación al testigo.



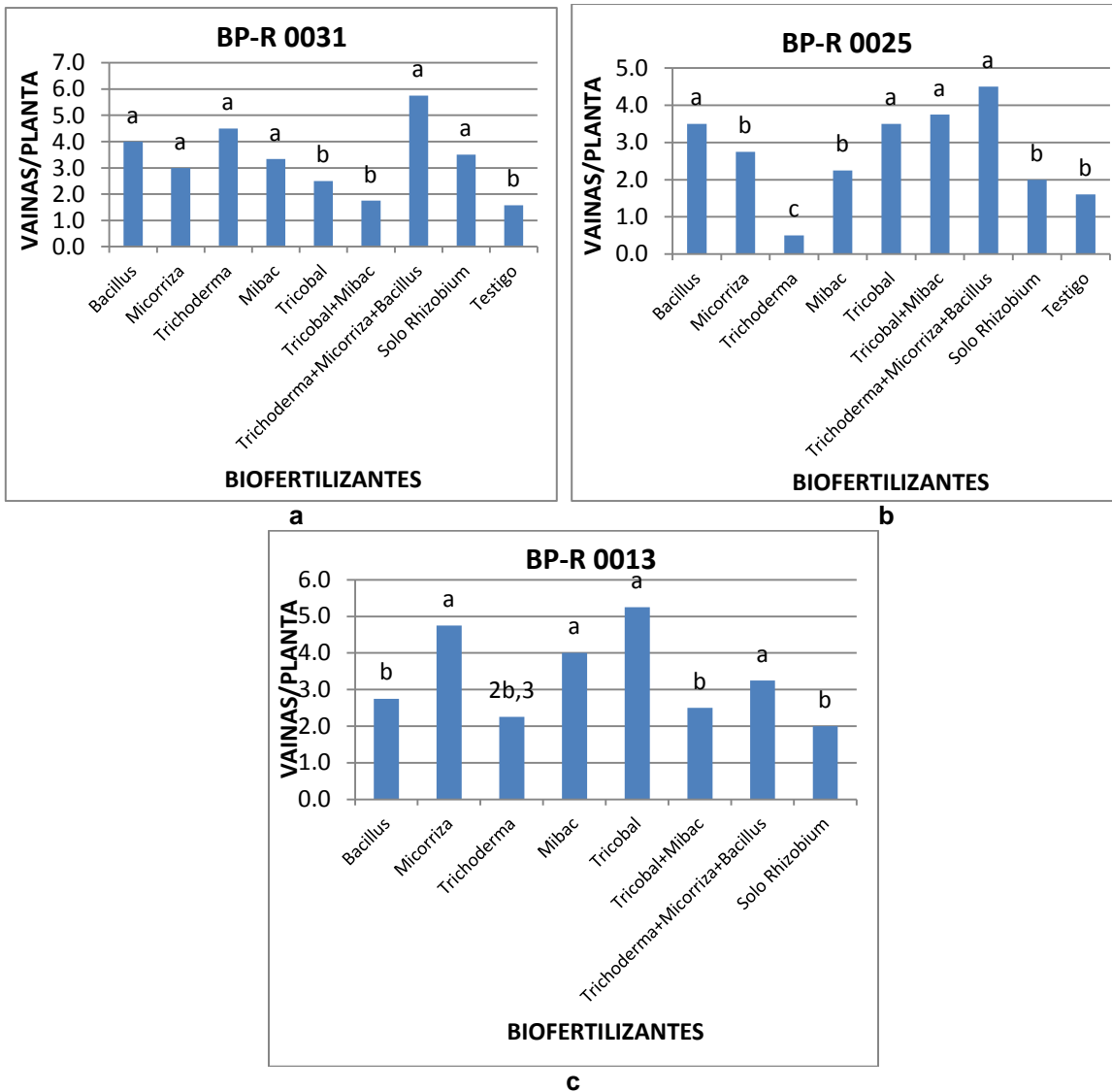
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 7. Efecto de diferentes biofertilizantes sobre el desarrollo de vainas/planta.**

Así mismo, se estimaron diferencias entre los diferentes cepas de rhizobium para la variable número de vainas/planta. Observándose, mayor número de vainas con la aplicación de las cepas BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 en comparación al testigo (Figura 8).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 8. Efecto de cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas/planta.**

Asimismo, se observó diferencias significativas entre la interacción de los diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas por planta (Cuadro 1). Donde, la combinación de los biofertilizantes y las cepas de Rhizobium permitieron mayor desarrollo de vainas. Así, los biofertilizantes Bacillus, Micorriza, Trichoderma, Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0031 (Figura 9a). Bacillus, Tricobal, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0025 (Figura 9b) y Micorriza, Mibac, Tricobal, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0013 (Figura 9c) permitieron mayor desarrollo de vainas por planta en comparación al testigo (Figura 9)

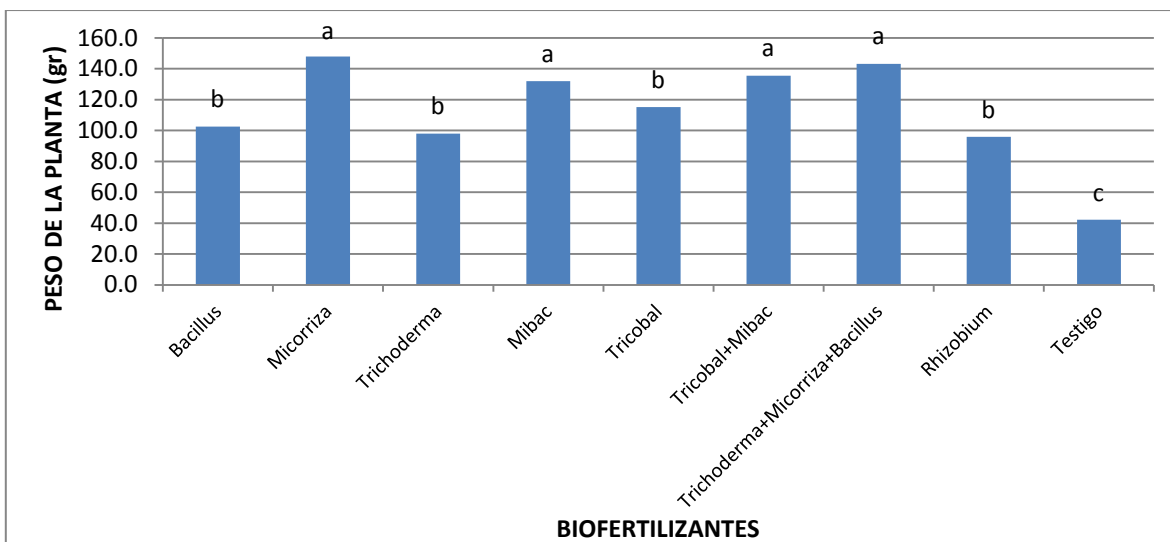


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 9. Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas/planta.

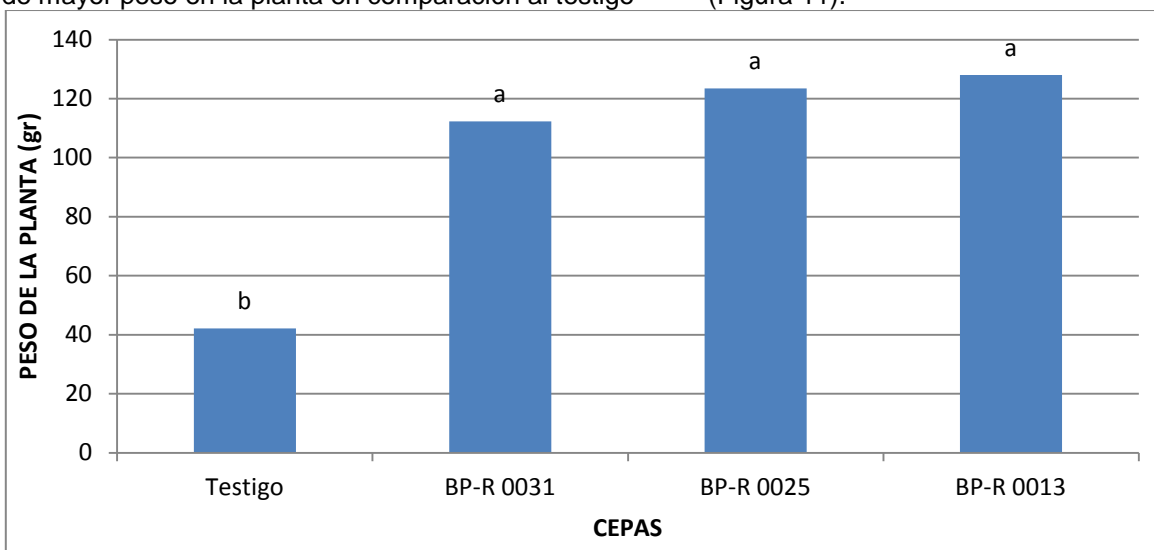
#### Peso de la planta.

Para la variable peso de la planta se estimaron diferencias entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde se observó mayor peso en la planta con la aplicación de los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+Bacillus en comparación a la simple aplicación de Bacillus, Trichoderma, Tricobal, Rhizobium (Figura 10). Aunque, la aplicación de todos los biofertilizantes permitió mayor de desarrollo de la planta en comparación al testigo.



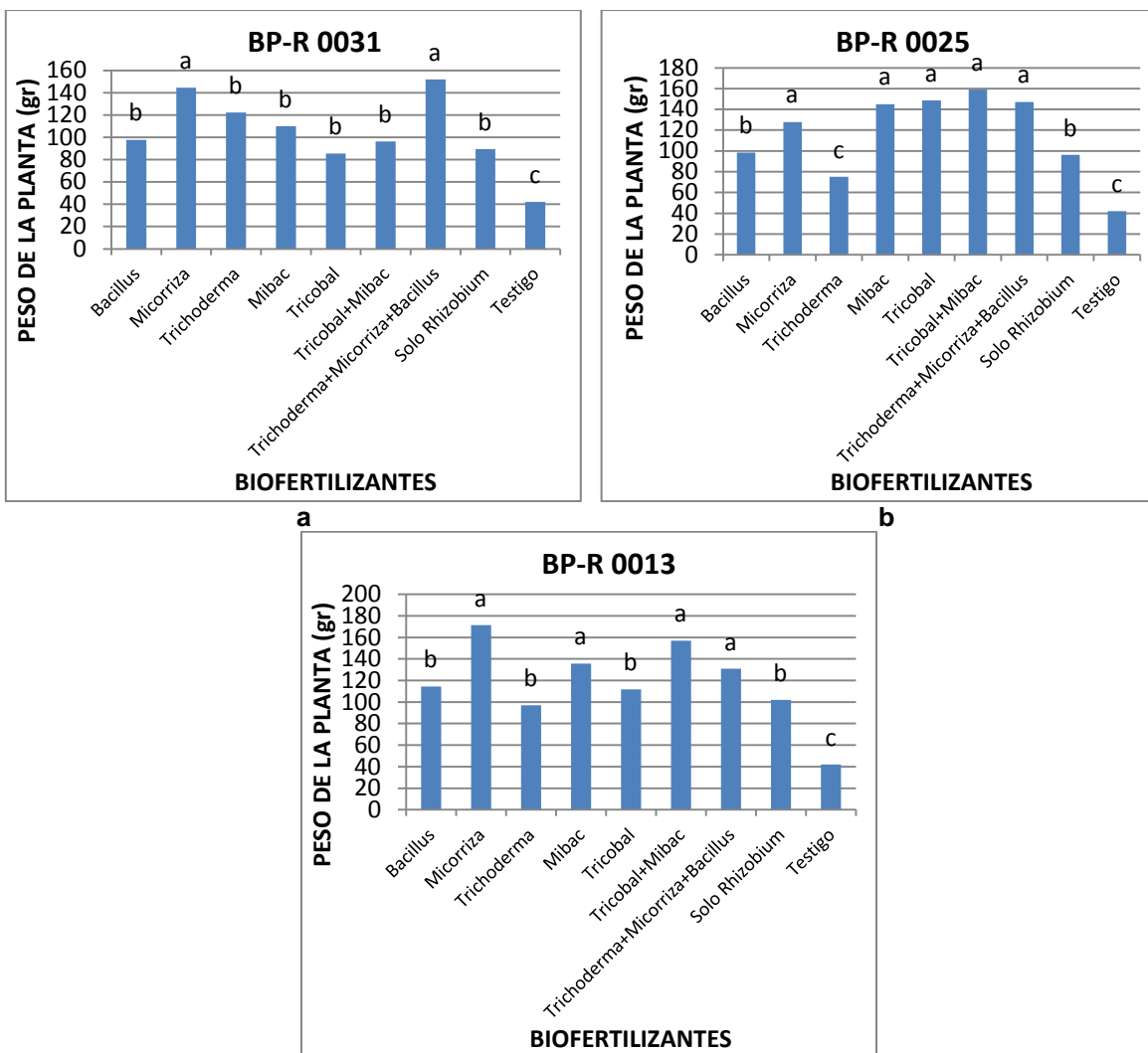
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 10. Efecto de diferentes biofertilizantes sobre el peso de la planta.**

Asimismo, se estimaron diferencias entre las cepas de rhizobium para la variable peso de la planta (Cuadro 1). Donde las cepas BP-R 0031, BP-0025 y BP-R 0013 permitieron el desarrollo de mayor peso en la planta en comparación al testigo (Figura 11).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 11. Efecto de diferentes de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo del peso de la planta.**

Por otra parte también se estimaron diferencias entre la combinación de diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium para la variable peso de la planta (Cuadro 1). Donde la combinación de los biofertilizantes y las cepas de rhizobium permitieron mayor desarrollo de la planta (Figura 12). Sin embargo, los biofertilizantes Micorriza, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0031 (Figura 12a). Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0025 (Figura 12b) y los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0013 (Figura 13c) permitieron mayor desarrollo del peso de la planta.



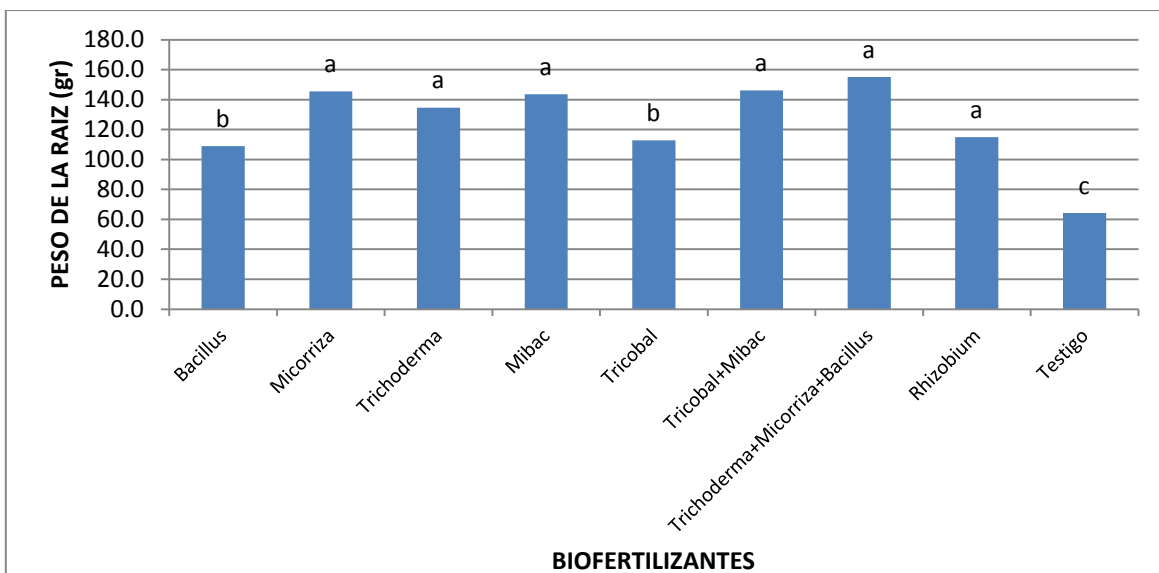
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 12 (a,b,c). Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de Rhizobium sobre el desarrollo del peso de la planta.**

**Peso de la Raíz.**

Para la variable peso de la raíz también se estimaron diferencias con la aplicación de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde las plantas que se inocularon con Micorriza, Trichoderma, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus y la aplicación de Rhizobium permitieron el desarrollo de mayor volumen radicular en comparación a los biofertilizantes Bacillus, Tricobal y el testigo (Figura 13). Aunque todos lo biofertilizantes en si superaron al testigo en el desarrollo del volumen radicular.

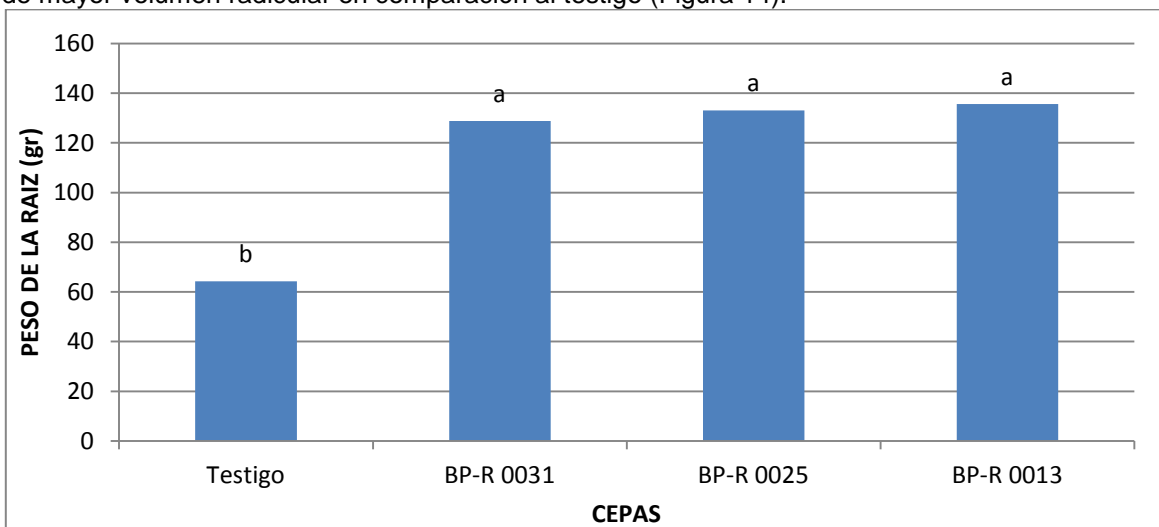




\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 13. Efecto de los biofertilizantes sobre el desarrollo radicular.**

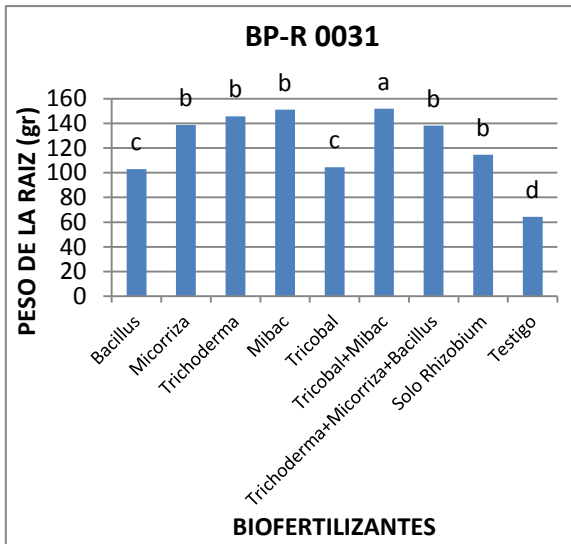
Así mismo, se estimaron efectos significativos entre las cepas de rhizobium para la variable peso de la raíz (Cuadro 1). Donde la aplicación de las 3 cepas de Rhizobium permitió el desarrollo de mayor volumen radicular en comparación al testigo (Figura 14).



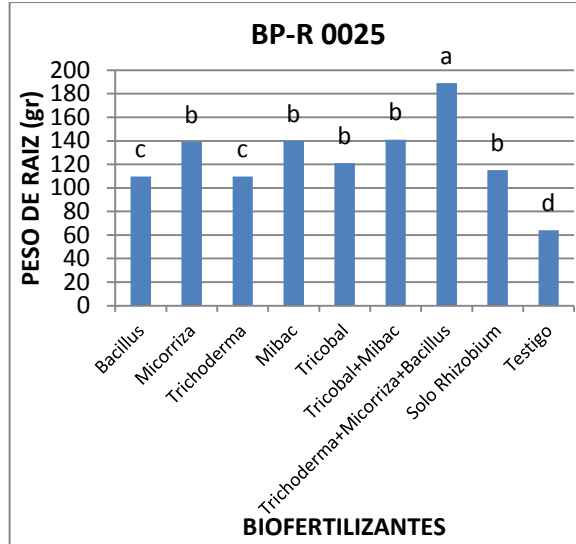
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 14. Efecto de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo radicular.**

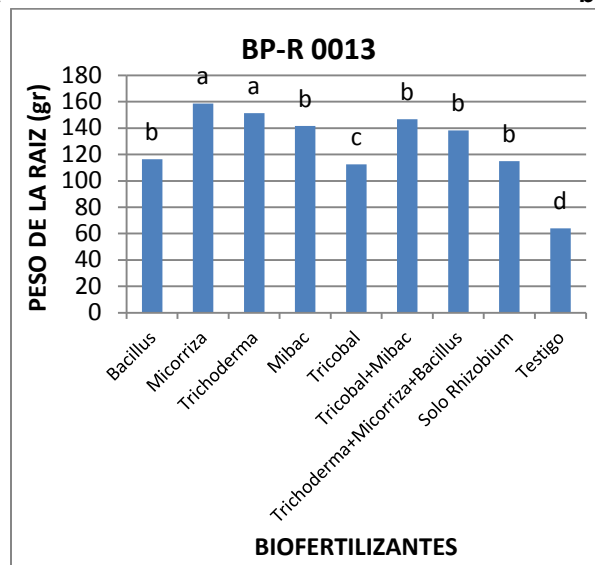
Por otra parte también se estimaron diferencias para la combinación de los diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium sobre el desarrollo radicular (Figura 15). Donde la combinación de todos los biofertilizantes y las cepas de rhizobium superaron en desarrollo radicular al testigo; sin embargo, se observó mayor desarrollo radicular con los biofertilizantes Tricobal+Mibac con la cepa BP-R 0031 (Figura 16a), Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0025 (Figura 16b) y los biofertilizantes Micorriza, Trichoderma en combinación a la cepa BP-R 0013 (Figura 16c) permitieron mayor desarrollo radicular.



a



b



c

\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
 Figura 15. Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el desarrollo radicular.



**Figura 16(a,b,c). Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes con aislados de Rhizobium sobre el desarrollo radicular**

**Desarrollo de Nódulos.**

Así mismo, se estimaron diferencias sobre la cantidad de nódulos desarrollados en la planta entre las cepas de rhizobium. Donde la cepa BP-R 0031 (Cepa 1) (Figura 17a) desarrollo nódulos en una proporción alta (0,60). La cepa BP-R 0025 (Cepa 2) (Figura 17b) desarrollo nódulos en una proporción alta (0,47). Así mismo, la cepa BP-R 0013 (Cepa 3) (Figura 17c) desarrollo nódulos en una proporción alta (0,59). Contrariamente si bien se observo nódulos en las raíces de los testigos estos fueron en una proporción muy baja (0,08) (Figura 18). Por lo que el uso de inoculantes favorece el desarrollo de mayor cantidad de nódulos.

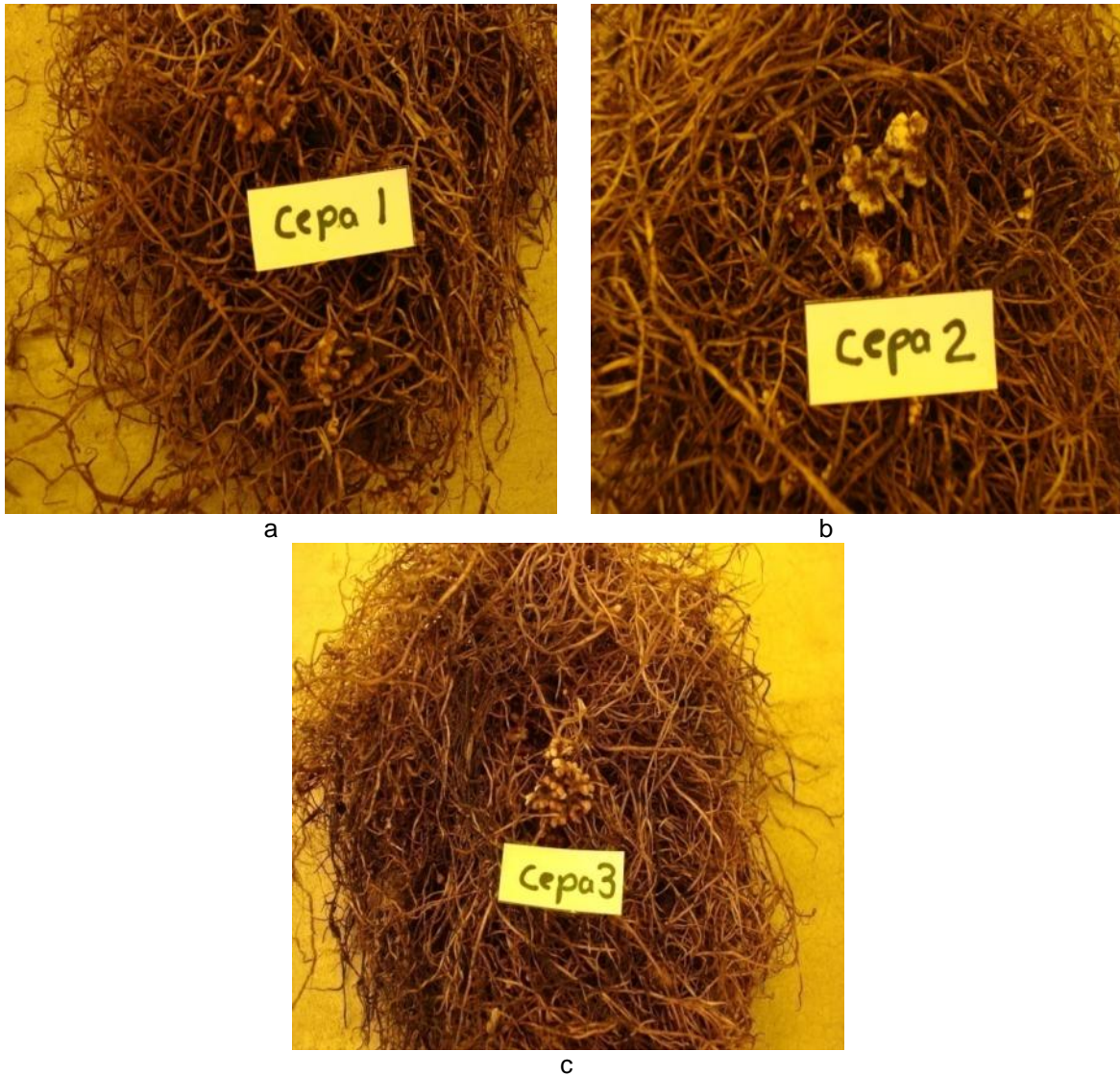


Figura 17a, 17b, 17c. Formación de nódulos por de aislados de *Rhizobium spp.*

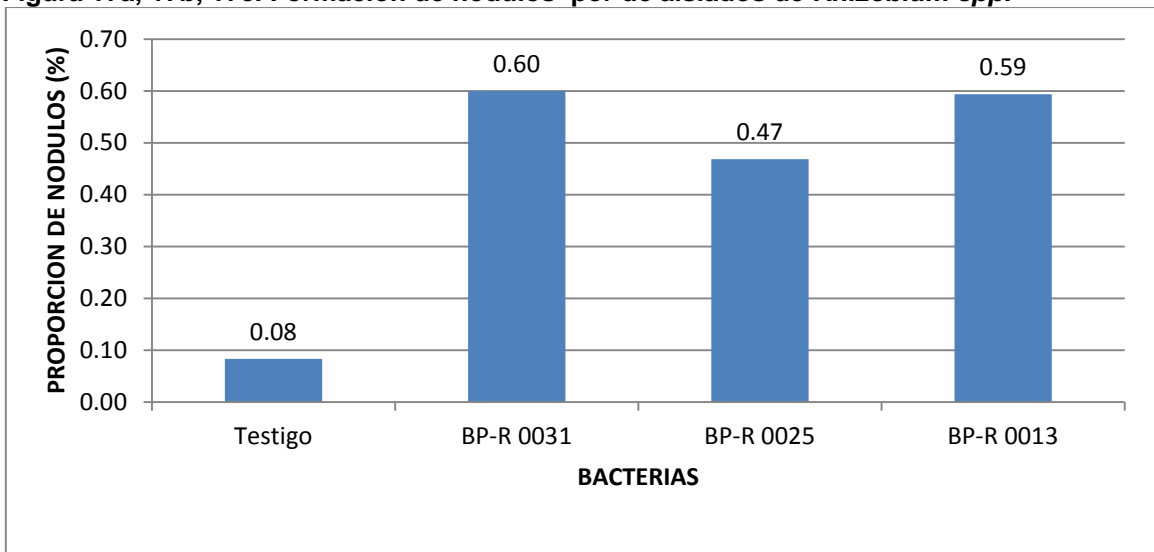


Figura 18. Proporción de la formación de nódulos de tres cepas de *Rhizobium spp.*

Por otra parte, también se observó que los biofertilizantes favorecieron la formación de mayor cantidad de nódulos en las plantas, las mismas que fueron relativamente más grandes en comparación a los nódulos desarrollados en los testigos. Si bien todos los biofertilizantes favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de nódulos, se observó mayor desarrollo de nódulos (>50%) con los biofertilizantes Bacillus, Micorriza, Trichoderma, Mibac, Tricobal\*Mibac, Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus en combinación con la cepa BP R 0031 (Figura 19a). Micorriza, Trichoderma, Mibac, Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus con la cepa BP-R 0025 (Figura 19b) y los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal\*Mibac Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus en combinación con la cepa BP-R 0013 (Figura 19c). Así mismo, la formación de nódulos fue superior con la combinación de los biofertilizantes en comparación a la aplicación de solo Rhizobium (Figura 19a,b,c). Por lo que la combinación de de biofertilizantes y bacterias fijadoras de nitrógeno puede traer consecuencias favorables a la agricultura ecológica.

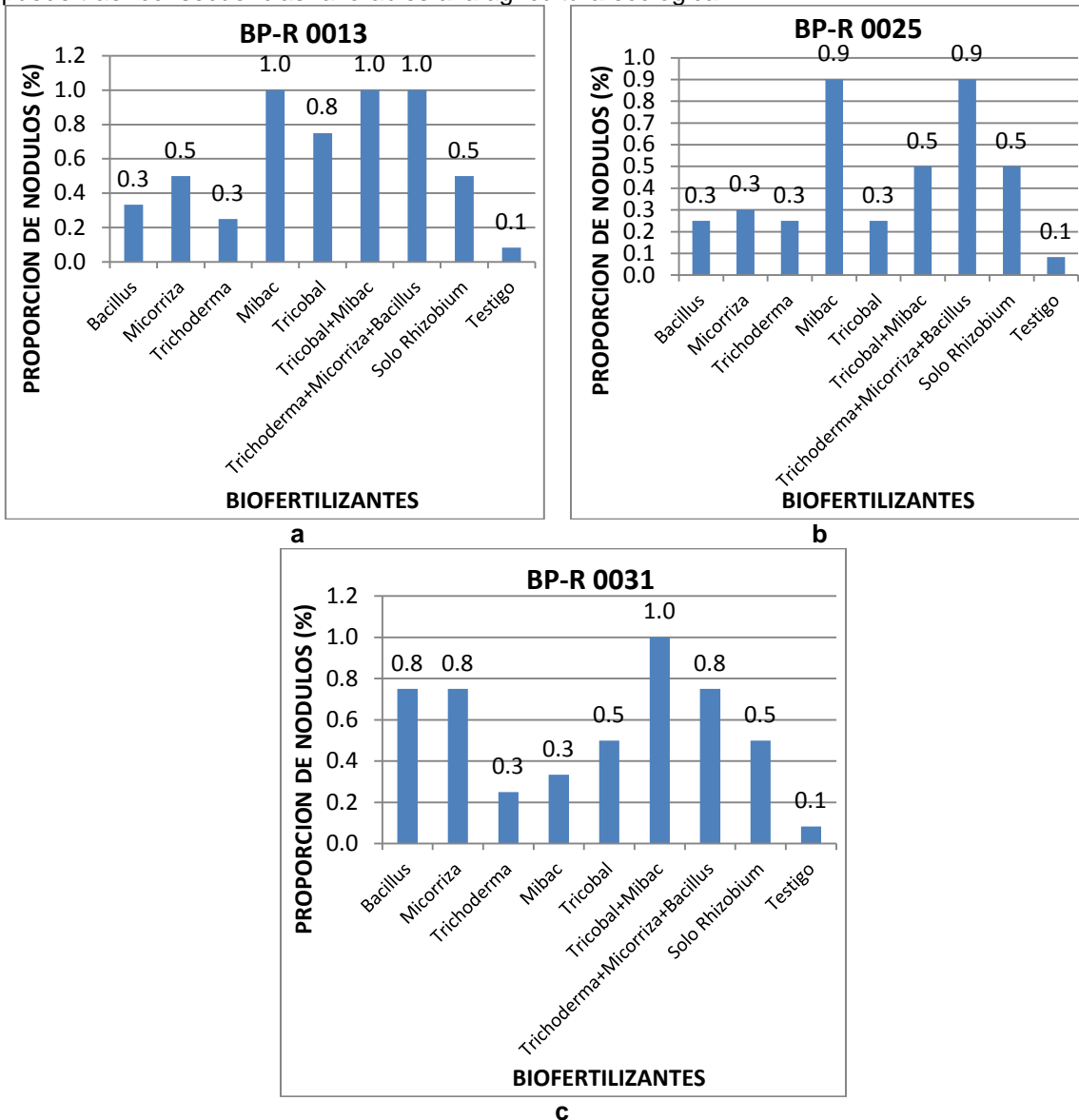


Figura 19. Efecto de los biofertilizantes sobre la formación de nódulos.

### Ubicación del desarrollo nodular.

Por otra parte, las tres cepas de Rhizobium desarrollaron nódulos en mayor proporción tanto en toda la extensión de la raíz, así como también, desde la parte intermedia hacia la parte apical de la raíz (Figura 20). En cambio el testigo desarrollo nódulos en la parte central-apical en mayor proporción, aunque las mismas fueron en menor cantidad en comparación a los nódulos desarrollados por las cepas de Rhizobium.

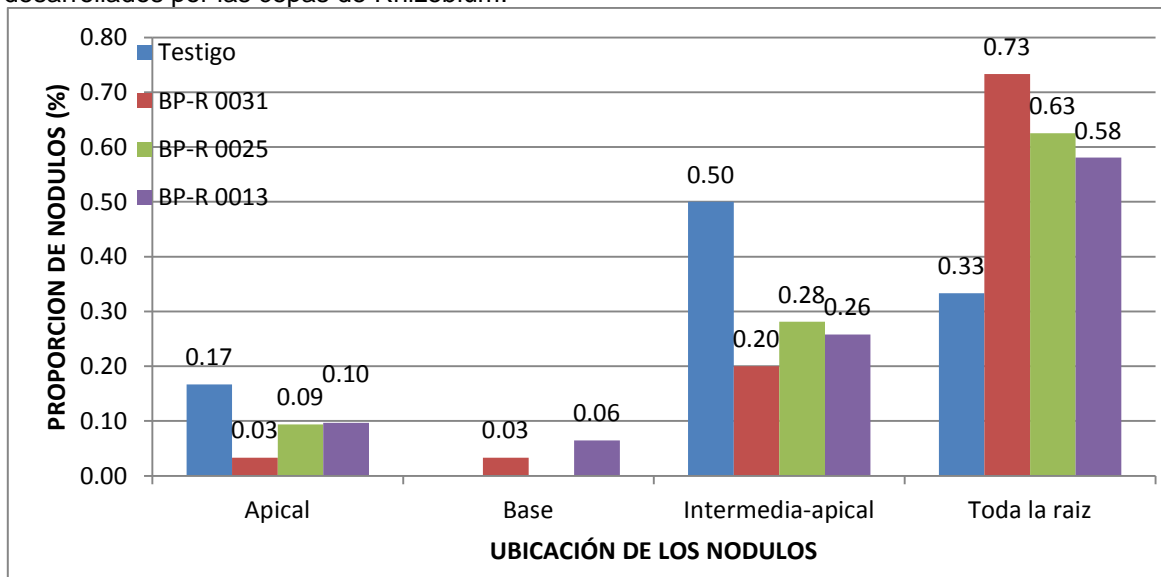


Figura 20. Ubicación del desarrollo de nódulos en la raíz

### 6. Discusión.

Los resultados muestran que tanto los biofertilizantes y las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecen el desarrollo de la planta. Así, entre los biofertilizantes, Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+Bacillus permitieron mayor desarrollo de la planta, mayor cantidad de tallos y vainas por planta al igual que mayor desarrollo radicular. Así mismo, tanto la bacteria BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de la planta, número de tallos, vainas por planta y mayor desarrollo radicular. Lo cual muestra la importancia que podría significar para el desarrollo de una agricultura biológica sostenible.

La combinación de los biofertilizantes con las bacterias fijadoras de nitrógeno también favoreció el desarrollo de planta. Donde casi en forma general las bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 se combinan mejor con los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus. Resultados similares fueron reportados por Bardr El-Din *et al.*, (1987) donde el número de nódulos y el peso de la materia seca de los nódulos, inoculados con bacterias de Rhizobium y *Glommus spp.* en el cultivo de la soya fueron superiores que cuando se inoculo solo rhizobium. Rodelas *et al.*, (1998) también reportaron mayor cantidad de nódulos debido la combinación de Azotobacter y Rhizobium. La materia seca de los nódulos fue incrementado hasta en 38% en comparación a las plantas que recibieron solo la inoculación de rhizobium.

Por otra parte, las 3 bacterias presentaron mayor desarrollo de nódulos las mismas que fueron ligeramente más grandes en comparación al testigo, Así mismo, llegaron a formar mayor cantidad de nódulos en toda la raíz y desde la parte intermedia hacia la apical en comparación al testigo que llego a formar nódulos en una proporción basal y en la parte intermedia-apical.

### 7. Conclusiones.

- Las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecen el desarrollo de planta.
- Los biofertilizantes favorecieron el desarrollo de la altura de planta, número de tallos, vainas por planta, peso de la planta y peso de la raíz.
- Las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecieron el desarrollo de la altura de planta, número de tallos, vainas por planta, peso de la planta y peso de la raíz.

- Los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus desarrollaron un efecto superior en combinación con las tres bacterias.
- Las tres bacterias desarrollaron mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia-apical y en toda la raíz de la planta.

#### 8. Recomendaciones.

Si bien las tres bacterias presentaron similar comportamiento con la combinación de los diferentes biofertilizantes, se recomienda realizar pruebas con diferentes variedades comerciales para determinar bacterias potenciales para el uso en la agricultura ecológica.

#### 9. Revisión bibliográfica.

- Abdel Moity, S.M., A.A. Khaled and S.A. Omar, 1992. Biological treatments for control root rot wilt disease of faba bean. Egypt. J. Appl. Sci.. 7(11). 13-21
- Arora, N.K., S.C. Kang and D.K. Maheshwari. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potencial against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Science, 81(6): 673-677.
- Badr El-Din, S.M.S., Y.Z. Ishac, H. Moawad, T.H. El-Nakhal and M. Attia, 1987. Response of soybean to dual inoculation with vesicular Arbuscular mycorr In: D.M. Sylvia L.L. Hung and G.H. Graham (Ed.). *hizal fungi and Bradyrhizobium japonicum Mycorrhiza in the Nex Decade.* USA.
- Bodker, L., R. Kjoller and S. Rosendahl. 1998. Effect of phosphate and the arbuscular micorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. Mycorrhiza, 8: 169-174.
- Brockwell, J., P.J. Bottomley and J.E. Thies, 1995. Manipulation of rhizobia micro flora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil, 174: 143-180.
- Burns, T.A., Bishop, P.E., Israel, D.W., 1981. Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and *Rhizobium*. Plant and Soil 62, 399-412.
- Chaven, J.K., L.S. Kute and S.S. Kadam, 1989. In: CRC Hand Book of World legumes, Eds., salunkle, D.D., S.S. Kadam. Boca Raton, Florida, Usa. CRC Press, pp:223-245.
- Dehne, H.W., 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology, 72: 1115-1119.
- Dileep-Kumar B.S., (1999): Fusarial with sufrccsion and crop improvement through two rhizobacterial strains in chickpea growing in soil infected with *Fusarium oxysporum* F.Sp ciceris. Biol. Fert. Soils.29:87-91.
- Duffy, B.K. and D.M. Weller, 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis var. graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. Plant Dis., 79: 907-911.
- El-Gantiry, S.M., S.A. Omar, E. Dorreih and M.M. Rahhal, 1994. Survey, Host response and fungicides treatment of root rot wilt disease complex in faba bean. Egypt. Appl. Sci., 9(7): 366-375.
- Harbi, A.R., A.A. Alsadon, and S.O. Khalil, 1996. Influence of training system and growing media on growth and yield of cucumber cultivars. Alex. J. Agric. Res. 41 (3): 355 – 365.
- Iruthayathas, E.E., Gunasekaran, S., Vlassak, K., 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N<sub>2</sub>-fixation of winged bean and soybean. Scientia Horticulturae 20, 231-240.
- Khaled, A.A., M. Samiha, M.H. Abdul-oily and S.A. Omar, 1995. Chemical control of some faba bean disease with fungicides. Egypt J. agric. Res., 73(1): 45\_55.
- Kole, M.M., Page, W.J., Altosaar, I., 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. Can. J. Microbiol. 34, 815-817.
- Martinez-Toledo, M.V., SalmeroÂn, V., GonzaÂlez-LoÂpez, J., 1991. Biological characteristics of *Azotobacter* spp. in natural environments. Trends in Soil Sci. 1, 15-23.
- Rodelas B. ; J. Gonzalez-Lopez\*, C. Pozo, V. Salmeron, M.V. Martinez-Toledo. 1998. Response of Faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. Viceae. Applied Soil Ecology 12 (1999) 51-59

- Sankaranayanan, R., H.A. Shah and V. Alagesan, 1995. Effect of Azospirillum on improved varieties of bhendi. South Indian Hort. 43 (1): 52 – 53
- Sikora, R.A. and S. Reimann, 2004. Suppressive soils, the edge of chaos and multitrophic strategies for biocontrol of pest and diseases in soil ecosystems. In: Multitrophic interactions in soil, Eds., Sikora, R.A., S. Growen,, R. Hausschild,, S Kiewnick, Gent, Belgium, pp: 251-258.
- Sikora, R.A., 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol., 30:245-270.
- Sorwli F. K. and L. R. Mytton (1986): Nitrogen limitations to field bean productivity: A comparison of combined nitrogen applications with Rhizobium inoculation .Volume 94, Number 2, 267-275.
- Yahalom, E., Okon, Y., Dovrat, A., 1987. Azospirillum effects on susceptibility to Rhizobium nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. Can. J. Microbiol. 33, 510-514.

### **Desarrollo de formulacion de biofertilizante con rizobias**

**Responsable:** Mayra Claros y Noel Ortuño

#### **Compendio:**

La fijación biológica del nitrógeno en las leguminosas es muy importante, por lo que la inoculación a la planta con bacterias fijadoras es esencial. En este trabajo se validó el protocolo más utilizado en la producción de rizobias en sustrato sólido (Turba). Se trabajó con cuatro cepas de haba seleccionadas como las más eficientes de la colección de la Fundación PROINPA y dos cepas de arveja de la variedad yesera de la localidad de Anzaldo. Se concluyó que el protocolo utilizado para la multiplicación masiva de *Rhizobium* spp. de haba y arveja ha sido validado. Para el caso de la multiplicación masiva de *Rhizobium* spp. de arveja se vio una mejor multiplicación comparado con el de haba esto se puede dar a que los rizobios de arveja son cepas de Cochabamba.

**Palabras claves:** *Rhizobium* spp., haba, arveja, turba.

#### **73. Objetivo:**

El objetivo de este trabajo es validar el protocolo para la producción masiva de *Rhizobium* spp. en turba, para rizobios de haba y arveja.

#### **74. Hipótesis**

El protocolo que se utiliza en la multiplicación masiva de *Rhizobium* spp. es universal.

#### **75. Revisión de literatura**

El *Rhizobium* es un género de bacteria de suelo que infecta las raíces de las leguminosas que pueden fijar nitrógeno atmosférico. El *Rhizobium* entra a la raíz de la planta y se establece entre ellos una relación simbiótica, donde la leguminosa suministra a la bacteria carbono como fuente de energía y la bacteria proporciona nitrógeno inorgánico fácilmente utilizable por la planta. Posteriormente, se establece una transferencia (de sustancias y elementos) bidireccional, de la bacteria a la planta y de la planta a la bacteria y comienza el proceso simbiótico. (CENIAP HOY, 2007)



Los inoculantes son productos biológicos fabricados a base de un material acarreador o soporte (en la mayoría de los casos se emplea suelo de turba) y de un caldo de bacterias crecidas en un medio de cultivo. La función de los inoculantes es la de proveer a las plantas de la familia de las leguminosas un alto porcentaje del nitrógeno que la planta requiere para su desarrollo y producción, esto debido a la capacidad de las bacterias de hacer disponible el nitrógeno atmosférico (Acuña, O. 1996).

Una vez que se tiene máximo crecimiento de la bacteria ( $10^{10}$  cel. /ml de caldo) esta se adiciona a un material acarreador o soporte que debe presentar varias características: alto contenido de materia orgánica, textura muy fina, alta capacidad de retención de humedad y bajo pH. dentro de estos materiales el más empleado es el suelo de turba, el cual se origina en sitios que permanecen la mayor parte del año bajo inundación (León et,al., 1986).

La explotación agrícola de cepas de *Rhizobium* seleccionadas que son altamente efectivas en la fijación de nitrógeno depende de la disponibilidad de una tecnología de inoculación en la cual la cepa se cultiva en forma masiva, se incorpora en un material que sirve como soporte en el que sobrevivirá durante su distribución y estancia en el mercado, lo que permitirá introducirlas en el suelo en cantidades adecuadas para que nodulen a las leguminosas sembradas.

## **76. Materiales y métodos**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Material biológico**

Se trabajó con las cuatro cepas de haba seleccionadas como las más eficientes de la colección de la Fundación PROINPA.

Se trabajó con dos cepas de arveja de la variedad yesera. Estas muestras fueron colectadas en Anzaldo.

#### **4.1.2 Material de laboratorio**

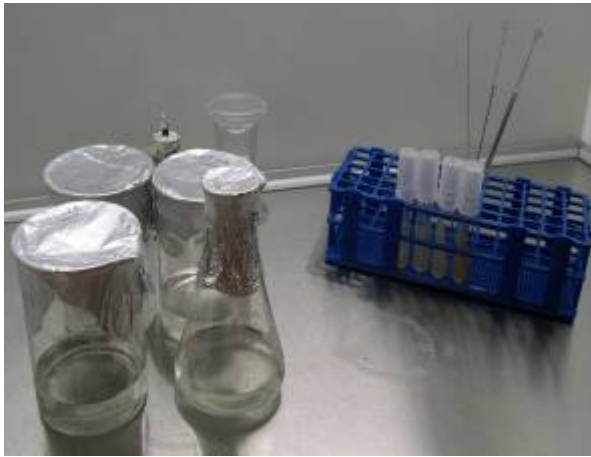
Se utilizaron erlenmeyers de 250 ml con medio LM, medio LMA, asas de siembra, espátula de Drigalski, papel aluminio, marcador, agitador incubador, autoclave, bolsas autoclavables, masking tape, cámara de flujo laminar, turba molida, microscopio, agua destilada, placas Petri, cámara fotográfica, micropipetas, pipetas, bolsas de plástico de alta densidad, balanza digital, Cámara de Neubauer, jeringas estériles, libreta de registro, sellador de bolsas.

### **4.2 Método**

La producción en gran escala se realiza mediante un proceso en dos etapas: el desarrollo del rhizobio en cultivo líquido y su uso para la impregnación de la turba (Vincente, 1975). Con este método se han obtenido cultivos con alto número inicial de rizobios que se pueden conservar por largo tiempo. Pero se requiere un cuidado considerable en la esterilización inicial y en el manipuleo aséptico posterior.

#### **3.2.1. Multiplicación en medio líquido**

Para la multiplicación en medio líquido se preparó el medio LM en los erlenmeyers de 250 ml. una para cada cepa (Figura 1). Posteriormente se inoculó con las cepas de *Rhizobium* spp. y se pusieron en el agitador orbital (Figura 2) por el lapso de siete días donde alcanzó una concentración  $10^8$ .



### 3.2.2. Preparación de la turba

Según la metodología expresada por Vicente (1975) la humedad de la turba deberá ser de 55% en base a peso seco. En el manual de producción de inoculantes del CIAT, 1994 mencionan que se debe neutralizar la turba para obtener un buen crecimiento de las bacterias ya que esta es de naturaleza ácida.

Para este propósito se llenaron bolsas de 500gr. con 250 gr de turba humectada con 250 cc de agua destilada (Figura 4), y se la neutralizó con 7,5gr. de cal apagada. Figura 3



Figura 3. Neutralización de la turba



Posteriormente se cerraron las bolsas con sellador de plástico (Figura 5) pasándolas a autoclavar por 3 horas a 120 °C (Figura 6). Se dejaron enfriar dentro la autoclave hasta el día siguiente.



### 3.2.3. Preparación del inoculante

Cuando el *Rhizobium* ha alcanzado el fin de su fase exponencial en fermentador o erlenmeyer y la turba ha sido preparada, el caldo con bacterias es incorporado en el soporte previo control de pureza por tinción de gram. (CIAT, 1994)

Las bolsas de turba fueron inoculadas con 10 cc del cultivo con una concentración de  $10^8$  tanto en las rizobias de haba como las de arveja. Se utilizó una jeringa estéril. (Figura 7 y 8)



Después de la impregnación del caldo en la bolsa, se sella el agujero con cinta adhesiva. Una vez sellada la bolsa se procede a homogenizar el medio manualmente moviendo de un lado a otro la turba tratando de impregnarla toda. Al mismo tiempo se identificaron las bolsas. (Figura 9)



### Figura 9. Bolsas inoculadas

Los cultivos se incubaron a 28 °C por dos semanas. Se refrigeraron a 4 – 8°C hasta su uso.

## 77. Resultados

### 5.1. Concentración de *Rhizobium* spp. de Haba

En el caso de las rizobias de haba se tuvo un crecimiento inicial en promedio de  $10^7$  UFC/ml inoculando a turba e incubando nuevamente la población se aumentó significativamente llegando a poblaciones de  $10^9$  UFC/ml que para un inóculo inicial esta en el rango de lo normal bueno. Cuadro 1. Figura 10.

Cuadro 1. Concentración de *Rhizobium* spp. en haba

Cepa	Concentración inóculo	Concentración turba
HC2T7A	8,50E+07	9,60E+09
USC2T7A	6,30E+07	8,20E+09
GC3T7A	3,50E+07	5,00E+09
H3T7A	4,50E+06	6,30E+08

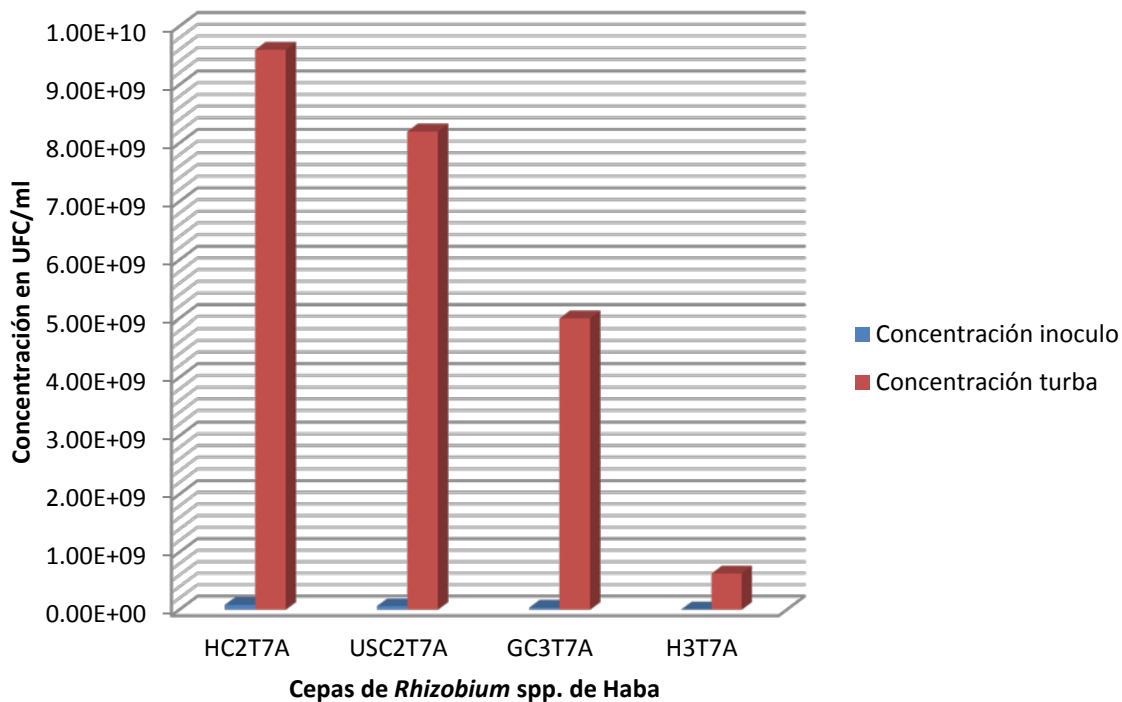


Figura 10. Concentración de *Rhizobium* spp. en haba

## 5.2. Concentración de *Rhizobium* spp. de arveja

La concentración inicial de inoculo de *Rhizobium* spp. de arveja fue de  $10^9$  UFC/ml considerándose una buena concentración para comenzar una multiplicación masiva en turba. Se vio reflejada en el alcance de multiplicación en turba ya que se alcanzo una concentración de  $10^{11}$  UFC/ml siendo una excelente concentración para un formulado comercial de rizobios. Cuadro 2. Figura 11.

Cuadro 2. Concentración de *Rhizobium* spp. en arveja

Cepa	Concentración inoculo	Concentración turba
R1	5,75E+09	3,70E+11
R2	4,25E+09	5,80E+11

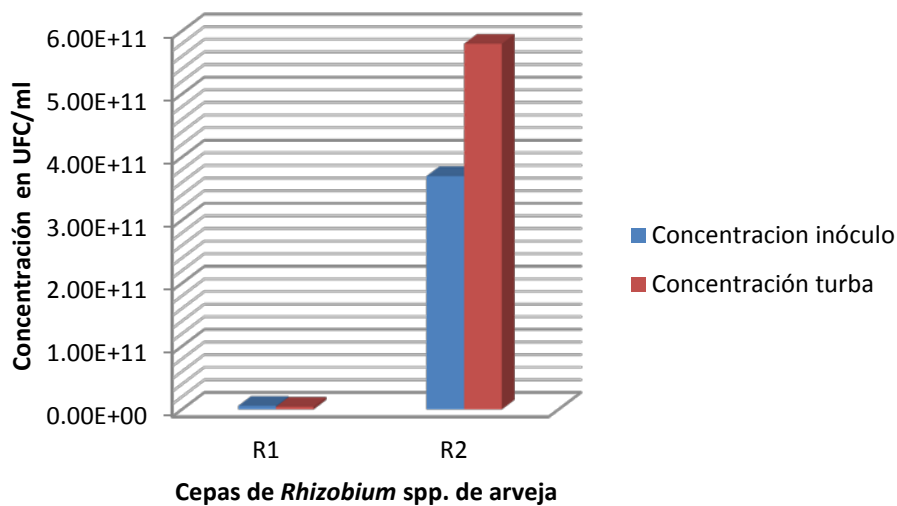


Figura 11. Concentración de *Rhizobium* spp. en arveja

## 78. Discusión

Una forma de optimizar la fijación biológica del nitrógeno es la inoculación de la semilla antes de la siembra; mediante esta práctica se aporta a la semilla un buen número de rizobios funcionales, capaces de infectar la raíz y fijar efectivamente el  $N_2$  del aire. En general, la práctica de la inoculación sigue dos fines, uno es mantener la fertilidad del suelo y otro es aumentar el rendimiento. (CIAT, 1994)

Por lo tanto, es importante estudiar las formas de inocular estos rizobios funcionales a las plantas y en este trabajo se demuestra que es posible mediante la preparación de un inóculo con un soporte de turba de dos fases, siendo en la segunda donde se obtiene mayor número de rizobios funcionales.

## 79. Conclusiones

Con todo lo analizado se puede concluir que el protocolo utilizado para la multiplicación masiva de *Rhizobium* spp. de haba y arveja está validado.

En el caso de *Rhizobium* spp. de arveja se vio una mejor multiplicación comparado con el de haba esto se puede dar a que los rizobios de arveja son cepas de Cochabamba.

## 80. Recomendaciones

A futuro si se piensa utilizar este protocolo en cantidades masivas recomiendo hacer diferentes pruebas para optimizar la humedad con el tipo de turba que se utilizara.

## 81. Bibliografía consultada

- Vincente, J. M. 1975. Manual Práctico de rizobiología. Ed. Hemisferio Sur S.R.L. Buenos Aires – Argentina. 151-157 pp.
- CENIAP HOY es una Revista técnica digital de las ciencias del agro, editada por el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Tierras de Venezuela.

- LEON, E.; ACUNA, O.; RAMIREZ, C. 1986. Reproducción y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* en inoculantes a base de turba de Costa Rica. *Ceiba*27 (1): 139-145.
- ACUÑA, O. 1996. Manejo y tecnología de la fijación biológica de Nitrógeno en leguminosas de importancia agrícola. X Congreso Nacional Agronómico / II Congreso de Suelos. Costa Rica. 90 p.
- CIAT, 1994. La Producción de Inoculantes por el Proyecto Rhizobiología. Santa Cruz – Bolivia. 29 p.

### Evaluación de medio líquido para producción de rizobias

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### Compendio:

Los microorganismos se asocian con las plantas en interacciones simbióticas y mutualistas; por ejemplo, las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, conocidas como rizobios, realizan fijación simbiótica de nitrógeno con las leguminosas, en un proceso considerado de alta eficiencia (CIAT, 1988; The Nitragin Company, 1990). El primer paso en la producción de inoculantes de leguminosas es la multiplicación masiva de una cepa rizobial seleccionada en medio líquido (Thompson, 1991). Como es el caso de muchas otras fermentaciones industriales, la economía de dicho proceso es en gran medida por el precio de los medios de multiplicación utilizados. Por este motivo el objetivo de este trabajo fue de encontrar el mejor medio líquido para la multiplicación masiva de *Rhizobium spp.*

Utilizando el aislado HC2T7A de crecimiento rápido con cinco medios: LMA (Testigo), Caldo de papa (PD), Caldo de soya, Caldo de arveja y Caldo de cebada. El diseño utilizado fue Completamente Aleatorio con dos repeticiones y cinco tratamientos. Las mejores concentraciones del ensayo se obtuvieron con el caldo de soya ( $3,33E+09$ ) y el testigo LM ( $2,88E+09$ ). Por lo que se concluye que ambos medios son buenos para la multiplicación de la cepa HC2T7A de *Rhizobium spp.* Aunque el caldo de soya es ligeramente mejor que el testigo.

**Palabras claves:** Medio Líquido, multiplicación masiva, *Rhizobium spp.*

#### 82. Objetivos:

Encontrar el mejor medio líquido para la multiplicación masiva de *Rhizobium spp.*

#### 83. Hipótesis

La multiplicación masiva de bacterias es viable en medios líquidos por lo que se quiere encontrar el más económico.

#### 84. Revisión de literatura

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Martínez & Hernández 1999). La asociación *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre un 1/3 y un 1/2 del nitrógeno fijado de la atmósfera y se basa en el intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbioses ya que para las plantas el nutriente más limitante es el nitrógeno.



Los microorganismos se asocian con las plantas en interacciones simbióticas y mutualistas; por ejemplo, las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, conocidas como rizobios, realizan fijación simbiótica de nitrógeno con las leguminosas, en un proceso considerado de alta eficiencia (CIAT, 1988; The Nitragin Company, 1990).

Las leguminosas son ricas como fuente de proteína tanto para la alimentación humana como para el ganado. La producción de plantas leguminosas depende en gran medida de la fijación de nitrógeno que se realiza en simbiosis por el *Rhizobium* específico. Existen cerca de 19,000 especies de leguminosas (Allen & Allen 1980), la mayoría aún no aprovechadas por el hombre. Sólo se conocen los simbioses para alrededor del 1% de las leguminosas que forman nódulos fijadores de nitrógeno (Martínez-Romero & Caballero-Mellado 1996).

El primer paso en la producción de inoculantes de leguminosas es la multiplicación masiva de una cepa rhizobial seleccionada en medio líquido (Thompson, 1991). Como es el caso de muchas otras fermentaciones industriales, la economía de dicho proceso es en gran medida por el precio de los medios de multiplicación utilizados.

Varios medios se han propuesto para el cultivo de *Rhizobium spp.* En general, la mayoría contiene extracto de levadura (YE) o agua de levadura como una fuente de nitrógeno, para los factores de crecimiento, manitol, sacarosa o glicerol como fuente de carbono y sales minerales. Siendo medios caros para la producción masiva. En este trabajo se modificará los medios de cultivo para que sean aptos para la producción de inoculante de haba a mediana escala utilizando materiales disponibles de alimentos para evitar las complicaciones derivadas de la utilización de sustratos complejos.

## **85. Materiales y métodos**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1. Material biológico**

Se seleccionó una de las cepas elite de la colección tomando en cuenta los resultados del trabajo realizado por Claudia Cecilia Salazar. El aislado fue HC2T7A de crecimiento rápido.

#### **4.1.2. Material de laboratorio**

Cámara de Flujo Laminar, incubadora con agitación orbital, microscopio, autoclave, agua destilada, alcohol, erlenmeyers de 250 ml, medio LMA y LM papa, soya, arveja, gasa para filtrar, azúcar, placa petri, asa de platino, papel aluminio, parafilm, cámara figuragráfica, libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero, Cámara de Neubauer.

Los medios utilizados fueron:

- LMA (Testigo)
- Caldo de papa (PD)
- Caldo de soya
- Caldo de arveja
- Caldo de cebada

### **4.2. METODOS**

#### **4.2.1. Siembra del aislado HC2T7A**

La preparación del medio de cultivo LMA consiste en pesar para un litro de medio,  $K_2HPO_4$  0,5 gr.,  $MgSO_4$  0,2 gr., NaCl 0,1 gr., Manitol 1 gr. Agar 3 gr., azul de bromotimol al 0,5% 5 ml., Extracto de levadura 1 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 1000 cc, se tapa el recipiente con papel aluminio y se autoclava durante 15 minutos a 20 psi de presión. Luego se procede al plaqueado del medio de cultivo en una Cámara de Flujo y se espera que enfríe para refrigerarlo. Dejar reposar por lo menos 24 horas.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra del aislado. Cerrando la caja petri con parafilm, se identifica la cepa mas la fecha.

Incubar a 28 °C por espacio de una semana ó hasta tener un buen crecimiento de la bacteria.

#### **4.2.2. Preparación de los medios de cultivo**

Para la preparación del medio de cultivo testigo LM se preparó 500 ml que contiene  $K_2HPO_4$  0,25 gr.,  $MgSO_4$  0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 500cc. Dividiéndolo en dos partes una para cada repetición.

Para los caldos de papa, soya, cebada y arveja se pesaron 80 gr. de cada uno y se puso a hervir por 15 minutos en 200 ml de agua. Pasado el tiempo se filtró el caldo y se puso en los erlenmeyers conteniendo cada uno 8 gr. de azúcar se mezcló todo muy bien y se enrasó a 400 ml. con agua destilada. Luego se dividió en dos partes de 250 ml cada una para tener dos repeticiones de cada uno.

Posteriormente se autoclavaron todos los caldos por 15 min. a 20 psi de presión.

#### **4.2.3. Inoculación de CH2T7A en los 5 medios de cultivo**

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyers. La duración de la prueba fue de 7 días y en el octavo día se hicieron las lecturas de la concentración de la cepa en cada medio con su respectiva repetición.

#### **4.2.4 Crecimiento en medios de cultivo**

Cada organismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para la generación de energía y biosíntesis celular. Los elementos de ese medioambiente que son utilizados para el crecimiento celular se refieren como nutrientes (Todar, 2002).

Los medios de cultivo, ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985).

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos (Ertola, 2009)

Por lo anteriormente citado el diseño de los medios de cultivo responderán entonces a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación.

### 4.3. Variable de Respuesta

La variable de respuesta a ser utilizada en es el conteo de conidias, para obtener el la concentración de cada caldo de multiplicación de la cepa HC2T7A de *Rhizobium spp.*

#### 4.3.1. Conteo de conidias (Concentración)

Para el conteo de conidias se puso 1 ml del caldo de cultivo en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyó 1 a 2 veces más dependiendo cuan concentrada estaba la solución. Se llevo esta solución al hematocímetro para el conteo de conidias.

Para el montaje de la suspensión se tomó 10 ml con una micropipeta colocando 5ml en cada ranura de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la lectura en las dos cámaras, en los cuadrados más pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\#de\ conidias/ml = Suma\ de\ los\ 5C.S. \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

### 4.4. Diseño Experimental

Los datos fueron analizados bajo el diseño Completamente Aleatorio con 2 repeticiones, donde una unidad experimental fue constituida por un erlenmeyer de 250 ml., los tratamientos fueron cada uno de los 5 medios de cultivo LMA (Testigo), Caldo de papa, Caldo de soya, Caldo de arveja y Caldo de cebada (Figura 1).



Figura 1. Multiplicación de la bacteria en la incubadora orbital

#### 4.4. Modelo estadístico

El porcentaje de crecimiento se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + \xi_{ij}$$

$i = 1,2$ ; unidades experimentales por tratamiento  
 $j = 1,2,3,4,5$ ; medios de cultivo  
 $y_{ij}$  = # de conidias en la  $i$ -ésima unidad experimental con  $j$ -ésimo medio de cultivo.  
 $\mu$  = Media general  
 $\alpha_j$  = Efecto fijo del  $j$ -ésimo medio.  
 $\xi_{ij}$  = Efecto aleatorio de los residuales

## 86. Resultados y Discusión

### 5.1 Concentración de conidias al octavo día

Según el análisis de varianza de la concentración de conidias al octavo día (Cuadro 1) existen diferencias significativas entre medios de cultivo con la cepa HC2T7A ( $Pr < 0,001$ ) (Figura 1). Lo cual indica que la cepa se comporta diferente con cada medio de cultivo.

Cuadro 1. Análisis de varianza

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr>F
Medio de cultivo	4	2.2790427E1 9	5.6976068E1 8	65.5 3	0.0002* *
Error	5	4.3473767E1 7	8.6947534E1 6		
total	9	2.3225165E1 9			

\*\* al 99 %

Dada la diferencia significativa entre medios de cultivo (Fig. 1) Las medias para cada uno de los medios de cultivo (Figura 2) demuestran que hubo diferencias entre ellos (Cuadro 2). Donde los medios LM y caldo de soya son iguales y mayores a los demás medios, lo cual indica que el medio LM y el caldo de soya son los que registraron una mayor concentración de conidias de la cepa HC2T7A. Por otra parte, los caldos de papa, cebada y arveja son iguales y con menores concentraciones comparados con los medios LM y caldo de soya. Por lo que el medio LM y el caldo de soya son más recomendables para la multiplicación en medio líquido de la cepa HC2T7A.



Figura 2. Crecimiento de *Rhizobium spp.* en los diferentes medios.

Cuadro 2. Comparación de medias entre medios

Cepa	LS media
Arveja	2,94E+07
Cebada	2,97E+07
LM	2,88E+09
Papa	3,75E+07
Soya	3,33E+09

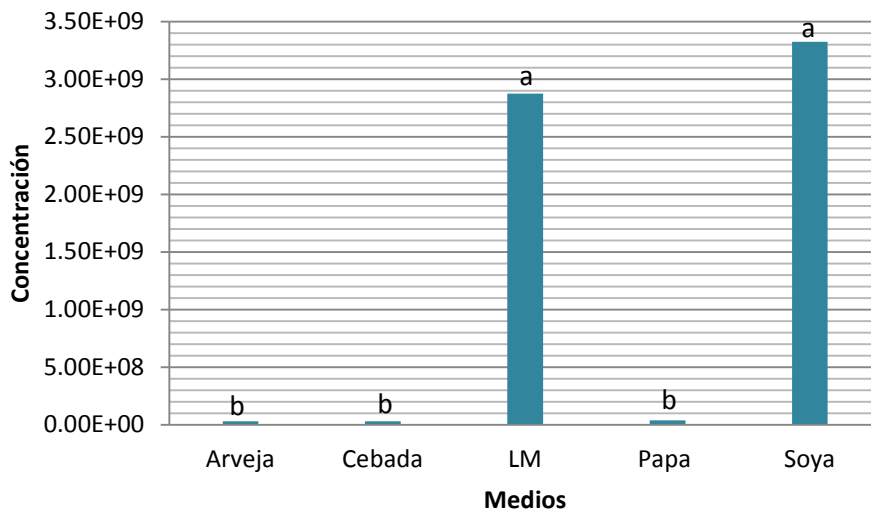


Figura 1. Concentración final de *Rhizobium spp.* en los diferentes medios

## 87. Conclusiones

Dado los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

- Las mejores concentraciones del ensayo se obtuvieron con el caldo de soya (3,33E+09) y el testigo LM (2,88E+09). Por lo que se concluye que ambos medios son buenos para la multiplicación de la cepa HC2T7A de *Rhizobium spp.* Aunque el caldo de soya es ligeramente mejor que el testigo.

## 88. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar el caldo de soya para la multiplicación de la cepa HC2T7A de *Rhizobium spp.* Aunque se deberá seguir haciendo pruebas con este en volúmenes mayores, para ver si tiene el mismo comportamiento de multiplicación.

- Se recomienda ver otros caldos para la multiplicación de esta cepa y para encontrar el más eficiente y económico.

## 89. Bibliografía consultada

**Allen, O. N. y Allen, E. K.** 1980. The *Leguminosae*; a source book of characteristics, uses, and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, WI.

**CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT)**, 1988. The legume-Rhizobium symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. Cali. United Nations Development Programme (UNDP). 172 p.

**Ertola R., Yantorno O. y Mignone C., Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA** [Consultado 4-2009]  
<http://www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm>

**Herrera, A.** 1985. Manual de medios de cultivo. Editorial Científico-Técnica. Ministerio de Cultura. C. Habana.

**McFarland, J.** 1970. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. pp. 435-437. In: H.D. Campbell, S.J. Garvey, E.N. Cremer y H.D. Sussdorf (eds.). Methods in immunology. Benjamin. New York.

**Martínez, E. & G. Hernández.** (Eds.) 1999. Highlights of Nitrogen Fixation Research. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.

**Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci., 15:113-140.

**Todar, K.** Nutrition and growth of bacteria. [Consultado 8-2002]. Disponible en:  
<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>.

**Thompson, J.A.** 1991. Legume inoculant production and quality control, pp. 15-32. In: Report on the Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. J.A. Thompson (Ed.). Rome. 145 pp.

**Young, J. P. W.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. pp. 43-86. In: Stacey, Burns, y Evans (Eds.). Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York, U.S.A.

## Evaluación de medio líquido para la producción masiva de rizobias

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Mayra Claros**

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:**

Los microorganismos se asocian con las plantas en interacciones simbióticas y mutualistas; por ejemplo, las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, conocidas como rizobios, realizan fijación simbiótica de nitrógeno con las leguminosas, en un proceso considerado de alta eficiencia (CIAT, 1988; The Nitragin Company, 1990). El

primer paso en la producción de inoculantes de leguminosas es la multiplicación masiva de una cepa rizobial seleccionada en medio líquido (Thompson, 1991). Como es el caso de muchas otras fermentaciones industriales, la economía de dicho proceso es en gran medida por el precio de los medios de multiplicación utilizados. Por este motivo el objetivo de este trabajo fue de encontrar el mejor medio líquido para la multiplicación masiva de *Rhizobium spp.* y el uso del espectrofotómetro para tener una tabla comparativa, para futuras lecturas de concentración con la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.* Se evaluó el aislado GC3T7A de crecimiento rápido con siete medios: LM (Testigo), Caldo de soya, Caldo de avena, Caldo de lenteja, Caldo de maíz, Caldo de trigo y Caldo de cebada. El diseño utilizado fue Completamente Aleatorio con 3 repeticiones y siete tratamientos. La mejor concentración del ensayo se obtuvo con el caldo de maíz ( $1,94E+08$ ). Los caldos de lenteja, trigo y cebada obtuvieron similares concentraciones. Por lo que se concluye que estos son los mejores caldos para la multiplicación de la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.* Con la utilización del espectrofotómetro se obtuvo las ODs que se pueden utilizar como referencia para saber concentraciones con la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.* en los medios de cultivo estudiados.

**Palabras claves:** Medio Líquido, *Rhizobium spp.*, multiplicación masiva.

#### 90. Objetivos:

- Encontrar el mejor medio líquido para la multiplicación masiva de *Rhizobium spp.*
- Uso del espectrofotómetro para tener una tabla comparativa, para futuras lecturas de concentración con la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.*

#### 91. Hipótesis

La multiplicación masiva de bacterias es viable en medios líquidos por lo que se quiere encontrar el más económico.

#### 92. Revisión de literatura

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Martínez & Hernández 1999). La asociación *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre un 1/3 y un 1/2 del nitrógeno fijado de la atmósfera y se basa en el intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbioses ya que para las plantas el nutriente más limitante es el nitrógeno.

Los microorganismos se asocian con las plantas en interacciones simbióticas y mutualistas; por ejemplo, las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, conocidas como rizobios, realizan fijación simbiótica de nitrógeno con las leguminosas, en un proceso considerado de alta eficiencia (CIAT, 1988; The Nitragin Company, 1990).

Las leguminosas son ricas como fuente de proteína tanto para la alimentación humana como para el ganado. La producción de plantas leguminosas depende en gran medida de la fijación de nitrógeno que se realiza en simbiosis por el *Rhizobium* específico. Existen cerca de 19,000 especies de leguminosas (Allen & Allen 1980), la mayoría aún no aprovechadas por el hombre. Sólo se conocen los simbioses para alrededor del 1% de las leguminosas que forman nódulos fijadores de nitrógeno (Martínez-Romero & Caballero-Mellado 1996).

El primer paso en la producción de inoculantes de leguminosas es la multiplicación masiva de una cepa rizobial seleccionada en medio líquido (Thompson, 1991). Como es el caso de

muchas otras fermentaciones industriales, la economía de dicho proceso es en gran medida por el precio de los medios de comunicación utilizados.

Varios medios se han propuesto para el cultivo de *Rhizobium spp.* En general, la mayoría contiene extracto de levadura (YE) o agua de levadura como una fuente de nitrógeno, para los factores de crecimiento, manitol, sacarosa o glicerol como fuente de carbono y sales minerales. Siendo medios caros para la producción masiva. En este trabajo se modificará los medios de cultivo para que sean aptos para la producción de inoculante de haba a mediana escala utilizando materiales disponibles de alimentos para evitar las complicaciones derivadas de la utilización de sustratos complejos.

## **93. Materiales y métodos**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1. Material biológico**

Se seleccionó una de las cepas elite de la colección tomando en cuenta los resultados del trabajo realizado por Claudia Cecilia Salazar. El aislado fue GC3T7A de crecimiento rápido.

#### **4.1.2. Material de laboratorio**

Cámara de Flujo Laminar, incubadora con agitación orbital, microscopio, espectrofotómetro, cubetas de espectrofigurametría, autoclave, agua destilada, alcohol, erlenmeyers de 25 ml, medio LMA, LM, soya, lenteja, avena, maíz, trigo, cebada, gasa para filtrar, azúcar, placa petri, asa de platino, papel aluminio, parafilm, cámara figuragráfica, libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero, Cámara de Neubauer.

Los medios utilizados fueron:

- LM (Testigo)
- Caldo de soya
- Caldo de avena
- Caldo de lenteja
- Caldo de maíz
- Caldo de trigo
- Caldo de cebada

### **4.2. METODOS**

#### **4.2.1. Siembra del aislado GC3T7A**

La preparación del medio de cultivo LMA consiste en pesar para un litro de medio,  $K_2HPO_4$  0,5 gr.,  $MgSO_4$  0,2 gr., NaCl 0,1 gr., Manitol 1 gr. Agar 3 gr., azul de bromotimol al 0,5% 5 ml., Extracto de levadura 1 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 1000 cc, se tapa el recipiente con papel aluminio y se autoclava durante 15 minutos a 20 psi de presión. Luego se procede al plaqueado del medio de cultivo en una Cámara de Flujo y se espera que enfríe para refrigerarlo. Dejar reposar por lo menos 24 horas.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra del aislado. Cerrando la caja petri con parafilm, se identifica la cepa mas la fecha.

Incubar a 28 ° C por espacio de una semana ó hasta tener un buen crecimiento de la bacteria.

#### **4.2.2. Preparación de los medios de cultivo**



Para la preparación del medio de cultivo testigo LM se preparó 500 ml que contiene  $K_2HPO_4$  0,25 gr.,  $MgSO_4$  0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 500cc. Utilizando solo 45 ml del medio dividido en tres partes de 15 ml para cada repetición.

Para los caldos de soya, avena, lenteja, maíz trigo y cebada se pesaron 9 gr. de cada uno y se puso a hervir por 15 minutos en 25 ml de agua. Pasado el tiempo se filtró el caldo a un recipiente conteniendo 0.9 gr de azúcar se mezcló todo muy bien y se enrasó a 45 ml. con agua destilada. Luego se dividió en tres partes de 15 ml cada una para tener tres repeticiones de cada una.

Posteriormente se autoclavaron todos los caldos por 15 min. a 20 psi de presión.

#### **4.2.3. Inoculación de GC3T7A en los 5 medios de cultivo**

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyers. La duración de la prueba fue de 12 días en el día 12 se tomaron las lecturas de la concentración de la cepa y se sembraron en placas.

#### **4.2.3. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia**

Para el conteo del número de colonias de bacterias que se desarrollan en la muestra después de cierto tiempo y temperatura de incubación, se usó la técnica de dilución y vaciado en placa de agar (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

La técnica consiste en realizar diluciones seriadas (en varias etapas), de diez en diez. Para realizar estas diluciones (Figura 1), se añade 1 ml de la suspensión bacteriana a 9 ml (en medio estéril o solución salina, igualmente estéril). Se agita vigorosamente para diluir las células y el proceso se repite cuantas veces sea necesario. Las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa de Drigalsky de cristal estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie. Las placas se incuban a 28°C durante 24 horas. (Gamazo *et al.*, 2005)

Después de 24 horas se hace el conteo de las colonias, las placas a contar no deberán presentar menos de 30 ni más de 300 colonias porque se dificulta tener un conteo exacto. Calcular con estos datos el número inicial de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) aplicar la fórmula. (Gamazo *et al.*, 2005)

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{ml sembrados en placa}}$$

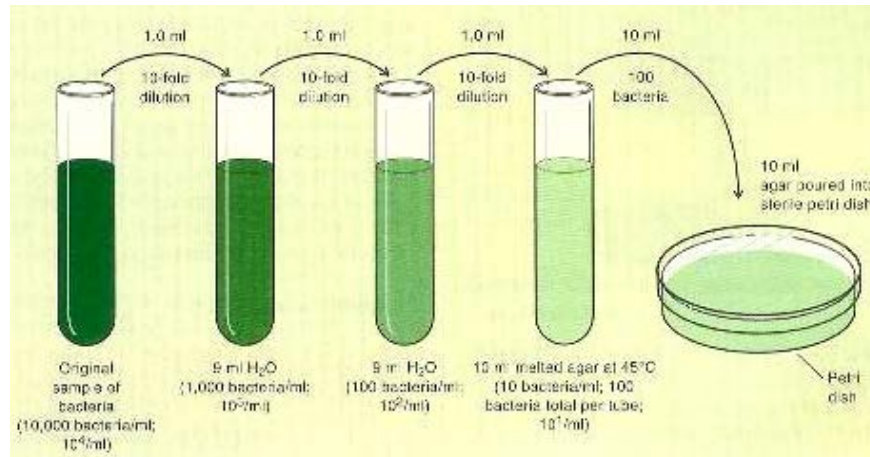


Figura 1. Diluciones seriadas

#### 4.2.4. Espectrofigurimetría

La espectrofigurimetría es el método de [análisis óptico](#) más usado en las investigaciones químicas y [biológicas](#). El [espectrofotómetro](#) es un instrumento que permite comparar la [radiación](#) absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de [solute](#), y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Es utilizado en los laboratorios de química para la cuantificación de sustancias y microorganismos. Nos indica indirectamente si una sustancia está presente en la muestra, es medida en OD (Optical Density). (1)



Figura 1. Espectrofotómetro utilizado en el ensayo.

#### 4.2.5. Crecimiento en medios de cultivo

Cada organismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para la generación de energía y biosíntesis celular. Los elementos de ese medioambiente que son utilizados para el crecimiento celular se refieren como nutrientes (Todar, 2002).

Los medios de cultivo, ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985).

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede

detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos (Ertola, 2009)

Por lo anteriormente citado el diseño de los medios de cultivo responderán entonces a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación.

#### 4.3. Variables de Respuesta

La variable de respuesta a ser utilizada es el conteo de conidias, para obtener la concentración de cada caldo de multiplicación de la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.*

#### 4.4. Diseño Experimental

Los datos fueron analizados bajo el diseño Completamente Aleatorio con 3 repeticiones, donde una unidad experimental fue constituida por un erlenmeyer de 25 ml., los tratamientos fueron cada uno de los medios de cultivo Caldo de soya, Caldo de avena, Caldo de lenteja, Caldo de maíz, Caldo de trigo, Caldo de cebada y LM (Testigo) (Figura 2).



Figura 2. Multiplicación de la bacteria en la incubadora orbital

#### 4.5. Análisis estadístico

El porcentaje de crecimiento se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$y_{ij} = \mu + \alpha_j + \xi_{ij}$$

$i = 1, 2, 3$ ; unidades experimentales por tratamiento

$j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ ; medios

$y_{ij}$  = Porcentaje de multiplicación en la  $i$ -ésima unidad experimental con  $j$ -ésimo medio.

$\mu$  = Media general

$\alpha_j$  = Efecto fijo del  $j$ -ésimo medio.

$\xi_{ij}$  = Efecto aleatorio de los residuales

#### 94. Resultados y Discusión

### 5.1. Concentración de conidias al octavo día

Según el análisis de varianza de la concentración de conidias al doceavo día (Cuadro 1) existen diferencias significativas entre medios de cultivo con la cepa GC3T7A ( $Pr < 0,0329$ ) (Figura 2). Lo cual indica que la concentración de la cepa es diferente con al menos un medio de cultivo.

Cuadro 1. Análisis de varianza

Fuente	Gl.	Suma de cuadrados	Cuadrado de medias	Valor de F	Pr>F
Medio de cultivo	6	64.6432965	10.7738827	3.24	0.0329**
Error	14	46.6065835	3.3290417		
Total	20	111.2498800			

\*\* al 95

Dada la diferencia significativa entre medios de cultivo (Fig. 2) Las medias para cada uno de los medios de cultivo (Figura 3) demuestran que hubo diferencias entre ellos (Cuadro 2). Donde la concentración de la cepa en los caldos de maíz, trigo, cebada y lenteja son similares y mayores a los demás medios de cultivo, lo cual indica que entre los medios de cultivo utilizados, los caldos de maíz, trigo, cebada y lenteja serían los más recomendados para la multiplicación de la cepa GC3T7A.

Por otra parte, no hay diferencia entre los caldos de soya, avena y LM Siendo estos los que han registrado menores concentraciones comparados con los medios de maíz, lenteja, trigo y cebada. (Figura 3) (Fig. 2).



Figura 3. Crecimiento de *Rhizobium spp.* en los diferentes medios.

Cuadro 2. Comparación de medias entre medios de cultivo.

Cepa	LS media
Avena	1,47E+08

Cebada	1,68E+08
Lenteja	1,79E+08
LM	1,44E+08
Maíz	1,94E+08
Soya	1,52E+08
Trigo	1,80E+08

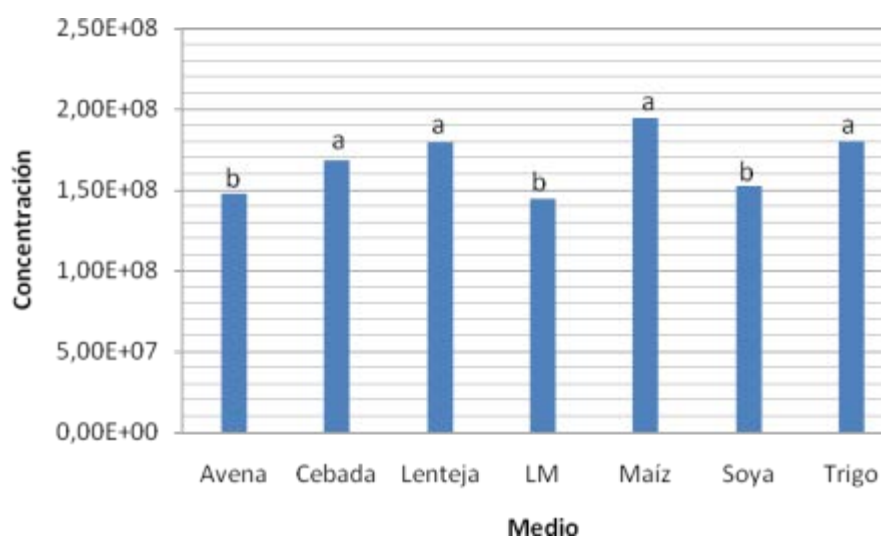


Figura 2. Concentración final de *Rhizobium spp.* en los diferentes medios

La relación entre la UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia por ml) y OD (Densidad Óptica) nos sirve para tener una tabla comparativa de concentraciones para hacer lecturas directas en el espectrofotómetro para la cepa GC3T7A en los medios de cultivos de LM, avena, trigo, soya, lenteja, cebada, maíz figuras 3,4,5,6,7,8,9 respectivamente.

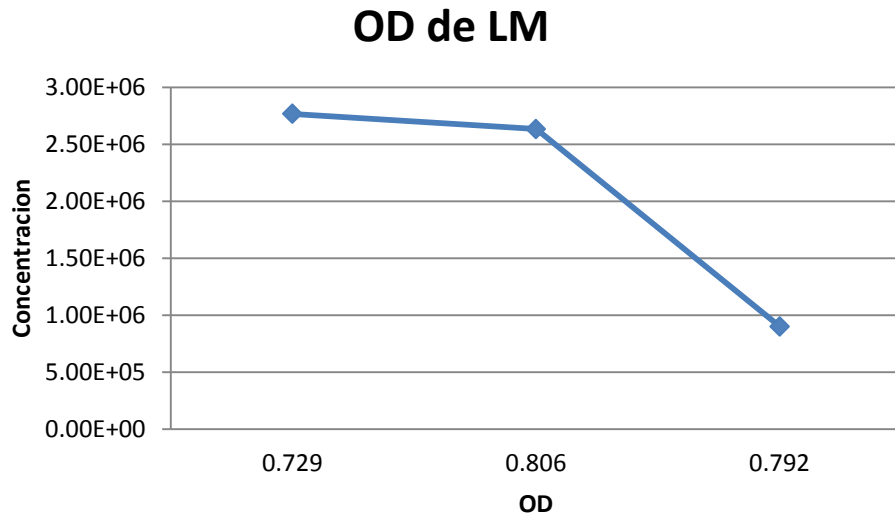


Figura 3. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo LM

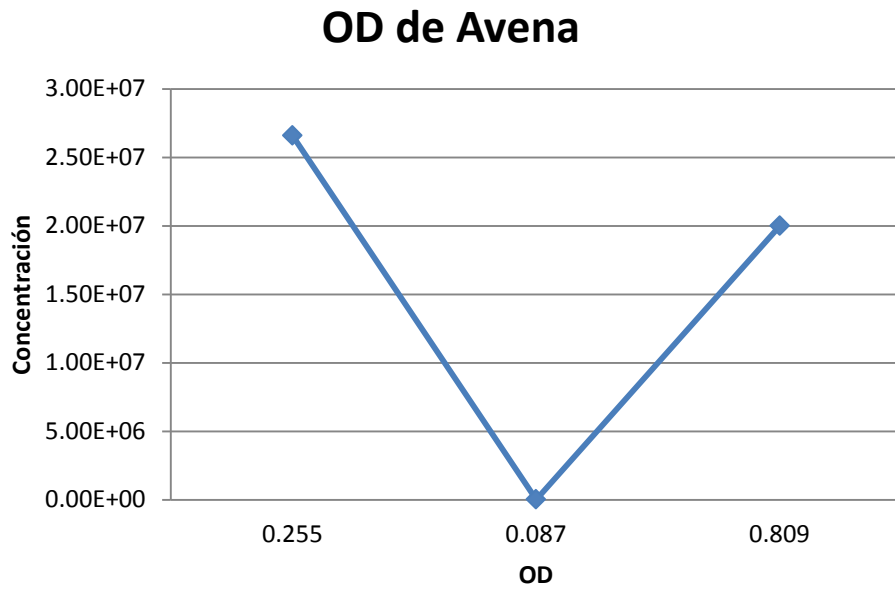


Figura 4. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de avena.

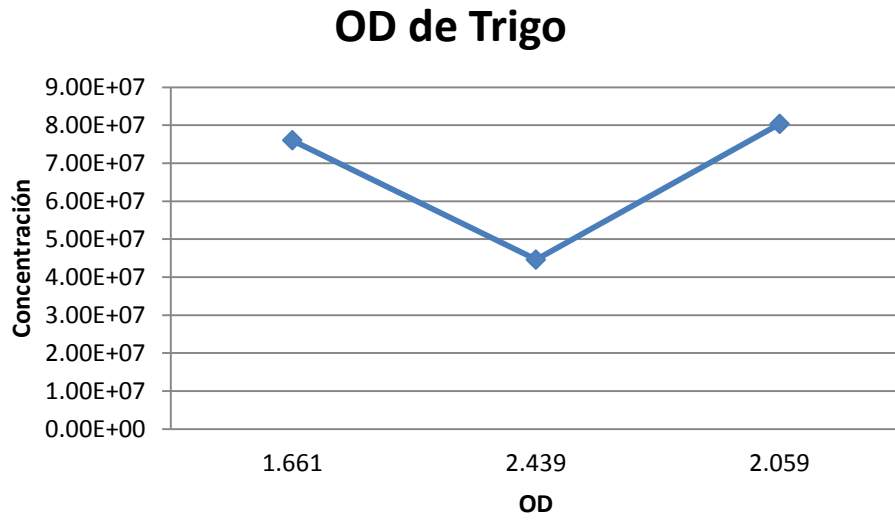


Figura 5. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de trigo

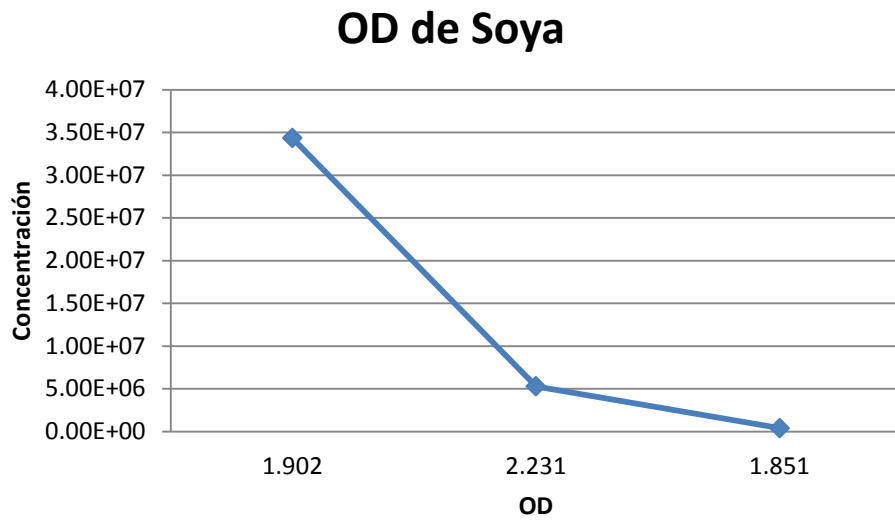


Figura 6. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de soya

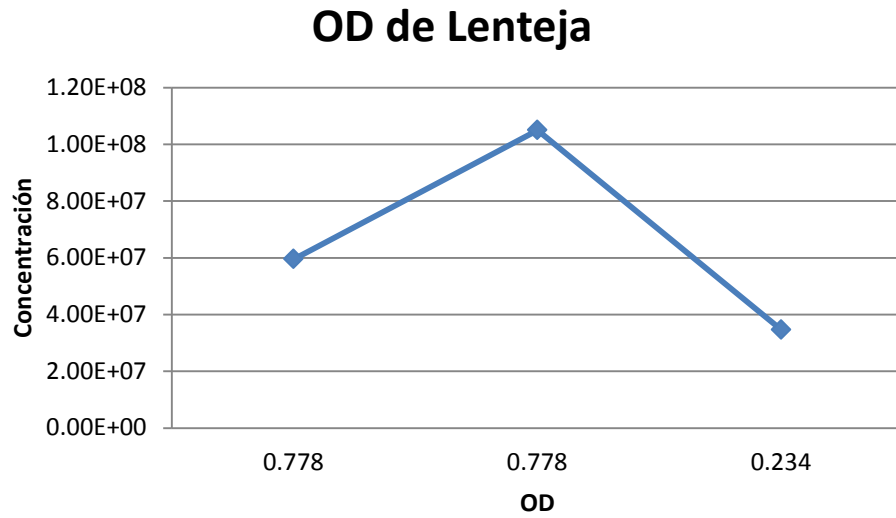


Figura 7. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de lenteja

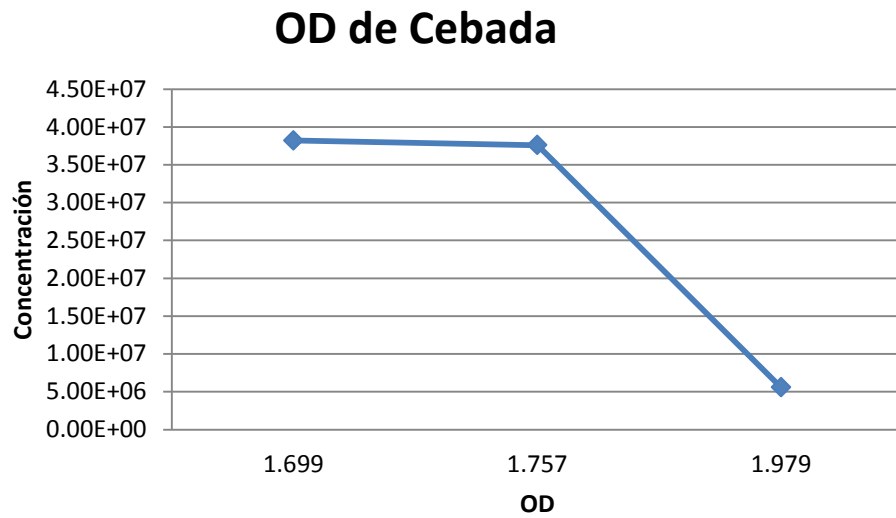


Figura 8. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de Cebada



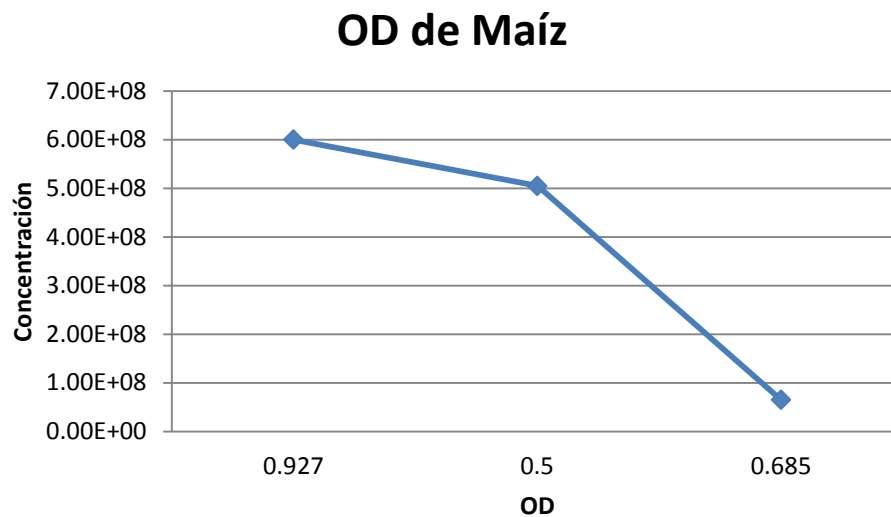


Figura 9. Figura comparativa entre UFC/ml con OD del medio de cultivo caldo de Maíz

## 95. Conclusiones

Por los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

- La mejor concentración del ensayo se obtuvo con el caldo de maíz ( $1,94E+08$ ). Los caldos de lenteja, trigo y cebada obtuvieron similares concentraciones. Por lo que se concluye que estos son los mejores caldos para la multiplicación de la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.*
- Los caldos de soya, avena y el medio testigo LM tuvieron similares concentraciones pero son superados por los caldos de lenteja, trigo y cebada por lo que se concluye que no son tan buenos para la multiplicación de la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.*
- Con la utilización del espectrofotómetro se obtuvo las ODs que se pueden utilizar como referencia para saber concentraciones con la cepa GC3T7A de *Rhizobium spp.* en los medios de cultivo estudiados.

## 96. Recomendaciones

- Se recomienda seguir haciendo pruebas con el caldo de maíz, lenteja, trigo y cebada en volúmenes mayores, para ver si tienen el mismo comportamiento.
- Se recomienda ver otros caldos para la multiplicación de esta cepa.

## 97. Bibliografía consultada

Allen, O. N. y Allen, E. K. 1980. *The Leguminosae; a source book of characteristics, uses, and nodulation.* The University of Wisconsin Press, Madison, WI.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1988. The legume-Rhizobium symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. Cali. United Nations Development Programme (UNDP). 172 p.

Ertola R., Yantorno O. y Mignone C., Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA [Consultado 4-2009] <http://www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm>

Ferrera-Cerrato R, González-Chávez MC, Rodríguez-Mendoza MN (1993) *Manual de Agromicrobiología*. Trillas. México. 142 pp.

C. Gamazo, I. López-Goñi, R. Díaz, 2005. Manual práctico de Microbiología. 3ª edición. Editorial MASSON S.A. Barcelona, España.

Herrera, A. 1985. Manual de medios de cultivo. Editorial Científico-Técnica. Ministerio de Cultura. C. Habana.

McFarland, J. 1970. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. pp. 435-437. In: H.D. Campbell, S.J. Garvey, E.N. Cremer y H.D. Sussdorf (eds.). *Methods in immunology*. Benjamin. New York.

Martínez, E. & G. Hernández. (Eds.) 1999. *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.

Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 15:113-140.

Todar, K. Nutrition and growth of bacteria. [Consultado 8-2002]. Disponible en: <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>.

Thompson, J.A. 1991. Legume inoculant production and quality control, pp. 15-32. In: Report on the Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. J.A. Thompson (Ed.). Rome. 145 pp.

Wikipedia enciclopedia virtual <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofigurametr%C3%ADa>

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. pp. 43-86. In: Stacey, Burns, y Evans (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York, U.S.A.

### **Efecto de 6 cepas de Rhizobium en tres variedades de arveja**

**Responsable:** Juan José Calisaya.

**Equipo de Trabajo:** Noel Ortuño, Mayra Claros, Juan José Calisaya.

#### **Compendio.**

Con el objetivo de determinar el efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, se inocularon 7 aislados de rhizobium en el cultivo de la arveja. Los resultados muestran que la inoculación favoreció la formación de nódulos las mismas que tienden a desarrollarse casi en toda la raíz en comparación a los testigos que solo formaron nódulos en la parte intermedia y apical. Así mismo, la formación de nódulos favoreció el desarrollo de la planta aunque este efecto vario entre las variedades, Sin embargo, las cepas y1cd, criolla1b y criolla son las bacterias que se comportaron de forma similar entre

las tres variedades. Por lo que estas bacterias podrían utilizarse como promotores de crecimiento en el cultivo de la arveja.

**Palabras Claves. Rhizobium, Fijadoras de nitrógeno, Promotores de crecimiento**

#### **10. Objetivo.**

- Determinar el efecto de 7 cepas de rhizobium en tres variedades de arveja.

#### **11. Hipótesis.**

- Los aislados de rhizobium tienen el mismo efecto sobre las variedades.

#### **12. Revisión bibliográfica.**

La arveja es un cultivo ampliamente distribuido, por que las vainas verdes o las semillas secas son ricas en proteína y vitaminas. La arveja al igual que otras leguminosas es capaz de fijar y utilizar el nitrógeno atmosférico a través de la relación simbiótica con la bacteria Rhizobium. El cultivo así mejora el suelo, economiza la producción reduciendo el requerimiento y la adición de fertilizantes nitrogenados. Muchos investigadores han reportado los efectos benéficos de la inoculación con rhizobium (Rahman *et al.*, 1994; Solaiman, 1999). Así, Feng *et al.*, (1997) reportaron un incremento en el rendimiento de vainas por la inoculación con Rhizobium en la arveja. Así mismo, un incremento de 18% en el rendimiento de semillas fue observado con la inoculación de rhizobium (Tolkachev *et al.*, 1994). Por otra parte, Ahmed *et al.*, (2007) observaron mayor número de vainas. Resultados similares fueron reportados por Solaiman (1999) en garbanzo. Evans *et al.* (1993), Feng *et al.* (1997) en arveja.

Así mismo, Ahmed *et al.*, (2007) reportaron diferencias para longitud de vaina con la aplicación de Rhizobium en comparación a plantas no inoculadas. Resultados similares fueron reportados por Rabbani *et al.* (2005). Ahmed *et al.*, (2007) observaron también diferencias significativas para número de semillas por vaina los cuales fueron superiores a las plantas no inoculadas. Resultados similares fueron reportados por Rahman *et al.* (1994) en chickpea. Solaiman and Rabbani (2005) en arveja. Ahmed *et al.*, (2007) también reportaron diferencias para peso de 1000 semillas en arveja, Resultados similares fueron observados por Rabbani *et al.* (2005) en arveja.

Por otra parte, Erman *et al.* (2009), observaron diferencias para altura de planta número de tallos, número de nódulos, materia seca raíz y numero de vainas con la inoculación de rhizobium. Resultados similares fueron reportados por Jha y Singh (1996) e Idris y Sandhu (1981). Asi mismo, en otros estudios, He *et al.*, (2011), Santalla (2001); Giller (2001) y Fall *et al.*, (2003) observaron diferencias en la interacción entre Rhizobium y los cultivares. Por lo que la eficiencia de la fijación simbiótica depende del cultivar y el Rhizobium. Sin embargo, en el suelo se encuentran poblaciones silvestres de Rhizobium que compiten con las cepas inoculadas y las indígenas por nutrientes o por espacio (Li y Zhou 2002). Esto significa que las cepas introducidas tienen que competir con las silvestres. Aunque, la eficiencia de la fijación de nitrógeno y la habilidad de competir de una entrada no están necesariamente correlacionados (Romdhane, 2007).

#### **13. Materiales y métodos.**

### Ubicación del ensayo.

El ensayo se llevo a cado en los invernaderos de la FUNDACION PROINPA ubicada en la zona de El Paso.

### Materiales de laboratorio.

- 7 aislados de rhizobium.
- Placas Petri.
- Tubos ependorf
- Micropipeta.
- Microscopio.
- Placa Newver.
- Camara de Flujo
- Bisturi

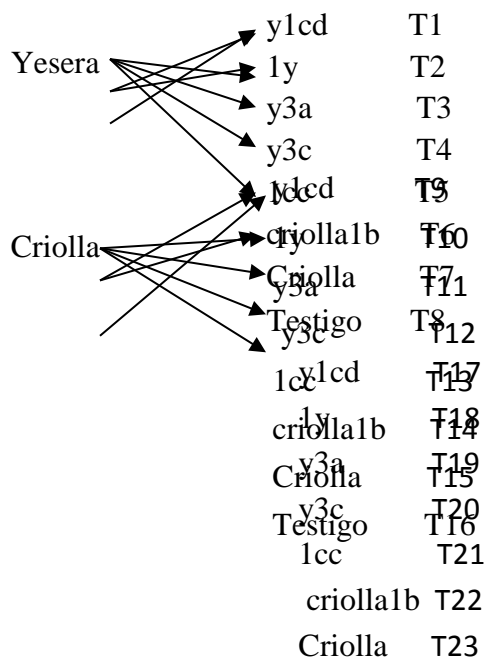
### Materiales de campo.

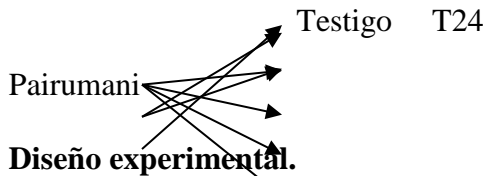
- Semilla de 3 variedades de arveja.
- Macetas de 2Kgr de capacidad.
- Suelo esterilizado.
- Fertilizante.
- Metro.

### Metodología.

#### Tratamientos.

Los tratamientos resultaron de la combinación de tres variedades de arveja con cada una de las cepas más un testigo, resultando un total de 21 tratamientos:





### **Diseño experimental.**

Los 24 tratamientos fueron evaluados bajo el diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Donde la unidad experimental fue constituida por una maceta de 2 kilogramos de capacidad.

### **Procedimiento de laboratorio.**

#### **Preparación del medio de cultivo**

Para la preparación del medio de cultivo LM se preparó 500 ml que contiene  $K_2HPO_4$  0,25 gr.,  $MgSO_4$  0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con  $H_2O$  destilada hasta 500cc. Dividiéndolo en pequeños erlenmeyers de 50 ml para la multiplicación de cada aislado. Posteriormente el medio se autoclavo por 15 min. a 20 psi de presión.

#### **Inoculación de rhizobium spp al medio LM**

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyers. La duración de la prueba fue de 7 días y en el octavo día se hicieron las lecturas de la concentración de la cepa.

#### **Conteo de conidios (Concentración)**

Para el conteo de conidias se puso 1 ml del caldo de cultivo en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyó 1 a 2 veces más dependiendo de la concentración de la solución para luego observar en el hematocímetro para el conteo respectivo. Para el montaje de la suspensión se tomó 10 ml con una micropipeta colocando 5ml en cada ranura de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la lectura en las dos cámaras, en los cuadrados más pequeños de  $0.0025 \text{ mm}^2$  cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\# \text{de conidias/ml} = \text{Suma de los } 5C.S. \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

### **Procedimiento de campo.**

El ensayo se realizo en macetas de 2 kilos de capacidad para lo cual se utilizo sustrato esterilizado con vapor de agua. La siembra se realizo colocando 4 semillas en la parte central de cada maceta; sin embargo, una semana después solo se dejo 2 plantas/maceta. La inoculación se realizo una semana después de la emergencia depositando 0,5 ml de rhizobium de los tubos eppendorf en el cuello de las 2 plantas (Figura 1).



**Figura 1. Inoculación de las plantas con bacteria fijadoras de nitrógeno.**

**Variables de respuesta.**

Las variables de respuesta se evaluaron en el momento de la cosecha:

- **Altura de planta.** La cual se evaluó como la distancia en centímetros desde el cuello de la planta hasta el ápice vegetativo.



**Figura 2. Altura de planta de planta de arvejas inoculadas con rhizobium.**

- **Número de vainas.** Para esta variable se realizó el conteo de vainas desarrolladas por la planta
- **Número de nódulos/planta.** Número de nódulos se evaluó bajo una escala donde: **baja**= menos de 15 nódulos, **media**= entre 15-50 nódulos y **alta**=mayor a 50 nódulos desarrollados encada una de las plantas
- **Longitud de la raíz.** Esta variable se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice de la raíz.

- **Peso de la planta.** La cual se evaluó tomando el peso de la parte foliar de la planta.
- **Peso de la raíz.** La misma que se evaluó tomando el peso de la raíz.
- **Color de los nódulos.** Para la cual se observó la coloración de los nódulos.
- **Forma de los nódulos.** Para la cual se observó la forma de los nódulos en la planta.

### **Análisis Estadístico.**

Los datos de las variables altura de planta, número de vainas, longitud de la raíz y peso de la raíz fueron evaluados bajo la distribución normal, previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el PROC MIXED del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{j(i)} + \gamma_k + \delta_{jk} + \varepsilon_{jk(i)}$$

Donde :

$i = 1,2,3,4$  bloques.

$j = 1,2,3$  variedades.

$k = 1,2,3,4,5,6,7,8$  cepas de Rhizobium

$y_{ijk}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  - esimo bloque donde se aplicó la  $k$  - esima cepa de rizhobium a la  $j$  - esima variedad.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  - esimo bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo de la  $j$  - esima variedad de arveja.

$\gamma_k$  = Efecto fijo de la  $k$  - esima cepa de rizhobium.

$\delta_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción de la  $j$  - esima variedad y la  $k$  - esima cepa de rizhobium.

$\varepsilon_{jk(i)}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_e^2)$ .

Las variables cantidad, color, forma y posición de los nódulos fueron evaluados bajo los modelos multinomiales con el PROC CATMOD del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico.

$$\log \frac{\pi_{ijk}}{\pi_{ijc}} = \eta_k + \alpha_{ik} + \beta_{jk} + \gamma_{ijk}$$

$i = 1,2,3$  variedades

$j = 1,2,3,4,5,6,7,8$  cepas de Rhizobium

$k = 1,2,\dots, c$  categorías de respuesta

$\pi_{ij}$  = Probabilidad de que un individuo sea clasificada en la  $k$ -ésima respuesta con la aplicación de la  $j$ -ésima cepa de Rhizobium en la  $i$ -ésima variedad.

$\eta_k$  = Media general de logit de la  $k$ -ésima categoría de respuesta.

$\alpha_{ij}$  = Efecto fijo de la  $i$ -ésima variedad de arveja sobre la  $k$ -ésima categoría de respuesta.

$\beta_{jk}$  = Efecto fijo de la  $j$ -ésima cepa sobre la  $k$ -ésima respuesta.

$\gamma_{ijk}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima variedad y la  $j$ -ésima cepa sobre la  $k$ -ésima respuesta

## 14. Resultados.

### Cantidad de nódulos.

Para la variable cantidad de nódulos se observaron diferencias entre los aislados de rhizobium (Figura 3). Aunque el testigo también presentó desarrollo de nódulos, las mismas fueron en menor proporción en comparación a los aislados de Rhizobium que desarrollaron nódulos en mayor proporción (>40%). Por lo que la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno puede incrementar el desarrollo de los nódulos.

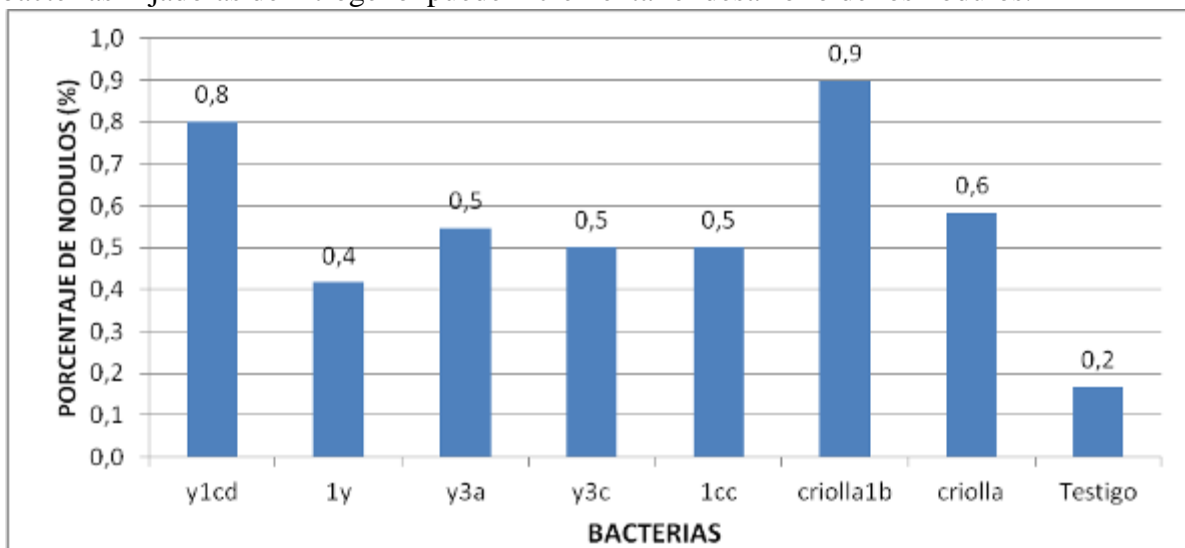


Figura 3. Formación de nódulos con la aplicación de 7 aislados de rhizobium.

### Ubicación de los nódulos.

Por otra parte, las bacterias **1cc**, **y1cd** desarrollaron mayor cantidad de nódulos en toda la raíz. **Criollo 1b** y **1y** desarrollaron mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia-apical. En cambio la bacteria **y3a** desarrollo mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia e intermedia-apical. La bacteria **criolla** desarrollo nódulos tanto en la parte



basal, intermedia-apical y en toda la raíz. Por otra parte el testigo desarrollo nódulos en la parte intermedia apical (Figura 4, Figura 5). Aunque estos fueron en menor cantidad.



a) Cepa y1cd



b) Cepa 1y



c) Cepa y3c



d) 1cc



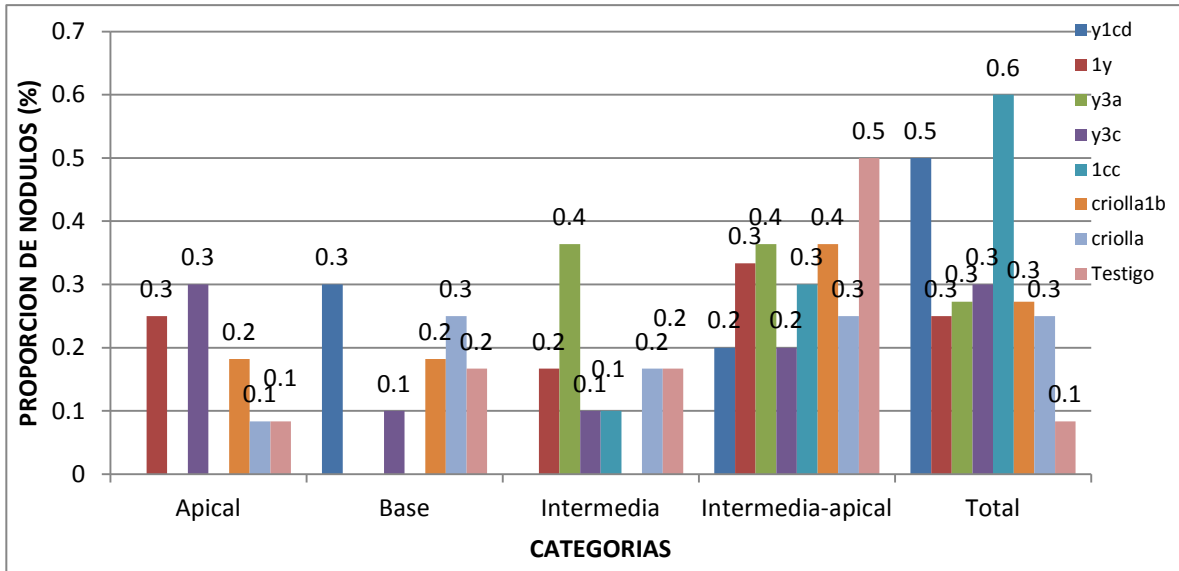
e) Cepa Criolla1b



f) Cepa

**Criolla**

**Figura 4(a,b,c,d,e,f). Formación de nódulos con siete aislados de rhizobium.**



**Figura 5. Ubicación de la formación de nódulos.**

**Forma de los nódulos.**

Por otra parte, se observó con mayor frecuencia nódulos de forma ovalada tanto en los aislados de rhizobium como en el testigo (Figura 5). Aunque los aislados **y1cd**, **1y**, **y3c**, **1cc**, **criolla1b**, **criolla** y el **testigo** desarrollaron nódulos de forma arriñonado (Figura 6). Sin embargo, Las bacterias **1y**, **y3a** y **criolla** también formaron nódulos de forma acorazado (Figura 7).



**Figura 5 (Cepa:y1cd). Nódulos de forma ovalada.**



Figura 6 (Cepa: y3c). Nódulos de forma arriñonada.

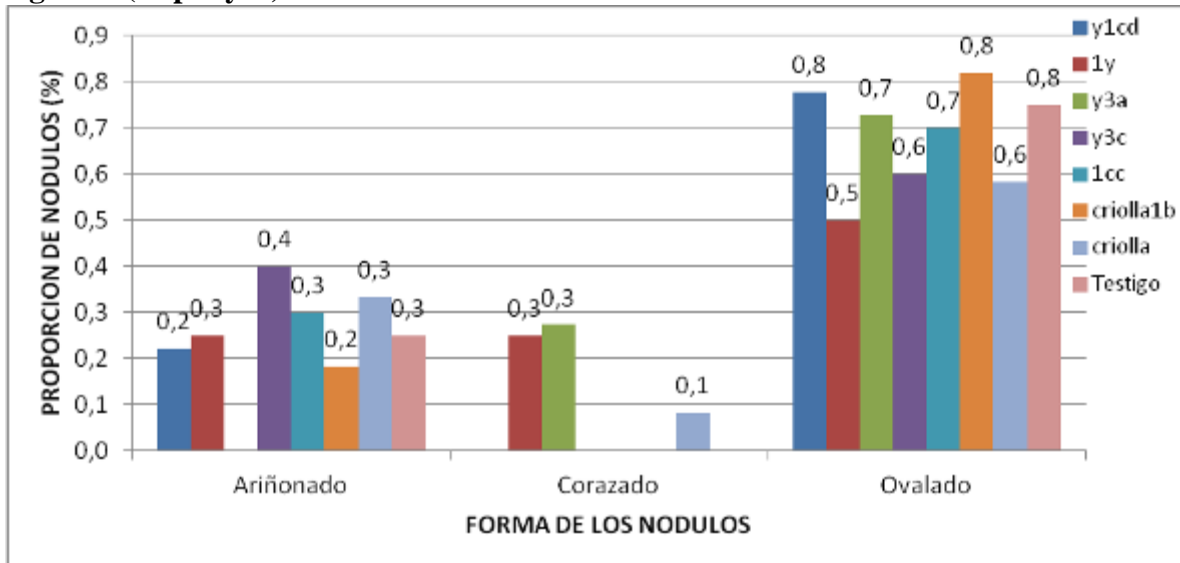


Figura 7. Forma nodular de siete aislados de rhizobium.

**Color de los nódulos.**

Por otro parte, se observó en mayor proporción nódulos de color veiz (Figura 8b) y blanco verduzco tanto en los 7 aislados de rhizobium como en el testigo. Lo cual posiblemente por que las plantas fueron cosechadas cuando las vainas estaban secas. Sin embargo, también se observó nódulos de color blanco (Figura 8a) y rosado lo cual indica que la formación de nódulos es continua. También se observó nódulos de color verde solo en los aislados **y3a** y en la **criolla** (Figura 9).

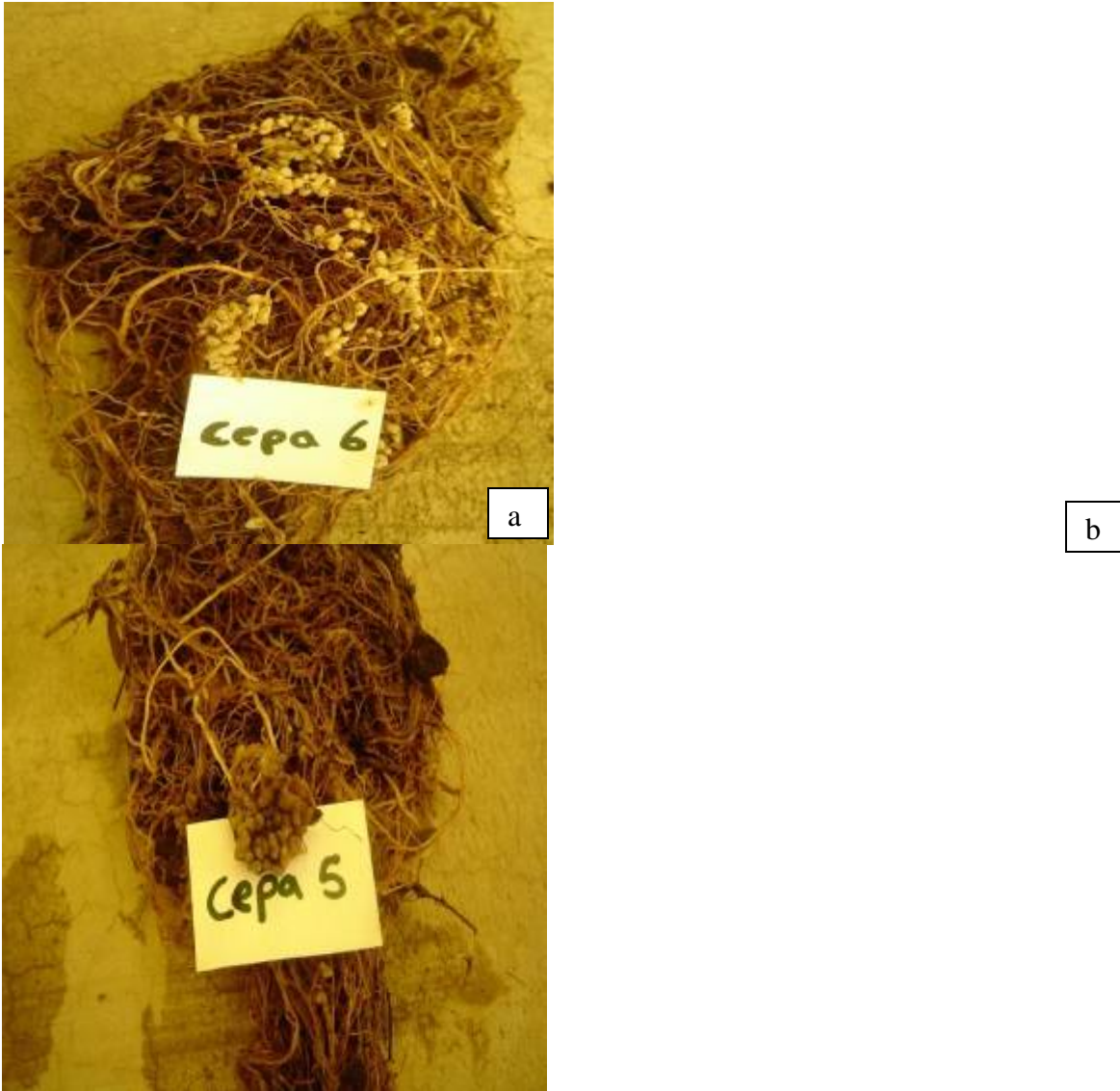
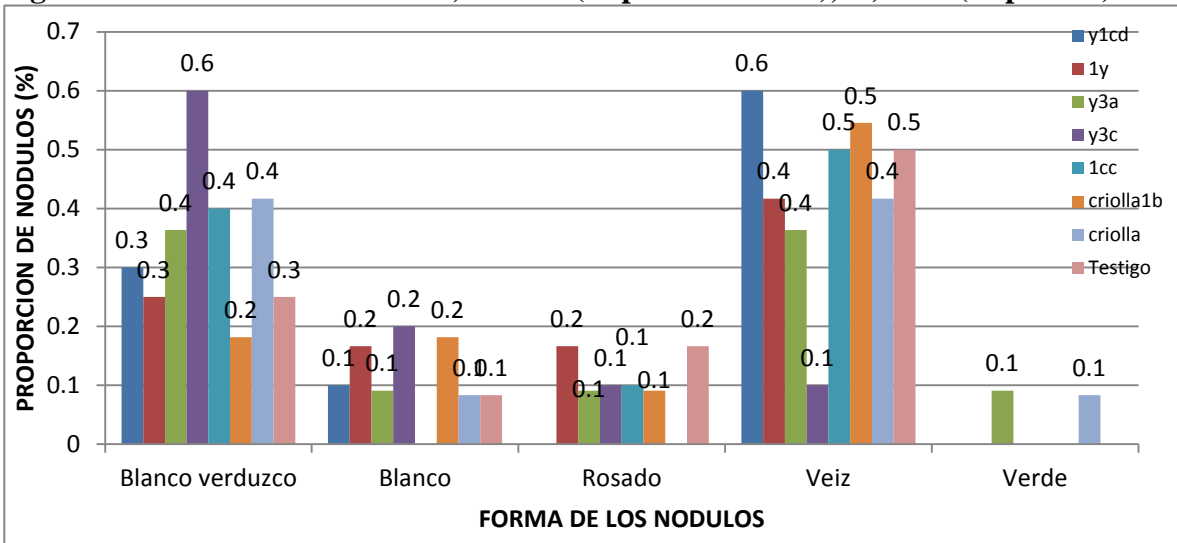


Figura 8. Color de los nódulos a) Blanco (Cepa: Criolla 1b), b) Veis (Cepa: 1cc).



**Figura 9. Color de los nódulos de 7 aislados de rhizobium. Variables Agronómicas.**

El cuadro de análisis de varianza muestra variación entre los bloques para todas las variables bajo estudio por lo que el diseño experimental fue apropiado (Cuadro 1).

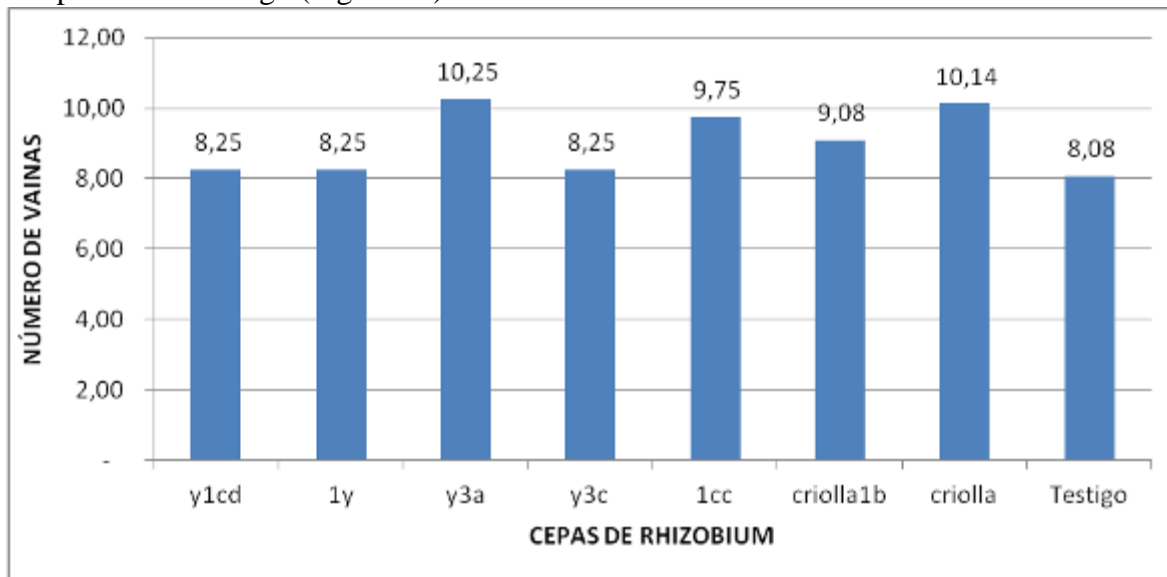
**Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza de 6 variables en el cultivo de la arveja.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Número de vainas	Altura de planta	Volumen de la raíz	Longitud de la vaina	Peso seco de la raíz	Peso seco foliar
Bloque	3	0,025	0,090	0,074	0,015	0,148	0,005
Variedades	2	1,252*	117,000**	6,872**	44,385**	330,550**	3,185**
Cepa	7	0,257	3,111	1,315	0,059	3,383	0,013
Variedad*Cepa	14	0,240	2,064	1,575*	0,223*	5,131**	0,084*
Residual	69	0,276	1,474	0,926	0,123	1,859	0,045
CV%		17,822	7,756	17,613	6,558	24,108	8,738
Media		9,010	249,250	31,096	5,348	5,566	11,849

\*,\*\* Significativo al 0,05 y 0,01 nivel de significancia.

**Vainas por planta.**

Para la variable número de vainas no se estimaron diferencias entre los aislados ni entre la combinación de cepas\*variedades (Cuadro 1). Sin embargo, los 7 aislados de rhizobium favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de vainas en la planta en comparación al testigo (Figura 10).

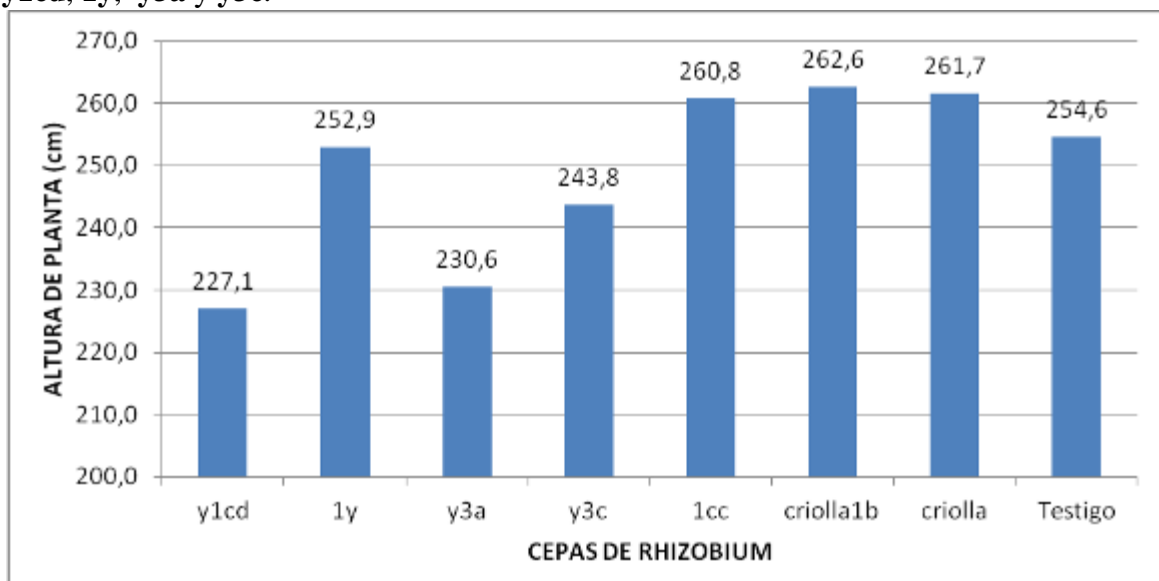


**Figura 10. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de número de vainas.**

**Altura de planta.**

Así mismo, no se estimaron diferencias entre las cepas y la interacción de cepas\*variedad para la variable altura de planta (Cuadro 1). Por lo que, la altura de planta fue similar con la aplicación de los aislados de rhizobium y el testigo (Figura 11). Aunque

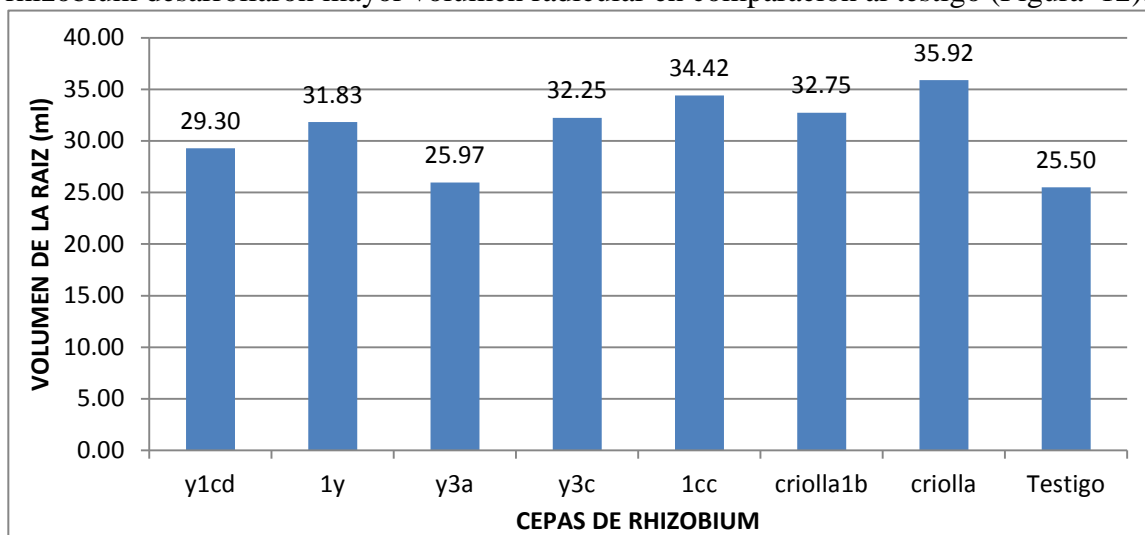
la altura de planta fue relativamente inferior al testigo con la inoculación de la bacteria **y1cd**, **1y**, **y3a** y **y3c**.



**Figura 11. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de la altura de planta.**

### Volumen radicular.

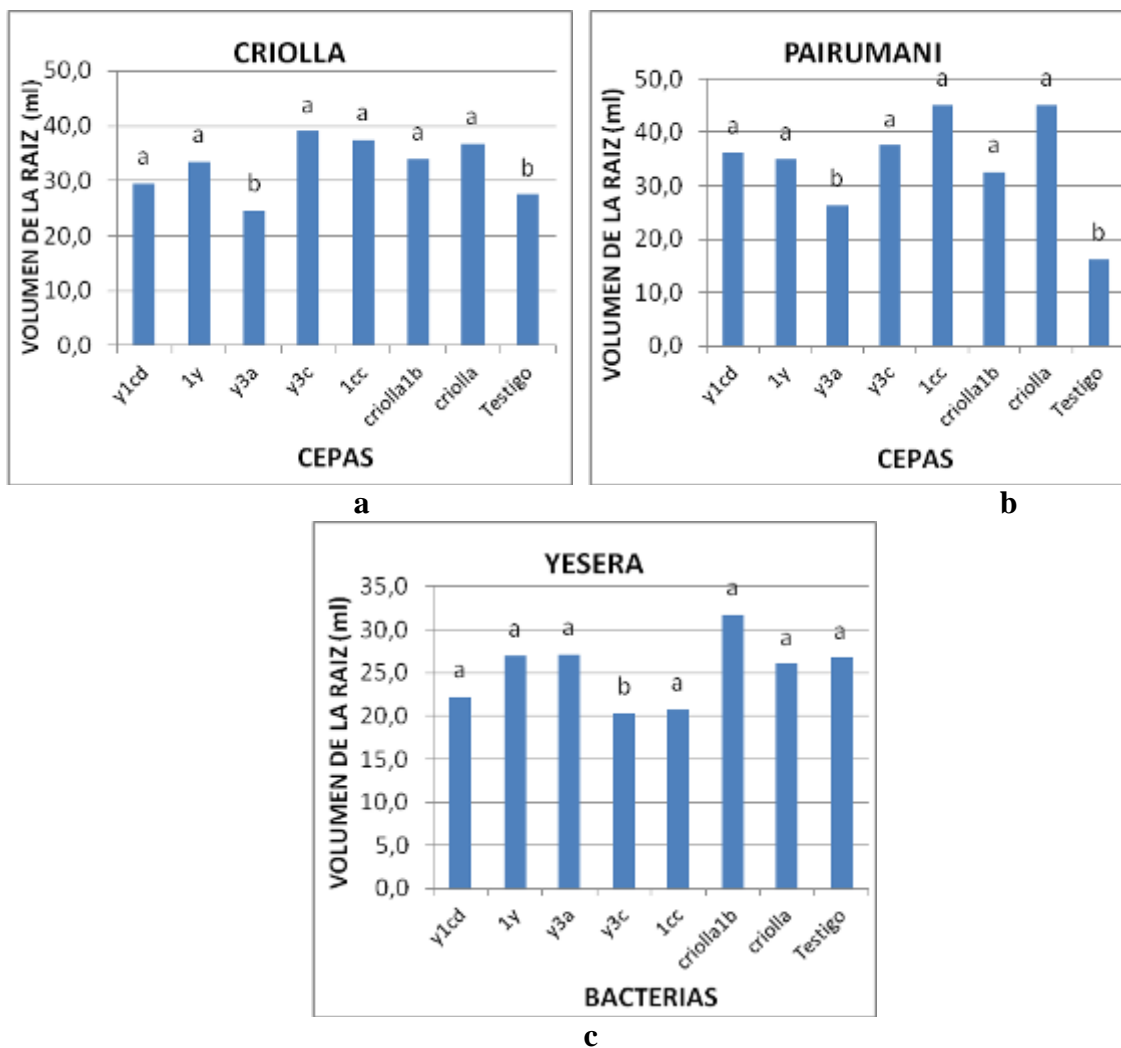
Por otra parte, tampoco se estimaron diferencias entre los aislados de rhizobium para la variable volumen radicular (Cuadro 1). Sin embargo, las plantas a las que se inoculo rhizobium desarrollaron mayor volumen radicular en comparación al testigo (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo de la altura de planta.**

Sin embargo, se observo diferencias significativas para la interacción de Variedad\*cepas (Cuadro1). Lo cual indica que algunas cepas responden mejor con alguna de las variedades. Donde todas las cepas tuvieron un efecto con la variedad criolla a excepción del aislado **y3a** (Figura 13a). Sin embargo, en la variedad Pairumani la cepa

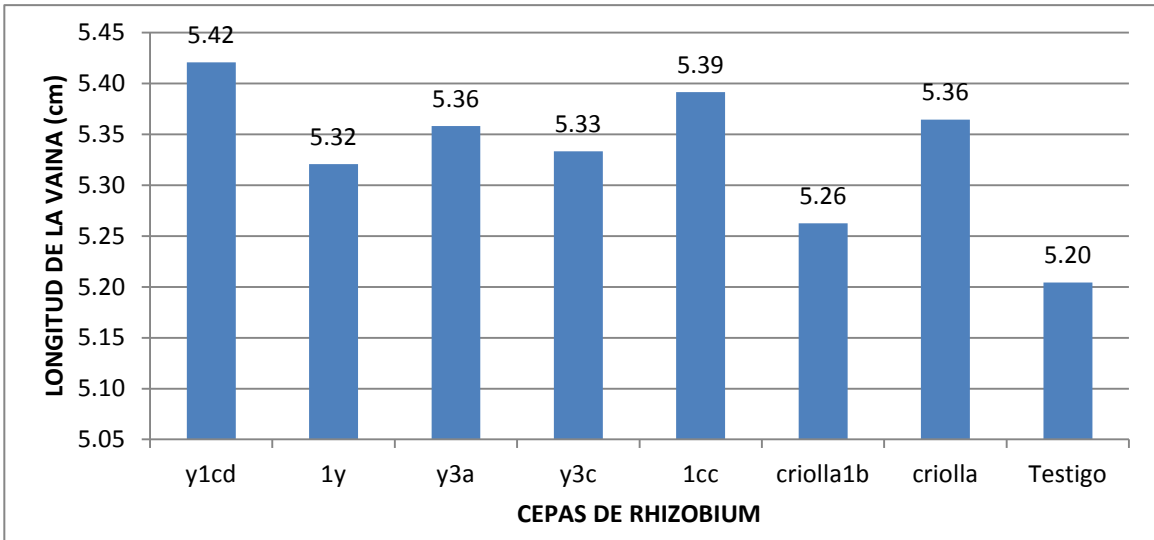
**y3a** tuvo un menor efecto sobre el desarrollo de la raíz (Figura 13b). En cambio en la variedad Yesera el aislado **y3c** mostro un menor efecto sobre el desarrollo radicular (Figura 13c).



\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

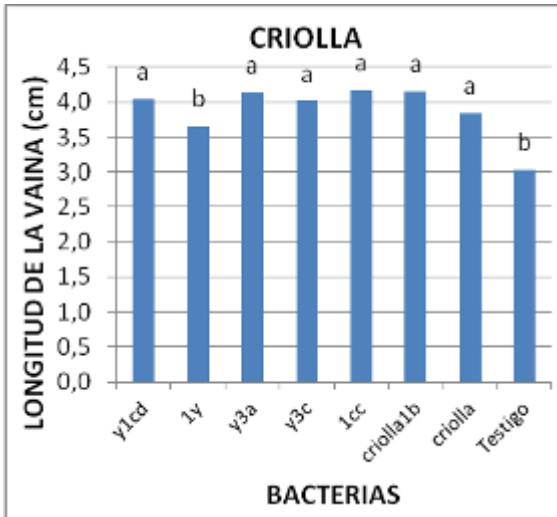
**Figura 13(a,b,c). Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja**  
**Longitud radicular.**

Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las cepas para la variable longitud radicular (Cuadro 1). Sin embargo, se observó mayor longitud radicular con la inoculación de las bacterias de rhizobium en comparación al testigo (Figura 14).

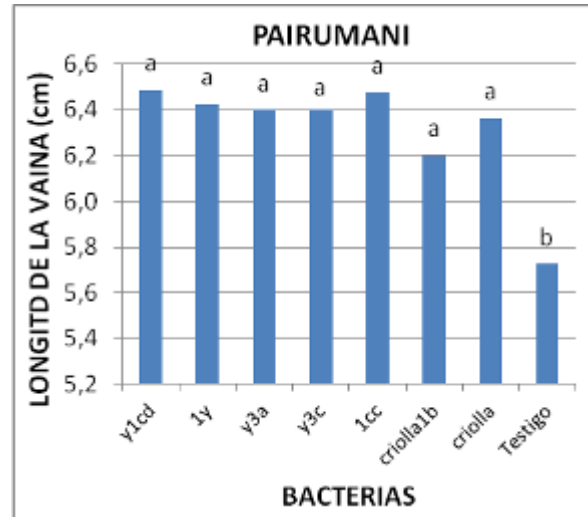


**Figura 14. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre la longitud radicular.**

Sin embargo, se observó diferencias entre la interacción de cepas\*variedades (Cuadro 1). Lo cual muestra que la respuesta de las variedades varía a la inoculación con las cepas de rhizobium. Donde la variedad criolla respondió a todos los aislados con excepción a la cepa **1y** (Figura 15a). La variedad Pairumani respondió de forma similar a todos los aislados (Figura 15b). En cambio la variedad Yesera respondió de forma similar a todos los biofertilizantes con excepción de la cepa **Criolla 1b** (Figura 15c).

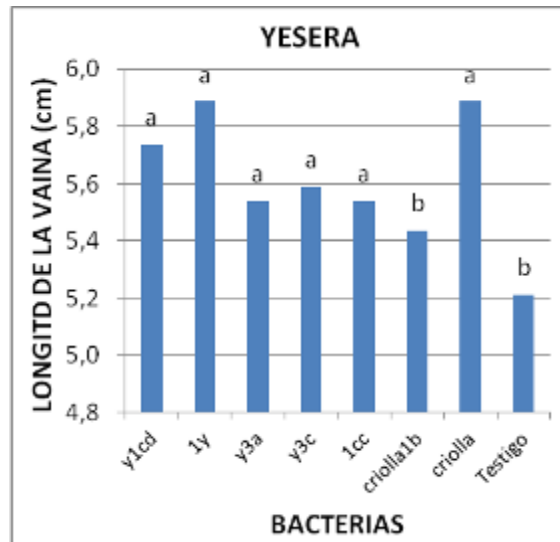


**a**



**b**





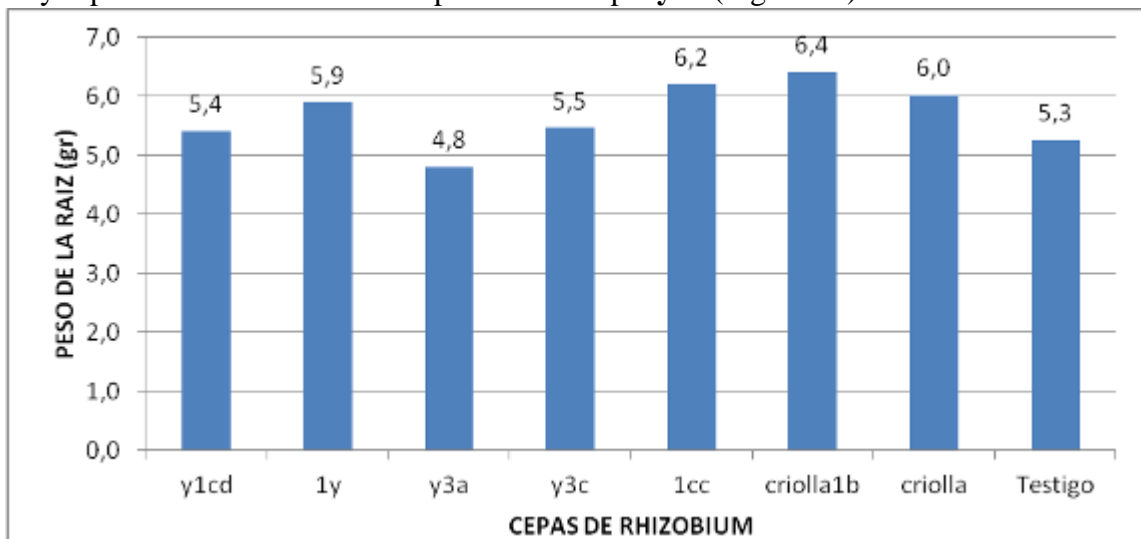
c

\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 15(a,b,c). Efecto de siete aislados de rhizobium sobre la longitud de la vaina de 3 variedades de arveja**

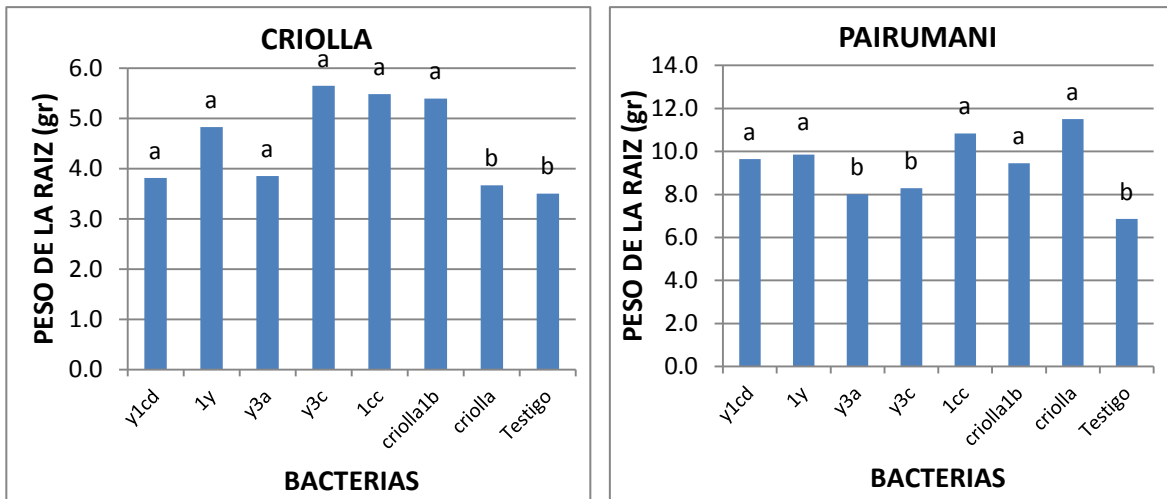
#### Peso de la raíz

Para la variable peso de la raíz tampoco se estimaron efectos significativos (Cuadro 1). Sin embargo, la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno favorecieron mayor peso en las raíces con excepción de la cepa **y3a** (Figura 16).



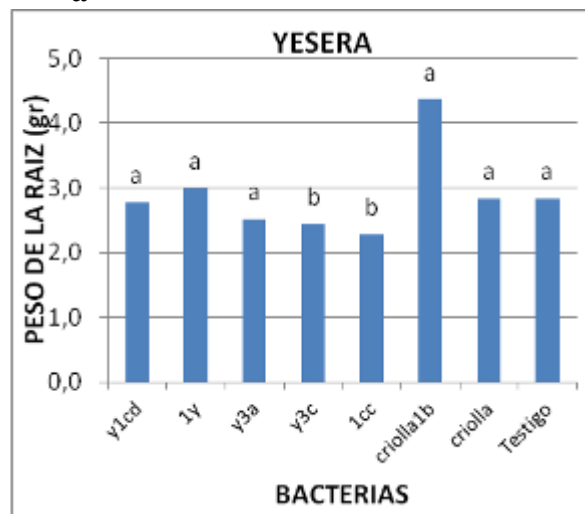
**Figura 16. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el peso de la raíz.**

Sin embargo, se observaron diferencias de las bacterias entre las diferentes variedades (Cuadro 1). Por lo que el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno vario de una variedad a otra. Donde, las cepas **Y1cd**, **1y**, **y3a**, **y3c**, **1cc** y **criolla1b** en la variedad Criolla (Figura 17a), las cepas **y1cd**, **1y**, **1cc**, **criolla1b** y **criolla** en la variedad Pairumani (Figura 17b) y las cepas **y1cd**, **1y**, **y3a**, **criolla1b** y **criolla** en la variedad yesera (Figura 17c) favorecieron mayor desarrollo radicular en la planta.



a

b



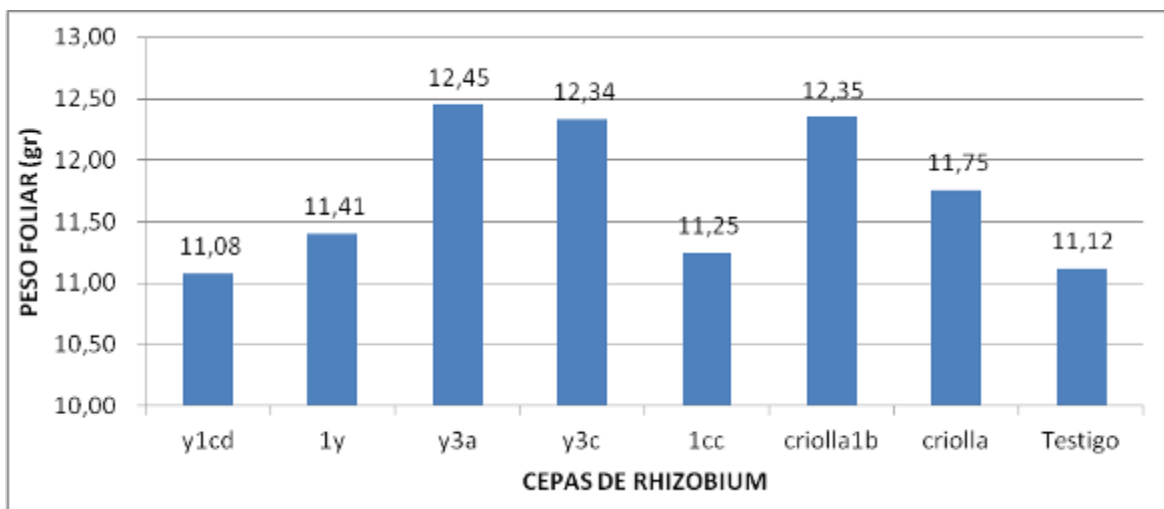
c

\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 17. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo radicular de 3 variedades de arveja**

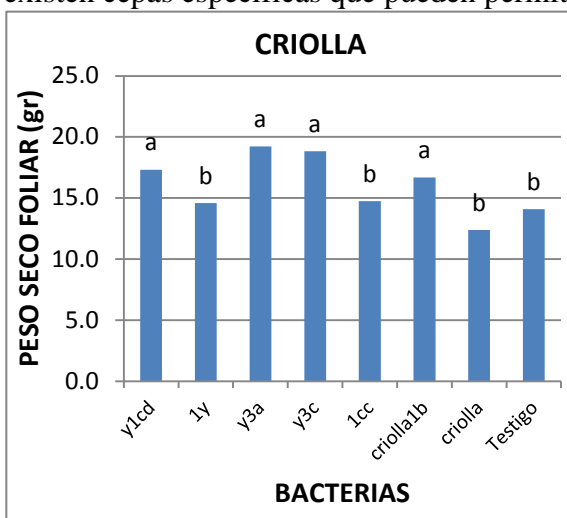
### Peso Foliar.

Para la variable peso de la planta tampoco se observaron diferencias significativas entre los diferentes aislados (Cuadro 1). Sin embargo, las cepas **Y3a**, **y3c**, **criolla1b** y **criolla** favorecieron relativamente mayor desarrollo radicular en comparación al testigo (Figura 18).

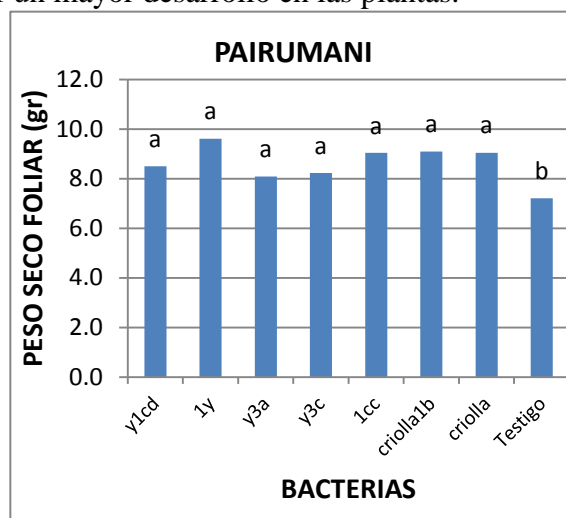


**Figura 18. Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el peso foliar de la planta.**

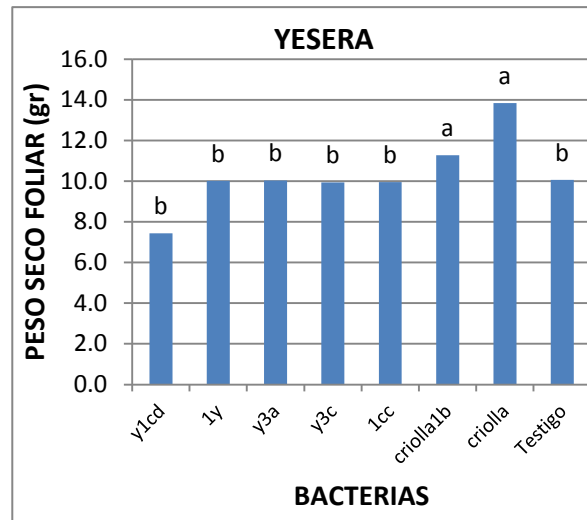
Sin embargo, se observaron diferencias entre la interacción de variedad\*cepas de rhizobium (Cuadro 1). Lo cual indica que el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno varía de una variedad a otra. Donde las cepas **Y1cd**, **y3a**, **y3c** y **criolla1b** permitieron mayor desarrollo foliar en la variedad Criolla (Figura 19a). **Y1cd**, **1y**, **y3a**, **y3c**, **1cc**, **criolla1b** y **criolla** en la variedad Pairumani (Figura 19b). **Criolla1b** y **criolla** en la variedad Yesera (Figura 19c) permitieron un mayor desarrollo foliar. Lo cual muestra que existen cepas específicas que pueden permitir un mayor desarrollo en las plantas.



**a**



**b**



c

\*Distintas letras son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 19(a,b,c). Efecto de siete aislados de rhizobium sobre el desarrollo foliar de 3 variedades de arveja**

## 15. Discusión.

A través de los resultados se puede observar que la inoculación de los aislados de rhizobium favoreció la formación de nódulos en la planta respecto al testigo que aunque presente desarrollo de nódulos las mismas fueron en menor proporción a las plantas inoculadas. Así mismo, se puede observar que existe una variabilidad respecto a la ubicación donde los aislados tienen la facultad de desarrollar nódulos tanto en la parte intermedia, apical y en toda la raíz. Así mismo, aunque se observe en mayor proporción nódulos de forma ovalada, también se observó nódulos de forma arriñonada y acorazada. En cambio en el color se observó en mayor proporción nódulos de color veis posiblemente por que las plantas estaban casi secas, sin embargo también se observó nódulos de color blanco verdusco, blanco, rosado, y de color verde lo cual muestra que la formación de nódulos es un proceso continuo en la planta.

En cuanto a las variables Agronómicas, Aunque no se observaron diferencias las siete aislados favorecieron el desarrollo de la planta en comparación al testigo. Así mismo, la interacción entre las cepas y las variedades, muestra la importancia de seleccionar bacterias específicas para obtener mejores resultados con la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno. Así, a través de las variables estudiadas y las cepas Y1cd, criolla1b y criolla favorecieron el desarrollo de la planta en forma general a través de las 3 variedades. Lo cual puede ser debido a que estas bacterias favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de nódulos en las plantas. Resultados similares fueron reportados el efecto benéfico de la inoculación con rhizobias el cual incrementa la fijación de nitrógeno y con lo que favoreció el crecimiento de la planta y desarrollo de la planta en haba (Brockwell, et. al.; 1995), Soya (Ali, et. al., 1997) y garbanzo (Mohamed Ahmed, et. al., 2006).

## 16. Conclusiones.

- La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno favorece el desarrollo de la planta.

- La inoculación con rhizobium favorece el desarrollo de mayor cantidad de nódulos tanto en la parte intermedia-apical como en toda la extensión de la raíz.
- Se observó variación entre los aislados en forma y color.
- Las variedades presentan respuesta específica a algunas cepas de rhizobium.
- Los aislados Y1cd, criolla1b y criolla presentaron efectos benéficos generales a través de las 3 variedades.

## 17. Recomendaciones.

La interacción de las variedades y las cepas muestra claramente la importancia de seleccionar cepas adecuadas para las variedades comerciales y así poder obtener mayores beneficios. Así mismo, se recomienda realizar ensayos en combinación a biofertilizantes comerciales para ver si podrían obtenerse mejores beneficios a través de la combinación con otros microorganismos.

## 18. Bibliografía.

- Ali, A.E., T. Horiuchi and S. Miyagawa, 1997. Nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean plants (*Glycine max* Merr.) in soil supplemented chitin and chitosan. Japanese Journal of Crops Science, 66(1): 100-107.
- AHMED. R. R., A. R. M. SOLAIMAN, N. K. HALDER, M. A. SIDDIKY AND M. S. ISLAM. 2007. Efecto of inoculation methods of rhizobium on yield attributes, yield and protein content in seed of pea *J. Soil. Nature. 1 (3):30-35*
- Brockwell, J., P.J. Bottomley and J.E. Thies, 1995. Manipulation of rhizobia micro flora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil, 174: 143- 180.
- Evans, J., C. Wallace, N. Dobrowolski, I. Pritchard and B. Sullivan. 1993. Requirement of field pea (*Pisum sativum*) for inoculation with *Rhizobium* and lime pelleting in soils of Western Australia. J. Exp. Agric. 33(6): 767-773.
- Fall L, Diouf D, Fall-Ndiaye MA, Badiane FA, Gueye M (2003). Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. Afr. J. Biotechnol. 2: 48-50.
- Feng, Y., C. Pan, D. Wang, Y. Li. and C. Wei. 1997. Isolation of nodule bacteria from *Pisum sativum* and the application of nitragine from the isolate. J. Trop. Sub Trop. Bot. 5(2): 47-53.
- Giller KE (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2nd Edn. CAB International Publishing: Wallingford, UK.
- He Yahui, Lizhuo Guo, Hutian Zhang and Gaobao Huang. 2011. Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming systems in the western Loess Plateau, China. African Journal of Biotechnology Vol. 10(18), pp. 3540-3548
- Idris, M. and G.R. Sandhu, 1981. Effect of Rhizobium inoculation on the dry matter, pod yield, grain protein and N<sub>2</sub> fixing efficiency of vegetable pea. J. Sci. Technol. (Pak), 5(1-2): 17-22.
- Jha, S.K. and V.P. Singh. 1996. Correlation for effectiveness of rhizobium leguminosarum in pea (*Pisum sativum* L.). J. Applied Biol., 6(1-2): 19-21.

- Krasova-Wade T, Ndoye I, Braconnier S, Sarr B, de Lajudie P, Neyra M (2003). Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.)
- Li YG, Zhou JC (2002). The main factors influencing on symbiotic nitrogen fixation efficiency of rhizobia and genetic improvement. *Microbiology*. 29: 86-89.
- Mohamed Ahmed, T.H., M.E. Abdelgani and A.G. Osman, 2006. Responce of chick pea and common bean...., to rhizobial cross inoculation in River Nile State. *Shendi University Journal*, 3: 142-157. (In Arabic).
- Rahman, M. H. H., M. Z. Islam, M. A. H. Bhuiyan, D. Khanam, A. K. M. Hossain and A. F. M. Rahman. 1994. Effect of rhizobial inoculum with and without chemical fertilizers on chickpea in Haplaquepts. *Bangladesh J. Agric. Sci.* 21(2): 273-277.
- Rabbani, M. G., A. R. M. Solaiman, K. M. Hossain and T. Hossain. 2005. Effects of *Rhizobium* Inoculant, Nitrogen, Phosphorus and Molybdenum on Nodulation, Yield and Seed Protein in Pea. *Korean J. Crop Sci.* 50(2): 112-119.
- Romdhane SB, Tajini F, Trabelsi M, Aouani ME, Mhamdi R (2007). Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World J. Microbiol Biotechnol.* 23: 1195-1201.
- Santalla M, Amurrio JM, De Ron AM (2001). Symbiotic interactions between *Rhizobium leguminosarum* strains and elite cultivars of *Pisum sativum* L. *J. Agron Crop Sci.* 187: 59-68.
- SAS INSTITUTE 2001. The SAS System for Windows. Version 9. SAS Inst., Cary, NC
- Solaiman, A. R. M. 1999. Nitrogenase activity, yield and yield contributing characters of chickpea as influenced by *Rhizobium* inoculant in presence and absence of nitrogen. *Bangladesh J. Sci. Tech.* 1(1): 141-144.
- Tolkachev, N. Z., P. A. Donchenko, A. V. Knyazev, N. M. Kosenko and V. F. Patyka. 1994. Methods of enhancing the efficiency of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Fiziol. Biok. Kul Rast.* 26(4): 344-351.

### **Producción de *Bacillus subtilis* en diferente medios y en envases de metal y plástico**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Walquer Arandia

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

#### **Compendio**

La bacteria *Bacillus subtilis* se encuentra en el suelo como en la vegetación y se lo utiliza como un fungicida y promotor del crecimiento ya que produce moderadas cantidades de una fitohormona llamada giberelina, que estimula el crecimiento en las plantas. Para la producción de *B.subtilis* se han utilizados medios de almidón con lactosa, con buenos resultados en especial para obtener mayores concentraciones enzimáticas. También se han utilizado medios de lavado de papa como fuente de almidón y hidrolizados de polvo de esmeril de cuero como fuentes de carbono y nitrógeno. El objetivo de este trabajo es evaluar diferentes medios de cultivo para la producción de *Bacillus subtilis* y la diferencia en los biodigestores de plástico y metal para la producción de *Bacillus subtilis*. Se procedió a la desinfección del biofermentador metálico y de plásticos de 80 litros, una vez desinfectados se llenaron con los distintos caldos como medio de cultivo. En los

resultados se puede observar que el medio de cultivo con mejores resultados fue el caldo de papa + soya y los envases no tienen ningún efecto en la concentración de las esporas de *B.subtilis*

**Palabras claves:** *Bacillus subtilis*, embases, plástico y metal

**98. Objetivos:** Evaluar diferentes medios de cultivos para la producción de *Bacillus subtilis* y evaluar si existe diferencia en los biodigestores de metal y plástico

**99. Hipótesis**

#### **100. Revisión de literatura**

La bacteria *Bacillus subtilis* se encuentra en el suelo como en la vegetación y se lo utiliza como un fungicida y promotor del crecimiento ya que produce moderadas cantidades de una fitohormona llamada giberelina, que estimula el crecimiento en las plantas y que además tiene la capacidad de transformar minerales no asimilables en componentes asimilables para las plantas (Aguilar et. al., 2003).

Para la producción de *B.subtilis* se han utilizados medios de almidón con lactosa, con buenos resultados en especial para obtener mayores concentraciones enzimáticas. También se han utilizado medios de lavado de papa como fuente de almidón y hidrolizados de polvo de esmeril de cuero como fuentes de carbono y nitrógeno. Aunque se usan también industrialmente medios como harina de soya y harina de avena (Giraldo et.al., 2003).

#### **101. Materiales y métodos**

##### **Esterilización del biodigestor**

Se procede a la desinfección del biodigestor metálico de 80 litros y de plásticos (figura1), una vez desinfectados se llenaron con los distintos caldos como medio de cultivo.

**Figura 1. Biodigestor metálico y de plásticos para la producción masiva de *B. subtilis***



### Preparación del medio de cultivo

Se elaboraron tres medios de cultivo; un medio era solo papa, otro era papa mas caldo de soya y el tercer medio era caldo de papa mas caldo de maíz. Estos tres medios de cultivo se vertieron a los envases de plástico y metálico; luego se inoculó con *Bacillus subtilis*

### 102. Resultados

En los resultados se puede observar que los mejores medios de cultivo para la producción de *B. subtilis* es la papa y la papa + soya (tabla 1). Y en los envases no tienen mucho efecto si son de plástico o metal lo importante es la temperatura y pH. (Tabla 2).

**Cuadro 1. Comparación de diferentes medios de cultivos.**

Medios de cultivo	Concentraciones
Papa	$1.08 \times 10^8$
Papa + Maiz	$6.25 \times 10^7$
Papa + Soya	$1.85 \times 10^8$

**Cuadro 1. Comparación poblaciones de *Bacillus subtilis* en los diferentes medios de cultivo y fermentadores.**

Medios de cultivo y Envase	Concentraciones
Papa + Metal	$4 \times 10^7$
Papa + Soya + Metal	$2.8 \times 10^7$
Papa + Maiz + Metal	$1.25 \times 10^7$
Papa + Plástico	$3.5 \times 10^7$
Papa + Soya + Plástico	$2.2 \times 10^7$
Papa + Maiz + Plástico	$1.2 \times 10^7$

### 103. Discusión



Se tuvo buenos resultados con los caldos de papa - soya ( $1.85 \times 10^8$ ) así como en el ensayo donde se desarrollo medios de cultivos para la multiplicación masiva, de *Bacillus subtilis* donde se evaluaron caldo de papa, caldo de arroz y caldo de soya (Ortuño et al. 2009) también se observó que no hubo ninguna diferencia con los envases de plástico y metal.

#### **104. Conclusiones**

Por tanto se concluye que el medio de cultivo con mejores resultados fue el de caldo de papa + soya y los envases no tienen ningún efecto en la concentración de las esporas de *B.subtilis*

#### **105. Recomendaciones**

En la producción tener mucho cuidado con la multiplicación de las bacterias, pueden contaminarse cuando la fermentación se pasa de las 72 horas.

#### **106. Bibliografía consultada**

Alonso Urmeneta, V. Aragón, *et.al.*, 1995. Manual Práctico de Microbiología. Editorial Masson. 200 p.

Ortuño, N.; O., Navia; V. Angulo; D. Barja y G. Plata. 2009. Desarrollo de biofertilizantes en base a microorganismos nativos para una producción soberana en Bolivia. Memoria V Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Oruro, Bolivia. p. irr.

### **Multiplicación de micorrizas en medio líquido y esporulación en sustrato solido.**

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Claudia Gutierrez**

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **1. introducción**

La endomicorriza arbuscular es la más común y ocurre en más del 90% de las plantas superiores. La endomicorriza arbuscular está usualmente asociada con plantas herbáceas como avena, maíz, tomate, cebolla, fresa, leguminosas y pastos. También se forma en algunos árboles como manzana, cítricos, aguacate y café (González, 1995).

Hemard (sf) menciona que el problema más importante que existe actualmente al pretender una inoculación de endomicorrizas MVA radica en la obtención de cantidades suficientes de inóculo. Esto ocurre porque los hongos no crecen en un cultivo puro, haciéndose necesario el reproducirlo con plantas. Este proceso además de ser caro y lento tiene el peligro latente de introducir patógenos conjuntamente con el hongo simbiote. Por lo anteriormente nombrado en este trabajo se probará un método de multiplicación de micorrizas en medio líquido.

#### **2. Objetivo**

El objetivo de este trabajo es establecer el protocolo para la multiplicación masiva de micorrizas en medio líquido y su esporulación en medio sólido.

#### **3. Materiales**

##### **3.1 Materiales**

### 3.1.1. Material biológico

Se utilizaron segmentos de raíz de haba (*Vicia faba* L) y cebada (*Hordeum vulgare*) de cultivos inoculados con micorrizas.

### 3.1.2. Material de laboratorio

Cámara de Flujo Laminar, autoclave, cajas petri, vasos de precipitado de 50 ml, agua destilada, alcohol, Medio LB y Extracto de malta, bisturí, pinzas, cámara figuragráfica, erlenmeyers de 50 ml., libreta de registro, marcador, mechero, hipoclorito de sodio, colador, harina de trigo, la harina de arroz, estufa, incubadora orbital y papel aluminio.

## 4. METODOS

### 4.1. Desinfección de raíces

Existen varios métodos para la esterilización de semillas. En este trabajo se utilizó la esterilización con hipoclorito de sodio con dos protocolos diferentes que a continuación se explica. Primeramente para ambos protocolos en envases separados se lavaron las muestras superficialmente con agua común y llevadas a la cámara de flujo laminar.

#### *Protocolo I*

Esterilización método por Dion y Magallon, 2009

- Si los fragmentos de las raíces son muy grandes, pueden ser cortados en segmentos de 5–8 cm.
- Para la esterilización superficial, las raíces son sumergidas por 1 min en una solución de etanol al 70%, siempre en agitación.
- Una vez realizado esto, el etanol al 70% es eliminado y a las raíces se les agrega una solución de hipoclorito de Na al 1,2%, una vez agregado el hipoclorito entonces se dejan en agitación por 15 min.
- Una vez finalizado este tiempo, las raíces son lavadas cuatro veces con solución salina NaCl 0.85%.

#### *Protocolo II*

Esterilización método Ortuño N. 2009 se procede de la siguiente manera:

- Desinfectar las raíces con una solución de hipoclorito de sodio al 1.3% durante 15 minutos en agitación constante.
- Enjuagar 3 veces durante 10 minutos con agua destilada esterilizada.

### 4.2. Siembra de las raíces en medio líquido

Se preparó el medio de cultivo LB con Rifampicina (30 gotas en 250 ml.) contenido en matraces de 50 ml. cubiertos con papel aluminio y autoclavados por 15 minutos a 121 ° C y 15 libras de presión. Se espera que enfríe para su posterior uso.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra de las raíces de haba y cebada en cada matraz los cuales fueron sellados, identificados y llevados a un agitador orbital con temperatura de 28°C con 100 rpm, durante tres días.

Se preparó el medio de cultivo extracto de malta al 1 y 0.5% en matraces de 50 ml y las raíces con abundante desarrollo de micelio fúngico (\*) fueron transferidas a estos. Los matraces fueron

sellados con papel aluminio, identificados y llevados nuevamente al agitador orbital con temperatura de 28°C y 100 rpm, durante tres días.

(\*)Una porción de los micelios fueron separados para ser inoculados en plantas *in Vitro* de frutilla (*Fragaria* spp).

#### 4.3.-Traspaso a sustrato sólido y esporulación

En 10 placas Petri se dispensaron la harina de trigo y la harina de arroz hasta llegar a la mitad de la placa petri de su volumen total (5/5) de las cuales 6 se esterilizaron en estufa a 180°C por tres horas y las 4 restantes no se esterilizaron.

Los micelios obtenidos del cultivo extracto de malta fueron transferidos a las placas Petri con un poco de líquido del medio dividiendo en cinco las raíces de haba y en las restantes cinco las raíces de cebada, hasta obtener una consistencia pastosa no muy líquida.

Las placas fueron identificadas y almacenadas en un lugar cerrado, no permitiendo el ingreso de luz directa. Observándolas diariamente.

Cuatro días después, los micelios restantes en medio líquido fueron inoculados a placas Petri con caolín siguiendo el mismo procedimiento que con las harinas anteriormente mencionadas

### 5. Diseño Experimental

El diseño experimental es el completamente aleatorio con dos repeticiones donde la combinación de los niveles de cada uno de los factores constituyen un tratamiento.

Factores:

Factor 1	Medio liquido	ML1= Medio LB ML2= Extracto de malta
Factor 2	Sustrato solido	S1= Harina de trigo S2= Harina de arroz S3= Caolín

Variables de respuesta

Las Variables cualitativas y cuantitativas serán evaluadas de acuerdo a:

1. Desarrollo de micelio fúngico en medio liquido
2. Desarrollo de micelio fúngico en sustrato solido
3. Numero de esporas obtenías por gramo de sustrato.

#### 5.1 Modelo estadístico

Las variables de respuesta se evaluarán previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas bajo el diseño completamente aleatorio con dos repeticiones bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \Omega_j + \sigma_{i(j)} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

i= medio liquido.

j= sustratos

$\mu$ = media general

$\beta_i$ = efecto aleatorio del i-esimo medio liquido.

$\Omega_j$ = efecto fijo del j-esimo sustrato.

$\sigma_{i(j)}$ = efecto aleatorio de la interaccion del j-ésimo sustrato sembrado con micelios del i-ésimo medio liquido.

$\varepsilon_{j(i)}$ = efecto aleatorio de los residuales NIID  $\sim (0, \sigma_b^2)$

## 6. Resultados

### 6.1 Siembra de las raíces en medio líquido

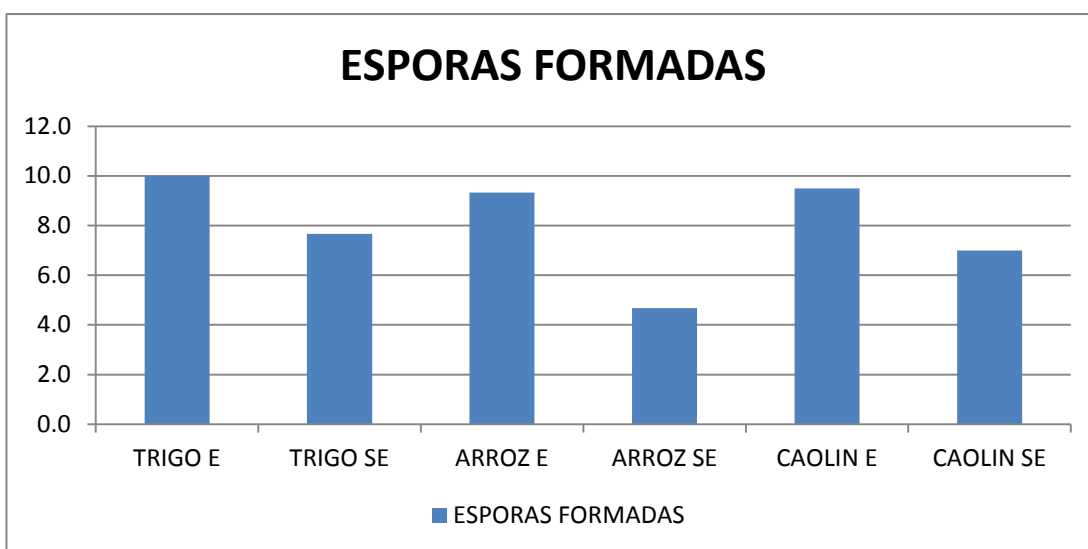
No hubo diferencia significativa entre tratamientos ya que el desarrollo de micelio se observo de igual forma en cada raíz contenida en el vaso de precipitado en medio LB y también en el medio con extracto de malta a diferentes concentraciones, teniendo estas volúmenes de desarrollo miceliales también similares.



### 6.2.- Esporulacion en sustrato solido



Hay diferencias significativas en el desarrollo micelial y la producción de esporas entre tratamientos. En las pacas petri se obtuvieron micelios fúngicos desarrollados en abundancia tanto para la harina de trigo, harina de arroz y caolín respectivamente, siendo el mejor sustrato la harina de trigo cuyo resultado va directamente ligado a la producción de esporas, obteniéndose así el mayor número de esporas en la harina de trigo.



## CUADRO ANVA

Source	DF	Square	Pr > ChiSq
STR	1	11.96	<.0001
EST	2	1.99	0.0009
STR*EST	1	4.33	<.0001

Las diferencias son significativas entre sustratos siendo la harina de trigo quien presenta el mayor numero de esporas formadas; también hubo diferencia significativa entre esterilización ya que en el sustrato estéril se tuvo mejor desarrollo de micelios y mayor esporulación a comparación de sustratos no estériles que además se contaminaron. La interacción nos muestra claramente la eficiencia de la harina de trigo con esterilización con la formación de 10 esporas, seguidas por el caolín y por último la harina de arroz con un promedio de 9.1 esporas formadas.

## 7. CONCLUSIONES

El desarrollo de micelios de hongos micorrícicos ocurrió de igual forma en cada tratamiento cultivado en medio líquido LB teniendo un volumen micelial sin diferencias significativas entre ellos.

El desarrollo de micelios de hongos micorrícicos ocurrió de igual forma en las raíces cultivadas en medio líquido con extracto de malta a diferentes concentraciones. Entonces se concluye que no hay diferencias significativas entre los tratamientos por lo que la concentración mas baja (0.5%) sería la mas recomendable para esta propósito.

Para la obtención de esporas micorrícicas el mejor sustrato fue la harina de trigo esterilizada. Se pudo ver que la esterilización de los sustratos es necesaria si se desea desarrollar solo el hongo inoculado.

## 6.- BIBLIOGRAFIA

Magallón S. P y Dion P. 2009. Curso práctico-teórico de microbiología agrícola. Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia. Université Laval, Québec, Canadá

Hemard, sf. Aspectos generales de las micorrizas. Consultado el 26 de julio del 2001. Disponible en <http://www.forestal.uchile.cl/cursos/fivegf/mico.htm>

González, M. 1995. Interacción de la simbiosis endomicorrícica y la fijación biológica de Nitrógeno.p.166-179 In Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable. Eds. Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno. PROEDAF, IRN,CP. Montecillo, México.

### **Evaluación del cultivo de la papa bajo diferentes biofertilizantes a base de microorganismos**

**Responsable:** Juan José Calisaya.

**Equipo técnico:** Noel Ortuño, Mayra Claros, Juan José Calisaya.

#### **Compendio:**

Debido a la necesidad de adoptar una agricultura biológica para la nutrición de la planta y el mantenimiento de la fertilidad de los suelos, además del incremento de la productividad se planteo el objetivo de estimar el efecto diferentes biofertilizantes sobre el desarrollo del cultivo de la papa. Observándose, que la combinación Trichoderma+micorriza+biobacillus, tricobal+mibac y la micorriza pura tuvieron un efecto significativo sobre la mayoría de las variables en particular sobre numero de tubérculos, peso de la raíz y materia seca. Así mismo, los biofertilizantes tricobal+mibac y la micorriza tuvieron un efecto sobre el peso de la raíz y longitud radicular. Por lo que microorganismos podrían utilizarse como promotores de crecimiento en el cultivo de la papa.

**Palabras claves:** Microorganismos, promotores de crecimiento

**107. Objetivos:**

- Estimar el efecto de diferentes bioinsumos sobre el desarrollo del cultivo de la papa.

#### **108. Hipótesis**

- Los bioinsumos a base microorganismos no tienen efecto sobre el desarrollo del cultivo de la papa.

#### **109. Revisión de literatura**

Las zonas de producción agrícola están sujetas a la degradación debido a causas naturales y principalmente a la presión humana el cual ha impactado negativamente sobre la estructura y comunidad de las plantas. Los suelos de Bolivia, principalmente el occidente boliviano se caracterizan por la presencia baja de materia orgánica por lo que los suelos son de baja fertilidad. Así mismo, la necesidad de una agricultura más consciente sobre la necesidad de adoptar una agricultura biológica para la nutrición de la planta y el mantenimiento de la fertilidad de los suelos como el incremento de la productividad muestran un rol importante del uso de los biofertilizantes a base de microorganismos .

Las micorrizas arbusculares juegan un rol importante en la captación de agua y nutrientes, especialmente en suelos con deficiencia de fósforo y ayudan a las plantas en el establecimiento y crecimiento en ambientes inadecuados (Koske and Polson, 1984). En ambientes con deficiencia en nutrientes, las micorrizas arbusculares no solo contribuyen con la nutrición, también con la estabilización uniendo granos de arena dentro agregados resistentes al viento, mejorando así la estructura y protegiendo las raíces de las plantas de los patógenos (Gemma *et al.*, 1989).

Así, Sieverding (1991) observó que plantas inoculadas con endomicorrizas han mostrado ser más resistentes a las enfermedades radiculares. Por otro lado, el uso de biofertilizantes micorrizicos ayuda a promover el desarrollo de la ramificación radicular y la hifa micorrizica crece de la raíz hacia el suelo habilitando las raíces de las plantas a conectar con un área más amplia de superficie de suelo. Por tanto las plantas con la asociación de las micorrizas tendrán mayor eficiencia en la absorción de nutrientes como el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, zinc y cobre (Sieverding, 1991).

Por otro lado, la población bacteriana en la rizosfera es 100-1000 veces más alta que el volumen radicular y más del 15% de la superficie es cubierto por micro colonias de un variedad de especies de bacterias (Gray and Smith 2005). El efecto de la rizosfera es debido al hecho de que cantidades substanciales de carbón fijado por la planta como fotosintatos son secretados en la rizosfera principalmente como exudados que pueden ser utilizados como nutrientes por las bacterias. Como retorno la actividad metabólica de las bacterias en la rizosfera estimula la entrega y captación de nutrientes por las raíces de las plantas (Glick 1995). Entre estos, las bacterias del género *Bacillus sp.* son esenciales en los sistemas de agricultura. Las especies nativas de este género ocurren abundantemente en la mayoría de los suelos y los tejidos de las plantas son

diferentemente colonizados por distintas subpoblaciones (Mahaffee and Kloepper 1997). Muchas especies de *Bacillus* pueden promover el crecimiento de las plantas y la sanidad en una variedad de formas. Algunas especies pueden promover el crecimiento directamente por la sistematización de hormonas o incrementando la toma de nutrientes por la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilizarían de fosforo del suelo y otras formas. Entre estas bacterias se tienen a las fijadoras de nitrógeno *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Bacillus brevis*, y *Bacillus firmus* (Xie et al., 1998). Entre las solubiladoras de fosforo se tienen como los más efectivas a entradas a *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. polymyxa* y *B. sircalmous* (Subbarao, 1988).

Las interacciones entre los miembros de diferentes tipos de microorganismos frecuentemente resultan en un proceso benéfico para el crecimiento y la sanidad de la planta. Lo cual es obvio que todas las interacciones suceden cerca de las raíces de las plantas. Tres tipos de interacciones juegan un rol importante por su relevancia al desarrollo de agroecosistemas sostenibles. Estos son: 1) la cooperación entre las bacterias PGPR y Rhizobium para una mejor fijación de nitrógeno, 2) antagonismo de los microorganismos para el biocontrol de patógenos de las plantas, y 3) interacciones entre organismos de la rizosfera y hongos AM para el establecimiento de micorrizosfera funcional (Barea et al. 2002).

## **110. Materiales y métodos**

### **Ubicación.**

El ensayo se llevo a cabo en os invernaderos de la FUNDACION PROINPA ubicada en la zona de El Paso.

### **Materiales.**

- Semillas de papa.
- Biobacillus.
- Micorrizas
- Trichoderma.
- Mibac
- Tricobal.
- Macetas de 2 kgr.
- Metro.

### **Metodología.**

#### **Tratamientos.**

Los tratamientos a evaluar fueron:

Biobacillus (Bs)	T1
Micorriza (Mico)	T2
Trichoderma (Tricho)	T3
Mibac	T4
Tricobal (Trico)	T5
Trico+mibac	T6
Tricho+Mico+Bs	T7



Testigo

T8

**Diseño experimental:**

Los 8 tratamientos fueron evaluados bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con 4 repeticiones (Figura 1). Donde la unidad experimental consistió de una maceta con una sola planta.

Bloque 1	T3	T7	T1	T4	T6	T2	T5	T8
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

Bloque 2	T4	T8	T3	T5	T2	T6	T7	T1
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

Bloque 3	T1	T5	T8	T6	T3	T7	T2	T4
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

Bloque 4	T3	T8	T7	T1	T5	T4	T6	T2
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

**Figura1. Croquis para la implementación del ensayo.**

**Procedimiento de campo.**

Para la siembra se utilizó sustrato esterilizado para lo cual se utilizó macetas de 2 kilogramos de capacidad. Previamente a la siembra se seleccionaron tubérculos de tamaño uniforme, las mismas que fueron inoculadas con los diferentes bioinsumos en el momento de siembra. Los riegos se realizaron de acuerdo a la necesidad del cultivo, generalmente 3 veces a la semana.

**VARIABLES DE RESPUESTA.**

Las variables de respuesta se evaluaron en el momento de la cosecha, las mismas que fueron:

**Altura de planta.** La cual se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice vegetativo.

**Número de tubérculos.** Para esta variable se cosechó el total de tubérculos desarrollados en cada una de las unidades experimentales

**Peso de tubérculos.** Se estimó pesando todos los tubérculos desarrollados por la planta.

**Longitud radicular.** Para lo cual se evaluó la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice radicular

**Peso de la planta.** La cual se evaluó como el peso total de la planta incluyendo la parte foliar y la parte radicular.

**Peso de la raíz.** La misma que se evaluó solo tomando la parte radicular de la planta.

**Análisis estadístico.**

Las variables de respuesta fueron analizadas bajo la distribución normal previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, bajo el siguiente modelo estadístico

$$y_{ij} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde :

$i = 1, 2, 3, 4$  bloques.

$j = T1, T2, T3, \dots, T8$ . tratamientos

$y_{ij}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  – *esimo* bloque donde se aplico el  $j$  – *esimo* tratamiento.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  – *esimo* bloque NIID ( $0, \sigma_b^2$ ).

$\alpha_j$  = Efecto fijo del  $j$  – *esimo* tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID( $0, \sigma_e^2$ )

### 111. Resultados

El análisis de varianza muestra que no hubo variación entre bloques para las variables número de tubérculos, longitud de la raíz y materia seca. Sin embargo, existió variación entre bloques para las variables peso de tubérculos y peso de la raíz (Cuadro 1). Por lo que el diseño experimental fue apropiado.

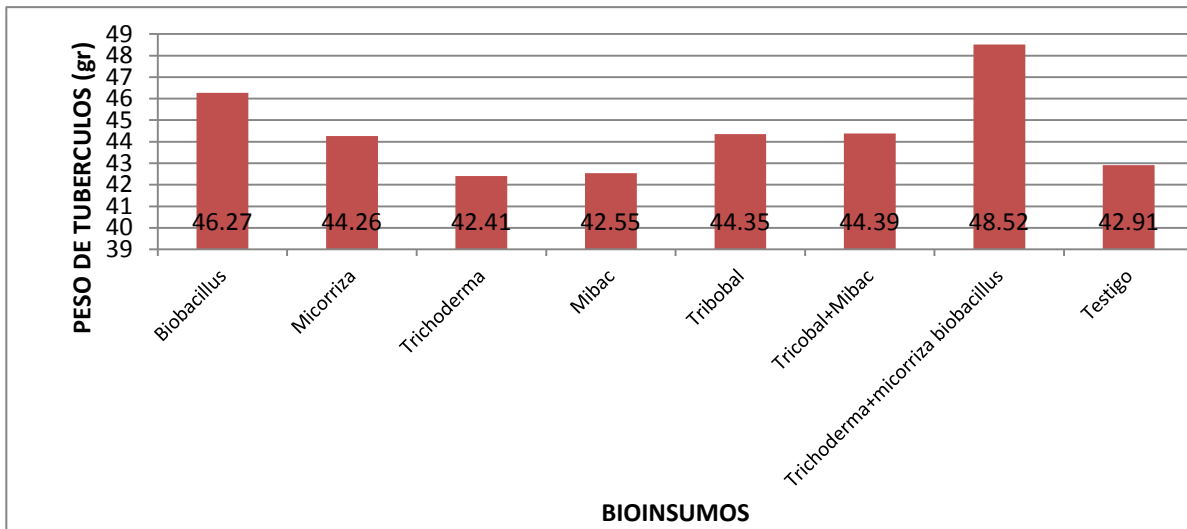
**Cuadro1. Cuadrados medios del análisis de varianza para 6 caracteres en el cultivo de la papa.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Peso de tubérculos (gr)	Numero de tubérculos	Peso de la raíz (gr)	Longitud de la raíz (cm)	Materia seca (gr)
Bloque	3	5,331	0	0,022	0	0
Biofertilizantes	7	17,782	4,682**	0,142**	47,995	0,912**
Residual	26,6	13,075	1,153	0,037	29,265	0,213
Media		44,854	7,216	0,889	19,027	3,370
CV(%)		9,419	14,882	27,572	13,501	13,714

\*\* Significativo al 0,01 nivel de probabilidad.

#### Peso de tubérculos.

Para la variable peso de tubérculos no se observaron diferencias en cuanto al uso de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Lo cual indica que el peso de tubérculos fue similar con el uso de los diferentes biofertilizantes. Sin embargo, se observo peso de tubérculos ligeramente superiores con la aplicación de trichoderma+micorriza+biobacillus (48,52 gr) y biobacillus (46,27 gr), en comparación a los otros tratamientos incluyendo el testigo (Figura 2)



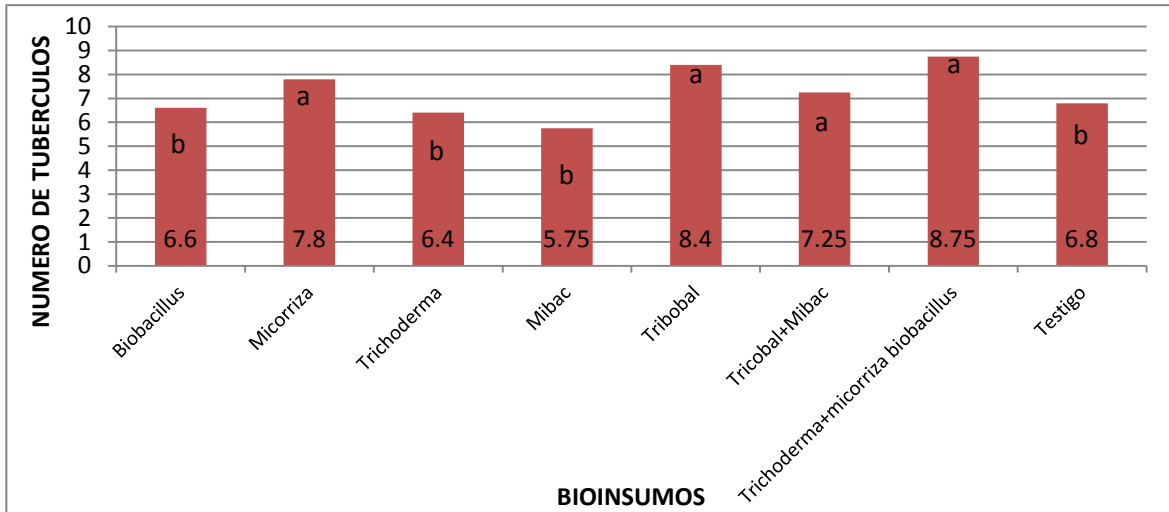
**Figura 2. Efecto de diferentes bioinsumos sobre el peso de tubérculos en el cultivo de la papa.**

**Número de tubérculos.**

Si bien no se estimaron diferencias para peso de tubérculos, se estimaron diferencias significativas entre los diferentes bioinsumos para número de tubérculos (Cuadro 1). Observándose mayor número de tubérculos con la aplicación de trichoderma+micorriza+biobacillus (8,75) (Figura 3), tricobal (8,4), micorriza (7,8) y tricobal+mibac (7,25) en comparación al testigo (6,8), biobacillus (6,6 gr), trichoderma (6,4) y mibac (5,75) (Figura 4).



**Figura 3. Efecto de la combinación de los biofertilizantes sobre el número de tubérculos**



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad.

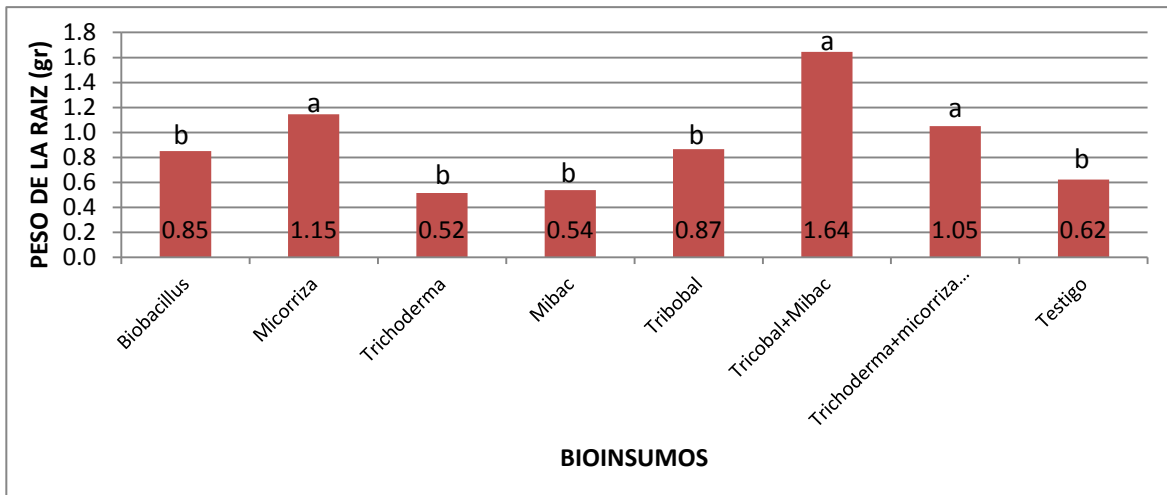
Figura 4. Efecto de diferentes bioinsumos sobre el número de tubérculos en el cultivo de la papa.

**Peso de la raíz.**

Al igual que para la variable número de tubérculos se estimaron efectos significativos para la variable peso de la raíz (Cuadro 1). Donde se observó mayor peso radicular con la aplicación de tricobal+mibac (1,64 gr) (Figura 5a), micorriza (1,15 gr) y trichoderma+micorriza+biobacillus (1,05 gr) (Figura 5b), en comparación a la de tricobal (0,87 gr), biobacillus (0,85 gr), testigo (0,62 gr), mibac (0,54 gr) y trichoderma (0,52 gr) (Figura 6).



Figura 5a, 5b. Efecto de los biofertilizantes sobre el desarrollo radicular



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 99% de probabilidad.

Figura 6. Efecto de diferentes bioinsumos sobre el peso de la raíz en el cultivo de la papa.

#### Longitud de la raíz.

Para la variable peso de la raíz no estimaron diferencias con la aplicación de los diferentes bioinsumos (Cuadro 1). Sin embargo, se observó raíces ligeramente superiores con la aplicación de tricobal+mibac (24,00), micorriza (21,60 cm), tricobal (20,40 cm) y trichoderma+micorriza+biobacillus (19,75 cm), en comparación a la aplicación de los otros biofertilizantes y el testigo (Figura 7).

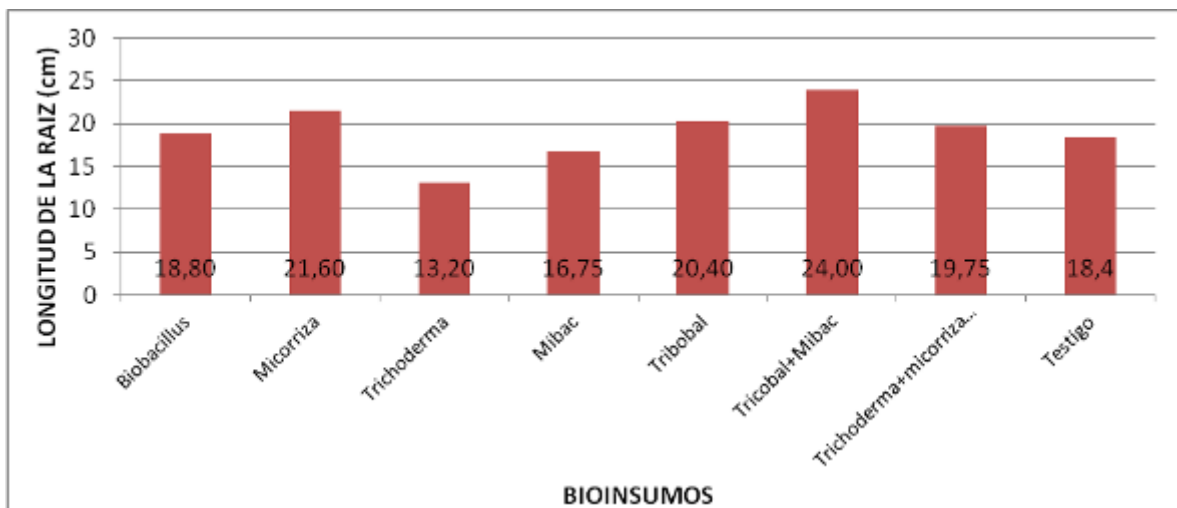
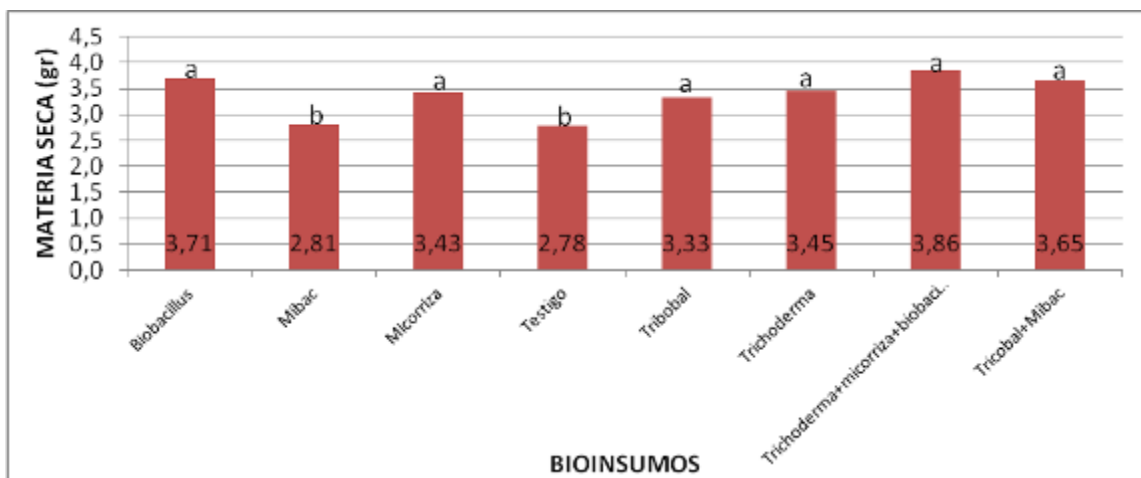


Figura 7. Efecto de diferentes bioinsumos sobre la longitud radicular en el cultivo de la papa.

#### Materia seca.

Para la variable materia seca se estimaron diferencias significativas con la aplicación de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). En la cual las plantas desarrollaron mayor materia seca con la aplicación de trichoderma+micorriza+biobacillus (3,86 gr), biobacillus (3,71 gr), tricobal+mibac (3,65 gr), trichoderma (3,45 gr), micorriza (3,43 gr) y tricobal (3,33 gr), en comparación a la aplicación de mibac (2,81gr) y el testigo (2,78 gr). (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de diferentes bioinsumos sobre la materia seca en el cultivo de la papa.**

### 112. Discusión

Los resultados muestran que la aplicación de los diferentes biofertilizantes mostraron un efecto significativo sobre las variables número de tubérculos, peso de la raíz y materia seca; aunque en forma general favorecieron el desarrollo de todas las variables del cultivo de la papa en comparación al testigo. Entre estas la triple combinación trichoderma+micorriza+biobacillus favoreció el desarrollo de todas las variables, posiblemente porque la Trichoderma, Micorriza y el *Bacillus* promovieron el crecimiento de las plantas y la sanidad directamente por la sistematización de hormonas o incrementando la toma de nutrientes por la fijación de nitrógeno atmosférico o solubilizando el fósforo del sustrato (Xie et al., 1998); así mismo, la combinación Tricobal+mibac y las micorrizas favorecieron el desarrollo de parte radicular, por que posiblemente el biofertilizante micorrizico ayudó a promover el desarrollo de la ramificación radicular debido a que las hifas micorrizicas crecen de la raíz hacia el suelo habilitando las raíces de las plantas a conectar con un área más amplia de superficie de suelo, logrando así una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes (Sieverding, 1991). Razón por la cual llegaron a desarrollar mayor cantidad de materia seca con un mayor volumen radicular y de esta manera favorecer el desarrollo de número de tubérculos; aunque el peso de los tubérculos fue similar entre los diferentes biofertilizantes. Por lo que la aplicación de los microorganismos podría ser favorable para la conservación no solo de la microbiología del suelo, si no también obtener una agricultura de conservación y duradera.

### 113. Conclusiones

- Existen efectos significativos de los diferentes bioinsumos sobre el desarrollo del cultivo de la papa.
- Los biofertilizantes tuvieron un efecto significativo sobre las variables número de tubérculos, peso de la raíz y materia seca.
- No se observó diferencias entre los diferentes biofertilizantes sobre las variables peso de tubérculos y longitud radicular.
- Las combinaciones Trichoderma+micorriza+biobacillus y Tricobal+mibac mostraron un efecto positivo sobre todas las variables.

- La combinación Tricobal+mibac mostro una mayor relación con las variables peso de la raíz y longitud radicular.

#### 114. Recomendaciones

Los efectos benéficos de los microorganismos y la combinación entre estas es positivo para la producción de los cultivos; sin embargo, es importante observar su comportamiento en ambientes naturales debido a que no solo llegan a interactuar con el ambiente si no también con otros microorganismos nativos del lugar.

#### 115. Bibliografía consultada

- BAREA, J.M., AZCÓN, R., and AZCÓN-AGUILAR, C., 2002, Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 343–351.
- GEMMA J.N., KOSKE R.E., CARREIRO M., 1989. Seasonal dynamics of selected species of VA mycorrhizal fungi in a sand dune. *Mycol Res* 92(3), 317-321.
- GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117
- GRAY, E.J, SMITH, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling process. *Soil Biol Biochem* 37:395–412
- MAHAFFEE, W.F. and KLOEPPER, J.W. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbiol Ecol* 34:210–223
- KOSKE R.E., POLSON W.R., 1984. Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? *Bioscience* 34, 420-424.
- SAS INSTITUTE. 2001. The SAS System for Windows. Version 9. SAS Inst., Cary, NC
- SIEVERDING, E. 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Management in Tropical Ecosystems*, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.
- SUBBARAO, N.S. 1988. Phosphate solubilizing micro-organism. In: *Biofertilizer in agriculture and forestry*. Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp 133–142
- XIE, G.H, SU, B.L, and CUI, Z.J. 1998. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. *Acta Microbiol Sin* 38:480–483

#### **Evaluación de bacterias solubilizadoras de fosforo en el cultivo de la papa.**

**Responsable:** Juan José Calisaya.

**Equipo técnico:** Noel Ortuño, Mayra Claros, Juan José Calisaya.

#### **Compendio:**

Con el objetivo de determinar el efecto de bacterias solubilizadoras de fosforo sobre el desarrollo del cultivo de la papa se inocularon 2 aislados de bacterias a dos fuentes de fosforo. Observándose, mayor desarrollo de tubérculos con la aplicación de bacterias solubilizadoras en ambas variedades; aunque el desarrollo de tubérculos fue superior con la bacteria **b2**. Así mismo, aunque no se observo diferencias para la longitud radicular, peso de la raíz y peso de tubérculos, las bacterias y la aplicación de fosforo permitió el desarrollo de mayor volumen radicular y el

desarrollo de tubérculos con un mayor peso. Por lo que las bacterias promueven el desarrollo de la planta a través de la solubilización del fósforo inorgánico del suelo.

**Palabras Claves: Bacterias solubilizadoras, promotoras de crecimiento.**

#### 1. Objetivo.

- Determinar el efecto de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre el desarrollo del cultivo de la papa.

#### 2. Hipótesis.

- No existe efecto de las bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de la planta.

#### 3. Revisión bibliográfica.

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos inorgánicos desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. Este factor viene despertando la atención para la utilización de estos microorganismos como inoculante comercial o el manejo de sus poblaciones como forma de promover una mejor utilización del fósforo existente en el suelo o el adicionado como fertilizante. (Silva Filho & Vidor 2001). La solubilización de fósforo mineral y orgánico se produce por la capacidad que presenta la rizobacteria de producir ácidos orgánicos y fosfatasa. Además produce estimulación del crecimiento vegetal por la presencia de citoquininas, giberelinas y ácido indolacético, así como protección fitosanitaria a los cultivos debido a la producción de antibióticos y presencia de sideróforos en la cepa (Informe Rizobacter).

Pero una de las principales limitantes para el desarrollo de los cultivos es la deficiencia de fósforo de los suelos (Tomei et al. 2005) Las plantas absorben el fósforo casi exclusivamente en la forma inorgánica, que está en la solución del suelo. De esta manera, el fósforo inorgánico disuelto satisface la demanda de los cultivos por unas pocas horas durante el período de crecimiento, aún en suelos con un buen abastecimiento de este nutriente. Por lo tanto, el fósforo deprimido en la solución debe ser repuesto constantemente a partir de formas fácilmente extraíbles, tanto orgánicas como inorgánicas, donde la disolución - disolución y mineralización – inmovilización son procesos críticos en el abastecimiento de fósforo (Boschetti et al. 2001).

Sin embargo, existen grupos microbianos capaces de solubilizar el fósforo edáfico entre ellos los de mayor relevancia son los hongos muchos de los cuales son patógenos como el *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sclerotium*. Un segundo grupo lo constituyen los Actinomycetes grandes productores de sustancias antibióticas y las bacterias como *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*. Este último grupo bacteriano y particularmente una de sus especies, *Pseudomonas fluorescens* han demostrado una gran capacidad por parte de sus cepas de solubilizar las fracciones orgánicas e inorgánicas del fósforo presente en el suelo y consecuentemente se han transformado en microorganismos interesantes para ser aislados, purificados y multiplicados con el propósito de elaborar inoculantes microbianos de alta eficiencia solubilizadora del nutriente fósforo. (Frioni L., 1999). Aunque los resultados mostraron que la respuesta a la inoculación varía en función del grado de fertilidad y la disponibilidad de agua de los suelos, observando la gran importancia que puede adquirir la relación cepa - cultivar.

Así, Romano *et al.*, (2003) reportaron mayor peso en las plantas, mayor número de vainas, mayor número de semillas/planta y mayor peso en las semillas con la aplicación de bacterias solubilizadoras en comparación al testigo en el cultivo del poroto. Por su parte Cracogna *et al.*, (2003), también observaron mayor longitud en las raíces y plantas más altas con la aplicación de bacterias solubilizadoras de fósforo en el trigo

#### 4. Materiales y métodos.

##### Materiales de laboratorio.

- Cajas petri.
- Cámara de flujo.
- Micropipeta.
- 2 aislados de bacterias solubilizadoras de fósforo



- Tubos epemdorf

**Materiales de campo.**

- Semilla de 2 variedades de papa.
- superfosfato.
- Roca fosfórica.
- Macetas de 2 Kgr. de capacidad.
- Regla.

**Metodología.**

**Tratamientos.**

Los tratamientos resultaron de la combinación de dos fuentes de Fosforo (Superfosfato y Roca fosfórica), dos bacterias (b1, b2) en dos variedades de papa (Waycha y Candelero).



**Diseño experimental.**

Los tratamientos fueron evaluados bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con 6 repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por una maceta de 2 kgr de capacidad con una planta.

**Variables de respuesta.**

**Altura de planta.** La cual se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice vegetativo.

**Longitud radicular.** Para lo cual se tomo la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice radicular

**Peso de la raíz.** La misma que se evaluó tomando la parte radicular de la planta (Figura 1).



**Figura 1. Evaluación de la longitud radicular**

**Número de tubérculos.** Para lo cual se tomo el número de tubérculos desarrollados por la planta (Figura 2a, 2b).



a

b

**Figura 2. Evaluación de número de tubérculos. a) Variedad candelero, b) variedad waycha.**

**Peso de tubérculos.** Para esta variable se realizó el pesaje de todos los tubérculos desarrollados por la planta.

**Procedimiento de laboratorio.**

**Procedimiento de campo.**

Durante la siembra se depositó un tubérculo en parte central de la maceta, momento en el cual se realizó la fertilización con el fósforo alrededor del tubérculo sin entrar en contacto directo con el tubérculo. Así mismo, con la ayuda de una micropipeta se inoculó 0,5 ml de las bacterias solubilizadoras al tubérculo. Posteriormente se cubrió el tubérculo con el sustrato.

Durante el desarrollo del cultivo los riegos se realizaron de acuerdo a las necesidades del cultivo. Generalmente 3 días a la semana. Durante la cosecha, la maceta se volteó sobre papel periódico para la extracción de los tubérculos y la raíz (Figura 3a, Figura 3b).



**Figura 3. Extracción de raíces y tubérculos. a) Variedad candelero, b) variedad waycha.**

#### **Análisis estadístico.**

Las variables fueron analizadas bajo la distribución normal previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el PROC MIXED del SAS (2001), bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijkl} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \delta_k + \gamma_{jk} + \tau_l + \lambda_{jl} + \delta_{kl} + \rho_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde :

$i = 1, 2, 3, \dots, 6$  bloques.

$j = 1, 2$  variedades

$k = 1, 2$  fuentes de fosforo

$l = 1, 2$  bacterias

$y_{ijkl}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  – esimo bloque donse se aplico la  $j$  – esima bacteria con el  $k$  – esimo fuente de fosforo en la  $j$  – esima variedad

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  – esimo bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo de la  $j$  – esima variedad.

$\delta_k$  = Efecto fijo del  $k$  – esimo fuente de fosforo.

$\gamma_{jk}$  = Efecto fijo de la interaccion entre el  $k$  – esimo fuente de fosforo y la  $j$  – esimo variedad.

$\tau_l$  = Efecto fijo la  $l$  – esima bacteria.

$\lambda_{jl}$  = Efecto fijo de la interaccion entre la  $l$  – esima bacteria y la  $j$  – esima variedad.

$\delta_{kl}$  = Efecto fijo de la interaccion entre la  $l$  – esima bacteria y el  $k$  – esimo fuente de fosforo.

$\rho_{jkl}$  = Efecto fijo de la interaccion de la  $l$  – esima bacteria y el  $k$  – esimo fuente fosforo dentro la  $j$  – esima variedad

$\varepsilon_{ijkl}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_e^2)$

## 5. Resultados.

El análisis de varianza muestra que hubo variación entre los bloques para todas las variables excepto peso de la raíz (Cuadro 1). Por lo que el diseño experimental fue apropiado.

**Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para 6 caracteres en el cultivo de la papa.**

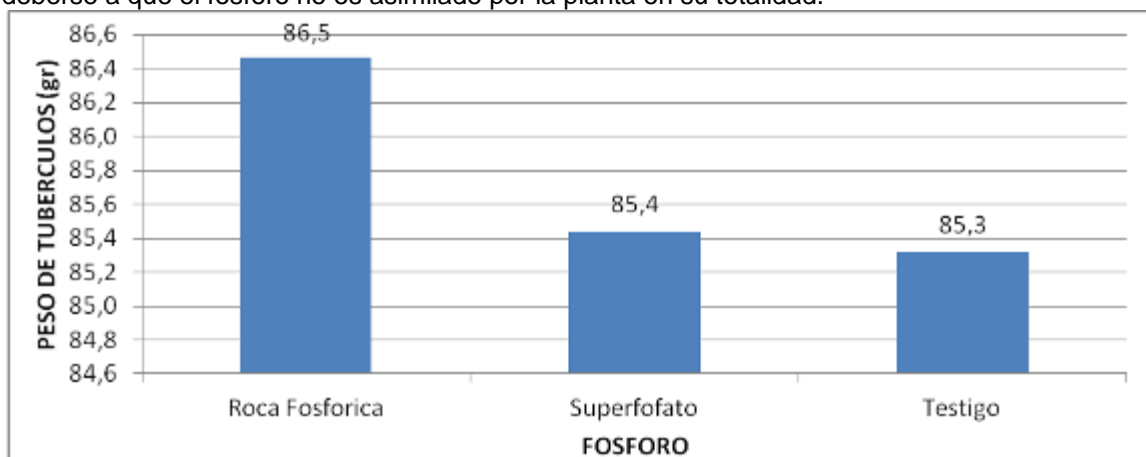
Fuentes de Variación	Grados de	Peso de tubérculos	Número de	Altura de planta	Longitud de la raíz	Peso de la raíz
----------------------	-----------	--------------------	-----------	------------------	---------------------	-----------------

	libertad	tubérculos				
<b>Bloque</b>	5	103,990	0,073	45,394	11,713	0,000
<b>Fosforo</b>	2	552,136	7,626	964,490**	28,041	0,380
<b>Cepas</b>	2	1166,910*	61,182**	492,625**	0,460	0,219
<b>Fosforo*Cepas</b>	2	426,862	23,054**	178,846	14,710	0,357
<b>Variedad*Cepas</b>	1	932,600	1,182	172,459	45,509	2,857
<b>Variedad*Cepas</b>	2	359,585*	5,734	209,186	15,629	1,693
<b>Fosforo*Variedad</b>	2	220,391	30,207**	28,743	28,500	2,096
<b>Fosforo*Variedad*Cepa</b>	13	329,426	14,364*	257,889**	28,960	0,991
<b>Residual</b>	31,8	231,990	5,911	79,842	45,968	1,152
<b>CV%</b>		20,523	25,919	22,163	27,719	23,331
<b>Media</b>		89,889	9,440	51,220	27,163	2,127

\*,\*\* Significativo al 0,05 y 0,01 nivel de significancia.

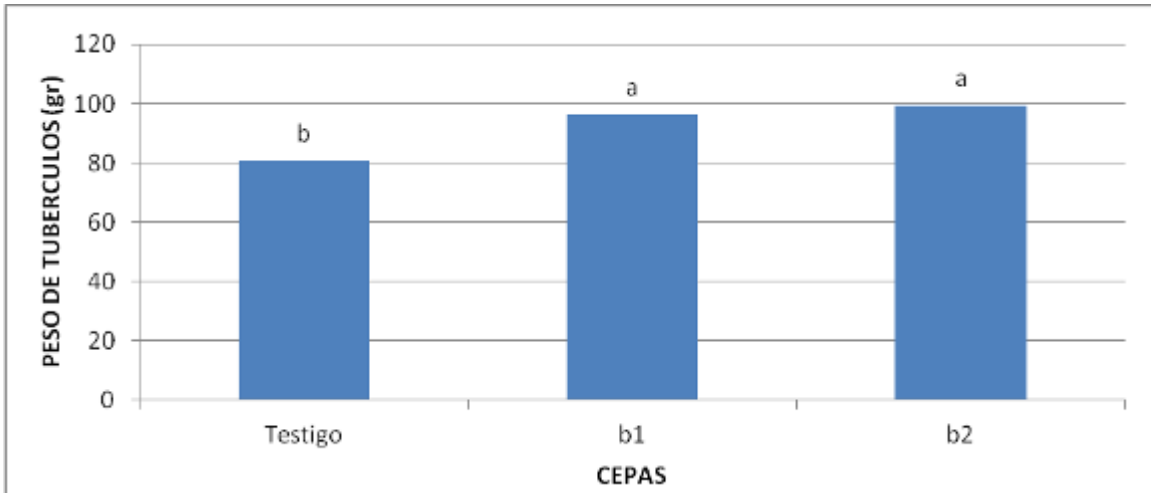
#### Peso de tubérculos.

Para la variable peso de tubérculos no se estimaron diferencias significativas entre los fuentes de fosforo (Cuadro 1) por lo que el peso de los tubérculos fue similar tanto con la aplicación de roca fosfórica o superfosfato en relación al testigo (Figura 4). Aunque las plantas a las que se aplico fosforo presentaron ligeramente mayor peso de tubérculos. Lo cual podría deberse a que el fosforo no es asimilado por la planta en su totalidad.



**Figura 4. Efecto de la aplicación de Fosforo sobre el peso de los tubérculos.**

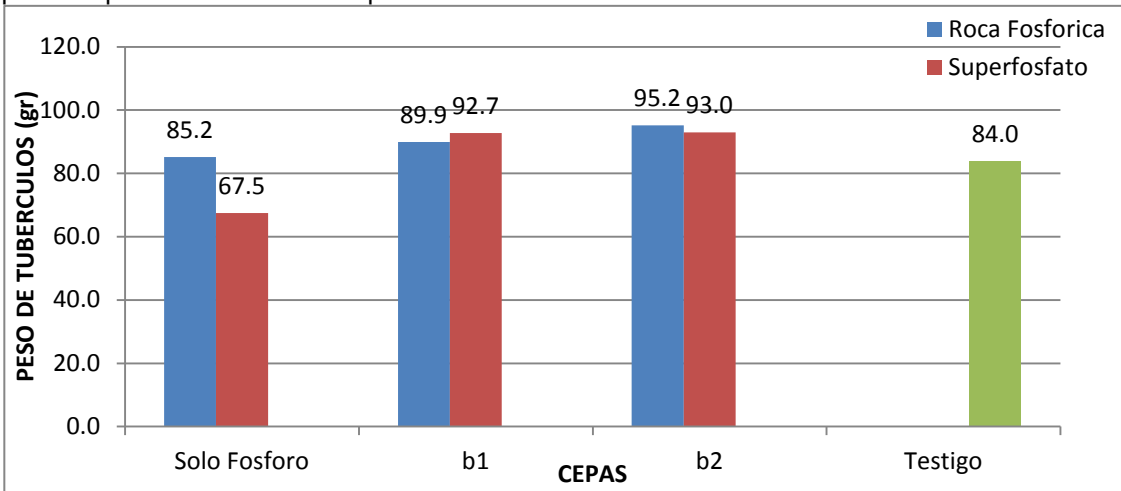
Por otro lado, se observo diferencias con la aplicación de las bacterias (Cuadro 1). Donde, tanto con la aplicación de la bacteria **b1** y **b2**, se observaron tuberculos de mayor peso en comparación al testigo (Figura 5). Lo cual muestra los beneficios de la aplicación de los microorganismos en la agricultura ya que estos llegar a promover el desarrollo de la planta.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

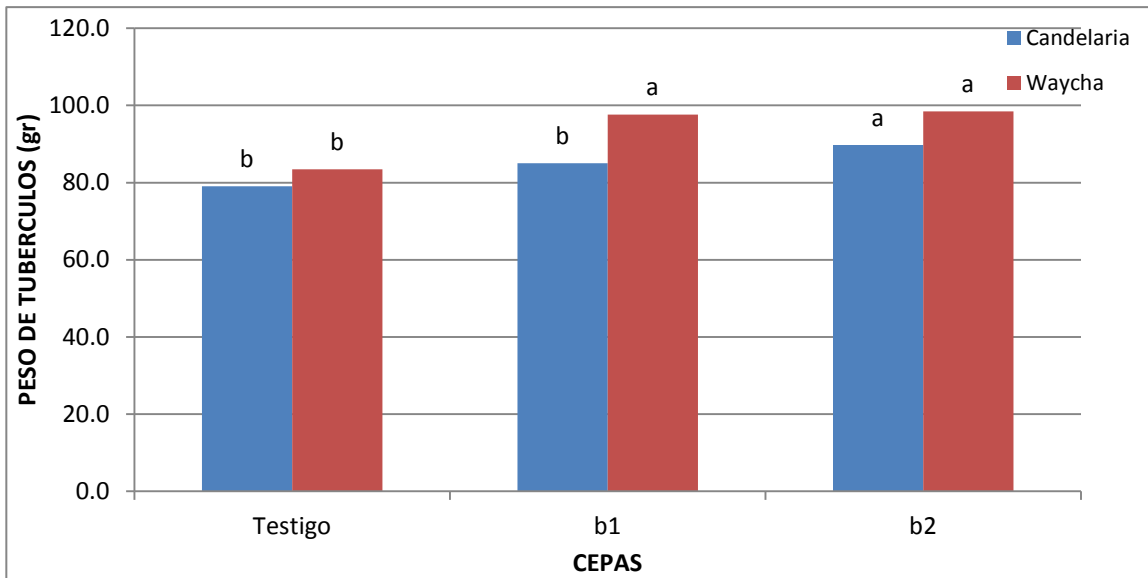
**Figura 5. Efecto de la aplicación de bacterias solubilizadoras de fosforo sobre el rendimiento en el cultivo de la papa.**

Aunque no se observaron diferencias estadísticas entre la interacción de Fosforo y las bacterias (Cuadro 1). Las plantas a las que se aplicó fosforo y fueron inoculadas con las bacterias desarrollaron tuberculos de mayor peso en comparación al testigo y las plantas que recibieron solo la aplicación de Fosforo (Figura 6). Lo cual muestra que las bacterias llegan a solubilizar el fosforo para el aprovechamiento de la planta.



**Figura 6. Efecto de la interacción de Fosforo y bacterias solubilizadoras.**

Sin embargo, se observó diferencias del efecto de las bacterias solubilizadoras en cada una de las variedades (Cuadro 1). Donde, ambas variedades desarrollaron tuberculos de mayor peso con la aplicación de las bacterias solubilizadoras con relación al testigo con excepción de la variedad Candelero que presenta una mejor respuesta a la inoculación con la bacteria **b2** (Figura 7).

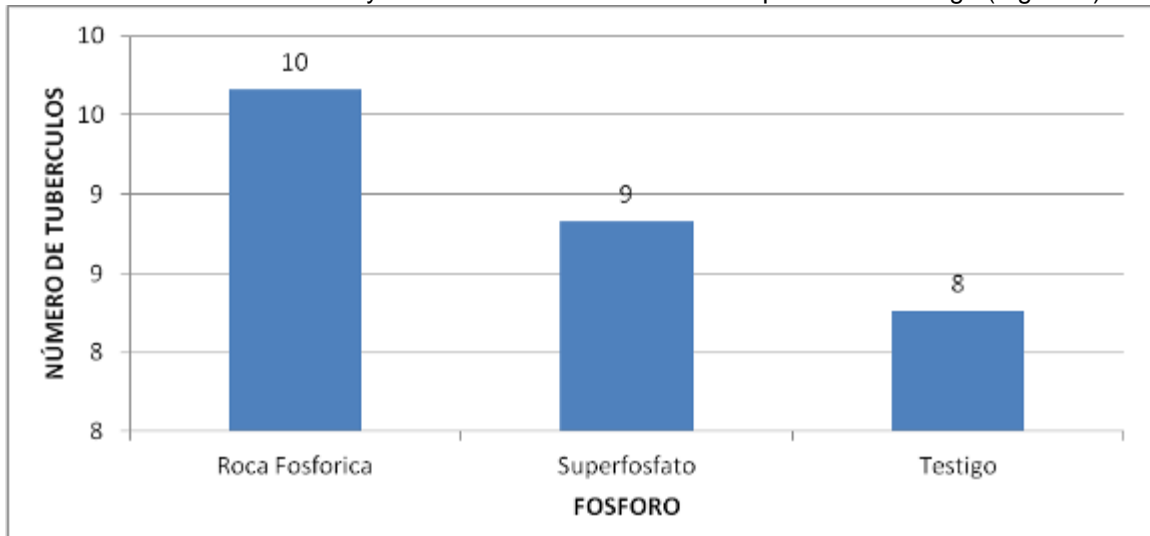


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 7. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de tubérculos en dos variedades de papa

#### Número de tubérculos.

Para la variable número de tubérculos no se estimaron efectos significativos con la aplicación de fósforo en relación al testigo (Figura 8). Sin embargo, la aplicación de fósforo favoreció a la formación de mayor número de tubérculos en comparación al testigo (Figura 9).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

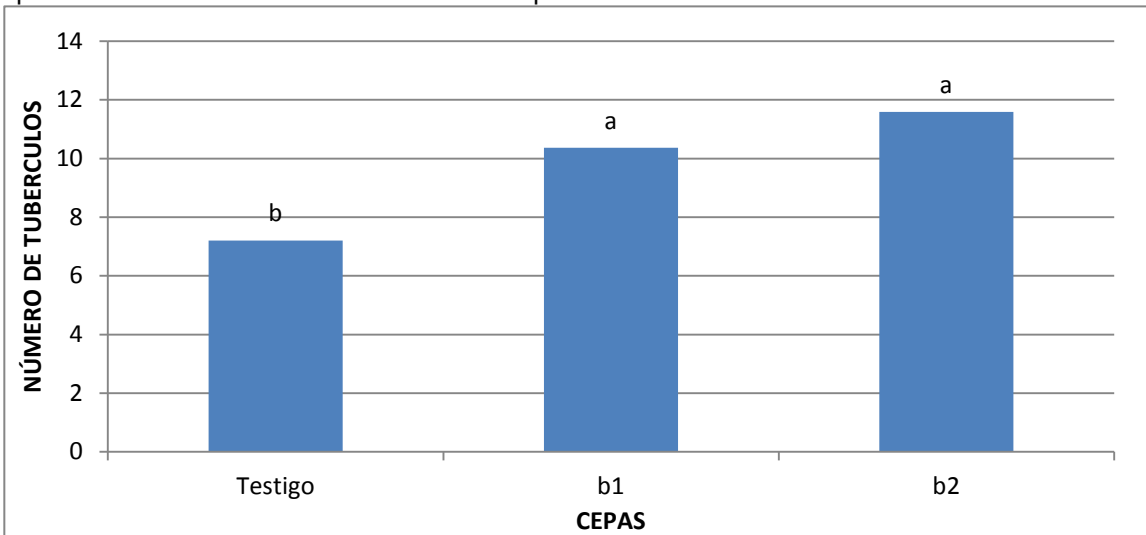
Figura 8. Efecto de la aplicación de Fósforo sobre el desarrollo de número de tubérculos.





**Figura 9. Número de tubérculos desarrollados con la aplicación de fósforo.**

Sin embargo, se observó diferencias en el desarrollo de tubérculos con la aplicación de bacterias solubilizadoras (Cuadro 1). Donde, las plantas que fueron inoculadas desarrollaron mayor cantidad de tubérculos en comparación al testigo (Figura 10, Figura 11). Por lo que la aplicación de estas bacterias sería favorable para el incremento del número de tubérculos.



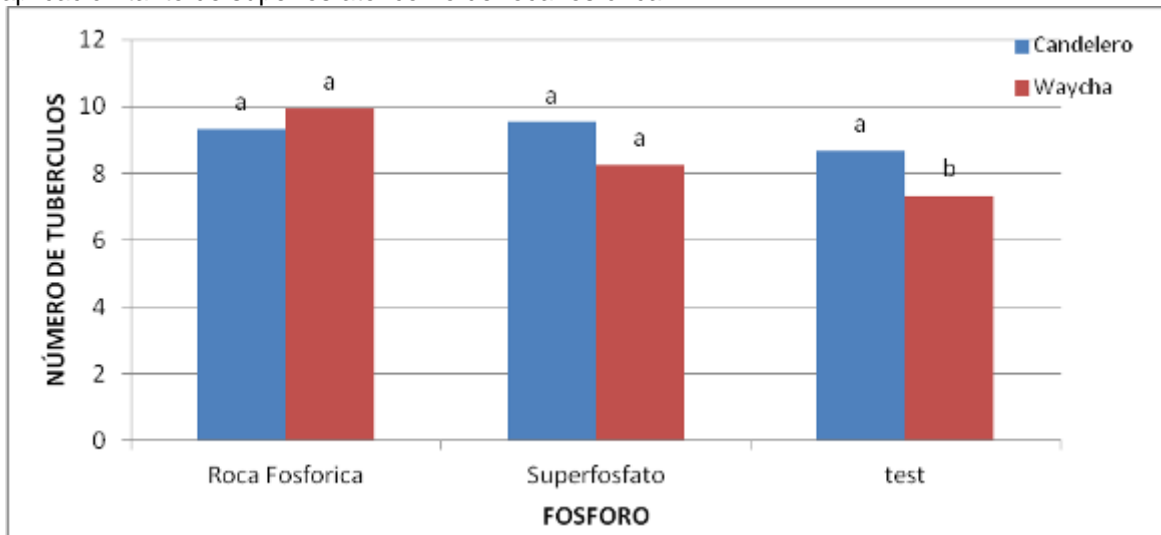
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 10. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de número de tubérculos.**



**Figura 11. Número de tubérculos con la aplicación de bacterias solubilizadoras de fósforo.**

Así mismo, se observó diferencias significativas entre la aplicación de fósforo en ambas variedades (Cuadro 1). En la que ambas variedades desarrollaron mayor número de tubérculos con la aplicación tanto de roca fosfórica como superfosfato en comparación al testigo (Figura 11, Figura 12). Aunque, en el caso de la variedad Candeleró respondió casi de igual manera a la aplicación tanto de superfosfato como de roca fosfórica.

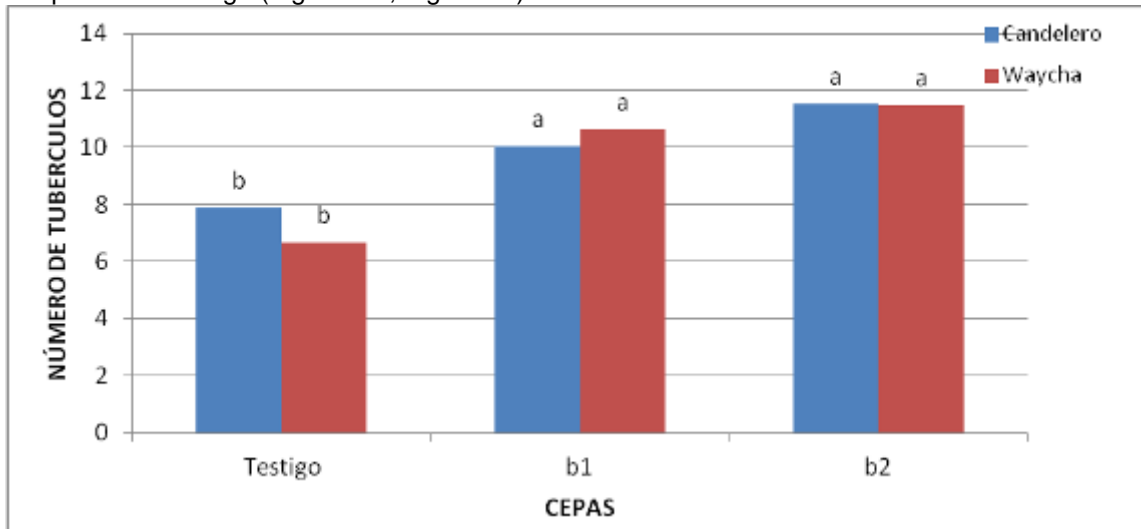


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
 Figura 11. Efecto del Fósforo sobre el desarrollo de número de tubérculos.



**Figura 12. Efecto de la aplicación de fósforo sobre el número de tubérculos en la variedad waycha**

Así mismo, se estimaron efectos significativos entre la interacción de las bacterias solubilizadoras y las variedades de papa (Cuadro 1). Donde, tanto la variedad Candelero como la variedad Waycha desarrollaron mayor número de tubérculos con la aplicación de las bacterias en comparación al testigo (Figura 13, Figura 14).



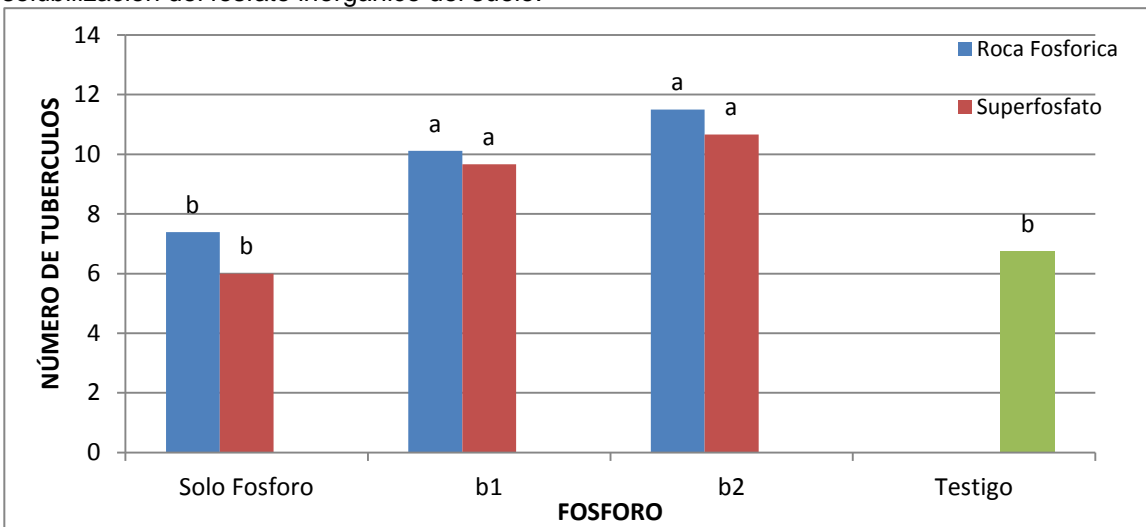
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 13. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de los tubérculos.**



**Figura 14. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de tubérculos en la variedad Canelero**

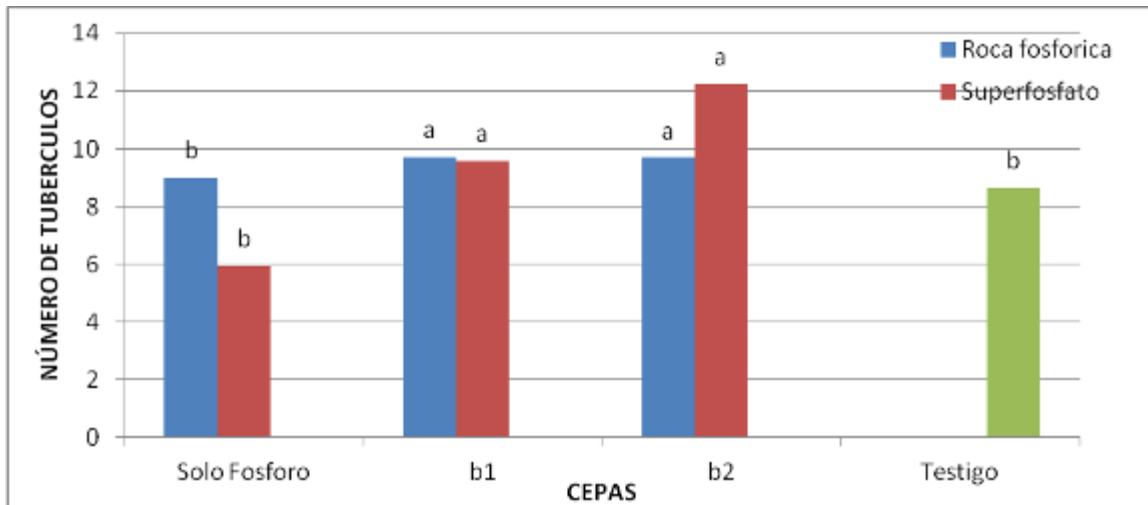
Por otra parte, también se observó diferencias entre la interacción de las bacterias y la aplicación de fósforo (Cuadro 1). Lo cual indica que algunas bacterias llegan a solubilizar el fósforo más que otras. Así, el número de tubérculos fue superior con la aplicación de fósforo y la inoculación de bacterias solubilizadoras en comparación al testigo (Figura 15). Lo cual muestra que las bacterias pueden ser beneficiosas para el desarrollo del número de tubérculos mediante la solubilización del fósforo inorgánico del suelo.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 15. Efecto de la interacción entre el fósforo y las bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de número de tubérculos.**

Así mismo, se observó diferencias entre la interacción entre variedades\*fósforo\*bacteria (Cuadro 1). Lo cual muestra que las variedades respondieron de diferente manera a la aplicación de fósforo y la inoculación de las bacterias (Figura 16). Así la variedad Canelero desarrolló mayor cantidad de tubérculos con la aplicación de superfosfato en combinación de la bacteria b2 (Figura 17).



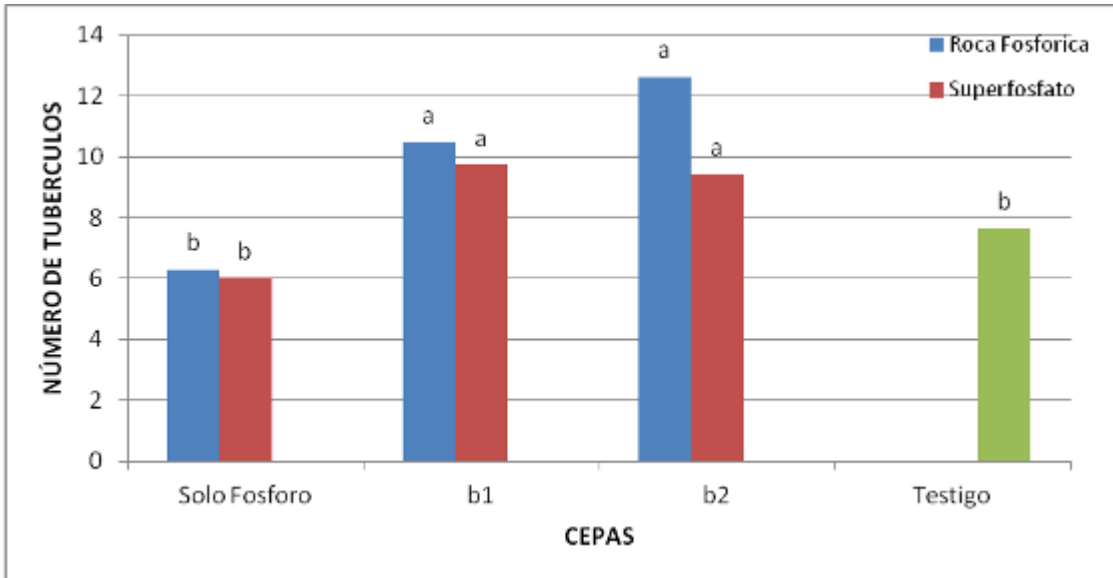
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 16. Efecto de la aplicación de fósforo y bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de número de tubérculos en la variedad candelero.



Figura 17. Número de tubérculos con la aplicación de fósforo y bacterias solubilizadoras en la variedad candelero. a) Superfosfato, b) Roca fosfórica.

En cambio la variedad waycha presentó mayor desarrollo de tubérculos con la aplicación de roca fosfórica y las bacterias b1 y b2 (Figura 18, Figura 19). Por lo que, la aplicación de roca fosfórica y superfosfato en combinación a las bacterias permitió mayor desarrollo de número de tubérculos en comparación al testigo y la aplicación de solo fósforo.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

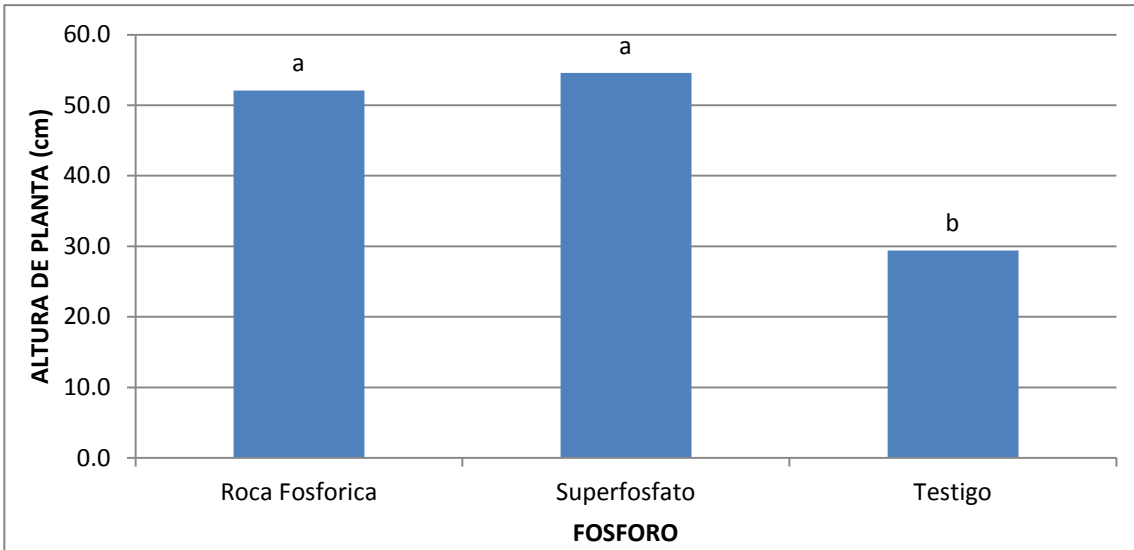
Figura 18. Efecto de la aplicación de fósforo y bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de número de tubérculos en la variedad waycha.



Figura 19. Número de tubérculos con la aplicación de fósforo y bacterias solubilizadoras en la variedad waycha. a) Roca fosfórica, b) Superfosfato.

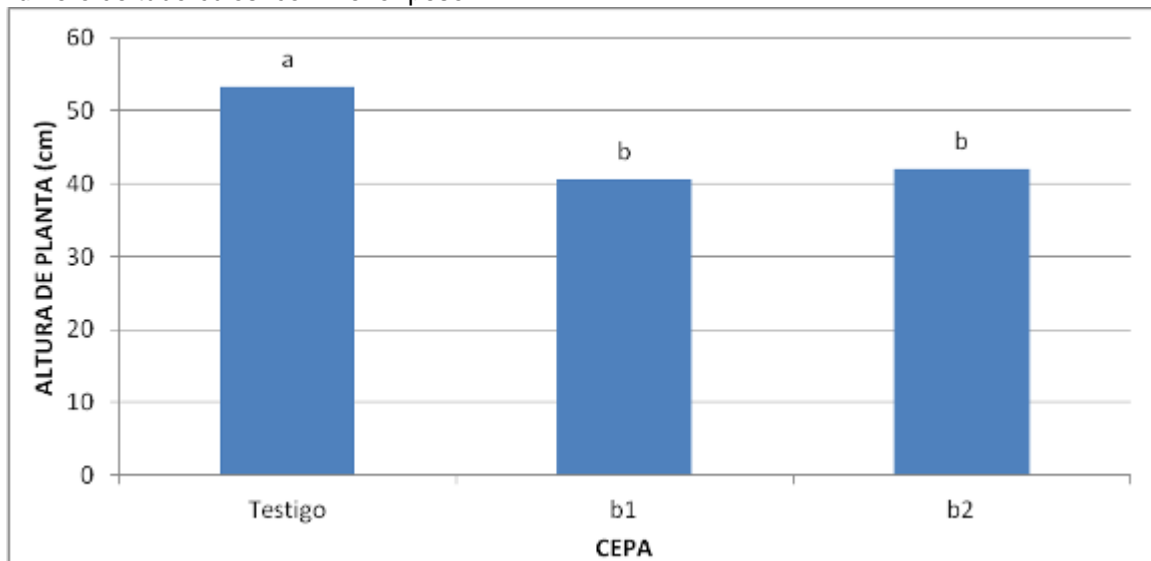
**Altura de planta.**

Para la altura de la planta se estimaron diferencias para la aplicación de fósforo (Cuadro 1). Por lo que la altura de planta fue superior con la aplicación de roca fosfórica y superfosfato en comparación al testigo (Figura 20).



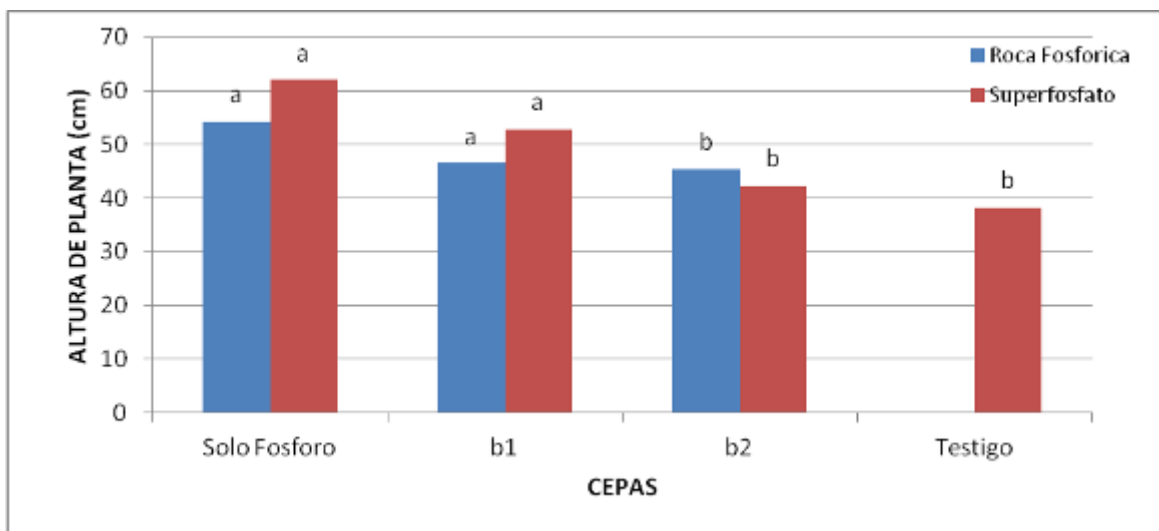
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 20. Efecto de la aplicación de fósforo sobre la altura de la planta**

Así mismo, se estimaron diferencias en la altura de planta para la aplicación de bacterias solubilizadoras (Cuadro 1). Aunque, las plantas que recibieron la inoculación de las bacterias desarrollaron plantas más pequeñas en comparación al testigo (Figura 21). Esto podría ser debido a que las plantas que presentan alguna deficiencia nutricional tienden a elongarse para llegar a completar su ciclo. Sin embargo si bien las plantas fueron más altas, estas desarrollaron menor número de tubérculos con menor peso.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
**Figura 21. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre la altura de la planta.**

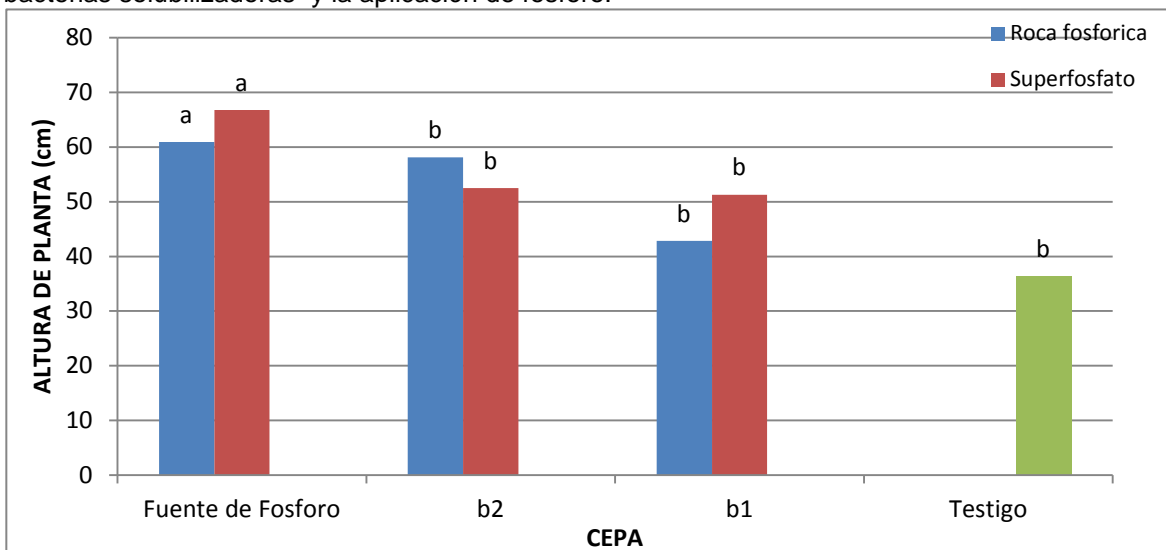
Así mismo, se estimó diferencias para la combinación de fósforo\*bacterias\*variedad (Cuadro 1). Lo cual indica que las variedades respondieron de diferente manera a la aplicación de fósforo y las bacterias solubilizadoras. Así, en la variedad candelero las plantas a las que se aplicó solo fósforo y la combinación de roca fosfórica y superfosfato con la bacteria b1 desarrollaron plantas más altas que aquellas a las que se aplicó fósforo en combinación a la bacteria b2 y el testigo (Figura 22).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 22. Efecto de la interacción de de fosforo y bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de la planta de la variedad candelero.**

Por otra parte, en la variedad waycha las plantas a las que se aplico fosforo son las que desarrollaron plantas mas altas seguida de la aplicación de de rocafosforica y superfosfato conbinado con la bacteria b2 (Figura 23). Sin embrago, si bien las plantas fueron mas altas, el desarrollo del número de tubérculos y el peso de los tuberculos fue superior con la aplicacion de bacterias solubilizadoras y la aplicación de fosforo.



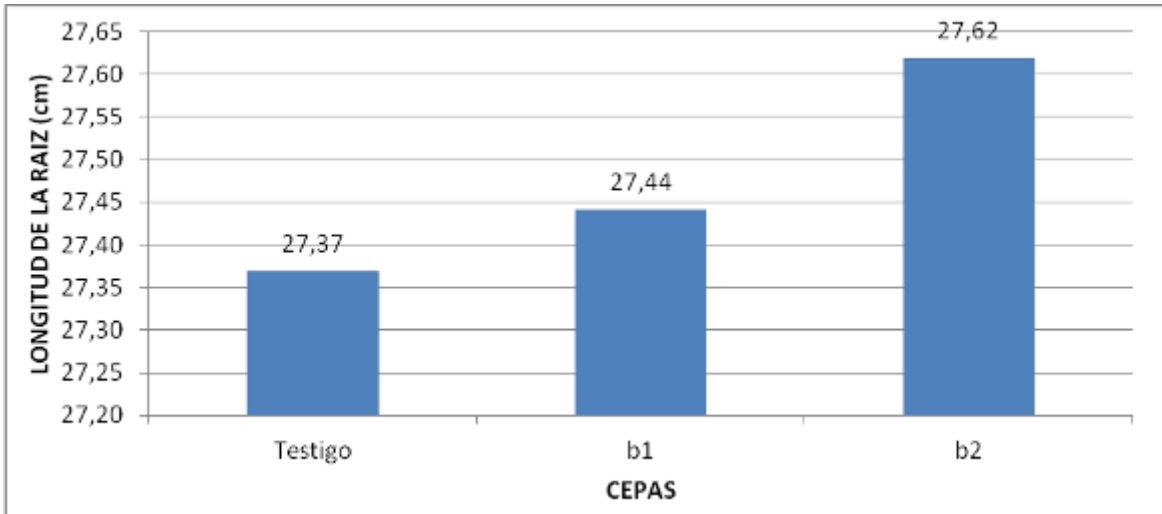
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 23. Efecto de la interacción de fosforo y bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo de la altura de planta en la variedad waycha**

**Longitud de la raíz.**

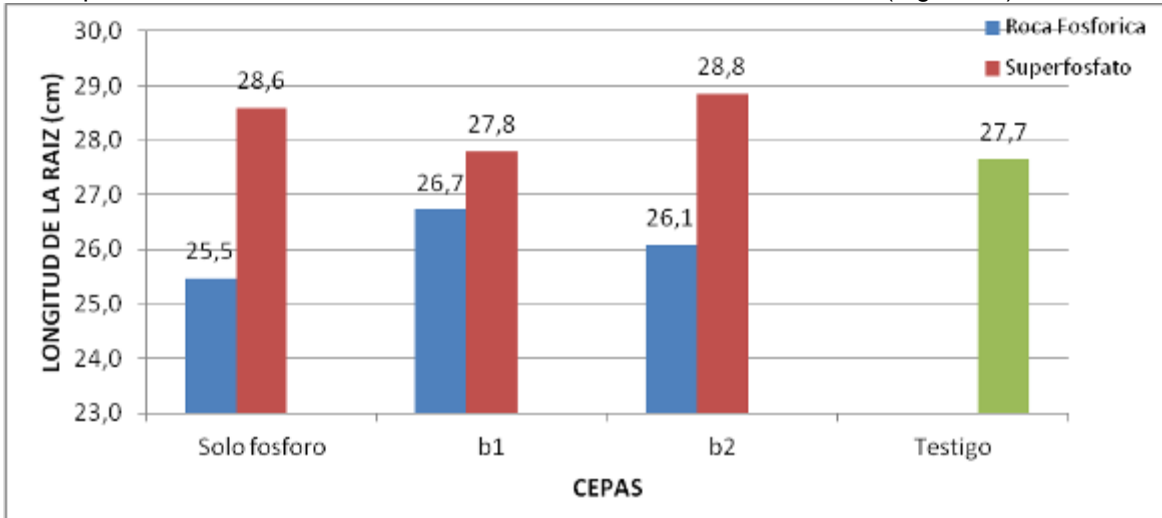
Para la variable longitud radicular no se estimaron diferencias significativas con la aplicación de fosforo (Cuadro 1) por lo que las plantas desarrollaron similar longitud radicular. Asi mismo no se observo diferencias con la aplicación de las bacterias solubilizadoras de fosforo (Cuadro 1); sin embrago, la aplicación de ambas bacterias posibilito el desarrollo mayor longitud radicular en compracion al testigo (Figura 24). Observándose, raíces ligeramente más larga con la aplicación de la bacteria b2.





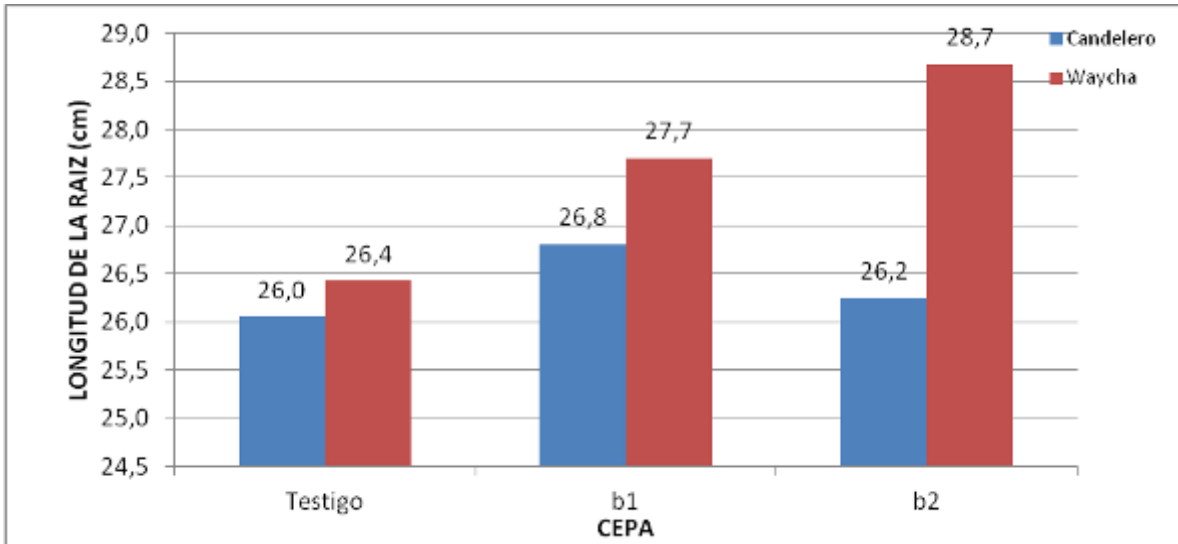
**Figura 24. Efecto de bacterias solubilizadoras sobre la longitud radicular.**

Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las bacterias solubilizadoras y el fósforo (Cuadro 1). Sin embargo, se observó mayor desarrollo radicular con la aplicación de solo superfosfato o en combinación con ambas bacterias solubilizadoras (Figura 25).



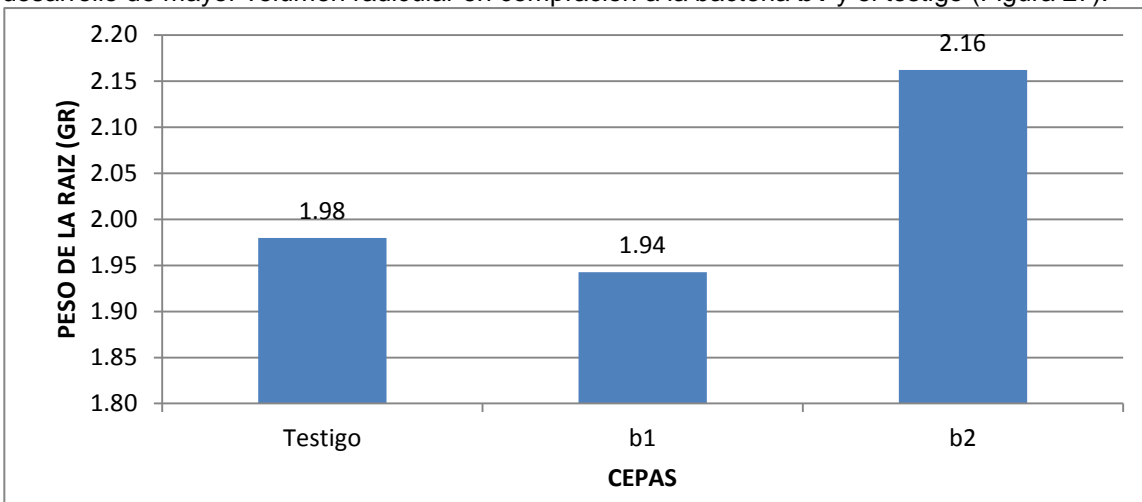
**Figura 25. Efecto de la interacción de fósforo y bacterias solubilizadoras sobre la longitud de la raíz**

Así mismo, no se estimaron diferencias significativas para las variedades y las bacterias solubilizadoras (Cuadro 1). Aunque, ambas variedades desarrollaron raíces más largas con la aplicación de las bacterias solubilizadoras a excepción de la variedad waycha y la bacteria **b2** (Figura 26). Por lo que la aplicación de las bacterias facilita la absorción de nutrientes.



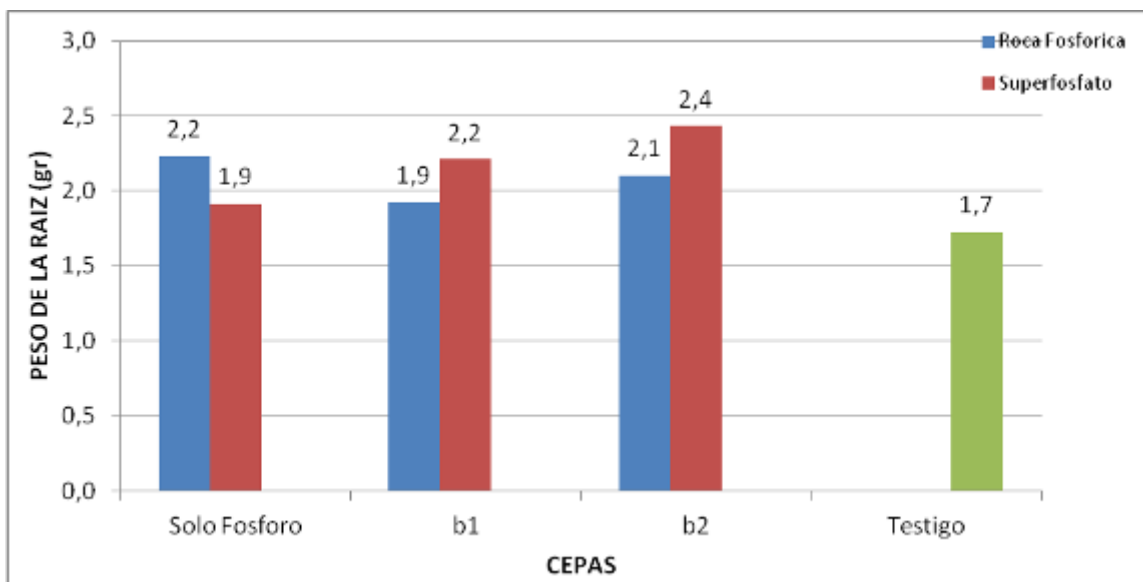
**Figura 26. Efecto de las bacterias solubilizadoras sobre la longitud radicular. Peso de la raíz.**

Para la variable peso de la raíz tampoco se observaron diferencias para la aplicación de fósforo (Cuadro 1). Por lo que el peso de la raíz fue similar con la aplicación tanto de roca fosfórica como la de superfosfato. Así mismo, no se estimaron diferencias para el desarrollo de la raíz con la aplicación de las bacterias solubilizadoras (Cuadro 1). Sin embargo, la bacteria **b2** favoreció el desarrollo de mayor volumen radicular en comparación a la bacteria **b1** y el testigo (Figura 27).



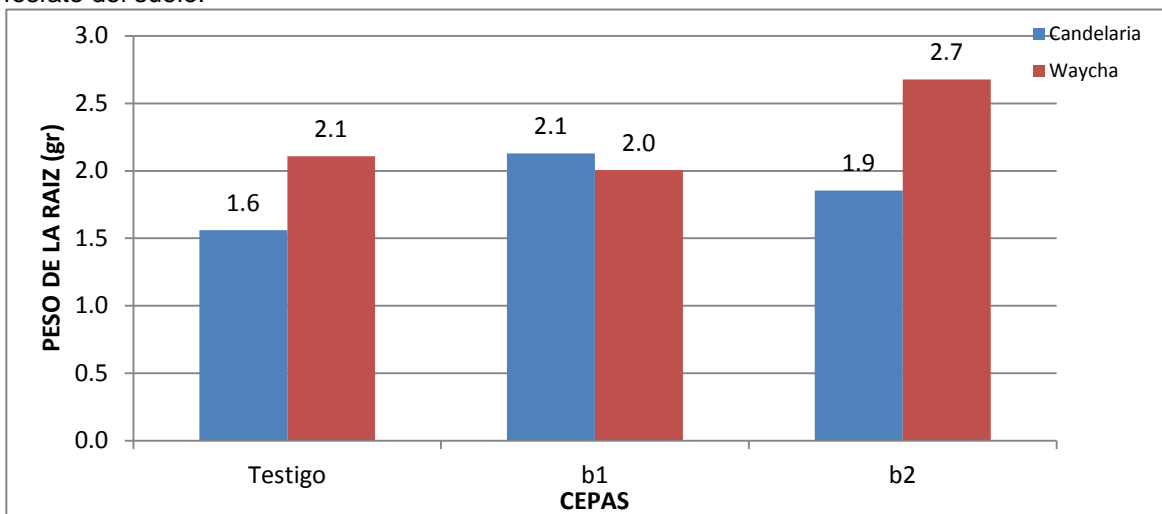
**Figura 27. Efecto de las bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo radicular**

Así mismo, si bien no se observaron diferencias significativas para la interacción de fósforo y las bacterias solubilizadoras (Cuadro 1); se observó mayor desarrollo radicular con la aplicación de fósforo o en combinación con bacterias solubilizadoras en comparación al testigo (Figura 28).



**Figura 28. Efecto de la interacción de las bacterias solubilizadoras y la aplicación de fosforo sobre el desarrollo radicular.**

Aunque no se observaron diferencias para la interacción de bacterias y las variedades (Cuadro 1). Tanto la variedad candelero y waycha desarrollaron mayor volumen radicular con la aplicación de las bacterias solubilizadoras en comparación al testigo (Figura 29). Lo cual muestra que las bacterias son benéficas para el desarrollo de la planta mediante la solubilización del fosfato del suelo.



**Figura 29. Efecto de las bacterias solubilizadoras sobre el desarrollo radicular.**

## 6. Discusión.

Los resultados muestran que aunque no se observo diferencias significativas para las variables longitud de la raíz y peso de la raíz. Las variedades tanto la waycha como la variedad candelero desarrollaron raíces más largas en combinación a las dos bacterias solubilizadoras. Aunque, la variedad waycha desarrollo raíces más largas con la bacteria b2 y la variedad candelero con la bacteria b1. Así mismo, no se observaron diferencias significativas para la variable peso de tubérculos; sin embargo, la aplicación de fosforo y la inoculación de las bacterias posibilito el desarrollo de tubérculos ligeramente con mayor peso respecto a la aplicación de solo fosforo y el testigo. Lo cual muestra que el fosforo no es totalmente asimilable por la planta. Lo cual podría ser debido a que el P inorgánico disuelto satisface la demanda de los cultivos por un periodo reducido. Por lo tanto, el fósforo deprimido en la solución debe ser repuesto constantemente a partir de formas fácilmente extraíbles, tanto orgánicas como inorgánicas, donde la diserción -

disolución y mineralización – inmovilización son procesos críticos en el abastecimiento de fósforo (Boschetti *et al.*, 2001).

Así mismo, las diferencias significativas para número de tubérculos muestra la importancia del uso de microorganismos para la solubilización del fósforo. Donde las variedades tanto waycha como candelero desarrollaron mayor número de tubérculos cuando se aplicó fósforo y se inocularon las bacterias solubilizadoras. Observándose, mayor número de tubérculos con la aplicación de la bacteria **b2**. Por lo que, la bacteria b2 podría ser un gran potencial para la producción agroecológica; aunque ambas bacterias permitieron el desarrollo de mayor número de tubérculos.

Por otra parte, aunque se observaron diferencias para la altura de la planta, las plantas a las que no se aplicó fósforo y a las que se colocó solo fósforo presentaron mayor altura de planta en comparación a la aplicación de bacterias solubilizadoras y fósforo. Lo cual podría deberse a que las plantas llegaron a elongarse por la falta de nutrientes disponibles para la planta. Porque el desarrollo de número de tubérculos y el peso de los tubérculos fue inferior en comparación a la aplicación de la combinación bacterias solubilizadoras \*fósforo.

### **7. Conclusiones.**

- No se observó diferencias significativas para las variables longitud radicular, peso de la raíz y peso de tubérculos.
- Se observaron diferencias significativas para las variables número de tubérculos y altura de planta.
- Existe desarrollo de mayor número de tubérculos con la aplicación de bacterias solubilizadoras de fósforo en ambas variedades.
- La bacteria b2 favorece ligeramente mayor desarrollo de tubérculos en comparación a la bacteria b1.
- Las plantas que solo reciben fósforo tienden a desarrollar plantas más altas limitando el desarrollo de tubérculos.
- Las microorganismos favorecen la asimilación del fósforo inorgánico del suelo.

### **8. Recomendaciones.**

Es evidente la importancia del uso de los microorganismos en la agricultura por lo que se recomienda evaluar las bacterias solubilizadoras solo en diferentes variedades de papa si no también en diferentes cultivos bajo diferentes condiciones ambientales.

### **9. Bibliografía consultada.**

- Boschetti, N.G.; Quintero C.E.; Benavidez, R.A. Giuffrè, L. 2001. Destino del fósforo proveniente de diferentes fuentes de fertilizante fosfatado en suelos de la provincia de Entre Ríos. Revista Científica Agropecuaria, FCA, UNER. Vol. 5: 23 - 30.
- Cracogna, Mariano F. - Iglesias, María C. - Díaz, Irma - González, Noelia - Carbajal, María L. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: A-045.
- Froni, L. 1999. Procesos Microbianos. Tomo 1. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. p. 250-255.
- Rizobacter "Desarrollo de la aplicación de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo en los principales cultivos del norte de Buenos Aires, Trigo" Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, On-line disponible [www.rizobacter.com.ar](http://www.rizobacter.com.ar) conectado el 17/11/02.
- Romano, As.; Altamirano, FE.; Arguello, JA.; Teves, I.; Cazón, L. 2003. Efectos de la inoculación con *Pseudomonas* fluorescentes 51B sobre la germinación y crecimiento de dos cultivares de poroto (*Phaseolus vulgaris* L) Revista de Ciencia y Tecnología Nº 8, UNSE.
- Silva Filho G. N. & Vidor C. 2001 "Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio" Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508.

## **Efecto de la combinación de bacterias fijadoras de nitrógeno y biofertilizantes en el cultivo de haba**

**Responsable:** Juan José calisaya.

**Equipo técnico:** Noel Ortuño, Mayra Claros, Juan José calisaya.

### **Compendio.**

Con el objetivo de determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* spp. en combinación con diferentes biofertilizantes, se llevo el ensayo con la aplicación de 8 biofertilizantes y 3 aislados de *Rhizobium*. Los resultados muestran que tanto las bacterias como los biofertilizantes tuvieron un efecto positivo sobre el desarrollo de número de nódulos y por tanto el desarrollo de planta. Donde los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus desarrollaron un efecto superior en combinación con las tres bacterias. Así mismo, las 3 bacterias mostraron mayor desarrollo de nódulos en la posición intermedia-apical y toda la extensión de la raíz de la planta favoreciendo de esta manera el desarrollo de la planta.

**Palabras claves:** Biofertilizantes, fijadoras de nitrógeno, promotoras de crecimiento

### **6. Objetivo.**

- Determinar el efecto de *Rhizobium* spp. en combinación con diferentes biofertilizantes en el cultivo de haba.

### **7. Hipótesis.**

- Las bacterias fijadoras de nitrógeno interactúan de la misma manera con todos los biofertilizantes.

### **8. Revisión bibliográfica.**

El cultivo de haba es uno de los más importantes por su alto contenido de proteína. En este sentido, desde hace muchos años se llevan prácticas agrícolas para evitar el efecto de los productos químicos. Los sistemas de agricultura bio-organica es la reciente tendencia introducida para la obtención de productos sanos. La aplicación de biofertilizantes al suelo es el método común en la agricultura orgánica. En el ecosistema del suelo, microorganismos patogénicos y no patogénicos están en competición unos con otros (Sikora y Reimann, 2004). Así, cada suelo tiene un potencial antagonista contra patógenos específicos que evitan la diseminación de un patógeno (Sikora, 1992). Por lo que en ambientes naturales el control biológico resulta de la combinación de antagonistas en ves de una población alta de un simple antagonista. Así, la combinación de diferentes microorganismos podría imitar la situación natural lo cual podría ampliar el espectro de la actividad de biocontrol y por tanto la eficiencia del control (Duffy *et al.*, 1995).

La inoculación de las leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno promueven el crecimiento de la planta e incrementan el rendimiento (Sankaranayanan *et al* 1995), porque las bacterias del genero rhizobium conviven en simbiosis con las leguminosas. Las mismas que producen fitohormonas, sideróforos que permiten el desarrollo de plantas así como la resistencia a los patógenos (Dileep-Kumar, 1999). Sin embargo, la fijación efectiva del nitrógeno producto de la fijación simbiótica entre las rhizobias y las leguminosas dependen principalmente de la bacteria, cultivar y el ambiente (Sorwli y Mytton (1986).

Por otro lado la pudrición de la semilla y las raíces del cultivo de haba han sido consideradas como factores que limitan el crecimiento y el rendimiento. Por lo que se han llevado varias investigaciones para reducir el impacto de las enfermedades incluyendo mejoramiento a la resistencia de la enfermedad (El- Gantiry et al., 1994), control con fungicidas (Kh aled et al., 1995) y control biológico (Abdel, 1992). Sin embargo, se ha prestado gran atención a las bacterias

promotoras de crecimiento (PGPR) como una alternativa a los productos químicos (Arora, 2001). Los hongos micorrizicos arbusculares son conocidos también por facilitar la disponibilidad de fosforo y otros nutrientes a la planta (Bodker, et al., 1998). Esta disponibilidad de nutrientes puede conducir a un escape o una tolerancia contra agentes patogénicos (Dehne, 1982). La superioridad nutricional de plantas inoculadas con micorrizas ha sido propuesta por ser un mecanismo para la reducción de las enfermedades radicales (Bodker, et al., 1998). Las bacterias solubilizadoras de fosforo también pueden actuar con los rhizobias durante el proceso de colonización de las raíces promoviendo la formación de nódulos y la fijación biológica del nitrógeno en las leguminosas (Brockwell, et al., 1995).

Así, Bardr El-Din et al., (1987) reportaron que el número de nódulos y el peso de la materia seca de los nódulos, inoculados con bacterias de *Rhizobium* y *Glommus spp.* en el cultivo de la soya fueron superiores que cuando se inoculo solo rhizobium. Rodelas et al., (1998) también reportaron mayor cantidad de nódulos con la combinación de *Azotobacter* y *Rhizobium*. La materia seca de los nódulos fue incrementado hasta en 38% en comparación a las plantas que recibieron solo la inoculación de rhizobium. Por lo que las interacciones ecológicas entre rhizobias y otras bacterias del suelo han sido de interés in recientes años por sus implicaciones agronómicas. Así, muchos estudios reportaron mayor nodulacion y crecimiento en una amplia variedad de forrajes y leguminosas de grano debido a la interacción entre rhizobium y *Azospirillum* (Iruthayathas et al., 1983; Yahalom et al., 1987). Por otra parte, *Azotobacter* (particularmnete *A. chroococcum*) ocurre ampliamente en los suelos agrícolas de regiones atemperados y en suelos con pH cercano a lo neutral y pueden ser fácilmente encontrados en asociación con cereales y leguminosas (Kole et al., 1988; MartõÁñez- Toledo et al., 1991). Sin embrago, la influencia de estas bacterias sobre la interaccion de *Rhizobium*-leguminosas ha sido explorado en menor extensión particularmente en leguminosas de grano (Burns et al., 1981).

## **9. Materiales y Métodos.**

### **Ubicación del ensayo.**

El ensayo se implemento en los invernaderos de la FUNDACION PROINPA ubicada en la zona de El Paso

### **Materiales de laboratorio.**

- Cajas petri.
- Cámara de flujo.
- Micropipeta.
- 3 cepas de *Rhizobium*
- Tubos ependorf
- Biobacillus.
- Micorrizas.
- *Trichoderma*.
- Mibac.
- Tricobal.

### **Materiales de campo.**

- Semilla de haba.
- Macetas de 2 kg.
- Regla.

### **Metodología.**

### **Tratamientos.**

Los tratamientos a evaluar resultaron de la combinación de tres cepas de rizobium y 7 biofertilizantes:

Rh <sub>1</sub> +Bs	T1	Rh <sub>2</sub> +Bs	T9	Rh <sub>3</sub> +Bs	T17
Rh <sub>1</sub> +Mico	T2	Rh <sub>2</sub> +Mico	T10	Rh <sub>3</sub> +Mico	T18
Rh <sub>1</sub> +Tricho	T3	Rh <sub>2</sub> +Tricho	T11	Rh <sub>3</sub> +Tricho	T19
Rh <sub>1</sub> +Mibac	T4	Rh <sub>2</sub> +Mibac	T12	Rh <sub>3</sub> +Mibac	T20
Rh <sub>1</sub> +Trico	T5	Rh <sub>2</sub> +Trico	T13	Rh <sub>3</sub> +Trico	T21
Rh <sub>1</sub> +Trico+mibac	T6	Rh <sub>2</sub> +Trico+mibac	T14	Rh <sub>3</sub> +Trico+mibac	T22
Rh <sub>1</sub> +Tricho+Micorriza+Bs	T7	Rh <sub>2</sub> +Tricho+Micorriza+Bs	T15	Rh <sub>3</sub> +Tricho+Micorriza+Bs	T23
Rh <sub>1</sub>	T8	Rh <sub>2</sub>	T16	Rh <sub>3</sub>	T24
				Testigo	T25

### Diseño experimental.

Los tratamientos fueron evaluados bajo el diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Donde la unidad experimental lo constituyo una maceta de 2 kg de capacidad

### Procedimiento de laboratorio.

#### Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo LM se preparó 500 ml que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 gr., MgSO<sub>4</sub> 0,1 gr., NaCl 0,05 gr., Manitol 0,5 gr., Extracto de levadura 0,5 gr., mezclar bien enrasando con H<sub>2</sub>O destilada hasta 500cc. Dividiéndolo en pequeños erlenmeyers de 50 ml para la multiplicación de cada aislado. Posteriormente el medio se autoclavo por 15 min. a 20 psi de presión.

#### Inoculación de rhizobium spp al medio LM

Para la inoculación de los medios de cultivo se procedió con un asa bacteriana a sacar una pequeña cantidad de bacteria de la placa cultivada anteriormente para luego ponerla en un erlenmeyer conteniendo el caldo preparado (McFarland, 1970). Así se procedió para el resto de los erlenmeyeres. La duración de la prueba fue de 7 días y en el octavo día se hicieron las lecturas de la concentración de la cepa.

#### Conteo de conidios (Concentración)

Para el conteo de conidias se puso 1 ml del caldo de cultivo en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyó 1 a 2 veces más dependiendo de la concentración de la solución para luego observar en el hematocímetro para el conteo respectivo. Para el montaje de la suspensión se tomó 10 ml con una micropipeta colocando 5ml en cada ranura de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la lectura en las dos cámaras, en los cuadrados más pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\#de\ conidias/ml = Suma\ de\ los\ 5C.S. \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

#### Procedimiento de campo.

La siembra se realizo en macetas de 2 kilogramos de capacidad depositando una semilla en la parte central de la planta momento en el que aplicaron además los biofertilizantes en las dosis recomendadas. Determinada la concentración (10x8) con la ayuda de la micropipeta se deposito 0,5 de solución en tubos ependorf de cada una de las bacterias. La inoculación de las bacterias se realizo en el cuello de la planta cuando. Así mismo, los riegos se realizaron dependiendo a la necesidad del cultivo.

### **VARIABLES DE RESPUESTA:**

Las variables de respuesta se evaluaron cuando las plantas presentaron vainas en madurez fisiológica las mismas que fueron.

**Altura de planta.** La cual se evaluó desde la base de la planta hasta el ápice vegetativo.

**Número de tallos.** Se evaluó como el número tallos desarrollados por la planta.

**Número de vainas.** Para lo cual se realizó el conteo de todas las vainas desarrolladas por la planta

**Longitud de la raíz.** La misma que se evaluó desde el cuello vegetativo hasta el ápice de la raíz

**Peso de la planta.** Para esta variable se realizó el pesado de la parte foliar de la planta

**Peso de la raíz.** Para lo cual se realizó el pesado de la parte radicular de la planta.

**Número de nódulos/planta.** Debido a la cantidad de nódulos desarrollados y la dificultad de realizar el conteo la cantidad de nódulos se evaluó bajo una escala donde: **baja**= menos de 15 nódulos, **media**=entre 15-50 nódulos y **alta**=mayor a 50 nódulos por planta.

**Posición de los nódulos.** La cual se evaluó como: **B**=en la parte superior cerca al cuello de la planta, **I**= cuando las plantas desarrollaron los nódulos desde la parte intermedia hacia la parte apical de la raíz y **A**= Cuando se observó el desarrollo de nódulos en la parte apical de la raíz y **T**= en toda la raíz.

**Materia seca de la raíz.** Para lo cual se procedió al secado de la parte radicular.

### **Análisis estadístico.**

Las variables altura de planta, número de tallos, número de vainas, longitud de la raíz, peso de la planta, peso de la raíz y materia seca de la raíz fueron analizados bajo la distribución normal previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el PROC MIXED del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \tau_k + \gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde :

$i = 1, 2, 3, 4$  bloques.

$j = 1, 2, 3$  cepas de Rhizobium

$k = 1, 2, 3, \dots, 9$  biofertilizantes

$y_{ijk}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  - esimo bloque donse se aplico la  $j$  - esima cepa de Rhizobium con el  $k$  - esimo biofertilizante.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  - esimo bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo de la  $j$  - esima cepa de Rhizobium.

$\tau_k$  = Efecto fijo del  $k$  - esimo biofertilizante.

$\gamma_{jk}$  = Efecto fijo de la interaccion entre el  $k$  - esimo biofertilizante y la  $j$  - esima cepa de Rhizobium.

$\varepsilon_{ijk}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_e^2)$

Las variables cantidad de nódulos y posición de los nódulos se evaluaron bajo los modelos multinomiales con el PROC CATMOD del SAS (2001) bajo el siguiente modelo estadístico.



$$\log \frac{\pi_{ijk}}{\pi_{ijc}} = \eta_k + \alpha_{ik} + \beta_{jk} + \gamma_{ijk}$$

$i = 1,2,3$  cepas de Rhizobium

$j = 1,2,3,\dots,9$  biofertilizantes

$k =$  baja, media, alta categorías de respuesta

$\pi_{ijk}$  = Probabilidad de que un individuo sea clasificada en la  $k$  - esima respuesta con la aplicación de la  $i$  - esima cepa de Rhizobium y el  $j$  - esimo biofertilizante.

$\eta_k$  = Media general de logit de la  $k$  - esima categoría de respuesta.

$\alpha_{ij}$  = Efecto fijo de la  $i$  - esima cepa de Rhizobium sobre la  $k$  - esima respuesta.

$\beta_{jk}$  = Efecto fijo del  $j$  - esimo biofertilizante sobre la  $k$  - esima respuesta.

$\gamma_{ijk}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$  - esima cepa de Rhizobium y el  $j$  - esimo biofertilizante sobre la  $k$  - esima respuesta

## 10. Resultados.

El cuadro de análisis de varianza muestra que existió variación entre bloques para las variables altura de planta, peso de la raíz y peso seco de la raíz; aunque no se estimó variación para las variables número de tallos, número de vainas y peso de la planta (Cuadro 1). Por lo que el diseño experimental fue apropiado.

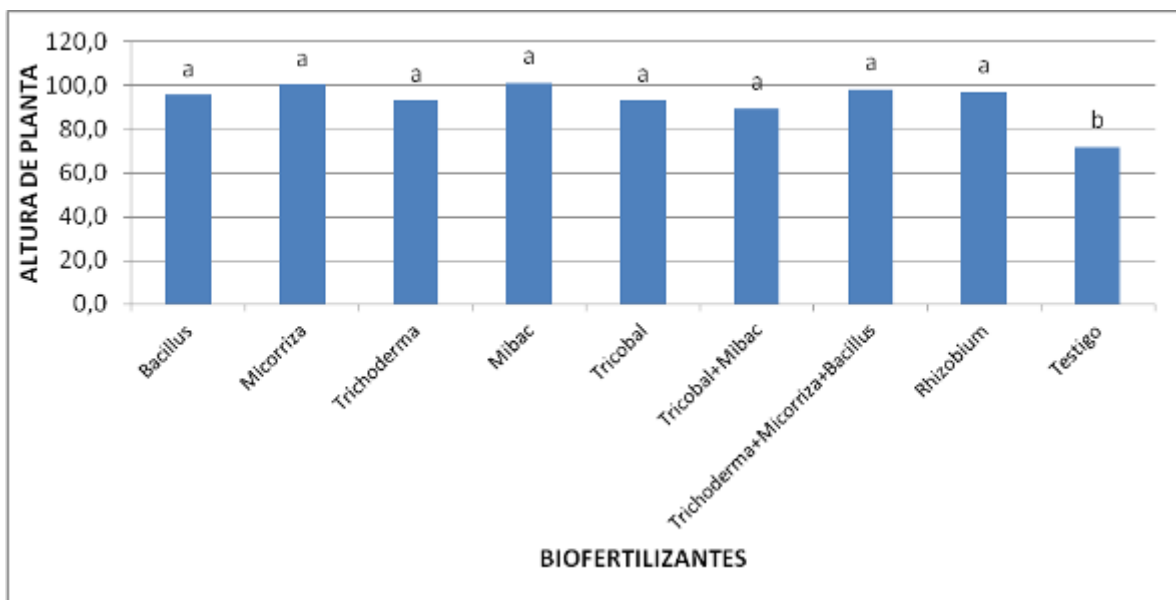
**Cuadro 1. Cuadros medios del análisis de varianza para 6 variables en el cultivo de la haba.**

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Altura de planta	Número de tallos	Número de vainas	Peso de la planta	Peso de la raíz	Peso seco de la raíz
Bloque	3	34,738	0,000	0,000	0,000	54,501	3,484
Biofertilizante	8	952,833**	21,578**	8,932**	12864,547**	9452,196**	489,617**
Cepa	3	2156,552**	21,906**	12,307**	19284,931**	12322,296**	625,554**
Biofertilizante*Cepa	24	579,173**	10,932**	7,096**	6265,819**	3960,738**	282,945**
Residual	95	266,900	4,095	4,962	1188,960	637,800	61,510
CV%		18,134	27,479	32,205	28,895	20,557	19,201
Media		93,308	6,103	3,056	112,204	124,638	19,659

\*\*Significativo al 0,01 nivel de significancia.

### Altura de planta.

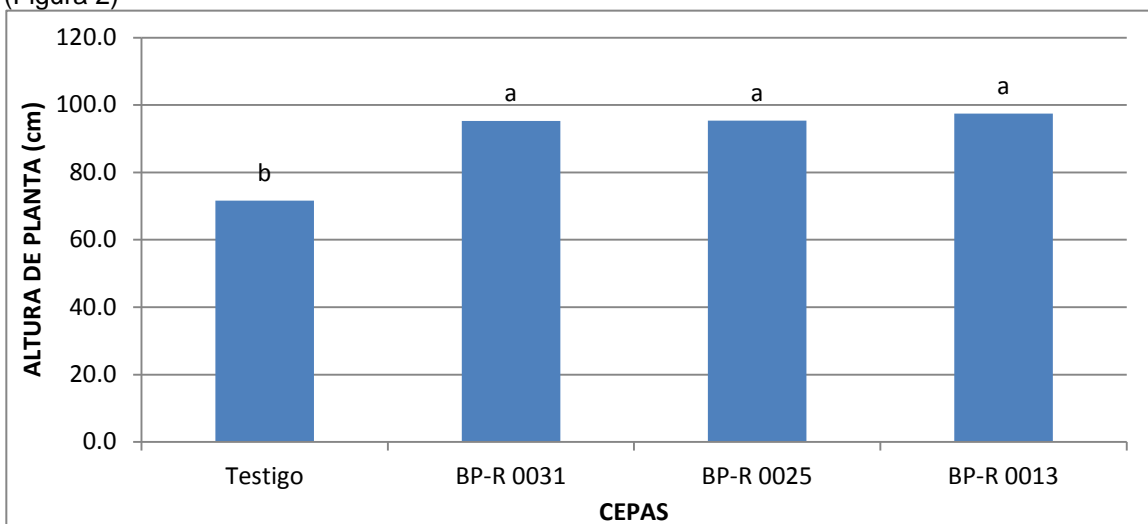
Para la variable altura de planta se estimaron efectos significativos entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde la aplicación de los biofertilizantes y la aplicación de solo rhizobium permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo (Figura 1).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 1. Efecto de los biofertilizantes sobre la altura de la planta.

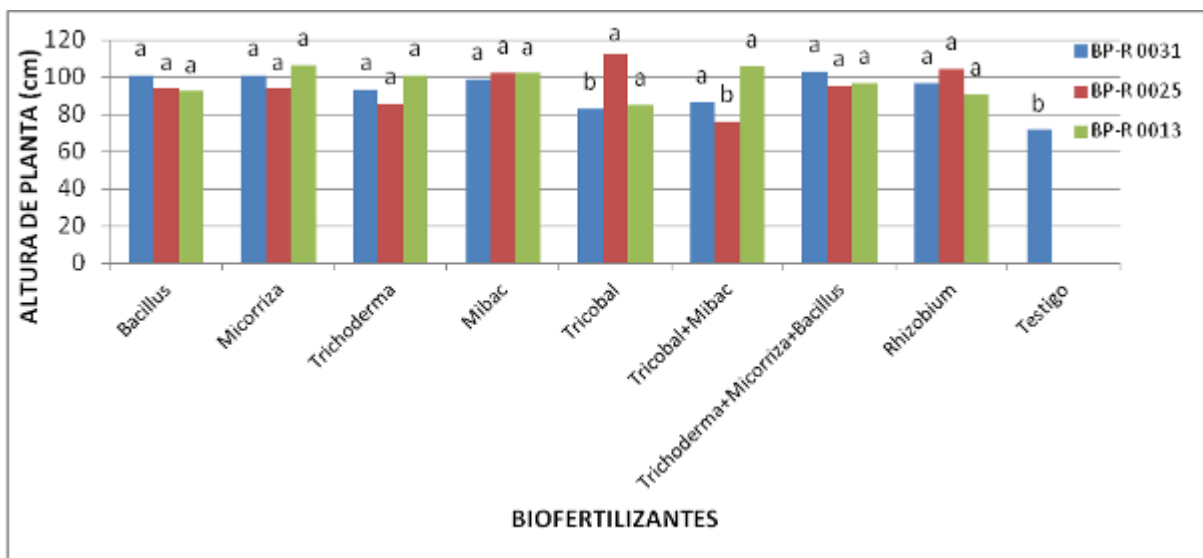
Así mismo, se estimaron diferencias entre las cepas sobre el desarrollo de la planta (Cuadro 1). Observándose, plantas más altas con la aplicación de las bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 que permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo (Figura 2)



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 2. Efecto de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo de la planta.

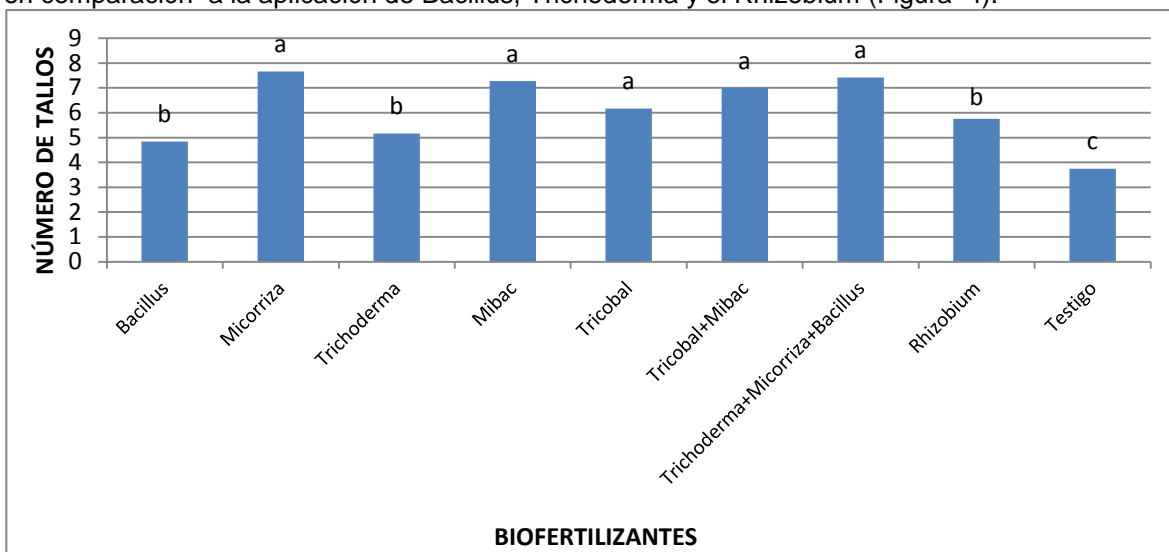
Por otra parte, también se observó diferencias entre la interacción de las cepas de rhizobium y los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde, los biofertilizantes en combinación con los diferentes cepas de rhizobium permitieron el desarrollo de plantas más altas en comparación al testigo; aunque, el biofertilizante Tricobal combinado con la bacteria BP-R 0031 y el biofertilizante Tricobal+Mibac combinado con la bacteria BP-R 0013 (Figura 3) desarrollaron plantas más pequeñas que la combinación de los diferentes biofertilizantes y las bacterias de rhizobium.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 3. Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes y cepas de rhizobium Número de tallos.**

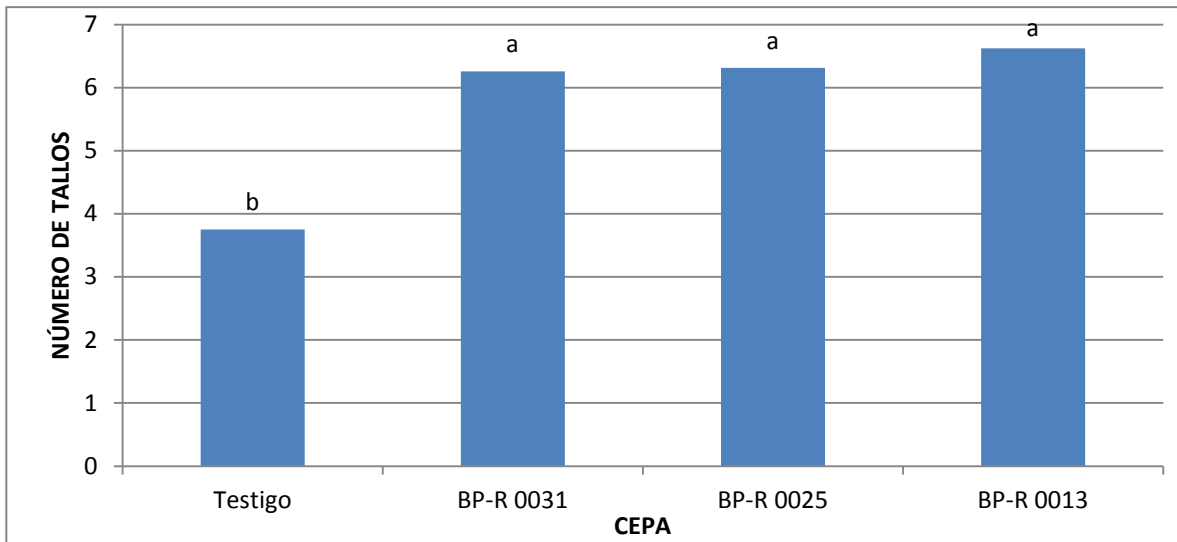
Para la variable número de tallos se estimaron diferencias significativas entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde, todos los biofertilizantes permitieron el desarrollo de mayor número de tallos en comparación al testigo. Sin embargo, los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+bacillus desarrollaron mayor número de tallos en comparación a la aplicación de Bacillus, Trichoderma y el Rhizobium (Figura 4).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

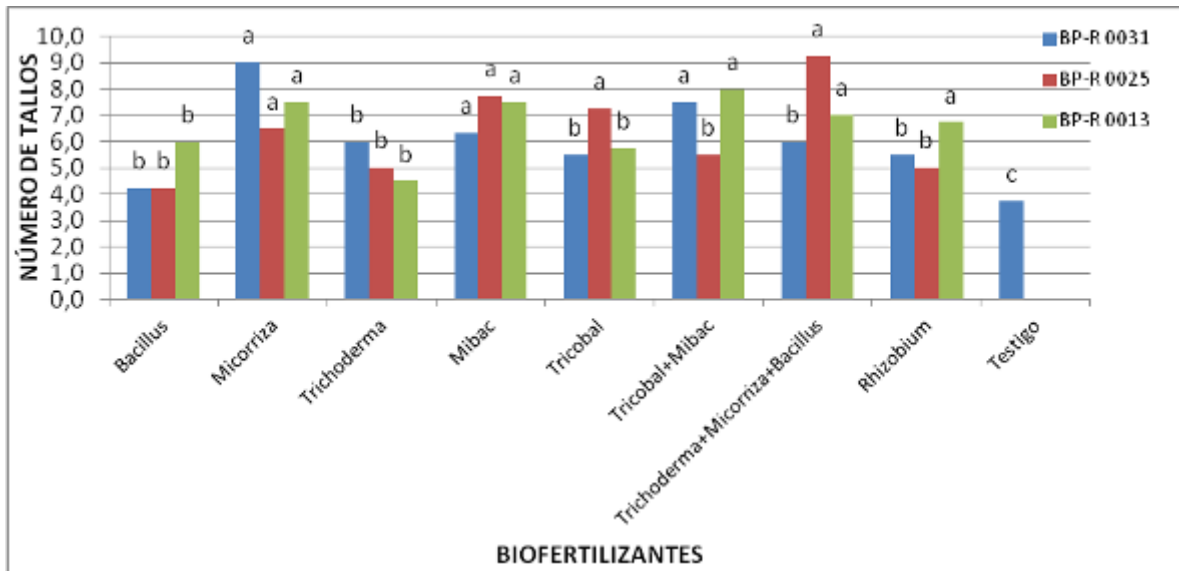
**Figura 4. Efecto de los biofertilizantes sobre el desarrollo de número de tallos.**

Así mismo, se observaron diferencias entre los diferentes cepas de rhizobium para la variable número de tallos (Cuadro 1). Donde las tres bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de tallos en comparación al testigo (Figura 5).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
 Figura 5. Efecto de cepas de rhizobium sobre el desarrollo del número de tallos.

También, se estimaron diferencias en desarrollo de los tallos entre la combinación de los biofertilizantes y las cepas de rhizobium (Cuadro 1). Si bien, todos los biofertilizantes en combinación con las cepas de rhizobium permitieron mayor desarrollo de tallos en comparación al testigo, los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac en combinación a la cepa BP-R 0031. Micorrizas, Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0025 y Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de tallos (Figura 6).

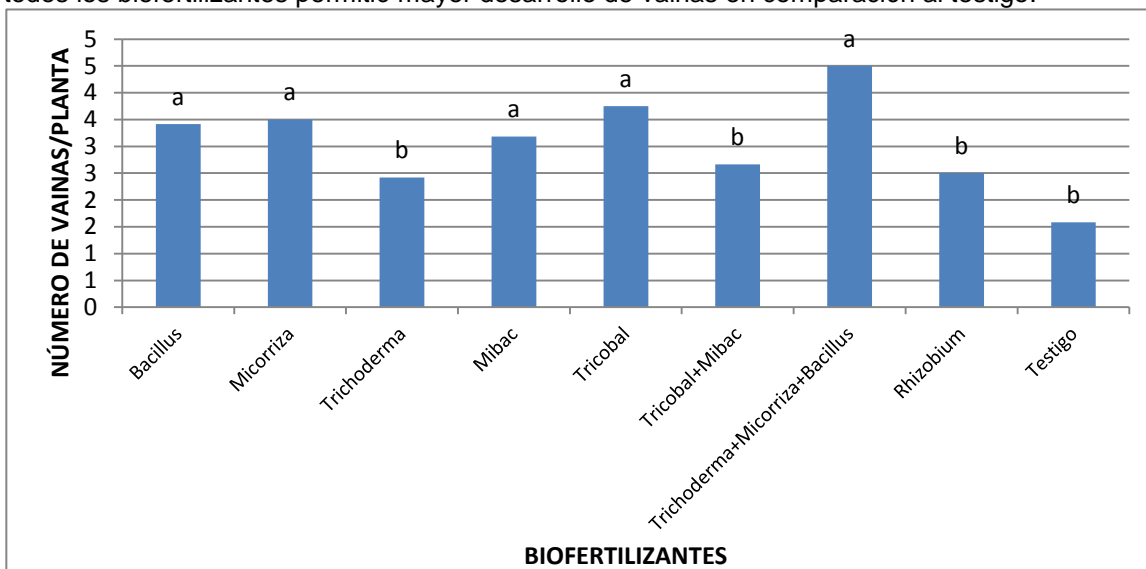


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad  
 Figura 6. Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el número de tallos en el cultivo de haba.

**Número de vainas/planta.**

Al igual que para las variables altura de planta y número de tallos se observó diferencias para número de vainas/planta con la aplicación de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde la aplicación de Trichoderma+Micorriza+Bacillus, Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac y Tricobal permitieron el desarrollo de mayor número de vainas en comparación a la sola aplicación de

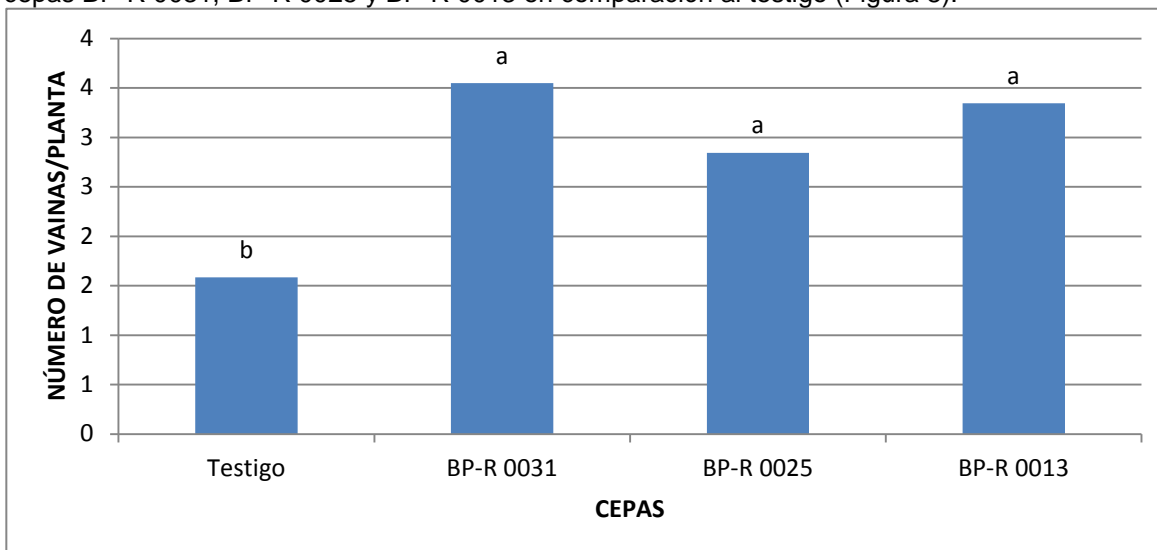
biofertilizantes Bacillus, Trichoderma, Rhizobium y el testigo (Figura 7). Aunque, la aplicación de todos los biofertilizantes permitió mayor desarrollo de vainas en comparación al testigo.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 7. Efecto de diferentes biofertilizantes sobre el número de vainas/planta.

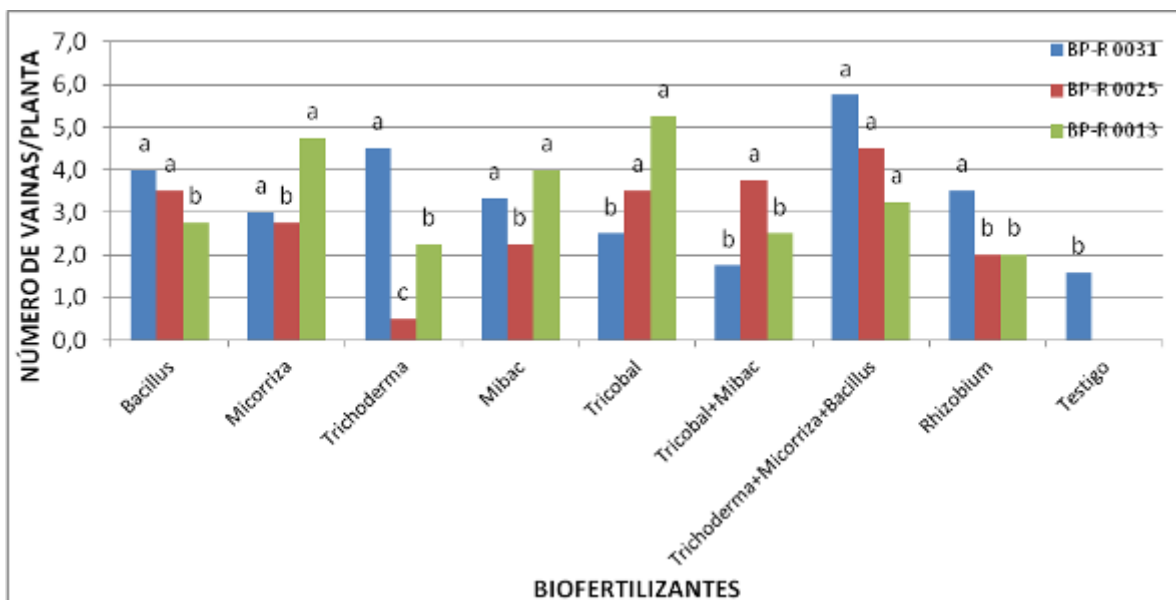
Así mismo, se estimaron diferencias entre los diferentes cepas de rhizobium para la variable número de vainas/planta. Observándose, mayor número de vainas con la aplicación de las cepas BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 en comparación al testigo (Figura 8).



Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 8. Efecto de cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas/planta.

Asimismo, se observó diferencias significativas entre la interacción de los diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas por planta (Cuadro 1). Donde, la combinación de todos los biofertilizantes y las cepas de Rhizobium permitieron mayor desarrollo de vainas en comparación al testigo con excepción de la aplicación de Trichoderma y la bacteria BP-R 0025 que desarrolló menor número de vainas que el testigo. Sin embargo, los biofertilizantes Bacillus, Micorriza, Trichoderma, Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0031. Bacillus, Tricobal, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0025 y Micorriza, Mibac, Tricobal, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de vainas por planta en comparación al testigo (Figura 9)

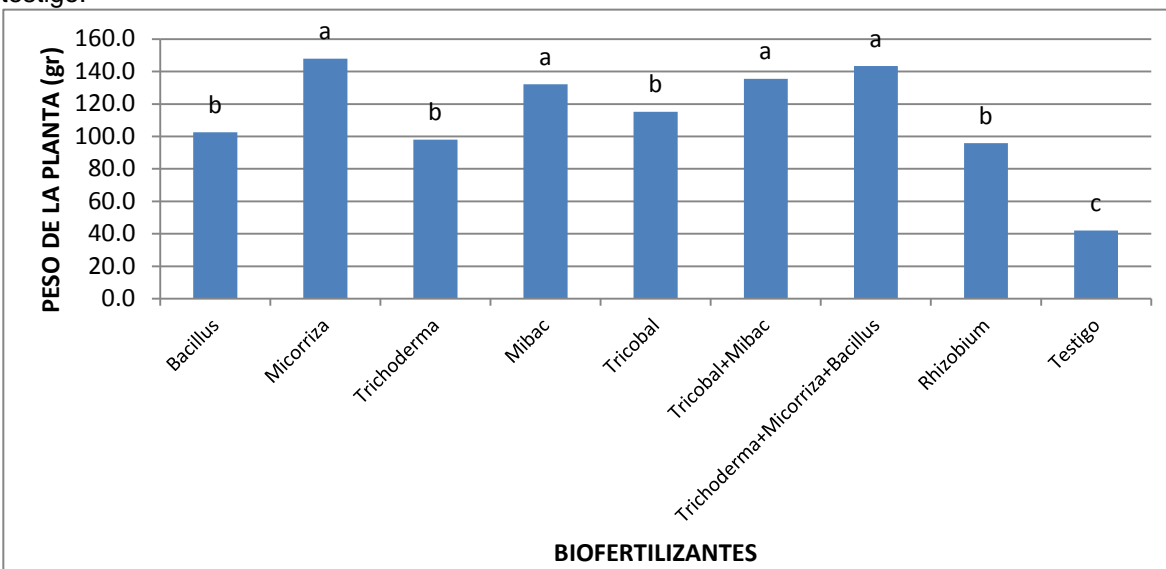


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 9. Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el desarrollo de vainas/planta.**

**Peso de la planta.**

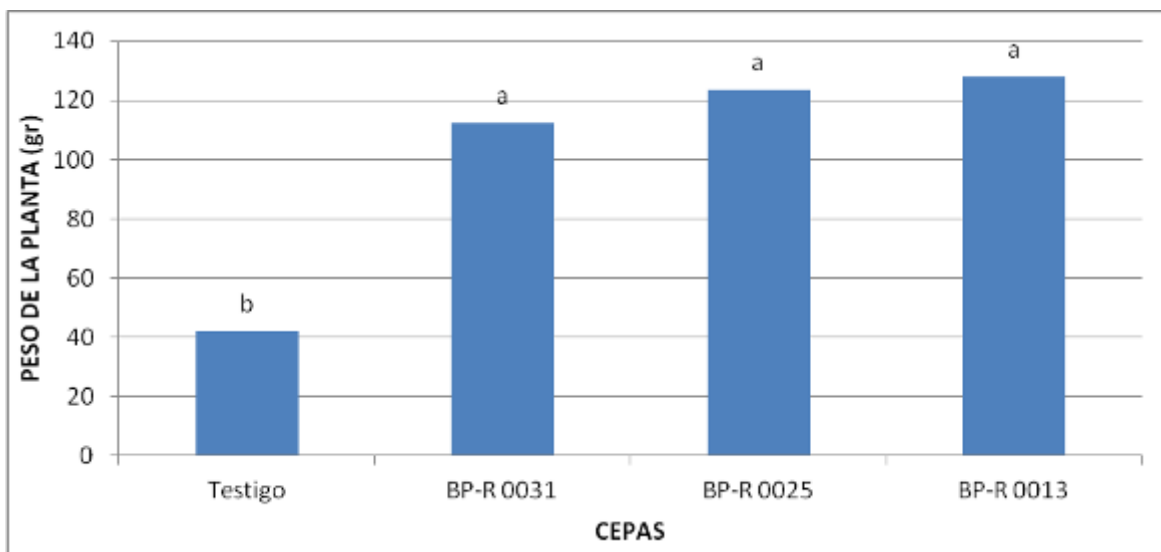
Para la variable peso de la planta se estimaron diferencias entre los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde se observó mayor peso en la planta con la aplicación de los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+Bacillus en comparación a la simple aplicación de Bacillus, Trichoderma, Tricobal, Rhizobium (Figura 10). Aunque, la aplicación de todos los biofertilizantes permitió mayor de desarrollo de la planta en comparación al testigo.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 10. Efecto de diferentes biofertilizantes sobre el peso de la planta.**

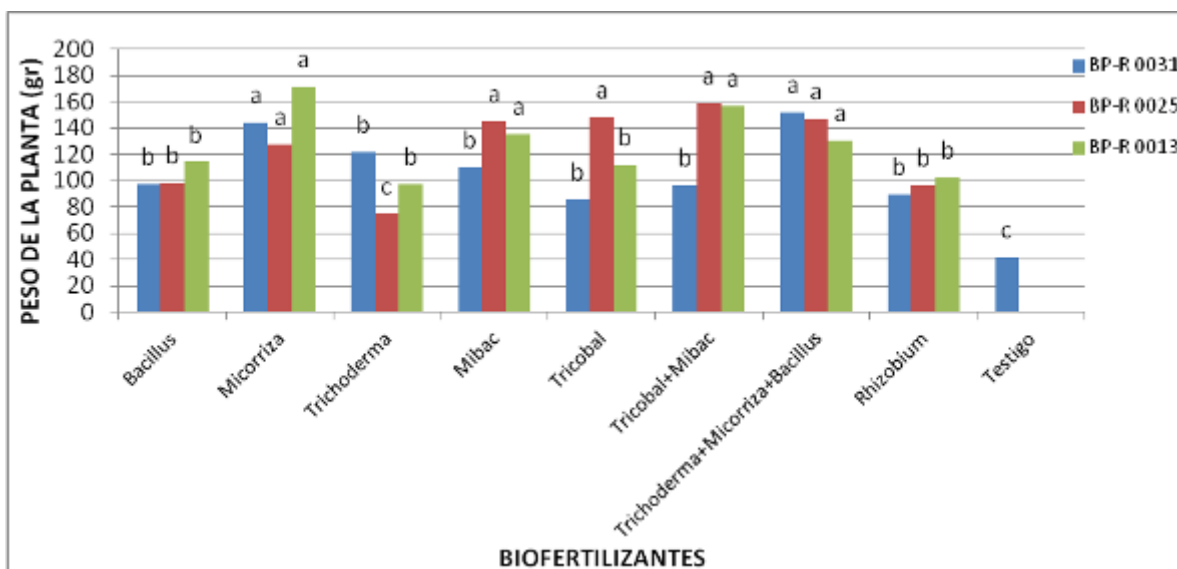
Asimismo, se estimaron diferencias entre las cepas de rhizobium para la variable peso de la planta (Cuadro 1). Donde las cepas BP-R 0031, BP-0025 y BP-R 0013 permitieron el desarrollo de mayor peso en la planta en comparación al testigo (Figura 11).



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 11. Efecto de diferentes de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo del peso de la planta.**

Por otra parte también se estimaron diferencias entre la combinación de diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium para la variable peso de la planta (Cuadro 1). Donde la combinación de todos los biofertilizantes y las cepas de rhizobium permitieron mayor desarrollo del peso de planta en comparación al testigo (Figura 12). Sin embargo, los biofertilizantes Micorriza, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0031. Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0025 y los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la cepa BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo del peso de la planta.



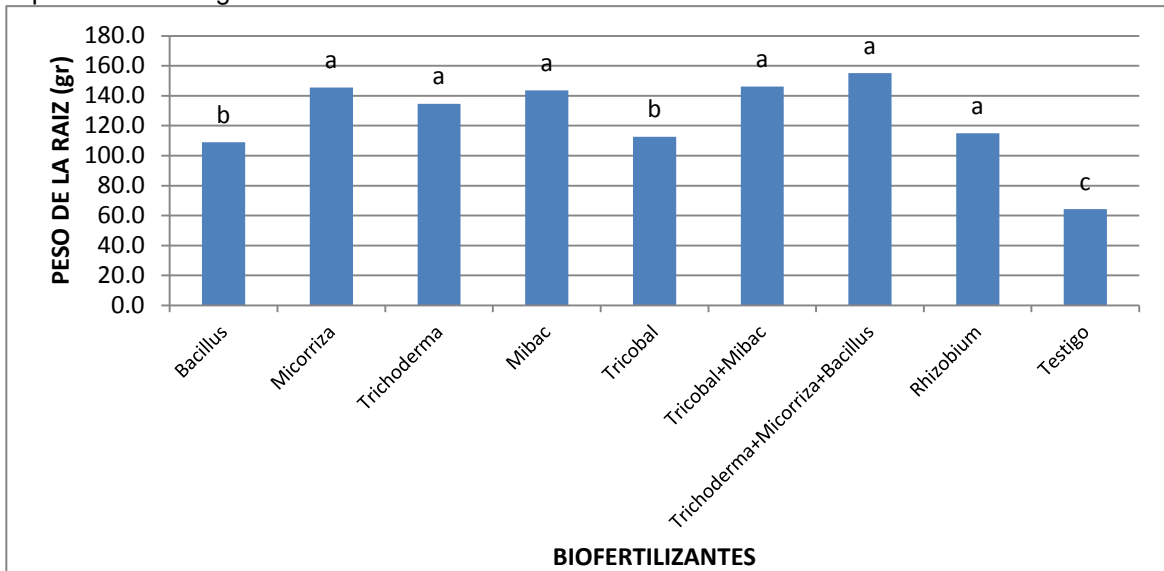
\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 12. Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de Rhizobium sobre el desarrollo del peso de la planta.**

#### Peso de la Raíz.

Para la variable peso de la raíz también se estimaron diferencias con la aplicación de los diferentes biofertilizantes (Cuadro 1). Donde las plantas que se inocularon con Micorriza, Trichoderma, Mibac, Tricobal+Mibac, Trichoderma+Micorriza+Bacillus y la aplicación de

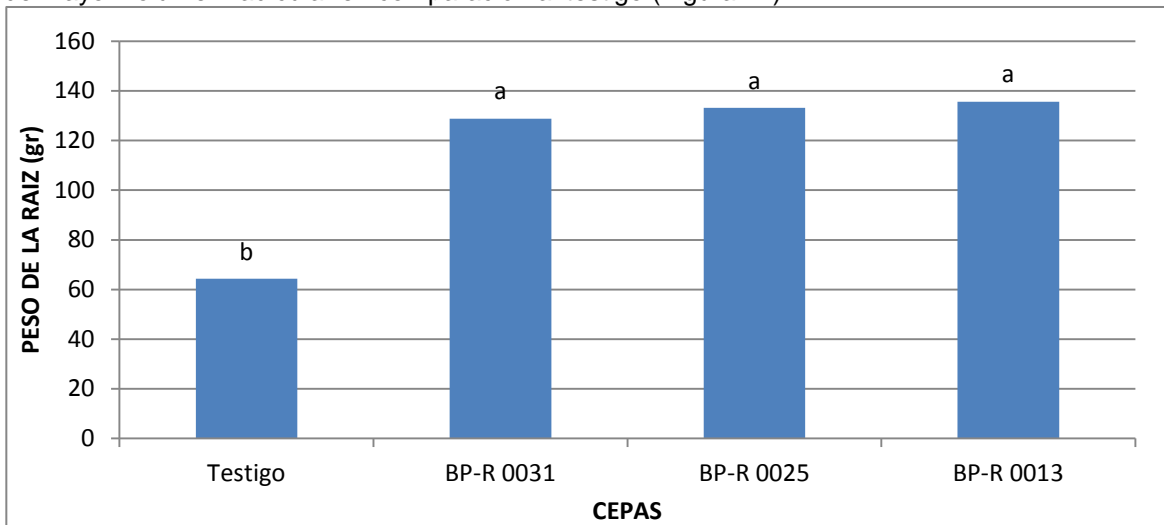
Rhizobium permitieron el desarrollo de mayor volumen radicular en comparación a los biofertilizantes Bacillus, Tricobal y el testigo (Figura 13). Aunque todos los biofertilizantes en sí superaron al testigo en el desarrollo del volumen radicular.



\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 13. Efecto de los biofertilizantes sobre el desarrollo radicular.**

Así mismo, se estimaron efectos significativos entre las cepas de rhizobium para la variable peso de la raíz (Cuadro 1). Donde la aplicación de las 3 cepas de Rhizobium permitió el desarrollo de mayor volumen radicular en comparación al testigo (Figura 14).

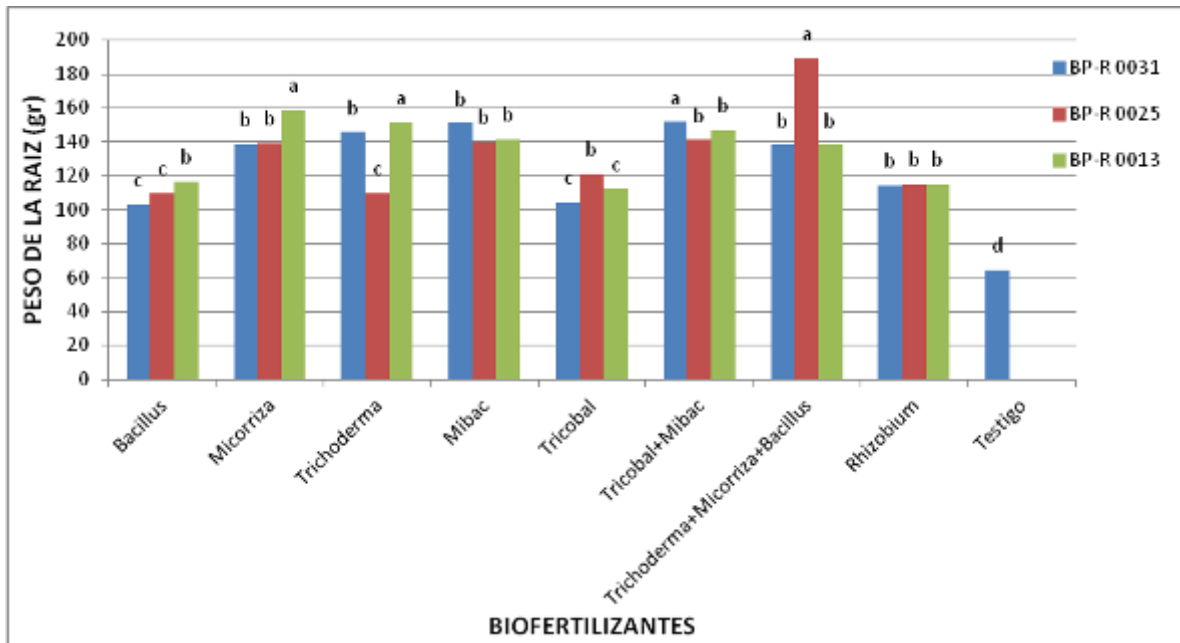


\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

**Figura 14. Efecto de cepas de Rhizobium sobre el desarrollo radicular.**

Por otra parte también se estimaron diferencias para la combinación de los diferentes biofertilizantes y las cepas de rhizobium sobre el desarrollo radicular (Figura 15). Donde la combinación de todos los biofertilizantes y las cepas de rhizobium superaron en desarrollo radicular al testigo; sin embargo, se observó mayor desarrollo radicular con los biofertilizantes Tricobal+Mibac (Figura 16a) con la cepa BP-R 0031, Trichoderma+Micorriza+Bacillus en combinación a la bacteria BP-R 0025 y los biofertilizantes Micorriza (Figura 16b), Trichoderma (Figura 16c) en combinación a la cepa BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo radicular.





\*Letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de probabilidad

Figura 15. Efecto de la combinación de biofertilizantes y cepas de rhizobium sobre el desarrollo radicular.



a



b



c

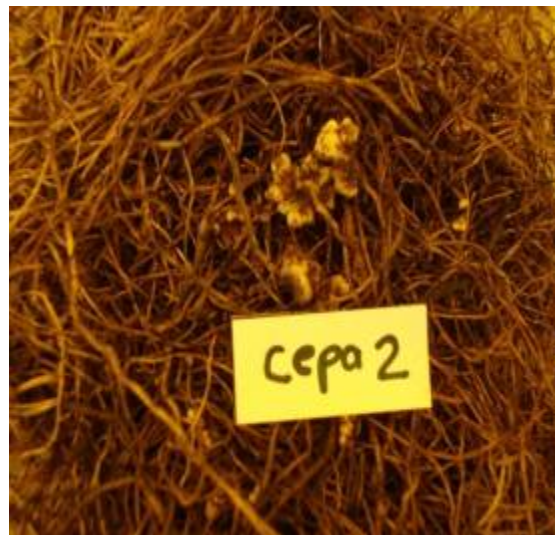
**Figura 16a, 16b, 16c. Efecto de la combinación de diferentes biofertilizantes con aislados de Rhizobium sobre el desarrollo radicular**

**Desarrollo de Nódulos.**

Así mismo, se estimaron diferencias sobre la cantidad de nódulos desarrollados en la planta entre las cepas de rhizobium. Donde la cepa BP-R 0031 (Cepa 1) (Figura 17a) desarrollo nódulos en una proporción alta (0,60) y media (0,40). La cepa BP-R 0025 (Cepa 2) (Figura 17b) desarrollo nódulos en una proporción alta (0,47) y media (0,38). Así mismo, la cepa BP-R 0013 (Cepa 3) (Figura 17c) también desarrollo nódulos en una proporción alta (0,59) y media (0,31). Contrariamente si bien se observo nódulos en las raíces de los testigos estos fueron en una proporción muy baja (0,98) (Figura 18).



a



b



C

Figura 17a, 17b, 17c. Formación de nódulos por de aislados de *Rhizobium spp.*

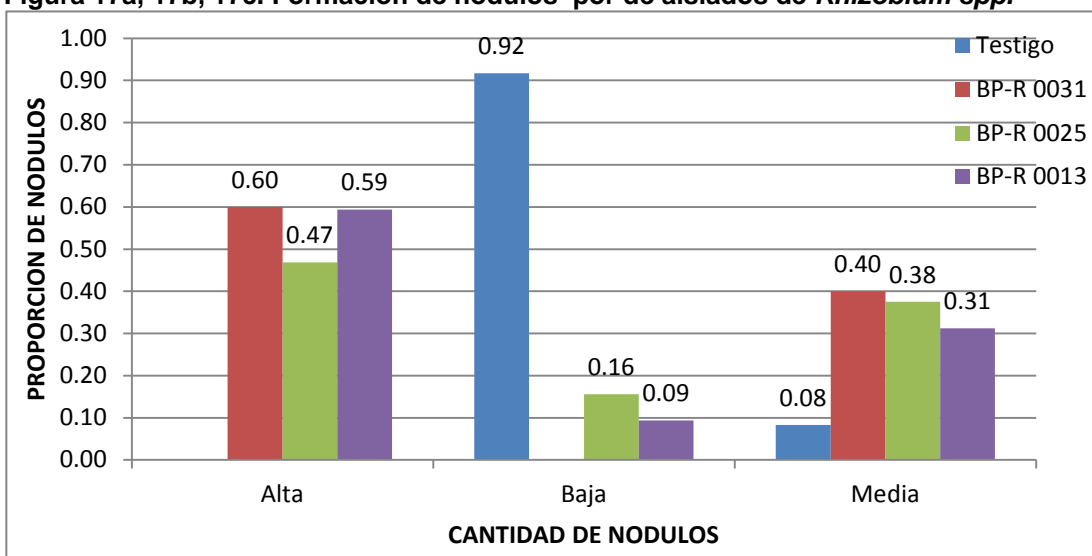
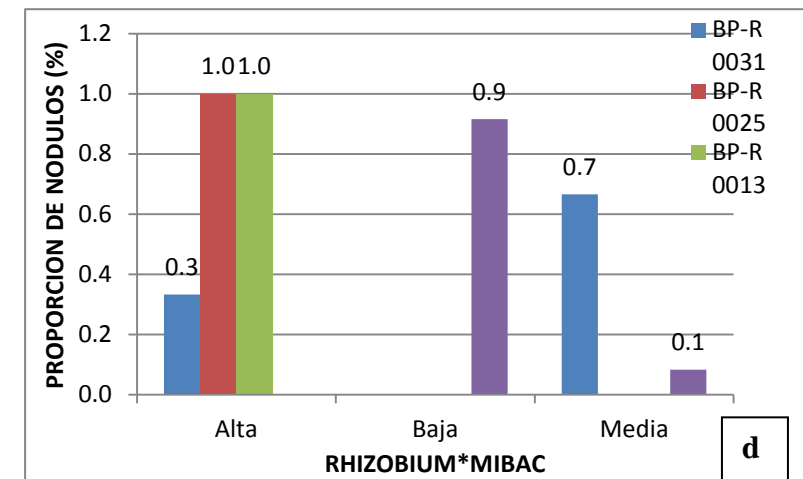
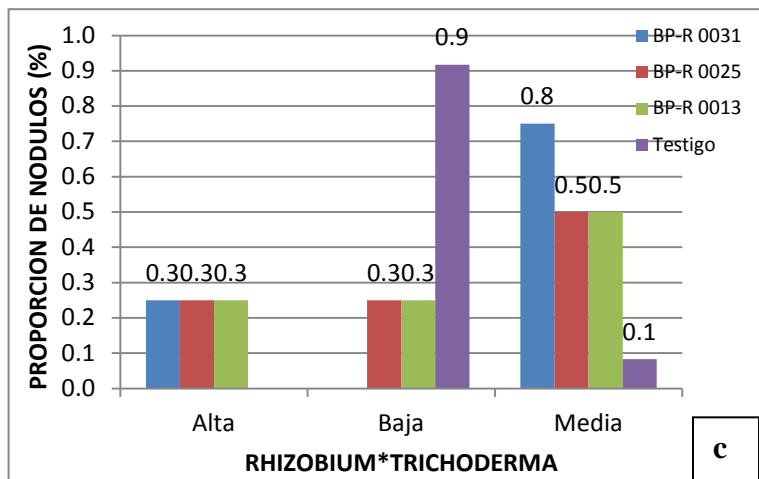
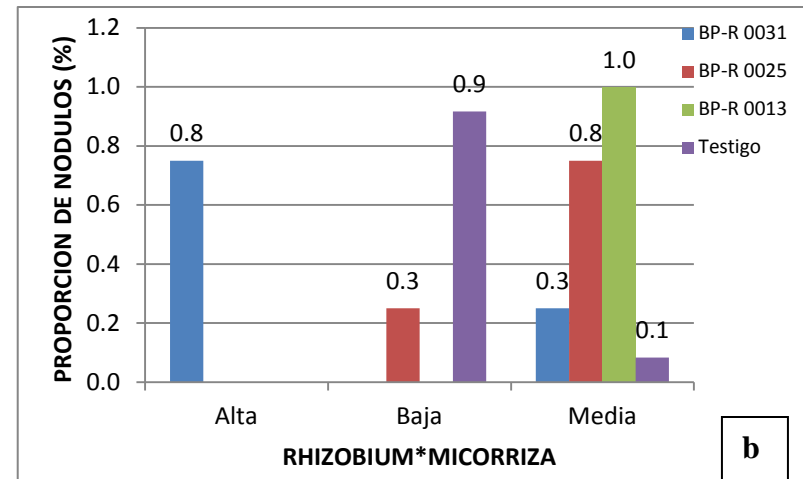
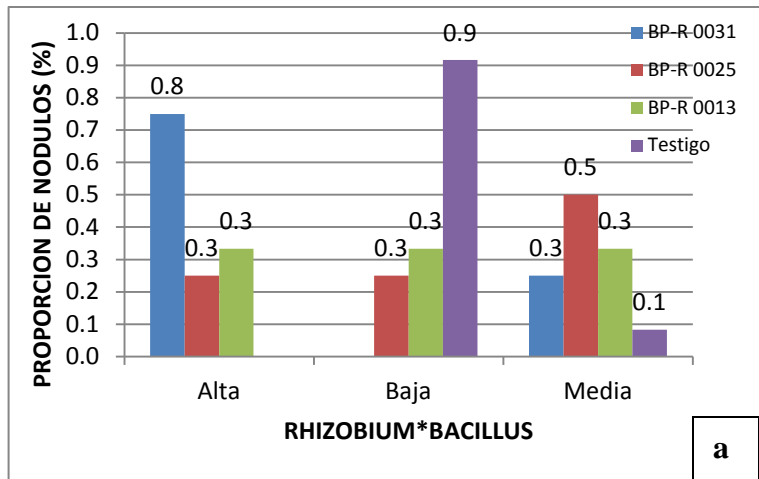


Figura 18. Proporción de la formación de nódulos de tres cepas de *Rhizobium spp.*

Por otra parte, también se observó que los biofertilizantes favorecieron la formación de mayor cantidad de nódulos en las plantas, las mismas que fueron relativamente más grandes en comparación a los nódulos desarrollados en los testigos. Si bien todos los biofertilizantes favorecieron el desarrollo de mayor cantidad de nódulos, se observó mayor desarrollo de nódulos (>50%) con los biofertilizantes Bacillus, Micorriza, Trichoderma, Mibac, Tricobal\*Mibac, Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus en combinación con la cepa BP R 0031. Micorriza, Trichoderma, Mibac, Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus con la cepa BP-R 0025 y los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal\*Mibac Trichoderma\*Micorriza\*Bacillus en combinación con la cepa BP-R 0013 (Figura 19). Así mismo, la formación de nódulos fue superior con la combinación de los biofertilizantes en comparación a la aplicación de solo Rhizobium (Figura 19h). Por lo que la combinación de de biofertilizantes y bacterias fijadoras de nitrógeno puede traer consecuencias favorables a la agricultura ecológica.



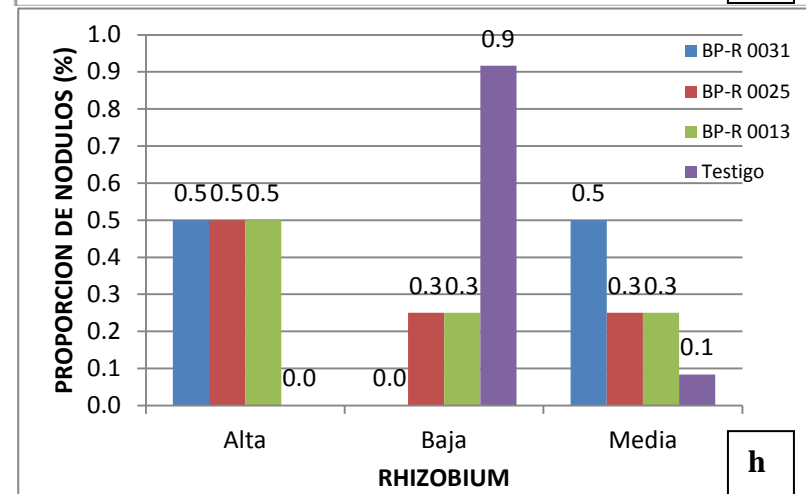
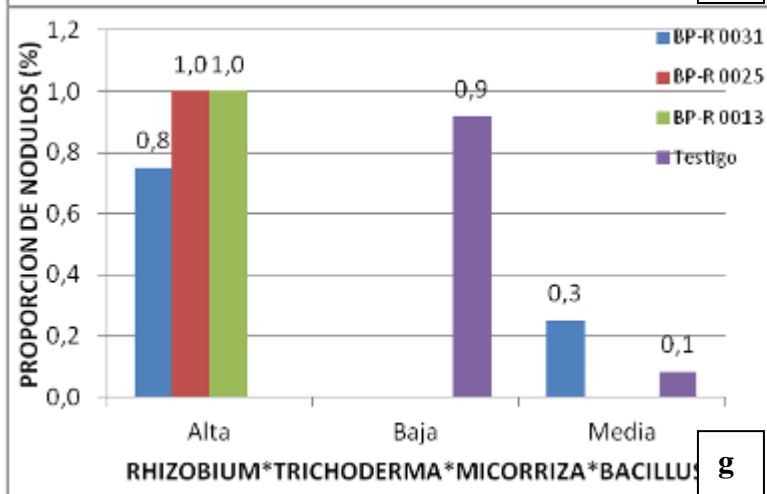
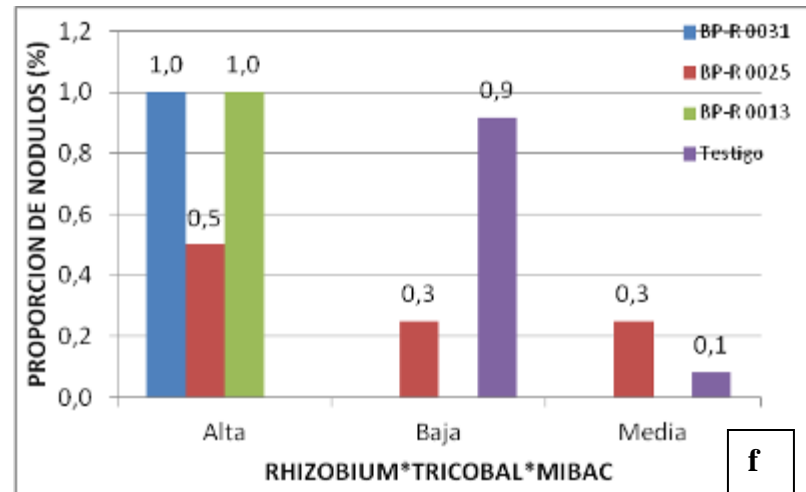
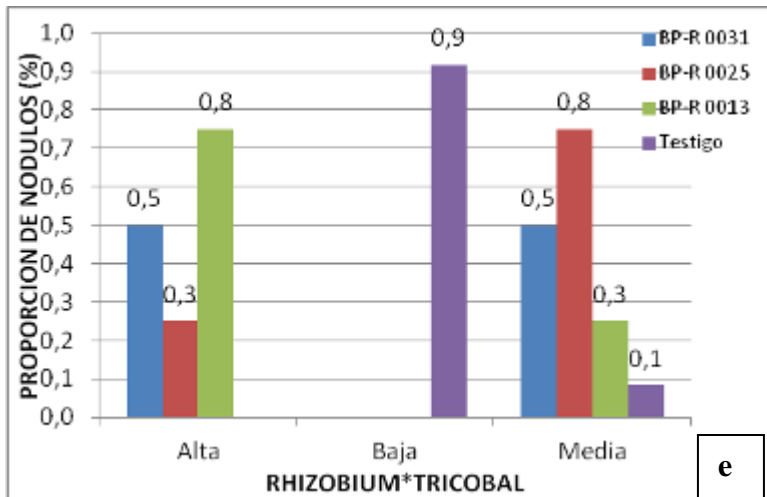


Figura 19. Efecto de los biofertilizantes sobre la formación de nódulos.

### Ubicación del desarrollo nodular.

Por otra parte, las tres cepas de Rhizobium desarrollaron nódulos en mayor proporción tanto en toda la extensión de la raíz, así como también, desde la parte intermedia hacia la parte apical de la raíz (Figura 20). En cambio el testigo desarrollo nódulos en la parte central-apical en mayor proporción, aunque las mismas fueron en menor cantidad en comparación a los nódulos desarrollados por las cepas de Rhizobium.

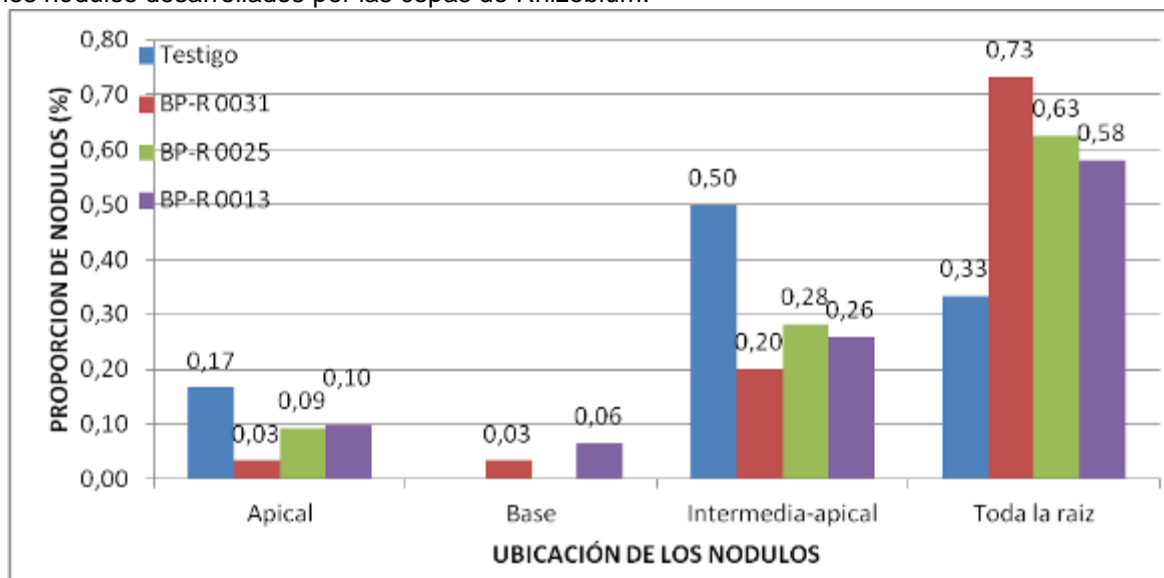


Figura 20. Ubicación del desarrollo de nódulos en la raíz

### 6. Discusión.

Los resultados muestran que tanto los biofertilizantes y las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecen el desarrollo de la planta. Así, entre los biofertilizantes, Micorriza, Mibac, Tricobal, Tricobal+Mibac y Trichoderma+Micorriza+Bacillus permitieron mayor desarrollo de la planta, mayor cantidad de tallos y vainas por planta al igual que mayor desarrollo radicular. Así mismo, tanto la bacteria BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 permitieron mayor desarrollo de la planta, número de tallos, vainas por planta y mayor desarrollo radicular. Lo cual muestra la importancia que podría significar para el desarrollo de una agricultura biológica sostenible.

La combinación de los biofertilizantes con las bacterias fijadoras de nitrógeno también favoreció el desarrollo de planta. Donde casi en forma general las bacterias BP-R 0031, BP-R 0025 y BP-R 0013 se combinan mejor con los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus. Resultados similares fueron reportados por Bardr El-Din et al., (1987) donde el número de nódulos y el peso de la materia seca de los nódulos, inoculados con bacterias de Rhizobium y *Glommus spp.* en el cultivo de la soya fueron superiores que cuando se inoculo solo rhizobium. Rodelas et al., (1998) también reportaron mayor cantidad de nódulos debido la combinación de Azotobacter y Rhizobium. La materia seca de los nódulos fue incrementado hasta en 38% en comparación a las plantas que recibieron solo la inoculación de rhizobium.

Por otra parte, las 3 bacterias presentaron mayor desarrollo de nódulos las mismas que fueron ligeramente más grandes en comparación al testigo, Así mismo, llegaron a formar mayor cantidad de nódulos en toda la raíz y desde la parte intermedia hacia la apical en comparación al testigo que llevo a formar nódulos en una proporción basal y en la parte intermedia-apical.

### 7. Conclusiones.

- Las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecen el desarrollo de planta.
- Los biofertilizantes favorecieron el desarrollo de la altura de planta, número de tallos, vainas por planta, peso de la planta y peso de la raíz.
- Las bacterias fijadoras de nitrógeno favorecieron el desarrollo de la altura de planta, número de tallos, vainas por planta, peso de la planta y peso de la raíz.
- Los biofertilizantes Micorriza, Mibac, Tricobal+Mibac, Tricobal y Trichoderma+Micorriza+Bacillus desarrollaron un efecto superior en combinación con las tres bacterias.

- Las tres bacterias desarrollaron mayor cantidad de nódulos en la parte intermedia-apical y en toda la raíz de la planta.

## 8. Recomendaciones.

Si bien las tres bacterias presentaron similar comportamiento con la combinación de los diferentes biofertilizantes, se recomienda realizar pruebas con diferentes variedades comerciales para determinar bacterias potenciales para el uso en la agricultura ecológica.

## 9. Revisión bibliográfica.

- Abdel Moity, S.M., A.A. Khaled and S.A. Omar, 1992. Biological treatments for control root rot wilt disease of faba bean. *Egypt. J. Appl. Sci.* 7(11): 13-21
- Arora, N.K., S.C. Kang and D.K. Maheshwari. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potencial against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 81(6): 673-677.
- Badr El-Din, S.M.S., Y.Z. Ishac, H. Moawad, T.H. El-Nakhal and M. Attia, 1987. Response of soybean to dual inoculation with vesicular Arbuscular mycorr In: D.M. Sylvia L.L. Hung and G.H. Graham (Ed.). *hizal fungi and Bradyrhizobium japonicum Mycorrhiza in the Nex Decade*. USA.
- Bodker, L., R. Kjoller and S. Rosendahl. 1998. Effect of phosphate and the arbuscular micorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza*, 8: 169-174.
- Brockwell, J., P.J. Bottomley and J.E. Thies, 1995. Manipulation of rhizobia micro flora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*, 174: 143-180.
- Burns, T.A., Bishop, P.E., Israel, D.W., 1981. Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and *Rhizobium*. *Plant and Soil* 62, 399-412.
- Chaven, J.K., L.S. Kute and S.S. Kadam, 1989. In: *CRC Hand Book of World legumes*, Eds., salunkle, D.D., S.S. Kadam. Boca Raton, Florida, Usa. CRC Press, pp:223-245.
- Dehne, H.W., 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 1115-1119.
- Dileep-Kumar B.S., (1999): Fusarial with suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chickpea growing in soil infected with *Fusarium oxysporum* F.Sp ciceris. *Biol. Fert. Soils*:29:87-91.
- Duffy, B.K. and D.M. Weller, 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. *Plant Dis.*, 79: 907-911.
- El-Gantiry, S.M., S.A. Omar, E. Dorreih and M.M. Rahhal, 1994. Survey, Host response and fungicides treatment of root rot wilt disease complex in faba bean. *Egypt. Appl. Sci.*, 9(7): 366-375.
- Harbi, A.R., A.A. Alsadon, and S.O. Khalil, 1996. Influence of training system and growing media on growth and yield of cucumber cultivars. *Alex. J. Agric. Res.* 41 (3): 355 – 365.
- Iruthayathas, E.E., Gunasekaran, S., Vlassak, K., 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N<sub>2</sub>-fixation of winged bean and soybean. *Scientia Horticulturae* 20, 231-240.
- Khaled, A.A., M. Samiha, M.H. Abdul-oily and S.A. Omar, 1995. Chemical control of some faba bean disease with fungicides. *Egypt J. agric. Res.*, 73(1): 45\_55.
- Kole, M.M., Page, W.J., Altosaar, I., 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can. J. Microbiol.* 34, 815-817.
- Martinez-Toledo, M.V., Salmero, V., Gonzaález-Loápez, J., 1991. Biological characteristics of *Azotobacter* spp. in natural environments. *Trends in Soil Sci.* 1, 15-23.
- Rodelas B. ; J. Gonzalez-Lopez\*, C. Pozo, V. Salmeron, M.V. Martinez-Toledo. 1998. Response of Faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*. *Applied Soil Ecology* 12 (1999) 51-59
- Sankaranayanan, R., H.A. Shah and V. Alagesan, 1995. Effect of *Azospirillum* on improved varieties of bhendi. *South Indian Hort.* 43 (1): 52 – 53
- Sikora, R.A. and S. Reimann, 2004. Suppressive soils, the edge of chaos and multitrophic strategies for biocontrol of pest and diseases in soil ecosystems. In: *Multitropic interactions in soil*, Eds., Sikora, R.A., S. Growen,, R. Hausschild,, S Kiewnick, Gent, Belgium, pp: 251-258.
- Sikora, R.A., 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30:245-270.

- Sorwli F. K. and L. R. Mytton (1986): Nitrogen limitations to field bean productivity: A comparison of combined nitrogen applications with Rhizobium inoculation .Volume 94, Number 2, 267-275.
- Yahalom, E., Okon, Y., Dovrat, A., 1987. Azospirillum effects on susceptibility to Rhizobium nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. Can. J. Microbiol. 33, 510-514.

### **Multiplicación de hongos micorrícicos en raíces de cebada (*Hordeum vulgare*) en medio líquido con sistema de oxigenación.**

**Responsable:** Claudia Gutierrez, Noel Ortuño

#### **Compendio:**

La aplicación de micorrizas como biofertilizante en cultivares de interés es una tendencia en crecimiento como alternativa al uso de agroquímicos para el incremento en el rendimiento y producción. Por esto, se tiene por objeto multiplicar micelios y esporas de micorrizas en un medio líquido que facilita la extracción de esporas al ser un "sustrato" limpio. En este trabajo se utilizaron esporas de tres cepas de micorrizas: *Glomus musseae* (B-28), LME 2-3-2-1 y LMB 2-3-2 como inóculo. Se evaluaron 9 tratamientos de los que se obtuvieron resultados no favorables al constatarse la ausencia de desarrollo micelial en las raíces y la no formación de esporas. Por lo que se demuestra que en esta prueba es inviable propagar masivamente micorrizas en el cultivo de cebada como hospedero, en medio líquido.

**Palabras claves:** Hongos micorrícicos, micorrizas, *Hordeum vulgare*

- 116. Objetivo:** Propagar de forma masiva micorrizas en el cultivo de cebada como hospedero, en medio líquido.
- 117. Hipótesis:** Ninguna micorrizas se multiplica en sustrato líquido.
- 118. Revisión de literatura**

La hidroponía es una alternativa eficiente al uso de suelo que representa muchas veces problemas de sanidad. Como medio eficiente para el cultivo de plantas es también un potencial para cultivo de hospederos de plantas cultivadas.

La inoculación de simbiontes benéficos a cultivos en medio líquido es una opción estudiada, ya que durante el proceso de germinación de una semilla en medio líquido, se producen una serie de cambios que le permiten a la plántula en pocos días captar energía luminosa y a través de un proceso decrecimiento acelerado desarrollar su parte radicular y poder asociarse con micorrizas obteniéndose así micelios y esporas. (Rotar 2004).

#### **119. Materiales y métodos**

##### **4.1 Material de laboratorio**

Macetas grandes de 2 litros de capacidad  
Probetas de diferentes graduaciones  
Pizeta  
Semilla de cebada  
Bombas/Oxigenadores de pecera  
Coladores plásticos comunes de diferentes diámetros  
Agua  
Fertisol  
Inóculo de micorrizas del cepario de PROINPA



#### 4.2 Material de escritorio:

Cuaderno  
Lápiz  
Bolígrafo  
Marcador indeleble  
Cámara figuragráfica  
Computadora

#### 4.3 Métodos

##### 4.3.1 Ensayo a partir de semilla

- En las macetas se depositaron 2000cc de agua común, y se instaló el equipo para oxigenación del agua consistente en un motor con manguerillas cuyas terminaciones fueron puestas dentro la maceta con ayuda de piedras difusoras, de manera que el aire salga del centro y desde el fondo del vaso.
- Se pusieron los coladores en la boca de cada maceta, a manera de tapa, de forma que el nivel del agua rozaba el borde inferior de los coladores sobre los que se pusieron las semillas de cebada, de forma que estuvieron en contacto (no inmersos) con el agua.
- Las raíces de las semillas germinadas, desarrolladas abundantemente en el agua fueron inoculadas al cuarto día con 30 esporas de hongos micorrícicos por maceta, de tres cepas identificadas y aisladas del cepario de micorrizas de la fundación PROINPA.



- Se hicieron evaluaciones y observaciones a los 30, 45 y 70 días de la siembra para determinar tiempos en los que llegan a desarrollar los micelios.
- Después de dos meses de establecido el cultivo se procedió al corte del follaje de las plantas de cebada para la inducción al estrés y estimulación de esporulación.
- Después del corte se las dejó por 10 días aun con oxigenación y se las cosecho para los análisis respectivos.

## Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en la presente investigación fue el completamente aleatorio con tres repeticiones donde la combinación de los niveles de cada uno de los factores constituyen un tratamiento.

Factores:

Factor 1 Semilla S1=semilla entera de cebada.

Factor 2 Cepas C1=*Glomus musseae* (B-28)  
C2=LME 2-3-2-1  
C3=LMB 2-3-2

Variables de respuesta:

Las Variables a evaluar fueron:

4. Desarrollo de micelio fúngico en raíces de cebada, a partir de semillas en medio líquido.
5. Formación de esporas.
6. Viabilidad de las esporas.

## Modelo estadístico

Las variables de respuesta fueron evaluadas previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas bajo el diseño completamente aleatorio con dos repeticiones bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \Omega_j + \sigma_{j(i)} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

i= semilla de cebada

j= cepas de micorriza

$\mu$ = media general

$\beta_i$ = efecto aleatorio de la i-esima semilla.

$\Omega_j$ = efecto fijo de la j-esima cepa.

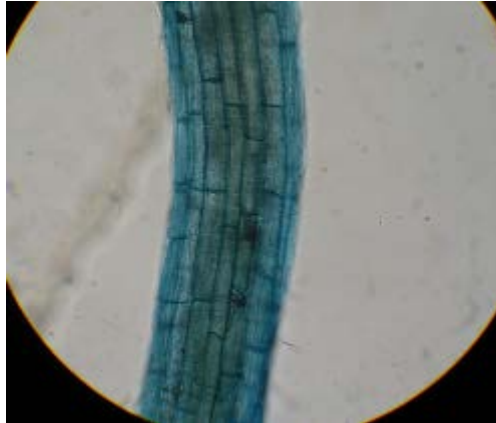
$\sigma_{j(i)}$ = efecto aleatorio de la interacción de la j-ésima cepa de micorriza inoculada en la i-esima semilla.

$\varepsilon_{j(i)}$ = efecto aleatorio de los residuales NIID  $\sim (0, \sigma_b^2)$

## 120. Resultados

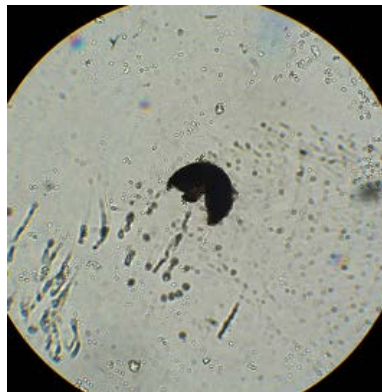
### 5.1 Desarrollo de micelio fúngico en raíces.

Las raíces fueron extraídas en las fechas de muestreo establecidas, y fueron procesadas siguiendo el protocolo de tinción de raíces para observación de micelios. En las tres evaluaciones no se observó presencia de micelios en todo los tratamientos.



## 5.2 Formación de esporas.

Toda el agua recogida de cada maceta por separado, fue procesada como muestra extraída a partir de suelo según protocolo de extracción de esporas. Al momento de la observación al estereoscopio no se encontraron esporas nuevas, solo restos de algunas de las esporas inoculadas, esto es consecuente con la ausencia de desarrollo de micelio micorrícico.



## 121. Discusión

El ensayo concluido muestra la inactividad simbiótica de las micorrizas con el hospedero, en un medio líquido.

Una mayor oxigenación probablemente podía hacer que las esporas, al estar en mayor movimiento en el agua, entren en contacto con la planta. No se descarta la idea de que por gravedad hayan caído y permanecido en el fondo de la maceta; y germinado allí sin que aun la raíz llegase hasta esta profundidad.

En otros trabajos reportados en plantas forrajeras, se encontró que hay formación de micelios y esporas en cultivos hidropónicos, lo que nos dice que se deben ajustar procedimientos en futuros ensayos.

## 122. Conclusiones

-Las micorrizas inoculadas en cultivo de cebada en medio líquido no hicieron simbiosis con la raíz; no mostraron desarrollo micelial ni formación de esporas. Por los resultados obtenidos en este ensayo, no es posible propagar de forma masiva micorrizas en medio líquido.

## 123. Recomendaciones

- Se deberá revisar para posteriores pruebas, si en otros cultivares se utiliza mayor número de esporas como inóculo.
- Se deberá encontrar un mecanismo que asegure que las esporas estarán en contacto con la raíz del hospedero al momento de germinar.
- Se deberá seguir probando y ajustando procedimientos para obtener esporas multiplicadas en medio líquido.

#### 124. Bibliografía consultada

- HERNANDEZ A. 2001 Las Micorrizas. (En línea). Cataluña, Es. Consultado 20 de agosto 2010. Disponible en <http://www.terralia.com/revista14/pagina13.htm>
- Arano Carlos R. Libro: Forraje Verde Hidropónico y otras técnicas de cultivos sin tierra. Edición Propia. Buenos Aires Argentina.
- [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2001/T1365.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2001/T1365.pdf)
- <http://www.tesisymonografias.net/perfil-de-tesis-cebada-hidroponica/1/>

### INOCULACION DE MICELIOS DESARROLLADOS EN MEDIO LÍQUIDO A RAÍCES DE PLANTAS DE CEBADA (*HORDEUM VULGARE*) DESARROLLADAS EN SUSTRATO ESTERIL PARA SU MICORRIZACIÓN.

Responsable: Claudia Gutierrez, Mayra Claros y Noel Ortuño

#### 125. Introducción:

La inmensa mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualista, con ciertos hongos del suelo dando lugar a las llamadas micorrizas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son simbiontes obligados; solo cuando colonizan las raíces de esta son capaces de completar su ciclo de vida; es decir, de esporular y generar propágulos capaces de micorrizar otras plantas. (Barea, M. 1999)

La clave está en la producción masiva de un inóculo de calidad, fácilmente aplicable y transportable. En este contexto, a lo largo de la corta historia de la investigación sobre micorrizas arbusculares, se han propuesto varios procedimientos de obtención de inóculo, que varían según la forma de cultivar la planta (cultivos aeropónicos, hidropónicos, etc.) y dentro de los cultivos que emplean un soporte sólido, según el sustrato de crecimiento. Los métodos más comunes, y con más posibilidades de ser explotados a nivel comercial, son los basados en el crecimiento de la planta hospedadora sobre un soporte sólido donde se pueden conseguir buenas "cosechas" de propágulos infectivos. En cuanto a formulación, y dado que estos inóculos están constituidos normalmente por una mezcla de esporas del hongo, fragmentos de raíces colonizadas, hifas y el sustrato (normalmente el único componente "visible" donde creció la planta, el formulado es prácticamente el propio sustrato cargado de propágulos, dosificado apropiadamente.

Tras una serie de experimentos en los que se han multiplicado micelios micorrícicos en medio líquido *in vitro* y ensayado diversos sustratos sólidos para la producción de esporas y propágulos infectivos, objeto del presente trabajo de investigación, se ha conseguido aumentar notablemente la cosecha de esporas

#### 126. Objetivo

Obtener plantas y suelos colonizados con micorrizas a partir de inóculos en forma de micelios desarrollados en medio líquido *in vitro* y determinar la mejor combinación de sustratos, con el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare*), que permitan una abundante producción de propágulos infectivos de micorriza.

#### 127. Hipótesis:

Las micorrizas desarrollan micelios de igual forma en medios líquidos e infectan y colonizan cebada cultivada en cualquier tipo y combinación de sustrato

#### 128. Materiales y métodos

#### 4.1. Material Biológico

- Segmentos de raíz de cebada (*Hordeum vulgare*) de cultivos inoculados con micorrizas de la especie *Glomus mosseae*.
- Micelios aislados en medio líquido.
- Semilla de cebada

#### 4.2. Material de laboratorio

Placas petri, vasos de precipitado de 50 ml, algodón, bisturí, placas planas de vidrio pequeñas, cucharillas de mango largo, pinzas, erlenmeyers de 50 ml., parafilm, papel aluminio, mechero, marcador, porta y cubre objetos colador, harina de trigo, la harina de arroz, agua destilada, alcohol, Medio LB, medio extracto de malta, hipoclorito de sodio, libreta de registro; Sustratos: arcilla, arena, limo, tierra vegetal y humus de lombriz estériles; vasos descartables, cámara Figuragráfica, estufa, Cámara de Flujo Laminar, microscopio, estereoscopio autoclave, incubadora orbital.

#### 4.3. Métodos

##### 4.3.1. Obtención de micelios.

Desinfección de raíces

- Si los fragmentos de las raíces son muy grandes, pueden ser cortados en segmentos de 5–8 cm sobre la superficie de la placa de vidrio.
- Para la esterilización superficial, las raíces son sumergidas por 1 min en una solución de etanol al 70%, siempre en agitación adentro de un vaso de precipitado.
- Una vez realizado esto, los vasos son llevados adentro de la cámara de flujo laminar donde el etanol al 70% es eliminado (vaciado a otro vaso de precipitado) y a las raíces se les agrega una solución de hipoclorito de Na al 1,2%, una vez agregado el hipoclorito entonces se dejan en agitación por 15 min.
- Una vez finalizado este tiempo, las raíces son lavadas cuatro veces con solución salina NaCl al 0.85%. (Figura 1)
- Realizados los enjuagues las raíces están estériles y limpias.

Siembra de raíces en medio líquido.

Se preparó el medio de cultivo LB con Rifampicina (30 gotas en 250 ml.) contenido en matraces de 50 ml. Estos matraces fueron cubiertos con papel aluminio, autoclavados por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Se dejó enfriar para su uso. Ya con el medio frío, se procedió a la siembra (colocado) de las raíces estériles de cebada con ayuda de una pinza en cada matraz (Figura 2), los cuales fueron sellados, identificados y llevados a un agitador orbital con temperatura de 28°C con 100 rpm, durante tres días.

A las 24 horas ya se observó desarrollo inicial de micelios en algunas raíces, al tercer día ya se contaba con un considerable volumen de micelio desarrollado en el medio líquido.

##### 4.3.2. Desarrollo y multiplicación de micelios.

Se preparó el medio de cultivo LB mas ácido tartárico (para evitar el desarrollo de bacterias) en un vaso de precipitado que fue autoclavado por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión; después de autoclavado el medio fue dispensada en cámara de flujo laminar a volúmenes de 20 ml en matraces de 25 ml que fueron cubiertos con papel aluminio, los matraces conteniendo los micelios desarrollados también fueron esterilizados por fuera e introducidos a la cámara de flujo. Los matraces fueron sellados con papel aluminio, identificados y llevados nuevamente al agitador orbital con temperatura de 28°C y 100 rpm, durante tres días.

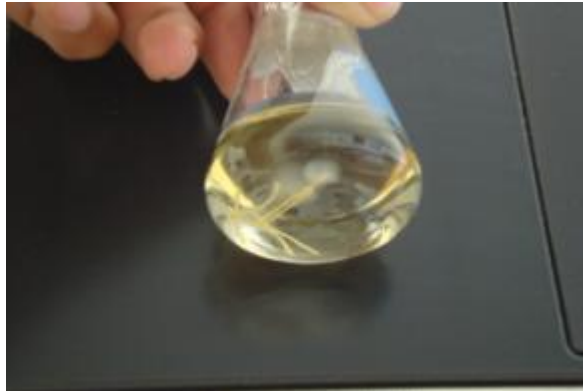


Figura1. Micelios en medio líquido.

#### 4.3.3. Inoculado a sustrato sólido

##### Desinfección de sustrato

Los sustratos utilizados fueron: arcilla, arena, limo, tierra vegetal y humus de lombriz donde cada una fue puesta en pequeños saquitos de tela por separado y fueron sometidos a esterilización por método fisicoquímico mediante vapor de agua por tres horas discontinuas (una hora al día durante tres días). Se dejó enfriar y se procedió al mezclado en las proporciones especificadas por tratamiento:

- T1=arena roja – humus de lombriz (2:1)
- T2=limo – tierra vegetal (2:1)
- T3=arena roja – limo - tierra vegetal (2:1:1)
- T4=arena roja – T. vegetal – humus (2:1:1)
- T5= limo – T. vegetal – humus (2:1:1)
- T6=arcilla – humus de lombriz (2:1)
- T7=arcilla – tierra vegetal (1:1)
- T8=arcilla – arena roja (1:1)
- T9=arcilla – limo (1:1)
- T10=arcilla – tierra vegetal (2:1)
- T11=arcilla – arena roja – T. veg. (1:1:1)
- T12=arcilla=testigo

Una vez preparadas las combinaciones de sustratos, fueron dispensadas en macetas para su siembra.

Siembra de Cebada (*Hordeum vulgare*) e inoculado con micelios micorrícicos.

La semilla antes de ser sembrada fue desinfectada superficialmente; luego se sembraron en las macetas pequeñas y fueron llevadas a una cámara de crecimiento (Figura 3) con un periodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y 24 °C de temperatura; los riegos fueron periódicos después de la germinación.

A la segunda semana desde la germinación, contando ya con buen volumen de raíz y teniendo los micelios micorrícicos en medio líquido se procedió a la inoculación de estos siendo el procedimiento de la siguiente manera:

- Con ayuda de una cucharilla de mango largo y pinzas se procedió a abrir espacio entre el sustrato hasta llegar a la raíz donde con ayuda de la pinza se tomó una porción de micelio y con mucho cuidado se lo depositó en la raíz, haciendo que este entre en contacto con la mayor superficie de raíz posible.
- Ya con los micelios en la raíz se procedió a cubrirlos nuevamente, con mucho cuidado, con el sustrato extraído.
- Después se regó la maceta para que el suelo removido se compacte un poco para evitar que por la porosidad ingrese aire que podía deshidratar al micelio.
- Hecha la inoculación se hicieron riegos y evaluaciones periódicas hasta la conclusión del ensayo.



Figura 3. Plántulas de cebada en la cámara de cría.

## 129. Resultados

### 5.1 Altura planta

Cuadro 1. Análisis de Varianza de las variables de respuesta

	Mean Square	F Value	Pr > F
Alt. Planta	742,895632	27.61	<.0001
Nro hojas	0.13411860	2.80	0.0071
Esp/100 gr	818,013305	20,19	<.0001

Los datos de las variables de respuestas se aproximan a una distribución normal. El cuadro 1 nos muestra que para la variable altura de planta al 95 % de probabilidad, hubo diferencias significativas, siendo que los tratamientos t7, t5 y t10 fueron los que tuvieron mayor altura de planta con 21.6 cm, 21.5 cm y 19.1 cm respectivamente. El tratamiento 7 que consta de la combinación de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1) fue la mejor siguiéndole el tratamiento 5 compuesto por combinaciones de limo, tierra vegetal y humus de lombriz en proporciones (2:1:1) y el tratamiento 10 con arcilla y tierra vegetal en proporciones (2:1) fue el tercer mejor sustrato (Cuadro 2). Contrariamente los tratamientos t1 compuesto por la combinación de arena y humus de lombriz en proporciones (2:1) y t3 compuesta por arena, limo y tierra vegetal (2:1:1) fueron los que presentaron menor altura de planta con 9.8 cm y 11.9 cm de altura respectivamente; teniendo este segundo iguales resultados que el testigo.

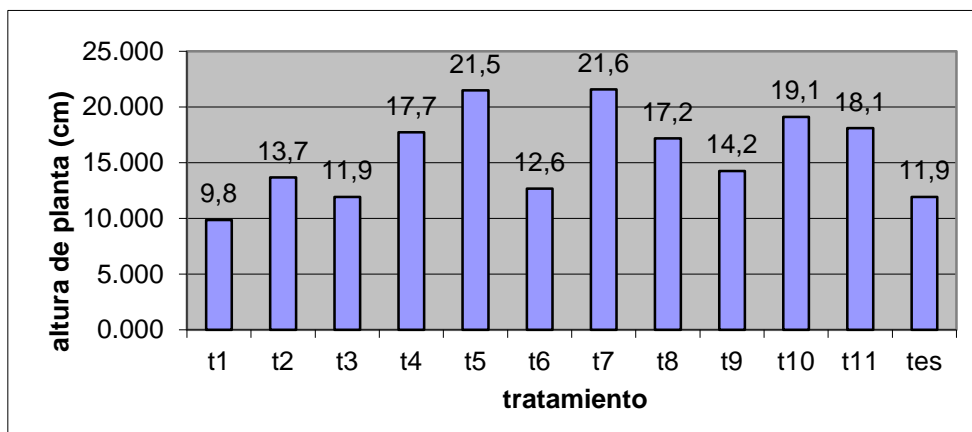


Figura 2. Altura de planta por tratamiento

## 5.2 Número de hojas

Se tiene que los tratamientos t8, t5 y t7 fueron los que tuvieron mayor número de hojas con 5.7, 5.4 y 4.8 hojas respectivamente. El tratamiento 8 cuya composición fue arcilla y arena en proporción (1:1) tuvo como promedio 5.7 hojas por planta, en segundo lugar con 5.4 hojas estaba el tratamiento compuesto por la combinación de limo, tierra vegetal y humus de lombriz en proporciones (2:1:1). Finalmente el tratamiento 7 de combinaciones de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1) fue el tercer mejor en cuanto al numero de hojas formadas junto al tratamiento t4 que presentó el mismo resultado.

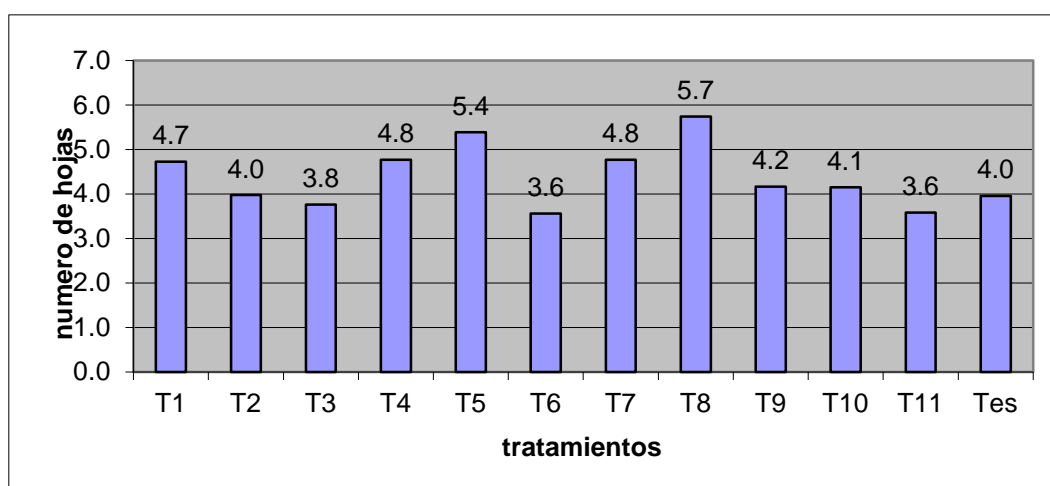


Figura 3. Numero de hojas formadas por tratamiento

## 5.3 Número de esporas formadas.

El cuadro ANVA nos muestra que para la variable esporas por gramo de suelo hubo diferencias significativas, siendo que el tratamientos t7 con 27.2 esporas formadas por gramo de suelo fue la mejor siendo el sustrato combinación de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1); El tratamiento t10 en segundo lugar obtuvo 26.7 esporas por gramo de suelo en un sustrato combinado de arcilla y tierra vegetal en proporciones (2:1); y finalmente t8 con 23.1 esporas formadas en combinación de arcilla y arena en proporción (1:1) tuvo el tercer lugar.



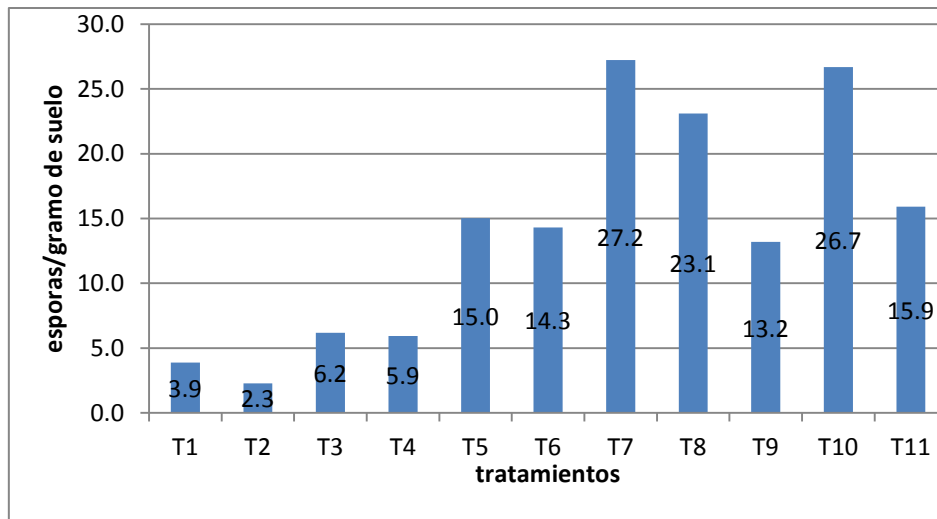
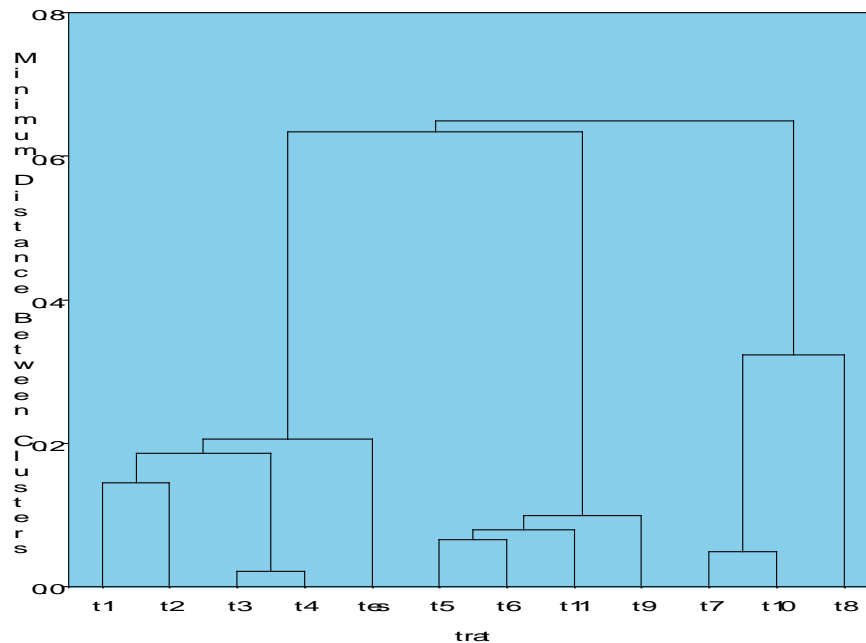


Figura 2. Número de esporas obtenidas por tratamiento

#### 5.4 Agrupamiento de Cluster

De acuerdo al análisis de Cluster sobre todas las variables evaluadas, se obtuvieron tres grupos:



El primer grupo conformado por los tratamientos t1, t2, t3, t4 y en que se incluye el testigo; siendo este grupo el que presenta los valores mas bajos en todas las variables y teniendo estas como base la utilización de arena en la mezcla de sustrato.

El segundo grupo llegó a conformarse por los tratamientos t5, t6, t11 y t9 quienes presentan valores intermedios para todas las variables de respuesta, teniendo que t5 y t6 con la utilización en común de humus de lombriz tuvieron el mismo comportamiento que los tratamiento t9 y t11 que están compuestos por arcilla, arena roja, tierra vegetal y limo, por lo que es indistinta la utilización de esas combinaciones.

El tercer grupo compuesto por los tratamientos t7, t10 y t8 fueron los que tuvieron mayor efecto sobre las variables de respuesta, obteniéndose los mejores valores con las combinaciones de sustratos a base de arcilla.

De acuerdo al análisis multivariado MANOVA (Cuadro 2) hubo diferencias significativas entre grupos. Esto confirma que el grupo 3, con las combinaciones a base de arcilla en proporciones 1:1 o 2:1 con tierra vegetal, fueron las más eficientes en la multiplicación de esporas de micorriza. Estas tuvieron el mismo efecto en las variables altura de planta y numero de hojas

Cuadro 2 . Análisis multivariado MANOVA

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
GR	0.01616399	13.73	6	12	<.0001
GR1-GR2	0.07539539	24.53	3	6	0.0009
GR1-GR3	0.01849971	106.11	3	6	<.0001
GR2-GR3	0.05696607	33.11	3	6	0.0004

### 130. Discusión

- Es importante la optimización del sustrato a utilizarse para maximizar la producción de propágulos infectivos de micorriza ya que esto implica directamente la reducción de costos de producción.
- Las micorizas son muy importantes en el impacto de la producción orgánica, abriéndose mas mercados para su comercialización.
- La selección y estandarización de sustratos para producción de micorizas es vital para crear una fuente de producción viable.

### 131. Conclusiones

- Es posible obtener micelios desarrollados en medio líquido y hacer efectiva la infección de estos mediante la inoculación en raíces de cebada.
- Es posible incrementar la producción de esporas de micorriza en el cultivo de cebada, con el uso de la combinación a base de arcilla y tierra vegetal que fueron las que presentaron mayor producción de propágulos infectivos.

### 132. Recomendaciones

- La utilización de sustratos con base arcillosa y materia orgánica representa mayor producción de propágulos infectivos, esto se ve reflejado en diferentes variables agronómicas, por lo que es recomendable su aplicación en propagación comercial.

### 133. Bibliografía consultada

- Guerrero, R (2004) Características edáficas y presencia de micorizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica. Disponible on line en: <http://www.allbusiness.com/central-america/costa-rica/250105-1.html>
- Hernandez, A. 2001. Las micorizas (En línea). Cataluña, Es. Consultado 20 agosto 2001. Disponible en [http://www.terralia.com/revista14/pagina\\_13.htm](http://www.terralia.com/revista14/pagina_13.htm)
- [http://www.espatentes.com/pdf/2165775\\_a1.pdf](http://www.espatentes.com/pdf/2165775_a1.pdf)

## **Multiplicación de esporas de micorizas (MA) en medio líquido y sólido para el desarrollo de bioinsumos.**

**Responsables: Claudia Gutierrez y Noel Ortuño**

### 134. Introducción:

La inmensa mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualista, con ciertos hongos del suelo dando lugar a las llamadas micorizas. Los hongos formadores de micorizas arbusculares son simbiosiontes obligados; solo cuando colonizan las raíces de esta son capaces de completar su ciclo de vida; es decir, de esporular y generar propágulos capaces de micorizar otras plantas. (Barea, M. 1999)

Las consideraciones anteriores implican que la producción de inóculo de este tipo de micorizas tiene diversas limitaciones. De un lado, las inherentes a la propia naturaleza del hongo, lo que

condiciona la obligatoriedad de contar con la planta para poderlo multiplicar, y de otro, las derivadas de la necesidad de usar un sustrato de crecimiento para la planta que debe permitir una abundante producción de propágulos infectivos, fundamentalmente esporas y micelio, capaces de provocar la micorrización.

La clave está en la producción masiva de un inóculo de calidad, fácilmente aplicable y transportable. En este contexto, a lo largo de la corta historia de la investigación sobre micorrizas arbusculares, se han propuesto varios procedimientos de obtención de inóculo, que varían según la forma de cultivar la planta (cultivos aeropónicos, hidropónicos, etc.) y dentro de los cultivos que emplean un soporte sólido, según el sustrato de crecimiento. Los métodos más comunes, y con más posibilidades de ser explotados a nivel comercial, son los basados en el crecimiento de la planta hospedadora sobre un soporte sólido donde se pueden conseguir buenas "cosechas" de propágulos infectivos. En cuanto a formulación, y dado que estos inóculos están constituidos normalmente por una mezcla de esporas del hongo, fragmentos de raíces colonizadas, hifas y el sustrato (normalmente el único componente "visible" donde creció la planta, el formulado es prácticamente el propio sustrato cargado de propágulos, dosificado apropiadamente.

Tras una serie de experimentos en los que se han multiplicado micelios micorrícicos en medio líquido *in vitro* y ensayado diversos sustratos sólidos para la producción de esporas y propágulos infectivos, objeto del presente trabajo de investigación, se ha conseguido aumentar notablemente la cosecha de esporas

**135. Objetivo:** Obtener micelios micorrícicos en medio líquido *in vitro* y determinar la mejor combinación de sustratos, con el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare*), que permitan una abundante producción de propágulos infectivos de micorriza.

**136. Hipótesis:** Las micorrizas desarrollan micelios de igual forma en medios líquidos e infectan y colonizan cebada cultivada en cualquier tipo y combinación de sustrato

### **137. Materiales y métodos**

#### **138.**

#### **4.1. Material Biológico**

- Segmentos de raíz de cebada (*Hordeum vulgare*) de cultivos inoculados con micorrizas de la especie *Glomus mosseae*.
- Micelios aislados en medio líquido.
- Semilla de cebada

#### **4.2. Material de laboratorio**

Placas petri, vasos de precipitado de 50 ml, algodón, bisturí, placas planas de vidrio pequeñas, cucharillas de mango largo, pinzas, erlenmeyers de 50 ml., parafilm, papel aluminio, mechero, marcador, porta y cubre objetos colador, harina de trigo, la harina de arroz, agua destilada, alcohol, Medio LB, medio extracto de malta, hipoclorito de sodio, libreta de registro; Sustratos: arcilla, arena, limo, tierra vegetal y humus de lombriz estériles; vasos descartables, cámara fotográfica, estufa, Cámara de Flujo Laminar, microscopio, estereoscopio autoclave, incubadora orbital.

#### **4.3. Métodos**

##### **4.3.1. Obtención de micelios.**

Desinfección de raíces

En este trabajo se utilizó la esterilización con hipoclorito de sodio siguiendo el método de Dion y Magallon, (2009) que consiste en lo siguiente:

- Si los fragmentos de las raíces son muy grandes, pueden ser cortados en segmentos de 5–8 cm sobre la superficie de la placa de vidrio.
- Para la esterilización superficial, las raíces son sumergidas por 1 min en una solución de etanol al 70%, siempre en agitación dentro de un vaso de precipitado.
- Una vez realizado esto, los vasos son llevados dentro de la cámara de flujo laminar donde el etanol al 70% es eliminado (vaciado a otro vaso de precipitado) y a las raíces se les

agrega una solución de hipoclorito de Na al 1,2%, una vez agregado el hipoclorito entonces se dejan en agitación por 15 min.

- Una vez finalizado este tiempo, las raíces son lavadas cuatro veces con solución salina NaCl al 0.85%. (Foto 1)
- Realizados los enjuagues las raíces están estériles y limpias.

Siembra de raíces en medio líquido.

Se preparó el medio de cultivo LB con Rifampicina (30 gotas en 250 ml.) contenido en matraces de 50 ml. Estos matraces fueron cubiertos con papel aluminio, autoclavados por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Se dejó enfriar para su uso. Ya con el medio frío, se procedió a la siembra (colocado) de las raíces estériles de cebada con ayuda de una pinza en cada matraz (Foto 2), los cuales fueron sellados, identificados y llevados a un agitador orbital con temperatura de 28°C con 100 rpm, durante tres días.

A las 24 horas ya se observó desarrollo inicial de micelios en algunas raíces, al tercer día ya se contaba con un considerable volumen de micelio desarrollado en el medio líquido; ya estaba listo para su cambio a medio de multiplicación.

#### 4.3.2. Desarrollo y multiplicación de micelios.

Se preparó el medio de cultivo extracto de malta en un vaso de precipitado disolviendo únicamente extracto de malta al 1 y 0.5% en agua destilada por calentamiento, esta solución fue dispensada a volúmenes de 30 ml en matraces de 50 ml que fueron cubiertos con papel aluminio, autoclavados por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. El medio estéril fue trasladado a la cámara de flujo laminar hasta enfriar; los matraces conteniendo los micelios desarrollados también fueron esterilizados por fuera e introducidos a la cámara de flujo. Las raíces con abundante desarrollo de micelio fúngico fueron transferidas a los medios con extracto de malta (Foto 2). Los matraces fueron sellados con papel aluminio, identificados y llevados nuevamente al agitador orbital con temperatura de 28°C y 100 rpm, durante tres días.



Foto 1. Desinfección superficial de raíces.



Foto 2. Micelios en medio líquido.

#### 4.3.3. Inoculado a sustrato sólido

Desinfección de sustrato

Los sustratos utilizados fueron: arcilla, arena, limo, tierra vegetal y humus de lombriz donde cada una fue puesta en pequeños saquitos de tela por separado y fueron sometidos a esterilización por método fisicoquímico mediante vapor de agua por tres horas discontinuas (una hora al día durante tres días). Se dejó enfriar y se procedió al mezclado en las proporciones especificadas por tratamiento:

T1=arena roja – humus de lombriz (2:1)  
T2=limo – tierra vegetal (2:1)  
T3=arena roja – limo - tierra vegetal (2:1:1)  
T4=arena roja – T. vegetal – humus (2:1:1)  
T5= limo – T. vegetal – humus (2:1:1)  
T6=arcilla – humus de lombriz (2:1)

T7=arcilla – tierra vegetal (1:1)  
T8=arcilla – arena roja (1:1)  
T9=arcilla – limo (1:1)  
T10=arcilla – tierra vegetal (2:1)  
T11=arcilla – arena roja – T. veg. (1:1:1)  
T12=arcilla=testigo

Una vez preparadas las combinaciones de sustratos, fueron dispensadas en macetas para su siembra.

Siembra de Cebada (*Hordeum vulgare*) e inoculado con micelios micorrícicos.

La semilla antes de ser sembrada fue desinfectada superficialmente siguiendo el protocolo de Dion y Magallon, (2009); luego se sembraron en las macetas pequeñas y fueron llevadas a una cámara de crecimiento (Foto 3) con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y 24 °C de temperatura; los riegos fueron periódicos después de la germinación.

A la segunda semana desde la germinación, contando ya con buen volumen de raíz y teniendo los micelios micorrícicos en medio líquido se procedió a la inoculación de estos siendo el procedimiento de la siguiente manera:

- Con ayuda de una cucharilla de mango largo y pinzas se procedió a abrir espacio entre el sustrato hasta llegar a la raíz donde con ayuda de la pinza se tomó una porción de micelio y con mucho cuidado se lo depositó en la raíz, haciendo que este entre en contacto con la mayor superficie de raíz posible.
- Ya con los micelios en la raíz se procedió a cubrirlos nuevamente, con mucho cuidado, con el sustrato extraído.
- Después se regó la maceta para que el suelo removido se compacte un poco para evitar que por la porosidad ingrese aire que podía deshidratar al micelio.
- Hecha la inoculación se hicieron riegos y evaluaciones periódicas hasta la conclusión del ensayo.



Foto 3. Plántulas de cebada en la cámara de cría.

## 139. Resultados

### 5.1 Altura planta

Cuadro 1. Análisis de Varianza de las variables de respuesta

	Mean Square	F Value	Pr > F
Alt. Planta	742,895632	27.61	<.0001
Nro hojas	0.13411860	2.80	0.0071
Esp/100 gr	818,013305	20,19	<.0001

Los datos de las variables de respuestas se aproximan a una distribución normal. El cuadro 1 nos muestra que para la variable altura de planta al 95 % de probabilidad, hubo diferencias significativas, siendo que los tratamientos t7, t5 y t10 fueron los que tuvieron mayor altura de planta con 21.6 cm, 21.5 cm y 19.1 cm respectivamente. El tratamiento 7 que consta de la combinación de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1) fue la mejor siguiéndole el tratamiento 5 compuesto por combinaciones de limo, tierra vegetal y humus de lombriz en proporciones (2:1:1) y el tratamiento 10 con arcilla y tierra vegetal en proporciones (2:1) fue el tercer mejor sustrato (Cuadro 2). Contrariamente los tratamientos t1 compuesto por la combinación de arena y humus de lombriz en proporciones (2:1) y t3 compuesta por arena, limo y tierra vegetal (2:1:1) fueron los que presentaron menor altura de planta con 9.8 cm y 11.9 cm de altura respectivamente; teniendo este segundo iguales resultados que el testigo.

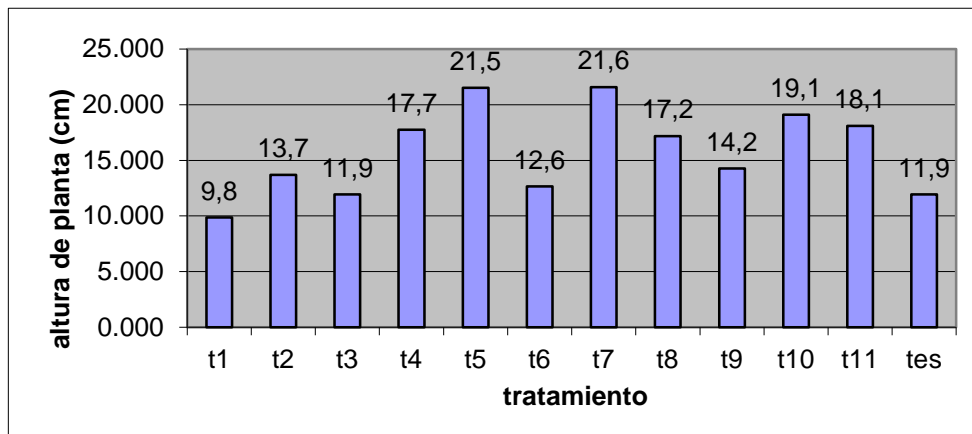


Figura 2. Altura de planta por tratamiento

## 5.2 Número de hojas

Se tiene que los tratamientos t8, t5 y t7 fueron los que tuvieron mayor número de hojas con 5.7, 5.4 y 4.8 hojas respectivamente. El tratamiento 8 cuya composición fue arcilla y arena en proporción (1:1) tuvo como promedio 5.7 hojas por planta, en segundo lugar con 5.4 hojas estaba el tratamiento compuesto por la combinación de limo, tierra vegetal y humus de lombriz en proporciones (2:1:1). Finalmente el tratamiento 7 de combinaciones de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1) fue el tercer mejor en cuanto al numero de hojas formadas junto al tratamiento t4 que presentó el mismo resultado.

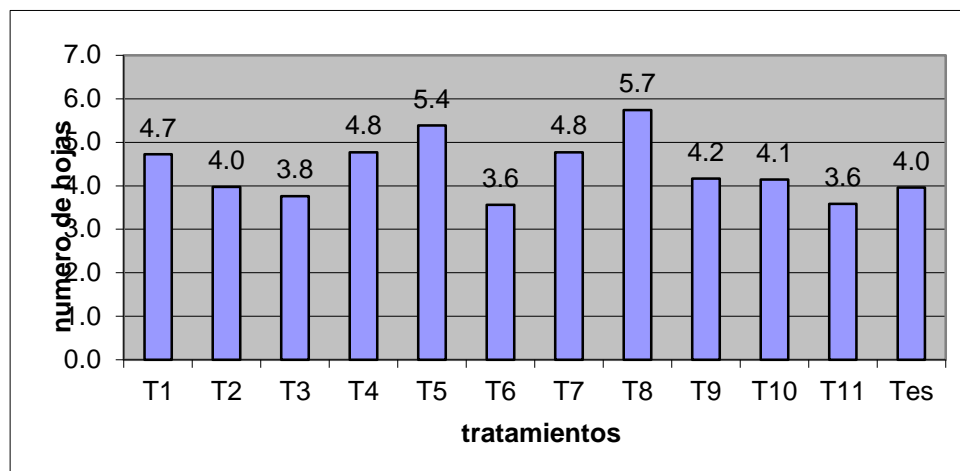


Figura 3. Numero de hojas formadas por tratamiento

## 5.3 Número de esporas formadas.

El cuadro ANVA nos muestra que para la variable esporas por gramo de suelo hubo diferencias significativas, siendo que el tratamientos t7 con 27.2 esporas formadas por gramo de suelo fue la mejor siendo el sustrato combinación de arcilla y tierra vegetal en proporciones (1:1); El tratamiento t10 en segundo lugar obtuvo 26.7 esporas por gramo de suelo en un sustrato combinado de arcilla y tierra vegetal en proporciones (2:1); y finalmente t8 con 23.1 esporas formadas en combinación de arcilla y arena en proporción (1:1) tuvo el tercer lugar.

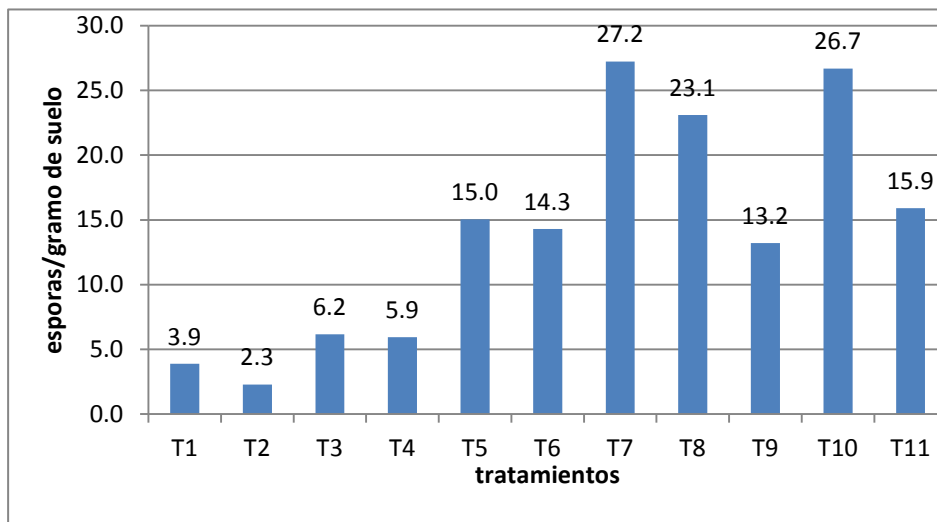
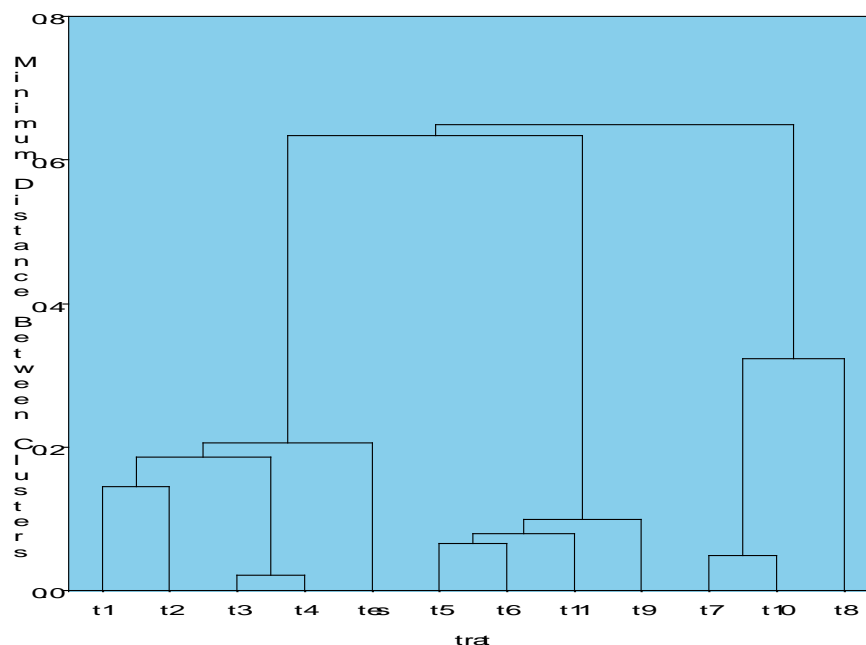


Figura 2. Número de esporas obtenidas por tratamiento

#### 5.4 Agrupamiento de Cluster

De acuerdo al análisis de Cluster sobre todas las variables evaluadas, se obtuvieron tres grupos:



El primer grupo conformado por los tratamientos t1, t2, t3, t4 y en que se incluye el testigo; siendo este grupo el que presenta los valores mas bajos en todas las variables y teniendo estas como base la utilización de arena en la mezcla de sustrato.

El segundo grupo llegó a conformarse por los tratamientos t5, t6, t11 y t9 quienes presentan valores intermedios para todas las variables de respuesta, teniendo que t5 y t6 con la utilización en común de humus de lombriz tuvieron el mismo comportamiento que los tratamiento t9 y t11 que están compuestos por arcilla, arena roja, tierra vegetal y limo, por lo que es indistinta la utilización de esas combinaciones.

El tercer grupo compuesto por los tratamientos t7, t10 y t8 fueron los que tuvieron mayor efecto sobre las variables de respuesta, obteniéndose los mejores valores con las combinaciones de sustratos a base de arcilla.

De acuerdo al análisis multivariado MANOVA (Cuadro 2) hubo diferencias significativas entre grupos. Esto confirma que el grupo 3, con las combinaciones a base de arcilla en proporciones 1:1 o 2:1 con tierra vegetal, fueron las más eficientes en la multiplicación de esporas de micorriza. Estas tuvieron el mismo efecto en las variables altura de planta y numero de hojas

Cuadro 2 . Análisis multivariado MANOVA

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
GR	0.01616399	13.73	6	12	<.0001
GR1-GR2	0.07539539	24.53	3	6	0.0009
GR1-GR3	0.01849971	106.11	3	6	<.0001
GR2-GR3	0.05696607	33.11	3	6	0.0004

#### 140. Discusión

- Es importante la optimización del sustrato a utilizarse para maximizar la producción de propágulos infectivos de micorriza ya que esto implica directamente la reducción de costos de producción.
- Las micorrizas son muy importantes en el impacto de la producción orgánica, abriéndose mas mercados para su comercialización.
- La selección y estandarización de sustratos para producción de micorrizas es vital para crear una fuente de producción viable.

#### 141. Conclusiones

- Es posible obtener micelios desarrollados en medio líquido y hacer efectiva la infección de estos mediante la inoculación en raíces de cebada.
- Es posible incrementar la producción de esporas de micorriza en el cultivo de cebada, con el uso de la combinación a base de arcilla y tierra vegetal que fueron las que presentaron mayor producción de propágulos colonizadores.

#### 142. Recomendaciones

- La utilización de sustratos con base arcillosa representa mayor producción de propágulos colonizadores, esto se ve reflejado en diferentes variables agronómicas, por lo que es recomendable su aplicación en propagación comercial.

#### 143. Bibliografía consultada

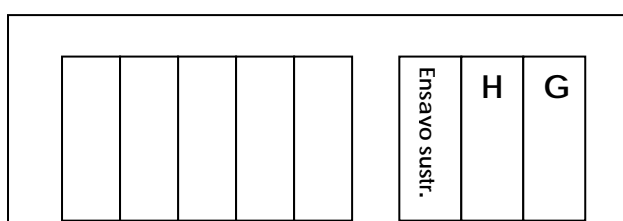
- Guerrero, R (2004) Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica. Disponible on line en: <http://www.allbusiness.com/central-america/costa-rica/250105-1.html>
- Hernandez, A. 2001. Las micorrizas (En línea). Cataluña, Es. Consulado 20 agosto 2001. Disponible en [http://www.terralia.com/revista14/pagina\\_13.htm](http://www.terralia.com/revista14/pagina_13.htm)
- [http://www.espatentes.com/pdf/2165775\\_a1.pdf](http://www.espatentes.com/pdf/2165775_a1.pdf)

### DETERMINACION DE POBLACION DE ESPORAS MICORRÍCICAS EN SUELOS INOCULADOS, Y CULTIVADOS CON CEBADA (*Hordeum vulgare*) EN PLATABANDAS DE LA PLANTA DE BIOINSUMOS PROINPA - COCHABAMBA.

Responsable: Claudia Gutierrez

#### • Datos del cultivo:

Lugar origen de las muestras: Planta de bioinsumos PROINPA - Cochabamba  
 Cultivo: Cebada (*Hordeum vulgare*)  
 Fecha cultivo: 17/10/10  
 Fecha muestreo: 16/02/2011  
 Fecha procesado: 17/02/2011  
 Ubicación platabandas:





		A	B	C		D	E	F
--	--	---	---	---	--	---	---	---

- **Materiales y métodos**

- **2.1 Materiales**

- Muestras de suelo de platabandas de la planta de bioinsumos PROINPA - Cochabamba
- Jeringa de insulina para limpieza estereoscópica de las esporas
- Juego de tamices (450  $\mu\text{m}$  – 120  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$ )
- Espátula de punta fina
- Pizeta
- Porta y cubre objetos
- Balde plástico
- Papel filtro
- Placas petri de pastico.
- Tijera
- Marcador indeleble
- Tubos falcon de 50 cc.
- Lápiz
- Libreta de apuntes
- Agua destilada.
- Agua común
- Solución de sacarosa al 70 %
- Contómetro

- **Equipos**

- Estereoscopio
- Centrífuga a 3350 rpm en ángulo libre con capacidad para tubos de 50 cc.

- **2.2 Métodos**

- **2.2.1 Extracción de esporas**

Se siguió el protocolo de extracción de esporas de suelo que corresponde al procedimiento desarrollado por el Dr. Ewald Sieverding en 1984, en el proyecto Micorriza – CIAT.

- **2.2.2 Determinación peso seco suelo**

Las muestras paralelas después de las 72 horas fueron pesadas en balanza electrónica teniendo los siguientes pesos:

Cuadro 1 peso seco de muestras

código muestra	peso inicial	peso seco
A	20	19,193
B	20	19,385
C	20	18,998
D	20	18,766
E	20	18,459
F	20	18,411
G	20	18,377
H	20	18,872

- **Resultados**

Se procesaron y evaluaron 8 muestras de suelo de origen ya descrito de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro 2. Numero de esporas obtenidas por 100 gramos de suelo

Código muestra	Peso inicial	Peso seco	Nro. esp contadas	Nro. esp/100gr	Nro. esp/gr de suelo
A	20	19,2	726	3782,6	37,8
B	20	19,4	602	3105,5	31,1
C	20	19,0	647	3405,6	34,1
D	20	18,8	856	4561,4	45,6
E	20	18,5	966	5233,2	52,3
F	20	18,4	921	5002,4	50,0
G	20	18,4	1011	5501,4	55,0
H	20	18,9	1102	5839,3	58,4

• **Conclusiones**

- El numero de esporas contadas fue considerable, teniendo en cuenta que las platabandas A,B y C fueron resembrados en suelo anteriormente sembrado e inoculado.
- Las platabandas D,E,F,G y H fueron sembradas en tierra nueva; las plantas después del corte rebrotaron, se las regó otra vez y finalmente fueron cortadas para esperar la cosecha.

• **Recomendaciones**

- El suelo que se tiene ahora en las platabandas tiene muy buena población, puede ser inmediatamente usado para la formulación de insumos.

• **Bibliografía consultada**

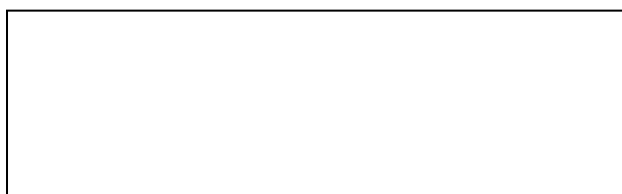
- SÁNCHEZ DE PRAGER M, POSADA R, VELÁSQUEZ D, NARVÁEZ M, 2009, Metodologías básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y Hongos formadores de Micorriza Arbuscular
- [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2001/T1365.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2001/T1365.pdf)

**DETERMINACION DE POBLACION DE ESPORAS MICORRÍCICAS EN SUELOS INOCULADOS, Y CULTIVADOS CON CEBADA (*Hordeum vulgare*) EN PLATABANDAS DE LA PLANTA DE BIOINSUMOS PROINPA - COCHABAMBA.**

Responsable: Claudia Gutierrez

• **Datos del cultivo:**

Lugar origen de las muestras: Planta de bioinsumos PROINPA - Cochabamba  
 Cultivo: Cebada (*Hordeum vulgare*)  
 Fecha cultivo: 17/10/10  
 Fecha muestreo: 16/02/2011  
 Fecha procesado: 17/02/2011  
 Ubicación platabandas:



					Ensayo sust.	H	G
		A	B	C		D	E

- **Materiales y métodos**

### 2.1 Materiales

- Muestras de suelo de platabandas de la planta de bioinsumos PROINPA - Cochabamba
- Jeringa de insulina para limpieza estereoscópica de las esporas
- Juego de tamices (450  $\mu\text{m}$  – 120  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$ )
- Espátula de punta fina
- Pizeta
- Porta y cubre objetos
- Balde plástico
- Papel filtro
- Placas petri de pastico.
- Tijera
- Marcador indeleble
- Tubos falcon de 50 cc.
- Lápiz
- Libreta de apuntes
- Agua destilada.
- Agua común
- Solución de sacarosa al 70 %
- Contómetro

### Equipos

- Estereoscopio
- Centrífuga a 3350 rpm en ángulo libre con capacidad para tubos de 50 cc.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extracción de esporas

Se siguió el protocolo de extracción de esporas de suelo que corresponde al procedimiento desarrollado por el Dr. Ewald Sieverding en 1984, en el proyecto Micorriza – CIAT.

### 2.2.2 Determinación peso seco suelo

Las muestras paralelas después de las 72 horas fueron pesadas en balanza electrónica teniendo los siguientes pesos:

Cuadro 1 peso seco de muestras

código muestra	peso inicial	peso seco
A	20	19.193
B	20	19,385
C	20	18,998
D	20	18,766
E	20	18,459
F	20	18,411
G	20	18,377
H	20	18,872

### • Resultados

Se procesaron y evaluaron 8 muestras de suelo de origen ya descrito de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro 2. Numero de esporas obtenidas por 100 gramos de suelo

Código muestra	Peso inicial	Peso seco	Nro. esp contadas	Nro. esp/100gr	Nro. esp/gr de suelo
A	20	19,2	726	3782,6	37,8
B	20	19,4	602	3105,5	31,1
C	20	19,0	647	3405,6	34,1
D	20	18,8	856	4561,4	45,6
E	20	18,5	966	5233,2	52,3
F	20	18,4	921	5002,4	50,0
G	20	18,4	1011	5501,4	55,0
H	20	18,9	1102	5839,3	58,4

### • Conclusiones

- El numero de esporas contadas fue considerable, teniendo en cuenta que las platabandas A,B y C fueron resembrados en suelo anteriormente sembrado e inoculado.

- Las platabandas D,E,F,G y H fueron sembradas en tierra nueva; las plantas después del corte rebrotaron, se las regó otra vez y finalmente fueron cortadas para esperar la cosecha.

- **Recomendaciones**

- El suelo que se tiene ahora en las platabandas tiene muy buena población, puede ser inmediatamente usado para la formulación de insumos.

- **Bibliografía consultada**

- SÁNCHEZ DE PRAGER M, POSADA R, VELÁSQUEZ D, NARVÁEZ M, 2009, Metodologías básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y Hongos formadores de Micorriza Arbuscular
- [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2001/T1365.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2001/T1365.pdf)

**USO DE MATERIA ORGÁNICA PARA INCREMENTAR LA POBLACION DE ESPORAS DE MICORRIZAS EN UNA PRODUCCIÓN COMERCIAL UTILIZANDO CULTIVO DE CEBADA (*Hordeum vulgare*) EN PLATABANDAS**

**Responsable: Claudia Gutierrez**

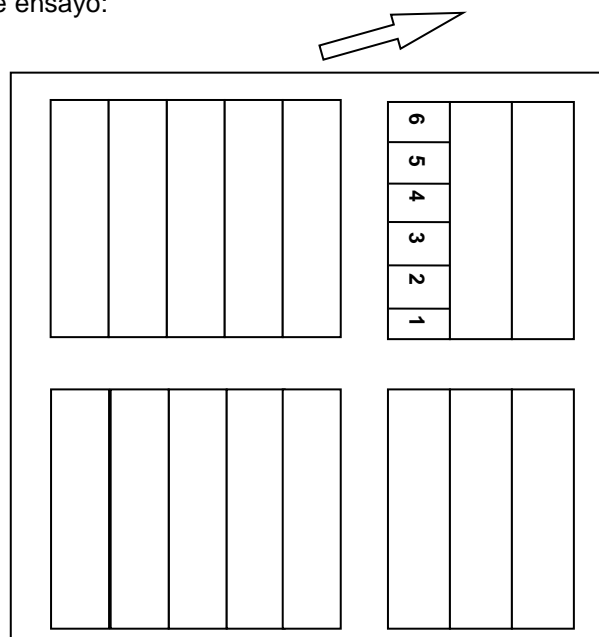
El presente análisis fue realizado complementando los conteos para determinación de población de 8 platabandas de producción de la planta de bioinsumos, por lo que se muestra puntualmente los resultados.

- **Datos del cultivo:**

Lugar origen de las muestras: Planta de bioinsumos PROINPA - Cochabamba

Cultivo: Cebada (*Hordeum vulgare*)

Ubicación platabanda de ensayo:



Donde:

SUSTRATOS	PROPORCION
1= Arcilla - Humus de lombriz	1:1
2= Tierra vegetal - Arena - Arcilla	2/4 : 1/4 : 1/4
3= Arcilla – Tierra vegetal	1:1
4= Humus de lombriz – Tierra vegetal	1/3 : 2/3
5= Arcilla – Tierra vegetal	1/3 : 2/3
6= Tierra vegetal - Arena – Arcilla	1/3 : 1/3 : 1/3

## 2. Determinación peso seco suelo

Las muestras paralelas después de las 72 horas fueron pesadas en balanza electrónica teniendo los siguientes pesos:

**Cuadro 1.** Peso seco de muestras de suelo.

código muestra	peso inicial	peso seco
1	20	18.804
2	20	16.505
3	20	13.422
4	20	16.557
5	20	17.767
6	20	17.600

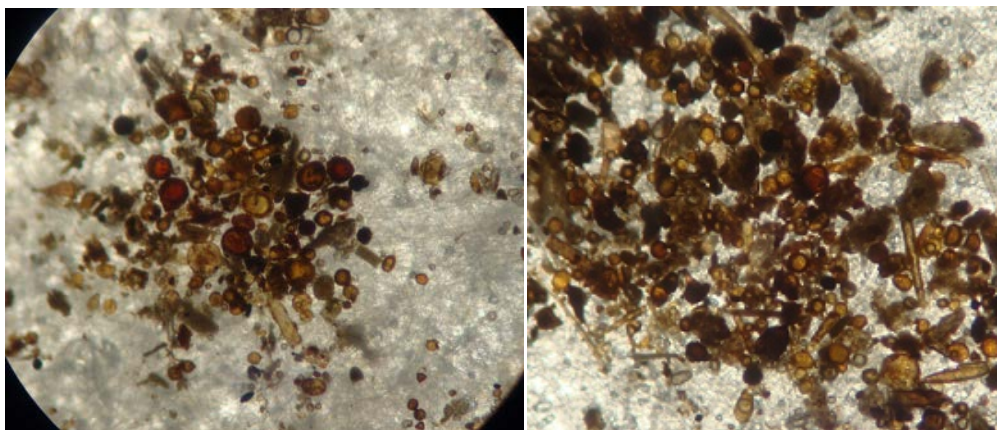
**Cuadro 2.** Numero de esporas promedio por gramo de suelo.

Código muestra	Nro. esp/100gr	Nro. esp/gr de suelo
1	9100,3	<b>91,0</b>
2	21870,5	<b>218,7</b>
3	24294,0	<b>242,9</b>
4	17433,3	<b>174,3</b>
5	6871,1	<b>68,7</b>
6	13647,2	<b>136,5</b>

## 1. Conclusión.

Aplicando la materia orgánica al suelo es posible incrementar la población de esporas de micorrizas (MA) en el suelo.

El manejo de las platabandas basadas en el estrés (dos cortes a 20 cm de altura de planta) a la planta ayuda a incrementar la población.



## ESTUDIO COMPARATIVO Y EFECTO DE DIFERENTES CEPAS DE MICORRIZAS (MA) SOBRE LAS PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*), HABA (*Vicia faba*) y CEBADA (*Hordeum vulgare*)

**Responsables:** Mikaela Cáceres; Noel Ortuño

**Colaboración:** Proyecto Consorcio Andino-Bioinsumos (Holanda)

### INTRODUCCIÓN.

Según Simon (*et al.*, 1993) Se conoce con el nombre de micorriza (del griego *mykes*-hongo, *rhiza*-raíz) a la asociación mutualista existente entre algunos hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas. Los registros fósiles más antiguos indican que dicha asociación tiene unos 400 millones de años, lo que ha llevado a considerar la compleja co-evolución entre las plantas y sus hongos asociados, que se manifiesta en la amplia distribución del fenómeno (se ha estimado que el 90% de las plantas terrestres están micorrizadas) y en la diversidad de mecanismos morfológicos, fisiológicos y ecológicos implicados.

Durante la simbiosis, las plantas hospedantes reciben nutrientes minerales del suelo tomados por el hongo (principalmente fósforo), mientras que éste obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Brundrett *et al.*, 1996).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) constituyen micorrizas que colonizan el tejido intraradical de la planta hospedera, donde desarrollan estructuras características de la simbiosis (arbuscúlos y vesículas), así como micelio extraradical, el cuál interactúa con el ecosistema de la rizósfera y es el encargado de la toma de nutrientes del suelo. Es importante tener en cuenta que las micorrizas constituyen una asociación multifuncional con las plantas, cuyos beneficios van más allá de los aspectos nutricionales. Los HFMA son considerados como un recurso biológico multipropósito cuyo manejo, además de los efectos sobre la productividad vegetal, genera beneficios ambientales al mejorar las condiciones físico-químicas y biológicas del suelo, (Guerrero *et al.*, 1996). Es por esa situación surge la necesidad de desarrollar los biofertilizantes que coadyuva en la fertilidad del suelo.

Así mismo, dichos hongos interactúan con microorganismos implicados en el control biológico de patógenos presentes en el suelo, demostrando que existen diferentes tipos de interacción con HFMA. Algunos estudios sugieren que determinadas especies empleadas en control biológico pueden ser compatibles con las micorrizas y en consecuencia pueden ser aplicadas conjuntamente en el mismo inóculo, con la finalidad de incrementar el crecimiento vegetal en términos de rendimiento y sanidad. (Paulitz y Linderman, 1991).

Bolivia cuenta con una biodiversidad en recursos naturales y microorganismos del suelo, en la actualidad se tiene escasos estudios realizados y documentados en el tema de microorganismos, específicamente de las micorrizas, que favorecen en el desarrollo agropecuario de las zonas de: el Altiplano, Valles y Trópico.

El efecto benéfico que tiene el uso de diferentes microorganismos y micorrizas del suelo como alternativa para la nutrición de las plantas, la defensa de los suelos contra la degradación y la protección fitosanitaria de los cultivos (Su función es la de absorción, proporcionando agua y nutrientes y protegiendo las raíces de algunas enfermedades), entre otros; el ser humano ha logrado aislarlos y reproducirlos de manera vertiginosa, convirtiéndolos en un gran aliado del productor y de personas que lo emplean para diferentes fines y propósitos naturales y ecológicos (Páez, Bernaza y Acosta, 2006).

Aunque la simbiosis hongo – planta se encuentra muy extendida en todo el ecosistema terrestre, ya que el 90-95% de las plantas superiores se encuentran micorrizadas, la degradación del planeta, el uso indiscriminado de sustancias químicas por el hombre, etc., han obligado a éste, crear nuevas alternativas de actuación, dando paso a actividades de tipo

sostenible. Entre éstas, se encuentra la utilización de inóculos microbianos micorrizicos (Páez, Bernaza y Acosta, 2006).

Internacionalmente son muchas las cepas diferentes microorganismos benéficos, que se han logrado aislar y reproducir permitiendo incrementar y acelerar. Uno de los microorganismos más estudiados y empleados en la actualidad, es la *Micorriza*. Son tantas las especies, de cepas existentes, y tan diversas sus formas de actuar en la planta y en el suelo, que podemos asegurar que están presentes en casi todas las especies vegetales y los suelos agrícolas existentes en el Mundo (Páez, Bernaza y Acosta, 2006).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo de investigación se realizó en la zona de “El Paso” en dependencias de la Fundación PROINPA ubicada al Nor Oeste a 15 Km. de la ciudad de Cochabamba, dentro del valle central de la provincia de Quillacollo. Geográficamente ubicada en las coordenadas 17° 21'01.91” de Latitud Sud y 66° 15'44.34” de Longitud Oeste, con una altitud promedio de 2613 m.s.n.m. con un clima semiárido con precipitaciones media anual de 512 mm; temperaturas media anual es de 17.4 °C, con una mínima de 1°C en el mes de junio y la máxima de 27°C en el mes de octubre., humedad relativa se encuentra entre 53% en los meses de junio y agosto y 66% en los meses de enero y febrero y vientos predominantes de la zona, es de dirección sur este y suroeste, se presenta con mayor frecuencia en los meses de octubre y noviembre.

### **Evaluación de cepas de micorriza en tres cultivos diferentes**

El estudio se desarrollo sobre las plantas de: lechuga (*Lactuca sativa*), haba (*Vicia faba*) y cebada (*Hordeum vulgare*); las semillas criollas utilizadas fueron, compradas de la feria de Quillacollo, para evitar el efecto residual de los fungicidas con los cuales son tratados las semillas, el sustrato empleado tubo una relación de 2:1:1 de arena áspera, cascarilla de arroz y materia orgánica reutilizada.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres cultivos y 7 cepas nativas, cada una repetida cinco veces, las variables evaluadas fueron: Tasa de multiplicación de esporas, frecuencia de, intensidad de raíces. Los datos se analizaron con el programa SAS y para las comparaciones se utilizó la técnica de Tukey.

### **Tasa de multiplicación de esporas**

La evaluación consistió en la cuantificación microscópica de esporas de micorrizas presentes en el suelo y de las estructuras fúngicas (hifas de micorriza en la raíz). La metodología que se utilizó para la cuantificación de esporas de micorrizas fue una combinación de 2 métodos: 1) tamizado y decantación propuesto por Gerdmann y Nicolson (1963).y 2) Centrifugación propuesto por Jenkins (1964).

### **Tinción de raíces**

La metodología que se utilizo para la coloración de raíces y su observación al microscopio mencionado por Phillips (1970).

Determinación de la frecuencia de colonización con la siguiente formula:

$$\%F = \frac{\text{Número de segmentos colonizados}}{\text{Número de segmentos totales observados}} * 100$$

Determinación de la intensidad de colonización utilizando la siguiente escala de colonización en base a 5 categorías de intensidad: Categoría 1(a): 1-20%; Categoría 2(b): 21-40%; Categoría 3(c): 41-60%; Categoría 4(d): 61-80%; Categoría 5(e): 81-100%.

A cada segmento de raíz observado se asigno una de estas categorías, posteriormente el número de segmentos obtenidos para cada categoría (a, b, c, d, e) se multiplico por 0.1, 0.3,



0.5, 0.7, y 0.9 respectivamente. Finalmente se dividió entre el número total de segmentos observados.

La fórmula para hallar el % de intensidad es la siguiente:

$$\%I = \frac{(0.1*a + 0.3*b + 0.5*c + 0.7*d + 0.9*e)}{(a+b+c+d+e)} * 100$$

Posteriormente, los datos obtenidos de frecuencia e intensidad de colonización fueron sometidos a análisis estadísticos (ANVA) en el programa SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tasa de multiplicación de esporas entre cultivos

Concluido los análisis de varianzas y covarianzas para los efectos aleatorios, se observa que el uso de los mismos fue eficiente en el modelo, razón por la cual se obtuvo valores mayores a cero como indica el cuadro 37, mostrando de esta forma el correcto uso dentro del modelo.

**Cuadro 1.** Análisis de varianzas y covarianzas de los efectos aleatorios del modelo de parcelas divididas de la tasa de multiplicación de esporas.

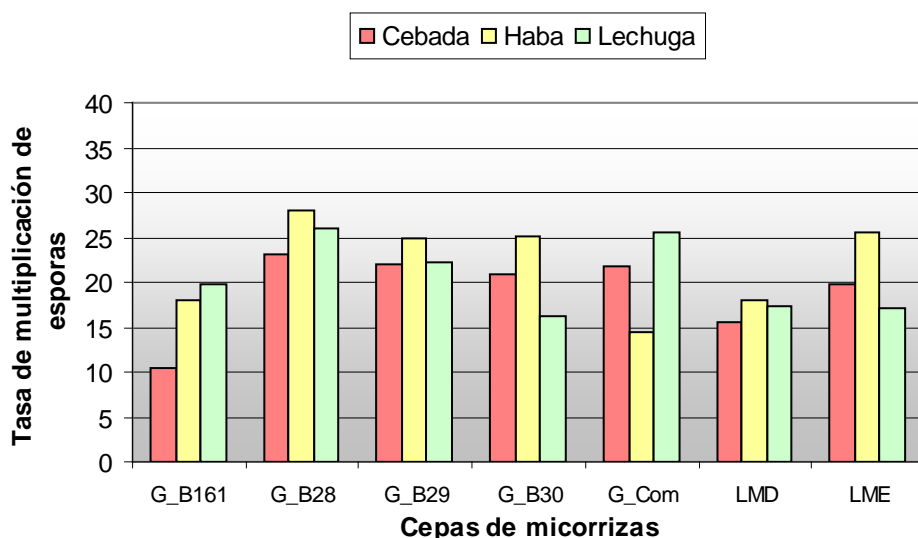
Parámetros de Covarianza	Estimador
Blq	0.04052
Blq*Cultivo	0.0224
Residual	0.3665
Verosimilitud -2 Res Log	196

Efectuado el análisis de varianza de los efectos fijos (Cuadro 38), no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $Pr > 0.05$ ) en ninguno de los factores estudiados, indicando de esta manera que la tasa de multiplicación de esporas fue similar en los tres cultivos utilizados (Cebada, haba y lechuga); el comportamiento de las cepas fue similar respecto a la tasa de multiplicación de esporas y finalmente que el efecto de interacción de cultivo\*cepas produjo comportamientos similares.

**Cuadro 2.** Análisis de varianza de la tasa de multiplicación de esporas.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	F-Valor	Pr > F
Cultivo	2	8	0.47	0.6398
Cepas	6	72	1.65	0.1460
Cultivo*Cepas	12	72	0.71	0.7345

Si bien no existen diferencias estadísticas significativas, la figura 50 sugiere que las mejores respuestas se dieron con la cepa G\_B28, alcanzando una tasa de multiplicación promedio de 25, en los tres cultivos evaluados.



**Figura 1.** Comparación de la tasa de multiplicación de esporas frente a las cepas de micorrizas en los cultivos de lechuga, haba y cebada.

#### Frecuencia de colonización de hifas

Analizados los efectos aleatorios (Cuadro 39), se observa valores mayores a cero, indicando de esta forma el correcto uso dentro del modelo planteado.

**Cuadro 3.** Análisis de varianzas y covarianzas de los efectos aleatorios del modelo de parcelas divididas de la frecuencia de colonización de hifas.

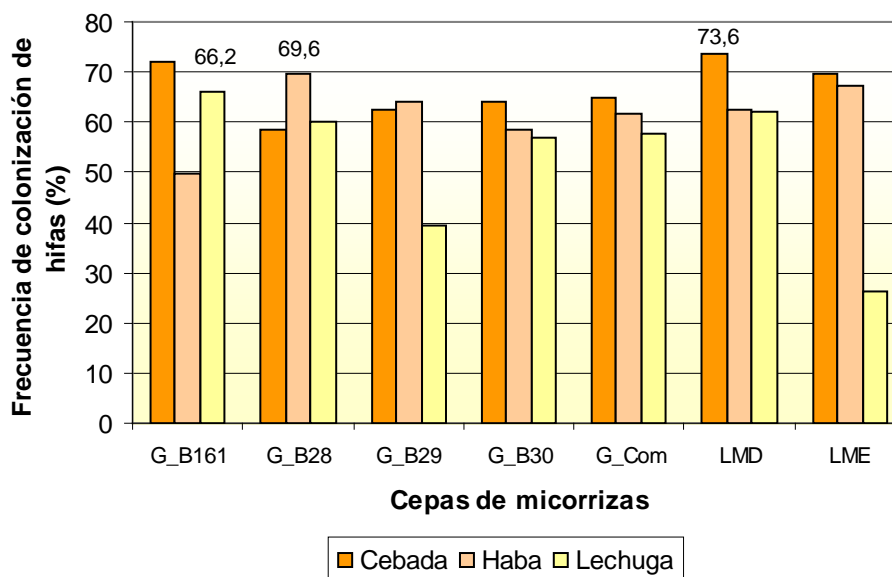
Parámetros de Covarianza	Estimador
Blq	54.8748
Blq*Cultivo	8.22
Residual	269.59
Verosimilitud -2 Res Log	590.7

Respecto al análisis de varianza de los efectos fijos (Cuadro 40), tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $Pr > 0.05$ ) entre cultivos, cepas y el efecto de la interacción cultivo\*cepas, éstos resultados son similares a los obtenidos en la tasa de multiplicación de esporas.

**Cuadro 4.** Análisis de varianza de la frecuencia de colonización de hifas.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	F-Valor	Pr > F
Cultivo	2	6.04	1.03	0.4119
Cepas	6	56.8	1.76	0.1235
Cultivo*Cepas	12	54.4	1.58	0.1267

La figura 51 corrobora los resultados hallados en el análisis de varianza, donde se observa la ausencia de diferencias estadísticas significativas, sin embargo, también se ve una ligera superioridad de la cepa LMD en el cultivo de cebada que alcanza a 73.6%; la respuesta es diferente en el cultivo de haba donde la cepa G\_B28 alcanzó 69.6% y finalmente en el cultivo de lechuga la cepa con un promedio mayor fue G\_B161 con 66.2%.



**Figura 2.** Comparación de la frecuencia de colonización de hifas frente a las cepas de micorrizas en los cultivos de lechuga, haba y cebada.

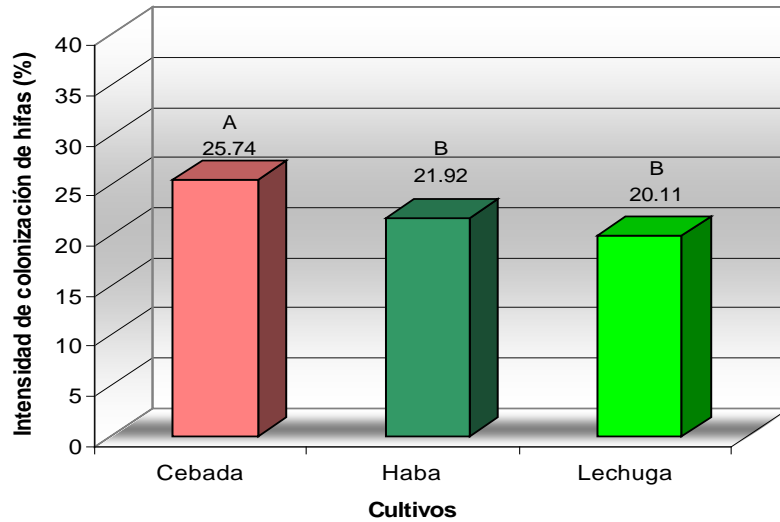
#### Intensidad de colonización de hifas

Realizado el análisis de varianza de los efectos fijos (Cuadro 40), se hallaron diferencias estadísticas significativas ( $Pr < 0.05$ ) en el factor Cultivo, indicando de esta forma que la intensidad de colonización de hifas fue diferente en alguno de los cultivos evaluados; respecto al otro factor estudiado (Cepas) éste resultado no significativo al igual que la interacción Cultivo\*Cepas.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza de la intensidad de colonización de hifas.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	F-Valor	Pr > F
Cultivo	2	62.5	4.08	0.0216
Cepas	6	62.2	1.12	0.3637
Cultivo*Cepas	12	61.7	1.27	0.2570

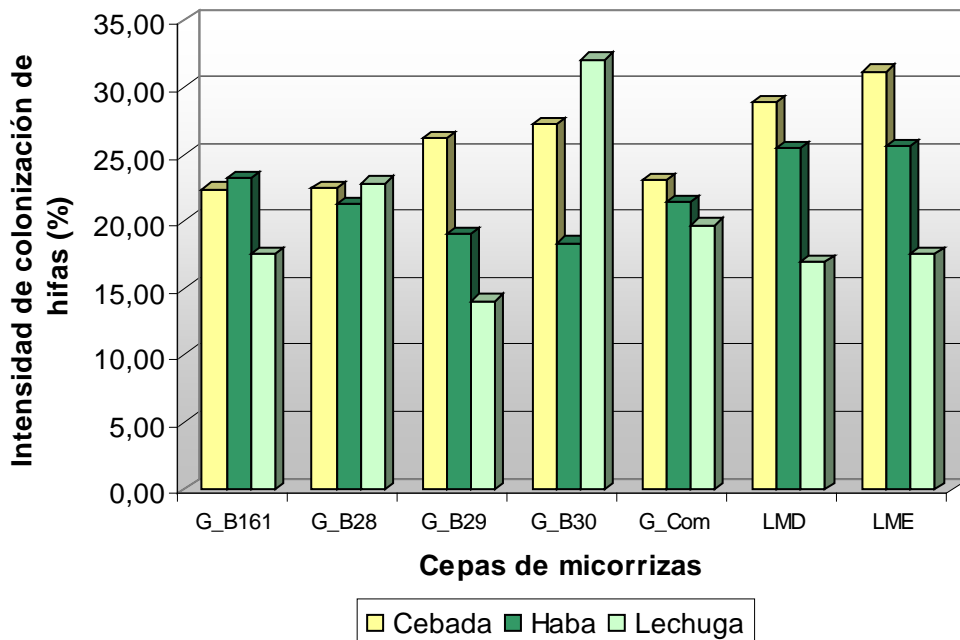
Comparadas las medias obtenidas por cultivo de la intensidad de colonización de hifas, se obtuvo dos grupos: el grupo A (cebada) con 25.74% que resultó superior al grupo B (haba y lechuga) con 21.92 y 20.11% respectivamente, como se observa en la figura 46.



**Figura 3.** Proporción de la intensidad de colonización de hifas por cultivos evaluados.

Además, se observa que la cebada presenta el grado más alto de intensidad (25.74%) respecto al resto de los cultivos. Eso demuestra que tiene un mayor grado de simbiosis porque permite un mayor desarrollo vegetal para la micorriza.

Graficando la interacción de las cepas de micorrizas y los cultivos (Fig. 47), se observa ligeras diferencias entre los mismos, que sugieren una mejor respuesta, tal es el caso de la cepa G\_B30 que se comporta mejor en el cultivo de lechuga, la cepa LME cuyo resultado fue favorable en el cultivo de cebada y para el cultivo de haba las cepa LMD y LME fueron las de mejores respuestas.



**Figura 4.** Comparación de la intensidad de colonización de hifas frente a las cepas de micorrizas en los cultivos de lechuga, haba y cebada.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Tasa Multiplicación de Esporas: todas las cepas tuvieron la misma tasa de multiplicación en los tres

- Frecuencia de colonización: todas las cepas favorecieron de igual forma en los tres cultivos evaluados, bajo las condiciones de estudio.
- Intensidad de colonización: los cultivos fueron favorecidos por la colonización de hifas principalmente en el cultivo de cebada, seguida de haba y finalmente lechuga.

En general después del trabajo realizado bajo las condiciones de estudio se observó: En lo que respecta la tasa de multiplicación de micorriza, intensidad y frecuencia de colonización de micorrizas, todas las cepas mencionadas presentan el mismo comportamiento para los cultivos de haba y cebada.

## REFERENCIAS

ANGULO V.W. 1997 Relación simbiótica entre hongos *MA-Baccharis incarum* y su papel en la recuperación de los suelos del altiplano boliviano. La Paz. p.20-38

AZCÓN-AGUILAR C, BAREA J. Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos de la rizósfera. En E. Guerrero (Ed.), Micorrizas. Recurso Biológico del suelo. Fondo FEN Colombia, Bogotá; 1996;47-68

FERRERA-CERRATO, R. "La endomicorriza (VA) en la producción agrícola, frutícola y forestal". Rev. Mex. de Fitopatología, 5(2): 150-158, 1987

FERRERA-CERRATO, R.; D. JAEN CONTRERAS. "Manual de prácticas. Curso breve teórico-práctico de la endomicorriza VA para la formación de recursos humanos en las Universidades Agrícolas de México". Chapingo. México. Sección de Microbiología. Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados. 1987.

GUERRERO E, RIVILLAS C, RIVERA E. Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. En Guerrero E. (Ed.), Micorrizas. Recurso Biológico del suelo. Fondo FEN Colombia, Bogotá; 1996;181-201

PAULITZ T, LINDERMAN R. Lack of Antagonism Between the Biocontrol Agent *Gliocladium virens* and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. New Phytol. 1991;117(2):303-308.

SIMON L., BOUSQUET J., LEVESQUE R.C. & LALONDE M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature. 363: 67-68.

## **EFFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS Y ESPECIES SIMBIONTES (Cebada, *Brachiaria*) EN LA MULTIPLICACION MASIVA DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR (MA) *Glomus sp.***

Responsable: Marcelo Alconz y Noel Ortuño.

### **INTRODUCCION.-**

Uno de los problemas más importantes en los países subdesarrollados, son los bajos rendimientos que se tienen en los diferentes productos agrícolas esto debido a la degradación de los suelos en todas sus formas: físicas, químicas, biológicas tales desequilibrios son los que repercuten en la baja productividad de los cultivos.

Esta situación puede observarse mucho más en países desarrollados o en cualquier lugar donde se realice una agricultura intensiva y que es justamente por el uso irracional o indiscriminado de agroquímicos (fungicidas, nematicidas, fertilizantes, etc.) donde existe una ruptura de la interacción natural de los tres factores mencionados y se crea un problema ambiental lo cual genera la necesidad de disponer nuevas tecnologías que permitan incrementar los rendimientos agrícolas (Swaminathan, 1991).

Ante estos problemas y como una alternativa de solución, está demostrado y reconocido, el efecto beneficioso que tiene el uso de diferentes microorganismos del suelo como alternativa para estos problemas en el marco de una "Agricultura Sostenible". Dentro de la diversidad de esos microorganismos del suelo, y sus diferentes interacciones, se destacan grupos de

relaciones positivas como el de algunas asociaciones simbióticas micorrízicas, presentes entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo, que juegan un papel clave en el ciclaje de nutrientes en el ecosistema y en la protección de las plantas contra estrés cultural y ambiental (Linderman, 1993; Hooker and Atkinson, 1992).

En síntesis las micorrizas traen beneficios en cuanto a conservación, restauración del suelo y en las plantas en cuanto a nutrición, principalmente con el Fósforo, tolerancia a diferentes tipos de estrés y control de enfermedades basadas en el antagonismo. Por eso es muy importante estudiar los factores que lo afectan como por ejemplo, el tipo de sustrato para su producción masiva en cantidades adecuadas en relación al tipo de agricultura (Blanco y Salas, 1997).

## MATERIALES Y METODOS.

### Ubicación.

El ensayo se realizó en los predios de la Fundación PROINPA que está ubicada en la localidad del Paso a 14 km de la ciudad de Cochabamba en la provincia de Quillacollo en las coordenadas 17° 21' 2.03" latitud sud y 66° 15' 46.94" longitud oeste

### Materiales.

Entre los materiales se tuvo material de campo empezando por el terreno de 96 m<sup>2</sup>, estacas de 1.5 m. de altura, tablas de madera de 0.2\*1 m. alambre acerado, clavos, plástico negro de 2m. de ancho, combo, alicate, pala, azadón, picota y malla semi-sombra todo, este material se uso en la implementación de las unidades experimentales y la estructura en la cual se hizo el ensayo.

Para la preparación de los sustratos se uso una maquina mezcladora de concreto para agilizar la mezcla de los componentes del sustrato, los cuales constaron de limo y arcilla, después de la mezcla se lo esterilizo en una esterilizadora a vapor para lo cual también se preciso de diesel como combustible para su funcionamiento.

En el momento de la siembra los materiales que se precisaron fueron semillas de cebada, *Brachiaria* e inóculo de micorriza. Ya en la medición de las variables en laboratorio se utilizaron los siguientes materiales microscopio óptico, tubos de ensayo, hidróxido de potasio, tinta pluma fuente PELIKAN azul, porta objetos, tamices de 400 y 500 mesh, bisturí, gradillas, cajas petri, estufa, centrifuga, pizetas, estereoscopio y papel filtro.

El ensayo estuvo establecido en cuatro bloques de 9.5m de largo y 1m de ancho dentro las cuales se ubicaron las unidades experimentales con dimensiones de 1.1m de largo y 1m de ancho separado por tablas de madera de 1m de largo y 0.2m de ancho, es importante mencionar que el ensayo se realizó en condiciones de semi-sombra.

### Sustrato

- Tomando en cuenta la altura del sustrato que fue de 15cm la cantidad de sustrato que se utilizo por unidad experimental fue de 0.165m<sup>3</sup> con mezcla de limo y arcilla en diferentes proporciones (v/v) con las siguientes relaciones:

Cuadro 1. Relación de composición de sustratos para la multiplicación de micorrizas.

Relación Limo : Arcilla		Relación en % de los componentes del sustrato		Sustrato
Limo	Arcilla	Limo	Arcilla	Nombre
3	1	75%	25%	A
2	1	67%	33%	B
1	1	50%	50%	C
0	1	0%	100%	D

- Previamente antes de la mezcla se procedió a esterilizar los sustratos con la ayuda de un esterilizador de vapor.
- Esterilizado el sustrato se procedió a mezclarlo con la ayuda de una mezcladora eléctrica en las proporciones indicadas.
- Hecha la mezcla se procedió a llenar las platabandas con su respectivo sustrato dependiendo del tratamiento.

### Siembra

- La siembra se realizó en cada unidad en pequeños surcos 6en total por cada unidad experimental colocando la misma cantidad de semillas de la siguiente manera.
- La cebada se sembró a una densidad de 30gr. por tratamiento, es decir para cada una de las 32 unidades experimentales.
- Para el caso de la *B. decumbens* se sembró a una densidad de 15 gr por tratamiento en cada uno de los bloques. Todo esto con el fin de tener una población uniforme en cada tratamiento y repetición.
- Ambas especies se sembraron en surcos a chorro continuo, con las siguientes diferencias. La cebada a una profundidad de 3cm. y la *B. decumbens* superficialmente debido al tamaño de la semilla y así se logre una rápida emergencia.
- Después de la siembra se mantuvo la humedad del sustrato constante hasta su emergencia.

### Inóculo

- El inóculo que se utilizó fue una cepa cubana *Glomus sp.* obtenida del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).
- La inoculación se realizó en una relación de 625 gr. por unidad experimental (1.1 m<sup>2</sup>) esparcido sobre el surco después de colocar la semilla.
- Posteriormente se realizó el tapado del surco y luego se procedió a regarlo.

### VARIABLES DE RESPUESTA

- Entre los parámetros para evaluar principalmente el efecto de las dos especies sobre la producción de micorrizas se tomaron los siguientes parámetros para su evaluación.
- Altura planta se midió cada semana después de la germinación de la semilla con la ayuda de una regla graduada en (cm.) se escogieron plantas representativas según el criterio del investigador la medición se hizo desde la altura del coleoptilo hasta la punta de la hoja más larga
- Volumen raíz esta evaluación se lo realizó cada 2 semanas después de que se hubo establecido las dos especies de gramíneas, es decir, cuando la raíz tuvo un desarrollo aceptable para hacer esta evaluación, 18 días. La medición se hizo de la siguiente manera se tomaron tres plantas que estuvieron al borde de la platabanda, se tomó la muestra cuidadosamente, para no perder raíces que puedan afectar los resultados. Después de extraer las raíces las mismas se introdujeron a un matraz con agua y el volumen desplazado correspondió al volumen de la raíz por planta en c.c.
- Peso seco raíz, la raíz extraída para la medición de volumen también se utilizó para medir el peso seco de la raíz con la ayuda de una balanza electrónica, la raíz se secó a temperatura ambiente envuelta en un periódico.
- Área foliar, esta evaluación se la realizó midiendo el ancho y largo de las hojas obtenidas de las plantas muestreadas.
- Peso foliar seco, tal evaluación se la realizo secando la parte aérea de la planta en ambiente natural, en sobres de papel sabana y luego pesados con la ayuda de una balanza electrónica con precisión de 0.001 de g.
- Micorrización Para determinar la colonización endomicorrizica se utilizó el método de Phillips y Hayman (1970), para Porcentaje de colonización total.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables de respuesta se analizaron con el siguiente modelo que corresponde al Diseño de bloques completos al azar (DBCA):

$$Y_{ijk} = \mu + \phi_i + \alpha_j + \beta_k + \tau_{bjk} + \epsilon_{ijk}.$$

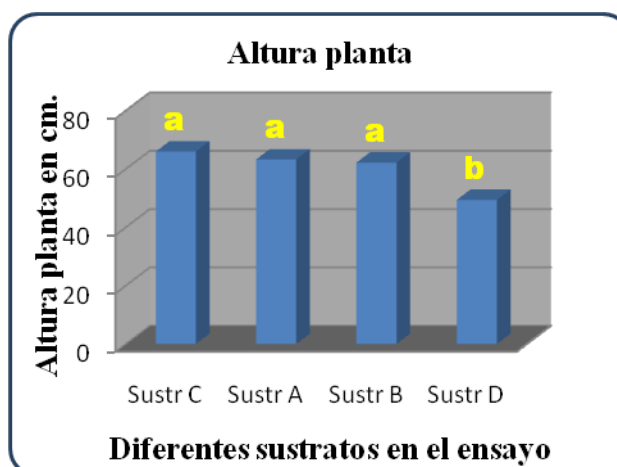
## RESULTADOS Y DISCUSION

### Altura planta cebada

**Cuadro2.** Análisis de varianza para la altura de planta.

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	6	0.0139	0.0023	6.46	0.007
Error	9	0.0032	0.0004		
Blq	3	0.0078	0.0026	7.24	0.009
sustr	3	0.0061	0.0021	5.69	0.0183

El análisis de varianza indica que las diferencias de altura entre sustratos es significativo para la cebada, lo cual nos permite hacer una comparación de medias para determinar cual o cuales fueron los sustratos con mayor desarrollo de la altura planta, en la siguiente figura podemos observar las diferencias cuantitativas y estadísticas de los diferentes sustratos.



**Figura 1.** Efecto de los diferentes sustratos sobre la altura planta en cebada.

En la figura 1 se observó que tres sustratos resultaron ser iguales estadísticamente, en cuanto al desarrollo de la altura. Los sustratos C, A y B resultaron ser superiores al sustrato D compuesta de solamente arcilla. Por otra parte estos resultados respaldan lo que mencionan muchos autores con respecto a que la cebada es una especie rustica y puede tener un buen desarrollo en diferentes tipos de suelo debido a su adaptabilidad, pero en un extremo de suelo arcilloso no se ve muy beneficiado y es afectado en diferentes procesos fisiológicos (www.infoagro.com).

Por eso es importante mencionar que la adsorción de los nutrientes juega también un rol muy importante en la nutrición de las plantas ya que la misma solo puede asimilar aquellos nutrientes que se encuentran en la solución del suelo y esa disponibilidad de nutrientes varía con la granulometría del suelo, es decir, en suelos pesados como los arcillosos que tienen partículas muy pequeñas, los nutrientes son adsorbidos con mayor fuerza, que los suelos más livianos es por esa razón que la cebada tubo menor desarrollo en el sustrato arcilloso (Black, 1975; FAO, 1980).



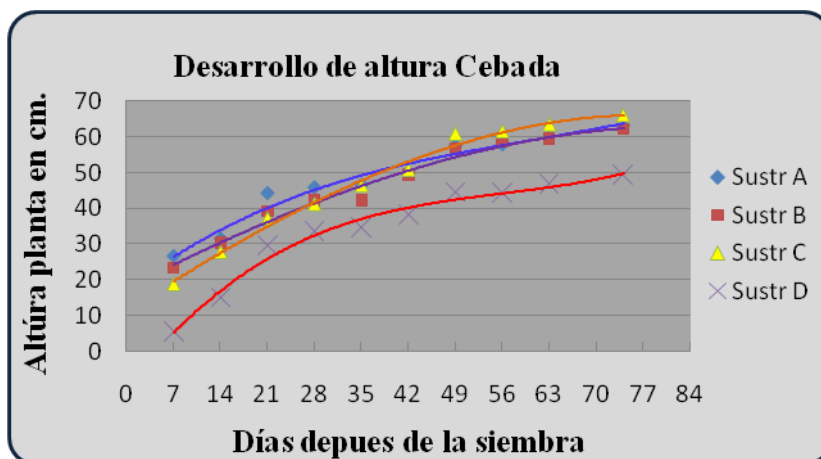


Figura 2. Secuencia del desarrollo de la altura durante el ensayo.

En la figura 2 se observa el comportamiento que tuvo el desarrollo de la altura planta tomando como fuente de variación solo a los sustratos, se observa que el comportamiento es similar especialmente en los sustratos A, B y C los cuales están muy estrechamente relacionados en cada evaluación hecha. En cuanto al sustrato D fue la que tuvo un menor desarrollo de altura en todo el ciclo del cultivo, la mayor aproximación que tuvo fue a los 21 días donde alcanzó 29.5 cm. de altura, en cuanto al ritmo de desarrollo se puede observar que fue más o menos constante y lento, a juzgar por la pendiente que tienen.

Black (1975), menciona que el crecimiento vegetal está relacionado con la composición granulométrica de los suelos y una de las formas en que afecta al crecimiento en las plantas es por su influencia en el suministro de agua donde el suministro es mayor en los suelos de textura moderadamente fina que en los de textura gruesa. La segunda condición que varía según la textura es el suministro de nitrógeno.

#### Área foliar cebada.

Cuadro 3. Análisis de varianza al finalizar el ensayo de la variable área foliar.

FV	DF	SC	CM	F Valué	Pr > F
Sustr.	3	0.1551	0.0517	4.07	0.0328
Error	12	0.1522	0.0127		

De acuerdo al análisis de varianza del área foliar en la cebada se puede observar que las diferencias entre sustratos fueron significativas lo cual permite hacer una comparación estadística entre ellas y determinar cuál fue el que tuvo mayor desarrollo en la siguiente figura se observan dichas diferencias.

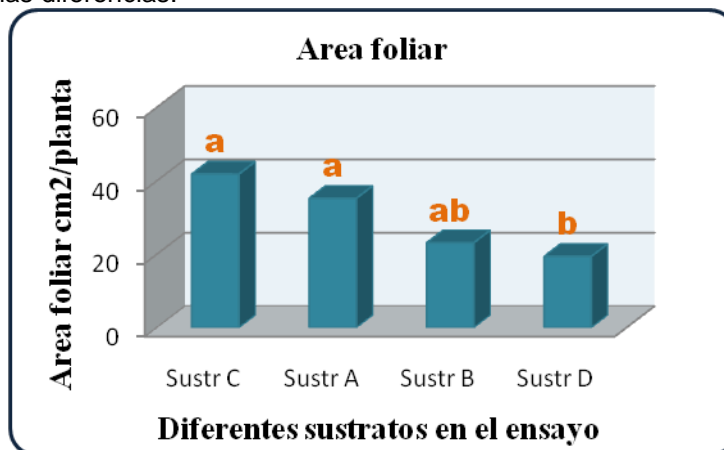
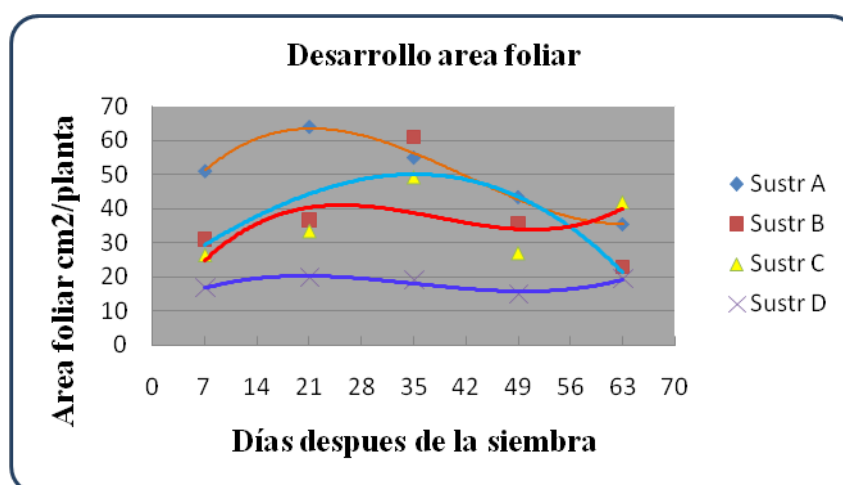


Figura 3. Efecto de sustratos sobre el área foliar en la cebada.

En la figura 3, se puede ver comparativamente los cuatro sustratos propuestos en el ensayo, de las cuales el sustrato C fue la que alcanzo mayor área foliar, seguida del sustrato A con el cual son estadísticamente iguales, como también con el sustrato B pero diferentes y superiores al sustrato D que fue la que alcanzo menor desarrollo en el ensayo.



**Figura 4.** Secuencia de desarrollo del área foliar durante el ensayo.

En la figura 4 se observa el comportamiento del desarrollo del área foliar en todo el tiempo que duro el ensayo, se observa que en un inicio hasta los 21 días, el desarrollo de área foliar fue en ascenso en todos los sustratos pero posteriormente los sustratos A y D tuvieron un descenso en el área foliar, más drástico en el sustrato A y estrepitoso de tal manera que no pudo recuperarse y paso de ser del más desarrollado a ser segundo.

La nutrición de las plantas depende en gran manera de las condiciones de aireación (Fuentes, 2004), una compactación del trae como consecuencia muchas desventajas para el desarrollo de la plantas trayendo en si muchos efectos como la reducción del crecimiento de las raíces, disminución de la porosidad afectando así al drenaje del suelo y por ultimo afecta también la aireación (Gratacos, 2004).

#### Altura planta *Brachiaria*.

**Cuadro 4.** Análisis de varianza para la variable altura planta.

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	6	191.235	31.8725	3.24	0.0557
Error	9	88.585	9.84277		
Blq	3	44.265	14.755	1.50	0.2799
Sustr	3	146.97	48.99	4.98	0.0264

El análisis de varianza (ANVA) para la variable altura de planta, muestra que existen diferencias significativas entre sustratos donde la probabilidad de F resultado ser menor a 0.05 rango de probabilidad límite. Esta diferencia significativa responde al efecto del ambiente sobre la especie, Greulach y Edison (1970), mencionan que la influencia del medio ambiente sobre el crecimiento de las plantas es de gran interés e importancia en la agricultura y que la misma afecta al crecimiento de las plantas tanto en la tasa de crecimiento como en el tipo de desarrollo, también determina donde pueden sobrevivir y crecer con ciertas potencialidades hereditarias, afectando por tanto la distribución geográfica de las plantas.

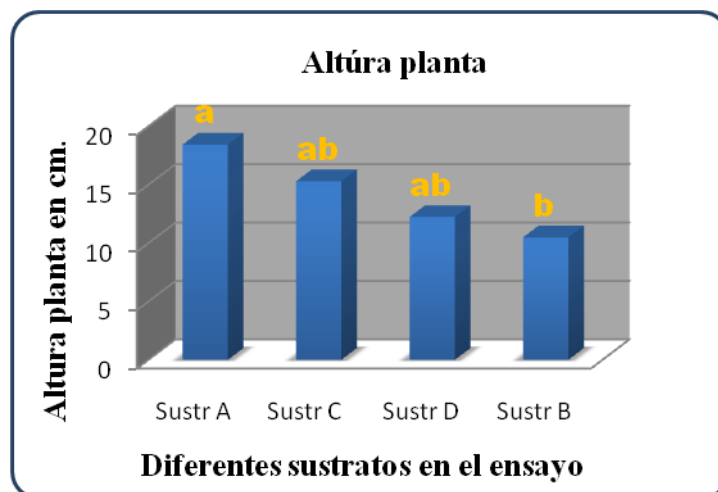


Figura 5. Efecto de sustratos sobre la altura planta en *Brachiaria decumbens*.

En la figura 5 y 6, se observa las diferencias de altura que existen entre sustratos, siendo A igual a C y D pero superior y diferente de B que la misma resultado ser igual a C y D estos resultados a pesar de ser diferentes y haber uno superior a las demás no alcanzaron ni el tercio de todo su potencial reportado que es de 90 a 150 cm. de altura, la causa, más probable de estos resultados obtenidos fue la temperatura que desfavoreció a la *Brachiaria decumbens*, según los datos obtenidos del SENAMHI la temperatura fluctuó en promedio de 16.25 °C a 23.7 °C siendo que la *Brachiaria decumbens* según Ndikumana y Leeuw (1996), necesita de 30 a 35 °C de temperatura para un desarrollo óptimo, aunque ([www.tropicalforages.info](http://www.tropicalforages.info)), expone que *Brachiaria decumbens* puede desarrollar a temperaturas superiores a 19 °C como temperatura mínima.

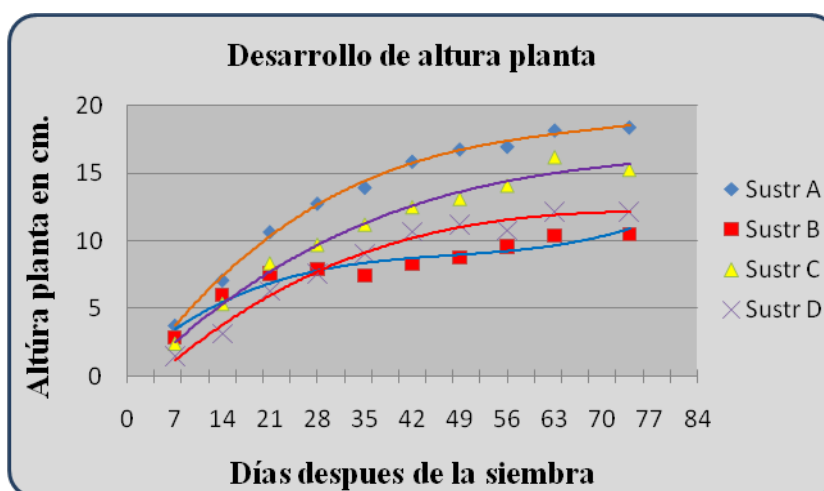


Figura 6. Secuencia de desarrollo de la altura planta durante el ensayo.

Meyer *et al.*, (1970), menciona que el desarrollo y las reacciones de un organismo resultan de la interacción coordinada de los factores hereditarios y de las condiciones ambientales sobre los procesos fisiológicos internos de ese organismo. Y que los estadios intermedios entre la constitución genética y los factores ambientales, por una parte, y la reacción o desarrollo del organismo, por la otra son amplios y complicados.

#### Peso foliar *Brachiaria*.

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable Peso foliar

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Sustr.	3	0.1339	0.04463	5.70	0.0116

Error	12	0.0939	0.0078		
-------	----	--------	--------	--	--

En el cuadro de análisis de varianza se observa que la probabilidad de F es menor 0.05 por lo que deducimos que la diferencia de peso foliar es significativa entre los sustratos evaluados en el ensayo, por lo cual se puede realizar la comparación correspondiente de los valores obtenidos en cada uno de ellos.

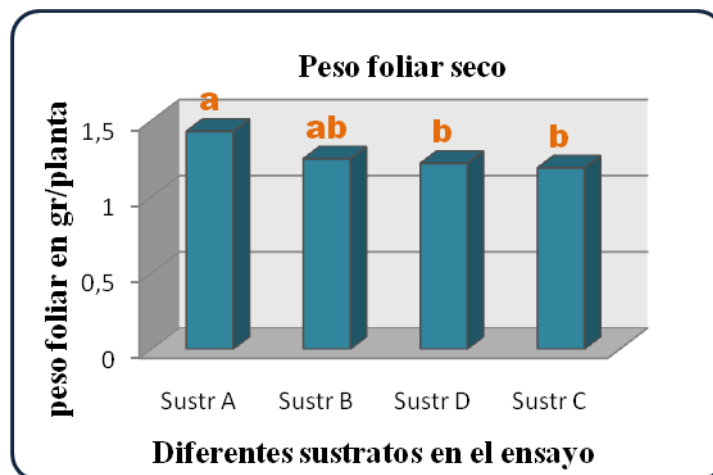


Figura 7. Efecto de sustratos sobre el peso foliar.

En la figura 7 se observa las diferencias existentes entre los sustratos, donde el sustrato A compuesta de tres porciones de limo y una de arcilla resulto ser superior a los sustratos D compuesto de solo arcilla y C compuesto de una porción de limo y una de arcilla, pero también fue igual estadísticamente al sustrato B compuesta de dos porciones de limo y una de arcilla.

Cuando hablamos de crecimiento, hablamos de un aumento en la masa de un organismo el cual es resultado de la formación de nuevas células y del aumento de peso de la masa seca del mismo, es por eso que en estudios de crecimiento, usualmente son de desear datos cuantitativos, de manera que se obtienen mediciones de incremento en talla, peso seco o peso fresco (Hunt, 1982 citado por Rincon, *etal.*, 2007).

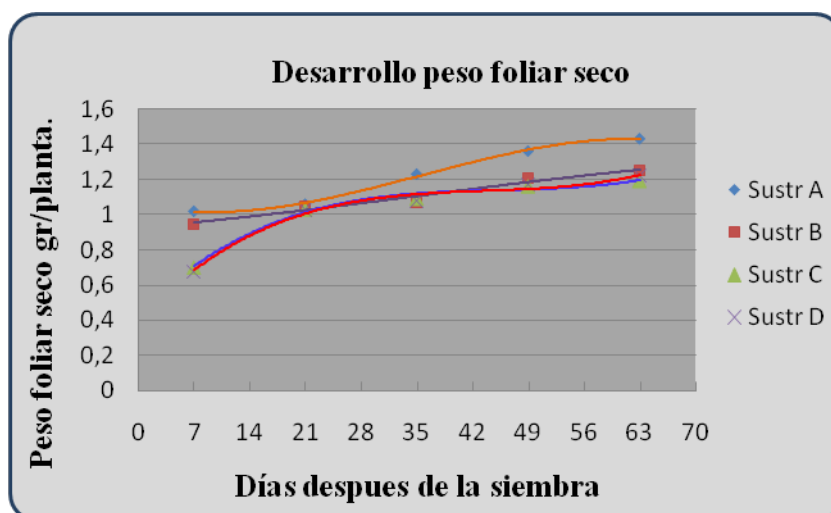


Figura 8.- Secuencia de desarrollo del peso foliar durante el ensayo.

En la figura 8, se observa el comportamiento y la respuesta de los sustratos en el desarrollo del peso foliar, se aprecia un comportamiento similar en los sustratos C y D tanto que una se sobrepone a la otra, al mismo tiempo estos dos tratamientos presentan los valores más bajos de peso foliar seco al finalizar el ensayo, también presentan coincidencias con los demás sustratos tanto así, que a los 21 días el peso foliar es igual en todos los sustratos y a los 35

días lo es en los sustratos B, C y D solamente.

El sustrato A empezó a tener un incremento más acelerado con respecto a los demás sustratos, a partir del día 21 fue superior a los demás. Está claro que la composición granulométrica de cada sustrato influyo en esta variable, pero no lo hizo de una manera tan drástica incluso tomando en cuenta la concentración de arcilla ya que los sustratos B, C y D resultaron ser casi iguales y las mismas tienen altas concentraciones de arcilla.

### Peso raíz *Brachiaria*.

**Cuadro 6.** Análisis de varianza para la variable peso raíz.

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	6	0.1953	0.03255	4.42	0.0233
Error	9	0.0662	0.00736		
Blq	3	0.0374	0.01246	1.69	0.2373
sustr	3	0.1579	0.05264	7.16	0.0093

De acuerdo al análisis de varianza la diferencia de peso seco raíz entre los sustratos fue altamente significativo, lo cual permite hacer una comparación de medias entre ellos y determinar cuál fue el sustrato que tuvo un mayor desarrollo de peso seco raíz al fin del ensayo. a continuación se presenta la figura que expone las diferencias de peso raíz en los diferentes sustratos.

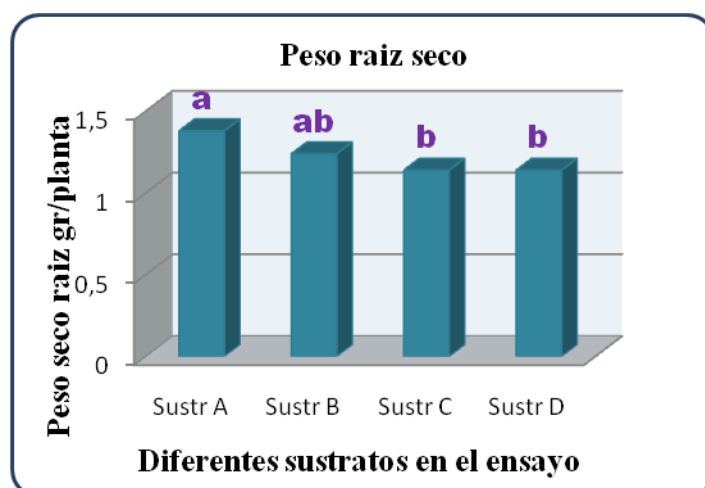
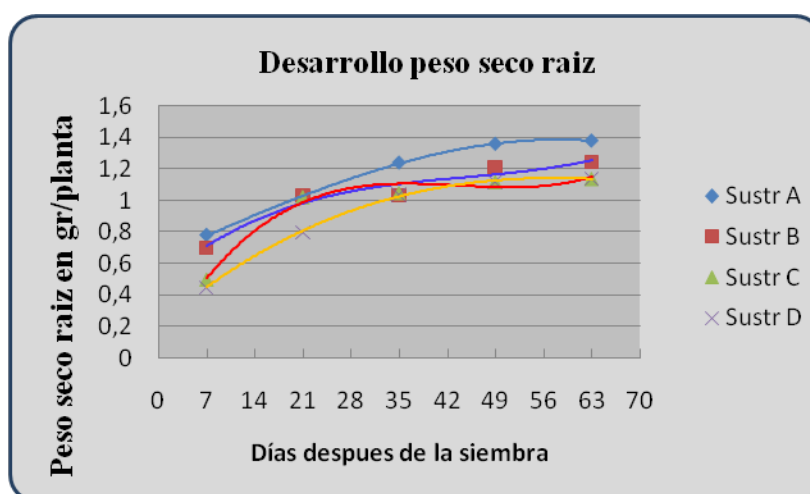


Figura 9. Efecto de los sustratos sobre el peso seco raíz.

En la figura 9 se observa al sustrato A que tuvo mayor desarrollo del peso seco raíz, que llegó alrededor de 1.43 gramos por planta, seguida por el sustrato B con el cual fueron estadísticamente iguales, se observa también que el efecto de los sustratos sobre el peso seco de la raíz en *Brachiaria* es igual en B, C y D estadísticamente, lo cual manifiesta que los componentes de cada uno de ellos no influyeron significativamente.

Una vez más parece ser que la temperatura fue un factor preponderante sobre *Brachiaria decumbens*, especie tropical donde el suelo está más cubierto por vegetación, las temperaturas y la humedad son más altas. Velarde (1981), menciona que la temperatura del suelo tiene efectos indirectos a través de su influencia, sobre el crecimiento de las raíces y posiblemente

sobre la actividad sintetizadora de estas. Diferencias locales en la temperatura del suelo afectan también el crecimiento y distribución de las plantas y por ende afectan también el establecimiento y población del tipo de vegetación.



**Figura 10.-** Secuencia de desarrollo del peso seco raíz durante el ensayo.

La figura 10 describe el desarrollo que tuvo peso seco raíz en un ciclo de 63 días, se puede observar que en general el ritmo de desarrollo del peso fue lento, pero de forma más detallada el sustrato C tuvo un acelerado incremento de peso hasta los 21 días donde incluso pudo igualar los valores de los sustratos A y B que habían sido superiores anteriormente, pero luego tuvo un mínimo incremento hasta finalizar el ensayo.

El sustrato A tuvo un desarrollo más regular con un ritmo casi constante y que a partir de los 21 días llegó a ser superior a los demás sustratos, curiosamente también presenta un paralelismo con el sustrato D si observamos la figura, el sustrato B es el único que tuvo un bajón en el peso seco raíz, esto se observó a los 35 días.

### Área foliar *Brachiaria*.

**Cuadro 7.** Análisis de varianza al finalizar el ensayo para la variable área foliar.

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	6	125.05	20.8418	2.92	0.0723
Error	9	64.020	7.13383		
Blq	3	24.338	8.11287	1.14	0.3852
Sustr	3	100.712	33.5708	4.71	0.0306

El cuadro de análisis de varianza para el área foliar en la *Brachiaria* indica que existieron diferencias significativas entre sustratos, lo cual indica que puede hacerse una comparación estadística y determinar cuál fue el mejor sustrato en desarrollar el área foliar, en el siguiente cuadro se aprecian dichas diferencias entre sustratos.

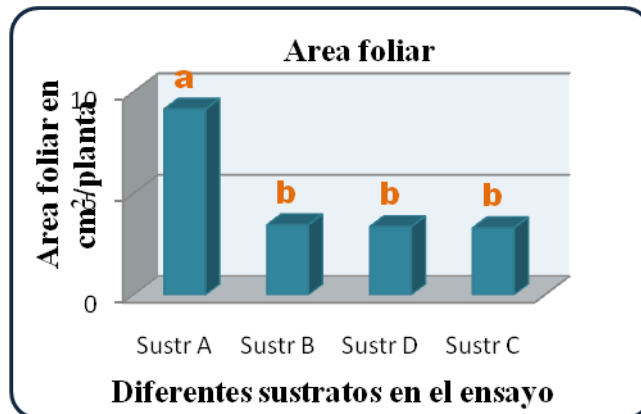


Figura 11. Efecto de sustratos sobre el área foliar en *Brachiaria*.

En la figura 11 se observa las diferencias de área foliar entre sustratos, el sustrato A fue superior a las demás con una considerable amplitud y estadísticamente diferente, en cambio los sustratos B, C y D resultaron ser iguales lo que indica que los factores que afectaron la variable fueron las mismas.

Es notorio que entre los factores más importantes que influyen en el área foliar y desarrollo de las hojas, esta la radiación solar tanto que la magnitud en el aumento o disminución en la luz directa y en su intensidad influyen la respuesta de las especies (Fletcher et al. 1987), en términos de su tasa de crecimiento, ángulo de inclinación, área foliar, succulencia y dureza de las hojas son las que influyen (Chazdon et al. 1987).

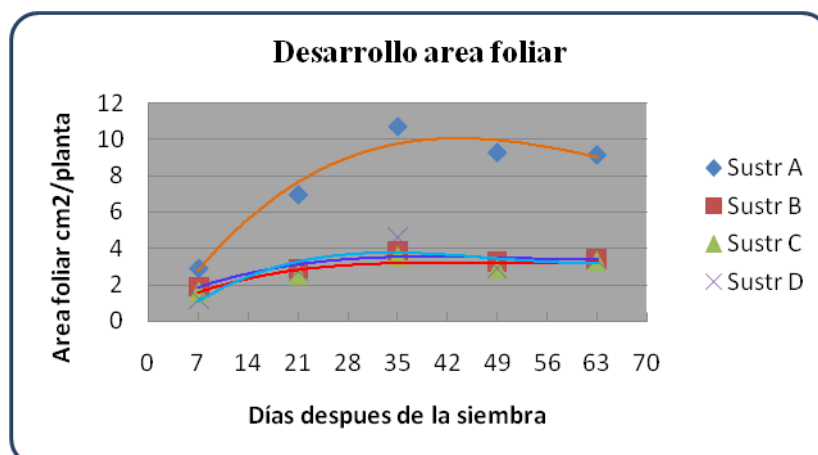


Figura 12. Secuencia de desarrollo del área foliar durante el ensayo.

En la figura 12 podemos observar el desarrollo del área foliar que tuvo *Brachiaria decumbens*. a lo largo de todo el tiempo transcurrido en el ensayo, en la figura se aprecia características muy interesantes con respecto a esta variable, tal es el caso del similar comportamiento y ritmo de desarrollo que tuvieron los sustratos B, C y D, que fue mínimo de tal manera que permaneció casi constante. En cambio el sustrato A tubo un incremento acelerado de área foliar hasta los 35 días, después de la cual fue decreciendo levemente y en ningún momento dejo de ser superior.

#### Número de esporas *Brachiaria*.

Cuadro 8. Análisis de varianza al final del ensayo para la variable esporas.

FV	DF	SC	CM	F Value	Pr > F
Model	6	21248.5	3541.42	24.28	0.0001
Error	9	1312.5	145.833		
Blq	3	1393.0	464.33	3.18	0.0774
Sustr	3	19855.5	6618.5	45.38	0.0001

El análisis de varianza muestra claramente que la diferencia del número de esporas entre sustratos es altamente significativo y permite hacer una comparación estadística de las medias para determinar cuál de ellas fue la que reporto mayor número de esporas, a continuación en la figura se presenta dicha comparación y sus diferencias estadísticas.

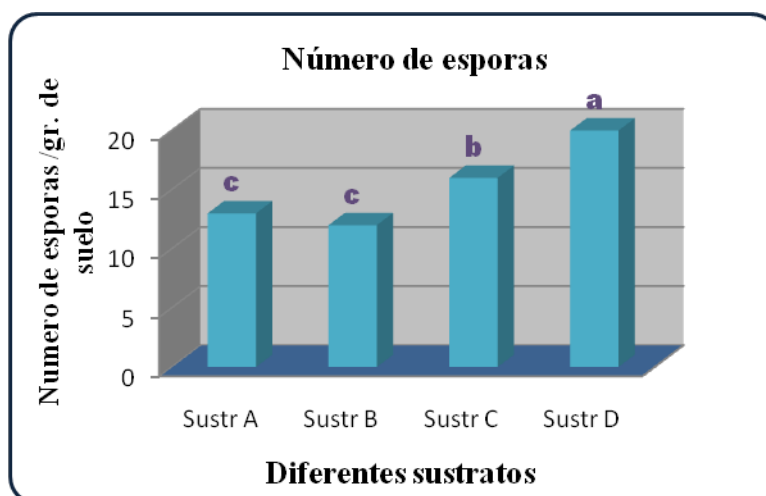


Figura 13.- Efecto de sustratos sobre número de esporas en *Brachiaria*.

En la figura 13 se observa las diferencias estadísticas entre los sustratos en cuanto al número de esporas, de las cuales el sustrato D fue la que reporto mayor número de esporas ante los demás sustratos, seguida del sustrato C que reporto un número de esporas inferior al sustrato anterior y también fueron estadísticamente diferentes pero al mismo tiempo superior a los sustratos A y B los cuales reportaron una igualdad estadística e inferioridad en el numero de esporas ante los sustratos restantes.

Las condiciones del suelo afectan el crecimiento de la planta e influyen el crecimiento de hongos micorrícicos y su subsecuente infección de la raíz (Flores, 1988). Se debe tomar en cuenta que este está formado por cinco componentes principales; materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. Los factores del suelo que se deben tomar en cuenta para la colonización micorrícica son: el nivel y balance de nutrientes inorgánicos, pH, materia orgánica, textura, humedad y temperatura (Flores, 1988).

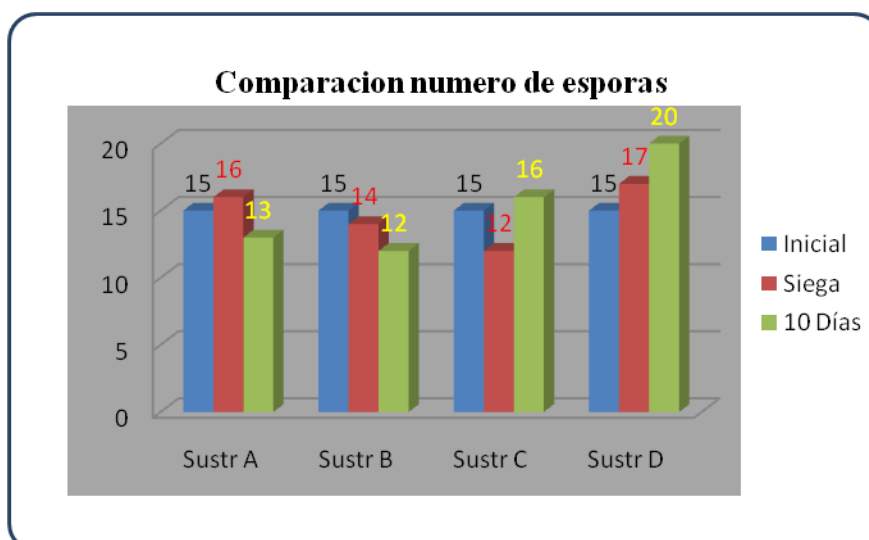


Figura 14.- Número de esporas en distintas etapas propuestas en diferentes sustratos.

La figura 14 expone comparaciones del numero de esporas por etapas, una de inicio 15 esporas por gramo que es la cantidad inoculada de esporas al inicio de la siembra de manera igualitaria por sustratos, A es un sustrato de limo y arcilla en una relación de 3:1, el sustrato B



con una relación de 2:1 el sustrato C con una relación de 1:1 y finalmente el sustrato D que se constituye de arcilla pura.

Las etapas posteriores son la de cosecha donde se hizo el conteo de esporas después de haber segado las especie en estudio (cebada, *Brachiaria*) 74 días después de la siembra y finalmente una última después de 10 días en la que se realizó la siega.

En la figura 14, puede observarse en forma general que los sustratos A y B no lograron superar el número de esporas inicial sino que bajaron a 13 y 12 esporas por gramo respectivamente, los sustratos C y D fueron los únicos sustratos que superaron la cantidad inicial de 15 esporas llegando a 16 y 20 esporas por gramo de suelo aunque el sustrato C fue inferior en el momento de la siega con 12 esporas por gramo.

## CONCLUSIONES

Al evaluar los diferentes sustratos de composición conocida se llegó a determinar que todas son diferentes en su respuesta a los factores a los que estaban sujetos y su efecto sobre las especies de plantas fue influyente tanto en su anatomía y fisiología. En cuanto a la eficacia en la multiplicación de las micorrizas hubo también diferencias entre sustratos y de manera puntual para fines de producción, el sustrato D resulto ser el mejor para la multiplicación de *Glomus sp.* Sin importar que cultivo trampa se use ya sea *Brachiaria* o cebada porque la diferencia entre especies no fue significativa.

En el grado de colonización no hubo quien se destaque entre especies o sustratos ya que no hubo diferencias estadísticas entre estas lo que da una idea de lo aislado que es esta variable con respecto a estos factores, y hubo un promedio de 13.82 % de colonización para sustratos y especies la cual es baja pero no está ligada o correlacionada directamente en la producción de esporas.

En síntesis se observaron diferencias en la esporulación de los sustratos y no así entre especies si bien en base a los reportes de muchos investigadores se esperaba lo contrario, es decir que tuviera más peso la influencia de la especie usada como cultivo trampa que los sustratos.

Finalmente, se apreció que mientras menos adecuado fue el sustrato, para el desarrollo de cada especie de planta usada como cultivo trampa, mejor fue la respuesta de las micorrizas en la producción de esporas, ya que es muy conocido que muchas especies de plantas no prosperan en suelos arcillosos pesados con niveles altos de salinidad tal como ocurrió en el ensayo, mientras aumentaba el nivel de arcilla en los sustratos menor era el desarrollo de las plantas. También se evidenció que la *Brachiaria decumbens* no prospera bien en este ambiente en cuanto a su desarrollo de la planta, pero estiene la misma eficiencia en la producción de esporas respecto a la cebada, lo cual fue el objeto de esta investigación

## Bibliografía consultada

BLANCO, FA; SALAS, E. 1997. Micorrizas en la Agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21(1):55-67.

BLACK, CA. Relaciones suelo planta. Buenos Aires: Hemisferio sur. 1975. 444 p.; 23 cm

CHAZDON, R. 1987. Aspectos importantes para el estudio de los regímenes de luz en bosques tropicales. *Revista de Biología Tropical*. 35:191-196.

FETCHER, N; S. OBERBAUER, G. ROJAS Y B. STRAIN, 1987. Efectos del régimen de luz sobre la fotosíntesis y el crecimiento en plántulas de arboles de un bosque lluvioso tropical de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 35: 97-110.

GRATACOS, E. 2004. EL CULTIVO DEL DURAZNERO *Prunus persica* (L.) Batsch. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Apuntes para la Cátedra de Fruticultura de Hoja Caduca. 108p

GREULACH, V; EDISON, J. Las Plantas, introducción a la botánica moderna. Mexico: LIMUSA-Wiley, 1970. 679 p. ; 23 cm.

HOOKEER, J.E. and D. ATKINSON. 1992. Aplicación de computer-aided image analysis to studies of arbuscular endomycorrhizal fungi effects on plant root system morphology and dynamics. *Agronomie* 12, 821-824.

KRAMER, P. Relaciones hídricas de suelo y planta; una síntesis moderna, México: Edutex, 1974. xvi, 53 p.; 23 cm.

LINDERMANN, R. E.; J. W. HENDRIX. "Evaluation of plant response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. A. Host variables". En *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*; USA, The American Phytopathological Society, 1982. 175-187.

LINDERMAN, R.G. 1993. Effects of microbial interactions in the mycorrhizosphere of plant growth and health. *In*: R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero Lizaola (Eds.), *Agroecología, Sostenibilidad y Educación*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. pp 138-151.

MEYER, B; ANDERSON, D. introducción a la fisiología vegetal Buenos Aires: EUDEBA, 1970; 579 p.; 22 cm.

[www.tropicalforages.info/.../Brachiaria\\_decumbens.htm](http://www.tropicalforages.info/.../Brachiaria_decumbens.htm) Consultado 21 abr. 2007

## **Evaluación de las interacciones benéficas de bacterias y hongos en cultivos de cebolla y haba**

Responsable: Maria Juana Alvarez, Edson Meneses y Noel Ortuño

Con el fin de evaluar la efectividad agrobiológica de bacterias del género *Bacillus* y *Rhizobium*, y de los hongos de los géneros *Trichoderma* y *Glomus*, solos y combinados sobre el crecimiento de plantas de cebolla y haba, se estableció el siguiente ensayo.

### **Metodología**

Se evalúa 5 microorganismos proporcionados por la fundación PROINPA:

- *Bacillus Subtilis* (Bs)
- *Bacillus amylolequefaciens* (Ba)
- *Rhizobium* (R)
- *Trichoderma* (T)
- *Glomus* (M)

Con las siguientes combinaciones:

- M + Bs
- M + T
- M + R
- M + Ba
- M + Bs + T
- M + Bs + R
- M + Bs + Ba
- M + Bs + T + R
- M + Bs + T + Ba
- M + Bs + R + Ba

Haciendo por tanto 15 tratamientos cada una con diez repeticiones tanto en el cultivo de haba como para la cebolla. Formando un número de 150 plantas de cebolla y 150 de haba, con un total 300 plantas.

#### **Preparación de masetas.**

Se utiliza como sustrato tierra vegetal y lama (1:1) y se colocarán en masetas de 2 Kg de capacidad, los cuales son instalados en viveros de la fundación PROINPA.

#### **Inoculación.**

Se procede a mezclar los biofertilizantes con el sustrato con las siguientes dosis:

<b>Microorganismo</b>	<b>g/m<sup>2</sup></b>
<i>Bacillus amylolequefaciens</i>	5
<i>Bacillus subtilis</i>	5
<i>Glomus sp.</i>	2
<i>Rhizobium</i>	2
<i>Trichoderma sp.</i>	20

#### **Siembra.**

*Cebolla:* Se seleccionó las plántulas por tamaño uniforme de la variedad Century para lograr la mayor homogeneidad posible, luego se colocaron en número de dos plántulas por maceta. Después se elimina la plántula más débil.

*Haba:* Las semillas se sumergieron en un recipiente con agua, por el lapso de dos días, para favorecer su germinación, luego se colocó dos semillas por maceta de la variedad Gigante Copacabana, para luego eliminar la planta menos vigorosa.

**Riego:** Se regaron con una frecuencia de dos a tres veces por semana según requerimiento, tendiendo el cuidado de no inundarlas ya que podrían ocasionar pudrición y hasta favorecer la aparición de enfermedades.

## **EVALUACIÓN.**

Efecto sobre el desarrollo del cultivo de haba y cebolla. Estas variables se miden una vez por semana y son:

- Altura de plantas (cebolla y haba): Se midió en centímetros, con una regla graduada. En el caso de la cebolla se mide desde el cuello del bulbo hasta la punta de la hoja más larga, en el haba se considerará la altura del tallo.
- Número de ramas en haba.
- Número de hojas en cebolla.
- Floración en haba: se cuenta el número de flores por planta.
- Número flores cuajadas en haba.
- Incidencia de enfermedades: Las enfermedades tanto foliares como en la raíz se evalúa por el número de plantas en la que se ven presentes, luego, se obtiene el porcentaje de las plantas enfermas.

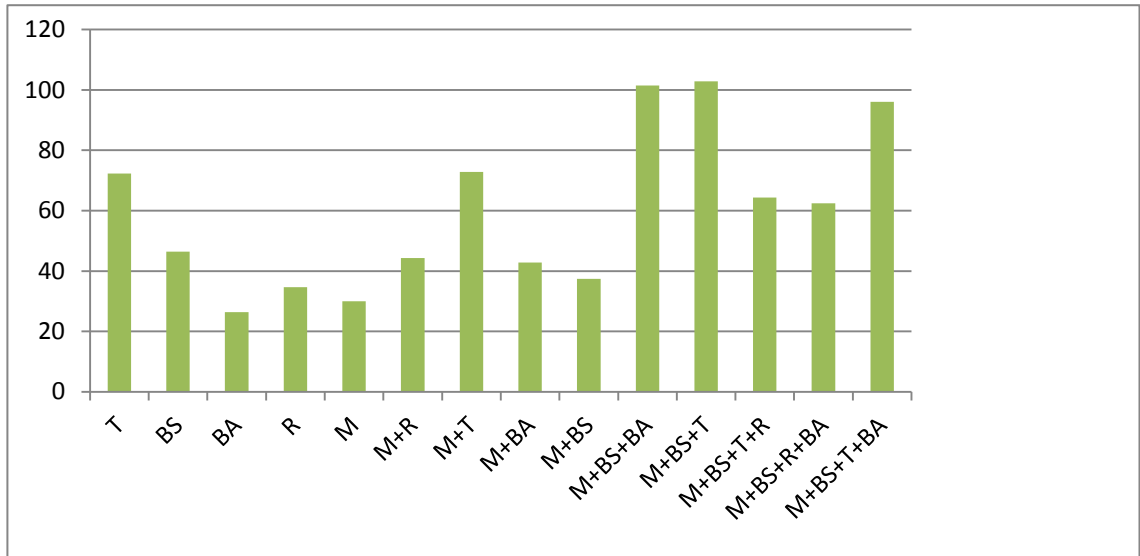
Determinar efectos de simbiosis de bacterias y hongos sobre el rendimiento de plantas de cebolla y haba.

Esto se realizará una vez cosechadas las plantas.

- Peso materia fresca: Con ayuda de una balanza de precisión.
- Peso materia seca: Se llevó a una cámara de secado durante 48 horas y con una temperatura de 121° C.
- Porcentaje de humedad: Ya teniendo los datos de peso de materia fresca como de materia seca, se obtiene el porcentaje de humedad mediante la diferencia.
- Largo de raíz: Con ayuda de una regla graduada.
- Volumen de raíz: Por desplazamiento de agua por las raíces se determina el volumen radical. Para eso se utiliza una probeta graduada.
- Peso de raíz: Al igual que con la materia fresca.
- Rendimiento: se determina una vez que el cultivo complete su ciclo vegetativo.

## **RESULTADOS EN EL RENDIMIENTO**

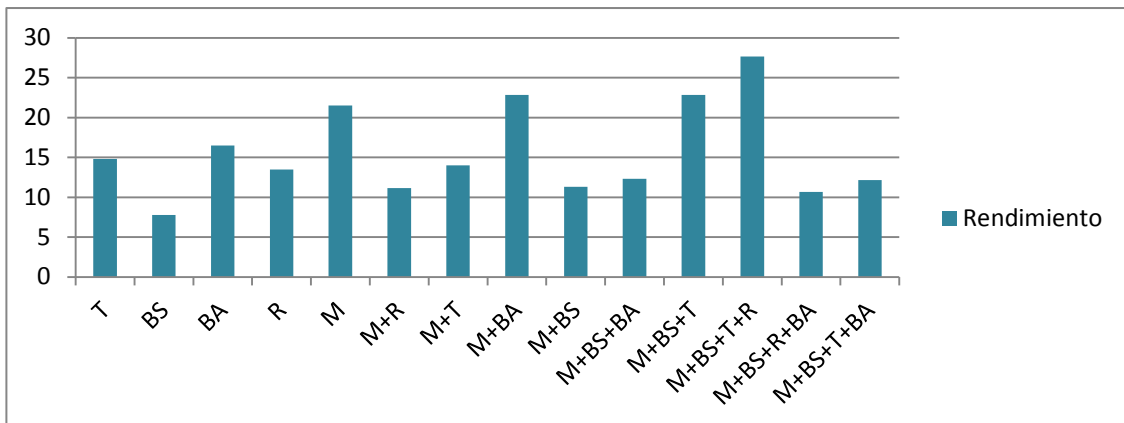
### **Rendimiento en plantas de cebolla**



**Figura 1.** Efecto de microorganismos solos y en interacción sobre los rendimientos del cultivo de cebolla, en invernadero.

Se observó que la interacción de micorrizas, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*, muestra una interacción positiva y la posibilidad de hacer formulaciones comerciales entre estos microorganismos.

#### Rendimiento en plantas de haba



**Figura 2.** Efecto de microorganismos solos y en interacción en los rendimientos del cultivo de de haba, en invernadero.

En el cultivo de haba se observa combinaciones positivas como las micorrizas, *B. subtilis*, *Trichoderma* y rizobias, lo cual genera una posibilidad de realizar formulaciones a escalas mayores entre estos cuatro microorganismos, considerando las cepas que fueron utilizadas en este estudio.

#### Interacción de roca fosfórica con hongos y bacterias promotoras de crecimiento y solubilizadoras de crecimiento

Responsable: Noel Ortuño  
Equipo técnico:

## **Instituciones colaboradoras o socias:**

### **Compendio:**

Se evaluaron tres microorganismos Micorriza (M.A.), *Bacillus subtilis* y *Trichoderma sp.* como solubilizadores de Fósforo de la roca fosfórica en la producción de cebolla orgánica en la localidad de El Paso. Siendo el mejor la combinación de los tres microorganismos con la roca fosfórica. El diámetro del bulbo de la cebolla en suelo no esterilizado y esterilizado no tubo diferencias.

**Palabras claves:** Micorriza (M.A.), *Bacillus subtilis*, *Trichoderma sp.*, solubilizadores de Fósforo, roca fosfórica

### **144. Objetivos:**

- Evaluar los efectos de los microorganismos solubilizadores de Fósforo de la roca fosfórica en la producción de cebolla orgánica en la localidad de El Paso.
- Analizar la relación de microorganismos solubilizadores de Fósforo y el rendimiento del cultivo de cebolla en condiciones de invernadero.
- Evaluar el crecimiento de las plantas de cebolla en presencia de microorganismos solubilizadores de Fósforo.

### **145. Hipótesis**

Todos los microorganismos solubilizadores de Fósforo de la roca fosfórica presentan el mismo efecto en la producción de cebolla orgánica.

### **146. Revisión de literatura**

Debido a la importancia del fósforo como uno de los elementos esenciales en el cultivo de la cebolla, ya que este está relacionado con la calidad del bulbo, resistencia al transporte y mejor conservación, es que se realizó la debida prueba con microorganismos que solubilicen el fósforo en el suelo

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander 1980). Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg kg<sup>-1</sup>. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez & Fraga 1999).

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Peix *et al.* 2001). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer & Schinner 1992).

Ahora bien, los grupos microbianos capaces de solubilizar el fósforo edáfico son varios y entre ellos los de mayor relevancia son los hongos muchos de los cuales son patógenos como el *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sclerotium*. Un segundo grupo lo constituyen los *Actinomycetes* grandes productores de sustancias antibióticas y las bacterias entre las que podemos mencionar a *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Oviedo e Iglesias, 2005).

Por tanto es importante realizar evaluaciones con bacterias del género *Bacillus*, las cuales son bacterias con potencial para solubilizar fósforo y también con estructuras de resistencia a las condiciones ambientales adversas.

## 147. Materiales y métodos

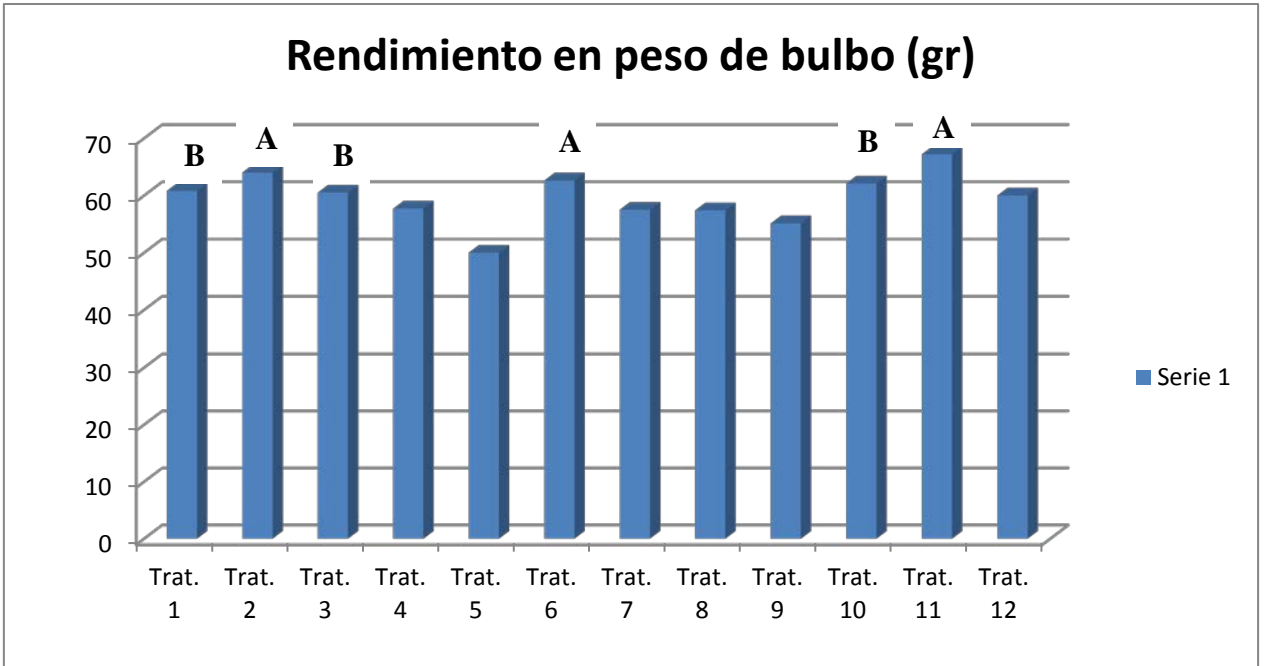
### TRATAMIENTOS.

- Trt 1 = SE + Micorriza (M.A.)  
Trt 2 = SE + Bacillus subtilis  
Trt 3 = SE + Roca Fosfórica  
Trt 4 = SE + Trichoderma sp.  
Trt 5 = SE + M.A. + Roca Fosfórica  
Trt 6 = SE + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 7 = SE + Trichoderma sp. + Roca fosfórica  
Trt 8 = SE + Trichoderma sp. + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 9 = SE + M.A. + Trichoderma sp. + Roca fosfórica  
Trt 10 = SE + M.A. + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 11 = SE + M.A. + Bacillus subtilis + Trichoderma sp. + Roca fosfórica  
Trt 12 = SE + Testigo agricultor
- Trt 1 = SN + Micorriza (M.A.)  
Trt 2 = SN + Bacillus subtilis  
Trt 3 = SN + Roca fosfórica  
Trt 4 = SN + Trichoderma sp.  
Trt 5 = SN + M.A. + Roca fosfórica  
Trt 6 = SN + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 7 = SN + Trichoderma sp. + Roca fosfórica  
Trt 8 = SN + Trichoderma sp. + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 9 = SN + M.A. + Trichoderma sp. + Roca fosfórica  
Trt 10 = SN + M.A. + Bacillus subtilis + Roca fosfórica  
Trt 11 = SN + M.A. + Bacillus subtilis + Trichoderma sp. + Roca fosfórica.  
Trt 12 = SN + Testigo agricultor.

### Variables de respuesta.

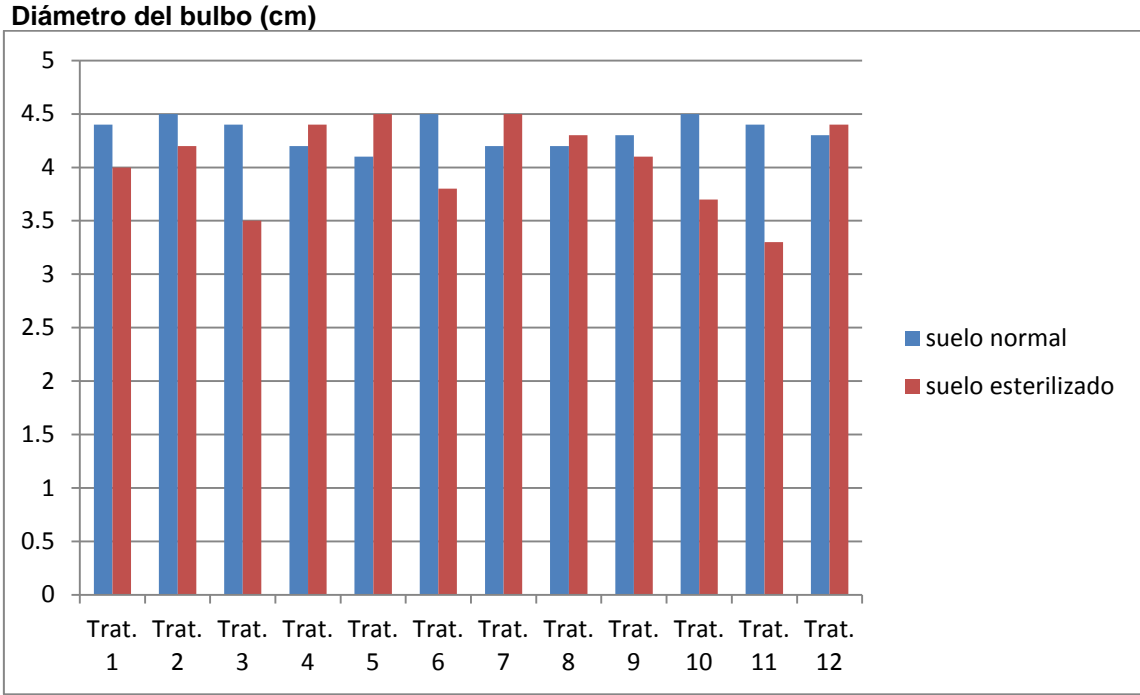
1. Porcentaje de prendimiento.
2. Altura de planta DDT
3. Número de hojas DDT.
4. Longitud de raíz.
5. Materia seca verde.
6. Número de catafilas.
7. Volumen de raíz.
8. Materia seca raíz.
9. Diámetro del cuello falso DDT.
10. Rendimientos por calibre y total.
11. Peso del bulbo.
12. Diámetro del bulbo.
13. Colonización de micorrizas en raíz.
14. Número de esporas por gramo de micorrizas.
15. Análisis de suelo Antes y después.
16. Microflora y microfauna del suelo antes de la cosecha.

### Resultados



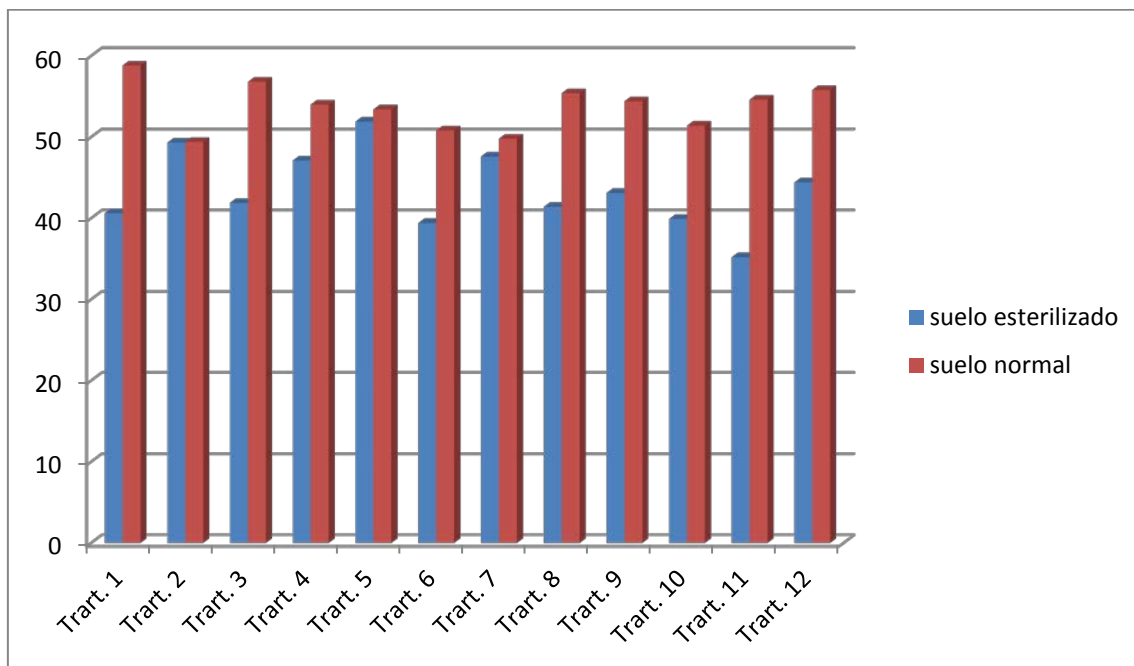
Para el rendimiento en peso de bulbo de la cebolla en suelo no esterilizado, se observa que los tratamientos 2, 6 y 11 son los que mejor respondieron, debiéndose a la presencia del *Bacillus subtilis* presente en los dos tratamientos en cuanto al tratamiento 11 que respondió mucho mejor fue una combinación de los cuatro microorganismos.

Para el rendimiento en peso de bulbo de la cebolla en suelo esterilizado, hay marcadas diferencias en relación del suelo normal, pero que los tratamientos que mejor respondieron fueron el 4, 5, 1 y 7 de los cuales el 7 es el mejor ya que usamos *Trichoderma sp.*, y roca fosfórica.





Para el diámetro del bulbo de la cebolla en suelo no esterilizado y esterilizado no hubo diferencias por que los valores significativos en suelo normal son 2, 6 y 10 en cambio en el otro son el 5 y 7.



Para la altura de la planta a 77 días del transplante que se vio que a esta etapa la altura crece su máximo que luego ya es constante por lo que se ve la clara diferencia en cuanto al suelo normal alcanzó alturas superiores en relación del esterilizado, siendo los mejores tratamientos 1, 3 y 8.

#### 148. Conclusiones

Los mejores tratamientos para el rendimiento en peso de bulbo de la cebolla en suelo no esterilizado fueron el 2, 6 y 11.

El mejor de los tratamientos en suelo esterilizado fue el 11 por contener la combinación de los cuatro microorganismos.

Los microorganismos en suelo no esterilizado se comportan diferente comparado a un suelo esterilizado. Los mejores tratamientos resultaron ser el 4, 5, 1, y 7.

El mejor de los tratamientos en suelo no esterilizado fue el 7 atribuyendo al uso de *Trichoderma sp.*, y roca fosfórica.

El diámetro del bulbo de la cebolla en suelo no esterilizado y esterilizado no tubo diferencias.

Los mejores tratamientos para altura de la planta resultaron ser el 1, 3, y 8.

#### 149. Recomendaciones

Se recomienda la evaluación en campo de los mejores tratamientos.

#### 150. Bibliografía consultada

Alexander M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. (En: Introducción a la microbiología del suelo). AGT editor, México, p.: 355-371. 491 p.

Illmer P, Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol. Biochem. 24:389-395.

Oviedo, M., E. Iglesias, 2005. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Universidad Nacional del nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Peix A, Rivas-Boyer A A, Mateos P F, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velazquez E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol. Biochem. 33:103-110.

Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 17:319-339.

## **EVALUACION DE MICROORGANISMOS QUE FAVOREZCAN LA FORMAS DE SOLUBILIZAR LA ROCA FOSFÓRICA CON MICROORGANISMOS EN CEBOLLA**

**Responsables: Oliver Bolaños, Noel Ortuño**

### **INTRODUCCION**

El cultivo de la cebolla requiere de temperaturas entre 18 y 35°C, lográndose los mejores rendimientos donde estas condiciones no superan los 26°C. Requiere de clima seco y mucha insolación, es relativamente resistente a la sequía, sin embargo no deberá faltar agua en las fases de germinación y desarrollo de raíces y bulbos.

El fosfato es crítico durante la etapa inicial de crecimiento y después de la emergencia de las primeras hojas verdaderas, como pro motor de un adecuado desarrollo radical .

Se encontró que la fertilización fosfórica en cebollas plantadas en suelos salinizados tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento y la nutrición.

### **METODOLOGIA**

El presente estudio se llevó a cabo en instalaciones de la Fundación PROINPA, en la zona del paso en un invernadero en la ciudad de Cochabamba. El suelos mostró una textura franco arenosa, con un porcentaje de fósforo bajo.

En las unidades experimentales se utilizó cebolla blanca (*Allium cepa* L.) las cebollas fueron transplantadas en macetas individuales. Los tratamientos fueron constituidos por la combinación de microorganismos (bacterias, hongos) y roca fosfórica como fuente de fosforo fueron 18 tratamientos y con 10 repeticiones, distribuidos al azar en un diseño estadístico de completamente aleatorio.

### **TRATAMIENTOS**

T1 – Solo suelo(testigo), T2 – Roca fosforica (RF), T3 – Ba +RF, T4 – Bs + RF, T5 – Bt +RF, T6 – Ba + Bs + RF, T7 – Ba + Bt + RF, T8 - Bs + Bt + RF, T9 – Bs + Bt +Ba +RF, T10 – Suelo + microriza (MI), T11 – RF + Mi, T12 – Ba + RF + Mi, T13 – Bs + RF + Mi,

T14 - Bt + RF + Mi, T15 – Ba + Bs +RF + Mi, T16 - Ba + Bt + RF +Mi, T17 - Bs + Bt + RF +Mi, T18 - Bs + Bt +Ba +RF + Mi

### VARIABLES DE RESPUESTA

Altura de planta, número y peso (fresco y seco) de hojas, largo y volumen de raíz, peso bulbo (fresco y seco), diámetro bulbo, volumen de bulbo, altura de planta.

### RESULTADOS

Cuadro 1. Efecto de tratamiento sobre el bulbo y la raíz de plantas de cebolla.

Tratamiento	Diámetro Bulbo	Largo de raíz	Peso bulbo
1	5.4	20	77.68
2	5.6	22.2	85.3
3	5.8	25.3	99.8
4	6.4	21.2	115.9
5	5.7	17.9	89.77
6	5.8	24	95.1
7	6.2	24	115.25
8	6.3	23.4	115.1
9	6	20.3	102
10	5.8	22.1	94.3
11	6.4	26.3	116.50
12	5.7	29	91
13	6.1	24.2	95.8
14	5.4	21	102.6
15	6.1	24.5	108.1
16	5.9	23.5	96
17	6.3	21.6	117.8
18	6.6	28	120.6

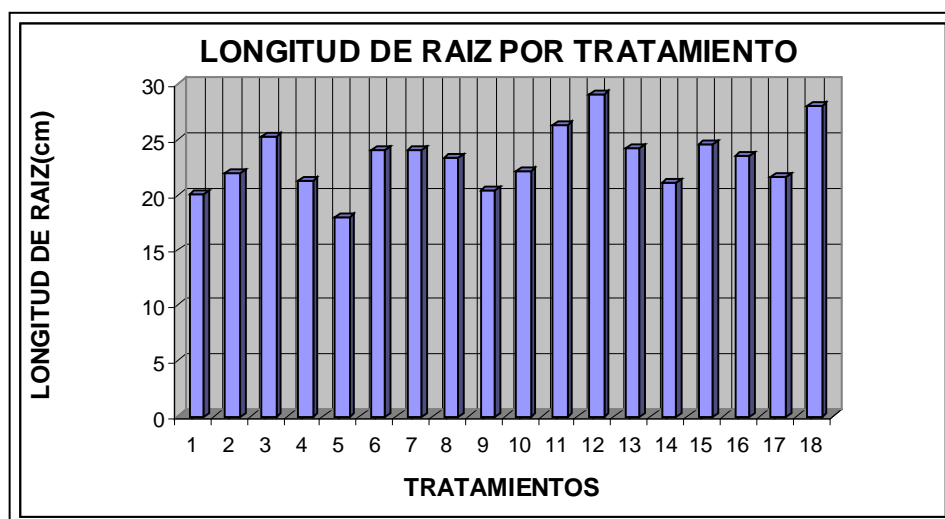


Figura 1. Efecto de la interacción de *Bacillus* y micorrizas sobre el desarrollo de la raíz en cultivo de cebolla.

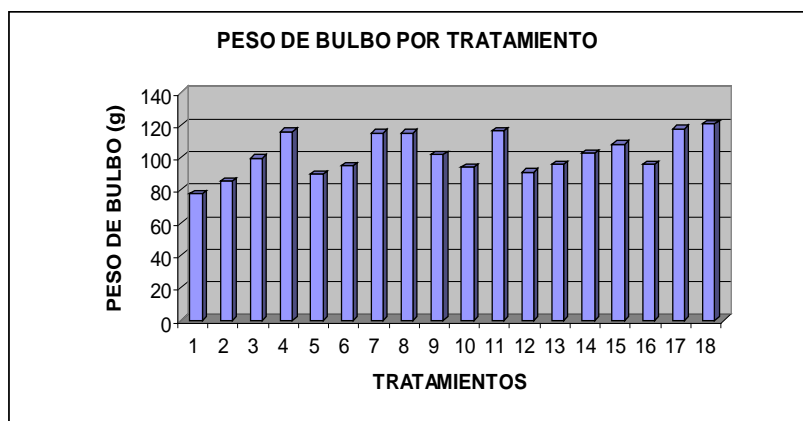


Figura 2. Efecto de la interacción de tipos de *Bacillus* y micorrizas sobre el rendimiento del cultivo de cebolla.

Con los resultados obtenida basándonos en los datos de rendimiento en este caso el peso de bulbo por tratamiento, tomamos el testigo que en este caso es el T1 con un peso promedio de 77.6 g lo comparamos con el tratamiento q obtuvo el menor rendimiento que es el T2 con un peso de 85.3 g y la diferencia q se obtuvo fue del 7.67 % mas al del testigo y luego se comparo con el mejor tratamiento q fue el T18 con un peso 120.6 g y se obtuvo una diferencia de 43 % mas respecto al testigo teniendo como mejor tratamiento al T18 y no quedando muy lejos en rendimiento los tratamientos T4, T7, T11, T17.

## EFFECTO DE DIFERENTES BIOINSUMOS A BASE DE MICROORGANISMOS EN EL CULTIVO DEL LECHUGA

Responsable: Juan José calizaya, Mayra Claros y Noel Ortuño

### INTRODUCCION.

Los suelos dedicados a la agricultura sufren un paulatino empobrecimiento en su disponibilidad de nutrientes como consecuencia de una larga historia agrícola sin fertilización. Así, una vez introducida esta práctica, el criterio utilizado para decidir las dosis de fertilizante a aplicar es la de suficiencia, basado en umbrales críticos para obtener la máxima respuesta económica (Berardo, 2003).

Sin embargo, recientes estudios muestran que el uso de microorganismos tales como las micorrizas arbusculares, *Basillus sp.*, *Trichoderma sp.*, y las bacterias solubilizadores de fosforo entre otros juegan un rol importante en el desarrollo de los cultivos (Koske y Polson, 1984; Amer y Utkhede, 2000). Así, los microorganismos en asociación con los cultivos juegan un rol importante para el desarrollo de cultivos de alta producción. El mejoramiento en la calidad microbiológica de los suelos agrícolas con la incorporación de organismos seleccionados para contribuir a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que contribuiría al logro de mejores cultivos. Por otro parte, algunos de estos microorganismos han sido eficientemente aislados y multiplicados, permitiendo así la formulación de inoculantes para su aplicación en escala de producción. Por lo que el presente estudio se planteo el siguiente objetivo:

### OBJETIVO.

- Determinar el efecto de diferentes bioinsumos a base de microorganismos sobre el desarrollo del cultivo de la lechuga.

### REVISION BIBLIOGRAFICA

La condición nutricional de un cultivo depende de la oferta de nutrientes por parte del suelo y/o por fertilización, y de la demanda del cultivo (Marschner, 1995). La demanda a su vez está afectada por la especie y por su potencial de crecimiento. Cultivos de alto rendimiento presentan elevadas tasas de crecimiento y de absorción de nutrientes. Por este motivo son los que relativamente expresan mayor pérdida de productividad ante una deficiencia nutricional. Sin embargo, los suelos dedicados a la agricultura están degradándose continuamente en su disponibilidad nutricional como consecuencia de una agricultura intensiva. Por lo que, el mejoramiento en la calidad microbiológica de los suelos agrícolas con la incorporación de organismos seleccionados es una alternativa para obtener mejores rendimientos. Así, los microorganismos PGPR, entre ellos los solubilizadores de fósforo, desempeñan un importante papel en el aporte de este nutriente para las plantas, propiedad que potencia su utilización como inoculantes, (Glick, 1995).

Así mismo, existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada para el control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Fusarium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. El efecto principal de *Trichoderma* es por hiperparasitismo, aunque algunas especies y cepas pueden producir metabolitos bioactivos que incrementan su acción.

### MATERIALES Y METODOS.

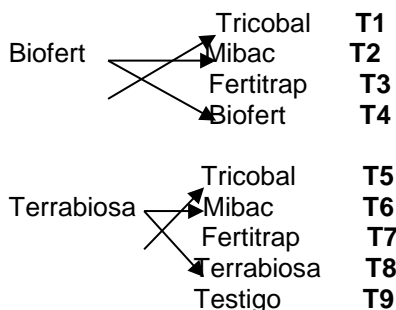
#### Materiales.

- Plantines de lechuga.
- Macetas.
- Metro.
- Biofert.
- Terrabiosa.
- Tricobal.
- Mibac.
- Fertitrap.
- Balanza.
- Bolsas de plástico.

#### Metodología.

##### Tratamientos.

Los 9 tratamientos a evaluar resultaron de la combinación:



#### Diseño experimental.

Los 9 tratamientos fueron evaluados bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con 6 repeticiones. Donde la unidad experimental estuvo constituida por una maceta de 2 kg de capacidad con una planta (Figura 1).

Bloque 1	T4	T7	T1	T6	T3	T8	T5	T2
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

Bloque 2	T2	T4	T7	T1	T6	T3	T8	T5
Bloque 3	T5	T3	T7	T6	T2	T8	T4	T1
Bloque 4	T1	T5	T2	T7	T4	T6	T8	T3
Bloque 5	T8	T3	T1	T6	T2	T5	T4	T7
Bloque 6	T7	T6	T2	T1	T4	T5	T8	T3

**Figura1. Croquis para la implementación del ensayo.**

### **Metodología de campo**

#### **Almacigo del material.**

El almacigo del material se realizó en una bandeja de plástico, para lo cual se utilizó sustrato esterilizado. Las semillas se sembraron al voleo a una densidad promedio de 5 mm entre semillas. Posteriormente las semillas fueron cubiertas con una capa delgada de sustrato esterilizado.

#### **Trasplante del material.**

Dos semanas después de la siembra y una vez que las plantas alcanzaron una altura de 10 cm se realizó el trasplante a las macetas, donde se aplicó biofert (3-4 qq/ha), Tricobal (3 kgr/ha), Mibac (20 kgr/ha) Fertitrap (40 kgr/ha) y Terrabiosa (1 litro/20 litros agua) de acuerdo al tratamiento a implantar. Para lo cual se seleccionaron plantines uniformes en tamaño y longitud radicular.

#### **Variables de respuesta.**

Las variables de respuesta se evaluaron en el momento de la cosecha, las mismas que fueron:

**Altura de la planta.** La cual se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice de la hoja más larga

**Longitud de la raíz.** La misma que se evaluó como la distancia desde el cuello de la planta hasta el ápice de la raíz.

**Número de hojas.** Para lo cual se realizó el conteo del número de hojas desarrolladas por la planta.

**Peso de la planta.** Para esta variable se tomó el peso de la parte foliar de la planta.

**Peso de la raíz.** La misma que se evaluó pesando la parte radicular de la planta.

**Materia seca de la planta.** Para esta variable se realizó el secado de toda la planta incluyendo la parte foliar y radicular en una estufa a 70°C.

#### **Análisis estadístico**

Las variables de respuesta fueron analizadas con el PROC MIXED del SAS (SAS, 2001), previa verificación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas bajo el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ij} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde :

$i = 1, 2, 3, 4$  bloques.

$j = T1, T2, T3, \dots, T9$ . tratamientos

$y_{ij}$  = Variable de respuesta observada en el  $i$  – *esimo* bloque donse se aplico el  $j$  – *esimo* tratamiento.

$\mu$  = Media general.

$\beta_i$  = Efecto aleatorio del  $i$  – *esimo* bloque NIID  $(0, \sigma_b^2)$ .

$\alpha_j$  = Efecto fijo del  $j$  – *esimo* tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma_c^2)$

## **RESULTADOS**

El cuadro de análisis de varianza, muestra variación entre los bloques excepto para altura de planta y longitud de la raíz (Cuadro 1), por lo que el diseño experimental aplicado fue apropiado.

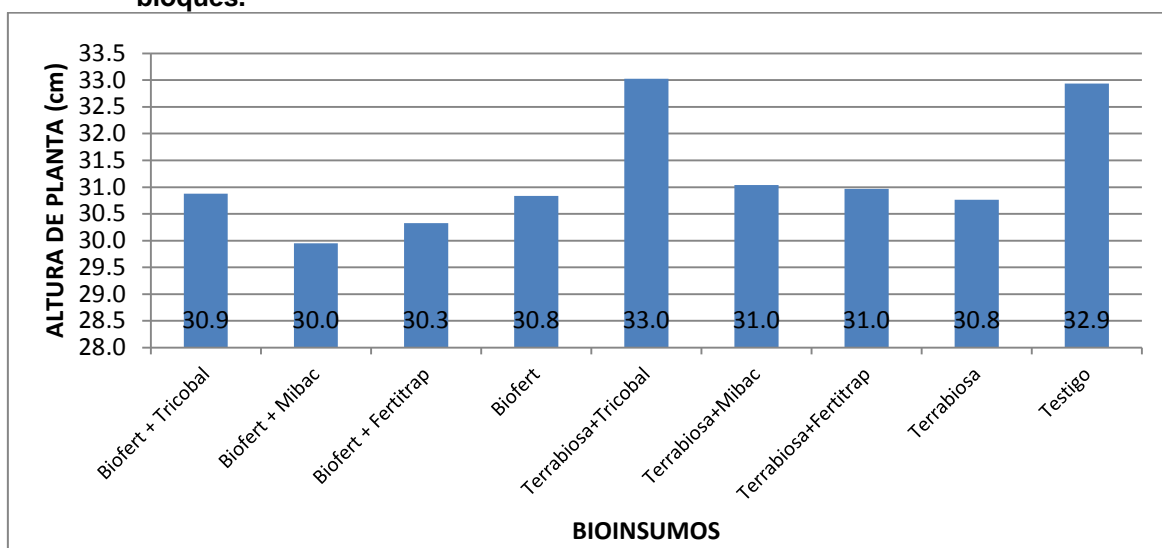
#### Altura de planta.

Para altura de planta no se estimaron efectos significativos ( $Pr = 0,8988$ ) (Cuadro1), lo cual indica que la altura de planta fue similar entre los diferentes bioinsumos. Las mismas que varían desde 30,0 cm con la aplicación de biofert conjuntamente con mibac hasta 33,0 cm con la aplicación de terrabiosa con tricobal (Figura2).

**Cuadro1. Cuadros medios del análisis de varianza para 6 caracteres en el cultivo de la lechuga**

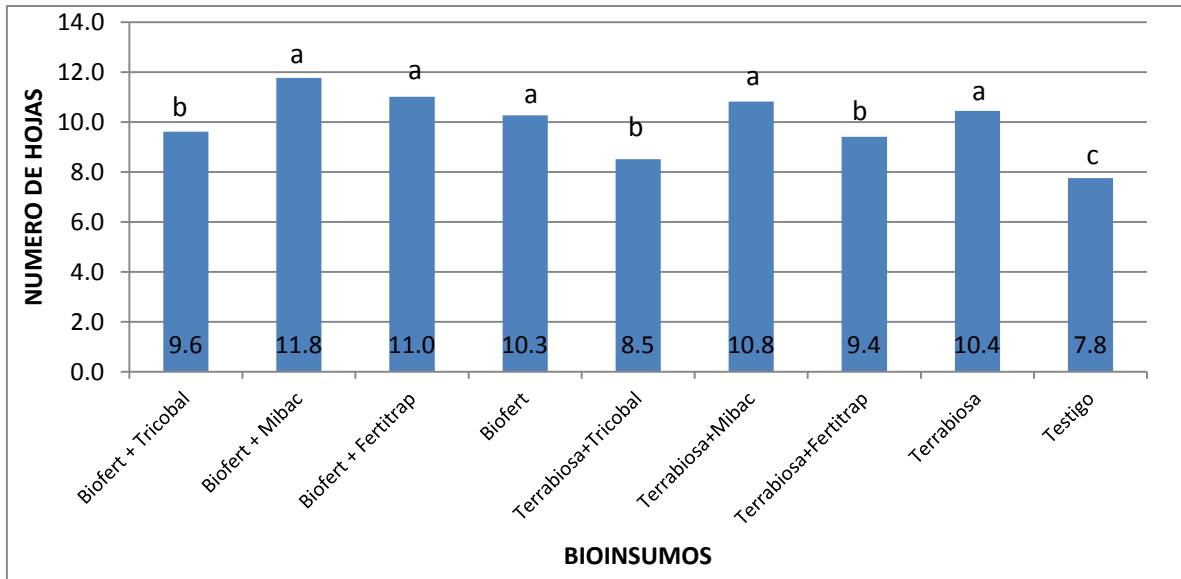
Fuentes de variación	Grados de libertad	Altura de planta (cm)	Numero de hojas	Peso de planta (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Peso de la raíz (gr)	Materia seca de la planta (gr)
Bloque	5	0	0,14	24,07	0	1,13	0
Biofertilizantes	8	4,18	5,71**	141,52**	17,18	70,02*	5,04**
Residual	25	9,96	1,22	141,52	19,09	23,58	2,08
<b>Media</b>		31,16	10,00	50,37	20,96	11,27	3,85
<b>CV%</b>		10,16	11,30	20,28	22,56	23,56	28,90

\*, \*\* Significativo al 0,05 y 0,01 nivel de probabilidad respectivamente, excepto para bloques.



**Figura 2. Altura de planta con la aplicación de bioinsumos. Número de hojas.**

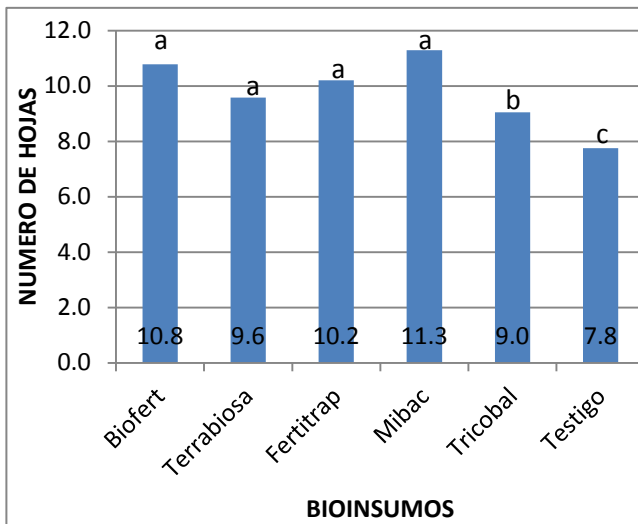
Si bien no se observaron diferencias significativas para altura de planta. Existen diferencias altamente significativas para número de hojas por planta ( $Pr = 0,0017$ ) (Cuadro 1). En el que la combinación de los diferentes bioinsumos supero al testigo. Así, la aplicación de biofert + mibac, biofert + fertitrap, terrabiosa + mibac, terrabiosa y biofert desarrollaron mayor número de hojas (11.8, 11.0, 10.8, 10.4 y 10.3 respectivamente), en comparación al testigo (7.8) (Figura 3).



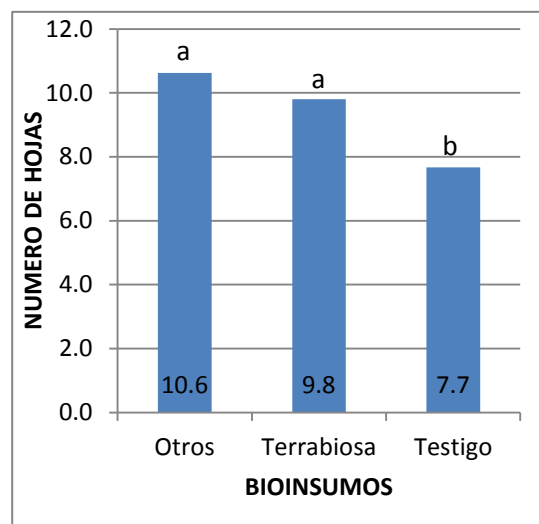
\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad

**Figura 3. Número de hojas desarrolladas con la combinación de los diferentes bioinsumos**

Por otra parte, entre los efectos principales de cada bioinsumo se observó mayor desarrollo de hojas con la aplicación de biofert (10,8), terrabiosa (9,6), fertitrap (10,2) y mibac (11,3) en comparación al testigo (7,8) (Figura 4a). Así mismo, el efecto promedio sobre el desarrollo de número de hojas de los diferentes bioinsumos (10,6) fue similar a la aplicación de terrabiosa (9,8) las mimas permitieron el desarrollo de mayor número de hojas en comparación al testigo (Figura 4b).



a



b

\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad

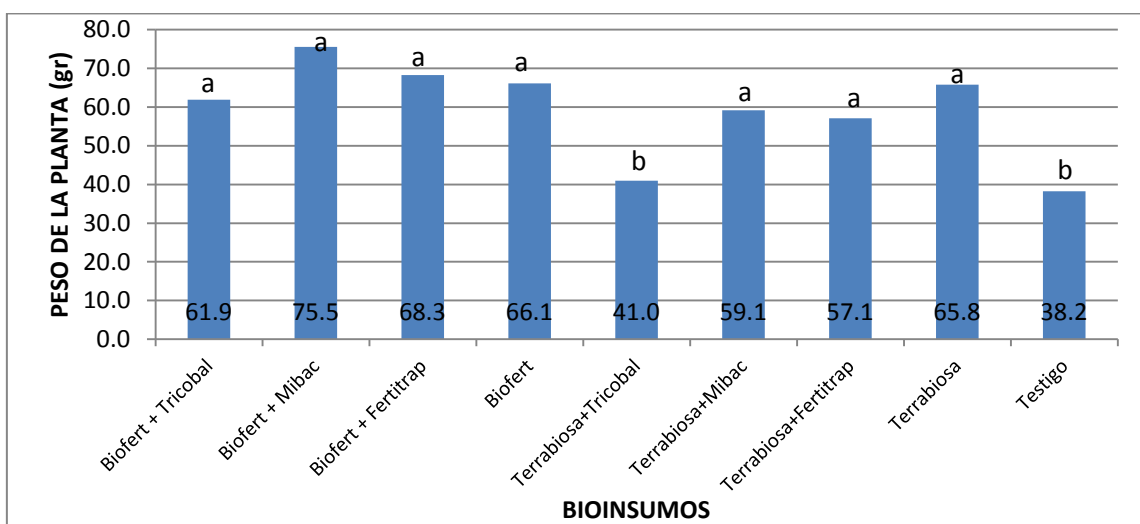
**Figura 4a, 4b. Número de hojas desarrolladas con la aplicación de los diferentes bioinsumos.**

**Peso de la planta.**



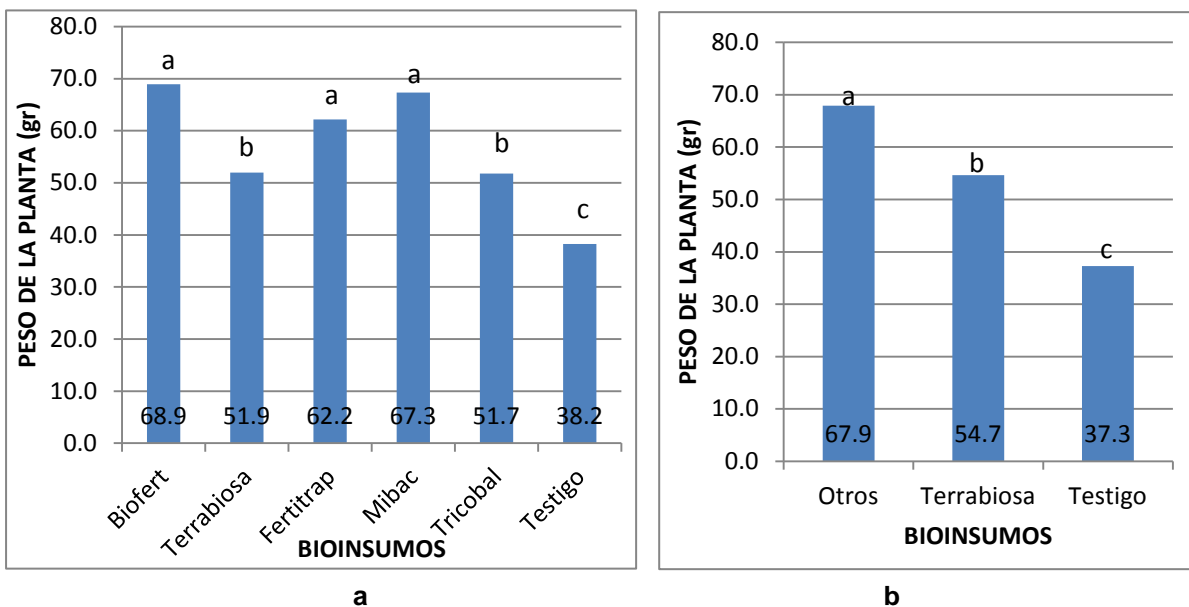
Debido al mayor número de hojas desarrolladas con la aplicación de los bioinsumos, se observaron diferencias en el peso de la planta ( $P_r = 0,0066$ ) (Cuadro 1). Por lo que se estimaron plantas con mayor peso con la aplicación de biofert + mibac (75.5 gr), biofert + fertitrap (68.3 gr), biofert (66.1 gr), terrabiosa (65.8 gr), biofert + tricobal (61.9 gr), terrabiosa + mibac (59.1 gr) y terrabiosa + fertitrap (57.1 gr), en comparación al testigo (38.2 gr) (Figura 5).

Entre los efectos principales de cada bioinsumo con la aplicación de biofert (68,9 gr), fertitrap (62,2 gr) y mibac (67,3 gr) se observaron plantas de mayor peso seguida de terrabiosa (51,9 gr) y tricobal (51,7 gr) (Figura 6a). Así mismo el promedio de los diferentes bioinsumos fue superior (67,9 gr) respecto a la terrabiosa (54,7 gr). Sin embargo, la aplicación de los diferentes bioinsumos fue superior al testigo (37,3) (Figura 6b).



\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad

Figura 5. Peso de la planta con la combinación de diferentes bioinsumos.



\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad

Figura 6a, 6b. Peso de la planta con la aplicación de diferentes bioinsumos.

### Longitud de la raíz

En cuanto a la longitud radicular no se estimaron efectos significativos ( $P_r = 0,5286$ ) (Cuadro 1). Por lo que la longitud radicular fue la misma con la aplicación de los diferentes bioinsumos al igual que el testigo, las mismas que variaron desde 17,7 cm con la aplicación de terrabiosa + mibac hasta 23,8 cm con la aplicación de terrabiosa + tricobal (Figura 7).

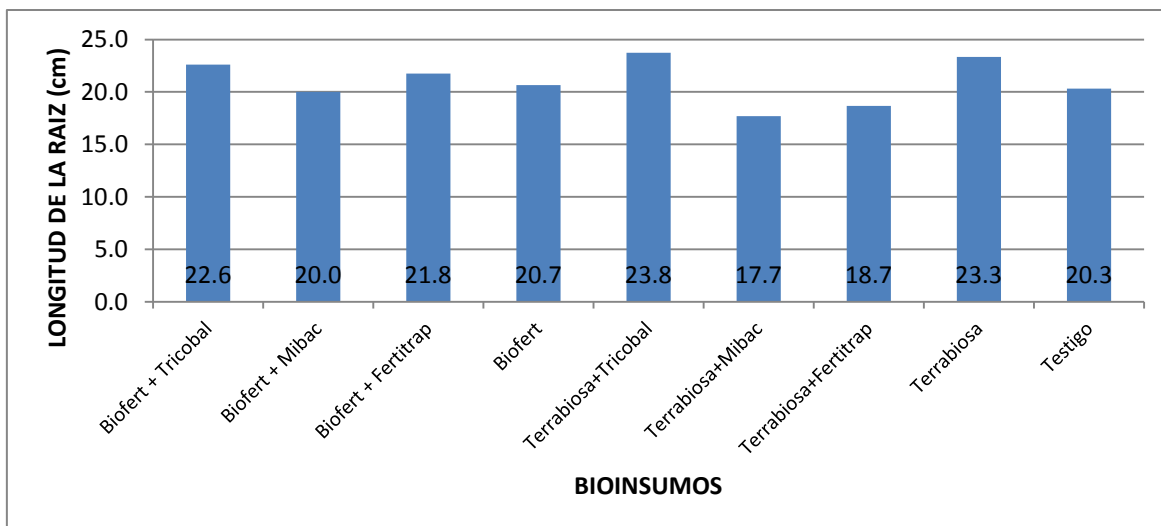
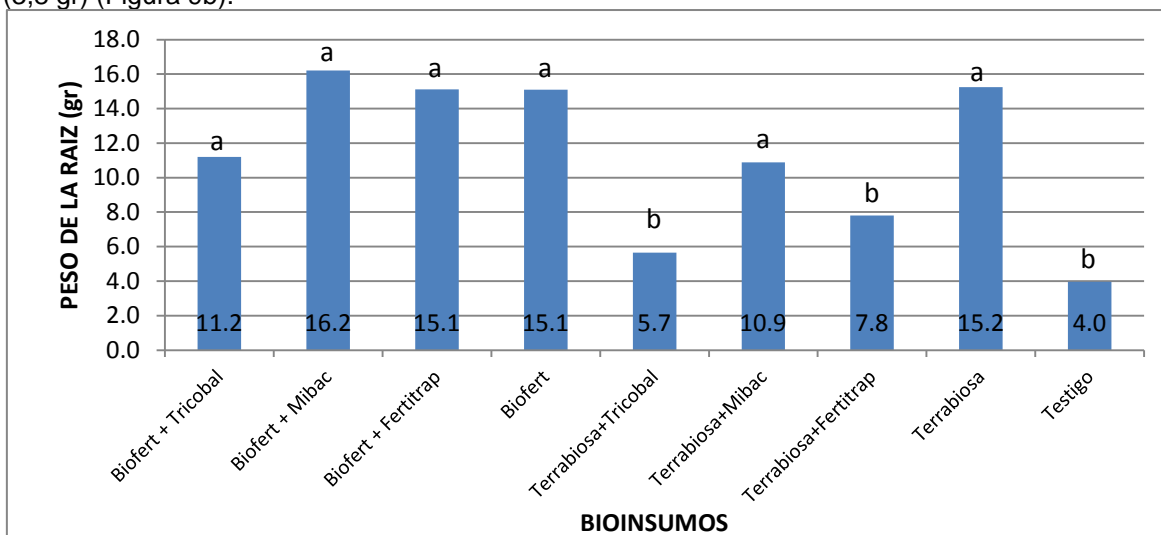


Figura 7. Longitud radicular con la aplicación de los diferentes bioinsumos.

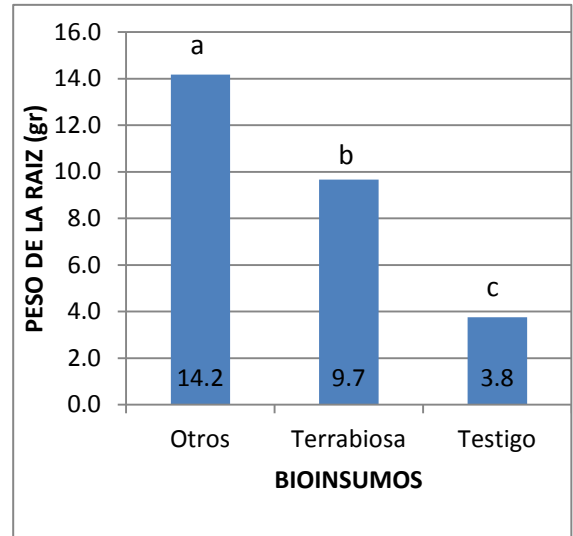
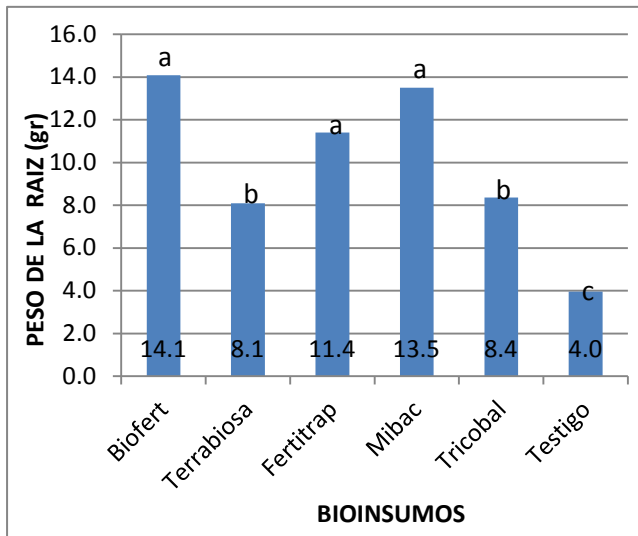
#### Peso de la raíz.

Aunque no se observaron diferencias entre la longitud radicular, se estimaron diferencias significativas para peso de la raíz ( $P_r = 0,0206$ ) (Cuadro 1). Por lo que la aplicación de los diferentes bioinsumos posibilitó mayor desarrollo radicular en comparación al testigo (4.0 gr). Así, las plantas desarrollaron mayor peso radicular con la aplicación de biofert+mibac (16.2 gr), terrabiosa (15.5 gr), biofert+fertitrap (15.1 gr), biofert (15.1gr), biofert+tricobal (11.2 gr) y terrabiosa+mibac (10.9 gr) en comparación al testigo (4 gr) (Figura 8).

Entre los efectos principales de cada bioinsumo se observó mayor peso radicular con la aplicación de biofert (14,1 gr), mibac (13,5 gr) y fertitrap (11,4 gr) seguida de tricobal (8,4 gr) y terrabiosa (8.1 gr) (Figura 9<sup>a</sup>). Así mismo, el efecto promedio de los diferentes bioinsumos (14,2 gr) fue superior al de la terrabiosa (9,7 gr). Sin embargo estos fueron superiores al testigo (3,8 gr) (Figura 9b).



\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad



\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad

Figura 9a, 9b. Peso de la raíz con la aplicación de diferentes bioinsumos.

#### Materia seca planta.

Al igual que para número de hojas, peso de la planta y peso de la raíz se estimaron efectos significativos para materia seca de la planta ( $Pr= 0,0035$ ) (Cuadro 1). Así, se observó mayor cantidad de materia seca con la aplicación de biofert+tricobal (3,17 gr), biofert+mibac (6,12 gr), biofert+fertitrap (4,64 gr), biofert (30,8 gr), terrabiosa+tricobal (2,94gr), terrabiosa+mibac (3,91gr) y terrabiosa (5,63 gr) en comparación a la aplicación de terrabiosa+fertitrap (2,29gr) y el testigo (1,67 gr) y (Figura 10).

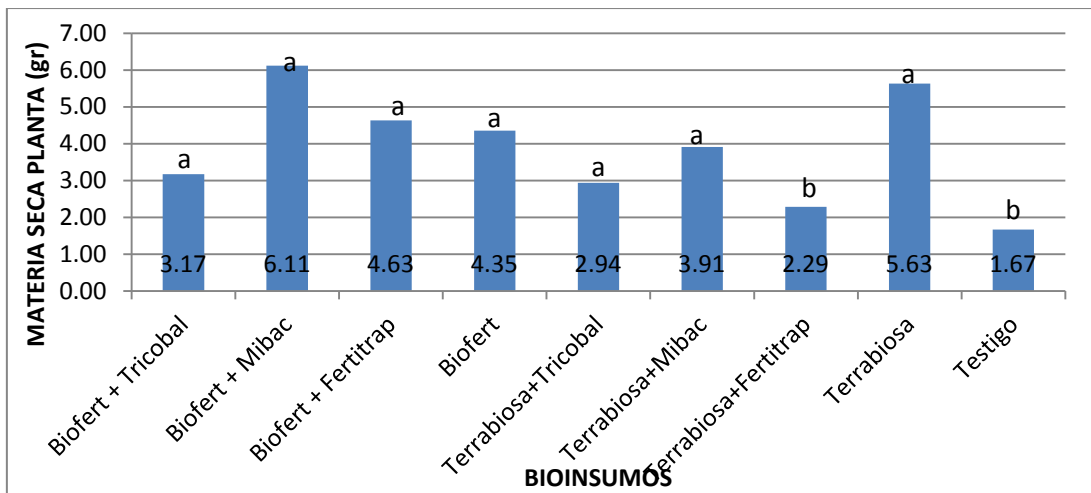
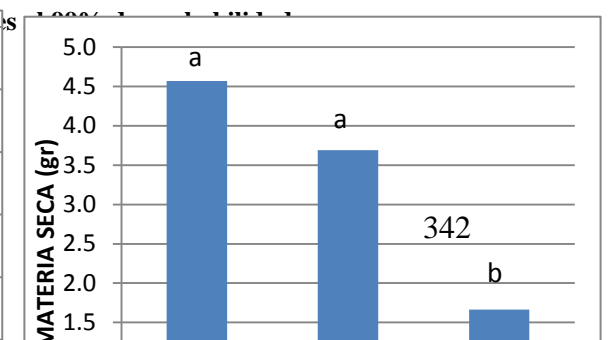
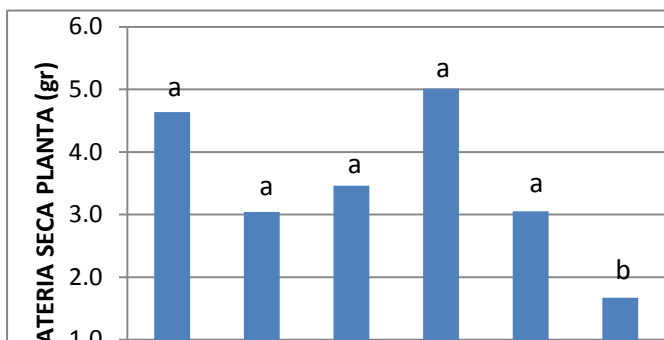


Figura 10. Materia seca de la planta con la aplicación de diferentes bioinsumos.



a

b

**\*Letras similares son iguales, caso contrario son diferentes al 99% de probabilidad**  
**Figura 11a, 11b. Materia seca con la aplicación de diferentes bioinsumos.**

Entre el efecto principal de cada bioinsumo se observó mayor cantidad de materia seca con la aplicación de mibac (5,0 gr), biofert (4,6 gr), fertitrap (3,5 gr), tricobal (3,1 gr) y terrabiosa (3,0 gr) (Figura 11a). Por lo que el efecto promedio de los diferentes bioinsumos (4,6 gr) fue la misma que con la aplicación de la terrabiosa (3,7 gr). Las mismas que fueron muy superiores al testigo (1,7 gr) (Figura 11b).

#### **CONCLUSIONES.**

A través de los objetivos planteados y los resultados obtenidos se concluye:

- El uso de los diferentes bioinsumos permite el desarrollo de mayor número de hojas, mayor peso en la planta, mayor peso radicular y mayor desarrollo de materia seca en la planta.
- No se encontraron efectos significativos de los diferentes bioinsumos sobre la altura de la planta y longitud radicular.
- El efecto principal de cada bioinsumo y la combinación entre diferentes bioinsumos fue superior en comparación al testigo.
- Las combinaciones Terrabiosa+Tricobal y Terrabiosa+Fertitrap si bien favorecieron mayor desarrollo en la mayoría de las variables en comparación al testigo, los mismos permitieron un desarrollo inferior en comparación a los otros tratamientos.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- AMER, A. G. and UTKHEDE, R. S. 2000. Development of formulation of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber, *Canadian J Microbiol* 46:809-816
- BERARDO; A. 2003. Manejo del Fósforo en los sistemas de producción pampeanos. En: Simposio "El Fósforo en la Agricultura". pp 38-44. INPOFOS Cono Sur, Rosario.
- GLICK B.R.1995.The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *can J. Microbiol.* 41:109-117.
- KOSKE R.E., POLSON W.R., 1984. Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? *Bioscience* 34, 420-424.
- MARSCHNER, H.E. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press, London/San Diego/New York/Boston/Sydney/Tokyo, 889 p.
- SAS INSTITUTE. 2001. The SAS System for Windows. Version 9. SAS Inst., Cary, NC.

**Evaluación de la variedades de lechuga (*Lactuca sativa*) en hidroponía en el sistema recirculante (NFT)**

**RESPONSABLE:** Riovana Rojas Velasquez; Gino Aguirre, Marlene Angulo, Noel Ortuño

**I. COLABORADORES:**

Convenio CIUF – UMSS; Fundación PROINPA

## II. JUSTIFICACION

El departamento de Cochabamba por sus características topográficas, climáticas, edáficas y socioculturales, constituye una de las zonas más importantes para la producción de hortalizas, cereales y frutales, cuyas tecnologías de manejo están basadas en conocimientos que han sido transmitidos y heredadas por generaciones el cultivo de hortalizas constituye una de las practicas corrientes en nuestro medio generalmente limitado a la tecnología tradicional, que confrontan diversos factores que limitan el rendimiento por lo tanto una elevación de los costos de producción, los que no son compensados con los ingresos económicos netos obtenidos por la comercialización de los productos y la prevalencia de la agricultura de subsistencia.

Para revestir esta situación de manejo y desarrollo de los cultivos existen muchas tecnologías alternativas de producción que al ser adoptadas en forma práctica como el empleo de viveros, invernaderos hidropónicos, carpas solares, etc. Mejoran las producciones y alcanzan una oferta en los mercados durante todo el año.

Entre el conjunto de hortalizas, la lechuga es una de las plantas mas importantes para la economía del agricultor y de su seguridad alimentaria, esta especie se adapta a todas las zonas, donde las características climáticas y edáficas son favorables para el desarrollo de esta hortaliza a nivel local, departamental y nacional.

La lechuga es un alimento que aporta muy pocas calorías, alto porcentaje de agua (90-95%), vitaminas (folatos, pro vitamina A o beta-caroteno y cantidades apreciables de vitamina C), minerales (potasio y magnesio) y fibra, y las hojas externas de color mas oscuro son mas nutritivas que las blanquecinas del interior, la forma cruda es la mejor forma de disfrutar de su frescura, agradable sabor y valor nutritivo, textura firme, que va desde un verde oscuro hasta el verde claro (www.botanical).

Actualmente la lechuga alcanza un promedio de rendimiento de 17 tn/ ha que esta en un 56 % menos de la potencialidad que puede alcanzar esta especie (30 tn/ha) esta diferencia se debe a la influencia de varios factores como ser variedades cultivadas, manejo de cultivo, incidencia de plagas, infraestructura, deficiencia en la incorporación de materia orgánica y fertilizantes orgánicos, etc.

De todos estos factores uno de los aspectos que requiere tomarse en cuenta para incrementar la producción de lechuga y mejorar la calidad es la fertilización orgánica que por las características de consumo en fresco de esta hortaliza constituye un alimento importante por su alto valor en elementos minerales de Ca, Fe, y su contenido en vitaminas especialmente la vitamina A.

Con esta finalidad se propone el siguiente trabajo de investigación bajo los siguientes objetivos.

## III. OBJETIVO

### OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar el efecto de estimuladores en la producción hidropónica en el cultivo de lechuga.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar el efecto de extractos naturales y biofertilizantes en el crecimiento de lechuga.
- Realizar el análisis económico de producción de lechuga en hidroponía por el sistema recirculante (NFT).

- Establecer las ventajas de uso de Bioinsumos en la producción hidropónicas.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### Método

En el trabajo de Campo: se realizara la aplicación foliar, cada semana de biofertilizantes en el cultivo hidropónico de la lechuga, los biofertilizantes son el extracto de polen, humus líquido, fertisol (20 cc./ 0.5 lt agua), vigortop (25cc./ 1 lt agua), de igual manera se evaluara el  $pH$  del sustrato y CE. Cada semana.

##### Procedimiento

Las diferentes variedades se almacigaran el mismo día, en almacigueras, y se les tratará a todas de la misma forma, como también en el primer transplante, como en el transplante definitivo.

En el transplante definitivo las parcelas experimentales fueron tubos de "PVC" de tres pulgadas de diámetro y de ocho metros de largo, en el tubo se hicieron perforaciones del diámetro de un vaso de una onza (28 gramos), el vaso se lo perfora, cada unidad experimental consta de ocho líneas de tubos "PVC", de ocho metros de largo, de las cuales solamente las cuatro líneas de la parte del centro serán las unidades de muestreo, se respetara el efecto de bordura para tener resultados mas confiables.

Cada unidad experimental es un bloque, de las cuales el bloque se divide en cinco partes iguales, para los cinco tratamientos, de la misma forma se hacen en las otras tres repeticiones, y se distribuyen las variedades en forma aleatoria en las demás repeticiones, y en cada unidad de muestreo se marcaran 5 plantas para cada tratamiento, de las cuales se evaluaran desde el momento que se realizarán el transplante definitivo a los tubos de PVC, las evaluaciones de las diferentes variables de respuesta, se realizara cada semana, primeramente se pesaran las plantas, se contarán el # de hojas, se medirán la altura de las plantas, de cada uno de las diferentes tratamientos.

Los tratamiento utilizados fueron:

- |                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| 1. Fertisol       | 150 cc/m <sup>2</sup> l |
| 2. Vigortop       | 25cc/ m <sup>2</sup>    |
| 3. Extracto polen | 20 cc/ m <sup>2</sup>   |
| 4. Humus líquido  | 150 cc/ m <sup>2</sup>  |
| 5. Testigo 0      |                         |

Las aplicaciones se hicieron después de 20 días de iniciado el transplante por tres veces consecutivas cada 15 días.



**Figura 1.** Cultivo hidropónico con bioinsumos en la FCAP-UMSS.

**Diseño experimental**

El diseño experimental que se utiliza en la presente investigación es el diseño de bloques completos al azar, divididas en cuatro bloques o repeticiones

El tamaño de cada unidad experimental es de 1.5m de ancho x 1.55m largo, en total todo el ensayo es de 6.0 m ancho y de 1.55m de largo, haciendo una superficie útil de 9.3 m<sup>2</sup>.

**VARIABLES DE RESPUESTA:**

Peso de la planta (Materia verde)

Se realizará pesando las plantas marcadas con más las raíces con una balanza, y se pesaran cada 8 días

**Número de hojas**

Se realizara contando las hojas de cada uno de los tratamientos, de la misma forma cada 8 días

**Altura planta**

La medición de la altura se tomara desde el cuello de la planta hasta la ultima hoja, de igual forma se tomaron los datos cada 8 días.

**Área foliar**

Se realizara de cada planta marcada y se medirán cada semana el largo de las hojas.

**Longitud de raíz**

La medición de la longitud de la raíz se tomara desde el cuello de la planta hasta la final del ápice de la raíz, de igual forma se tomaron los datos cada semana.

**Análisis estadístico:**

El diseño experimental que se utilizara en la presente investigación es el diseño de bloques completos al azar.

$$Y_{ij} = \mu + \epsilon_i + \tau_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

i = 1,2,3,4 Bloques

j = 1,2,3,4,5 Tratamientos de lechuga

Y<sub>ij</sub> = Rendimiento en Tn/ha de materia verde observado en una unidad experimental en el i- esimo bloque donde se aplico la j- esima tratamientos de lechuga

μ = Media general

ε<sub>i</sub> = Efecto aleatorio del i-esimo bloque ε<sub>i</sub>~NIID (0, σ<sub>2r</sub>)

τ<sub>j</sub> = Efecto fijo del j-esimo tratamiento

ε<sub>ij</sub> = Efecto aleatorio de los residuales ε<sub>ij</sub> ~NIID (0, σ<sub>2e</sub>)

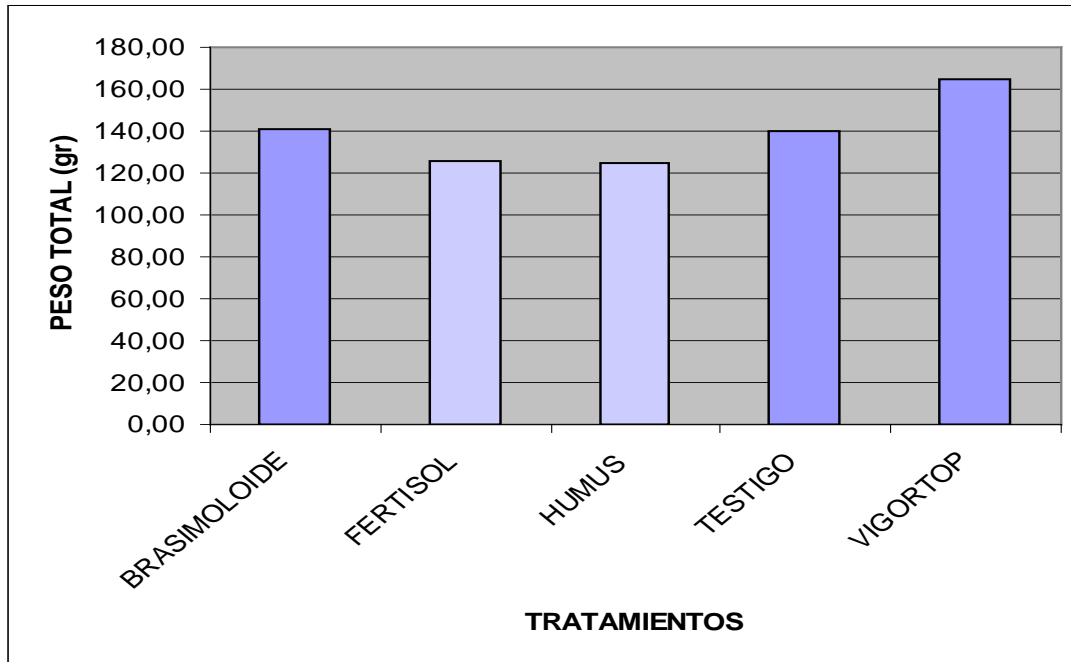
**V. RESULTADOS Y DISCUSION**

**Cuadro 1.** Análisis de significancia por variable evaluada.

Variables	FV	gl	SC	CM	F	Pr > F
Peso total	Trat	4	0,308	0,077	3.37	0.0245

Peso follaje	Trat	4	0,459	0,115	3.51	0.0210
Peso raíz	Trat	4	143,133	35,783	1.55	0.2179
Nº de hojas	Trat	4	39,533	98,833	3.02	0.0368
Altura de planta	Trat	4	119,200	29,800	3.18	0.0304
Longitud de raíz	Trat	4	0,426	0,107	2.51	0.0672

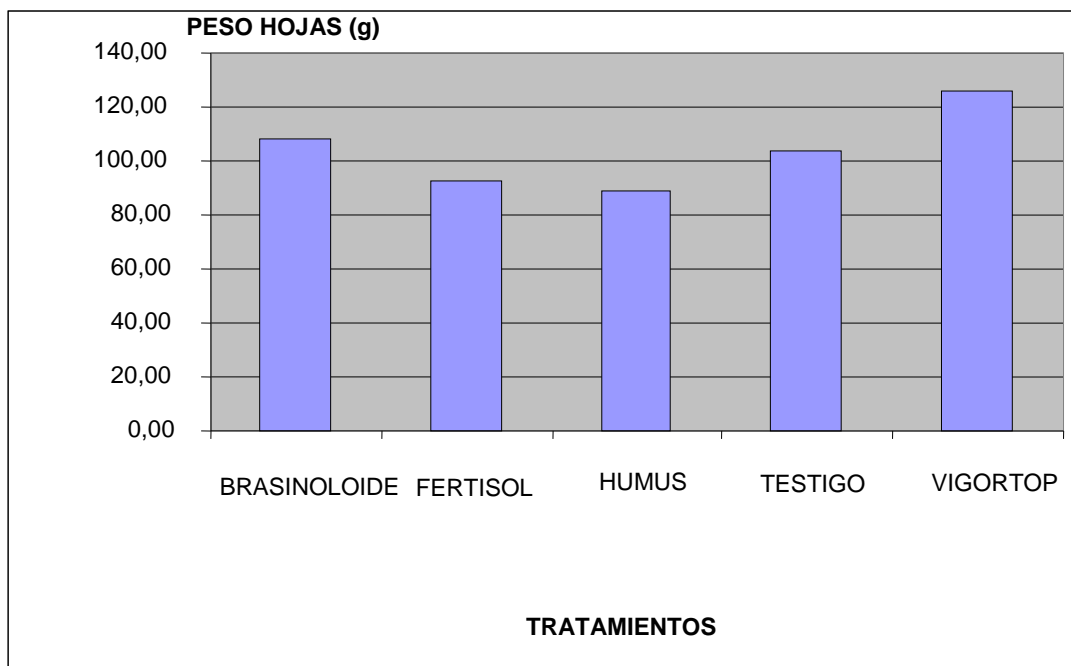
**Peso total de la planta.-**



El peso total de la planta fue mayor con los tratamientos: Vigortop y Brasinoloide, las mismas fueron similares al testigo, en cambio Fertisol y Humus tuvieron menor peso total de la planta.

**Peso hojas.-**





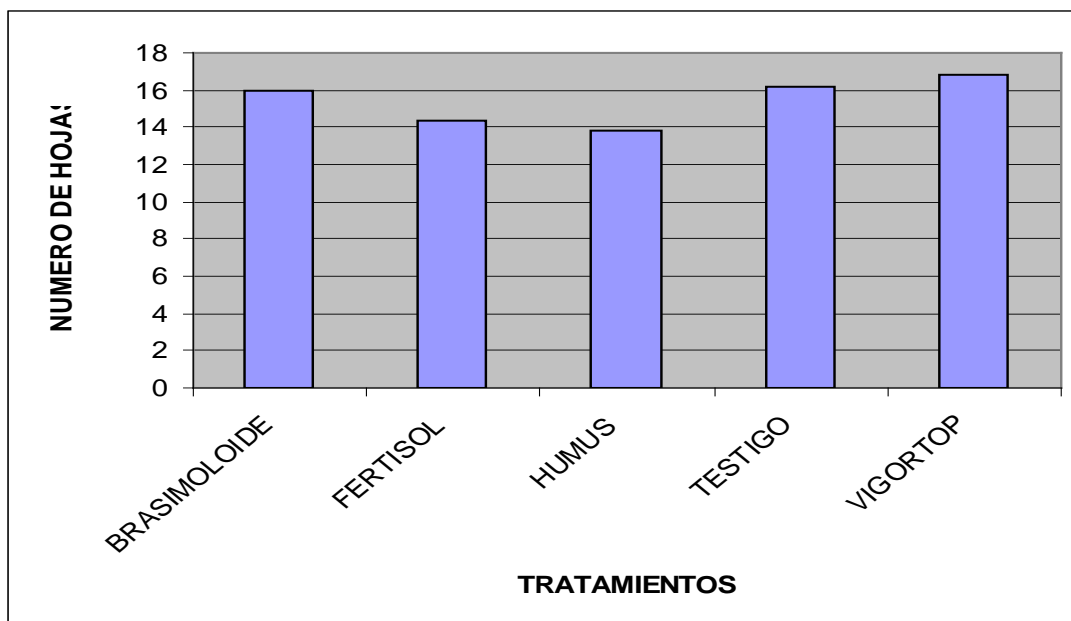
Al igual que peso total de la planta, el peso de solamente hojas Vigortop y Brasinoloide fueron los que presentaron mayor peso de hojas, similar al testigo; así, la aplicación con Fertisol y Humus tuvieron menor peso de hojas.

**Peso raíz.-**

No hubo diferencias significativas entre tratamientos, lo que indica que la aplicación de estos productos no tuvo efecto sobre el peso de raíz.

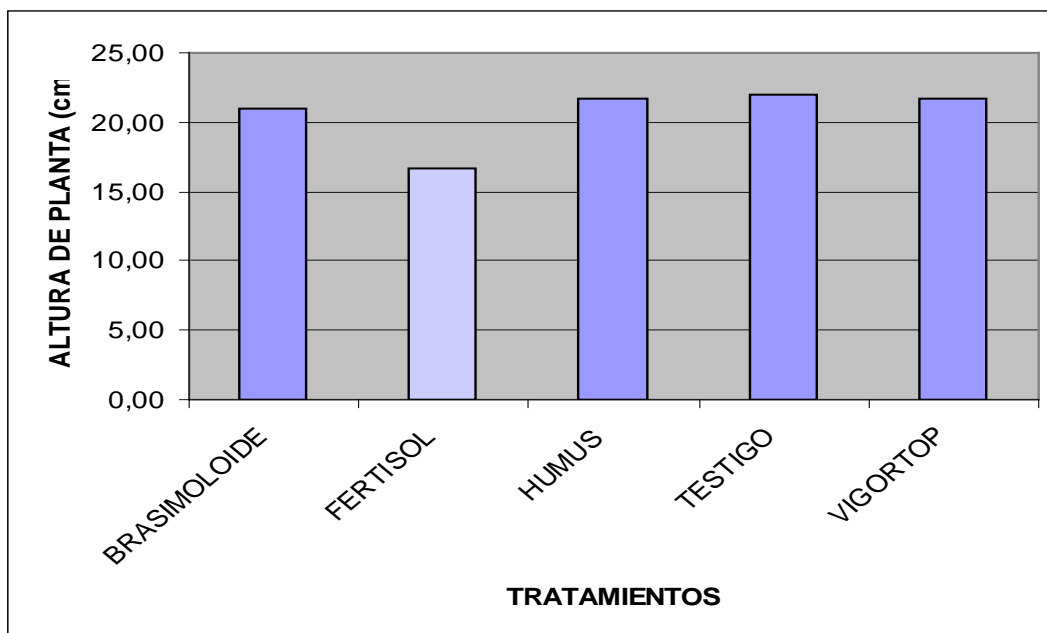
	PESO RAÍZ
BRASINOLOIDE	32,83
FERTISOL	33,33
HUMUS	36,00
TESTIGO	36,33
VIGORTOP	38,83

**Número de hojas.-**



Existen diferencias entre tratamientos, lo que indica que el número de hojas fue mayor con la aplicación de Vigortop y Brasinoloide, similar al testigo, en cambio con la aplicación de Fertisol y Humus el número de hojas fue menor.

#### Altura de planta.-



Los tratamientos Vigortop, Humus y BRASINOLOIDE fueron los que presentaron mayor altura de planta e igual al testigo, así, la aplicación con Fertisol fue el de menor altura de planta.

#### Longitud de raíz.-

No hubo diferencias significativas entre tratamientos para longitud de raíz, lo que indica que la longitud de la raíz fue similar entre los tratamientos.

BRASINOLOIDE 19,09

FERTISOL	17,08
HUMUS	24,14
TESTIGO	18,09
VIGORTOP	18,52

## X. BIBLIOGRAFIA

Restrepo R. Jairo 1998. E. Suelo La Vida y los Abonos Organicos. 1ra edición. Enlace P. 45.

Ramirez Casteño G. 1998. La Agricultura Organica. 3ra edición. Corregida P. 13.

Alfredo Rodriguez Delfín, Marilu Hoyos Rojas, Milagros Chang La Rosa. 2001. Soluciones Nutritivas en Hidroponía. 1ra edición. Centro de investigación de Hidroponía. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Peru. P.100

Buckamana H; Brandy. N 1977. Naturaleza y Propiedades de los suelos. Edición Aragón, Barcelona- España. P. 590

Alfredo Rodriguez Delfín, Marilu Hoyos Rojas, Milagros Chang La Rosa. 2002. Manual practico de hidroponía. 3 ra Edicion. Centro de investigación de Hidroponía. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Peru.

Cáceres, E. 1971. Producción de hortalizas en invernaderos. Editorial Herrero Hermanos S.A. México. pp. 145-160

Centro Nacional de Producción de Semillas de Hortalizas. 1998. Cultivo de Lechuga. Boletín divulgativo para el uso de semillas fiscalizadas de hortalizas. Ministerio de agricultura , ganadería y desarrollo rural. Editorial Qori Llama. Cochabamba-Bolivia

Edmundo CAtacora Pinazo. 1996 Curso Internacional de Hidroponía. Centro de investigación de Hidroponía. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Peru. Pp. 396.

Gordon , R. Barden, J, 1992. Horticultura. Editorial. AGT, S.A. Mexico. Pp. 535-538.

## MATERIAL INERTE DE PRECIPITACION PARA USO EN MICROBIOLOGIA

**Responsable: Marlene Angulo y Edson Meneses, Mayra Claros, Noel Ortuño**

### Compendio

Los materiales inertes como el caolín, la calcita y el oxido de silicio tienen diversos usos por sus diferentes propiedades, entre ellos el de absorber humedad y de ser mas densos que el agua por lo que forman sedimento, estas propiedades podrían utilizarse en microbiología para una producción masiva de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Con el objetivo de determinar el mejor material de sedimentación se utilizo también savia de penca y maicena como referentes de una mejor precipitación y por las partículas de menor densidad que el agua correspondientemente, los mejores materiales de precipitación fueron el oxido de silicio y la calcita a los que se sometieron a diferentes niveles de centrifugación. El oxido de silicio fue de mejor formación de sedimento en caldo de papa a 1500 rpm sin la adición de savia de penca.

**Palabras claves:** Microbiology, oxido de silicio, decantación.

**151. Objetivos:** Determinar el material de mayor formación de sedimento y el efecto de diferentes niveles de centrifugación en el o los materiales de mejor formación de sedimento

**152. Hipótesis:** Los materiales de sedimentación son iguales en todos los niveles de centrifugación.

**153. Revisión de literatura**

El caolín o caolinita, es una [arcilla](#) blanca muy pura que se utiliza para la fabricación de [porcelanas](#) y de aprestos para almidonar. También es utilizada en ciertos medicamentos y como [agente adsorbente](#). Su fórmula es  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$  ó  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (disilicato aluminico dihidratado) ([www.wikipedia.org/wiki/caolín](http://www.wikipedia.org/wiki/caolín)). Este material inerte se ha utilizado también en microbiología en el proceso de formación de pellets con micelio de *Streptomyces coelicolor* para estudios moleculares (Kim y Kim, 2004).

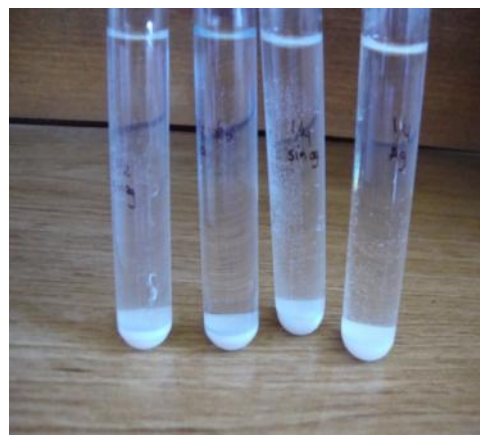
El óxido de silicio o dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) es un compuesto de [silicio](#) y [oxígeno](#), llamado comúnmente sílice. Es uno de los componentes de la [arena](#). Una de las formas en que aparece naturalmente es el [cuarzo](#). Es un [desecante](#), es decir que quita la [humedad](#) del lugar en que se encuentra. Se encuentra muy generalmente en paquetes nuevos de aparatos ópticos, electrónicos, etc. ([www.wikipedia.org/wiki/oxidodesilicio](http://www.wikipedia.org/wiki/oxidodesilicio)). Moreno (2000) utilizó este material para aislamientos entre dispositivos multinivel en el área de la electrónica.

La calcita es un [mineral](#) del grupo de los [Carbonatos](#), grupo V/B de la [clasificación de Strunz](#). Su nombre viene del latín *Calx*, que significa *cal viva*. Es el mineral más estable que existe de carbonato de [calcio](#). La calcita es muy común y tiene una amplia distribución por todo el planeta, se calcula que aproximadamente el 4% en peso de la [corteza terrestre](#) es de calcita. Se caracteriza por su relativamente baja dureza (3 en la [escala de Mohs](#)) y por su elevada reactividad incluso con ácidos débiles, tales como el [vinagre](#) ([www.wikipedia.org/wiki/calcita](http://www.wikipedia.org/wiki/calcita)). En el tema medio ambiental como es el caso de el estudio de precipitados de carbonato de calcio en destiladores solares experimentales utilizando como fuente afluentes de agua subterránea con alto contenido de calcio, como resultado se encontró precipitado de calcita como única fase cristalina (Armendáriz *et al*, 2005).

## 154. Materiales y métodos

### 4.1 Preparación del material

En tubos de ensayo se colocaron 1 gr de cada soluto y se adicionaron 8 ml de caldo de papa, a los cuales se homogenizaron en vortex, posteriormente se adicionó 5 ml de savia de penca y de la misma manera se homogeniza la muestra agitando con una varilla de metal y en vortex por 1 minuto aproximadamente. Se dejó en reposo un día para su posterior evaluación en espectrofotómetro.



Para la centrifugación se procedió de la misma manera, pero con y sin savia de penca, dejando en reposo al menos 30 min, luego se sometió a centrifugación a 500, 1000 y 1500 rpm por 3 min.



#### 4.2 Tratamientos

Cada uno de los solutos son los tratamientos haciendo un total de 4 tratamientos mas un testigo de caldo de papa + penca y solamente caldo de papa que sirvió como solución patrón de comparación en el espectrofotómetro. De los tratamientos anteriores, se determinaron los mejores para la centrifugación, los cuales constaron de oxido de silicio y calcita a quienes se combinaron con y sin adición de savia de penca, además de los niveles de centrifugación a 500, 1000 y 1500 rpm, conformando de esta manera 12 tratamientos estructurados con 3 repeticiones. Cada unidad experimental consta de un tubo de ensayo conteniendo la solución antes mencionada. La variable de respuesta a evaluar es la cantidad de partículas en suspensión, la misma fue evaluada a espectrofotómetro a 500 y 600nm de longitud de onda.

#### 4.3 Diseño estadístico

Los datos de cada una de las variables de respuesta, previa de la verificación de los supuestos, principalmente de distribución normal y homogenidad de varianzas se analizaran de acuerdo al diseño completamente aleatorio bajo el siguiente modelo:

Diseño completamente aleatorio:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$i = 1, 2$ , materiales de precipitación.

$j = 1, 2$  adición de savia de penca (con y sin).

$k = 1, 2, 3$  niveles de centrifugación.

$\mu$  = media general.  
 $\alpha_i$  = efecto fijo del  $i$ -ésimo material de precipitación, en el  $j$ -ésimo adición de penca y el  $k$ -ésimo nivel de centrifugación.

$\mu$  = media general.

$\alpha_i$  = efecto fijo del  $i$ -ésimo material de precipitación.

$\beta_j$  = efecto fijo de la  $j$ -ésima adición de savia de penca.

$\gamma_k$  = efecto fijo del  $k$ -ésimo nivel de centrifugación.

$\alpha_{ij}$  = efecto fijo de la interacción entre el i-esimo material de precipitación y la j-esima adición de savia de penca.

$\alpha_{ik}$  = efecto fijo de la interacción entre el i-esimo material de precipitación y el k-esimo nivel de centrifugación.

$\alpha_{ijk}$  = efecto fijo de la interacción entre el i-esimo material de precipitación, la j-esima adición de penca y el k-esimo nivel de centrifugación.

$\epsilon_{ijk}$  = efecto aleatorio de los residuales NIID  $(0, \sigma^2_{\epsilon})$

En base al modelo estadístico se realizó el análisis de varianza para probar la hipótesis de los efectos fijos y la estimación de los componentes de varianza, calculando así la media de la variable de respuesta, posteriormente se realizó un análisis de regresión para determinar el nivel óptimo de centrifugación utilizando el proc glm del SAS versión 9.

## 155. Resultados

### 5.1 Partículas en suspensión

El cuadro de análisis de varianza (Cuadro 1) indica que hubo diferencias significativas entre tratamientos tanto a 500 como 600 nm de longitud de onda, lo que sugiere que al menos uno de los materiales de precipitación es de mejor sedimentación.

Cuadro 1. Cuadro de análisis de varianza de tratamientos evaluados a 500 y 600 nm de longitud de onda.

Long onda de	FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
500	TRAT	3	0,0782603	0,0260868	6,73	0,014
600	TRAT	3	0,0502729	0,0167576	5,12	0,0289

De acuerdo a la figura 1 y con la comparación de medias, los materiales de precipitación que obtuvieron menor partículas en suspensión fueron la maicena, calcita y oxido de silicio en comparación al testigo (caldo de papa CP-con penca solamente), sin embargo, el caolin fue el que obtuvo mayor partículas en suspensión, por lo tanto no es un material que forme una buena sedimentación.

Estos resultados indican que los mejores tratamientos fueron oxido de silicio y calcita ya que la maicena fue utilizada solamente como indicador de mayor partículas en suspensión debido a la densidad menor que presenta frente al agua, esto con la finalidad de determinar si la savia de penca también podía sedimentar este material.

Estos resultados fueron de la misma manera a 600 nm de longitud de onda, por lo que basto solamente una evaluación de las partículas en suspensión a 500 nm de longitud de onda.

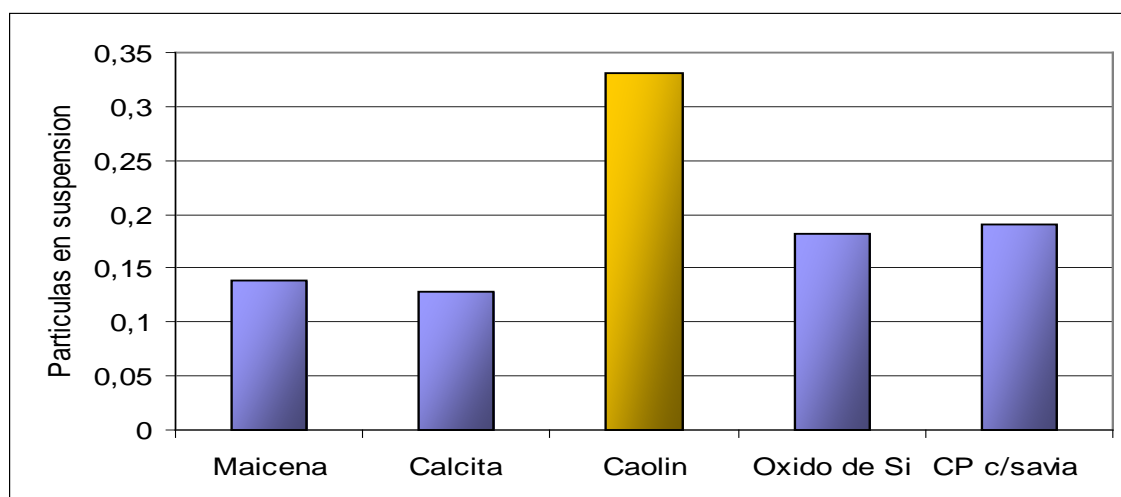


Fig 1.- Medias de cada uno de los tratamientos.

## 5.2 Partículas en suspensión con diferentes niveles de centrifugación

Los niveles de centrifugación fueron diferentes ( $Pr < 0.05$ ) lo que indica hubo efecto de la centrifugación sobre las partículas en suspensión, el Cuadro 2, indica que también hubo diferencias significativas en la adición o no de penca y entre los tratamientos, sin embargo diferencias para ninguna de las interacciones, lo que indica que los tratamientos fueron de la misma manera en la adición o no de penca y para los niveles de centrifugación.

Cuadro 2.- Cuadro de análisis de varianza de tratamientos evaluados a 500 nm de longitud de onda.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Rev	2	0.02566867	0.01283433	8.37	0.0017
Penc	1	0.27126736	0.27126736	176.87	<.0001
Trat	1	0.13261736	0.13261736	86.47	<.0001
rev*penc	2	0.00480289	0.00240144	1.57	0.2295
rev*trat	2	0.00119622	0.00059811	0.39	0.6813
rev*penc*trat	3	0.00027758	0.00009253	0.06	0.9801

Los niveles de centrifugación fueron diferentes (Cuadro 3) para el análisis de regresión cuadrática, lo que significa que las partículas en suspensión disminuyeron linealmente a medida que aumentan los niveles de centrifugación, por lo que, a 1500 rpm se tiene menor partículas en suspensión.

Cuadro 3.- Cuadro de análisis de regresión para los niveles de centrifugación evaluado a 500 nm de longitud de onda.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Lin	1	0.01075267	0.01075267	42.00	0.0006
Cua	1	0.00049089	0.00049089	1.92	0.2154

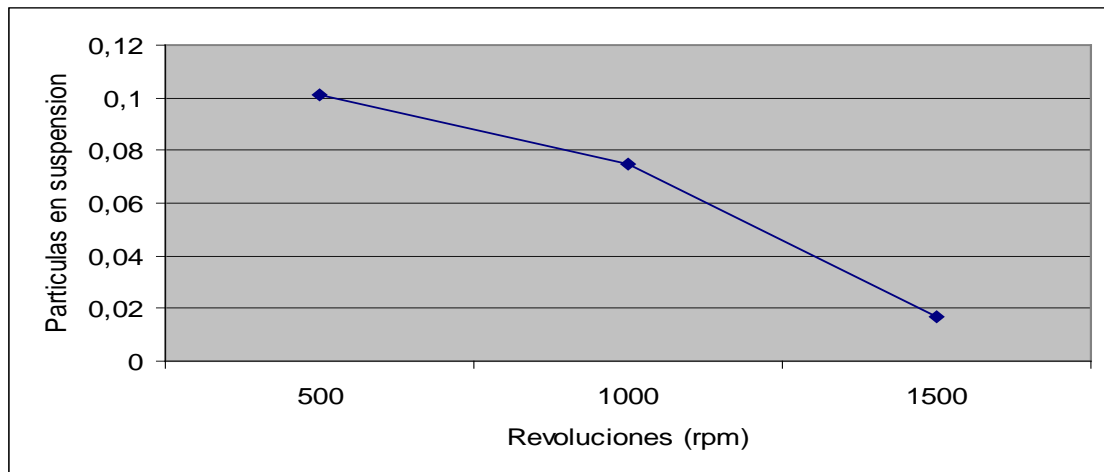


Fig. 2 Medias de los niveles de centrifugación

En la adición o no de savia de penca fue diferente (Cuadro 2), los tratamientos a los que no se adicionaron savia de penca fueron los que presentaron menores partículas en suspensión (Fig. 3), sugiriendo que la formación de sedimento es mejor en ausencia de esta savia.

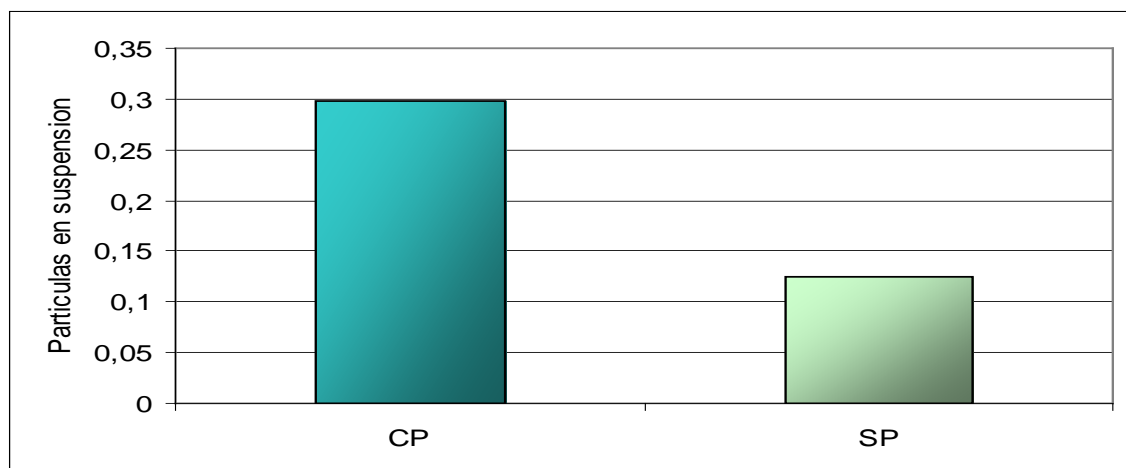


Fig. 3 Medias del factor savia de penca (con-CP y sin SP)

Los tratamientos fueron diferentes ( $Pr < 0.05$ ), es decir, al menos uno de los materiales de precipitación fue el que presentó menor partículas en suspensión. De acuerdo a la figura 4, el óxido de silicio fue el mejor por presentar menor partículas en suspensión y por lo tanto, mejor formación de sedimento en comparación a la calcita.



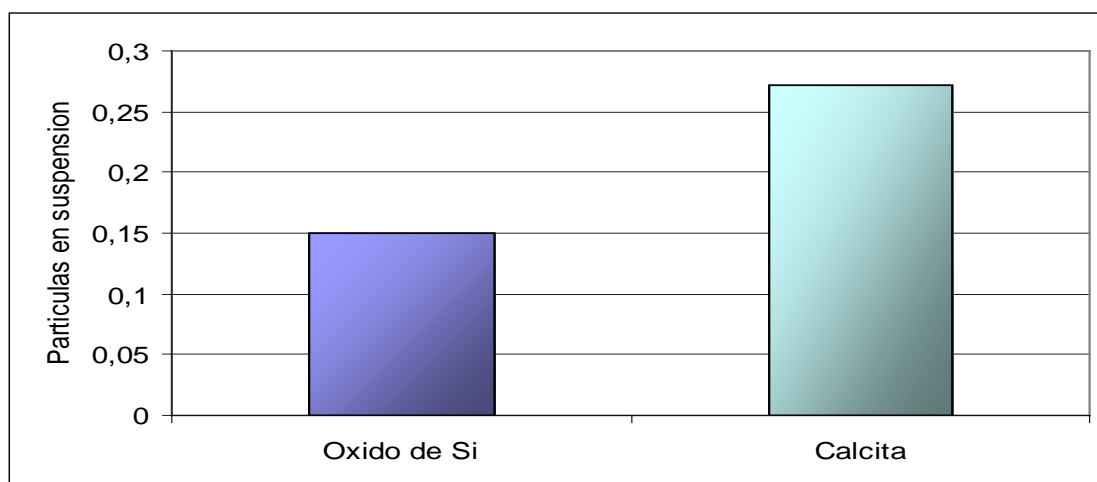


Fig. 4 Medias de los materiales de precipitación

#### 156. Discusión

- La calcita es denominada cal viva y en sus propiedades se utiliza como insecticida en estado sólido, lo que si permitiría actuar como carbonato de calcio en contacto con el agua y de esta manera podría utilizarse como segunda alternativa en la precipitación de bacterias.
- Las bacterias soportan un límite de 1500 rpm, por encima de este valor podrían estallar, por lo que es un límite permitido en el que el óxido de silicio respondió de mejor manera en la formación de sedimento y un decantado más claro, además de tener propiedades absorbentes de humedad.

#### 157. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos y los objetivos planteados, se concluye que:

- El óxido de silicio es el mejor material de precipitación por presentar menor partículas en suspensión y mayor formación de sedimento, lo que indica que podría utilizarse como material inerte para precipitar bacterias en los biofermentadores.
- El nivel de centrifugación óptimo fue de 1500 rpm utilizado con óxido de silicio.

#### 158. Recomendaciones

- Se deberá evaluar las proporciones de óxido de silicio dependiendo de la cantidad de volumen y la densidad de bacterias en los biofermentadores.
- La evaluación de la viabilidad y las unidades formadoras de colonia de las bacterias que serán usadas para este fin tanto el parte a decantar como en la formación de sedimento.

#### 159. Bibliografía consultada

- 1) ARMENDARIS S., PORTA-GANDARA M.A., FOSTER R.E., KOUTSOUCOS G.P., BAUTISTA-MARGULIS R.G., GRADO J.A., ALONSO G., 2005, Estudio de la precipitación de carbonato de calcio en destilador solar experimental, Rev. Int. Contam. Ambient. 21(1) 5-15.
- 2) KIM Y. Y KIM J., 2004, Formation and dispersion of micelial pellets of *Streptomyces coelicolor* A3(2), Departament of Microbiology, Dankook University, Anseo-Dog San 29, Cheonan 330-714, Korea.
- 3) MORENO J.A., 2000, Análisis de Óxido de silicio y estructuras multicapa para aplicaciones electrónicas, Universidad de Barcelona, Departamento de electrónica, España.

- 4) [www.wikipedia.org/wiki/calcita](http://www.wikipedia.org/wiki/calcita)

## **Evaluación de la respuesta de los diferentes bioles (Cuy, Vaca y Cerdo), en almaciguera del cultivo de cebolla.**

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Walquer Arandía y Claudia Gutierrez**

**Instituciones colaboradoras o socias:**

### **Compendio:**

**Palabras claves:** Biol, cebolla

#### **160. Objetivos:**

Evaluar la respuesta de los diferentes bioles (Cuy, Vaca y Cerdo), en almaciguera del cultivo de cebolla.

#### **161. Hipótesis**

Todos los bioles tienen el mismo efecto en almaciguera en el cultivo de cebolla.

#### **162. Revisión de literatura**

La fertilización representa una etapa clave del manejo de los cultivos. Una fertilización bien manejada asegura una buena cosecha en cantidad y calidad. Los fertilizantes llevan a las plantas los nutrientes que faltan en el suelo. Sobre todo potasio, fósforo y de nitrógeno. (Guide fertilisation des cultures, 2001)

En la agricultura orgánica los biofertilizantes fermentados desempeñan un papel muy importante en América del Sur. Estos abonos disponen de una gran diversidad ya que se pueden elaborar directamente en la finca: los agricultores tienen su propia receta y sus secretos de elaboración. Entre esos biofertilizantes se encuentra el biol.

El biol es un biofertilizante foliar fermentado. El uso de este abono, muy sencillo de elaboración, es importante en Bolivia y asegura a los agricultores la disponibilidad de un fertilizante eficiente a un precio bajo. El biol es el producto de la fermentación anaeróbica de estiércol mezclado a agua, una fuente de azúcar, leche y otros ingredientes propios a cada uno y al cultivo para quien se elabora. (J. Restrepo Rivera)

La fuente de nitrógeno en el biol proviene del estiércol y de la leche. La leche es un alimento de alta concentración proteica. El proceso de fermentación va a liberar algunos ácidos amino de estas proteínas, disponibles para los cultivos como fuente de nitrógeno. (J. Restrepo Rivera) Sin embargo la presencia de la leche en sus ingredientes molesta. En efecto, hay regiones de Bolivia donde este alimento es escaso. Aparece muy importante encontrar a algún ingrediente para sustituir la leche y así asegurar la seguridad alimentaria de los campesinos Bolivianos.

La harina de sangre es un producto que presenta como la leche un alto nivel de proteínas. Se produce en los mataderos. Proviene de la sangre de vaca que se hace secar. Este ingrediente es muy fácil de conseguir y por un precio bajo en todas las partes de Bolivia, sin amenazar a la seguridad alimentaria de los campesinos.

La idea sería entonces reemplazar la leche por la harina de sangre. Además la fuente de fósforo que es el biol parece más interesante si el pH del biol es ácido. En efecto, el fósforo se solubiliza en una forma disponible para las plantas cuando está en una solución ácida. La meta de este trabajo es conseguir a elaborar un biol más ácido y sin leche trabajando con la dosis de

levadura contenida en el biol, y la harina de sangre. Esta idea viene del hecho de que las levaduras van a transformar los azúcares presentes en el biol en ácidos quienes van a bajar el pH del biol.

Además, para mejorar los bioles producidos en el campo hay que encontrar un factor de control de la fermentación para saber cuando la fermentación termina y si se puede cosechar el biol. La temperatura y el pH son dos variables que cambian durante el proceso de fermentación de los bioles. Entonces pueden estar interesantes para seguir esta fermentación.

### 163. Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en la localidad de “El Paso”, en terrenos de la Fundación PROINPA, provincia Quillacollo, ubicado a 14 kilómetros de la capital del departamento de Cochabamba. Se encuentra entre los paralelos 17° 21'01.91" de latitud sur y 66° 15'44.34" de longitud oeste. Presenta una altitud media de 2613 msnm, una temperatura media anual de 16 °C y con una precipitación pluvial media anual de 620 mm.

#### Clima.

La zona es de un clima semiárido con una temperatura media anual de 16 °C, con una mínima de 1°C en el mes de junio y la máxima de 27°C en el mes de octubre y una precipitación media anual de 620 mm, la humedad media relativa del ambiente se encuentra entre 53% en los meses de junio y agosto y 66% en los meses de enero y febrero. El viento predominante de la zona, es de dirección sur este y suroeste, se presenta con mayor frecuencia en los meses de octubre y noviembre.

#### Vegetación.

En la zona de El Paso se cultiva una variedad de especies vegetales para diferentes fines, como ser: para forrajes, frutales, leguminosas y hortalizas.

Entre los cultivos de producción forrajera se tiene al maíz forrajero y alfalfa que son los más tradicionales, también se cultivan hortalizas y leguminosas entre los árboles frutales se tiene manzana y duraznero.

#### Materiales.

##### Material vegetal.

Para la evaluación agronómica se empleó como indicador plantines de cebolla (*Allium cepa*).

##### Tratamientos.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Estiércol de cuy $\frac{3}{4}$	Estiércol de Cerdo $\frac{3}{4}$	Estiércol de Vaca $\frac{3}{4}$
Leche 1 lt	Leche 1 lt	Leche 1 lt
Biograd 2 lts	Biograd 2 lts	Biograd 2 lt
Ceniza 0.5 Kg	Ceniza 0.5 Kg	Ceniza 0.5 Kg
Roca Fosfórica 1 kg	Roca Fosfórica 1 kg	Roca Fosfórica 1 kg

#### Metodología.

##### Diseño experimental 1.

Para la presente investigación se empleó el diseño completamente aleatorio (DCA), con tres repeticiones. Cada unidad experimental constituyó un tacho de 100 lts, los mismo se aplicaron en campo los bioles en plantines de planta de cebolla.

##### Diseño experimental 2.

Para la presente investigación se empleó el diseño de bloques completos al Azar (BCA) con tres repeticiones, cada unidad experimental consistía de 3 metros de largo y 1.10 metros de

ancho, las aplicaciones se hicieron una vez que los plantines de cebolla terminaron de germinar.

**Variables evaluadas.**

Tiempo de fermentación

Altura de los plantines.

Longitud de la raíz.

Vigorosidad de los plantines.

pH de los bioles.

## 164. Resultados y Discusión

### 5.1.-Tiempo que se inicia la fermentación:

La fermentación se inició a las 48 horas después de la elaboración, el estiércol vacuno + biograd fue el primero en iniciar la fermentación, seguido por el biol elaborado con el estiércol de Cuy, seguido por el tratamiento que lo componen el biograd+ estiércol de Cerdo siendo estos tratamientos que de moraron mucho mas en iniciar la fermentación.



Figura 1. Inicio de fermentación de los bioles.

El tiempo que se inicia la fermentación de los bioles con los diferentes estiércoles es una muestra que la forma de elaboración, es una forma de acelerar el tiempo de fermentación, la otra forma de acelerar el tiempo de fermentación es el tipo de estiércol que se va utilizar en la fermentación de los bioles.

Otro de los ingredientes que se utilizó en la preparación de los bioles fue el biograd, este producto es el que aceleran mucho mas rápido el tiempo de fermentación, por las acciones de los hongos que tiene este producto.

Con la elaboración de los bioles de esta manera, se disminuye el tiempo de proceso, también se disminuye las cantidades de ingredientes, asimismo se reduce el costo de elaboración.

### 5.2.- Tiempo que dura la fermentación.

El tiempo de fermentación inicia cuando los biodigestores inician burbujear, esto se observa en las botellas trampa, esta botella consiste en dejar salir el aire de la descomposición (Amoniaco), y no dejar ingresar el aire atmosférico, con el fin de que la descomposición sea anaeróbica tal como se ve en la figura 3, estas botellas nos sirve para hacer el control de la fermentación de nuestros biodigestores al mismo tiempo esto nos sirve para hacer los controles de los que la fermentación esta en proceso.



Figura 2. Trampa de escape de los gases.

El tiempo de fermentación que duró las fermentaciones de los bioles con los diferentes estiércoles han sido diferentes en cada tratamiento, el biol preparado con estiércol bovino fue el que inicio primero la fermentación y también es el tratamiento que ha terminado primero la fermentación, el tiempo de fermentación para este tratamiento fue de cinco días, tal como se ve en cuadro 1.

**Cuadro 1.** Inicio y finalización de la fermentación de los bioles.

Tratamientos	Inicio de fermentación días	Fin de Fermentación días
<b>Estiercol Bovino</b>	2	7
<b>Estiercol de Cerdo</b>	5	15
<b>Estiercol de Cuyes</b>	3	13

El tratamiento que tiene el estiércol de Cuyes es que inició a los tres días y concluyo a los trece días la fermentación teniendo un tiempo de 10 días de fermentación.

El tratamiento que ha demorado mucho mas tiempo en la fermentación fue el biol elaborado con estiércol de cerdo, iniciando a los 5 días y finalizando a los 15 días, el tiempo de fermentación es igual que el biol elaborado con estiércol de cerdo, con esta forma de elaboración del biol se disminuye el tiempo de fermentación de 20-30 a 10 hasta 15 días en la elaboración del biol.

### 5.3.- Altura Plantines.

La variable de altura de planta de los plantines de cebolla en almaciguera se han evaluado después de haber realizado la primera aplicación (80% de germinación de los plantines), se recomienda tres aplicaciones para tener un efecto de los viales, en este ensayo se ha realizado tres aplicaciones con un intervalo de 7 días por aplicación,

Para la variable de altura de los plantines de cebolla se observa diferencias significativas ( $p=0.0271$ ), entre tratamientos (Fig. 3), a la aplicación de los diferentes bioles realizados.

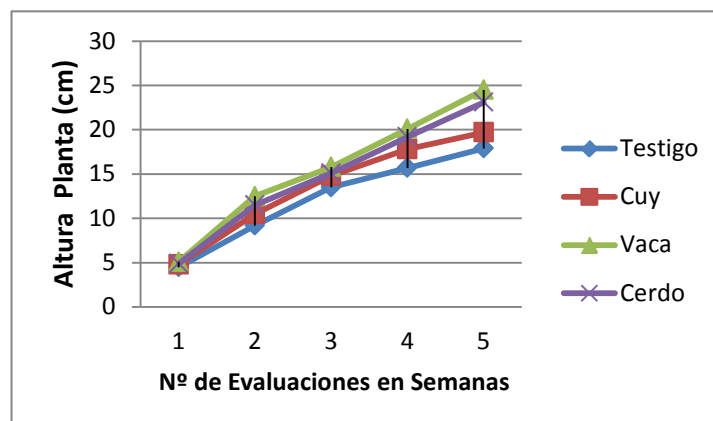


Fig. 3 Efecto de los diferentes tratamientos a la altura de cultivo de cebolla en almaciguera

El tratamiento que tiene un mayor desarrollo de los plantines de cebolla fue el tratamiento que tiene como ingrediente el estiércol de Vaca y el Biograd, este tratamiento a obtenido una altura de 24 centímetros de altura en cinco semanas. El tratamiento que lo estuvo después del tratamiento de vaca es el tratamiento de Cerdo con una altura de 22 centímetros. Asimismo estos tratamientos no tienen diferencias estadísticamente entre estos tratamientos pero si son diferentes a los tratamientos del testigo y el tratamiento de Cuy.

El tratamiento testigo y el de Cuy no tienen diferencias significativas entre tratamiento pero si tienen diferencias significativas a los tratamientos de Vaca y Cerdo, con estos últimos se puede decir que cuando aplicamos biol de estos tratamientos la respuestas de los plantines de cebolla son mucho mejor que los tratamientos de Cuy y el testigo. Asimismo se ha visto un efecto positivo a los bioles en los plantines de cebolla, se han observado plantas más sanas, y con mayor vigorosidad.

#### 5.4.- Longitud de las raíces.

La longitud de raíz de los plantines cebolla se han evaluado gradualmente según se hicieron las aplicaciones de los diferentes bioles, esto quiere decir que las evaluaciones se hicieron semanalmente hasta el transplante definitivo en campo, en las diferentes unidades experimentales donde se aplicaron los diferentes bioles.

Para esta variable de respuesta longitud de las raíces de los plantines de cebolla se tiene diferencias significativas ( $p=0.0024$ ) entre tratamiento (figura 4).

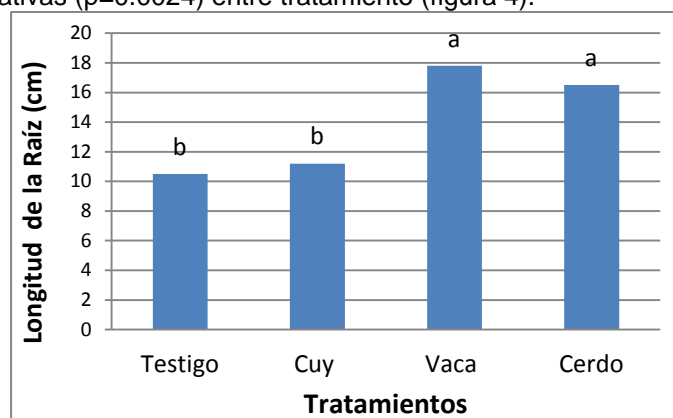


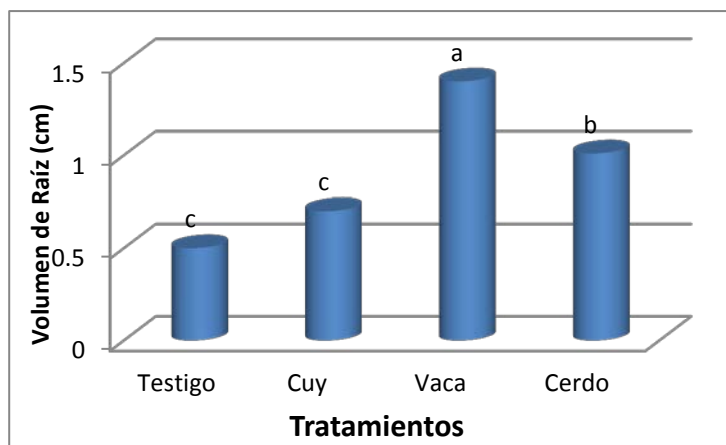
Fig. 4. Efecto de los tratamientos a la longitud de las raíces de los plantines de cebolla.

Los tratamientos que no tienen diferencias significativas entre tratamientos son los de Vaca y Cerdo, siendo estos los que tienen un mayor desarrollo de la longitud de las raíces que los demás, estos a la vez tienen un longitud de la raíces de una media 15.4 cm, de donde se puede deducir que utilizando el biol elaborado a base de estiércol de Vaca y Cerdo con la formulación del biograd la respuesta de los plantines de cebolla son mejor que los tratamientos de cuy y el testigo.

Con la formulación con la cual se realizó los bioles se ve que no se tiene efectos negativos en el desarrollo de la raíces de las plántulas de cebolla, sin embargo se puede deducir que se tiene mayor desarrollo radicular en los tratamientos de Vaca y Cerdo, el testigo es el que tiene menor longitud de las raíces de los plantines de cebolla, asimismo también se observo que el biol con estiércol de Cuy tiene menor efecto en la longitud de la raíces de los plantines de cebolla.

#### 5.5.- Volumen de raíz.

Para esta variable de respuesta de Volumen de Raíz de los plantines de cebolla, se ha realizado las evaluaciones semanalmente, desde el iniciado de las aplicaciones de los diferentes bioles, para ver si la aplicación de los bioles tienen un efecto en el volumen de las raíces de los plantines de cebolla se ha realizado el análisis estadístico, donde se tiene efectos altamente significativos ( $p=0.0001$ ) entre tratamientos. (Figura 5).



**Fig. 5.** Efecto de los tratamientos al volumen de las raíces de los plantines de cebolla.

En la figura 5, se observa que el biol con estiércol de vaca aplicado a los plantines de cebolla se tiene un mayor desarrollo de las plantas asimismo, se tiene un mayor volumen de raíz, esto indica que cuando aplicamos biol de vaca se tiene mayor volumen de las raíces de las plantas de cebolla, el tratamiento de lo sigue es el biol de Cerdo, este biol aplicado a las plántulas de cebolla se tiene un efecto positivo en el volumen de raíz de las plántulas de cebolla, obteniendo un volumen promedio de 1.16 cm.

Los tratamientos del testigo y el Cuy no tienen diferencias significativas entre tratamientos pero si son diferentes a los tratamientos de Vaca y cerdo, tal como se ve en la figura 5, los tratamientos de testigo y cuy tienen un menor volumen de raíz, esto nos indica que el biol realizado con la fórmula anterior no tiene un efecto negativo en el desarrollo de las plántulas de cebolla más bien con esta fórmula se mejora el desarrollo de las plantas.

#### 5.6.- pH de los bioles elaborados con diferentes estiércoles.

En cuadro 2, se observa los diferentes pH de los bioles esta evaluación lo ha realizado al final de la fermentación.

**Cuadro 2.** pH de los bioles al final de la fermentación.

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Promedio
<b>Cuy</b>	5.2	4.9	4.9	<b>5</b>
<b>Vaca</b>	4.8	4.9	4.9	<b>4.86</b>
<b>Cerdo</b>	4.9	4.8	4.9	<b>4.86</b>

En el cuadro 2, se tiene pH ácidos el tratamiento de cuy tiene un pH de 5, los tratamientos de vaca y cerdo tienen un pH de 4.86, de donde se puede deducir que el biol tiene una mayor disponibilidad de P en la solución y está disponible para la planta.

#### 165. Conclusiones y Recomendaciones

El tratamiento que ha obtenido un mayor desarrollo de las plántulas de cebolla es el tratamiento en el que se ha utilizado el biol de Vaca, en la variable longitud de las raíces también es el tratamiento de Vaca el que tiene diferencias significativas en relación a los demás tratamientos, de donde se deduce que el biol elaborado en base a estiércol de vaca y la fórmula del biograd ayudan en el desarrollo de las plantas, asimismo también ayudan en la longitud y volumen radicular de las plántulas de cebolla.

#### 166. Bibliografía consultada

- Direction de l'aménagement des terres, Guide de fertilisation des cultures, mars 2001, Nouveau Brunswick Canada

- J. Restrepo Rivera, Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2001

## **Evaluaciones de medios para sustituir la leche en la elaboración de biol**

**Responsable: Walquer Arandia, Camille Nohilan y Noel Ortuño**

### **Compendio:**

Se realizó tres bioles diferentes para conseguir un biol más ácido. Cada uno tenía una dosis de levadura diferente. Los bioles no tenían leche sino harina de sangre. Para elaborar los bioles, se formuló tres diferentes tipos de Biograd. Concluyendo que la variable de temperatura cambia en el transcurso del día: la actividad es más fuerte en la mañana. Las burbujas registraron los máximos de actividad en la tarde. La influencia de la altura sobre la temperatura afirma que la actividad microbiológica se encuentra al fondo del bidón. Al principio la fermentación se produce en todos los lugares del bidón y después de una semana se localiza más al fondo donde se encuentra el estiércol pesado que cae al fondo. Entonces para notar que la fermentación está verdaderamente acabada hay que medir la temperatura a 10 cm del suelo. El pH podría ser un buen factor de control para seguir la fermentación de los bioles. Cuando el pH llega a un valor de 5,2 podemos concluir que la fermentación es cuasi acabada y cosechar los bioles. El burbujeo no es suficiente para determinar el momento de cosecha de un biol. Se detiene mucho tiempo antes de finalizar la fermentación. La dosis de levadura presente en un biol es un parámetro que afecta a la fermentación y a unos parámetros físicos de los bioles. Un efecto de los tratamientos se nota a las alturas de medida de la temperatura de 30 y 45 cm. Aquí se nota un lazo significativo entre el burbujeo y la temperatura producida por la fermentación. La dosis de levadura influye sobre el tiempo de fermentación ya que el punto de estabilización del pH se alcanza más rápidamente por las dosis de levadura más grandes en los bioles. En cuanto a los tratamientos, las diferentes dosis de levadura no parecen tener un efecto fuerte sobre la acidificación de los bioles. Sin embargo estas dosis han mostrado que actúan sobre el tiempo de fermentación y la intensidad de la fermentación.

**Palabras claves:** Biol, biofertilizante, leche, harina de sangre, temperatura, pH

### **167. Objetivos:**

- Sustituir la leche en la elaboración de biol.
- Obtener un perfil de variaciones de la temperatura y pH del biol durante su formación. Ver si podemos usar la temperatura y pH como factor de control de calidad de los bioles.

### **168. Hipótesis**

No se puede suplir la leche con harina de sangre.

La temperatura y pH del biol no son factores a considerar para el control de calidad de bioles.

### **169. Revisión de literatura**

La fertilización representa una etapa clave del manejo de los cultivos. Una fertilización bien manejada asegura una buena cosecha en cantidad y calidad. Los fertilizantes llevan a las plantas los nutrientes que faltan en el suelo. Sobre todo potasio, fósforo y de nitrógeno. (Guide fertilisation des cultures, 2001)

En la agricultura orgánica los biofertilizantes fermentados desempeñan un papel muy importante en América del Sur. Estos abonos disponen de una gran diversidad ya que se pueden elaborar



directamente en la finca: los agricultores tienen su propia receta y sus secretos de elaboración. Entre esos biofertilizantes se encuentra el biol.

El biol es un biofertilizante foliar fermentado. El uso de este abono, muy sencillo de elaboración, es importante en Bolivia y asegura a los agricultores la disponibilidad de un fertilizante eficiente a un precio bajo. El biol es el producto de la fermentación anaeróbica de estiércol mezclado a agua, una fuente de azúcar, leche y otros ingredientes propios a cada uno y al cultivo para quien se elabora. (J. Restrepo Rivera)

La fuente de nitrógeno en el biol proviene del estiércol y de la leche. La leche es un alimento de alta concentración proteica. El proceso de fermentación va a liberar algunos ácidos aminos de estas proteínas, disponibles para los cultivos como fuente de nitrógeno. (J. Restrepo Rivera) Sin embargo la presencia de la leche en sus ingredientes molesta. En efecto, hay regiones de Bolivia donde este alimento es escaso. Aparece muy importante encontrar a algún ingrediente para sustituir la leche y así asegurar la seguridad alimentaria de los campesinos Bolivianos.

La harina de sangre es un producto que presenta como la leche un alto nivel de proteínas. Se produce en los mataderos. Proviene de la sangre de vaca que se hace secar. Este ingrediente es muy fácil de conseguir y por un precio bajo en todas las partes de Bolivia, sin amenazar a la seguridad alimentaria de los campesinos.

La idea sería entonces reemplazar la leche por la harina de sangre. Además la fuente de fósforo que es el biol parece más interesante si el pH del biol es ácido. En efecto, el fósforo se solubiliza en una forma disponible para las plantas cuando está en una solución ácida. La meta de este trabajo es conseguir a elaborar un biol más ácido y sin leche trabajando con la dosis de levadura contenida en el biol, y la harina de sangre. Esta idea viene del hecho de que las levaduras van a transformar los azúcares presentes en el biol en ácidos quienes van a bajar el pH del biol.

Además, para mejorar los bioles producidos en el campo hay que encontrar un factor de control de la fermentación para saber cuando la fermentación termina y si se puede cosechar el biol. La temperatura y el pH son dos variables que cambian durante el proceso de fermentación de los bioles. Entonces pueden estar interesantes para seguir esta fermentación.

## **170. Materiales y métodos**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Biológico**

Ingredientes del biol: estiércol fresco de vaca, harina de sangre, chancaca diluida, levadura, agua.

#### **4.1.2. Herramientas**

Bidones de 60 L de plástico opaco con sus tapas y sus mangueras, armados de grifo, botellas de refresco vacías, un termómetro, un pHmetro, baldes, una balanza, una regla, vasos de plástico, cinta, papel y lápiz.

### **4.2. Métodos**

#### **4.2.1. Elaboración del biol sin leche**

Para conseguir en hacer un biol más ácido, hicimos tres bioles diferentes. Cada uno tenía una dosis de levadura diferente. Los bioles que hicimos no tenían leche sino harina de sangre.

Hicimos los tres tratamientos presentados en la Tabla 1 y Tabla 2, con tres repeticiones en cada uno.

Tabla 1. Cuadro recapitulativo de los ingredientes de cada biol.

<b>Tratamiento 1</b>	<b>Tratamiento 2</b>	<b>Tratamiento 3</b>
Estiércol ¼ del bidón Biograd 4 2lts Agua 40lts	Estiércol ¼ del bidón Biograd 5 2lts Agua 40lts	Estiércol ¼ del bidón Biograd 6 2lts Agua 40lts

Tabla 2. Cuadro recapitulativo de los ingredientes de cada biograd.

<b>Ingredientes</b>	<b>Biograd 4</b>	<b>Biograd 5</b>	<b>Biograd 6</b>
Levadura (gr)	125	250	500
Chancaca diluida (cc)	750	750	750
Harina de sangre (gr)	250	250	250
Total (lt)	1	1	1

Para elaborar los bioles, primero hicimos los diferentes tipos de biograd tres veces por cada uno (Figura 1).

Después mezclamos en los bidones el estiércol de vaca, el agua y el biograd y movimos hasta que todo fuera bien mezclado (Figura 2).

Enseguida tapamos y sellamos la tapa y el bidón con cinta. Llenamos una botella de agua. Conectamos un tubo a la tapa del bidón. La extremidad libre del tubo estaba en el agua de la botella (Figura 3).



Figura 1. Los tres tipos de biograd y sus repeticiones.

En fila de la izquierda a la derecha el biograd 4, 5 y 6. De adelante hacia el fondo las tres repeticiones de cada tipo de Biograd.



Figura 2. Dos etapas de la elaboración del biol.

En la figurografía de izquierda se ve un bidón lleno de estiércol de vaca a un cuarto. En la figurografía de derecha se ven los bidones con su biograd listo para estar mezclado con el estiércol y el agua.



Figura 2. Dispositivo de elaboración de los bioles.

Con la cinta pegamos una tira de papel de 1 cm de largo desde el alto del bidón hasta abajo. En esta tira hicimos tres marcas: una a 10 cm del suelo, otra a 30 cm y otra a 45 cm del suelo. En estas marcas siempre se medía la temperatura.

#### 4.2.2. Elaboración del testigo de temperatura

Para seguir las variaciones de temperatura en los bidones de bioles se necesitaba un testigo de temperatura para borrar las variaciones ligadas con las variaciones de temperatura de afuera. Por este caso llenamos otro bidón de plástico de 60 L con agua. Lo tapamos igual y lo armamos de la misma manera que los bidones de los bioles con una tira de papel y sus marcas a 10, 30, 45 cm del suelo.

### 4.2.3. Evaluación de la fermentación de los bioles

Durante de este ensayo seguimos:

- Las variaciones del pH dos veces al día, cada día, en la mañana y en la tarde.
- La temperatura de los bidones a 10, 30 y 45 cm del suelo en los bidones de biol y en el bidón testigo con agua tres veces al día.
- La presencia y intensidad de las burbujas :

0 = 0 bur/min
1 : 1-30 bur/min
2 : 31-60 bur/min
3 : 61-más bur/min

El primer día se registro la hora de cierre del bidón, ti y la hora de aparición de las primeras burbujas, tb. Este mismo día, cada dos horas, se registró la intensidad del burbujeo, lb.

Los días siguientes, tres veces al día se registró la intensidad del burbujeo y se midió la temperatura a las alturas de 10, 30 y 45 cm: a las 9, a las 12 y a las 16 horas. También se midió el pH de los bioles a las 9 y a las 16 horas. Sacando una muestra de cada biol, de aproximadamente 5 ml, por el grifo.

El ensayo se terminó cuando las burbujas cesaron por más de una semana.

Se sacó una muestra de 1L para hacer análisis en el laboratorio.

### 4.2.4. Análisis de los datos

#### 4.2.4.1. Variables de respuesta

Teníamos las variaciones del burbujeo, de la temperatura y del pH con el tiempo, de cada una de las repeticiones y por cada tratamiento.

La temperatura usada por los análisis es la sustracción de la temperatura medida a una altura de un bidón de biol menos la temperatura medida a la misma altura en el bidón de agua. Tenemos así la producción de calor correlacionada a la fermentación.

Descompusimos el tiempo en tres grupos: las medidas hechas en la mañana entre 8 y 11h van en el grupo 1, las medidas hechas a medio día de 11h a 15h, en el grupo 2 y las medidas hechas en la tarde de 15h a 17h en el bloque 3.

Para hacer los análisis trabajamos con las variables siguientes:

- $B_1$  = tiempo a partir del cual el burbujeo no alcanzaba más los valores 2 o 3 y se quedaba superior a 0.
- $B_0$  = tiempo a partir del cual el burbujeo no alcanzaba más el valor 1 por más de 3 días.
- $t_{stab}$  = tiempo a partir del cual el pH alcanzaba su valor mínima.
- $dt_{stab}$  = tiempo entre el fin del burbujeo y la estabilización del pH =  $t_{stab} - B_0$
- $T_{med10}$  = la media de la temperatura durante todo el tiempo de fermentación a la altura de 10 cm del suelo
- $T_{med30}$  = la media de la temperatura durante todo el tiempo de fermentación a la altura de 30 cm del suelo
- $T_{med45}$  = la media de la temperatura durante todo el tiempo de fermentación a la altura de 45 cm del suelo

#### 4.2.4.2. Análisis Estadístico

Para hacer los análisis trabajamos con el logicial R.

La hipótesis de trabajo era que cada medida de temperatura a una altura, de pH y de burbujeo a dos tiempos diferentes eran independientes. Con esta aproximación cada medida estaba considerada como un individuo de las variables estudiadas.

#### 4.2.4.2.1. Obtener un perfil de los diferentes bioles

Con las variables  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $t_{stab}$ ,  $dt_{stab}$ ,  $T_{med10}$ ,  $T_{med30}$ ,  $T_{med45}$  vimos como se repartían los diferentes bioles. Por eso hicimos un ACP con el logicial R. Se usa la función *ACP* de R.

#### 4.2.4.2.2. Temperatura como factor de control

Probamos la influencia de la altura de medida, de la hora de medida y de los tratamientos sobre la temperatura realizando un análisis de la varianza con tres factores. Por eso se usó las funciones *lm* y *anova*. El modelo era el siguiente:

*Temperatura ~ altura de medida + tratamiento + tiempo + altura de medida\*tratamiento\*t tiempo + tiempo\*altura de medida + tiempo\*temperatura + temperatura\*altura de medida*

Teníamos que ver si existía un lazo entre la temperatura y la intensidad del burbujeo. Otra vez usamos la función *lm* y la función *anova* con el modelo siguiente:

*Temperatura ~ burbujeo+ tratamiento + tiempo + tratamiento\*t tiempo + burbujeo\*t tiempo+ tratamiento\*burbujeo + tratamiento\*t tiempo\*burbujeo*

#### 4.2.4.2.3. El burbujeo como factor de control

Era interesante ver si los tratamientos tenían alguna influencia sobre el burbujeo. Entonces hicimos un análisis de la varianza con un factor con las funciones *lm* y *anova*, usando el modelo siguiente:

*Burbujeo ~ tratamiento*

Después vimos como actuaba este efecto: ¿Un biol más concentrado en levadura acababa más temprano su fermentación? Para contestar a esta pregunta, trabajamos con las variables  $B_1$  y  $B_0$ . Había que trabajar con las funciones *lm* y *anova*, usando los modelos siguientes:

*B<sub>1</sub> ~ tratamiento*

*B<sub>0</sub> ~ tratamiento*

#### 4.2.4.2.4. El pH como factor de control y acidificación de los bioles

Para ver si los tratamientos tienen alguna influencia sobre el pH hicimos un análisis de la varianza con un factor con las funciones *lm* y *anova*, usando el modelo siguiente:

*pH ~ tratamiento\*t tiempo + tratamiento + tiempo*

Después vimos como actuaba este efecto: ¿Un biol más concentrado en levadura acababa fermentación más temprano? ¿Y un biol más concentrado en levadura es más ácido? Para contestar a estas preguntas, trabajamos con las variables  $t_{stab}$  y  $dt_{stab}$  y con las funciones *lm* y *anova*, usando los modelos siguientes:

*pHf ~ tratamiento*

*t<sub>stab</sub> ~ tratamiento*

*dt<sub>stab</sub> ~ tratamiento*

También se vio el lazo existente o no entre el pH y el burbujeo.

## 171. Resultados y Discusión

### 5.1. Perfil de los bioles

Los tres tipos de biol se individualizan según las variables medidas durante la fermentación (Figura 5).

Tabla 3. Cuadro recapitulativo de las medias de las variables seguidas en cada tratamiento durante la elaboración del biol.

Media	Tmed10	Tmed30	Tmed45	B1	B0	tstab	dtstab	pHf
1	27,2	26,4	26,9	24	161,5 *	338,3 a	178 a	5,03
2	26,8	26,5	26,7	24	174,5 *	325,3	153,5	5,07
3	26,9	26,5	26,6	24	188,7 *	320 a	131,3 a	4,97

a: variables cuya diferencia es significativa con un error de 5%, \*: variables con un efecto significativo de los tratamientos,  $p < 0,05$ .

La primera dimensión del ACP está correlacionada con las variables de fermentación, de pH y de temperatura a 10 cm del suelo, mientras la segunda dimensión está ligada con las variables de temperatura a 30 y 45 cm del suelo (Ilustración 4 y Tabla 4. Variables seguidas y su contribución en la definición de las dimensiones del ACP. Tabla 4). Las variables B<sub>0</sub>, tstab, dtstab et pHf están correlacionadas. Las variables de temperatura Tmed10 y Tmed30 también están correlacionadas.

Podemos ver que el primer axis segrega a los tres tipos de biol si se excluye el individuo 13. Hay una mezcla al nivel de los individuos 23 y 31. Entonces el primer axis es ligada con la dosis de levadura: las variables de fermentación y el pHf están entonces ligadas con la dosis de levadura de cada uno de los bioles.

El testigo se encuentra abajo a la izquierda. Esta posición es el reflejo de la temperatura más baja del testigo.

Parecería que más un biol es concentrado en levadura, más rápido alcanza su pH final cual es más bajo, la intensidad de su fermentación se mantiene a un nivel importante (intensidad de 1 por lo menos) más tiempo (B<sub>0</sub> más grande, Tabla 3) y acaba su fermentación más rápidamente.

Tabla 4. Variables seguidas y su contribución en la definición de las dimensiones del ACP.

	Dimensión 1					Dimensión 2	
	dtstab	pHf	Tmed45	tstab	B0	Tmed30	Tmed10
Correlación	0.885	0.739	0.704	0.664	-0.881	0.855	0.795
p-value	0.000672	0.0147	0.0229	0.0363	0.000757	0.00161	0.00596

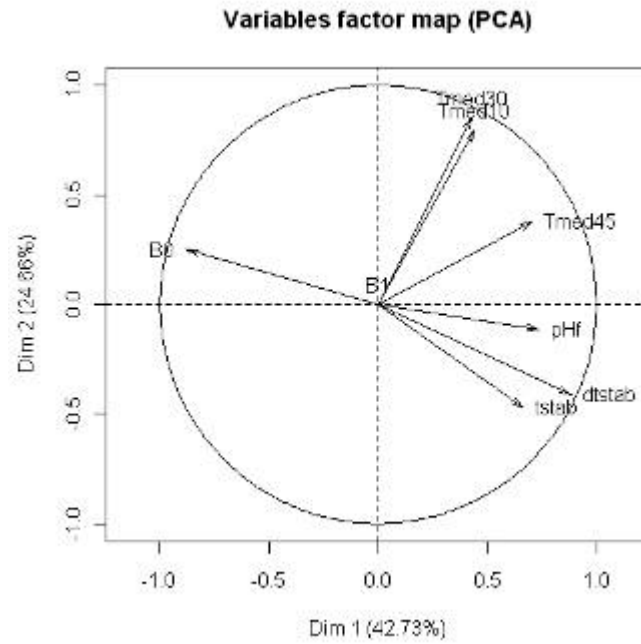


Figura 3. Variables seguidas durante la elaboración de los bioles y su contribución en la explicación de los axis del ACP.

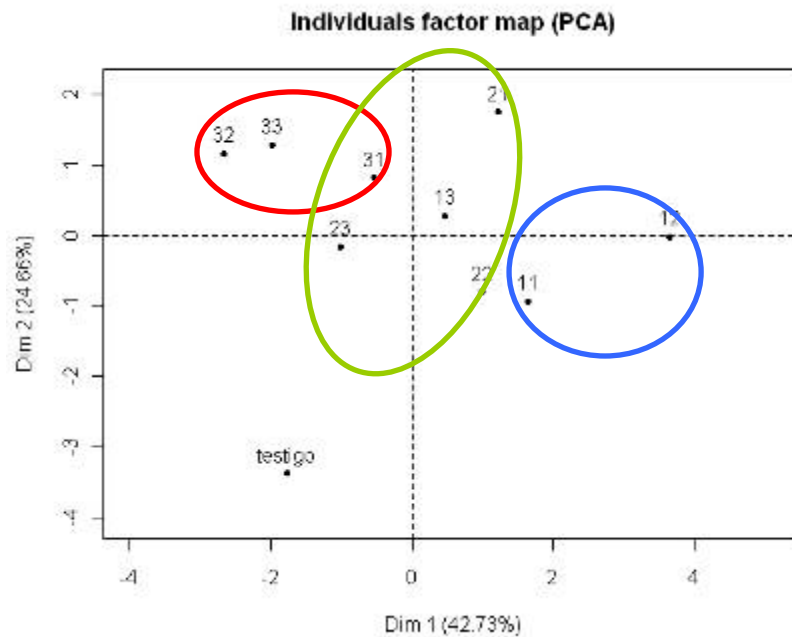


Figura 4. Distribución de los individuos según las dos dimensiones principales del ACP. Los círculos aíslan los tres tratamientos diferentes.

## 5.2. La temperatura como factor de control

### 5.2.1. Evolución de la temperatura con el tiempo

La temperatura producida por la fermentación en los bidones cambia con la altura y el tiempo. Más que todo se observa el efecto del tiempo con las variaciones cotidianas de temperatura (Figura 6). Un efecto de los tratamientos se manifiesta también con el tiempo (Tabla 5).

Después de 150 horas de fermentación las temperaturas medidas se individualizan según los niveles de medida: la temperatura es más alta a 10cm y más baja a 45cm.

**¡Error! Vínculo no válido.**

Figura 5. Gráfico de evolución de la temperatura con el tiempo a las tres alturas de medidas.

Cada punto es la media de los 9 valores de temperatura que tenemos a una altura dada.

Tabla 5. Resultados del análisis de la variancia multifactorial.

	altura	tiempo	tratamiento*tiempo
p-value	< 2e-16*	< 2e-16*	0.0155*
Estadística del test	415	291	5.88

\*:Test significativo con una probabilidad de error de 5%.

La producción de calor la más importante se encuentra a la altura de 10 cm del suelo y en la mañana. La temperatura es más baja a la altura de 45 cm. La producción de temperatura baja en el día (Tabla 6). El valor negativo de la media de la temperatura a 45 cm en la tarde muestra que a este momento y a esta altura la temperatura de los bioles es más baja que la del agua.

Tabla 6. Medias de la temperatura causada por la fermentación de todos los individuos según el momento y la altura de medida.

	10 cm	30 cm	45 cm
Mañana	4.28	2.83	1.53 *
Medio día	3.67	2.02	0.238
Tarde	1.47	0.283	-0.672

\*: efecto de los tratamientos de manera significativa con un riesgo de 5% de error.

Para el análisis siguiente trabajamos con los valores de temperatura medidos a la altura de 10 cm del suelo ya que esta zona parece estar una zona de producción de calor más fuerte o sea de fermentación más intensa.

El análisis de la variancia a un factor entre la temperatura de la fermentación y la modalidad "tratamiento" no muestra un lazo significativo a ningún momento del día a las alturas de 10 y 30 cm. Pero observamos un lazo entre la temperatura y los tratamientos a la altura de 45 cm en la mañana.

### 5.2.2. El lazo entre la temperatura de los bidones y la fermentación

El análisis de la variancia entre la temperatura a 10 cm del suelo y el burbujeo da un resultado no significativo. No existe un efecto del burbujeo sobre la temperatura a esta altura. Con las alturas de 30 y 45 cm un efecto se nota. Los resultados están presentados en la Tabla 7, la Figura 7 y la Figura 8.

Cuando no se nota un burbujeo (valor igual a 0) las temperaturas de los biodigestores son más bajas. La mitad de las temperaturas medidas son debajo de 26,3°C en ambos casos (a 30 o 45 cm).



Los tres cuartos de las medidas de temperatura cuando el burbujeo es ausente (valor de 0) son debajo de una temperatura de 27°C.

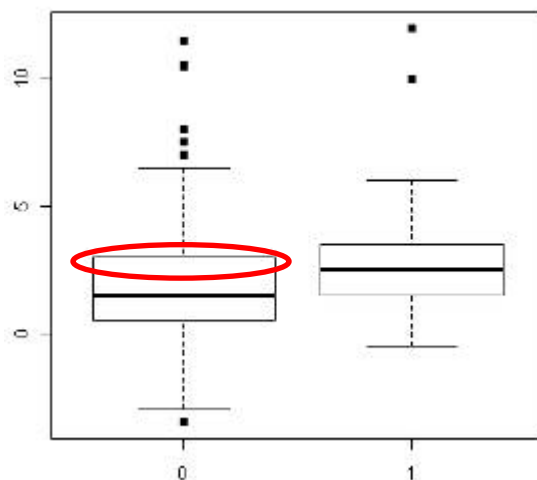


Figura 6. Histograma de la temperatura a 30 cm en función de la intensidad del burbujeo.

Para obtener este histograma hemos trabajado con todos los individuos de todos los tratamientos mezclados. El círculo rojo indica el tercer cuartil del histograma cuando el burbujeo es ausente.

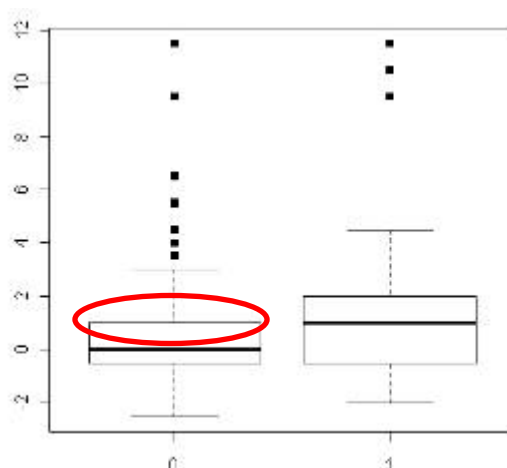


Figura 7. Histograma de la temperatura a 45 cm en función de la intensidad del burbujeo.

Para obtener este histograma hemos trabajado con todos los individuos de todos los tratamientos mezclados. El círculo rojo indica el tercer cuartil del histograma cuando el burbujeo es ausente.

Tabla 7. Resultados del análisis de la variancia a un factor entre la temperatura y el burbujeo, y medias de temperatura según la intensidad del burbujeo.

Altura	Efecto burbujeo, p-value	Temperatura media por un burbujeo de 1	Temperatura media por un burbujeo de 0
30 cm	0.000554	2,66 a (26,9)	1,74 a (26,0)
45 cm	0.000435	1,19 b (27,2)	0,45 b (26,3)

a, b: valores significativamente diferentes con  $p\text{-value} < 0,05$ . En paréntesis los valores de temperatura sin la corrección ambiental.

### 5.3. El burbujeo como factor de control

Hay un efecto del tiempo (Figura 9) sobre el burbujeo. En la mañana el burbujeo tomaba los valores 0 o 1. A medio día el burbujeo tomaba unos valores entre 0 y 2. Los únicos momentos cuando el burbujeo alcanza los valores de 3, o sea sus valores más fuertes son en la tarde.

Los tratamientos afectan los valores de B0 (Tabla 3) y el burbujeo de manera general. Más el biol es concentrado en levadura, más sus valores de B0 son grandes, la intensidad de la fermentación se queda a un nivel alto durante un tiempo más grande.

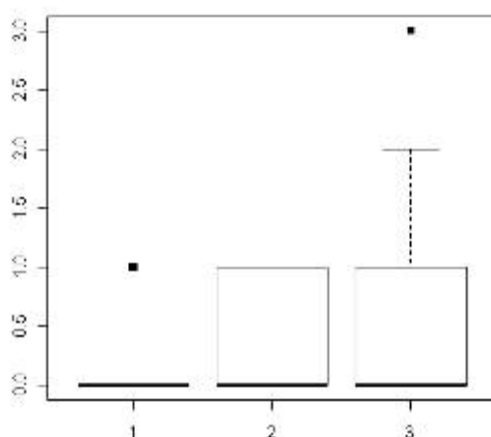


Figura 8. Intensidad del burbujeo según el momento del día.

1: en la mañana o sea antes de las 11 ; 2: a medio día o sea de las 11 a las 3 de la tarde ; 3: en la tarde o sea después de las 3 de la tarde.

### 5.4. El pH como factor de control y acidificación de los bioles

Los tratamientos no influyen el pH de los bioles de manera significativa. Pero influye el intervalo de estabilización de los bioles (Figura 11). Más un biol es concentrado en levadura, más su intervalo de estabilización es corto. A la bajada de la intensidad del burbujeo el biol alcanza de una manera más rápida su pH final cuando su concentración en levadura es más alta (Tabla 3, Figura10).

**¡Error! Vínculo no válido.**

Figura 9. Gráfico de la evolución del pH en los tres tratamientos con el tiempo.

Cada tratamiento es una media de los datos obtenidos por las tres replicaciones de un tratamiento.

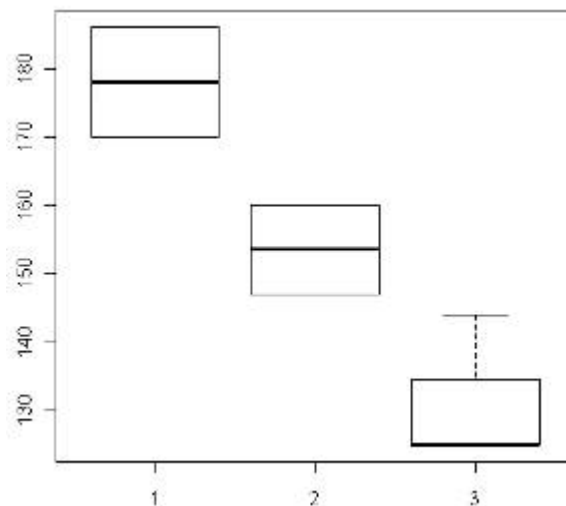


Figura 10. Gráfico del intervalo de estabilización de los bioles en función de los tratamientos.

El tiempo de estabilización depende de la dosis de levadura como lo muestra la Ilustración 12. Más un biol es concentrado en levadura más su tiempo de estabilización es bajo. La fermentación ocurre más rápidamente. La diferencia de tiempo de estabilización del pH entre el tratamiento 1 y el tratamiento 3 es de 18 horas.

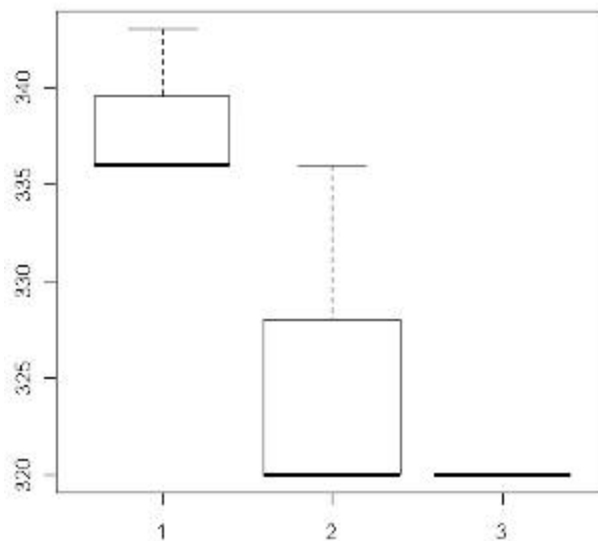


Figura 11. Gráfico del tiempo de estabilización por los tres tratamientos.

El lazo del pH y de la fermentación se nota cuando hacemos un análisis de la variancia a un factor entre el pH y la intensidad del burbujeo. El resultado es significativo (Figura 13). El pH es más bajo cuando no se nota más de burbujas (valor de 0). Más de tres cuarto de las medidas de pH asociadas a un burbujeo de 0 son debajo del valor de 5,5. Mientras más de tres cuarto de las medidas de pH asociadas a un burbujeo de 1 son superiores a un pH de 5,6.

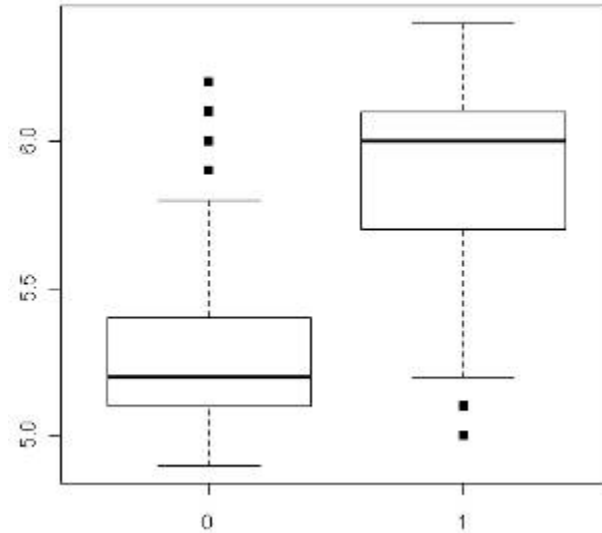


Figura 12. Gráfico del pH en función de la intensidad del burbujeo.

## 172. Conclusiones y Recomendaciones

De acuerdo a los resultados anteriores podemos concluir:

- La variable de temperatura cambia en el día: la actividad es más fuerte en la mañana. O es que el biol tiene una inercia térmica más grande que el agua y conserva el calor producido en el día toda la noche sin enfriarse. Al nivel de las burbujas los máximos de actividad son en la tarde, eso firma pues una actividad más fuerte en la tarde cuando la temperatura afuera es más alta. Entonces lo que podría explicar este fenómeno es la presencia de una pequeña actividad microbiológica en la noche que mantiene la temperatura alta mientras que la del agua baja en la noche ya que en este bidón no hay ninguna fermentación.
- La influencia de la altura sobre la temperatura es la firma de que la actividad microbiológica se encuentra al fondo del bidón. Al principio la fermentación se produce en todos los lugares del bidón y después de una semana se localiza más al fondo donde se encuentra el estiércol pesado que cae al fondo. Entonces para notar que la fermentación está verdaderamente acabada hay que medir la temperatura a 10 cm del suelo. Sería la mejor altura para seguir la fermentación de un biol. Pero no hay un valor umbral que se destaca y que puede servir de límite para saber si sí o no podemos cosechar los bioles.
- En cambio el pH podría ser un buen factor de control para seguir la fermentación de los bioles. Cuando el pH llega a un valor de 5,2 podemos concluir que la fermentación es casi acabada y cosechar los bioles. Además el pH muestra menos variaciones con el medio ambiente y llega a una constante que puede servir de referencia y de señal de cosecha.
- De la misma manera que la temperatura el burbujeo, que es una prueba de la presencia de una actividad de los microorganismos del biodigestor, no es suficiente para determinar el momento de cosecha de un biol. Se para mucho tiempo antes del fin de la fermentación.
- La dosis de levadura presente en un biol es un parámetro que afecta a la fermentación y a unos parámetros físicos de los bioles.
- La presencia de levadura en mayor concentración aumenta la intensidad de la fermentación. El biol fermenta con mucha más fuerza por un tiempo más importante y

por eso alcanza más rápido su pH final cuando la dosis de levadura que contiene es más alta.

- Un efecto de los tratamientos se nota a las alturas de medida de la temperatura de 30 y 45 cm. Aquí se nota un lazo significativo entre el burbujeo y la temperatura producida por la fermentación. Eso se puede explicar por el hecho de que a la altura de 10 cm todos los bidones siguen fermentando mientras más arriba solo los bidones con un proceso de fermentación más lento siguen fermentando. Entonces para ver una diferencia entre dos tratamientos al nivel de su fermentación hace falta medir la temperatura por lo menos a 30 cm del suelo en el bidón.
- La dosis de levadura influye sobre el tiempo de fermentación ya que el punto de estabilización del pH se alcanza más rápidamente por las dosis de levadura más grandes en los bioles. Este lazo entre el pH y la fermentación está confirmado por el lazo que se nota entre la intensidad del burbujeo y la acidez del pH: cuando el pH baja a 5,5 no se nota más burbujeo.
- En cuanto a los tratamientos, las diferentes dosis de levadura no parecen tener un efecto fuerte sobre la acidificación de los bioles. Parece que a mayor dosis de levadura mayor la acidificación del biol pero no baja mucho el pH. Para ver si esta pequeña diferencia puede ser suficiente para las plantas, vamos a hacer la prueba de los tres tipos de biol obtenidos al campo.
- Sin embargo estas dosis han mostrado que actúan sobre el tiempo de fermentación y la intensidad de la fermentación. Este resultado también es interesante: podemos promover la elaboración de un biol enriquecido en levadura para aumentar la velocidad de elaboración de los bioles en los lugares fríos del altiplano. Pero la diferencia no es mucha: estamos ganando un día de fermentación. Sería interesante producir de nuevo tres bioles diferentes aumentando otra vez la dosis de levadura presente en los bioles y haciendo el mismo trabajo de medida del pH dos veces al día. Y si este trabajo se puede hacer en un lugar con un clima más frío, eso también sería interesante para tener la evidencia en vivo. Una fase de experimentación al campo se necesitará también para ver si no vamos a crear una fitotoxicidad en estos bioles

### **173. Bibliografía consultada**

- Direction de l'aménagement des terres, Guide de fertilisation des cultures, mars 2001, Nouveau Brunswick Canada
- J. Restrepo Rivera, Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2001

## **Evaluación de tres tipos de bioles en cultivo de cebolla**

### **Introducción**

La fertilización representa una etapa clave del manejo de los cultivos. Una fertilización bien manejada asegura una cosecha de calidad y en cantidad. Lleva a las plantas los nutrientes que faltan en el suelo. Sobre todo está fuente de potasio, fósforo y de nitrógeno. (Guide fertilisation des cultures, 2001)

En la agricultura orgánica los biofertilizantes fermentados desempeñan un papel muy fuerte en América del Sur. Estos abonos disponen de una gran diversidad ya que se pueden elaborar directamente en la finca: los agricultores tienen su propia receta y sus secretos de elaboración. Entre esos biofertilizantes se encuentra el biol.

El biol es un biofertilizante foliar fermentado. El uso de este abono, muy sencillo de elaboración, es importante en Bolivia y asegura a los agricultores la disponibilidad de un fertilizante eficiente a un precio bajo. Es el producto de la fermentación anaeróbica de estiércol

mezclado a agua, una fuente de azúcar, leche y otros ingredientes propios a cada uno y al cultivo para quien se elabora el biol. (J. Restrepo Rivera)

La fuente de nitrógeno en el biol proviene del estiércol y de la leche. La leche es un alimento de alta concentración proteica. El proceso de fermentación va a liberar algunos ácidos aminos de estas proteínas, entonces disponibles para los cultivos como fuente de nitrógeno. (J. Restrepo Rivera) Sin embargo la presencia de la leche en sus ingredientes molesta. En efecto, hay regiones de Bolivia donde este alimento es escaso. Aparece muy importante encontrar algún ingrediente para sustituir la leche y así asegurar la seguridad alimentaria de los campesinos Bolivianos.

La harina de sangre es un producto que presenta como la leche un alto nivel de proteínas. Se produce en los mataderos. Proviene de la sangre de vaca que se hace secar. Este ingrediente es muy fácil de conseguir y por un precio bajo en todas las partes de Bolivia, sin amenazar a la seguridad alimentaria de los campesinos. La idea sería entonces sustituir la leche por la harina de sangre. Además la fuente de fósforo que es el biol parece más interesante si el pH del biol es ácido. En efecto, el fósforo se solubiliza en una forma disponible para las plantas cuando está en una solución ácida. La segunda meta de este trabajo es lograr elaborar un biol más ácido trabajando con la dosis de levadura contenida en el biol. Esta idea viene del hecho de que las levaduras van a transformar los azúcares presentes en el biol en ácidos quienes van a bajar el pH del biol.

En la localidad de La Villa, en la provincia de Punata, prefectura: Cochabamba, la producción de hortalizas es bien desarrollada. Entre estas hortalizas, el cultivo de la cebolla es importante en esta zona. Este cultivo presente todo el año en esta zona por la presencia de agua y la dulzura del clima, necesita una fertilización.

Probando los diferentes bioles obtenidos con varias dosis de levadura en una parcela de cebolla en La Villa, se intentará alcanzar un rendimiento igual o mejor que el rendimiento esperado trabajando con un biol clásico, con leche con una dosis de levadura normal.

## **Objetivos**

Probar al campo los tres bioles elaborados sin leche con varias dosis de levadura y un biol con leche, para ver si tienen una eficiencia o no, si hieren los cultivos, cual es el mejor de los tres bioles elaborados y si algunos alcanzan la eficiencia del biol con leche.

## **Materiales y métodos**

### **Materiales**

#### **Biológico**

Una parcela de cebolla transplantada desde 21 días, los bioles número 4, 5 y 6, 1l de Fertisol.

#### **Herramientas**

Un envase para medir los volúmenes de una capacidad de 500 ml, una regla, una cámara, un cuadrado de papel de superficie conocida, una bolsa de plástico, una tijera, un metro de una capacidad de 50 m, estacas, pita, una mochila para aplicar los tratamientos y una balanza.

### **Métodos**

#### **El dispositivo experimental**

##### **La parcela y su historia técnica**

El ensayo fue realizado en una parcela de cebolla de la provincia de Punata en la localidad de La Villa entre Punata y Tiraque (Figurografía 1).



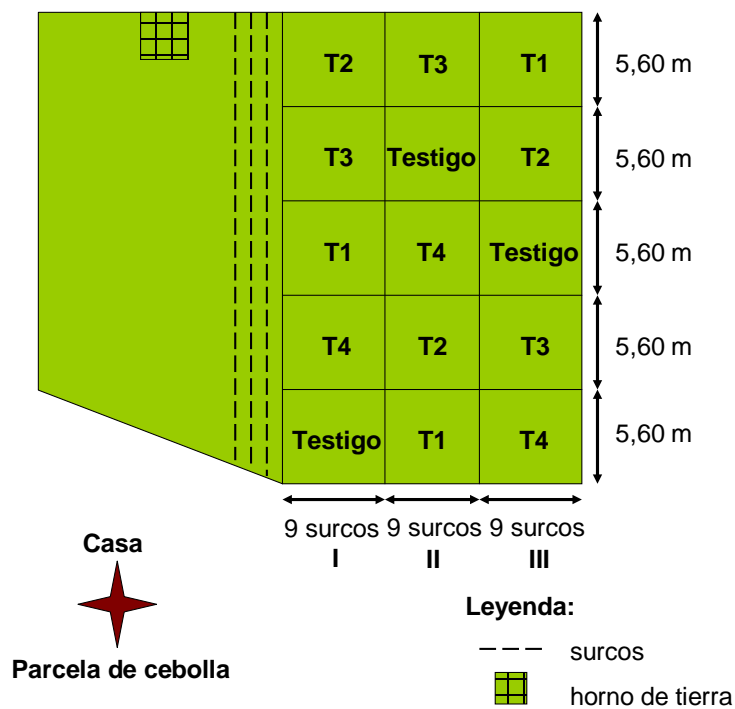
**Figuragrafia 1. Ensayo en la parcela de cebolla, La Villa, provincia de Cochabamba.**

La parcela fue transplantada al principio del mes de enero 2010. Durante del cultivo, unos tratamientos con el Acaritop estuvieron realizados para controlar las enfermedades.

### Construcción del ensayo

La construcción del ensayo fue ejecutada tres semanas después del transplante de las cebollas en la parcela, el 29 de enero 2010.

Con la ayuda de las estacas, de la pita y del metro la parcela fue recortada en tres bloques. Cada bloque era una repetición de los cuatro tratamientos y del testigo sin ningún tratamiento (Figuragrafia 1 y Figura 1).



**Figura 5. Recorte de la parcela en cebolla.** T1, tratamiento con el biol nº4 ; T2, tratamiento con el biol nº5 ; T3, tratamiento con el biol nº6 ; T4, tratamiento con Fertisol ; Testigo, testigo sin fertilizante.

## Aplicación de los tratamientos

### Los tratamientos

Tres bioles estuvieron probados : el biol n°4, el biol n°5 y el biol n°6. El Fertisol estuvo utilizado como fertilizante de referencia.

La elaboración de los tres bioles con diferentes dosis de levadura está presentada en el Cuadro 1 y en el Cuadro 2.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Estiércol ¼ del bidón Biograd 4 2lts Agua 40lts	Estiércol ¼ del bidón Biograd 5 2lts Agua 40lts	Estiércol ¼ del bidón Biograd 6 2lts Agua 40lts

**Cuadro 6. Ingredientes de los bioles 4, 5 y 6.**

Ingredientes	Biograd 4	Biograd 5	Biograd 6
<b>Levadura (gr)</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>
Chancaca diluida (cc)	750	750	750
Harina de sangre (gr)	250	250	250
<b>Total (lt)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Cuadro 7. Ingredientes de los biograd 4, 5 y 6.**

### El desarrollo de los tratamientos

Cuatro tratamientos estuvieron realizados (Cuadro 3). Por lo menos 15 días separaban dos aplicaciones.

Fecha	Dosis	Mochilas	Meteorología
29/01/10	250 ml / 5 l de agua por los cuatro tratamientos de los tres bloques del ensayo. Ha sobrado 1l de biofertilizantes después de la aplicación del biol n°6.	Aplicación de los bioles con la misma mochila.	Nubes, sol mojado. Hora de trabajo: las 11 am.
19/03/10	375 ml / 7.5 l de agua por los cuatro tratamientos de los tres bloques del ensayo.	Aplicación de los bioles con la misma mochila.	Sol. Hora de trabajo: las 11:30 am.
30/03/10	375 ml / 7.5 l de agua por los cuatro tratamientos de los tres bloques del ensayo.	Aplicación de los bioles con la misma mochila.	Nubes, había llovido. Hora de trabajo: 10 am.
14/04/10	250 ml / 5 l de agua por los bioles 5 y 6 de los tres bloques del ensayo. Ha sobrado 500 ml después de cada tratamiento. Para el biol 4 uso de 390 ml por 8 l de agua. Han sobrado 2 l. Fertisol: uso de 100 ml con 2 l de agua. Surcos centrales tratados con el fertisol.	Aplicación de los bioles con la misma mochila.	Sol. Hora de trabajo: 11:30 am.

**Cuadro 8. Calendario de fumigación del ensayo y de las condiciones de trabajo.**

El trabajo estaba realizado con una mochila, el biol de cada tratamiento estaba aplicado en los surcos sobre las hojas del cultivo. La dosis de trabajo del biol es de 1 l de biol por una mochila de 20 l. El volumen de biol estaba medido con un envase graduado (Figuragrafía 2).





**Figurografía 2. Medida de la dosis de biol y fumigación de la cebolla.**

### Evaluaciones

#### *Cuándo y cuánto*

Cuatro evaluaciones estuvieron realizadas (Cuadro 4). La primera antes de hacer el segundo tratamiento de biol, la segunda antes de hacer el tercero tratamiento de biol, la tercera antes de hacer el cuarto tratamiento, y la última a la cosecha.

Número de la evaluación	1	2	3	4
Fecha de la evaluación	19/03/2010	25/03/2010	14/04/2010	¿ /04/2010

**Cuadro 9. Fechas de evaluación del ensayo.**

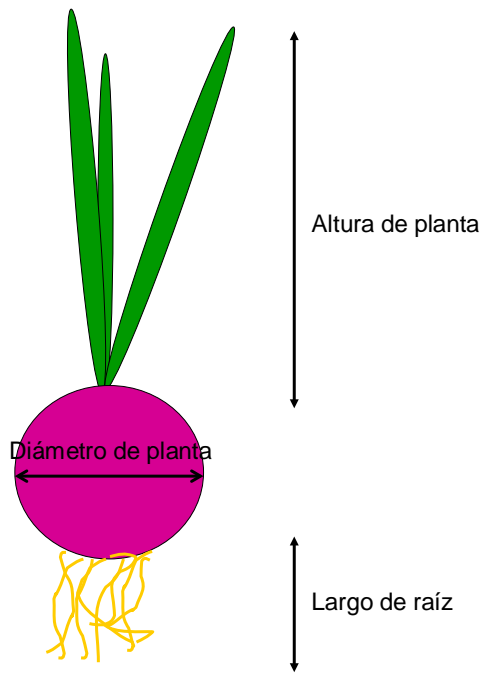
#### *Cómo*

Se evaluó cada vez las mismas diez plantas en el surco central de cada cuadro. La evaluación empezaba a aproximadamente 1 m del borde de la parcela. Las plantas evaluadas estuvieron identificadas durante la primera evaluación con una tira cortada en una bolsa de plástico.

#### *Las variables*

- La altura de planta

Medida con una regla desde el suelo hasta la punta de la hoja más alta de la planta de cebolla (Figura 2), esta variable estuvo medida a las cuatro evaluaciones.



**Figura 6. Recorte de la planta de cebolla para las evaluaciones.**

- El número de hojas

Medido a cada una de las tres primeras evaluaciones. Las hojas muertas y secas no estaban contadas.

- El área del sistema radicular

Variable de cosecha, estuvo medido con la cámara y el logicial *ImageJ*. Se sacó una figura con una referencia de tamaño conocido al lado del repollo (Figuragrafia 3).



**Figuragrafia 3. Figuragrafia de una cebolla para medir el área del sistema radicular.**

Después trabajando con el logicial *ImageJ* se sacaron las medidas de área a partir de las figuragrafías.

- La incidencia de las enfermedades

Es el número de plantas afectadas sobre el total de plantas evaluadas en el cuadro. Esta evaluación se hizo a las cuatro evaluaciones.

- La severidad de las enfermedades

Es el daño por planta. Para medir eso hay que:

- Trabajar siempre en el mismo lugar de la planta;
- Tomar siempre la misma persona evaluadora;
- Trabajar con un porcentaje de daño.

Se trabajaba con las hojas más viejas de las plantas. Esta evaluación se hizo a las cuatro evaluaciones.

- Largo de las raíces

Una variable de cosecha. Con una regla se midió el largo de las raíces desde el cuello de la raíz hasta la última raíz secundaria (Figuragrafia 4 y Figura 2)



**Figuragrafia 4. Medida del largo de las raíces de una cebolla.**

- El diámetro del bulbo

A la cosecha, con una regla se midió el diámetro el más grande del bulbo (Figura 2 y Figuragrafia 5).



**Figuragrafia 5. Medida del diámetro del bulbo.**

- El largo del bulbo

A la cosecha con una regla, se midió el largo del bulbo o sea la parte rosada de la planta.

- Peso de las plantas de cebolla

Con una balanza romana, se pesó las diez cebollas enteras de un cuadro, a la cosecha.

### Análisis de los datos

#### Las variables

Hay dos tipos de variables:

- Las **variables de crecimiento**, que son las medidas desde la primera evaluación hasta la última, la cosecha.
- Las **variables de cosecha**, que son las medidas únicamente el día de la cosecha.

#### Los análisis

Para hacer los análisis se trabajó con el logicial R.

Los datos están organizados en tres bloques. Un bloque era una repetición de un sistema de cinco cuadros con un tratamiento diferente en cada uno.

Para comparar los tratamientos y los bloques se trabajó con las funciones *lm* y *anova* para realizar un análisis de la varianza.

Se hizo un análisis de la varianza multifactorial: el primer factor es el efecto "bloque", el segundo el efecto "tratamiento" y luego las variables agronómicas.

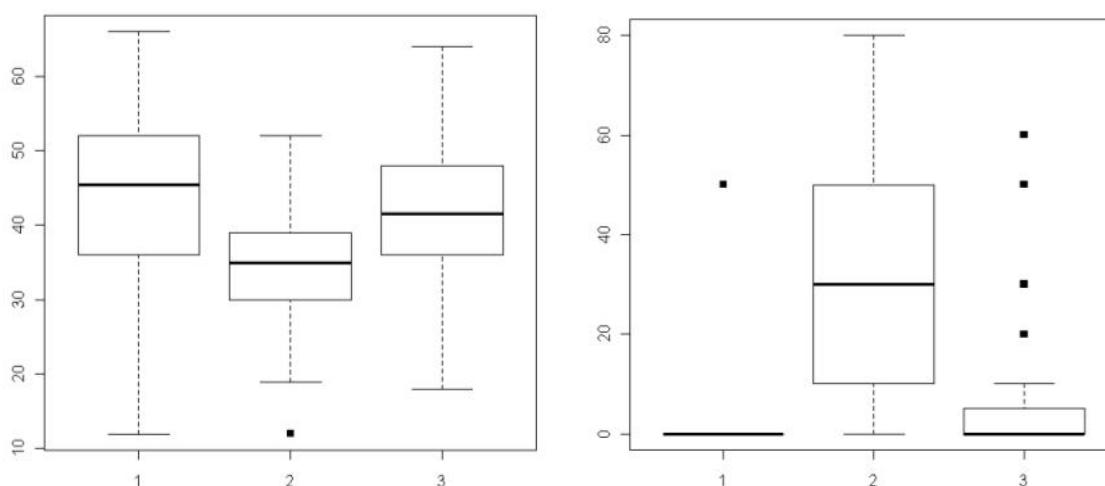
El modelo es el siguiente:

*Variable ~ bloque x tratamiento x las otras variables agronómicas x interacción entre los parámetros*

### Resultados

#### La primera evaluación

Se notó un efecto de los bloques sobre las variables. El bloque 2 se destacaba de los otros: sus plantas eran más pequeñas y más enfermas (Figura 3).



**Figura 7. Gráficos de la altura en función de los bloques a la izquierda y de la severidad de las enfermedades en función de los bloques a la derecha, a la primera evaluación. La altura está en cm, la severidad de las enfermedades está en %. El número de los bloques está en abscisa.**

Por esta razón, los análisis estuvieron realizados únicamente con los datos de los bloques 1 y 3 (Cuadro 5).

**Cuadro 10. Medias de las variables evaluadas a la primera evaluación**

	Altura	Número de hojas	Incidencia de las enfermedades	Severidad de las enfermedades
T1	43.9	6.1	10	0.75 c
T2	48.5 ab	6.6	30	2.8 d
T3	42.6	5.8	45	12 cde

T4	41.2 a	6.7	25	5.5
T5	41.5 b	6.1	5	0.25 e

T1, tratamiento con el biol n°4 ; T2, tratamiento con el biol n°5 ; T3, tratamiento con el biol n°6 ; T4, tratamiento con Fertisol ; T5, testigo sin fertilizante. La altura está en cm. La incidencia y la severidad de las enfermedades están en %. Las medias estuvieron calculadas con los diez individuos del bloque 1 y los diez individuos del bloque 3. a, b, c, d y e: medias significativamente diferentes, p-value < 0.05.

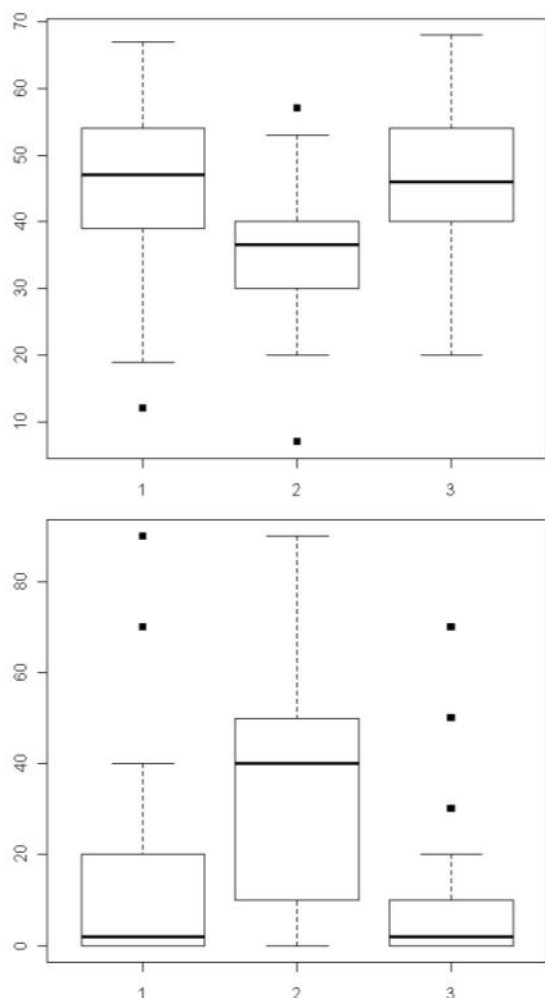
Las plantas de cada uno de los tratamientos no presentan diferencias significativas de número de hojas.

En cuanto a la altura, se notan diferencias entre las plantas de los dos testigos sin y con fertilizante, con las plantas fumigadas con el biol n°5. Las plantas fertilizadas con el tratamiento 2 están más altas.

Al nivel de las enfermedades, las plantas fumigadas con el biol n°6 tienen el nivel el más alto de enfermedad.

### La segunda evaluación

El efecto bloque seguía presente a la segunda evaluación. Como a la primera evaluación, las plantas del bloque 2 estaban más pequeñas y con un nivel de enfermedad muy alto (Figura 4).



**Figura 8. Gráficos de la altura en función de los bloques a la izquierda y de la severidad de las enfermedades en función de los bloques a la derecha, a la segunda evaluación. La altura está en cm, la severidad de las enfermedades está en %. El número de los bloques está en abscisa.**

Por esta misma razón los análisis estuvieron hechos con los datos de los bloques 1 y 3 (Cuadro 6).

Cuadro 11. Medias de las variables evaluadas a la segunda evaluación.

	Altura	Número de hojas	Incidencia de las enfermedades	Severidad de las enfermedades
T1	46.6	6.4	45	12.5
T2	50.1 a	6.8	85	11
T3	46.7	6.6	60	13.8
T4	43.2 a	6.9	85	5.6
T5	44.2	6.6	55	12.7

T1, tratamiento con el biol nº4 ; T2, tratamiento con el biol nº5 ; T3, tratamiento con el biol nº6 ; T4, tratamiento con Fertisol ; T5, testigo sin fertilizante. La altura está en cm. La incidencia y la severidad de las enfermedades están en %. Las medias estuvieron calculadas con los diez individuos del bloque 1 y los diez individuos del bloque 3. a: medias significativamente diferentes, p-value < 0.1

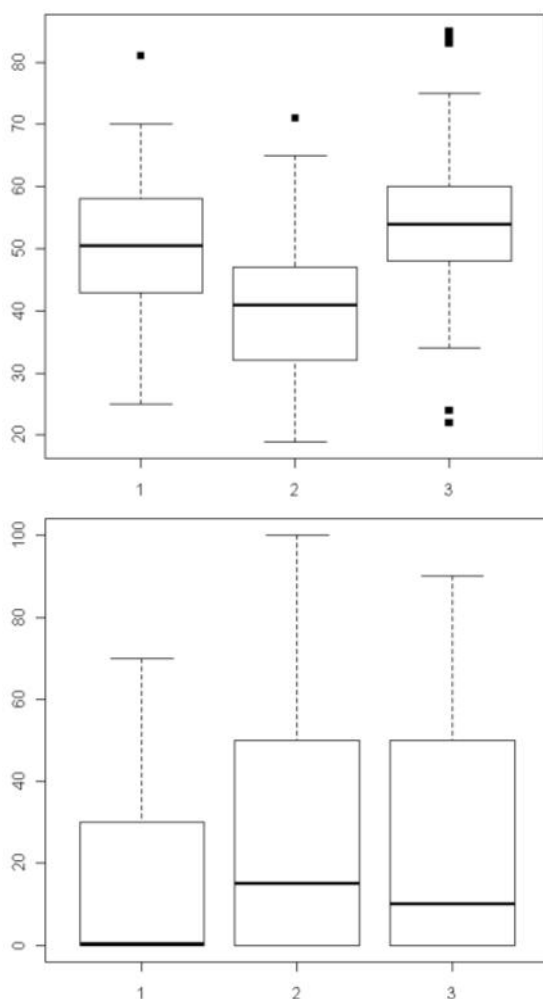
Esta evaluación confirma la superioridad de las plantas fumigadas con el biol 5. Eran más altas que las otras. Las más pequeñas son las fumigadas con el Fertisol.

No se nota diferencia significativa al nivel del número de hojas, de la severidad de las enfermedades.

Las plantas del tratamiento 4 o sea el Fertisol, parecen menos enfermas, muchas están enfermas pero la severidad está baja. Al contrario, solo la mitad de las plantas del tratamiento 1, el biol 4, están enfermas. Pero las que están enfermas, lo están mucho: la severidad está alta.

### La tercera evaluación

Como en las dos evaluaciones precedentes, se notó un efecto de los bloques. El bloque 2 seguía destacándose como el bloque con las más pequeñas plantas. Pero el bloque 1 se individualizaba también del bloque 2 y 3 (Figura 5) como el bloque cuyas plantas estaban las menos enfermas.



**Figura 9. Gráficos de la altura en función de los bloques a la izquierda y de la severidad de las enfermedades en función de los bloques a la derecha, a la tercera evaluación. La altura está en cm, la severidad de las enfermedades está en %. El número de los bloques está en abscisa.**

Para los análisis, los datos de los bloques 1 y 3 estuvieron utilizados (Cuadro 7).

**Cuadro 12. Medias de las variables evaluadas a la tercera evaluación.**

	Altura	Número de hojas	Incidencia de las enfermedades	Severidad de las enfermedades
T1	56.4 a	8.1	50	15.1
T2	55.4 b	7.7	65	20.6
T3	50.8	8.2	65	20.5
T4	46.5 ab	8.2	65	19.2
T5	51.6	7.6	65	21.8

T1, tratamiento con el biol n<sup>o</sup>4 ; T2, tratamiento con el biol n<sup>o</sup>5 ; T3, tratamiento con el biol n<sup>o</sup>6 ; T4, tratamiento con Fertisol ; T5, testigo sin fertilizante. La altura está en cm. La incidencia y la severidad de las enfermedades están en %. Las medias estuvieron calculadas con los diez individuos del bloque 1 y los diez individuos del bloque 3. a y b: medias significativamente diferentes, p-value < 0.05.

A la tercera evaluación no se notó diferencia al nivel de las enfermedades. El nivel de enfermedad era el quasi el mismo en cada tratamiento. El número de hojas tampoco permitía hacer una diferencia entre los tratamientos.

En cambio, al nivel de la altura de las plantas en cada uno de los tratamientos, unas diferencias permanecían. El tratamiento 2, biol 5, seguía asociado a las plantas las más altas. Pero esta vez las plantas del tratamiento 1 alcanzaron las del tratamiento 2.

### **Conclusiones**

A pesar de un efecto de bloque presente durante todo el ensayo, esta prueba permite notar la eficiencia de los bioles 4 y 5 como fertilizantes. Si ningún de los tratamientos tienen un efecto al nivel del número de hojas de las cebollas o del control de las enfermedades, los bioles 4 y 5 estimulan la crecencia de las cebollas.

Al contrario del Fertisol, cuyas plantas son más pequeñas que las del testigo sin fertilizante, los bioles 4 y 5 promueven la crecencia en altura de las plantas. El biol 5 tiene un efecto sobre la altura de las plantas desde la primera evaluación. El efecto del biol 4 solo aparece de manera significativa a la tercera evaluación.

El biol 6 no tiene un efecto de fertilizante claro. No está mejor que el testigo sin fertilizante. La diferencia entre los bioles 4, 5 y 6 es la dosis de levadura. La dosis la más alta, la del biol 6 no permite obtener un buen fertilizante. Los análisis de los bioles durante de su elaboración no mostraron una gran diferencia de pH significativa entre los tres bioles. Pero mostraron que la velocidad de fermentación del biol estaba aumentada cuando la dosis de levadura estaba más grande. El biol 6 sería más maduro que los bioles 4 y 5. Esta diferencia de fermentación podría explicar la ausencia de eficiencia del biol 6.

Entonces se logró hacer un biol sin leche más eficaz que el Fertisol. No se notó ninguna fitotoxicidad en este ensayo.

### **Recomendaciones**

Primero para entender la diferencia entre los bioles 5 y 6 sería interesante hacer un análisis de la conservación de los bioles, seguir la evolución de sus componentes con el tiempo. Ya que la fermentación produce unos componentes alcohólicos, se podría seguir la concentración en alcoholes de los bioles durante de la fermentación y después. Se puede que un biol envejeciendo pierde su función de fertilizante por degradación de sus componentes.

Segundo gracias a este ensayo se nota que se puede hacer un fertilizante sin el uso de leche. Pero no se alcanzó la meta de obtener un biol más ácido. Entonces se puede trabajar ahora, no con la dosis de levadura que no parece estar el factor limitante, sino con su reactivo: el azúcar. Se podría hacer la misma experimentación pero aumentando esta vez la dosis de chancaca disuelta de los bioles. Se trabajaría con la misma dosis de harina de sangre, con la dosis de levadura del biol 5 y luego con tres dosis diferentes de chancaca disuelta.

Para acabar, el trabajo de campo presenta unas dificultades. Primero hay que encontrar la parcela, luego es lejos de la ciudad y todos los parámetros no están bajo control. El trabajo en masetas es una primera solución para luchar contra el problema del efecto de bloque. Durante de las primeras etapas de elaboración de un producto el trabajo en masetas podría bastar.

### **Bibliografía**

Direction de l'aménagement des terres, Guide de fertilisation des cultures, mars 2001, Nouveau Brunswick Canada

J. Restrepo Rivera, Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2001.

**Mejoramiento del manejo de residuos orgánicos municipales a través de uso de activadores orgánicos para la lombricultura en el Municipio de Tiquipaya, Cochabamba.** Responsables. Jessica Ruiz y Noel Ortuño

### **Introducción**



En el Municipio de Tiquipaya se genera 22 t d<sup>-1</sup>, 63% son orgánicos y 37% son inorgánicos, estos son transportados al Botadero, saturando y convirtiéndolo en una amenaza al medio ambiente y la salud humana.

### Metodología

El ensayo se desarrolló en el vivero Municipal de Tiquipaya y en instalaciones de la Fundación PROINPA. Inicialmente se realizó el compostaje de estos residuos, con dos tratamientos, con y sin activador orgánico. Luego estos fueron utilizados para el lombricompost, donde se tuvo otros cuatro tratamientos, dos de estos con adición de activador orgánico.

### Resultados

La generación de residuos orgánicos en el Municipio de Tiquipaya, el 63% son orgánicos y el 37% son inorgánicos.

La mayor cantidad de residuos orgánicos provenientes del cementerio, rastrojo de parques y jardines, los cuales son aprovechados en la compostera municipal y utilizados en este trabajo experimental.

Los residuos provenientes del mercado y lugares gastronómicos son llevados directamente al botadero, porque están muy mezclados y son difíciles de aprovechar en el reciclaje, pues se necesitaría mayor mano de obra para su separación.

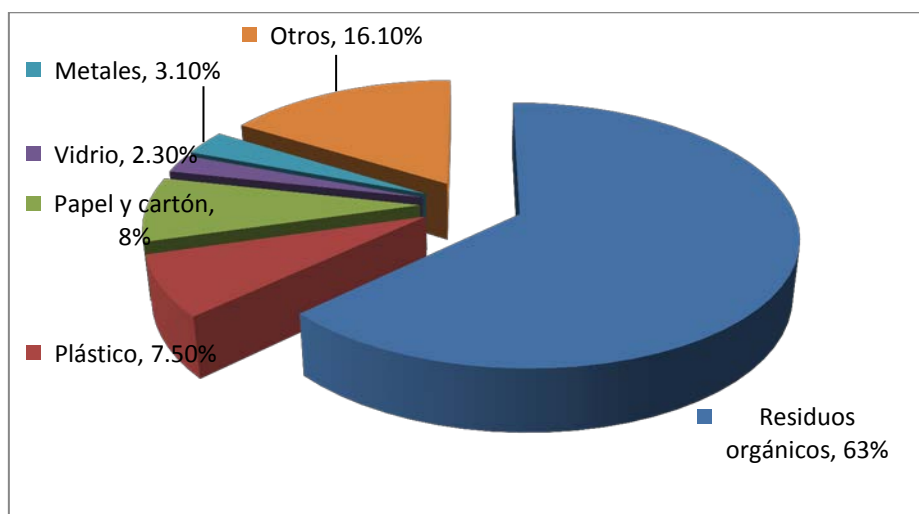
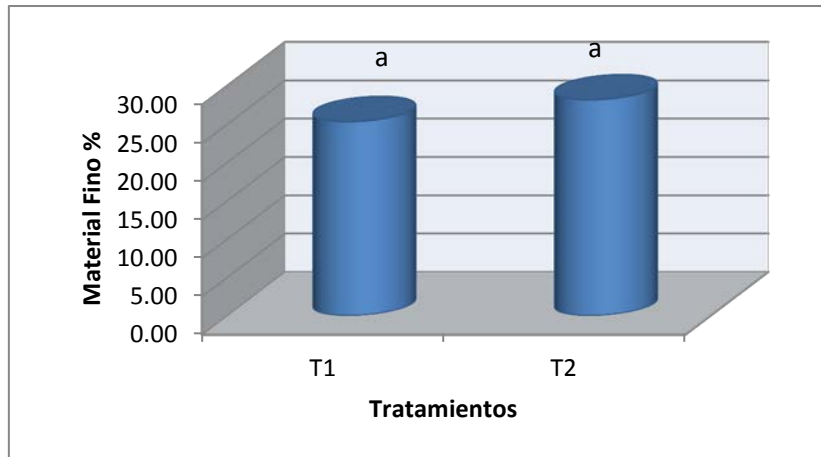


Figura 1. **Composición de los residuos sólidos en el Municipio de Tiquipaya**

Con el uso del activador orgánico, en la Fase I (compostaje), se logró disminuir el tiempo de compostaje a dos meses y en la Fase II (lombricompost) a un mes, obteniéndose en total el material final reciclado en tres meses.

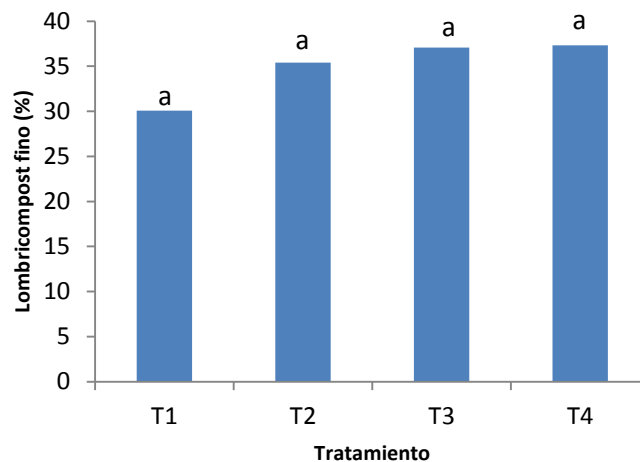
La incorporación de activador orgánico en el proceso de compostaje favoreció al incremento de la temperatura, el cual aceleró la actividad metabólica de los microorganismos, lográndose a higienizar el compost (Labrador, 2001).



**Figura 2. Porcentaje del volumen descompuesto de la materia fina.**

En cuanto a la descomposición de los residuos orgánicos en la etapa del compostaje el biodegradador no logró procesar mayor cantidad de materia fina teniendo como resultado en este mayor porcentaje de materia gruesa. En cambio, en el lombricompost el activador generó el menor porcentaje de materia gruesa (39.99%).

Cuando se utiliza el activador orgánico en la etapa de compostaje y en la del lombricompostaje se tiene mayor porcentaje de materia fina, eso fue demostrado con el tratamiento cuatro, el cual solo dejó 9.33% de material grueso, dejando mayor cantidad de material fino disponible para su uso.



T1(Fase 1:sin activador- Fase II sin activador); T2(Fase I: sin activador-Fase II con activador); T3(Fase I: con activador-Fase II sin activador); T4(Fase I: con activador; Fase II con activador).

**Figura 3. Degradación del lombricompost de la materia fina por efecto de los cuatro tratamientos**

Los bioensayos realizados para evaluar la fitotoxicidad en plantas de cebada se observó que los tratamientos con concentración del 50% de lombricompost y los que contenían el 100% se destacaron por su mayor producción.

Los tratamientos con el activador resultó ser el con mayor costos, donde los beneficios netos son menores, sin embargo el tiempo de procesado es menor lo cual debe ser incluido en próximos estudios de este tipo.

### **Bibliografía consultada**

- Alvarado, E. 2007. Campaña por la calidad de vida. Residuos sólidos entre el problema y las soluciones. Oruro, Bolivia.
- Brady, C. y Weil, R. 1999. *The nature and properties of soils*. 12ª ed. Editorial Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Barrena, R. (2006). Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso. Memoria de Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
- CalRecovery Inc. (2005). *Solid Waste Management*. Chapter 8 Composting. UNEP. Japan.
- Cooperband, L. 2002. *The Art and Science of Composting*. Center for Integrated Agricultural Systems. University of Wisconsin. Madison-USA.
- Dalzell H., A. Biddlestone, K. Gray y K. Thurairajam. 1991. *Manejo del suelo; producción y uso del composte en ambientes tropicales y subtropicales*. FAO. Roma.

## **PRODUCTO 3 Bolivia DESARROLLO DE BIOPLAGUICIDAS**

### **Pruebas de compatibilidad entre cepas de *Trichoderma* sp.**

**Responsable:** Noel Ortuño  
**Equipo técnico:** Mayra Claros  
**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

*Trichoderma spp* es un hongo antagonista, que actúa como organismo benéfico impidiendo el desarrollo de hongos patógenos de suelo. Al mismo tiempo presenta una acción estimulante en el crecimiento de raíces lo que induce en la planta mayor resistencia a los ataques de plagas y enfermedades. En este trabajo se evaluó las reacciones de incompatibilidad y crecimiento entre doce aislados de *Trichoderma* sp., A pesar de que estuvieron dos cepas enfrentadas en una misma placa Petri, estas presentaron un desarrollo parecido no habiendo diferencias significativas entre los aislados. La compatibilidad o incompatibilidad entre aislados se vio por la ausencia o presencia de la barrera de separación, los autocruzamientos tuvieron una total compatibilidad, los resultados mostraron las diferentes compatibilidades e incompatibilidades de los aislados. Por lo que es muy importante hacer las pruebas de compatibilidad de los aislados de *Trichoderma* sp. antes de ser utilizados en combinaciones.

**Palabras clave:** Incompatibilidad, *Trichoderma* sp.

#### **174. Objetivos:**

- El objetivo es encontrar la compatibilidad de aislados de *Trichoderma* spp. que puedan ser utilizados en combinaciones como promotores de crecimiento en biofertilizantes.

- Comparar la velocidad de crecimiento de los diferentes aislados.

#### 175. **Hipótesis :**

En *Trichoderma spp.*, pueden surgir situaciones de incompatibilidad intra e interespecíficas, por lo que el estudio de la compatibilidad entre especies de *Trichoderma spp.* puede proporcionar información muy importante para el uso combinado de varias especies. Al mismo tiempo la velocidad de crecimiento del aislado nos indica su velocidad de acción.

#### 176. **Revisión de literatura**

*Trichoderma spp.* es un hongo antagonista, que actúa como organismo benéfico impidiendo el desarrollo de hongos o nemátodos causantes de enfermedades en las plantas. Este hongo anaerobio se encuentra naturalmente en el suelo y se caracteriza por no tener un estado sexual determinado.

Generalmente se ubica en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, como residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por hongos fitopatógenos. Su importancia radica principalmente en que ataca, parasita y desplaza otros hongos que producen enfermedades en las plantas.

Por otro lado su acción como biofungicida se ve complementada por su acción estimulante en el crecimiento de raíces lo que induce en la planta mayor resistencia a los ataques de plagas y enfermedades (Arias, 2004).

*Trichoderma sp.* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de hidrógeno, compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio. (Moore, 1996)

El uso de microorganismos con diferentes espectros de acción (Guetsky *et al.*, 2001) puede reducir la variabilidad en el control biológico *in vivo* y favorecer el sinergismo entre Agentes de Control Biológico (ACB) similares o distintos (diferentes hongos antagonistas, aislados de *Trichoderma spp.* o de hongos con bacterias) (Baker y Scher, 1987; Benítez *et al.*, 2004; Deacon, 1994; Harman *et al.*, 1989; Lutz *et al.*, 2004). Sin embargo, tal y como sugieren algunos estudios como los de Reaves y Crawford (1994), en *Trichoderma spp.*, pueden surgir situaciones de incompatibilidad intra e interespecíficas, por lo que el estudio de la compatibilidad entre especies de *Trichoderma* puede proporcionar información muy importante para el uso combinado de varias especies, puesto que algunos de ellos ejercen poder inhibitorio sobre otros, sobre todo debido a liberación de compuestos no-volátiles.

#### 177. **Materiales y métodos**

##### **4.1 Materiales**

##### **4.1.1. Material biológico**

Se utilizaron las doce cepas de la colección de PROINPA. Los aislados probados fueron: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, TC, TSICP-03, T. Pairumani.

##### **4.1.2. Material de laboratorio**

Cámara de Flujo Laminar, autoclave, agua destilada, alcohol, papa, azúcar, agar, aguja enmangada, bisturí, tubo de gotero de vidrio, cajas petri, cámara fotográfica, erlenmeyer de 1000 ml., libreta de registro, marcador, mechero, parafilm, papel aluminio.

## 4.2. METODOS

### 4.2.1. Cultivos duales

Los cultivos duales se realizaron según la metodología Reaves y Crawford (1994), enfrentando uno a uno en placa de Petri con PDA, los doce aislados de *Trichoderma spp.* El experimento se desarrolló a 20 °C en oscuridad (condiciones estándar de crecimiento, CEC).

### 4.2.2. Siembra de aislados de *Trichoderma spp.*

La preparación del medio de cultivo PDA consiste: para un litro de medio, se pelan 200 gr. de papa, se pica en cubos y se pone a hervir durante 15 minutos en 500 cc de agua, luego se filtra y se adiciona 20 gr. de azúcar y 15 gr. de agar, mezclar bien enrasando hasta 1000cc, se tapa el recipiente con papel aluminio y se autoclava durante 15 minutos a 121 ° C. Luego se procede al plaqueado del medio de cultivo en una Cámara de Flujo y se espera que enfríe para refrigerarlo. Dejar reposar por lo menos 24 horas.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra de los dos aislados enfrentados, con la ayuda de un gotero de vidrio se cortaron círculos de los diferentes aislados de placas anteriormente incubadas por 7 días. Estos discos se colocaron a 2 cm. del perímetro. Posteriormente se cerraron las cajas Petri con parafilm, identificando los aislados enfrentados y la fecha en que se sembraron.

Se incubaron a 20 ° C, y se tomaron lecturas diarias del crecimiento y la compatibilidad de los mismos, hasta que la placa quedo totalmente cubierta. La duración de la prueba fue de 5 días.

## 4.3 Diseño Experimental

Cada placa Petri constituyó una unidad experimental, el diseño empleado fue Completamente Aleatorio con 2 repeticiones, en este periodo se tomaron las lecturas a partir del segundo día, del porcentaje de crecimiento del hongo desde el círculo del hongo hacia la parte central de la placa de ambos aislados enfrentados, al mismo tiempo se evaluó la compatibilidad entre aislados mediante la presencia o ausencia de la barrera de incompatibilidad.

### 4.4 Modelo estadístico para crecimiento

El crecimiento se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ij} = \mu + \theta_j + \xi_{ij}$$

$i = 1, 2$ ; unidades experimentales por tratamiento

$j = 1, 2, 3, \dots, 12$  cepas

$Y_{ij}$  = Crecimiento en la  $i$ -ésima unidad experimental con  $j$ -ésima cepa.

$\mu$  = Media general

$\theta_j$  = Efecto fijo del  $j$ -ésima cepa

$\xi_{ij}$  = Efecto aleatorio de los residuales

### 3.5 Modelo estadístico para compatibilidad

La compatibilidad se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ij} = \log \frac{\pi^2}{\pi - 1} = \mu + \theta_j$$

$i = 1,2$ ; unidades experimentales por tratamiento  
 $j = 1,2,3,\dots,12$  cepas  
 $Y_{ij}$  = Crecimiento en la  $i$ -ésima unidad experimental con  $j$ -ésima cepa.  
 $\mu$  = Media general de logit  
 $\theta_j$  = Efecto fijo del  $j$ -ésima cepa

## 178. Resultados y Discusión

### 5.1 Velocidad de crecimiento

Según el análisis de varianza (Cuadro 1) no existen diferencias significativas del crecimiento entre cepas. ( $Pr < 0.6315$ ) (Foto. 1). Lo cual significa que a pesar de que están dos cepas enfrentadas en una misma placa Petri, estas presentan un desarrollo parecido.

Cuadro 1. Análisis de varianza

Fuente	Gl.	Suma de cuadrados	Cuadrado de medias	Valor de F	Pr>F
Cepa	65	6.46878788	0.09951981	0.92	0.6315
Error	66	7.14000000	0.10818182		
total	131	13.60878788			

Las medias estimadas para cada una de las cepas de *Trichoderma sp.* (cuadro 2) demuestran que no hubo diferencias entre cepas ( $Pr < 0.6315$ ). Figura 1.

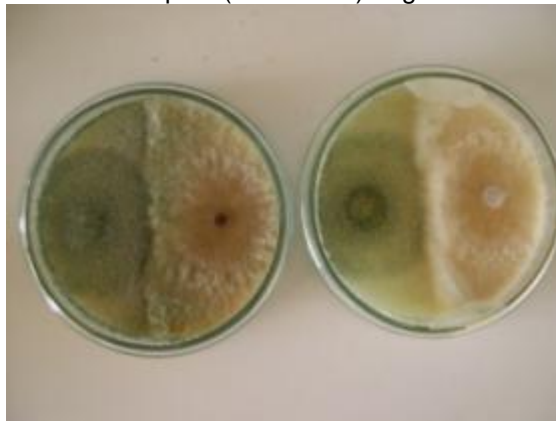


Figura 1. Crecimiento de *Trichoderma sp.*

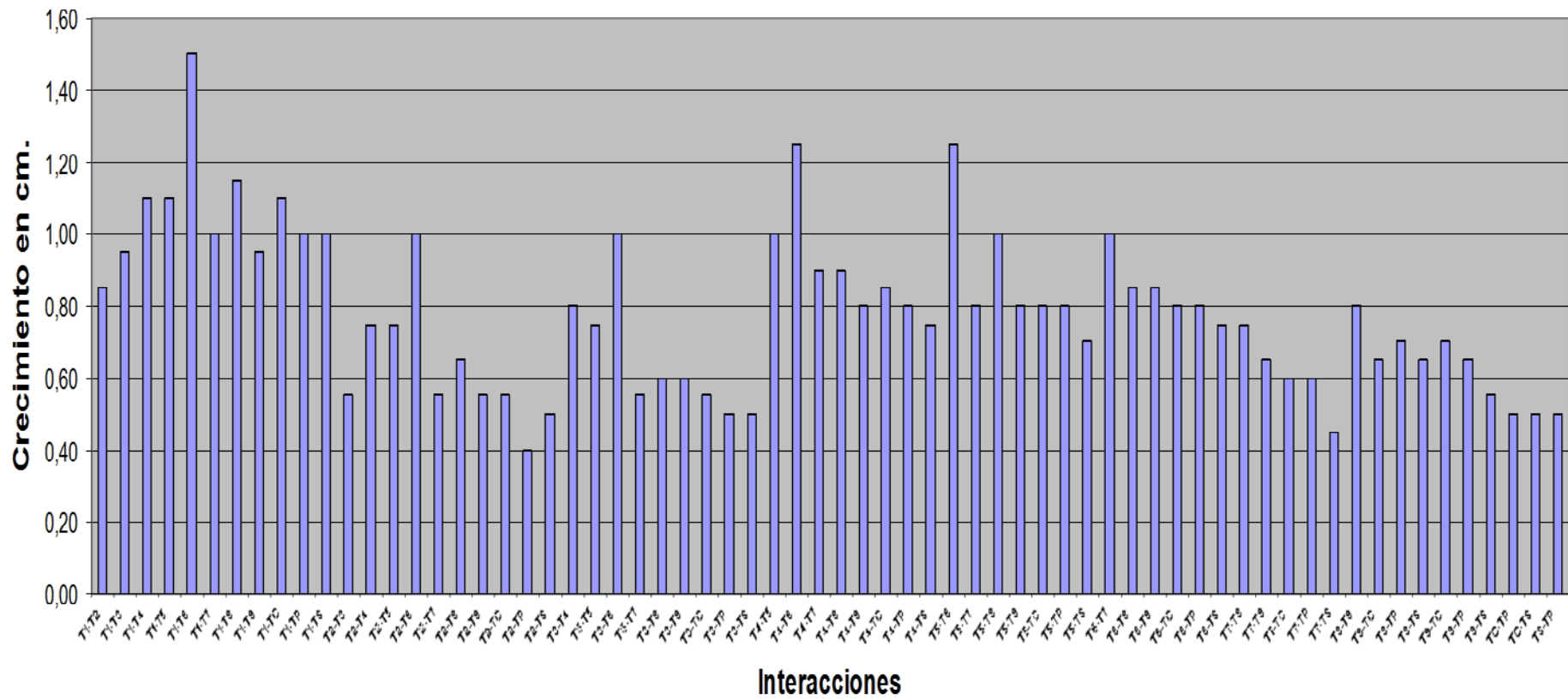


Figura 1. Crecimiento de la 12 cepas de *Trichoderma* spp.

## 5.2 Análisis de incompatibilidad entre cepas

La compatibilidad o incompatibilidad entre aislados se vio por la ausencia o presencia de la barrera de separación, con una característica de tinción del medio de cultivo de coloración amarillenta respectivamente entre las colonias de aislados enfrentados (Cuadro.3).

Según López *et al*, en algunos autocruzamientos observaron en ocasiones barreras de incompatibilidad. Para los autocruzamientos de este ensayo no se observaron barreras de incompatibilidad, todos fueron compatibles (Foto 2).

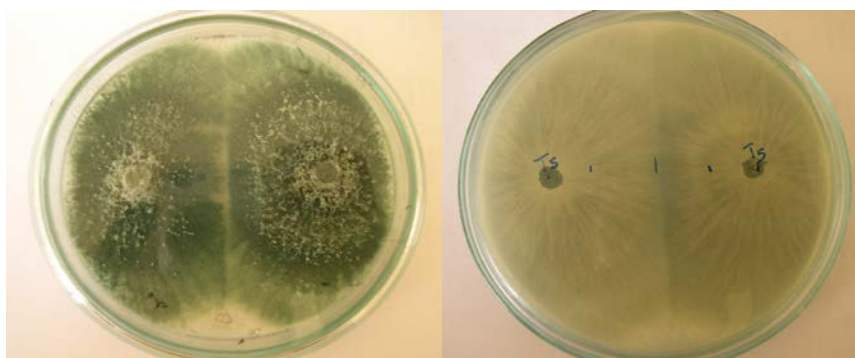


Figura 2. Autocruzamiento del aislado T5.

Cuadro 3. Barreras de incompatibilidad formadas entre los distintos cruces realizados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TC	TSICP-03	TP
1	C	BI*	C	BI*	BI*	C	BI	BI*	BI*	BI*	BI	C
2		C	BI	C	C	BI*	C	C	C	C	C	BI*
3			C	C	C	C	C	BI	C	C	C	C
4				C	C	BI*	C	C	C	C	C	BI
5					C	BI*	C	C	C	C	C	BI*
6						C	BI*	BI*	BI*	BI*	BI*	C
7							C	C	C	C	C	BI*
8								C	C	C	C	BI*
9									C	C	C	BI*
TC										C	C	BI*
TSICP-03											C	BI
TP												C

C Compatible, BI Barrera de incompatibilidad, BI\* Barrera de incompatibilidad fuerte

Para el aislado T1 solo se vio que es compatible con los aislados T3, T6, T9, con el resto de los aislados presento incompatibilidad.

En el caso de los aislados T6 y TP solo son compatibles con los aislados T1, T3, T6 y TP, con el resto de los aislados presento incompatibilidad.

El aislado T2 no es compatible con los aislados T1, T3, T6 y TP, con el resto de los aislados presento compatibilidad.



El aislado T3 no es compatible con los aislados T2 y T8, siendo con los restantes aislados compatible. (Foto 3)

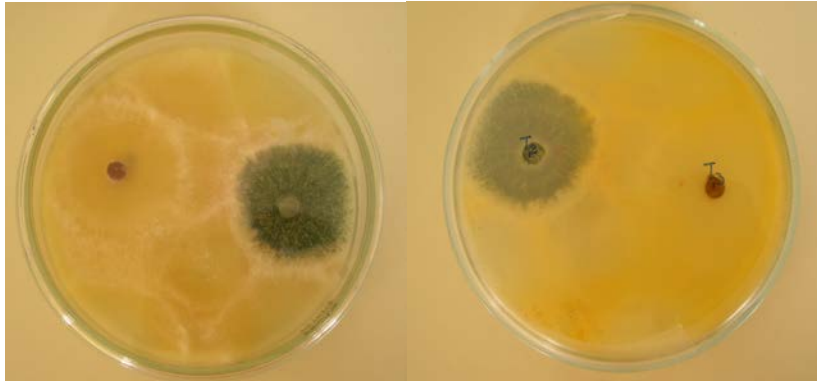


Figura 3. Incompatibilidad del aislado T3 con el aislado T2.

El resto de los aislados T4, T5, T7, T8, T9, TC y TSICP-03, todos en común resultaron ser no compatibles con los aislados T1, T6 y TP. Pero para con el resto de los aislados son compatibles. (Foto 3)

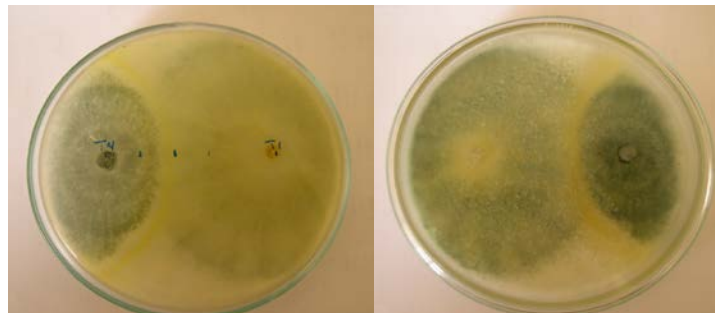
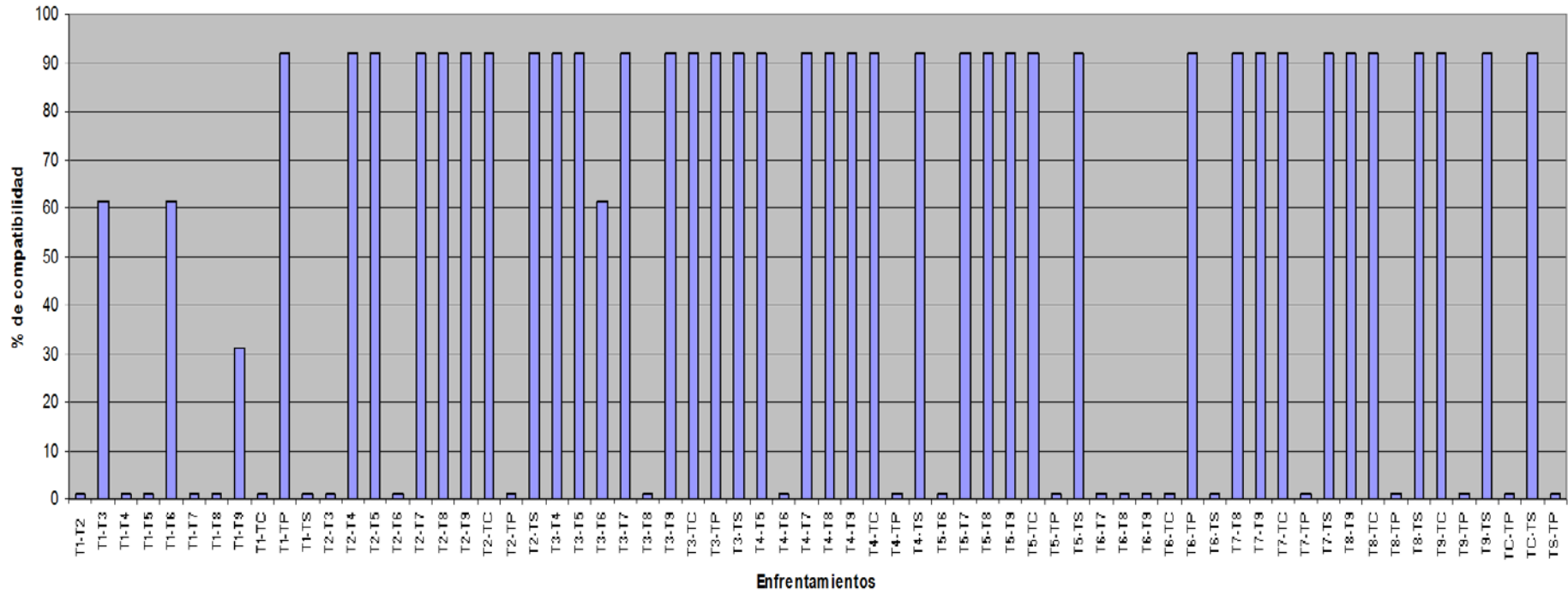


Figura. 3. Incompatibilidad del aislado T4 con el aislado T1.

F



En cuanto al porcentaje de compatibilidad de los aislados los enfrentamientos que resultaron ser más compatibles con el 91.82 % de compatibilidad entre ellos fueron: T1-TP (T. Pairumani), T2-T4, T2-T5, T2-T7, T2-T8, T2-T9, T2-TC, T2-TSCP-03, T3-T4, T3-T5, T3-T7, T3-T9, T3-TC, T3-TP, T3-TSCP-03, T4-T5, T4-T7, T4-T8, T4-T9, T4-TC, T4-TSCP-03, T5-T7, T5-T8, T5-T9, T5-TC, T5-TSCP-03, T6-TP, T7-T8, T7-T9, T7-TC, T7-TSCP-03, T8-T9, T8-TC, T8-TSCP-03, T9-TC, T9-TSCP-03 y TC-TSCP-03.

Por otro lado con el 61,45% de compatibilidad de los aislados enfrentados fueron: T1-T3, T1-T6 y T3-T6.

Con el 31,18% de compatibilidad se registró el enfrentamiento T1-T9.

Los enfrentamientos que resultaron ser menos compatibles con el 0,9% de compatibilidad fueron: T1-T2, T1-T4, T1-T5, T1-T7, T1-T8, T1-TC, T1-TSCP-03, T2-T3, T2-T6, T2-TP, T3-T8, T4-T6, T4-TP, T5-TP, T6-T7, T6-T8, T6-T9, T6-TC, T6-TSCP-03, T7-TP, T8-TP, T9-TP, TC-TP y TS-TP.

### **179. Conclusiones**

Por los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

- La velocidad de crecimiento de los doce aislados enfrentados, presenta un desarrollo parecido, no teniendo diferencias significativas.
- Los aislados menos compatibles son el T1, T6 y T. Pairumani.
- Los aislados que tienen mayor compatibilidad son T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9, TC y TSICP-03.
- De los doce aislados analizados nueve tienen una alta capacidad de combinarse, teniendo una colección que permita hacer mezclas.
- Los mejores aislados (Tesis de Claudia Achá) de la colección T1 y T6 son los que tienen menor porcentaje de compatibilidad.
- Los aislados algodonosos son los que son menos compatibles T1, T6 y T. Pairumani.
- El aislado T5 (*Trichoderma harzianum*) que se lo utiliza comercialmente tiene un alto grado de compatibilidad con el resto de los aislados.

### **180. Recomendaciones**

- Se recomienda hacer de conocimiento público los resultados obtenidos para evitar mezclas no compatibles, donde los diferentes aislados de *Trichoderma* compiten entre si.
- Se recomienda seguir haciendo las pruebas con los nuevos aislados que se adjunten a la colección.

### **181. Bibliografía consultada**

Arias, M. 2004. Hongos Antagonistas o micopatógenos en: Guía de insumos Biológicos para el Manejo Integrado de Plagas. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Harmonía. pp. 59-62.

BAKER, R., SCHER, F. M. 1987. Enhancing the activity of biological control agents. In: Innovative Approaches to Plant Diseases Control. Wile Interscience. New York. Pp. 1-17.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A. M., LIMÓN, M. C. y CODÓN, A. C. 2004. Biocontrol mechanism o *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.

DEACON, J. W. 1994. Rhizosphere constraints affecting biocontrol organisms applied to seeds. In: *Seed Treatment: Progress and Prospects*. BCPC Surrey, UK. 57: 315-326.

HARMAN, G. E., TAYLOR, A. G. y STASZ, T. E. 1989. Combining effective strains of *trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Disease* 73: 631-637.

GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y. y DINOOR, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce de variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627.

LÓPEZ H. C., RUANO R. D. y LELAY Y. 2007. Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma sp.* potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. *Proceedings VI Worl Avocado Congreso (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007*. Viña del Mar, Chile. 12-16 Nov. ISBN No 978-956-17-0413-8. 3-4 p.

LUTZ, M. P., WENGER, S., MAURHOFER, M., DÉFAGO, G. y DUFFY, B. 2004. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 447-455.

REAVES, J. L. y CRAWFORD, R. H. 1994. *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. United States Department of Agriculture, Forest Service (Pacific Northwest Research Station), 8 p.

Moore, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.

### **Evaluación de la compatibilidad de los aislados BP- T 0005 y BP- T 0008 de *Trichoderma sp.* con cinco diferentes aceites agronómicos.**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros y Edson Meneses

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

Se determinó la compatibilidad de cinco aceites agronómicos Grand Goma, Gomax, Agral, Assist y Natural Oil con dos cepas de *Trichoderma sp.* BP- T 0005 y BP- T 0008 de la colección de la Fundación PROINPA, para su uso en la conservación a largo plazo de *Trichoderma sp.* La mejor compatibilidad de los aceites se presentó con la cepa BP- T 0005 y el aceite agronómico Assist. Seguido por la cepa BP- T 0008 y el aceite agronómico Assist.

**Palabras claves:** *Trichoderma sp.* , compatibilidad, aceites agronómicos.

#### **182. Objetivos:**

Determinar la compatibilidad de los aislados BP- T 0005 y BP- T 0008 de *Trichoderma sp.* con cinco diferentes aceites agronómicos.

### **183. Hipótesis**

No existen incompatibilidades de los aislados de *Trichoderma sp.* con los aceites agronómicos.

### **184. Revisión de literatura**

La acción de los productos fitosanitarios sobre el hongo puede variar en función de la especie y línea del hongo, de la naturaleza química de los productos y de las dosis utilizadas. Estos productos pueden actuar inhibiendo el crecimiento vegetativo, la conidiogénesis y la esporulación de los organismos e incluso causar mutaciones genéticas. (Alves S., 1998)

El mismo autor indica, que es necesario utilizar productos selectivos que no afecten el equilibrio en el ecosistema. Algunos agrotóxicos son altamente selectivos a los hongos benéficos y muchas veces pueden ser asociados a hongos benéficos y mejorar su efecto.

Por los conceptos anteriormente nombrados en este trabajo se realizará las pruebas con diferentes aceites agronómicos comerciales con los dos mejores aislados del cepario utilizados para la producción comercial.

### **185. Materiales y métodos**

#### **4.1. Materiales**

##### **4.1.1. Material biológico**

Se utilizaron dos aislados BP- T 0005 y BP- T 0008 del cepario de PROINPA.

##### **4.1.2. Material de laboratorio**

Placas Petri, medio PDA, incubadora a 20°C, autoclave, marcador, regla, sacabocados de 5 mm, libreta de apuntes.

Aceites Agronómicos:

- Grand Goma
- Gomax
- Agral
- Assist
- Natural Oil

#### **4.2 Métodos**

##### **4.2.1. Preparación en medio sólido**

Para las pruebas de validación del efecto tóxico de productos fitosanitarios *in vitro* pueden ser realizados en medios de cultivo sólidos o líquidos. Para el caso de medios de cultivo sólidos, la metodología consiste básicamente en la adición de los productos químicos en dosis preestablecidas al medio de cultivo todavía no solidificado. (Alves S., 1998)

Algunos factores importantes deben ser considerados en la ejecución de esta prueba. Inicialmente se debe tomar especial cuidado con el medio de cultivo específico para cada tipo de microorganismo. Otro aspecto a ser considerado es la temperatura del medio de cultivo, que no debe pasar los valores próximos a 45°C, el cual garantice que el medio de cultivo no se solidifique y que no se alteren las propiedades de los compuestos químicos a ser probados. (Alves S., 1998)

La dosis del aceite agronómico utilizado en la prueba dependió de la dosis máxima recomendada por el fabricante de cada tipo de aceite. Se procedió a la incorporación del aceite cuando el medio PDA alcanzó una temperatura de 40°C.

#### 4.2.2. Siembra de los a aislados de *Trichoderma sp.*

La inoculación del hongo en el medio de cultivo se realizó cortando círculos de 5 mm de diámetro con un sacabocados de vidrio esterilizado de una placa sembrada previamente con *Trichoderma sp.* Se procedió a sembrar con una aguja enmangada ubicando cada círculo en medio de la placa petri. (Fig. 1)

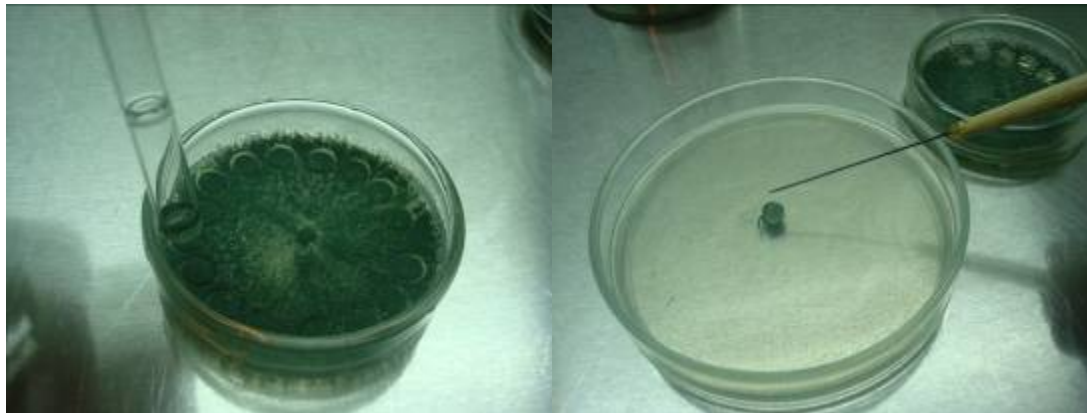


Figura 1. Siembra de *Trichoderma sp.* con los diferentes aceites.

#### 4.2.3. Diseño Experimental

El diseño empleado fue Completamente Aleatorio con dos repeticiones, cada placa Petri constituyó una unidad experimental, en este periodo se tomó las lecturas a partir del cuarto día, cuando el testigo completó el crecimiento de la placa.

#### 4.2.4. Análisis estadístico

El porcentaje de crecimiento se analizó de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \theta_k + \gamma_{jk} + \xi_{k(ij)}$$

$i = 1,2$ ; unidades experimentales por tratamiento

$j = 1,2,3,4,5$ ; aceites agronómicos

$k = 1,2$  cepas

$y_{ijk}$  = Porcentaje de crecimiento en la  $i$ -ésima unidad experimental con el  $j$ -ésimo aceite agronómico y la  $k$ -ésima cepa.

- $\mu$  = Media general
- $\alpha_j$  = Efecto fijo del j-esimo aceite agronómico
- $\theta_k$  = Efecto fijo de la k-esima cepa
- $\alpha_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción entre el j-esimo aceite agronómico y la k-esima cepa.
- $\xi_{k(ij)}$  = Efecto aleatorio de los residuales

## 186. Resultados

### 5.1 Velocidad de crecimiento

Según el análisis de varianza (Cuadro 1) existen diferencias significativas entre aceites ( $Pr < 0,001$ ) lo cual indica que al menos el porcentaje de crecimiento con uno de los aceites ha sido diferente. También existen diferencias significativas en la interacción cepa por sustrato ( $Pr < 0,001$ ) (Fig. 2), por lo que al menos una cepa con un aceite presentan un porcentaje de crecimiento diferente. En cuanto a las cepas no existen diferencias significativas indicando que ambas poseen el mismo porcentaje de crecimiento.

Cuadro 1. Análisis de varianza

Fuente	Gl.	Suma de cuadrados	Cuadrado de medias	Valor de F	Pr>F
Aceite	5	89.45873445	17.89174689	229.66	0.0001
Cepa	1	0.11685770	0.11685770	1.50	0.2442
Aceite*Cepa	5	2.58982127	0.51796425	6.65	0.0035
Error	12	0.93487156	0.07790596		
Total	23	93.10028498			

Coefficiente de variación 23.27216 R-Cuadrada 0.989958

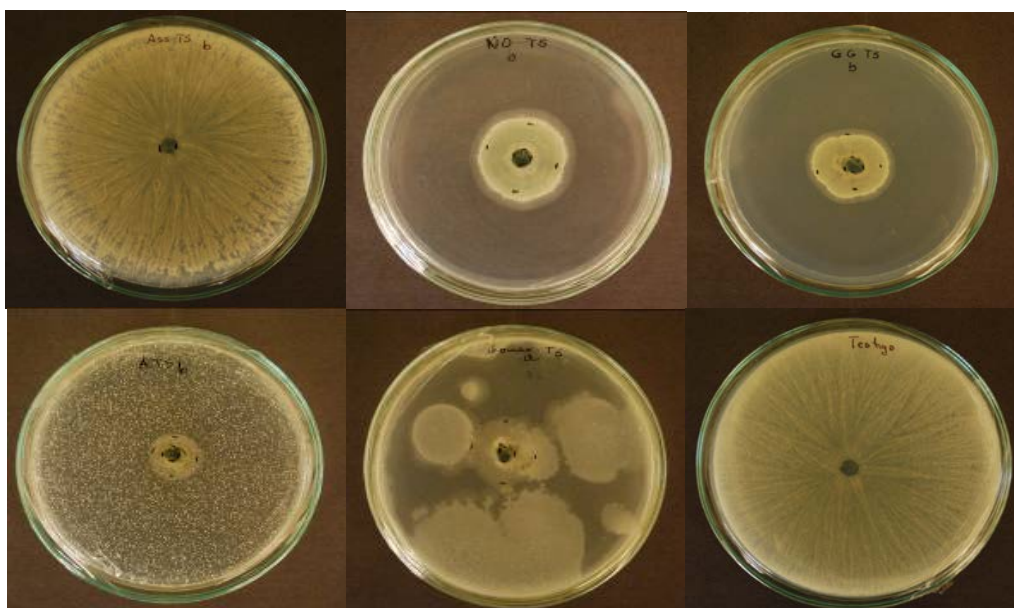


Figura 2. Compatibilidad del aislado BP- T 0005 con los diferentes aceites y el testigo.

Según las medias de los aceites (cuadro 2) (Fig. 3), el porcentaje de crecimiento fue mayor con el testigo que no contenía ningún aceite y con el aceite agronómico Assist (Fig. 4). A pesar que el testigo el hongo se desarrolla mejor no es el medio ideal para su conservación ya que al ser en

base de agua el tiempo de conservación del hongo es menor, siendo el aceite agronómico Assist el ideal para una conservación del hongo por periodos más largos de tiempo y en el que el hongo se desarrolla mejor.

Cuadro 2. Comparación de medias entre aceites

Aceite	Medias
Agral	0,2334500
Assist	36,0600500
G	1,6559000
GG	1,2586000
NO	2,6883000
Testigo	41,9050000

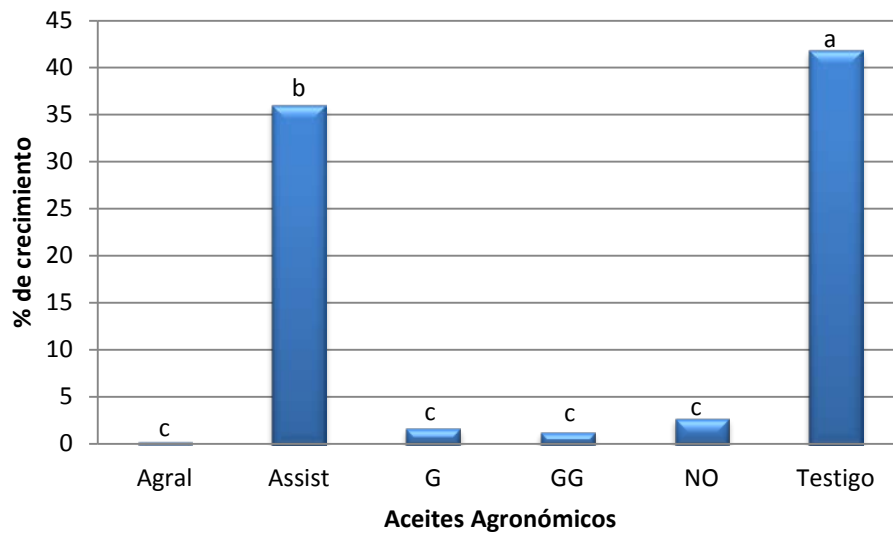


Figura 3. Crecimiento de *Trichoderma* sp. en Aceites Agronómicos

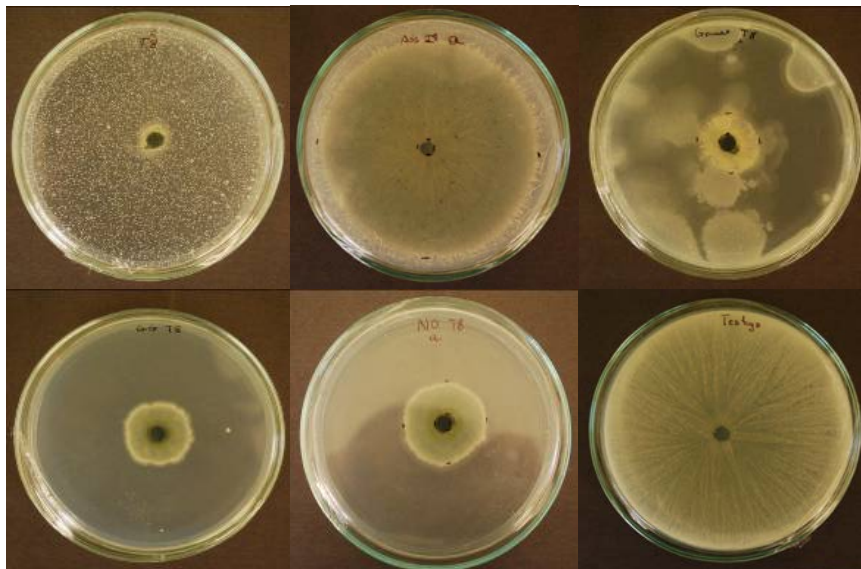


Figura 4. Compatibilidad del aislado BP- T 0008 con los diferentes aceites y el testigo.



En el cuadro 4 (Fig. 5) la interacción entre las cepas con los aceites nos indica que las cepas BP- T 0005 y BP- T 0008 (Fig. 6) presentan los mayores valores cuando son combinadas con el aceite Assist y el testigo. Por las características del aceite agronómico Assist y su compatibilidad con los aislados BP- T 0005 y BP- T 0008 es el más indicado para la conservación del hongo.

Cuadro 4. Comparación de medias entre cepas y aceites

Aceite	Cepa	Media LS
Agral	T5	0.3712000
Agral	T8	0.0957000
Assist	T5	41.9050000
Assist	T8	30.2151000
G	T5	1.3108000
G	T8	2.0010000
GG	T5	1.2180000
GG	T8	1.2992000
NO	T5	2.0358000
NO	T8	3.3408000
Testigo	T5	41.9050000
Testigo	T8	41.9050000

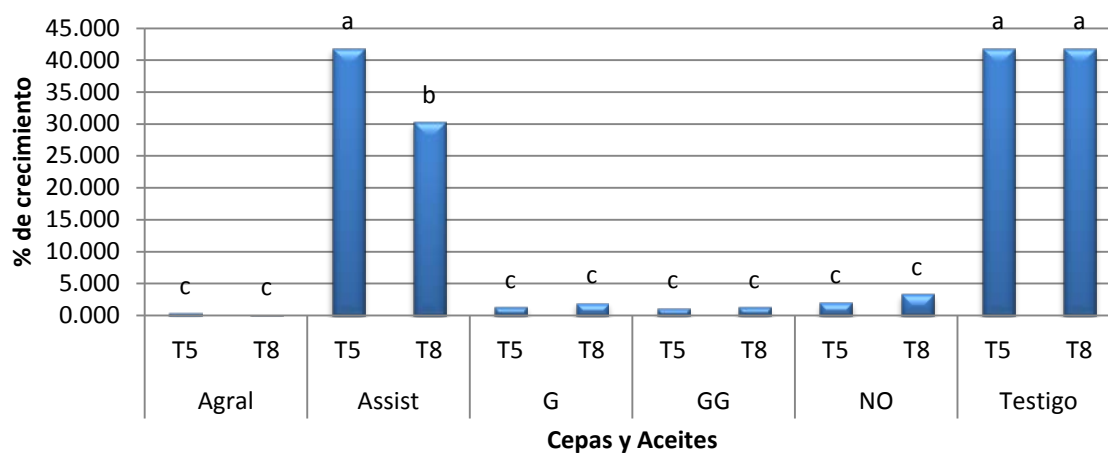


Figura 5. Compatibilidad de las cepas de *Trichoderma* sp. con los diferentes aceites agronómicos

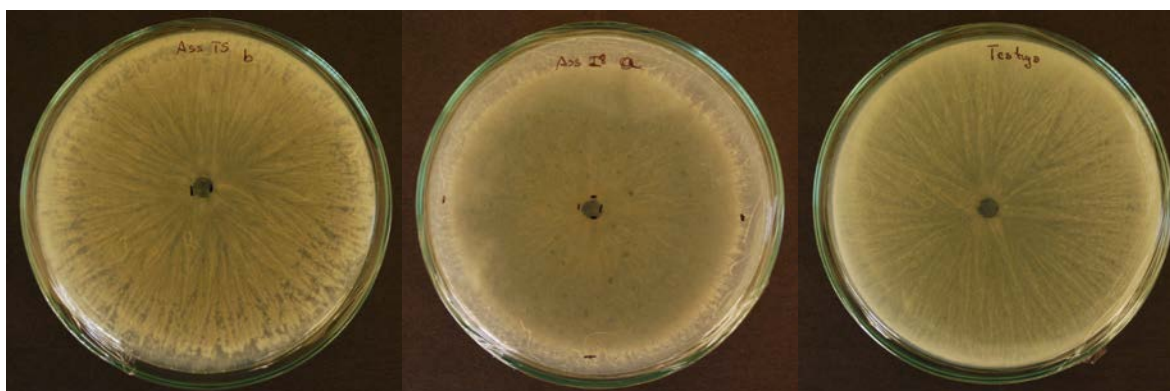


Figura 6. Compatibilidad de los aislados BP- T 0005 y BP- T 0008 con Assist frente al testigo.

#### 187. Discusión

Las pruebas de validación del efecto tóxico de productos fitosanitarios *in vitro* pueden ser realizados en medios de cultivo sólidos o líquidos. Para el caso de medios de cultivo sólidos, la metodología consiste básicamente en la adición de los productos químicos en dosis preestablecidas al medio de cultivo todavía no solidificado. (Alves S., 1998). Los resultados reflejan la teoría expuesta por Alves, 1998 obteniéndose incompatibilidades y compatibilidades de las cepas *Trichoderma* sp. y de los diferentes aceites agronómicos probados. Es el caso de la compatibilidad de Assist y de las cepas cepa BP- T 0005 y la cepa BP- T 0008.

#### 188. Conclusiones

Por los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

- La mejor compatibilidad de los aceites se presentó con la cepa BP- T 0005 y el aceite agronómico Assist. Seguido por la cepa BP- T 0008 y el aceite agronómico Assist.
- Las cepas en todos los aceites agronómicos crecieron, pero en el que tuvieron mayor desarrollo fue en el Assist.

#### 189. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar el aceite agronómico Assist para la conservación del hongo *Trichoderma* sp., inclusive para su utilización en mezclas con las cepas BP- T 0005 y BP- T 0008.
- En caso de tener otros aislados se recomienda hacer las pruebas respectivas de compatibilidad con los diferentes aceites agronómicos.

#### 190. Bibliografía consultada

- Alves S.B., Moino Jr. A. y Almeida J.E.M. 1998. Productos Fotosanitarios y Entomopatógenos en Alves S.B. 1998 Control Microbiano de Insectos. 2da Edición. FEALQ. Sao Pablo Brasil Cap. 8

**Determinar el método óptimo de conservación del hongo *Trichoderma* sp. en refrigeración a 4 °C**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Mayra Claros

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:**

Se determinó el método óptimo para la conservación del hongo *Trichoderma* sp. con todos los aislados de la colección de la Fundación PROINPA, en refrigeración a 4°C . Los mejores métodos de conservación resultaron ser los medios arroz, PDA, PA (PDA+aceite) y agua en un periodo no mayor a los ocho meses de conservación. Al cabo de este tiempo se va perdiendo la viabilidad de las cepas y dependiendo el medio de conservación las cepas pueden contaminarse. Esta es la

primera parte de un estudio a largo plazo para determinar cuál es el mejor método de conservación del hongo *Trichoderma sp.* a largo plazo.

**Palabras claves:** Conservación, *Trichoderma sp.*

#### **191. Objetivos:**

Determinar el método óptimo de conservación del hongo *Trichoderma sp.* en refrigeración a 4 °C con todos los aislados de la colección de la Fundación PROINPA.

#### **192. Hipótesis**

#### **193. Revisión de literatura**

Los hongos son el segundo grupo de organismos más numerosos del mundo, después de los insectos. Su importancia radica en que participan en todos los procesos biológicos, tienen un papel vital en la evolución de la vida terrestre, en la dinámica de los ecosistemas, el mantenimiento de la biodiversidad y el progreso humano.

A pesar de la eficiencia comprobada de estos hongos, la escasez de formulaciones o preparaciones que permitan su preservación tanto a temperaturas ambientales o temperaturas bajas por periodos razonables, representa uno de los principales obstáculos para la utilización más amplia de este hongo (EDMILSON, 1993).

LEUCONA (1996), indica que no existe un método universal de conservación ya que cada microorganismo puede responder en forma diferente a los procedimientos de almacenamiento, incluso pueden existir diferentes comportamientos entre cepas de un mismo hongo.

#### **194. Materiales y métodos**

##### **4.1. Materiales**

##### **4.1.1. Material biológico**

Se seleccionaron las cepas elite de la colección de PROINPA tomando en cuenta los resultados de la Tesis de Grado de Claudia Acha. Los aislados probados fueron dos algodonosos T1, T6 y dos lisos T5, T8.

##### **4.1.2. Material de laboratorio**

Cámara de Flujo Laminar, autoclave, agua destilada, alcohol, algodón, papel filtro, bisturí, balanza, tubos de ensayo con tapa, cámara fotográfica, erlenmeyer de 250 ml., libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero, parafilm, papel aluminio, porta y cubre objetos, microscopio, Cámara de Neubauer.

Los sustratos a fueron:

1. Arroz + Caolín
2. PDA (Papa Dextrosa Agar)
3. Agua destilada
4. Aceite mineral + Papa Dextrosa Agar (PA)

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Conservación en arroz con Caolín**

Esta técnica se basa en el hecho de que el caolín (silicato de alumina) es un material inerte, pero con capacidad de absorción de la humedad. Se prepararon tubos de ensayo esterilizados, los que se llenaron una cuarta parte (1/4) con caolín esterilizado a 180 °C durante 1 hora, dejándolo luego enfriar en una campana de desecación por 24 horas. Se colocó arroz inoculado con *Trichoderma* sp.. Los tubos de ensayo fueron flameados, sellados con parafilm y almacenados a 4°C.

### **4.2.2. Conservación en PDA**

La preparación del medio de cultivo PDA consiste en: para un litro de medio, se pelan 200 gr. de papa, se pica en cubos y se pone a hervir durante 15 minutos en 500 cc de agua, luego se filtra y se adiciona 20 gr. de azúcar y 15 gr. de agar, mezclar bien enrasando hasta 1000 cc, se tapa el recipiente con papel aluminio y se autoclava durante 15 minutos a 121 ° C. Luego se procedió al vaciado en tubos del medio de cultivo en una Cámara de Flujo, dejándolos solidificarse en pico de flauta y se esperó que enfríe para refrigerarlo. Dejar reposar por lo menos 24 horas antes de su uso.

Una vez que se tenga el medio preparado, se procedio a la siembra de los aislados. Cerrando los tubos con parafilm, identificando la cepa y la fecha de inoculación.

Se incubaron a 20 °C por espacio de una semana. Posterior a ello se transfirieron para su conservación a 4° C.

### **4.2.3. Conservación en agua**

Se cultivó el hongo en cajas Petri con una capa delgada de PDA, después de su esporulación se cortó el medio en pequeños bloques de aproximadamente 1 cm. cada uno. Esta porción de micelio, fue transferido a tubos o recipientes con 4 ml. de agua destilada estéril para ser sellados y colocados a 4 °C, en una posición lo más horizontalmente posible, sin que el líquido alcance el bloque de cultivo. Antes de sellarlos se flameó con el fin que las esporas aerógenas de otras especies indeseables se destruyan.

### **4.2.4. Conservación en aceite mineral**

En tubos de ensayo se vaciaron 6 cc. de PDA haciendo una siembra en pico de flauta, con la variante que los cultivos corrientes en tubos se cubrieron por completo con 4 cc de aceite mineral puro esterilizado, por encima de la colonia bien desarrollada para evitar así la deshidratación y reducir la actividad metabólica. Luego se guardaron a una temperatura de 4 °C.

## **4.3. Diseño Experimental**

Cada tubo con sustrato constituye una unidad experimental, el diseño empleado será Completamente Aleatorio con 4 cepas, 4 sustratos y 3 repeticiones. La duración de la prueba será de 8 meses, en este periodo se tomaran las lecturas a partir del día treinta y consecutivamente cada treinta días hasta llegar a los 8 meses.

#### 4.4. Análisis estadístico

El porcentaje de viabilidad se analizó de acuerdo al modelo lineal generalizado bajo el supuesto de distribución binomial (prueba de Wald)

$$\eta_{ijk} = \text{logit} \left[ \frac{\pi_{ijk}}{1 - \pi_{ijk}} \right] = \eta + \theta_i + \beta_j + \alpha_{ijk}$$

$i = 1, 2, 3, 4$  medios de conservación.

$j = 1, 2, 3, 4$  cepas *Trichoderma* sp.

$\eta_{ijk}$  = porcentaje de viabilidad  $j$ -ésima cepa en el  $i$ -ésimo medio de conservación en la  $k$ -ésima unidad experimental.

$\eta$  = media general de logit

$\theta_i$  = Efecto fijo del  $i$ -ésimo medio de conservación.

$\beta_j$  = Efecto fijo de la  $j$ -ésima cepa de *Trichoderma* sp.

$\alpha_{ijk}$  = Efecto fijo de la interacción entre el  $i$ -ésimo medio de conservación y la  $j$ -ésima cepa de *Trichoderma* sp.

#### 195. Resultados

##### 5.1 Viabilidad de *Trichoderma* sp.

Según el cuadro 1 no existen diferencias significativas entre cepas y medios. A pesar que la interacción entre medios y cepas no ha sido significativo en laboratorio se vio que el arroz presentó el porcentaje más bajo de viabilidad. (Figura 1)

Cuadro 1. Estadística de Wald

Fuente	Gl.	Cuadrado de medias	Pr>Chi
Medio	3	73.7831	0.0001
Cepa	3	31.6584	0.0001
Medio*Cepa	9	55.3657	0.0001

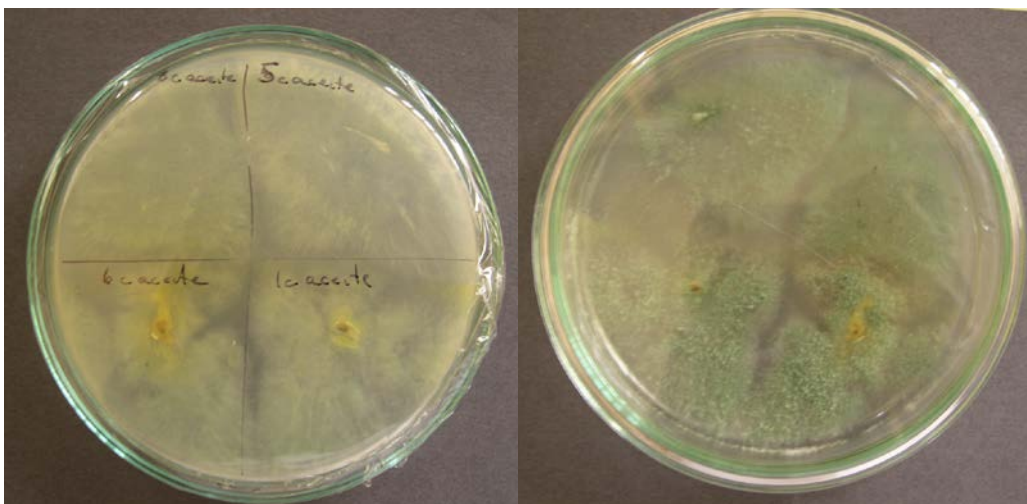


Figura 1. Activación de las cepas de *Trichoderma* sp. en PDA.

## 5.2 Probabilidades

Según la figura 3 los medios de conservación de agua, PA (PDA+aceite) y PDA son los mejores en comparación con el arroz. Los medios agua, PDA y PA (PDA+aceite) comparados con el medio arroz con cualquiera de las cepas probadas son mejores. (Figura 2)

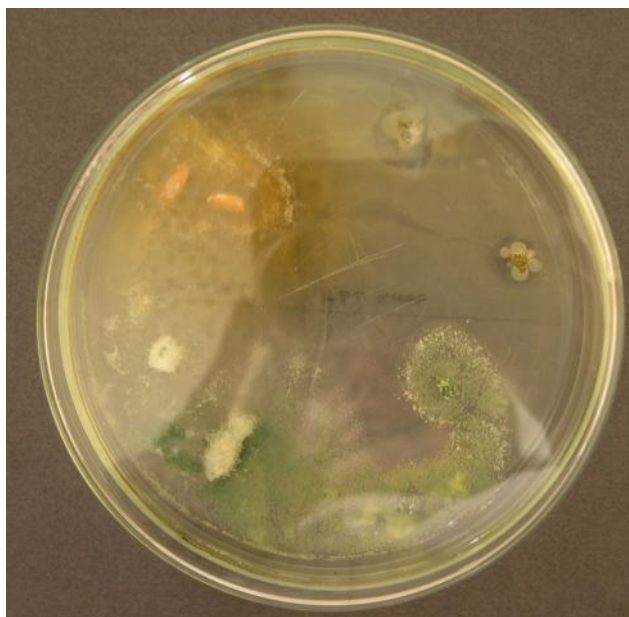


Figura 2. Activación de *Trichoderma* sp. con el sustrato de arroz con caolín.

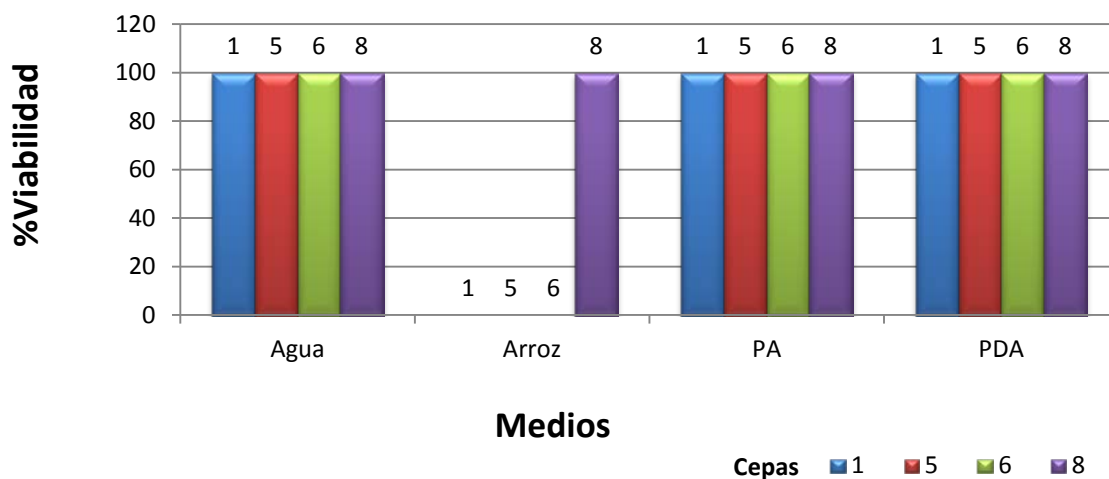


Figura 3. Porcentaje de Viabilidad de cepas de *Trichoderma* sp. en diferentes medios de conservación.

Las cuatro cepas de *Trichoderma sp.* probadas con el medio agua se comportan de la misma manera por lo que se las puede considerar iguales. Las cuatro cepas de *Trichoderma sp.* con los medios agua, PA (PDA+aceite) y PDA, obtuvieron el mismo porcentaje de viabilidad por lo que se comportan de igual manera. (Fig.3)

Las cepas de *Trichoderma sp.* 1, 5 y 6 en el medio arroz son las que han presentado menor porcentaje de viabilidad siendo estas inviábiles al cabo de 8 meses de su conservación siendo que la cepa 8 con el medio arroz es la mejor porque al cabo de 8 meses todavía sigue siendo viable.

#### **196. Discusión**

Para evitar la degeneración y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación en las características deseables de una cepa, se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como se enumeran a continuación: Carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo; acumulación de secreciones tóxicas propias del metabolismo del hongo; alteración del pH en el medio (acidez o alcalinidad); disminución en la concentración de oxígeno y la consecuente acumulación de CO<sub>2</sub> (Gerticem, 2004).

Los métodos de conservación a corto plazo son métodos que ayudan al mantenimiento de las cepas, generalmente para el uso frecuente donde se requiere la cepa activa, igualmente puede darse por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos. (García y Uruburú,1991). Por lo que se probaron diferentes métodos siendo todos eficientes a corto plazo.

#### **197. Conclusiones**

- Por el análisis estadístico se concluye que todas las cepas de *Trichoderma sp.* con todos los medios arroz, PDA, PA (PDA+aceite) y agua no presentan diferencias significativas entre sí.
- El análisis de probabilidades nos da a concluir que las cepas de *Trichoderma sp.* con los medios PDA, PA (PDA+aceite) y agua se comportan de la misma manera.
- El análisis de probabilidades nos muestra que las cepas 1,5 y 6 no son viables con el medio arroz, resultando solo la cepa 8 viable al cabo de 8 meses de su conservación.
- Por lo anteriormente nombrado el medio arroz no es el mejor medio para la conservación de las cepas 1,5 y 6 de *Trichoderma sp.* por el tiempo de 8 meses. El arroz es un medio orgánico rico en nutrientes que por su naturaleza misma tiende a descomponerse más rápido que otros medios.

#### **198. Recomendaciones**

- Se recomienda ver hasta cuando los otros sustratos serán buenos para su utilización en la conservación de *Trichoderma sp.*

- Se recomienda obtener el mejor medio de conservación de *Trichoderma* sp. para su uso en el cepario.
- Se recomienda probar métodos a largo plazo para su uso en la colección de la Fundación PROINPA.

#### 199. **Bibliografía consultada**

- EDMILSON, J. M. 1993. Efeitos de formulacoes na preservacao de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL e *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) sob diferentes condições de armazenamento. Tesis de Doutor Piracicaba Estado de São Paulo – Brasil.
- MENECEZ, E. E. 1999. Métodos de conservación de *Beauveria brogniartii* Cepa Ayopaya. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Cochabamba – Bolivia.
- MONTGOMERY, D. 2003. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa Wiley. México DF.

#### **Evaluación de medios de cultivo sólido para *Trichoderma* sp.**

**Responsable: Noel Ortuño**

**Equipo técnico: Mayra Claros**

**Instituciones colaboradoras o socias:**

#### **Compendio:**

*Trichoderma* sp es un hongo antagonista, que actúa como organismo benéfico impidiendo el desarrollo de hongos o nemátodos causantes de enfermedades en las plantas. Generalmente se ubica en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, como residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por hongos fitopatógenos. El sustrato común de multiplicación masiva de este hongo es el arroz, pero por ser de consumo humano y costo elevado se realizó este trabajo con el objetivo de encontrar el mejor sustrato para la multiplicación masiva de *Trichoderma* sp. Los aislados probados fueron: T1 y T5. Siendo T1 un aislado algodonoso y T5 un aislado liso con siete sustratos: Arroz (Testigo), Arcilla + Melaza, Calcita + Melaza, Cascarilla de arroz, Arroz (50) + Cascarilla de arroz (50), Arroz (30) + Cascarilla de arroz (70), Cascarilla de arroz + Melaza. El diseño empleado fue Completamente Aleatorio con 2 cepas, 7 sustratos y 4 repeticiones. Dependiendo la cepa utilizada varían los resultados para los diferentes sustratos. La velocidad de crecimiento de las cepas es diferente siendo T1 mejor que T5. Los mejores resultados se obtuvieron en los sustratos que tenían arroz. Siendo los mejores Arroz (Testigo) y Arroz (50) + Cascarilla de arroz (50). Posteriormente se encuentra el sustrato Arroz (30) + Cascarilla de arroz (70).

**Palabras claves:** Multiplicación masiva, *Trichoderma* sp.

**200. Objetivos:** El objetivo es encontrar el mejor sustrato para la multiplicación masiva de *Trichoderma* sp.

**201. Hipótesis :**



*Trichoderma sp.* crece en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, por lo que se puede tener medios económicos alternativos al arroz para su multiplicación masiva.

## **202. Revisión de literatura**

*Trichoderma sp.* es un hongo antagonista, que actúa como organismo benéfico impidiendo el desarrollo de hongos o nemátodos causantes de enfermedades en las plantas. Este hongo anaerobio se encuentra naturalmente en el suelo y se caracteriza por no tener un estado sexual determinado.

Generalmente se ubica en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, como residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por hongos fitopatógenos. Su importancia radica principalmente en que ataca, parasita y desplaza otros hongos que producen enfermedades en las plantas.

Por otro lado su acción como biofungicida se ve complementada por su acción estimulante en el crecimiento de raíces lo que induce en la planta mayor resistencia a los ataques de plagas y enfermedades (Arias, 2004).

*Trichoderma sp.* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de hidrógeno, compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio. (Moore, 1996)

## **203. Materiales y métodos**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1. Material biológico**

Se seleccionaron las cepas elite de la colección de PROINPA tomando en cuenta los resultados de la Tesis de Grado de Claudia Acha. Los aislados probados fueron: T1 y T5. Siendo T1 un aislado algodonoso y T5 un aislado liso.

#### **4.1.2. Material de laboratorio**

Cámara de Flujo Laminar, microscopio, autoclave, agua destilada, alcohol, cinta aislante, algodón, papa, azúcar, agar, asa de platino, bisturí, bolsas de polipropileno, balanza, cajas petri, cámara fotográfica, erlenmeyer de 1000 ml., libreta de registro, marcador, micropipetas, pipetas, mechero, parafilm, papel aluminio, papel filtro, porta y cubre objetos, Cámara de Neubauer.

Los sustratos a utilizados fueron:

5. Arroz (Testigo)
6. Arcilla + Melaza
7. Calcita + Melaza
8. Cascarilla de arroz
9. Arroz (50) + Cascarilla de arroz (50) 50/50
10. Arroz (30) + Cascarilla de arroz (70) 30/70
11. Cascarilla de arroz + Melaza

## 4.2. METODOS

### 4.2.1. Siembra de aislados de *Trichoderma sp.*

La preparación del medio de cultivo PDA consiste en: para un litro de medio, se pelan 200 gr. de papa, se pica en cubos y se pone a hervir durante 15 minutos en 500 cc de agua, luego se filtra y se adiciona 20 gr. de azúcar y 15 gr. de agar, mezclar bien enrasando hasta 1000 cc, se tapa el recipiente con papel aluminio y se autoclava durante 15 minutos a 121 ° C. Luego se procede al plaqueado del medio de cultivo en una Cámara de Flujo y se espera que enfríe para refrigerarlo. Dejar reposar por lo menos 24 horas.

Una vez que se tuvo el medio preparado, se procedió a la siembra de los dos aislados. Cerrando las cajas petri con parafilm, se identifica la cepa mas la fecha.

Incubar a 20 ° C por espacio de una semana

### 4.2.2. Preparación de los sustratos

Para el ensayo se remojaron todos los sustratos durante una hora. Se quitó toda el agua sobrante y se embolsó aproximadamente 200 gr. por repetición. Posteriormente se los autoclavó por 15 min. a 20 psi de presión.

Paralelamente se autoclavó la melaza, los tapones de algodón y el agua destilada.

### 4.2.3. Conteo de conidias

Para el conteo de conidias se puso 1 gramo de arroz en 9 ml de agua destilada se agito en un agitador tipo vortex por un minuto, se diluyo 1 a 2 veces mas dependiendo cuan concentrada esta la solución. Se llevo esta solución al hematocímetro para el conteo de conidias.

Para el montaje de la suspensión se tomó con un gotero colocándola en las ranuras de la cámara de Neubauer. Se montó el hematocímetro al microscopio y se procedió a la lectura en las dos cámaras, en los cuadrados mas pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno; cinco de estos se utilizaron para el conteo de las conidias.

Donde se aplicó la fórmula general:

$$\#de\ conidias/ml = Suma\ de\ los\ 5C.S. \times 50000$$

Donde:

C.S.= Cuadrados Secundarios

50000 = Constante

### 4.2.4. Velocidad de crecimiento

French (1982), indica que el crecimiento es una función de las hifas y no de cada célula individual. El crecimiento en medio líquido es más globoso y estacionario, se necesita que el hongo flote, porque de lo contrario le faltará oxígeno. Crece sobre la superficie con poca extensión dentro del medio, y varía considerablemente el crecimiento aéreo. Sobre medio sólido se observa el ritmo de avance del hongo, el cual es constante y uniforme. El ritmo de crecimiento puede variar cuando los factores ambientales no son propicios.

Por lo anteriormente citado la evaluación se realizará en medio sólido tomando en cuenta la velocidad de de crecimiento en porcentaje de los diferentes sustratos.

### 4.3. Diseño Experimental

Cada bolsa con sustrato constituyó una unidad experimental, el diseño empleado fue Completamente Aleatorio con 2 cepas, 7 sustratos y 4 repeticiones. La duración de la prueba fue de 9 días, en este periodo se tomaron las lecturas a partir del quinto día, del porcentaje de crecimiento del hongo.



Figura 1. Ensayo dentro la incubadora gigante

### 4.4. Análisis estadístico

El porcentaje de crecimiento y la mejor cepa se analizaron de acuerdo al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_j + \theta_k + \alpha_{jk} + \xi_{k(ij)}$$

$i = 1,2,3,4$ ; unidades experimentales por tratamiento

$j = 1,2,3,\dots,7$ ; sustratos

$k = 1,2$  cepas

$Y_{ijk}$  = Porcentaje de crecimiento en la  $i$ -ésima unidad experimental con  $j$ -ésimo sustrato y  $k$ -ésima cepa.

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto fijo del  $i$ -ésimo tratamiento

$\theta_k$  = Efecto fijo del k-esima cepa  
 $\alpha_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción entre el j-esimo sustrato y k-esima cepa.  
 $\xi_{\kappa(ij)}$  = Efecto aleatorio de los residuales

## 204. Resultados y Discusión

### 5.1 Velocidad de crecimiento

Según el análisis de varianza (Cuadro 1) existen diferencias significativas entre sustratos, cepas y la interacción cepa por sustrato ( $Pr < 0,001$ ) (Fig. 2).

Cuadro 1. Análisis de varianza

Fuente	Gl.	Suma de cuadrados	de Cuadrado medios	de Valor de F	Pr>F
Cepa	1	0.39446429	0.39446429	441.80	<.0001**
Sustrato	6	7.80053571	1.30008929	1456.10	<.0001**
Cepa*Sustrato	6	0.12178571	0.02029762	22.73	<.0001**
Error	42	0.03750000	0.00089286		
total	55	8.35428571			

\*\* al 99 %

Las medias estimadas para cada una de las cepas de *trichoderma sp.* (cuadro 2) demuestran que hubo diferencias entre cepas ( $Pr < 0,001$ ). Donde la cepa T1 (A) tiene mejor crecimiento que la cepa T5 (B), en condiciones de laboratorio. (Fig. 3)



Figura 2. Crecimiento de *trichoderma sp.* en los diferentes sustratos

Cuadro 2. Comparación de medias entre cepas

Cepa	LS media	Pr> t
------	----------	-------

T1	0.61250000	<.0001
T5	0.44464286	

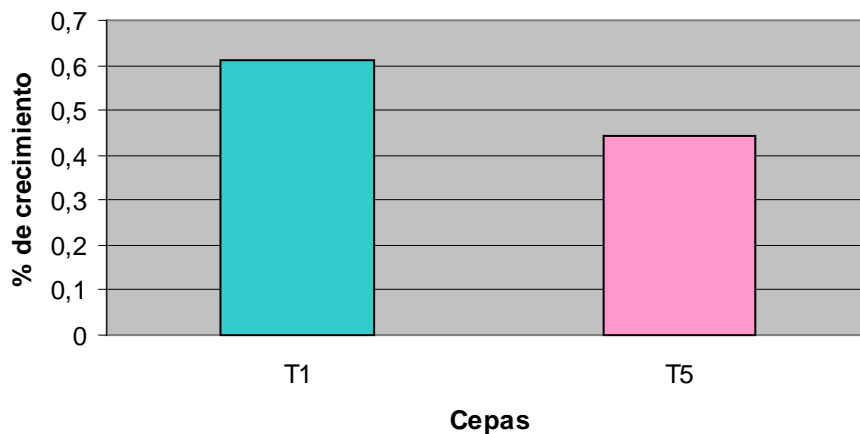


Figura 3. Porcentaje de crecimiento en dos cepas de *trichoderma sp.*



Figura 4. Crecimiento de las cepas T1 y T1 en arroz (sustrato 1)

Existen diferencias en los sustratos (cuadro 3) (Fig. 5), siendo el mejor el 1 (arroz) (Fig. 4). El efecto de los sustratos 5 (arroz 50 + cascarilla 50) y 6 (Arroz 30 + cascarilla 70) son similares no teniendo diferencias significativas entre ellos por lo que pueden ser considerados como sustratos alternativos para la producción masiva del hongo.

Cuadro 3. Comparación de medias entre sustratos

Sustrato	Media LS	Número LS media
1	0.99375000	1
2	0.20625000	2
3	0.16250000	3
4	0.24375000	4
5	0.95000000	5
6	0.93125000	6
7	0.21250000	7

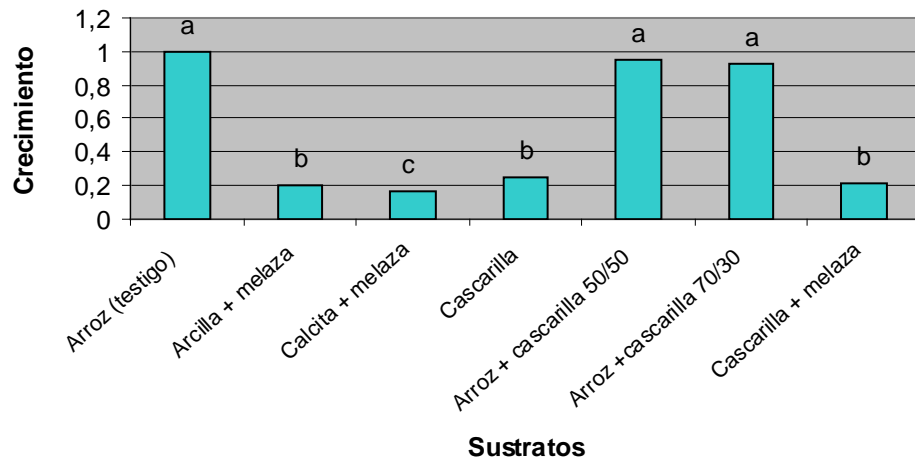


Figura 5. Crecimiento de *Trichoderma sp.* en siete sustratos (efecto fijo de sustratos).

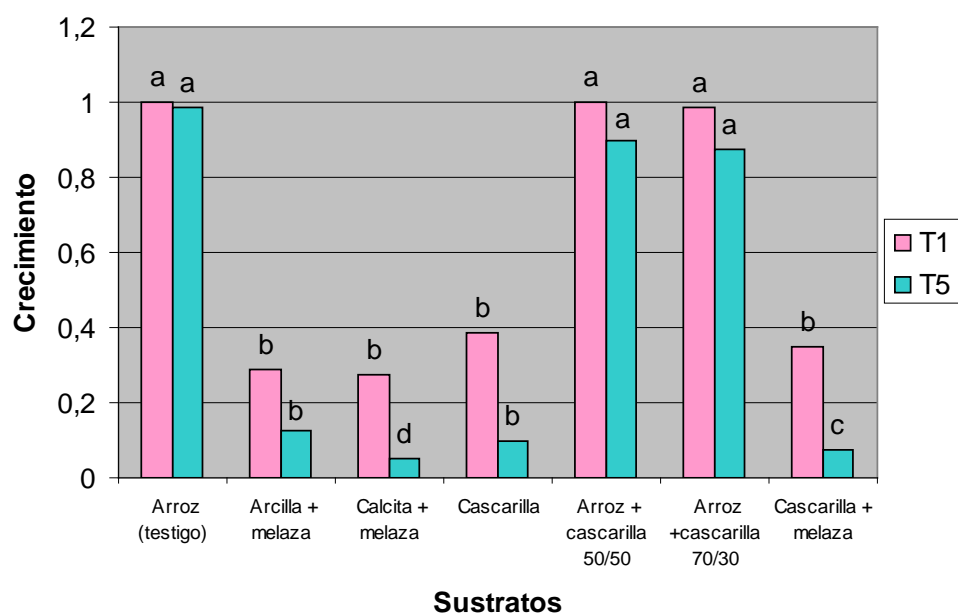


Figura 6. Desarrollo de las dos cepas en arroz +cascarilla 50/50 (sustrato 5)

El cuadro 4 nos indica que el crecimiento de la cepa T1 (A) es igual con los sustratos 1,5 y 6 (Fig. 7). Por otro lado el crecimiento de la cepa T5 (B) en el que mejor se desarrolla es en el sustrato 1. Lo cual sugiere que la cepa T1 es más agresiva en su crecimiento y se acomoda a más sustratos; en comparación a la cepa T5 que en el único sustrato que se desarrolla bien es en el 1.

Cuadro 4. Comparación de medias entre cepas y sustratos

Cepa	Sustrato	Media LS	Número LS media
A	1	1.00000000	1
A	2	0.28750000	2
A	3	0.27500000	3
A	4	0.38750000	4
A	5	1.00000000	5
A	6	0.98750000	6
A	7	0.35000000	7
B	1	0.98750000	8
B	2	0.12500000	9
B	3	0.05000000	10
B	4	0.10000000	11
B	5	0.90000000	12
B	6	0.87500000	13
B	7	0.07500000	14



El cuadro 5 (Fig. 8) nos indica que la mejor concentración para la cepa T1 fue el sustrato 6 seguidamente por el sustrato 5 y 1. En el caso de la cepa T5 la mejor concentración se obtuvo con el sustrato 6 seguidamente del sustrato 1 y 5.

Cuadro 5. Concentración final de los tratamientos

Sustratos	<i>Trichoderma sp.T1</i>	<i>Trichoderma sp.T5</i>
1) Arroz (testigo)	2,05E+09	1,65E+09
2) Arcilla + melaza	1,50E+07	5,50E+06
3) Calcita + melaza	1,50E+06	1,00E+06
4) Cascarilla	3,60E+08	2,55E+08
5) Arroz + cascarilla 50/50	2,25E+09	1,30E+09
6) Arroz +cascarilla 70/30	5,50E+09	3,95E+09
7) Cascarilla + melaza	3,90E+07	1,00E+08

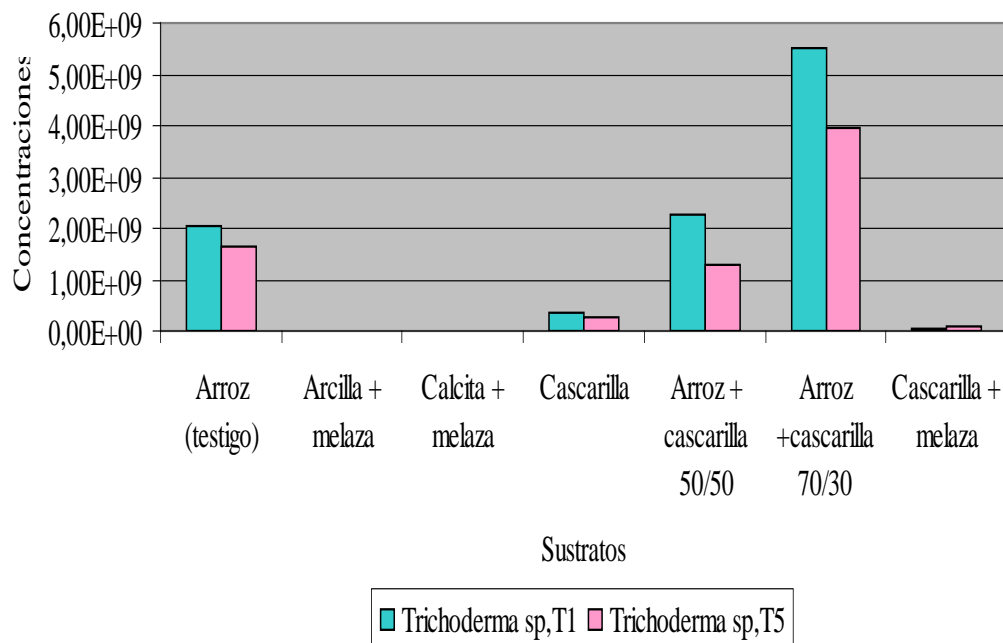


Figura 8. Concentración final de los tratamientos

## 205. Conclusiones

- Dependiendo la cepa utilizada varían los resultados para los diferentes sustratos.



- La velocidad de crecimiento de las cepas es diferente siendo T1 mejor que T5.
- Los mejores resultados se obtuvieron en los sustratos que tenían arroz. Siendo los mejores 1 y 5. Posteriormente se encuentra el sustrato 6.
- La cepa T1 se comporta de igual manera con los sustratos 1 (arroz), 5 (arroz 50 + cascarilla 50) y 6 (arroz 30 + cascarilla 70). La cepa T5 es mejor con el sustrato 1 (arroz).
- La mejor concentración del ensayo se obtuvo con la cepa T1 (5,50E+09) y el sustrato 6 (arroz 30 + cascarilla 70). En segundo lugar esta la cepa T5 (3,95E+09) con el mismo sustrato (6). Por lo que se concluye que con el 70 % de cascarilla de arroz se consigue una mayor cobertura en la superficie del arroz aumentando así su población por consiguiente su concentración.
- En el caso de la cascarilla pura sustrato 4, se obtuvo un crecimiento muy pobre por lo que no recomiendo para su uso en la multiplicación masiva.
- Los peores sustratos fueron el 2 (arcilla + melaza), 3 (calcita + melaza) y 7 (cascarilla + melaza). Habiendo muchas dificultades del hongo para su desarrollo. En conclusión a las cepas T1 y T5 no se desarrollan bien con la melaza.

#### 206. Recomendaciones

- Se recomienda seguir haciendo pruebas con otros sustratos, para obtener un sustrato que se iguale al arroz y que no sea de consumo humano.
- Se recomienda probar otra fuente de energía en el caso de los sustratos inertes. (Fig. 4)



Figura 4. Sustrato inerte con fuente de energía

#### 207. Bibliografía consultada

Arias, M. 2004. Hongos Antagonistas o micopatógenos en: Guía de insumos Biológicos para el Manejo Integrado de Plagas. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Harmonia. pp. 59-62.

French, R. E., Teddy, T.H. 1982. Métodos de investigación fitopatología. 1<sup>ra</sup> Ed. Reinpresión. San José, Costa Rica: IICA, pp. 289.

Moore, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.

**PRUEBA DE EFICIENCIA DEL BIOFUNGICIDA- BIOFERTILIZANTE- BIOBACILLUS (*Bacillus subtilis* 80 % + *Bacillus amyloliquefasciens* 20 %) PARA EL CONTROL DE LA RIZOCTONIASIS DEL CULTIVO DE PAPA**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia M.

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja  
**Instituciones colaboradoras o socias:** SENASAG

**COMPENDIO**

Para determinar la eficiencia del biofungicida- biofertilizante BIOBACILLUS en el control de la rizoctoniasis del cultivo de la papa, se estableció un ensayo en la zona de Colomi (Cochabamba) bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos. Se utilizó el cultivar Robusta. Los tratamientos fueron T1 ( BIOBACILLUS, 2.5 kg/ha), T2 (BIOBACILLUS, 2 kg/ha), T3 (BIOBACILLUS, 1.5 kg/ha), T4 (Maxim XL), T5 (Testigo). La aplicación del producto se realizó a la siembra, a surco abierto, sobre el estiércol y la semilla. El volumen de aplicación fue de 200 litros/ha. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con BIOBACILLUS , especialmente T1 y T2, seguido de T3 , tuvieron un control eficiente de la rizoctoniasis, mostrando valores bajos de incidencia e intensidad de daño y altos rendimientos. Asimismo, los tratamientos mostraron un mayor desarrollo del cultivo, mostrando significativamente una mayor emergencia, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor, mayor sanidad de las plantas y calidad de los tubérculos cosechados, con respecto a los otros tratamientos.y al testigo. El testigo (T5), presentó menor desarrollo, valores muy altos de grado de daño y rendimientos bajos. Los resultados muestran que BIOBACILLUS, mostró ser eficiente en el control de la rizoctoniasis de la papa, y por otra parte mostró un efecto positivo en el desarrollo del cultivo.

**Palabras claves:** Rizoctoniasis, *Rhizoctonia solani* Kühn , estrategias, BIOBACILLUS.

**1. INTRODUCCION**

Uno de los elementos clave en la práctica de la agricultura sostenible es el uso eficiente de los recursos naturales y de los insumos agrícolas (suelo, agua, material vegetal, energía, fertilizantes, plaguicidas), puesto que con ello debe reducirse significativamente la intensidad o frecuencia en que sea necesaria su utilización para asegurar la producción. Por esto, y dado que la incidencia de enfermedades, plagas y malas hierbas contribuye directa o indirectamente a disminuir dicha eficiencia en el uso de los insumos, uno de los componentes citados con más consistencia en las estrategias para implementar una agricultura sostenible, se refiere al manejo integrado de estreses bióticos y abióticos de los cultivos, o a programas de Manejo Integrado de Plagas (Jiménez Díaz, 2003).

Por ello, el control biológico, utilizando microorganismos autóctonos o importados, pero seleccionados en función de su actividad y de su bajo impacto medio ambiental, tiene una gran importancia y futuro potencial. Se trata de utilizar interacciones planta-microorganismo, que sean beneficiosas para los cultivos y que mejoren el control de patógenos, pero situando la lucha biológica en un contexto de control integrado. Una de las grandes ventajas del sistema bacteria contra bacteria, es que los agentes de control están dotados de propiedades similares al patógeno, entre las que cabe destacar las de fácil multiplicación y dispersión. Se trata en realidad de un

aprovechamiento de ciertos principios como la competencia, el antagonismo o la inducción de resistencia que rigen las interacciones entre plantas y bacterias (López y Peñalver, 2009).

En Bolivia, la papa es un cultivo básico y de seguridad alimentaria para la población. Para más de 200,000 familias de pequeños agricultores que constituyen entre el 30 al 40% del total de campesinos del país (Zeballos, 1997), la papa constituye la principal fuente de alimentación e ingresos (Fernández-Northcote et al, 1999). Sin embargo, la papa es vulnerable a la pérdida de la fertilidad del suelo y al ataque de un gran número de enfermedades y plagas, como la rizoctoniasis. Hooker (1981), menciona 266 patógenos y plagas, además de otros factores abióticos como las heladas y la sequía.

Por otra parte, el biofungicida-biofertilizante **BIOBACILLUS** es un producto en base a microorganismos benéficos con excelentes resultados en varios cultivos, como papa, maíz, hortalizas, frutales, etc. En general, influencia positivamente en la vitalidad de las plantas, la sanidad, el control biológico de enfermedades y en la habilidad de la planta para soportar estreses abióticos como sequía y salinidad. Tiene efecto en la mejora de las diversas características del suelo, lo cual no sólo permitirá alcanzar mayores rendimientos como respuesta inmediata a la incorporación de la bacteria y la materia orgánica, sino permitirá recuperar y conservar la fertilidad de los suelos, que constituyen la única fuente para alcanzar una agricultura sustentable en la región andina de Bolivia.

En base a estos antecedentes, para realizar nuevas innovaciones en el manejo del cultivo de papa, en el presente trabajo se estudió la eficacia del biofungicida-biofertilizante BIOBACILLUS (*Bacillus subtilis* 80 % + *Bacillus amyloliquefasciens* 20%) en el cultivo de papa.

## OBJETIVOS

- a) Evaluar la eficiencia del biofungicida-biofertilizante **BIOBACILLUS (*Bacillus subtilis* 80 % + *Bacillus amyloliquefasciens* 20%)** para el control de la rizoctoniasis y el desarrollo del cultivo de papa.
- b) Evaluar la fitotoxicidad.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Rizoctoniasis

#### Importancia:

La rizoctoniasis es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn en la fase asexual y *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk en la fase sexual. La rizoctoniasis es una enfermedad ampliamente diseminada en todas las regiones donde se cultiva papa en todo el mundo y también en las zonas paperas de Bolivia. Su efecto en la emergencia, daños en estolones y tallos, producción de esclerotes sobre los tubérculos, la asociación de este patógeno con la piel escamosa de los tubérculos y además la malformación de los tubérculos, afectan la producción y calidad de papa en el país (Navia et al, 2009).

Plantas severamente afectadas muestran una disminución en rendimiento hasta de un 96 %. El efecto en la calidad es altamente significativo en relación al de las plantas sanas. Puede ocasionar cosechas de 80 % de tubérculos pequeños y deformes y solo un 20 % de tamaño regular. Recibe diferentes denominaciones de acuerdo a las zonas donde se presenta, como ser rizoctoniasis, sarna, costra negra, pantalón blanco, chancro del tallo.

### **Distribución a nivel Nacional**

La rizoctoniasis es una enfermedad ampliamente diseminada en todas las regiones donde se cultiva papa en las zonas paperas de Bolivia, alcanzando incidencias hasta del 90 % en los departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Tarija, Potosí, La Paz, Santa Cruz y Tarija.

### **Síntomas**

La enfermedad afecta brotes, raíces, tallos y tubérculos. En los tres primeros producen lesiones o canchales hundidos, los cuales van estrangulando dichos órganos. Los daños más severos se producen poco después de la siembra, especialmente en suelos fríos y húmedos. El hongo ataca los brotes subterráneos, anulando o retardando la emergencia, dando lugar a fallas en la emergencia, desigualdad en el crecimiento, plantas débiles y por lo tanto una reducción en el rendimiento.

Los brotes que llegan a emerger presentan canchales, en casos avanzados pueden estrangular el tejido y como consecuencia se observa: antocianescencia y enrollamiento de las hojas apicales, y formación de tubérculos aéreos.

La fase sexual se presenta en la superficie de los tallos cuando hay suficiente humedad, por encima de la línea del suelo, formando una capa tenue blanco plumosa de apariencia polvorosa, que se desprende fácilmente al frotarla con los dedos y no ocasiona daño económico. Los agricultores denominan a este síntoma "pantalón blanco".

Durante la tuberización, uno de los síntomas observados, es la piel escamosa que empieza en los ojos o en el extremo más joven del tubérculo, que se manifiesta por el resquebrajamiento de la piel en forma de red con mallas de diferente tamaño que puede dar lugar a grietas, concavidades y malformaciones de tubérculo. Sobre la superficie de los tubérculos, el hongo produce masa compactas de micelio (filamentos que constituyen el cuerpo del hongo) llamadas esclerotes de color negro o castaño oscuro que pueden ser de diferentes tamaños y formas (Navia et al, 2009).

### **Ciclo del agente causal**

*R. solani* se mantiene de una campaña a otra en el suelo: en forma de micelio en restos vegetales u otros hospedantes y en forma de esclerotes (estructuras de conservación). Sobre los tubérculos-semilla se mantiene en la piel escamosa y esclerotes. El hongo se disemina con el agua de riego o de escorrentía de la lluvia, por implementos agrícolas, animales o todo aquello que permita el movimiento de suelo infestado, así como con los tubérculos infectados. Una vez que el hongo se ha establecido en un suelo puede permanecer por tiempo indefinido.

### **Diseminación**

El hongo se disemina con el agua de riego o de escorrentía de la lluvia, por implementos agrícolas, animales o todo aquello que permita el movimiento de suelo infestado, así como con los tubérculos infectados

## **2.2. Componentes del Manejo Integrado**

Para agricultores y productores de semilla, el control de la rizoctoniasis es muy importante.

- Medidas de control de la Rizoctoniasis
  - Usar semilla libre de la enfermedad como medida combinada con el tratamiento de la semilla con fungicidas
  - Evitar terrenos con mucha humedad.
  - Sembrar semilla sana y bien brotada, no en una época fría y húmeda.
  - Realizar rotación de cultivos (3 años).
  - Control químico

-Control biològic

### 2.3. BIOBACILLUS :

BIOBACILLUS Es un biofungicida y biofertilizante sòlido en base a microorganismos benèficos, con excelentes resultados en varios cultivos (papa, maiz, hortalizas, frutales, ornamentales).

#### COMPOSICIÓN:

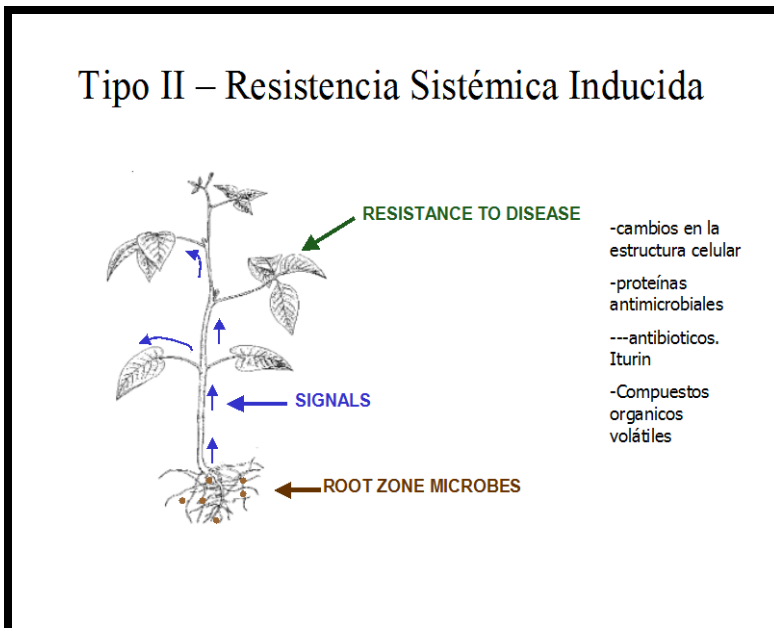
<i>Bacillus subtilis</i> .(4x10 <sup>9</sup> ufc).....	80 %
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .(4x10 <sup>6</sup> ufc).....	20 %
TOTAL .....	100.00 %

BIOBACILLUS Es un biofungicida y biofertilizante sòlido en base a microorganismos benèficos, *Bacillus subtilis*. y *Bacillus amyloliquefaciens* .

Tienen efecto en :

- la supresión de enfermedades de plantas,
- inicia la Resistencia Sistèmica Inducida, la exclusión de patògenos de la raiz por competencia, *tiene* antibiosis directa (ej. Iturin, amplio espectrofavorecer la liberaciòn de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo, la liberaciòn de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA ò àcido indol-3- acètico, y son activos en una gran variedad de condiciones (8-40°C, pH 5-9, óptima 7).
- Incrementa los rendimientos y la calidad del producto.

La “Resistencia Sistèmica Inducida”, es una nueva e innovativa forma de protecciòn de las plantas, no es solo un nuevo fenómeno sino una nueva tecnología. Consiste en activar el sistema de defensa de las plantas, la cual es activada en toda la planta. Esta forma particular de resistencia puede ser activada por agentes biòticos, y resulta en una protecciòn sistèmica de toda la planta contra una gama de enfermedades causadas por hongos y bacterias . (Sutton, 2005).



Resistencia Sistèmica Inducida (Fuente: Sutton, 2005, Dion, 2009)

### 3 . MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Localización

El ensayo se implementó en la localidad de Colomi (3200 msnm), perteneciente a la Provincia Chapare del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba. Esta zona está caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de papa y para la incidencia de la rizoctoniasis.

### 3.2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

### 3.3. Materiales

#### 3.3.1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Robusta, susceptible a la rizoctoniasis, y difundido en la zona.

#### 3.3.2. Productos

Se utilizaron el biofungicida-biofertilizante BIOBACILLUS y Maxim XL (Fludioxonil 25% + mefenoxan 10%) (Producto comercial).

### 3.4. Procedimiento experimental

El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

#### -Características de la unidad experimental

Distancia entre surcos	=	0.7 m
Distancia entre plantas	=	0.3 m
Largo del surco	=	10 m
N° de surcos /unid. exp.	=	6
N° de plantas/surco	=	33
N° de plantas/unid. exp.	=	198
Area de la unid. Exp.	=	42 m <sup>2</sup>
Distancia entre unid. exp.	=	1.0 m
Area total del ensayo	=	1015 m <sup>2</sup>

#### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis (kg/ha)
1	BIOBACILLUS	2.5
2	BIOBACILLUS	2.0
3	BIOBACILLUS	1.5
4	Maxim XL (producto comercial)	2.0 l/ha (Dosis comercial)

5	Testigo	-
---	---------	---

La aplicación del BIOBACILLUS se realizó por aspersión a la siembra, a surco abierto, sobre el estiércol y la semilla. El volumen de aplicación fué de 200 litros/ha.

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se evaluó el desarrollo de las plantas de papa (altura de planta e índice de cobertura del suelo) y el desarrollo de la enfermedad (emergencia, daño en estolones, piel escamosa y esclerotes en tubérculos). En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

Para la evaluación de daño en estolones y la evaluación de los tubérculos para estimar la incidencia y grado de daño por rizoctoniasis, se utilizó una escala de 1 a 6, donde 1 =0%, 2 = 0.1 – 10%, 3 = 10-25%, 4 = 25-50%, 5 = 50-75% y 6 = mayor a 75% de área cubierta por piel escamosa o esclerotes, o canchales.

### 3.6. Análisis estadístico

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05), con los datos de grado de daño y rendimiento.

#### 4. RESULTADOS

Las condiciones medio ambientales durante el ciclo del cultivo, fueron muy favorables para el cultivo y para el desarrollo de la rizoctoniasis. Las temperaturas fueron 10 - 27 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 1080 mm (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de la papa. Colomi, Cochabamba.

Mes	Temperatura °C			Precipitación mm
	Máxima	Mínima	Ambiente	
Diciembre	25	11	20	190
Enero	27	12	21	260
Febrero	26	12	21	240
Marzo	25	11	20	200
Abril	24	10	19	150
Mayo	23	10	18	40
Total				<b>1080</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

#### 4.1. Efecto de los tratamientos sobre la rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*)

Los resultados obtenidos muestran que todos los tratamientos con BIOBACILLUS ( T1, T2, T3) fueron efectivos para controlar las diferentes fases de la rizoctoniasis con respecto al tratamiento T4 (Maxim XL) y al testigo (T5). Mostraron mayor emergencia y menor intensidad de daño de estolones. Esto se manifestó en un mayor incremento en los rendimientos con respecto al testigo. Asimismo, los tubérculos cosechados presentaron menores valores de incidencia e intensidad de daño de piel escamosa y esclerotes sobre los tubérculos, lo cual se reflejó en una mejor calidad de los tubérculos-semilla. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 (BIOBACILLUS, 2.5 kg/ha) y T2 (BIOBACILLUS, 2,0 kg/ha). (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto de los tratamientos en control de la rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*). Colomi.

Tratamientos	Emergencia (%)	Índice Daño Estolones (%)	Incidencia (%)		Índice Daño (%)	
			Piel Escamosa	Esclerotes	Piel Escamosa	Esclerotes
T1= BIOBACILLUS (2.5 kg/ha)	100 a	2.0 a	3.0 a	1.0 a	1.5 a	0.4 a
T2= BIOBACILLUS (2.0 kg/ha)	100 a	2.0 a	3.3 a	1.2 a	1.6 a	0.5 a
T3= BIOBACILLUS (1.5 kg/ha)	100 a	2.2 a	5.0 b	3.5 b	3.1 b	1.5 b
T4= Maxim XL	90 b	5.0 b	10.0 c	5.5 c	6.0 c	3.0 c
T5= Testigo	80 c	20.5 c	60.0 d	22.0 d	30.5 d	11.5

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).



#### **4.2. Efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo**

Los tratamientos con BIOBACILLUS, en particular T1 (BIOBACILLUS, 2.5 kg/ha) y T2 (BIOBACILLUS, 2.0 kg/ha) seguido de T3 (BIOBACILLUS, 1.5 kg/ha), tuvieron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mostrando mayor uniformidad en desarrollo, mayor área foliar, mayor altura de planta, y mayor vigor, con respecto al tratamiento T4 (Maxim XL) y el testigo (T5). (Cuadro 3).

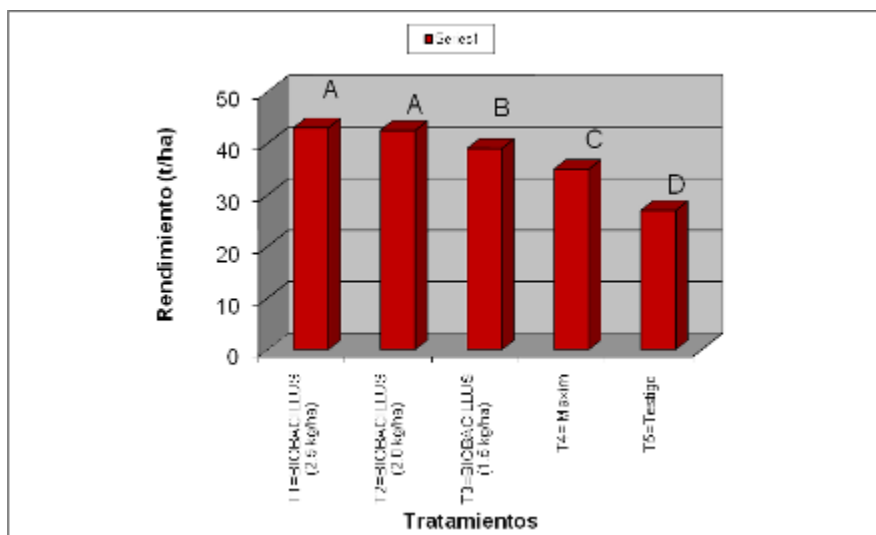
**Cuadro 3.** Efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo de papa. Ensayo BIOBACILLUS.

Tratamientos	Area Foliar (%)		Altura Planta (cm)		
	Al aporque	A floracion	Al aporque	A floracion	
T1= BIOBACILLUS (2.5 kg/ha)	25 a	100 a	29 a	147 a	
T2= BIOBACILLUS (2.0 kg/ha)	24 a	100 a	29 a	145 a	
T3= BIOBACILLUS (1.5 kg/ha)	21 b	97 b	25.5 b	140 b	
T4= Maxim XL	17 c	92 c	20.0 c	110 c	
T5= Testigo	10 d	80 d	15.0 d	90 d	

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Rendimiento**

En general se obtuvieron altos rendimientos. Los mayores rendimientos se obtuvieron con los tratamientos T1 (BIOBACILLUS, 2.5 kg/ha) Y T2 (BIOBACILLUS, 2.0 kg/ha), seguido de T3 (BIOBACILLUS, 1.5 kg/ha), mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento T4 (Maxim XL) y el testigo (T5). El testigo, mostró un rendimiento bajo (Figura 1). Con los tratamientos con BIOBACILLUS T1 T2 y T3 se obtuvieron incrementos de 55, 53 y 41 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (T5) (Figura 1).



**Figura 1.** Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de papa. Cultivar Robusta. Ensayo BIOBACILLUS.

Los promedios con igual letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 4. Análisis de varianza para Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de papa. Ensayo BIOBACILLUS.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	20.13	10.067	5.36	0.0334
Tratamientos	4	517.07	129.267	68.79	0.000 **
Error	8	15.03	1.879		
No aditividad	1	8.72	8.722	9.67	0.0171
Residual	7	6.31	0.902		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>552.23</b>			

CV = 3.48 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 5. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron favorables para el cultivo y la incidencia de la rizoctoniasis.
- ◆ Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con BIOBACILLUS , especialmente T1 y T2, seguido de T3 , tuvieron un control eficiente de la rizoctoniasis, mostrando valores bajos de incidencia e intensidad de daño y altos rendimientos. Asimismo, los tratamientos mostraron un mayor desarrollo del cultivo, mostrando significativamente una mayor emergencia, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor, mayor sanidad de las plantas y calidad de los tubérculos cosechados, con respecto a los otros tratamientos.y al testigo.

- ◆ Los resultados muestran que BIOBACILLUS, mostró ser eficiente en el control de la rizoctoniasis de la papa, y por otra parte mostró un efecto positivo en el desarrollo del cultivo. La dosis recomendada, es de 2.0 kg/ha.
- ◆ No se observaron síntomas de fitotoxicidad.
- ◆ BIOBACILLUS, es un biofungicida y biofertilizante sólido en base a microorganismos benéficos, *Bacillus subtilis*. y *Bacillus amyloliquefaciens*. Tienen efecto en la supresión de enfermedades de plantas, inicia la Resistencia Sistémica Inducida, la exclusión de patógenos de la raíz por competencia, *tiene* antibiosis directa (ej. Iturin, amplio espectro), favorecer la liberación de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo, la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA ó ácido indol-3- acético, y son activos en una gran variedad de condiciones (8-40°C, pH 5-9, óptima 7). Incrementa los rendimientos y la calidad del producto (PROINPA, 2009).

#### LITERATURA CITADA

1. Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffe, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Improving plant productivity with Rhizosphere Bacteria, Ryder, M.H. *et al.* (eds.), CSIRO division of soils, Glen Osmond.
2. Bochow, H., El-Sayed, S.F., Junge, H., Stavropoulou, A. and Schmiedeknecht, G. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as bio control agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. Journal of Plant Diseases and Protection 108:21-30.
3. Fernandez-Northcote.E.N., Navia, O., and Gandarillas, A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. Fitopatología 35 (3): 137-149.
4. Fernandez - Northcote, E. N.; Navia, O. y Gandarillas, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa 11: 1-25.
5. Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K, Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R 2002: Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth promoting effect. Microbiology 148:2097-2109.
6. Jimenez Diaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. Fitopatología 38 (2): 62- 73.
7. Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiol. Letters 182:291-296.

8. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4786-4790.
9. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
10. Zeballos, H. 1997. Aspectos económicos de la producción de papa en Bolivia. COSUDE – Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
11. Zapata, J. L. 1991. Combinación de inmunidad a los virus X e Y de la papa, y resistencia a *P. infestans*, en clones de papa. Tesis M.Sc. Univ. Nac. Agraria, La Molina, Lima, Perú.

### **Desarrollo preliminar de un bioinsecticida microbiano**

**Responsable:** Bioinsumos

**Equipo técnico:** Daniel Barja, Meneses Edson, Villca Samuel,

**Instituciones colaboradoras o socias:** Fautapo

**Compendio:**

**Palabras claves:** Microorganismos, Bioinsumos.

#### **208. Objetivos:**

El objetivo de este proyecto es desarrollar y difundir alternativas tecnológicas como parte de una estrategia para el manejo ecológico de plagas en la producción de quinua orgánica en el Altiplano Sur.

#### **209. Hipótesis:**

Los bioinsumos desarrollados se comportan en diferentes pisos ecológicos con buenos resultados,

#### **210. Materiales y métodos**

Ambos diseños se ajustan para la evaluación con completamente al azar en lab.

El hongo entomopatógeno *Beauveria* fue recolectado de la zona en estudio, Río Marques, Río Colorado y muestras de suelo de parcelas donde hubo antecedentes de ataque de lepidópteros anteriormente donde también en el caso de muestra suelo se pudo aislar *Metarhizium* sp, con este material se pudo trabajo de los entomopatógenos con los cuales se establecieron pruebas con lepidópteros para realizar pruebas preliminares de virulencia y una vez establecidas las crías de helicoverpa (ticonas) realizar los ensayos en Garci Mendoza, Salinas y en campo coincidiendo con las épocas de aplicación para los meses de febrero marzo abril.



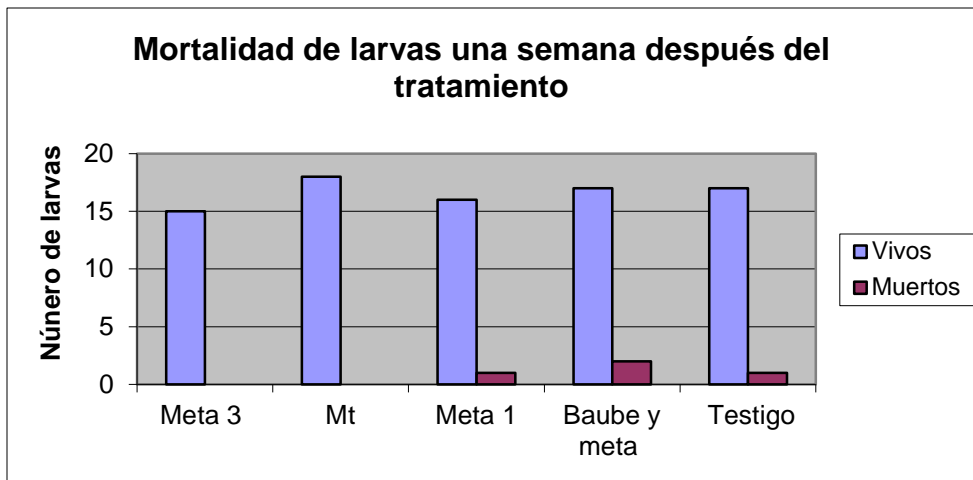
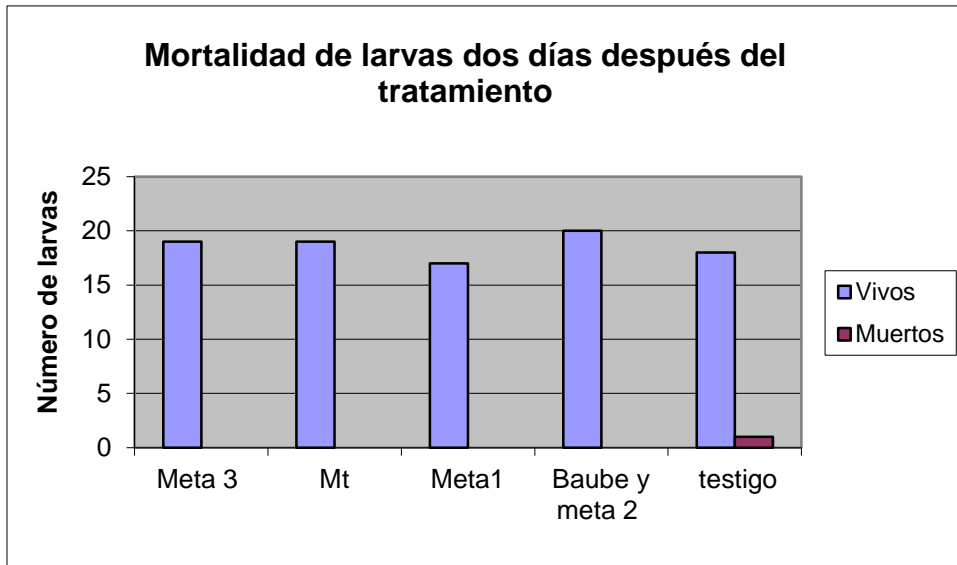
Se procedió a multiplicar en arroz 4 aisladas de microorganismos, material que se halla en conservación en el banco de microorganismos de la Fundación PROINPA. Una vez completado el proceso de multiplicación y cuando el hongo ya formó esporas, se pesó 100 gramos de arroz más hongo, se le agregó 9 cc. de agua destilada y se procedió al conteo de esporas por volumen, usando una cámara de Neubauer o hematocímetro. Para la implementación del ensayo se aumentó a cada una de las muestras una gota de aceite vegetal, para favorecer la adherencia de las esporas sobre el cuerpo del insecto.

Los resultados obtenidos serán sometidos a un análisis estadístico bajo un diseño de bloques al azar.

## 211. Resultados

- a) En el caso de los Bioinsecticidas con *Metarhizium* y *Beauveria*, se comprobó con otras especies de lepidópteros funciona como insecticidas.
- b) El invierno no es la mejor época para implementar este trabajo de desarrollo que podría coincidir con el ciclo agrícola de la Quinua.

Seguimiento y desarrollo de aplicaciones con *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp.



La persistencia y acción de mortandad de estos en entomopatogenos se ve afectada por factores climáticos como temperaturas y humedad que son por debajo de los que hay en el altiplano y condiciones semi controladas y acondicionadas de 10% HR, y T= 8°C las aislados altiplánicos tienen efecto todavía, una semana después la viabilidad nos muestra que persiste con un efecto positivo al aumentar la mortandad de larvas.

Al concluir los ensayos con dos semanas después de evaluados, aun el efecto de estos microorganismos es viable, lo que nos muestra que la combinación y el sinergismo natural de competitividad con la persistencia en sus ambientes naturales se muestra aquí como resultado de una mejor acción como comportamiento de un promisorio bioinsecticida a ser probado en campo para la validación práctica de un futuro bioinsecticida, lo cual estadísticamente es significativa la acción combinada de *Beauveria* y *Metarhizium*.

## 212. Discusión.

Tienen que ver mucho las épocas con las que se trabaja, que coincida con el ciclo del cultivo para poder hacer este tipo de desarrollo, la presencia de las plagas y las aplicaciones y verificaciones de campo, debemos tener claro los ciclos biológicos y verificaciones con ensayos y estudios de hábitos de las plagas.

Lograr un estudio particular de las plagas de la QUINUA.

### **213. Conclusiones**

Se definió que pese a las condiciones adversas de clima y condiciones, se pudo evidenciar de la acción bioinsecticida de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.*

### **214. Recomendaciones**

Se recomienda trabajar más en este tema con desarrollo de nuevos microorganismos de control biológico.

Elaboración del bioinsecticida a base de VPN desarrollando y trabajando en la regional de La Paz

### **215. Bibliografía consultada**

1. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
2. Meneses Edson, et al. (2006) *Trichoderma* como un potencial en suelos y biorremediador, 2006 Sta Cruz Bolivia, p. 62.
3. S B. Alves 2008. Controle microbiano de plagas, Ed. Manole, FEALQ, Peracicaba-San Pablo, Br. p. 350-371.

## **Recolección del microorganismo VPN para bioensayos sobre *Spodoptera frugiperda* como bioinsecticida biológico**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Edson Meneses y Daniel Barja Manriquez

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Compendio:** Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta ocasionar su muerte. Disponer de al menos 1 formulado de VPN para el control de *Spodoptera frugiperda*. De las 20 larvas de último instar, todas terminaron su ciclo (figura 2), sin ningún resultado de mortandad. Se coordinó con el equipo de La Paz (Qipaquipani y Patacamaya) armar otro bioensayo lo cual se encuentra en ejecución. Del bioensayo se concluye que la especificidad de este microorganismo para larvas de *Helicoverpa sp.* (ticona), son muy específicas, y no afecta a las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

**Palabras claves:** VPN, *Spodoptera frugiperda* y bioinsecticida biológico

**1. Objetivos:** Disponer de al menos 1 formulado de VPN para el control de *Spodoptera frugiperda* de últimos estadios

**2. Hipótesis**

**3. Revisión de Literatura**

Los estudios sobre virus que atacan a los artrópodos son muy importantes porque existen más de 700 virus que tienen la capacidad para infectar especies de insectos de varios Órdenes. Muchas de estas enfermedades ocurren naturalmente en insectos de importancia agrícola. Por tanto los virus son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos (Álvarez y Vargas, 1987).

Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación. (Álvarez y Vargas, 1987).

#### **4. Materiales y Metodos**

Se recolectaron larvas con sintomatología típica de VPN en tres localidades, Jalsuri, Quipa quipani, Patacamaya. Donde se trasladaron al laboratorio de Cbba y se los almacenó en condiciones de refrigeración, de los cuales se envió una muestra de cada localidad a España para su identificación respectiva.

Para el bioensayo con VPN se inoculó una solución viral a la dieta artificial, la cual se preparó moliendo las larvas infectadas que se trajeron de los tres diferentes lugares en un mortero (figura 1). Esta solución se mezcló con caolín en la licuadora por 10 min. Después se lo colocó en una bandeja por 5 días a temperatura ambiente.

Con este material se empapó la dieta artificial de 20 larvas de último instar y se lo ofreció a las larvas.



**Figura 1. Preparación de la solución viral.**

#### **5. Resultados**

De las 20 larvas de último instar, todas terminaron su ciclo (figura 2), sin ningún resultado de mortandad.





**Figura 2. Pupas de *Spodoptera frugiperda* que terminaron el ciclo después de la aplicación con VPN**

## **6. Discusión**

Se coordinó con el equipo de La Paz (Qipaquipani y Patacamaya) armar otro bioensayo lo cual se encuentra en ejecución, para esto se mandó 10 gramos de producto formulado y la cepa comercial de *Bacillus thuringiensis (Bt)* 10cc de formulación líquida y un pequeño protocolo de aplicación con tres repeticiones y dos tratamientos, un testigo y cada trat. con 20 larvas, en dos localidades diferentes.

## **7. Conclusiones**

Del bioensayo se concluye que la especificidad de este microorganismo para larvas de *Helicoverpa sp.* (ticona), son muy específicas, y no afecta a las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## **8. Recomendaciones**

Se debe realizar más pruebas con los extractos de estas plantas y de otras más con otro método de extracción.

Realizar las pruebas con larvas del 1 y 2 instar para ver si tienen algún efecto.

Realizar evaluaciones en el campo con estos extractos virales para ver si tienen algún efecto en otras plagas.

## **2. Bibliografía consultada**

ALVÁREZ, S.- y E. VARGAS-OSUNA 1987. Acción de la infección por el virus de la poliedrosis nuclear (Baculoviridae) sobre la capacidad copuladora del macho de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae) Bol. San. Veg. Plagas, 13: 167-171,

PEREZ, I. 1999. Plagas introducidas en España peninsular en la segunda mitad del siglo XX. Aracnet. Numero 4.

PRUETT, C. 2004. Principios de manejo integrado de plagas y biocontrol en siembra directa. III Congreso Boliviano de Protección Vegetal.

## Colección, aislamiento y Pruebas de eficiencia en laboratorio de *Beauveria* y *Bacillus turingiensis*

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Luís Crespo, Daniel Barja

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Compendio:** Cerca del 80% de las enfermedades que ocurren en los insectos son causados por hongos y la especie de hongo mas usada en control de insectos es *Beauveria bassiana*, los cuales se obtienen del suelo. Se pretende evaluar diferentes cepas aisladas de *Beauveria* en el control de *Sitophilus zeamais*. Cada unidad experimental consta de 10 insectos adultos de *Sitophilus zeamais*, población de la que se tiene en cría en laboratorio, los insectos fueron sumergidos por un minuto en la respectiva solución de conidios, luego fueron colocados en una cámara con granos de maíz. En el caso del testigo se procedió de la misma forma sumergiendo los insectos en una solución de agua más el aceite vegetal. Al evaluar diferentes cepas aisladas de *Beauveria* se tuvo diferencias altamente significativas entre tratamientos *Bb 7*, *Bb 12* y *Bb 4* con porcentajes de control de 53 y 60 % respectivamente, seguidos del aislamiento *B. brongniartii* con 50 % de control.

**Palabras claves:** Colección, aislamiento, *Beauveria* y *B. t.*

216. **Objetivos:** Evaluar diferentes cepas aisladas de *Beauveria* en el control de insectos.

217. **Hipótesis**

218. **Revisión de literatura**

Aunque el uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas, no sea muy reciente, solo en los últimos años se le a dado más importancia. En 1934 Agostino Bassi realizo un estudio sobre el agente causal de la enfermedad conocida como muscardina blanca del gusano de seda, y fue denominada *Beauveria bassiana* por Vuillemin en 1934. Cerca del 80% de las enfermedades que ocurren en los insectos son causados por hongos y la especie de hongo mas usada en control de insectos es *Beauveria bassiana*, los cuales se obtienen del suelo, debido a su capacidad de renovar inóculo sobre los insectos muertos, no inducen la aparición de resistencia y son efectivos agentes de control de plagas. Este hongo entomopatogeno se usa asperjando sus esporas sobre el cultivo para provocar brotes de enfermedades que causan en ciertas plagas (RODRIGUEZ et al., 2006 y PRUETT, C. 2004).

219. **Materiales y métodos**

Se procedió a multiplicar en arroz 8 cepas aisladas de *Beauveria*, material que se halla en conservación en el banco de microorganismos de la Fundación PROINPA. Una vez completado el proceso de multiplicación y cuando el hongo ya formo esporas, se peso 100 gramos de arroz más hongo, se le agrego 9 cc. de agua destilada y se procedió al conteo de esporas por volumen, usando una cámara de Neubauer o hematocímetro. Para la implementación del ensayo se aumento a cada una de las muestras una gota de aceite vegetal, para favorecer la adherencia de las esporas sobre el cuerpo del insecto. Se consideraron 9 tratamientos, 8 aislamientos de *Beauveria* más un testigo, todos con tres repeticiones. Cada unidad experimental consta de 10 insectos adultos de *Sitophilus zeamais*, población de la que se tiene en cría en laboratorio, los insectos fueron sumergidos por un minuto en la respectiva solución de conidios, luego fueron colocados en una cámara con granos de maíz. En el caso del testigo se procedió de la misma forma sumergiendo los insectos en una solución de agua más el aceite vegetal.

Las evaluaciones se realizaron diariamente observando la mortalidad de los insectos, en caso de encontrar insectos muertos, estos serán colocados en cámara húmeda para favorecer el crecimiento del hongo en caso de que haya sido infestado.

Los resultados obtenidos serán sometidos a un análisis estadístico bajo un diseño de bloques al azar.

## 220. Resultados

Los aislamientos probados en este ensayo fueron: *Bb* 1, *Bb* 4, *Bb* 5, *Bb* 6, *Bb* 7, *Bb* 12, *Bb* Sankayani, *B. brogniartii* más un testigo sin tratamiento.

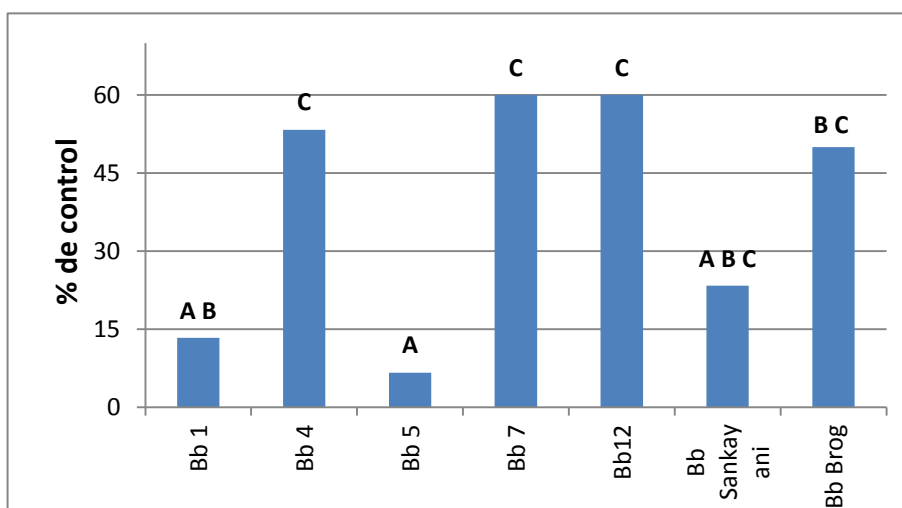
El conteo de conidios de cada uno de los aislados están en el rango de 1 a  $5 \times 10^7$  conidios/ml. En el caso del aislado *B.b.* 6 no se encontró conidios en la solución por lo que se descartó este tratamiento quedando al final solo 8 tratamientos incluyendo el testigo.

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico bajo un modelo de bloques completos al azar y una comparación de medias por la prueba de Duncan al 5 %, obteniéndose los siguientes resultados:

Fuentes de variación	G. L.	Tipo III SS	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Rep.	2	7.5833333	3.7916667	0.93	0.4176
Trat.	7	132.6666667	18.9523810	4.65	0.0071
Error	14	57.0833333	4.0773810		
Total	23	197.3333333			

## 221. Discusión

Se observan diferencias altamente significativas entre tratamientos, donde se destacan los aislados *Bb* 7, *Bb* 12 y *Bb* 4 con porcentajes de control de 53 y 60 % respectivamente, seguidos del aislamiento *B. brogniartii* con 50 % de control, y finalmente los aislamientos *Bb* Sankayani, *Bb* 1 y *Bb* 5 con porcentajes de control menores al 23 %. El porcentaje de control se calculó con la fórmula de Abbot modificada. Estos datos se observan en la siguiente figura:



## 222. Conclusiones

Al evaluar diferentes cepas aisladas de *Beauveria* se tuvo diferencias altamente significativas entre tratamientos Bb 7, Bb 12 y Bb 4 con porcentajes de control de 53 y 60 % respectivamente, seguidos del aislamiento *B. brongniartii* con 50 % de control.

### **223. Recomendaciones**

Se recomienda aumentar los días de evaluaciones hasta observar la mortalidad de los insectos, en caso de encontrar insectos muertos, se deben colocar en cámaras húmedas para favorecer el crecimiento del hongo.

Se volverán a realizar más ensayos con *Beauveria* en insectos en futuros ensayos

### **224. Bibliografía consultada**

PEREZ, I. 1999. Plagas introducidas en España peninsular en la segunda mitad del siglo XX. Aracnet. Numero 4.

PRUETT, C. 2004. Principios de manejo integrado de plagas y biocontrol en siembre directa. III Congreso Boliviano de Protección Vegetal.

Rodriguez, M. M. Jerding, A. France. 2006. Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógeno sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* ( LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE). Agricultura Técnica. 66(2), 159-165.

### **Cría de *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.* plagas de granos almacenados**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja Manriquez

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:** Se logro dar un ambiente con condiciones de temperatura y humedad necesarias para la cría de plagas de granos almacenados. Se empezó la cría con unos granos infectados con *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.* y se los coloco en envases de plástico y se les tapo con un tul. A *Sitophilus sp.* se lo coloco en maíz, y a *Acanthoscelides sp.* se lo coloco en frijol. Se tuvo una buena respuesta de los insectos plagas de granos con la temperatura de 26 °C y la humedad de 21%. Se tuvo una buena respuesta con la temperatura y el numero de individuos, a mayor temperatura se incremento el numero de individuos de *Sitophilus sp.* No se tiene todavía los datos de *Acanthoscelides sp.* debido a que no se han reportado todavía ningún adulto a los 26°C.

**Palabras claves:** plagas de granos, *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.*

**225. Objetivos:** Dar un ambiente con condiciones de temperatura y humedad necesarias para la cría de plagas de granos almacenados.

**226. Hipótesis**

**227. Revisión de literatura**

Los insectos plaga provocan pérdidas de 20 a 80 % de la producción del cultivo de frijol y de grano en almacén. La pérdida del frijol almacenado se ubica entre 15 y 30%. Las medidas de control comprenden: insecticidas químicos, las cuales causan daños al ambiente y a la salud humana;

bioconcentración en la cadena alimenticia, suelo y agua; que otorgan resistencia de insectos plagas, y eliminan parásitos, depredadores naturales y polinizadores. *Acanthoscelides obtectus* es importante por presentar una distribución amplia, así como por su hábito y ataque al cultivo en campo y a la semilla y grano de frijol en almacén (Dolores - Fernández & et al. 2009).

Entre las plagas asociadas al almacenamiento de maíz, el gorgojo del genero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) se destaca entre las mas importantes por atacar granos intactos. Las especies del genero *Sitophilus* son los mas devastadores de los granos almacenados y están consideradas como las plagas más grandes del mundo. Los huevos del genero *Sitophilus* son puestos dentro de los granos donde las larvas tienen suficiente alimento y están bien protegidas, no solo de los fungicidas químicos sino de los parasitoides y depredadores (Adalberto Hipólito de Sousa & et al., 2006)

#### 4. Materiales y métodos

Se empezó la cría con unos granos infectados con *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.* y se los coloco en envases de plástico y se les tapo con un tul. A *Sitophilus sp.* se lo coloco en maíz (figura 1), y a *Acanthoscelides sp.* se lo coloco en frijol (figura 2). La sala de cría consta de dos estufas para mantener la temperatura de 25 a 28 °C (figura 3) y debido a que son plagas de granos no necesitan de bastante humedad y se mantiene la humedad a 21 %(figura 4)



Figura 1. Frasco de cría de *Sitophilus sp.*



Figura 2. Frasco de cría de *Acanthoscelides* sp.

Figura 3. Estufas que mantienen la temperatura constante de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$



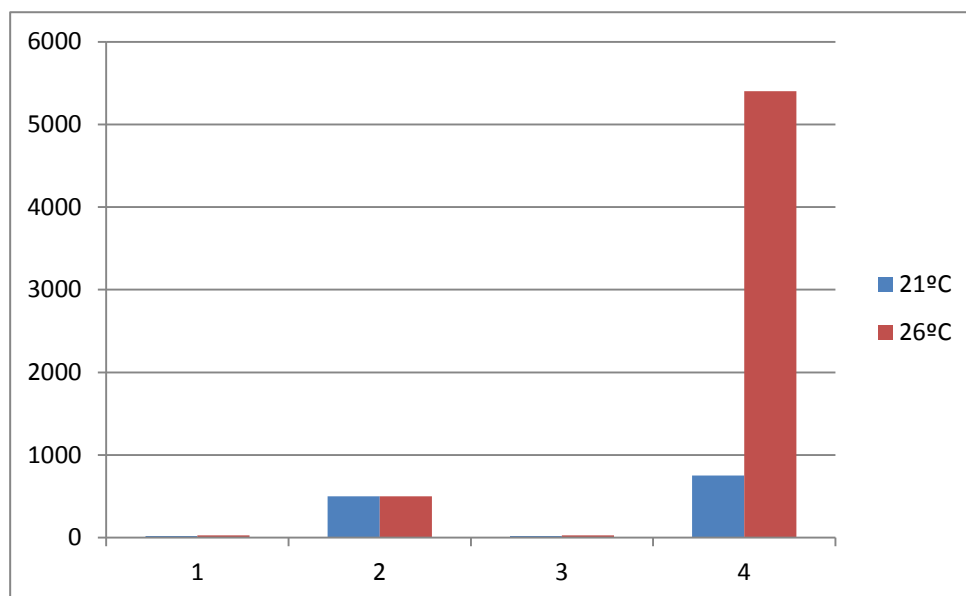
Figura 4. Temperatura y humedad relativa de la sala de cría de *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp*

## 5. Resultados

Se tuvo una buena respuesta de los insectos plagas de granos con la temperatura de 26 °C y la humedad de 21%(figura 5). Se tuvo una buena respuesta con la temperatura y el numero de individuos, a mayor temperatura se incremento el numero de individuos de *Sitophilus sp.* (Figura 6).



Figura 5. *Sitophilus sp.* en el de reproducción frasco con maíz



## **Figura 6. Población inicial a los 2 meses y la población final a los 4 meses de *Sitophilus sp.***

No se tiene todavía los datos de *Acanthoscelides sp.* debido a que no se han reportado todavía ningún adulto a los 26°C

### **6. Discusión**

No es muy necesario la humedad relativa en el ambiente pero si es importante la temperatura para las actividades.

### **7. Conclusiones**

Se pudo dar condiciones mas adecuadas para la cría de *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.* Se tiene una cría establecida de *Sitophilus sp.* y *Acanthoscelides sp.* para poder realizar bioensayos, con hongos.

### **8. Recomendaciones**

Tener cuidado con la contaminación de ácaros y hongos en los envases revisarlos periódicamente y cambiarlos de envases si se encuentra muy sucio.  
Cambiar periódicamente de alimento y controlar la temperatura.

### **9. Bibliografía consultada**

- Dolores - Fernández & et al. 2009. OLEORRESINA DE JÍCAMA PARA CONTROLAR *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptero: *Bruchidae*) EN SEMILLA DE FRIJOL *Agronomía mesoamericana* 20(1): 59-69
- Hipólito de Sousa & et al., 2006 DESEMPEÑO DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EN DIFERENTES VARIEDADES DE MAÍZ Y CONDICIONES ATMOSFÉRICAS *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.1, n.1, p. 20-25

## **Desarrollar técnicas de mejoramiento para la masificar la cría de *Spodoptera frugiperda***

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Edson Meneses

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Compendio:** *Spodoptera frugiperda* es uno de los insectos omnívoros de mayor importancia en el neotrópico americano. El mantenimiento de los insectos en laboratorio se toma imprescindible para dinamizar y acelerar los programas de investigación en diferentes áreas de la Entomología. Se pretende desarrollar técnicas sencillas para mejorar y optimizar la cría de *Spodoptera frugiperda*. Se modifico la dieta que se utilizaba antes por una nueva dieta y se reemplazo el agar por carragenina. Se tubo una buena respuesta de la modificación de la dieta para *Spodoptera frugiperda* dando como resultado una buena cantidad de adultos (566.67) caso que no ocurría antes con la anterior dieta. Se pudo lograr un mejoramiento en las técnicas de cría de *Spodoptera frugiperda* y mejorando la dieta así también como economizando con el cambio de ingredientes. La dieta de *Spodoptera frugiperda* dio excelentes resultados y la carragenina reemplazó el agar.



**Palabras claves:** cría, Dietas y *Spodoptera frugiperda*

**228. Objetivos:** Desarrollar técnicas sencillas para mejorar y optimizar la cría de *Spodoptera frugiperda*

**229. Hipótesis**

**230. Revisión de Literatura**

*Spodoptera frugiperda* es uno de los insectos omnívoros de mayor importancia en el neotrópico americano. Ataca una amplia variedad de cultivos, entre los cuales, se destacan el algodón y el maíz. El área de cría de insecto se ha desarrollado en los últimos años (Bahena J. F., Sánchez M. y Miranda M. A. 2003). El mantenimiento de los insectos en laboratorio se toma imprescindible para dinamizar y acelerar los programas de investigación en diferentes áreas de la Entomología, sea para entender las investigaciones básicas o aplicadas (Falcón F. 1992). Según Figueroa-Brito R. (2002) y García-Ramírez R. (2004) la importancia de la cría de insectos en laboratorio esta basada en diferentes líneas de investigación que esta actividad da soporte las cuales son:

- Estudios de resistencia de plantas a insectos
- Bioensayos con insecticidas
- Producción de enemigos naturales
- Producción masal para la aplicación del principio de la esterilidad
- Producción masal para control genético
- Bioensayos en general

Según Franco-Archundia S. L., Jiménez-Pérez A., Luna-León C. y Figueroa-Brito R. (2006) el éxito de la cría de insectos en laboratorio varios conocimientos y técnicas son necesarios para que se pueda conducir, de forma correcta, los programas de investigación con resultados claros y confiables. Para mantener los insectos en el laboratorio se tiene que utilizar dietas artificiales que es la manera de manejar a los insectos que presentan numerosas ventajas entre ellas la calidad del insecto producidos los cuales deben ser comparados con insectos de la naturaleza. Para que una dieta artificial sea considerada adecuada debe presentar las siguientes características:

- Proporcionar elevada viabilidad larval
- Insectos producidos presenta igual desarrollo que un insecto de la naturaleza
- Insectos con una elevada capacidad reproductiva
- La dieta debe servir para mas de una especie y en especial a mas de un Orden
- Ser formulada con ingredientes de bajo costo y ingredientes que se encuentren fácilmente en el mercado.
- Que la viabilidad sea superior a los 75%
- Que la calidad del insecto sea mantenida a lo largo de las generaciones

**231. Materiales y métodos**

La dieta de *Spodoptera frugiperda* se modifico quitándole algunos ingredientes y la adición de gentamicina y levadura de cerveza (Figura 1). La antigua dieta usada constaba de frijol carioca, germen de trigo, ácido ascórbico, sorbato de potasio, nipagin, solución vitamínica, leche empolvo, levadura de pan, formol, agar y agua. La nueva dieta consta de frijol carioca, ácido ascórbico, nipagin, gentamicina, levadura de cerveza, carragenina, formol y agua. Se reemplazo el agar por la carragenina para economizar mas la dieta.



**Figura 1. Dieta de *Spodoptera frugiperda***

La cría de *Spodoptera frugiperda* empieza con la recolección de huevos y larvas del campo. Estos son colocados en vasitos con dieta artificial hasta obtener adultos. Los adultos son transferidos a las jaulas de postura (figura 2), donde se colocan envasito de solución de miel como alimento para los adultos mientras realizan las posturas. Las condiciones de las sala de cría es Temperatura 25°C y una humedad relativa de 45

Se recoge las posturas y son colocados en vasitos con dieta (figura 3). A medida que van creciendo las larvas con la ayuda de un pincel son individualizadas. Las larvas son criadas con dieta hasta que empupen y las pupas son sexadas (figura 4) y colocadas en las jaulas de postura para que continúe el ciclo.

Resultados



**Figura 2. Jaulas de postura de *Spodoptera frugiperda***



**Figura 3. Posturas de *Spodoptera frugiperda* colocadas en vasitos de plástico.**



**Figura 4. Sexado de pupas de *Spodoptera frugiperda***

## **5. Resultados**

En esta nueva fase de cría de *Spodoptera frugiperda* la población inicial fue de 400 larvas que salieron de un gramo de huevos procedentes de Santa Cruz, al cabo de dos meses y media la población final es de 20000 larvas con una tasa de multiplicación de 50 larvas por adulto.

Se tubo una buena respuesta de la modificación de la dieta para *Spodoptera frugiperda* dando como resultado una buena cantidad de adultos (566.67) caso que no ocurría antes con la anterior dieta (143) (tabla 1). La adición de la gentamicina ayudo a que bajara la mortalidad de las larvas de 1 y 2 instar de un porcentaje de 75 % a un porcentaje de 23.33 %(figura 6).

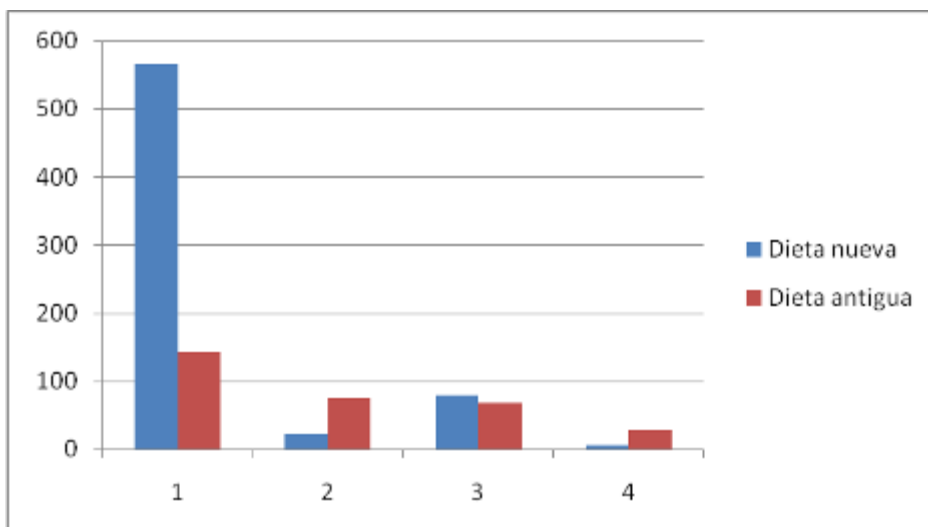
**Figura 5. Larva y pupa de *Spodoptera frugiperda***



**Tabla 1. Comparación de dos dietas en tres generaciones de *Spodoptera frugiperda*.**

Generaciones	Numero de adultos		Porcentaje de mortalidad en larvas de 1 y 2 instar.		Porcentaje de pupas que llegan a adultos		Porcentaje de mortalidad en pupas por hongos	
	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 1	Dieta 2
1 generación	400	80	30	70	75	60	5	20
2 generación	600	150	20	75	80	70	5	30
3 generación	650	200	20	80	80	75	5	35
Promedio	566.67	143	23.33	75	78.33	68.33	5	28.33

**Figura 6. Grafica de los promedios en la comparación de la dieta nueva con la antigua en tres generaciones.**



## 6. Discusión

La dieta fue muy eficiente para la larva de *Spodoptera frugiperda* (Fig.5) y se ve un 78.33 % de las larvas de 5 instar empupan (Figura 6).

## 7. Conclusiones

Se pudo lograr un mejoramiento en las técnicas de cría de *Spodoptera frugiperda* y mejorando la dieta así también como economizando con el cambio de ingredientes. La dieta de *Spodoptera frugiperda* dio excelentes resultados y la carragenina reemplazo el agar.

## 8. Recomendaciones

Se recomienda tener cuidado con la preparación de las dietas en el caso de *S. frugiperda* al disolver la carragenina y medir bien todas las proporciones porque un error puede causar la pérdida de la dieta o una dieta muy acuosa.

## 9. Bibliografía consultada

- Bahena J. F., Sánchez M. y Miranda M. A. (2003). Extractos vegetales y bioplaguicidas, alternativas para el combate del "gusano cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). En: Entomología Mexicana Vol. II. pp. 366-372.
- Falcón F. (1992). Toxicidad de sustancias vegetales contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) bajo condiciones de campo en la región del Valle del Fuerte, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 76 pp.
- Figuroa-Brito R. (2002). Evaluación de extractos vegetales contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 14-24 pp.
- Franco-Archundia S. L., Jiménez-Pérez A., Luna-León C. y Figuroa-Brito R. (2006). Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de *Carica papaya* (Caricaceae) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomol. Mex.* (aceptado).

García-Ramírez R. (2004). Efectividad de polvos de cuatro variedades de *Carica papaya* (Caricaceae) contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Licenciatura. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Autónoma de Guerrero. Iguala, Guerrero, México. 4-17 pp.

## **CRIA MASIVA Y APLICACIÓN DEL PARASITOIDE *Trichogramma sp.* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA EN CULTIVOS**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Edson Meneses

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Palabras claves:** Control biológico, cría masiva, *Trichogramma sp.*

**Compendio.** Se pretende en este trabajo es generar una tecnología sencilla de producción de este parasitoide para su transferencia y adopción por los productores agrícolas. A través de técnicas sencillas obtenidas de la revisión bibliográfica se pudo realizar la cría masiva de *Sitotroga cerealella* y se tiene las técnicas para la multiplicación masiva de *Trichogramma sp.*

**232. Objetivos:** Lo que se pretende en este trabajo es generar una tecnología sencilla de producción de este parasitoide para su transferencia y adopción por los productores agrícolas

**233. Hipótesis**

**Es posible criar el parasitoide bajo las condiciones del valle de Cochabamba**

**234. Revisión de literatura**

Dentro el uso de insectos como control biológico encontramos a los parasitoides. El parasitoide es un insecto que en su estado inmaduro se alimenta y desarrolla dentro o sobre el cuerpo de un insecto hospedante y también se desarrollan dentro de los huevecillos. Los parasitoides se diferencian de los verdaderos parásitos, los cuales dependen de un hospedante vivo, pero no le causan la muerte como los parasitoides. Los parasitoides son enemigos naturales mas utilizados en los programas de control biológico de plagas. La mayoría de parasitoides son del orden Hymenoptera y unos pocos son del orden Díptera. Por su localización en el hospedante los parasitoides se clasifican en ectoparasitoides, aquellos que se ubican y alimentan en el exterior del hospedante. Y los endoparasitoides, que son los que se ubican y alimentan en el interior. Por el número de parasitoides emergen del hospedante, solitarios aquellos que solo se desarrolla un individuo en el hospedante y los gregarios aquellos que se desarrollan varios parasitoides de un hospedante. Por la estrategia de desarrollo se clasifican en idiobiontes en donde la larva del parasitoide se alimenta del hospedante y detiene su desarrollo, por ejemplo los parasitoides de huevos, larvas y pupa (CARBALLO, 2002).

Entre las familias más importantes del orden Hymenoptera se encuentran la familia Braconidae, Eulophidae, Encyrtidae y Trichogrammatidae. Entre los insectos benéficos mas importantes para el control de lepidópteros están los parasitoides de huevos del genero *Trichogramma*. Estas son avispas diminutas que atacan los huevos de las polillas y mariposas. Su importancia en el control biológico radica en la facilidad con el que se pueden reproducir masivamente, utilizando polillas de granos almacenados, y la facilidad de liberarlos en el campo para el control de lepidópteros, con altos niveles de control (CARBALLO, 2002).

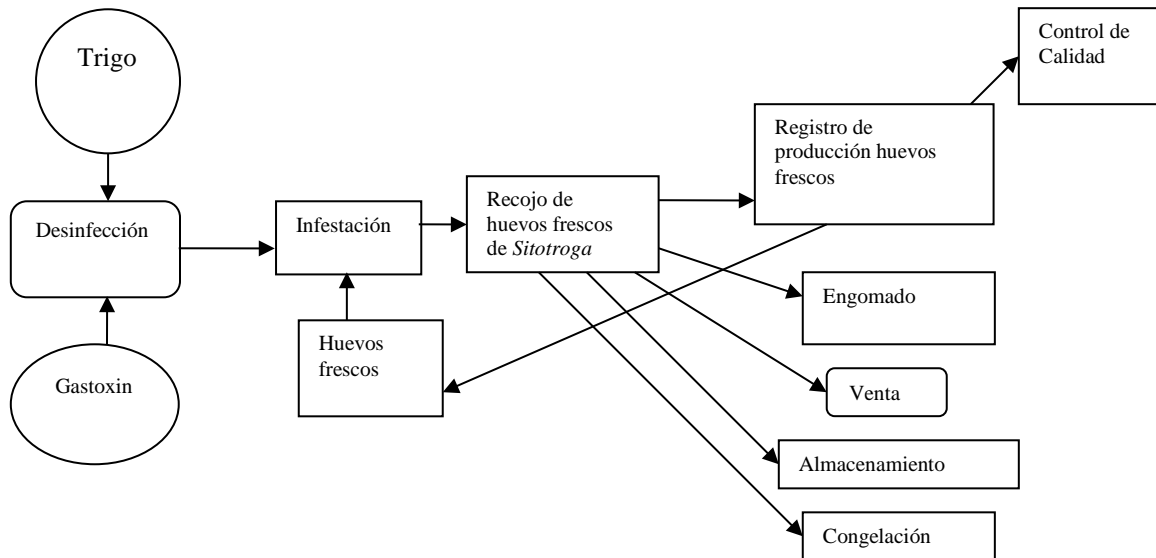
Uno de los métodos de control biológico contra esta polilla es el uso de parasitoides del genero *Trichogramma sp.* Estos parasitoides de huevos se caracterizan por que las avispias oviponen en el interior de los huevos de la polilla y allí se produce la eclosión de una larva de *Trichogramma*

antes que la larva de polilla, por lo que esta avispa consume el embrión transformándose en una pupa de color oscuro que es indicador del parasitismo. Se utilizan otros métodos de control por ejemplo el uso de feromonas artificiales, también llamados atrayentes sexuales, siendo sustancias químicas producidas por insectos para atraer el otro sexo y consecuentemente utilizadas para el control de plagas. Estas medidas de control son ecológicamente sanas y no interfieren con otras medidas de control de plagas, ni la actividad de enemigos naturales (PRUETT, 2004).

### 235. Materiales y métodos

Este trabajo iniciará cuando la habilitación de la infraestructura que consta de dos salas de cría, una sala de cernido, sala de parasitación, lavaderos bodegas y oficina de control de calidad.

Metodología para la cría del huésped *Sitotroga cerealella* (figura 1) para la producción de *Trichogramma spp.*(figura 2)



**Figura 1. Diagrama de flujo de la producción de *Sitotroga cerealella***

Para la producción de huevos del hospedero *Sitotroga cerealella*, se necesita el sustrato alimenticio que es el trigo que no debe tener menos de 9 % ni más de 14 % de contenido de humedad, debe ser grande e uniforme. El trigo una vez que se adquiere debe ser controlado su calidad y que no llegue con infestaciones de insectos, como gorgojos, lepidópteros, otras avispas o ácaros. Se realiza un tratamiento de desinfección con Gastoxin. La desinfección se realiza en tanques de plástico con tapa de 200 litros, donde se colocará una pastilla por cada 2 qq. de trigo, luego se tapan muy bien y se dejan en tratamiento por 4 días y después se deja orear por dos días.

Para el montaje del pie de cría del hospedero se instalará en la sala de reproducción que consta de 4 bastidores (Figura 1), que serán construidos con turriles metálicos de 200 litros. Cada bastidor se tapa con una tela negra muy tupida, y se adecua en su parte inferior con un embudo fabricado en plástico grueso, donde se acopla la rosca de una tapa de bidón de 4 litros de los que se van utilizar para recoger diariamente las polillas durante el tiempo de producción de la cría. Dentro de cada bastidor de cría se van colocando 6 cajas de madera de 40 x 40 cm. de lado y 4 a 5 cm. de

profundidad cada bastidor llevara 15 kg de trigo divididas en las cajas y 22 a 26 gramos de la plaga, haciendo una relación de 1.5 g por kg de trigo.

La polilla cumple su ciclo dentro del trigo en un tiempo de 28 a 35 días. Las polillas caen a los tarros de plástico los cuales son cambiados diariamente, ya que ponen las polillas los huevos y son desprendidos con brocha de las paredes y cernidos cerca de los extractores para así eliminar las impurezas, escamas y restos de insectos que se desprenden con la manipulación. Cuando se obtiene los huevecillos limpios se pesan y se los refrigerar y pueden permanecer hasta 20 días a una temperatura entre 7 – 8 ° C.

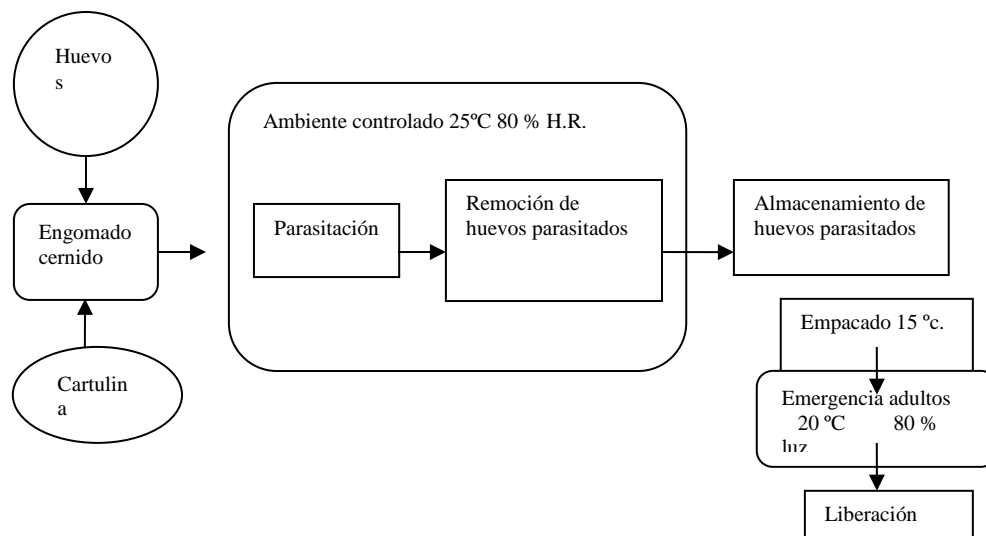


Figura 2. Diagrama de flujo de la producción de *Trichogramma spp.*

### Multiplicación de *Trichogramma spp.*

Se procede a la multiplicación de *Trichogramma spp.* lo cual consiste en exponer los huevos frescos de esta polilla a la parasitación de esta avispa, la cual se la realiza en el interior de recipientes plásticos transparentes.

### Marcado de la cartulina

La cartulina donde son pegados los huevos de *S. cerealella* no debe ser ni muy lisa ni muy porosa, puede ser de cualquier color ya que no se ha notado ninguna diferencia por algún color específico. Se debe marcar en pulgadas cuadradas, esto se hace para facilitar la venta y distribución del material, habiéndose calculado que por cada pulgada cuadrada vamos obtener un aproximado de 3500 a 4000 huevos pegados y una emergencia de aproximadamente de 3000 avispas de *Trichogramma spp.*

### Pegado de los huevos

Para el pegado de los huevos se utilizara goma arábica, esta se distribuye uniformemente con la ayuda de una pequeña brocha sobre la cartulina, procurando cubrir toda el área. Después de esparcir los huevos sobre toda el área engomada se sacude la cartulina para retirar el exceso de huevos, se deja secar por unos 15 a 20 minutos antes de proceder a colocarlos en los frascos de parasitación.

### Parasitación

En un frasco se coloca una determinada cantidad de huevos parasitados y se espera la emergencia de las avispas, cuando han emergido un 70 % se procede a colocar los huevos frescos, que recién han sido pegados en cartulina. La proporción de parasitación es de 1:4.



### **Tiempo de Parasitación**

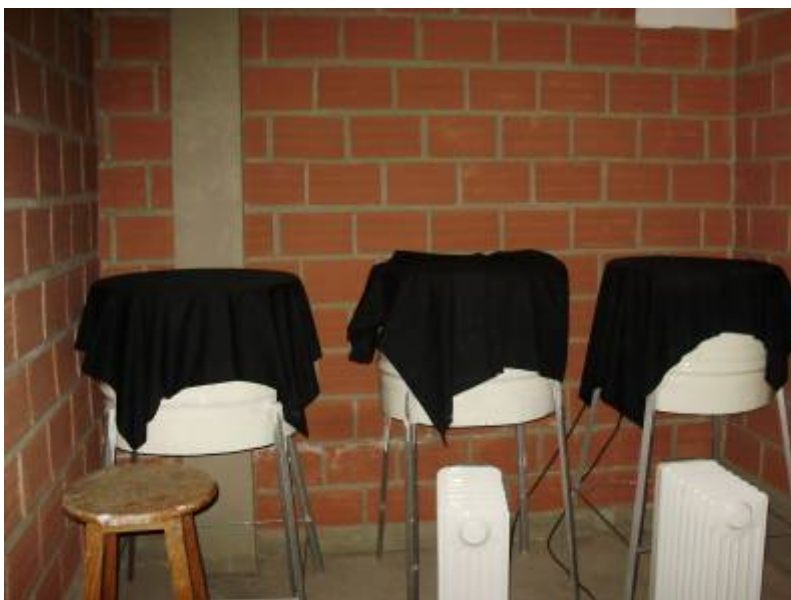
El tiempo que dura este trabajo depende de la temperatura y de la especie a parasitar. Así puede ser de 9 a 10 días en las estaciones lluviosas y de 10 a 12 días con temperaturas más bajas. En los recipientes de parasitación van a permanecer hasta que casi todas las avispas hayan muerto, y cuando los huevos de la cartulina tornen un color oscuro, lo cual es indicio de que han sido inoculados.

### **Deslarvado**

Transcurrido el tiempo de parasitación y cuando las avispas están muertas se procede a retirar las cartulinas con los huevos inoculados y se los colocara en una rejilla sobre una bandeja de agua, esto se hace con la finalidad de que las larvas de los huevos que no fueron parasitados caigan al agua, este proceso dura un día en temperaturas altas y 2 a 3 en temperaturas bajas.

### **Conservación en refrigeración**

Los cartones conteniendo los huevos ya parasitados y deslarvados pueden ser conservados en refrigeración a una temperatura de 8°C. hasta un máximo de 30 días, al cabo de los cuales empieza a disminuir la emergencia de las avispas y ya no es un material adecuado para la venta.



**Figura 3. Bastidores para la producción de *Sitotroga cerealella***

### **236. Resultados**

En los trabajos realizados anteriormente se tuvo la producción de 20 g de *Sitotroga cerealella*, pero se contaminaron con ácaros. Se hizo la prueba de multiplicar *Trichogramma sp.* en huevos de *Galleria mellonella* pero sin ningún resultado positivo. Se espera que con estos resultados se pueda mejorar en futuros trabajos.

Con la colaboración de DESA se pretende obtener unos 30 gramos de huevos de *Sitotroga cerealella*, con la se empezara la cría en 4 bastidores.

### **237. Discusión**

Una de las dificultades que se tuvo en la cría de *Sitotroga cerealella* fue la obtención de la cría inicial, que es muy importante en el inicio de una cría masiva de *Trichogramma*. La cría inicial para *Sitotroga cerealella* fue de 0.6 gramos, con la se empezó la cría, caso que no ocurre en muchos programas de cría de *Sitotroga cerealella* donde indica que la cría inicial debe empezarse por lo menos con 20 a 26 gramos. ( Madrigal, 2001; Moreira, 1985; Marchori, 2003).

Otro punto muy importante que se debe mencionar es el manejo del sustrato que en este caso es el trigo para la producción masiva de *Sitotroga cerealella*, se debe desinfectar con fumigantes una semana antes del inicio de la cría, (Madrigal, 2001; Moreira, 1985; Marchori, 2003). Nosotros iniciamos la cría de *Sitotroga cerealella* sin ningún tratamiento antes al trigo es debido a que la cría inicial era muy pequeña y se colocó en un kilo de trigo.

En varias investigaciones, (Madrigal, 2001; Moreira, 1985; Marchori, 2003), indican de se debe tener varias salas para la cría de *Sitotroga cerealella*, uno es la sala de cría, sala de obtención de los huevos, la sala de pegado de los huevos y la sala de control de calidad, en nuestro caso compartíamos la sala de cría con otros insectos y no se podía desinfectar el piso con diesel para evitar que le entre a la cría ácaros.

### **238. Conclusiones**

1. Se tiene la sala de reproducción donde se cuenta con cuatro bastidores, 2 qq de trigo desinfectado, 24 cajas de madera, 2 estufas que mantienen la temperatura de 28°C. y se está esperando la llegada del material biológico para iniciar la cría
2. Se espera tener el contacto con DESA para obtener los huevos de *Sitotroga cerealella* y empezar con la cría de la plaga como del parasitoides

### **239. Recomendaciones**

Se recomienda tener cuidado con la humedad del trigo que puede ocasionar infección de ácaros o otros insectos.

Tener cuidado en la desinfección del trigo cuando se usa el Gastoxin debido a que es un gas peligroso.

### **240. Bibliografía consultada**

Carballo, M. 2002. Manejo de insectos mediante parasitoides. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. N 66 pp 118-122.

Lopez, S and R. Botton. 1997. Biology of a South American Population of *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) Attacking the Greenhouse Whitefly. Biological Control. 9 1-5.

Moreira, M and Maldonado, J. 1985. Biología de *Sitotroga cerealella* Oliver ( LEPIDOPTERA: GELECHIDAE) polilla de los cereales almacenados en Venezuela. Agronomía Tropical. N 35 pp 117-124. Biol. 551-552.

PEREZ, I. 1999. Plagas introducidas en España peninsular en la segunda mitad del siglo XX. Aracnet. Numero 4.

PRUETT, C. 2004. Principios de manejo integrado de plagas y biocontrol en siembra directa. III Congreso Boliviano de Protección Vegetal.

### **Pruebas con *Gallería mellonella* para aislar entomopatógenos del suelo**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Edson Meneses

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Compendio:** Los nematodos se han mostrado más importantes en el control biológico de plagas, estos nematodos cuyos miembros están mutualísticamente asociados con bacterias que ocasionan septicemia y otros tipos de afecciones letales en sus hospederos. Se realizaron diferentes pruebas de captura de nematodos del suelo con larvas de *Galleria mellonella*, se tomaron 10 muestra de tierra con dos repeticiones de diferentes zonas. Se colocaron 2 larvas de *Galleria mellonela* en cada muestra de tierra y se lo dejo por 48 horas hasta que las larvas se infectaran con nematodos. Después de las 48 horas se sacaron las larvas y se la colocaron en trampas White. Después de las 48 horas se observaron las cajas petri al estero para observar si había nematodos. Y se observo que no había ningún nematodo de las diez muestras de tierra.

**Palabras claves:** Captura, Nematodos y *Galleria mellonella*

**241. Objetivos:** Probar la captura de nematodos entomopatógenos de suelo con las larvas de *Galleria mellonella*

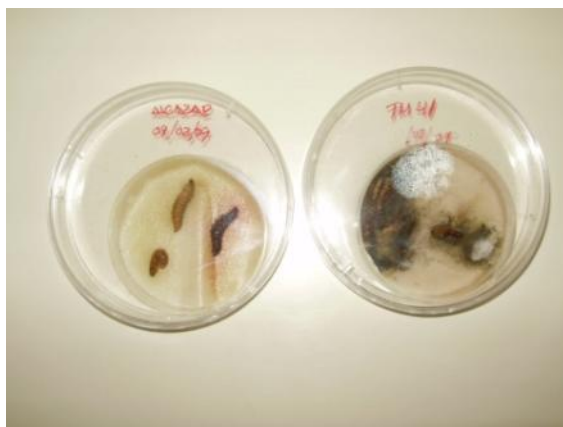
**242. Hipótesis**

**243. Revisión de literatura**

Los nematodos se han mostrado más importantes en el control biológico de plagas, estos nematodos cuyos miembros están mutualísticamente asociados con bacterias que ocasionan septicemia y otros tipos de afecciones letales en sus hospederos.

**244. Materiales y métodos**

Se realizaron diferentes pruebas de captura de nematodos del suelo con larvas de *Galleria mellonella*, se tomaron 10 muestra de tierra con dos repeticiones de diferentes zonas. Se colocaron 2 larvas de *Galleria mellonela* en cada muestra de tierra y se lo dejo por 48 horas. Después de las 48 horas se sacaron las larvas y se la colocaron en trampas White (fig.1) que consisten de dos cajas petri una pequeña y otra grande. Se coloca las larvas de *Galleria mellonela* en la caja petri pequeña con un pedazo de papel filtro y se coloca al medio de la caja petri grande que esta con agua destilada. Esta trampa se utiliza para extraer nematodos de las larvas infectadas, las larvas se dejan en la trampa por 48 horas.



**Figura 1. Trampas white.**

#### 245. Resultados

Después de las 48 horas se observaron las cajas petri al estero para observar si había nematodos. Y se observo que no había ningún nematodo de las diez muestras de tierra.

#### 246. Conclusiones

Después de estos resultados se concluyeron los siguientes puntos:

- No se observo ningún nematodo entomopatógenos en las tres muestras de tierra
- Tal vez estos resultados se deba a que las tierras de donde se quería extraer los nematodos no estaban bien conservadas.

#### 247. Recomendaciones

Realizar nuevamente las pruebas de captura de nematodos con las larvas de *Galleria mellonella*, teniendo el cuidado de que las muestras de tierra estén bien conservadas.

#### 248. Bibliografía consultada

Aleman J. 2003. Peso del hospedante de Sustitucion *Galleria mellonella* ( Lepidoptera:Pyralidae) como criterio en calidad en la cria de *Lixophaga diatraeae* (Diptera: Tachinidae) Rev. Proteccion vegetal Vol 18:108-111.

### **Desarrollo de una dieta para la multiplicación de *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*.**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Edson Meneses

**Instituciones colaboradoras o socias:** FUNDACION PROINPA

**Compendio:** Se pretende establecer una dieta para la multiplicación de *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*, se desarrollo técnicas sencillas para mejorar y optimizar la cría de *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*. Entre las cosas que se modifíco en la cría de *Spodoptera frugiperda* la dieta se modifíco quitándole algunos ingredientes y la adición de gentamicina y levadura de cerveza. Se tubo una buena respuesta de la modificación de la dieta para *Spodoptera frugiperda* dando como resultado una buena cantidad de adultos (400) caso que no ocurría antes con la anterior dieta (100). La adición de la gentamicina ayudo a que bajara la mortalidad de las larvas de 1 y 2 instar de un porcentaje de 60 % a un porcentaje de 20 %. Se evaluaron la dieta de *Galleria mellonella* con buenos resultados. Se minimizo el uso de la dieta par *Spodoptera frugiperda*. Se debe anotar la fecha cuando se recolecta las posturas y en todas las fases para poder controlar mejor la cría tanto en *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*.

**Palabras claves:** Dieta, *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*

**1. Objetivos:** Desarrollar técnicas sencillas para mejorar y optimizar la cría de *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*

## 2. Hipótesis

### 3. Revisión de literatura

*Spodoptera frugiperda* Smith es un lepidóptero de la familia Noctuidae, el gusano cogollero, , el cual es una especie insectil que ataca a muchas plantas silvestres y cultivadas como el maíz, la alfalfa, el frijol, papa, sorgo, soya, cebolla y tomate de cáscara (Morón y Terrón, 1988; Lagunes *et al.*, 1994). Se trata de una de las plagas más importantes en el Continente Americano, se encuentra particularmente en las regiones tropicales y subtropicales donde los daños que causa a los cultivos son regularmente superiores al 50% (Bahena J. F., Sánchez M. y Miranda M. A. 2003).

*Galleria melonella* es una polilla que se alimenta de cera, es un pequeño lepidóptero que escasamente llega a los 35 mm de envergadura alar y a una longitud total de 14 mm. *Galleria melonella* en el microclima de una colmena, es capaz de poner hasta 800 huevos de golpe. De estos huevos, nacen las larvas (orugas provistas de ocho pares de patas) al cabo de 5 u 8 días. Tardarán entre dos y tres semanas en alcanzar su pleno desarrollo. En este momento, puparán, y pasados una media de 10 días, saldrá el imago. Este tipo de desarrollo recibe el nombre de **holometábolo** (Bahena J. F., Sánchez M. y Miranda M. A. 2003).

### 4. Materiales y métodos

Entre las cosas que se modifico en la cría de *Spodoptera frugiperda* la dieta se modifico quitándole algunos ingredientes y la adición de gentamicina y levadura de cerveza. La cría de *Spodoptera frugiperda* empieza con la recolección de huevos y larvas del campo. Estos son colocados en vasitos con dieta artificial hasta obtener adultos. Los adultos son transferidos a las jaulas de postura donde se colocan en recipiente con algodón una solución de miel como alimento para los adultos mientras realizan las posturas. Se recoge las posturas y son colocados en vasos con dieta. A medida que van creciendo las larvas con la ayuda de un pincel son individualizadas. Las larvas son criadas con dieta hasta que empupen, las cuales son sexadas y colocadas en las jaulas de postura para que continúe el ciclo.

En el caso de *Galleria mellonella* se implemento una dieta a base de harina de maíz, salvado de trigo, maíz molido, leche en polvo y miel. Se realizo un pequeño ensayo para ver la efectividad de esta dieta y se lo comparo con otra dieta en base de comida de perro con miel y con panales de abejas. Se colocaron en tres recipientes diferente las tres dietas,(Fig. 1) con una cantidad de larvas de *Galleria mellonella* para que cumpla su ciclo en ella.

**Figura. 1 Dieta de Maíz, Panal de abejas y Dieta de perro.**



### 5. Resultados

Se tubo una buena respuesta de la modificación de la dieta para *Spodoptera frugiperda* dando como resultado una buena cantidad de adultos (400) caso que no ocurría antes con la anterior dieta (100). La adición de la gentamicina ayudo a que bajara la mortalidad de las larvas de 1 y 2

instar de un porcentaje de 60 % a un porcentaje de 20 %. La dieta fue muy eficiente para la larva de *Spodoptera frugiperda* (Fig.2) y se ve un 80 % de las larvas de 5 instar empupan (Fig.2).

**Figura 2. Larva y pupa de *Spodoptera frugiperda***



En el ensayo que se realizo con las dieta para *Galleria mellonella* se observo en la tabla 1 que la dieta de maíz tubo mejores resultados.

**Tabla 1. Características que se observaron en las tres dietas**

Dieta de Maíz	Panal de abejas	Dieta de Perro
Población relativamente alta	Población baja	Población alta
Larvas uniformes	Larvas de distintos tamaños	Larvas pequeñas
Ciclo mas corto	Ciclo mas largo	Ciclo mas corto
Pupas grandes	Pupas grandes	Pupas pequeñas
Adultos normales	Adultos normales	Adultos deformes

## 6. Discusión

Una de las características que fue muy relevante fue el ciclo mas corto en la dieta de maíz que en el panal de abejas esto talvez se deba a que las larvas tenga a su disposición bastante alimento. Lo malo de esta dieta de maíz es que pierde muy rápido su humedad constituyendo un problema para las larvas esto talvez se deba a que esta dieta se la utiliza zonas mas húmedas con un 65% de humedad, condiciones ajustables con equipo.

## 7. Conclusiones

Se lograron efectuar e instalar crías masivas de las dos especies de lepidópteros, tanto para bioensayos, controles de calidad y con proyección a producción de parasitoides.

Cría establecida de dos especies de lepidópteros y dos especies de coleópteros para realizar bioensayos, controles de calidad y producción de parasitoides.

Se evaluaron la dieta de *Galleria mellonella* con buenos resultados. Se minimizo el uso de la dieta par *Spodoptera frugiperda*. Se debe anotar la fecha cuando se recolecta las posturas y en todas las fases para poder controlar mejor la cría tanto en *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*.

## 8. Recomendaciones

Se recomienda tener cuidado con la preparación de las dietas en el caso de *S. frugiperda* al disolver el agar y medir bien todas las proporciones porque un error puede causar la perdida de la dieta o una dieta muy acuosa.

En *Galleria mellonella* tener cuidado en el manipuleo de la dieta después de la preparación ya que se puede contaminar muy fácilmente de hongos. Tener cuidado con que no se seque mucho la dieta porque puede ocasionar la perdida de toda la cría.

## 9. Bibliografía consultada

Alemán, J. María Elena Ruíz y Margarita Vidal. 2003. Peso del hospedante de sustitución *Galleria mellonella* Linneo (Lepidoptera: Pyralide) como criterio de calidad en la cría de *Lixophaga diatraeae* Townsend (Diptera: Tachinidae) *Rev. Protección Veg. Vol. 18 No. 2*

Bahena J. F., Sánchez M. y Miranda M. A. 2003). Extractos vegetales y bioplaguicidas, alternativas para el combate del “gusano cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). En: *Entomología Mexicana Vol. II. pp. 366-372.*

Perez, I. 1999. Plagas introducidas en España peninsular en la segunda mitad del siglo XX. *Aracnet. Numero 4.*

Pruet, C. 2004. Principios de manejo integrado de plagas y biocontrol en siembra directa. III Congreso Boliviano de Protección Vegetal.

### **Evaluar los extractos por arrastre de vapor de ajo, cebolla, tabaco, K´aralawa y locoto con y sin aceite mineral en *Spodoptera frugiperda* como ecoinsecticidas**

**Responsable:** Noel Ortuño

**Equipo técnico:** Daniel Barja y Walquer Arandia

**Instituciones colaboradoras o socias:**

**Compendio:** Los extractos de plantas biocida tienen una gran importancia en el control de las plagas en el marco de la producción orgánica. Se pretende disponer de al menos 3 extractos de plantas para el control de *Spodoptera frugiperda*. Para el siguiente trabajo se realizaron 5 extractos de diferentes plantas en la cual tres son de uso domestico como es el ajo, cebolla y locoto y los otros dos son plantas uno es el tabaco y otro es la K´aralawa (*Nicotina glauca*). Se realizaron los extractos de estas 5 plantas por la técnica de arrastre de vapor. En los resultados se puede observar que los extractos no tuvieron ningún efecto a las larvas de *Spodoptera frugiperpa* El que los extractos no tengan ningún efecto talvez se deba a que las larvas de *Spodoptera frugiperda* son grandes y como las pruebas de realizaron por contacto y no así por ingestión como se realizaron en otros ensayos con extractos. Para lograr mejores resultados se deben mejorar el método de extracción de los extractos, realizar las pruebas físicas y químicas a los extractos y verificar si en la cría se tiene larvas en diferentes instar para realizar los ensayos.

**Palabras claves:** extractos vegetales, ecoinsecticidas y *Spodoptera frugiperda*

**249. Objetivos:** Disponer de al menos 3 extractos de plantas para el control de *Spodoptera frugiperda*.

### **250. Revisión de literatura**

Los extractos de plantas biocida tienen una gran importancia en el control de las plagas en el marco de la producción orgánica, al respecto Gomero (1994), indica que el principio básico de la agroecología es tratar de mantener el equilibrio entre los factores bióticos y abióticos que interactúan en este sistema. Los productos a base de plantas, aplicados tanto en forma preventiva como curativa al ataque de plagas, respetan este principio. Es importante indicar que las sustancias activas de algunas plantas, causan un efecto repulsivo sobre algunas plagas y a veces pueden matarlo, pero por ser unos productos de origen vegetal; éstas se descomponen rápidamente y su eficacia es de corta duración, por lo que deben utilizarse con mucha prudencia.

Morales (2001), menciona que a partir de los extractos naturales se pueden producir pigmentos naturales, funguicidas de micotoxinas, premezclados de vitaminas, minerales, antioxidantes y fármacos veterinarios.

Por su parte Villarroel (2002), indica que los plaguicidas naturales contienen sustancias que repelen, controlan o matan a los insectos; estas sustancias están basados en los mentoles, que cuando sobrepasan del 40% matan a los insectos y del núcleo alfa Benzo-pirano y los flavonoides, cuando los porcentajes son mayores al 10% su acción es repelente. Los productos naturales obtenidos en forma de plaguicidas de origen vegetal, son recursos renovables dentro de la fotoquímica y la mayoría de se emplean con fines medicinales, insecticidas, fungicidas por el contenido de productos químicos (ingrediente activo) obtenidos por medio de extracciones.

## 251. Materiales y métodos

Para el siguiente trabajo se realizaron 5 extractos de diferentes plantas en la cual tres son de uso domestico como es el ajo, cebolla y locoto y los otros dos son plantas uno es el tabaco y otro es la K´aralawa ( Nicotina glauca ): Se realizaron los extractos de estas 5 plantas por la técnica de arrastre de vapor que consiste en colocar un kilo del material vegetal en la evaporizadota que es una olla de presión modificada donde se coloca un litro de agua y encima en una rejilla se coloca el kilo de material vegetal y se deja hervir por unos 15 minutos y con la ayuda de unas conexiones y mangueras se enfría el vapor que sale del vaporizador y se condensa quedando como producto el extracto.

Después del proceso de extracción se procedió a tres ensayos en los cuales asperjaron con los 5 extractos con tres diferentes dosis a 10 larvas de Spodoptera frugiperda de tercer instar en las siguientes dosis:

DOSIS DEL PRIMER ENSAYO	DOSIS DEL SEGUNDO ENSAYO	DOSIS DEL TERCER ENSAYO
Ajo 100 cc /20 litros	Ajo 300 cc./20 litros	Extracto puro
Locoto 100 cc./ 20 litros	Locoto 300 cc./20 litros	Extracto puro
Cebolla 200 cc./20 litros	Cebolla 600 cc./ 20 litros	Extracto puro
Tabaco 4 litros/20 litros	Tabaco 12 litros/20 litros	Extracto puro
Karalawa 4 litros/20 litros	Karalawa 12 litros /20 litros	Extracto puro

En el primer ensayo se asperjo los 5 extractos y la dosis correspondiente a 10 larvas de Spodoptera frugiperda del tercer instar. En el segundo ensayo se asperjo con la dosis correspondiente a 10 larvas del 2 instar. Y en el tercer ensayo se asperjo los 5 extractos con y sin aceite a larvas del 4 instar de Spodoptera frugiperda.

## 5. Resultados

En los resultados se puede observar en la tabla 1 y 2 que los extractos no tuvieron ningún efecto a las larvas de *Spodoptera frugiperpa*. Y el la tabla 3 se puede observar que los extractos puros no tuvieron ningún efecto en las larvas, pero los extractos con aceite mineral si tuvieron un efecto matando el 100 % de los insectos.

**Cuadro 1. Tratamientos y Larvas (L) muertos (M) y vivos (V) después de la aspersión con los extractos.**



Tratamientos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Testigo	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T1= Tabaco	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T2= Locoto	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T3= Cebolla	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T4= Ajo	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T5= K´aralawa	V	V	V	V	V	V	V	V	V

**Cuadro 2. Tratamientos y Larvas (L) muertos (M) y vivos (V) después de la aspersión con los extractos**

Tratamientos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Testigo	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T1= Tabaco	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T2= Locoto	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T3= Cebolla	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T4= Ajo	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T5= K´aralawa	V	V	V	V	V	V	V	V	V

**Cuadro 3. Tratamientos y Larvas (L) muertos (M) y vivos (V) después de la aspersión con los extractos con y sin Aceite mineral (Am).**

Tratamientos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
Testigo (Am) 5 %	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T1= Tabaco	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T2= Tabaco + Am	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T3= Locoto	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T4= Locoto + Am	M	M	V	V	V	V	V	V	V	V
T5= Cebolla	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T6= Cebolla + Am	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T7= Ajo	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T8= Ajo + Am	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T9= K´aralawa	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
T10=K´aralawa+Am	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V

En el cuadro 3 se puede observar que los extractos con aceite mineral tienen un efecto ecoinsecticida letal excepto en los extractos de locoto y k´aralawa que solo presentaron el 20 % y 60 % de mortalidad respectivamente. Como el testigo era el aceite mineral al 5 % de la cual hubo un 100 % de mortalidad esto tal vez se deba al alto porcentaje que se utilizó ya que la dosis que se recomienda es de 0.2 %. Los resultados demuestran que ninguno de los extractos sin aceite mineral tiene un efecto ecoinsecticida en larvas del 2, 3 y 4 instar de *Spodoptera frugiperda*.

El que los extractos no tengan ningún efecto tal vez se deba a que las larvas de *Spodoptera frugiperda* son grandes y como las pruebas se realizaron por contacto y no así por ingestión como se realizaron en otros ensayos con extractos (GUARDIA; 2003). Otro de los motivos que los extractos hayan fallado tal vez se deba a la técnica de extracción no es muy buena o tenga alguna falla y realizar a los extractos algunas pruebas físicas y químicas para ver si tienen los metabolitos secundarios que son el agente activo que actúa en los insectos (GUARDIA; 2003).

**Cuadro 4. Extractos con y sin aceite mineral con tres diferentes dosis en larvas de *Spodoptera frugiperda*.**

Extracto	Aceite mineral	dosis	Mortalidad de larvas
Testigo	con	0.2%	0%
Testigo	Sin	100%	0%
Cebolla	Con	25%	0%
Cebolla	Con	50%	0%
Cebolla	Con	100%	0%
Cebolla	Sin	25%	0%
Cebolla	Sin	50%	0%
Cebolla	Sin	100%	0%
K´aralawa	Con	25%	0%
K´aralawa	Con	50%	0%
K´aralawa	Con	100%	0%
K´aralawa	Sin	25%	0%
K´aralawa	Sin	50%	0%
K´aralawa	Sin	100%	0%
Ajo	Con	25%	0%
Ajo	Con	50%	0%
Ajo	Con	100%	0%
Ajo	Sin	25%	0%
Ajo	Sin	50%	0%
Ajo	Sin	100%	0%
Locoto	Con	25%	60%
Locoto	Con	50%	25%
Locoto	Con	100%	60%
Locoto	Sin	25%	0%

## 6. Discusión

En la tabla 4 se observa que solo el extracto de locoto tubo un efecto insecticida con aceite mineral al 0.2 % en las tres dosis que se aplico al 25%, 50 % y 100 % en un porcentaje de mortalidad de 60 %, 25% y 60% respectivamente. Se puede observar que no se hicieron pruebas con el extracto de tabaco debido a la dificultad de conseguir la materia prima para elaborar el extracto.

## 7. Conclusiones

Para lograr mejores resultados se deben mejorar el método de extracción de los extractos, realizar las pruebas físicas y químicas a los extractos y verificar si en la cría se tiene larvas en diferentes instar para realizar los ensayos.

## 8. Recomendaciones

Se debe realizar más pruebas con los extractos de estas plantas y de otras más con otro método de extracción.

Realizar las pruebas con larvas del 1 y 2 instar para ver si tienen algún efecto.

Repetir estas pruebas con solo aceite mineral al 0.2 % para ver si existe realmente un efecto insecticida.

## 252. Bibliografía consultada

Gomero, L. 1994. Plantas para proteger cultivos. 1ra edición. Lima-Perú, Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos. 235 Pág.

Villarroel, D. 2002. Plaguicidas Naturales. Centro de Asesoramiento en Desarrollo Integral Agropecuario (CADIA). Cochabamba, Bolivia. 45p.

## **DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO ARTESANAL PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis***

Responsable: Noel ortuño  
Equipo técnico: Violeta Angulo

### **Resumen**

En función de la necesidad de obtener un medio de cultivo económico para la producción de *B. thuringiensis* se probaron 12 diferentes medios de cultivo basados en: levadura tórula en dos concentraciones (2,5 y 5 g/ litro), harina de soya también en dos concentraciones (5 y 10 g/litro) ambas como empleadas como fuente de nitrógeno, y como fuente de carbono se probaron tres harinas: almidón de papa, almidón de maíz y almidón de yuca en una concentración de 2, 5 g/litro de medio, se trabajó con un preinóculo y un inóculo el cual fue incubado por el lapso de cinco días después de ese tiempo se procedió a la lectura mediante un equipo de espectrofotometría a 600nm de longitud. Los resultados indicaron que los niveles más altos de absorbancia se obtuvieron con las concentraciones más bajas de levadura tórula y de harina de soya y con el almidón de maíz, siendo de esta forma el medio elaborado con 2,5 g de levadura, 5 g de harina de soya y 2,5 g de almidón de maíz el mejor medio.

### **Palabras claves:**

*Bacillus thuringiensis*, producción artesanal, con diferentes fuentes de Nitrógeno y Carbono.

#### **253. Hipótesis**

- El empleo de ingredientes artesanales en la preparación de medios de cultivo para la producción de *B. thuringiensis* presenta un rendimiento similar al empleado con medios sintéticos.

#### **254. Objetivos**

- Elaborar un medio de cultivo artesanal para la producción de *B. thuringiensis*

#### **255. Revisión de literatura**

Aunque varios grupos de bacterias han sido descritos como patógenas a insectos, sólo *B. thuringiensis* ha sido estudiada y utilizada ampliamente, por lo cual constituye una alternativa para el control de plagas.

Los insecticidas derivados de esta bacteria constituyen el ejemplo más importante de este tipo de productos y ocupan la mayor parte del mercado mundial de bioinsecticidas. Estos productos se han utilizado comercialmente por más de 35 años y han sido aceptados como productos biodegradables y seguros para los vertebrados y el ambiente (Fernández, 2002).

Un factor clave en la producción por fermentación de biopesticidas basados en *Bacillus thuringiensis* es el diseño del medio de cultivo, el cual debe ser económico y contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo. Del cultivo se espera que rinda una alta producción de ingrediente activo conformado por los cristales que contienen las toxinas y por la espora del microorganismo, y que este ingrediente posea el valor de toxicidad requerido para la formulación del producto comercial (Escobar *et al.*, 2002).

Por lo que es necesario un diseño adecuado de un medio de cultivo (ó de fermentación) apto para el crecimiento, esporulación y formación de los cristales de *B. thuringiensis*, pues de ello depende la calidad tóxica del cristal; en ese sentido el medio de fermentación debe contener una fuente de carbono, de nitrógeno orgánico y sales minerales que en balance estimulen el crecimiento, la esporulación y la producción de cristales altamente tóxicos. (Galán *et al.*, 1996).

La composición del medio de cultivo es muy importante porque es necesario ajustar el balance de los nutrimentos, principalmente carbono y nitrógeno para obtener una concentración elevada de biomasa bacteriana y una buena cantidad de cristales tóxicos. Otros nutrimentos también son importantes, tales como las sales de magnesio, manganeso, carbonatos y fosfatos.

Como fuentes nitrogenadas se utilizan harinas de soya, maíz, trigo y pescado entre otras y como fuentes de carbono se emplean principalmente almidones y en ocasiones melazas (Fernández, 2002).

## **256. Materiales y métodos**

El protocolo para la elaboración de los medios de cultivo fue el siguiente de acuerdo a la metodología estandarizada de (Obeta y Okafor, 1984).

- Se realizó el inóculo a partir de una placa Petri con agar nutriente sembrada con *B. thuringiensis* a un matraz de 250 ml de capacidad con 50 ml de caldo nutriente

suplementado con 0,03% de extracto de levadura y se dejó incubar por 24 horas a 28°C y 100 rpm.

- De este primer caldo se paso a un segundo matraz con el mismo medio un volumen de 3 ml y se dejó incubar nuevamente por 18 horas. Este preinóculo fue transferido en una relación de 2% vol/vol a cada uno de los caldos de multiplicación a probar.
- Los caldos de inóculo fueron elaborados en un volumen de 12 ml y vertidos en matraces de 25 ml de capacidad midiéndose el pH de cada uno de los medios teniendo el cuidado de que estos se hallaron entre valores de 6 y 6,5 siendo posteriormente autoclavados.
- Una vez inoculados fueron incubados a 28°C de temperatura y 100 rpm por cinco días.
- Al cabo de ese tiempo se procedió a la evaluación para lo cual se extrajo un volumen de 1ml a tubos eppendorff de cada uno de los tratamientos.
- Las lecturas fueron realizadas mediante un equipo de espectrofotometría a 600nm de longitud.

Se probaron doce medios de cultivo elaborados con harina de soya, levadura tórula (fresca) y almidones de maíz, papa y yuca, como componentes principales.



**Figura 1.** Preparación de los medios de cultivo



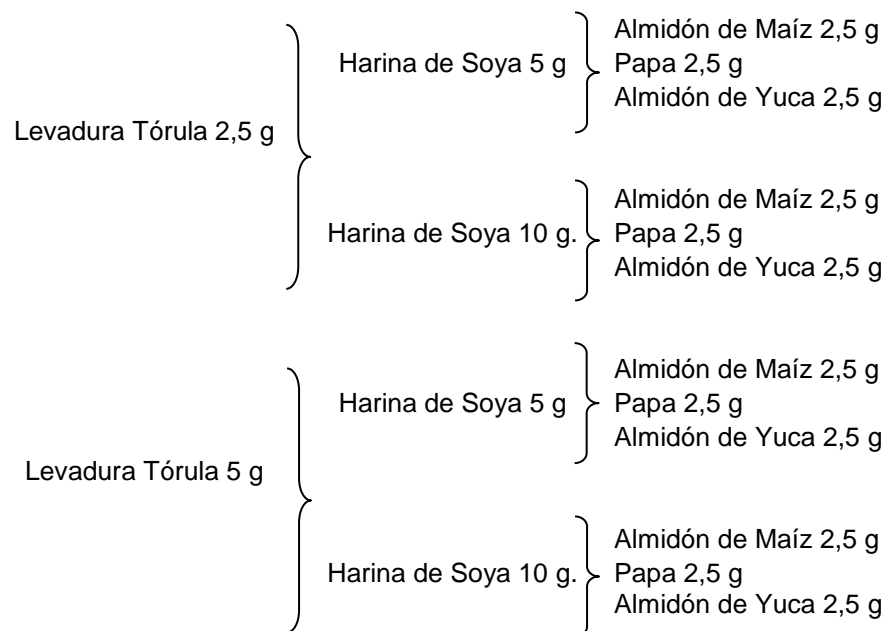
**Figura 2.** Dispensación de los medios de cultivo en los matraces de 25 ml de capacidad



**Figura 3.** Lecturas en el equipo de espectrofotometría

#### 4.1 Diseño Experimental

El diseño empleado fue completamente al azar. Los tratamientos fueron una combinación de los siguientes factores (Fig. 4):



**Figura 4.** Combinación de los diferentes niveles en los medios de producción probados.

Se realizaron tres repeticiones de cada medio más un control blanco, es decir un medio sin inóculo para la comparación en el equipo de espectrofotometría, siendo un total de 12

tratamientos, por tanto 48 unidades experimentales, además se incluyó el medio sintético LB (Luria Bertaini) con su respectivo blanco y caldo de papa en una relación de 3 litros de agua por Kg de papa como control.

### 3.2 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en las lecturas fueron analizados por el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

#### 257. Resultados

Los medios elaborados presentaron pH comprendido entre 6,5 y 7,2 siendo este rango óptimo para el cultivo microbiana de *Bt*.

Los resultados son interpretados de acuerdo al siguiente cuadro de Análisis de Varianza (Cuadro 1):

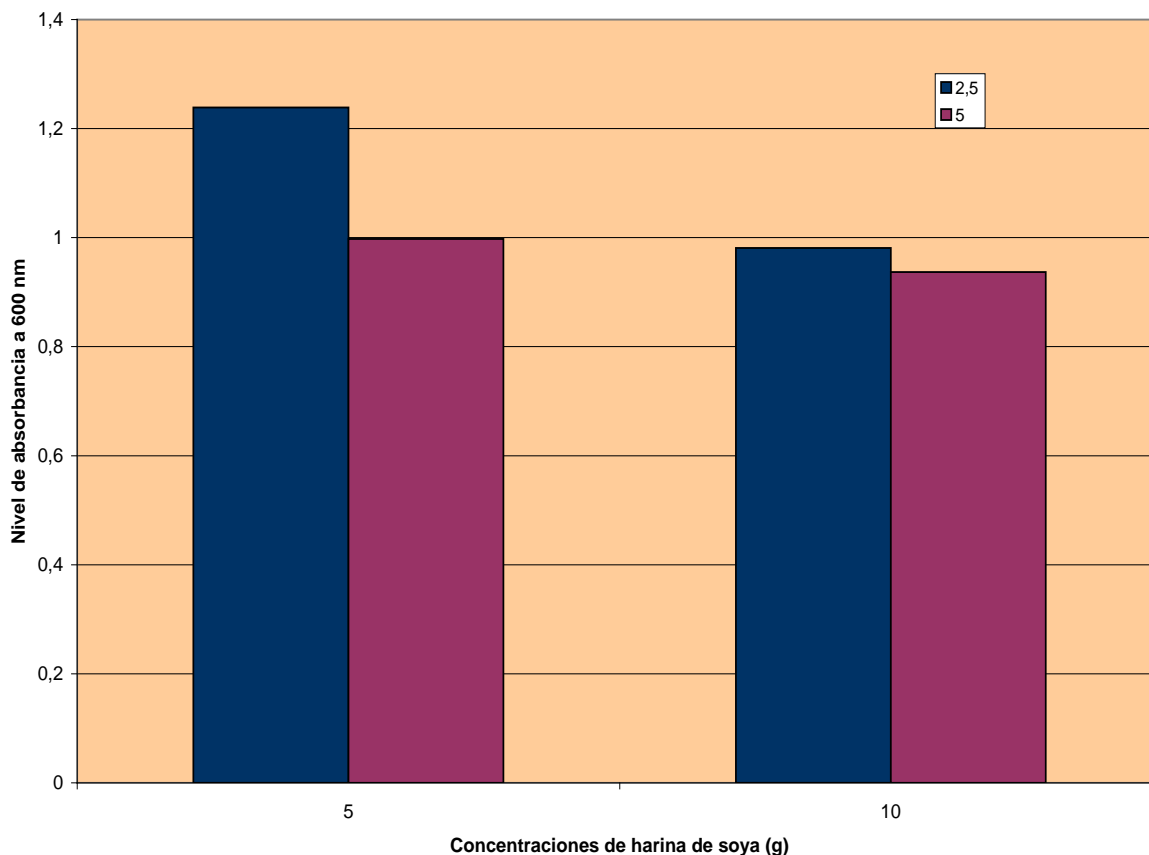
**Cuadro 1. Análisis de Varianza**

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Levadura	1	0,18261378	0,18261378	24,53	<,0001
Soya	1	0,22816544	0,22816544	30,65	<,0001
Leva*Soya	1	0,087025	0,087025	11,69	0,0023
Almidón	2	0,73792406	0,36896203	49,56	<,0001
Leva*Almidón	2	0,04815339	0,02407669	3,23	0,0571
Soya*Almidón	2	0,02846806	0,01423403	1,91	0,1696
Leva*Soya*Almidón	2	0,05782917	0,02891458	3,88	0,0346
Residual	24	0,178682	0,00744508		
Total	35	1,54886089			

De acuerdo al análisis de varianza existen diferencias estadísticamente significativas  $Pr > 0.01$  en la interacción levadura soya, esto quiere decir que las unidades de absorbancia en los dos niveles de levadura varían con los dos niveles de soya.

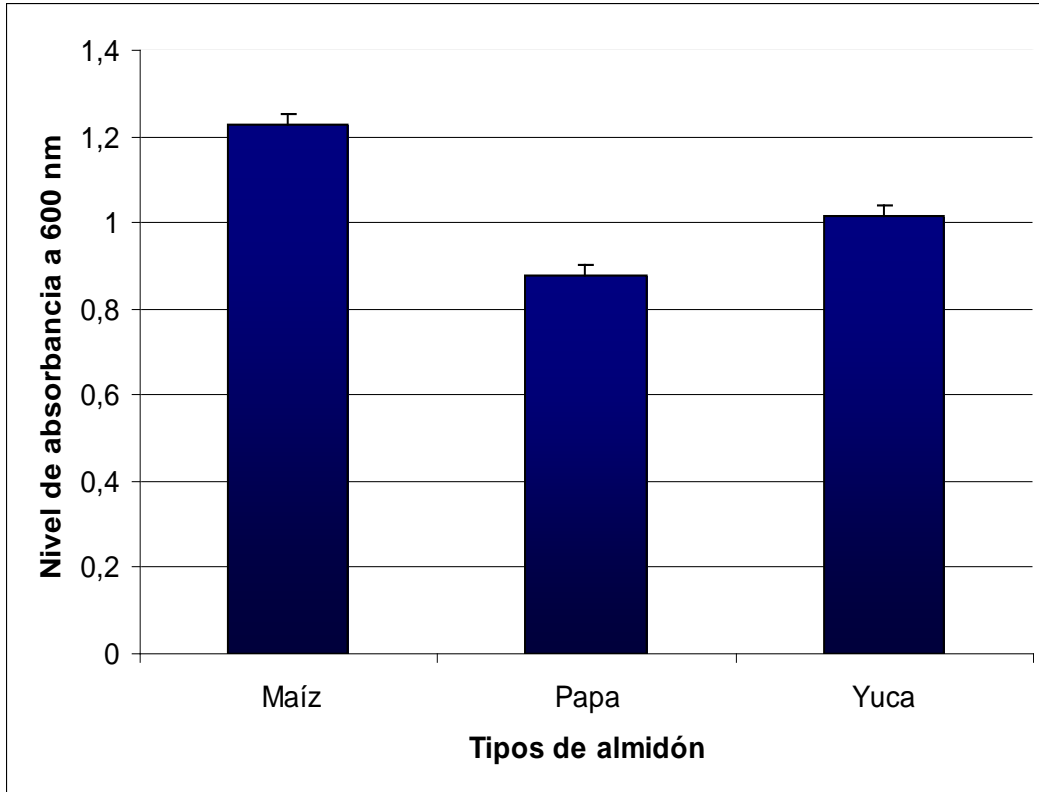


En la figura 4, se observa una diferencia marcada para los medios elaborados con 2,5 g de levadura en las dos concentraciones de harina de soya disminuyendo el nivel de absorbancia del primer nivel al segundo de la soya. En cambio en los medios con concentración de 5g de levadura se observa un pequeño decremento del primer nivel al segundo, por tanto las lecturas más altas de absorbancia se hallan con la concentración más bajas de levadura 2, 5 g y con la concentración más baja de harina de soya 5g.



**Figura 4. Efecto de los niveles óptimos de soya y levadura tórula**

Con relación al empleo de los almidones el análisis de varianza también nos muestra una diferencia estadísticamente significativa  $P > 0,01$ , el uso de los tres tipos de almidones elaborados con papa, maíz y yuca tiene un nivel diferente en el nivel de absorbancia del cultivo bacteriano. Siendo el almidón de maíz el más efectivo en el crecimiento bacteriano (Fig. 5).



**Figura 5.** Niveles de absorbancia para el crecimiento de *Bt* con los tres diferentes tipo de almidón.

## 258. Discusión

El pH de los medios se halló en rango de crecimiento óptimo para *Bt*. El valor de pH <http://www.phcmexico.com.mx/phcproduccion1.html> es un parámetro importante y aunque generalmente se deja libre durante el proceso, es necesario ajustar los medios de cultivo para que no sea menor a 5,0, de esta manera se trabajó dentro del rango de pH óptimo para la producción de *Bt*

Los resultados de los medios probados obtuvieron buenos resultados con las más bajas concentraciones de soya y de levadura.

Márquez *et al.*, (1999) probaron varios medios de cultivo para *Bt* en base al medio base probado en las plantas de de bioplaguicidas de Cuba el cual se constituye de 2,5 g de levadura panadera, 2,5 g de almidón y 5 g de levadura tórula, el cual es similar al hallado como óptimo en este ensayo en relación a las concentraciones de soya y de almidón ,obteniendo estos autores los dos mejores resultados aquellos probados con 3,5 % de levadura tórula, la más alta concentración probada, en comparación con las probadas de 3, 2 y 0,5%,en cambio en este trabajo la concentración más alta de de levadura tórula no fue la que dio mejores resultados.

Bernhard y Utz (1993), en un estudio de las influencias de las fuentes de N y C, para la producción de *Bt*, encontraron que un exceso de carbohidratos resultaba inhibitorio para la obtención de altos rendimientos en la toxina y proponen una relación N/C de 2/1. Asimismo, consideran que las concentraciones de carbohidratos resultan definitivas para el tamaño de los cristales tóxicos, los que tienden a ser más pequeños con exceso de carbohidratos en los medios de cultivo, en la presente investigación la mejor interacción N/C fue de 3/1, valor que en evidencia con los valores más bajos de levadura y torta de soya.

## **259. Conclusiones**

Por tanto se concluye que el mejor medio es el elaborado con 2,5 g de levadura, 5 g de harina de soya y 2,5 g de almidón de maíz

## **260. Recomendaciones**

Se recomienda la prueba del medio seleccionado en combinación con otras fuentes de Carbono como melaza y la adición de sales minerales como el  $\text{Ca}^{2+}$  que favorezcan la calidad de la producción de *Bt*.

## **261. Bibliografía consultada**

Bernhard, K. and R. Utz. 1993. The production of *Bacillus thuringiensis* for experimental and commercial uses theory and practice. Ed by Enstwertle

Ecobar., J, M, Pardo, G, Buitrago y Luis López. 2004. Análisis exploratorio para la multiplicación de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. Revista Colombiana de microbiología 6(2): 43-53.

Fernández Larrea, O. 2002. Control de Calidad de Insecticidas Microbianos. Revista Manejo Integrado de Plagas y Agro ecología Costa Rica N 65.

Galán L.J. ; J.A. García ; Ellis S.M. ; Quintero Z.I. y H.A. Luna O. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. En: Avances en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 139-152.

Márquez., M., O. Fernández- Larrea y A, Díaz, 1999. Influencia de la composición del medio de cultivo en el rendimiento de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*. Fitosanidad 3(1).

Obeta, J.A.N., and N. Okafor. 1984. Medium for the production of Primary Powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology, vol.47 No.4, 863-867.

<http://www.phcmexico.com.mx/phcproduccion1.html>

## DE EFICIENCIA INSECTICIDA DE EXTRACTOS DE LOCOTO Y KATARI PAPA

**Responsables:** Ilich Figueroa (MSc), Lic. Mery Córdoba  
Laboratorio de Entomología Fundación PROINPA

### **1. OBJETIVO:**

- Determinar si existe o no eficiencia insecticida en 4 extractos de locoto y 2 extractos de Katari papa.

### **2. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

#### Insectos:

*Phthorimaea operculella* (Polilla de la papa) criado en dieta natural en condiciones controladas de temperatura y humedad. Este organismo es utilizado como modelo biológicos de polillas menores (ej. Polilla de la quinua, etc.).

Para los bioensayos se utilizaron larvas de 4to. estadio (aprox. 2 cm.)

#### Preparación de las soluciones:

En base a un resultado preliminar, se tomó 1% como concentración única a probar para cada tratamiento. Cada tratamiento se preparó con agua destilada. Se utilizó también el extracto de capsaicina 1.8% proporcionado por el CTA (UMSS), como testigo positivo y solamente agua como testigo control.

#### Tratamientos:

- T1: Extracto LOCOTO 1 (1%)
- T2: Extracto LOCOTO 2 (1%)
- T3: Extracto LOCOTO 3 (1%)
- T4: Extracto LOCOTO 4 (1%)
- T5: Extracto KATARI PAPA 1 (1%)
- T6: Extracto KATARI PAPA 2 (1%)
- T7: Extracto capsaicina CTA (1%)
- T8: Testigo control (agua)

Método de contacto forzoso en viales de vidrio: De cada combinación se añadió 500 µl a viales de vidrio de 15 ml. Luego cada vial con la solución fue sometido a agitación en posición horizontal a fin de impregnar completamente cada vial. Al tratarse de soluciones en agua, se esperó 18 horas hasta lograr la evaporación del agua y total impregnación de las paredes de los viales. Se prepararon un total de 5 viales por tratamiento para el bioensayo.

Bioensayo: Se introdujeron 4 larva de cuarto estadio de *P. operculella* en cada vial impregnado, tomando el tiempo 0. Se evaluó la mortalidad a 1 hora, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs y 24 hrs. El criterio de mortalidad fue la falta de coordinación en movimientos: Cuando se rotaba el vial y la larva quedaba boca arriba, si no retornaba a su posición normal (boca abajo) inmediatamente, ya se consideró como muerto.

Análisis de datos: Se realizó el ajuste de la mortalidad mediante la fórmula de Abbott. Para el análisis de datos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que los datos no siguieron una distribución normal. La comparación múltiple entre tratamientos se hizo con la prueba DMS (Diferencia mínima significativa). El análisis se realizó en el paquete estadístico SPSS Ver. 11.0

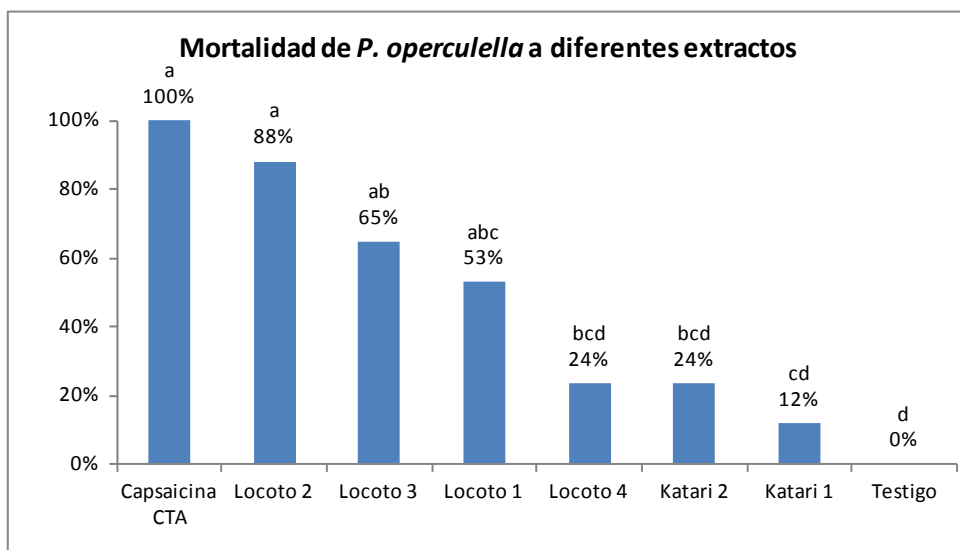
### **3. RESULTADOS**

Prueba de Kruskal – Wallis: Variable de contraste “Tratamientos”:

Chi-cuadrado	54.2658691
gl	7
P-value	<0.0001

\*\*\*

Según los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos:  $\chi^2=54.265$ ;  **$P<0.0001$**  (Prueba de Kruskal – Wallis  $\alpha=0,05$ )



**Fig. 1:** Mortalidad de extractos vegetales sobre *P. operculella* (Modelo de polillas menores) a las 24 hrs. después de iniciado el bioensayo y comparaciones múltiples (DMS,  $\alpha=0,05$ )

Locoto 1= extracto en alcohol 15min v:v 1:1

Locoto 2= extracto en alcohol por 24 horas v:v 1:1

Locoto 3= Borra del destilado

Locoto 4= Agua de destilado

El tratamiento testigo/control no presentó ningún espécimen muerto después de las evaluaciones, lo que nos da certeza de la buena conducción del experimento (fig. 1).

El tratamiento CTA es el más eficiente con 100% de mortalidad y a solamente 1 hora de iniciado el bioensayo. El tratamiento “Locoto 2” es el que le sigue en eficiencia pero 24 h. después, y no muestra diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento CTA (Prueba de comparaciones múltiples DMS,  $\alpha=0,05$ )

Los demás tratamientos no muestran eficiencias comparables con el tratamiento CTA, y destaca la poca eficiencia insecticida de los extractos de “Katari Papa” pues la mortalidad solo llegó al 24 y 12% para el extracto de Katari 2 y el Katari 1 respectivamente.

#### **4. CONCLUSIONES**

El tratamiento “Locoto 2” y “Locoto 3” son los que muestran eficiencias comparables con el testigo tratamiento “Capsaicina CTA” por lo que son los extractos que debemos continuar desarrollando a fin de concentrar la formulación de bioinsecticidas en base a locoto.

Los extractos de Katari Papa no muestran eficiencia insecticida expectable.

El extracto de capsaicina proporcionado por el CTA, tiene alta eficiencia insecticida, y se convierte en nuestro parámetro de referencia para lograr que los extractos de locoto producidos por nosotros lleguen a ese nivel de eficiencia. Se utilizará este producto como testigo positivo en los ensayos posteriores.

**Pruebas futuras:**

- Determinar si el efecto insecticida de los extractos de locoto 2 y 3 tienen igual o mejor efecto insecticida sobre *S. frugiperda*.
- Probar mejorar la eficiencia de estos extractos con la adición de solución de saponina, u otros dispersores o coadyuvantes.

**PRUEBA DE EFICIENCIA DEL ECO-ACARICIDA ACARITOP (Polisulfitos 90 % + Extracto de capsaicina 10 %) PARA EL CONTROL DE LA ARAÑUELA (*Tetranychus spp.*) DEL DURAZNO**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia M.

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja

**Instituciones colaboradoras o socias:** SENASAG

**COMPENDIO**

- ♦ Se estableció un ensayo para determinar la eficiencia del eco-acaricida de contacto ACARITOP para el control de la arañuela del durazno. El ensayo se implementó en la zona de Paracaya (Punata, Cochabamba) bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Se utilizó el cultivar Gumucio Reyes, el más difundido en la zona. Los tratamientos fueron T1 (ACARITOP, 0.4 l/20 l agua), T2 (ACARITOP, 0.5 l/20 l agua), T3 (ACARITOP, 0.6 l/20 l agua), T4 (Acarin), T5 (Testigo). Los tratamientos con ACARITOP T1 y T2, tuvieron un control eficiente de la arañuela y altos rendimientos con respecto a los otros tratamientos y el testigo (T5). El testigo, presentó valores altos de grado de daño (incidencia e índice de daño) y rendimientos bajos. Por lo tanto, ACARITOP mostró ser eficiente en el control de la arañuela.

**Palabras claves:** Arañuela, estrategias, ACARITOP, durazno.

**1. INTRODUCCION**

El Durazno (*Prunus persica* L.) es uno de los frutales más tecnificado y más difundido en todo el mundo. En Bolivia, el cultivo es tradicional en muchas regiones del país, en especial en la zona de los valles. Sin embargo, los rendimientos en el país son muy bajos debido principalmente a la incidencia de plagas, siendo uno de los más importantes la arañuela causado por (*Tetranychus spp.*).

Por otra parte, ACARITOP es un ecoacaricida que actúa por contacto y controla arañuelas, trips, pulguillas, pulgones en cultivos de hortalizas (cebolla,tomate), frutales (durazno, vid, manzano), papa y ornamentales (PROINPA, 2009).

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se estudió la eficacia del eco-acaricida **ACARITOP** para el control de la arañuela (*Tetranychus spp.*) del cultivo de durazno.

## OBJETIVOS

- c) Evaluar la eficiencia del eco-acaricida de contacto **ACARITOP** para el control de la araña ( *Tetranychus spp.*) del durazno.
- d) Evaluar fitotoxicidad.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Características de la araña del durazno:

Los ácaros del género *Tetranychus* y de otros géneros relacionados se conocen comúnmente como arañas rojas, aunque no siempre son de ese color. Son muy pequeños, casi microscópicos, y se alimentan del contenido celular de las hojas. Producen manchitas necróticas que terminan dando a las hojas un color bronceado. Infestaciones altas producen el marchitamiento de las hojas y de toda la planta.

Para el control, aplicar acaricidas específicos.

### 2.2. Eco-acaricida **ACARITOP**

ACARITOP Es un ecoacaricida que actúa por contacto. Controla arañas, trips, pulgillas, pulgones en cultivos de hortalizas (cebolla,tomate), frutales (durazno, vid, manzano), papa y ornamentales.

#### COMPOSICIÓN:

Polisulfitos..... 90 %  
Extracto de capsaicina ..... 10 %

TOTAL ..... 100.00 %ACARITOP , es un ecoinsecticida de contacto para el control de plagas de las plantas. Al ser un ecoinsecticida de contacto, solo afecta las plagas en la superficie de la planta. Se necesita bañar las plagas y toda la parte área de la planta. Su acción será efectiva mientras persistan en la hoja y mientras no sean lavados por la lluvia, es decir tengan una buena tenacidad.

Controla arañas, trips, pulgillas, pulgones en cultivos de hortalizas (cebolla,tomate), frutales (durazno, vid, manzano), papa y ornamentales.

### 3 . MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización

El ensayo se estableció en la localidad de Paracaya (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 Km de la ciudad de Cochabamba. Esta zona esta caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de durazno y la incidencia de la arañuela.

#### 3. 2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

#### 3. 3. Materiales

##### 3. 3. 1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Gumucio Reyes, susceptible a la arañuela y el más difundido en la zona.

##### 3.3.2. Productos

Se utilizó el ecoacaricida ACARITOP , y el acaricida comercial Acarin T (Dicofol 210 g/l + tetradifon 75 g/l).

#### 3. 4. Procedimiento experimental

El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

#### Características de la unidad experimental

Distancia entre hileras	=	4.0 m
Distancia entre plantas	=	3.0 m
Largo del surco	=	30 m
N° de plantas /unid. exp.	=	10
N° de plantas /tratamiento	=	30
Area de la unidad. Exp.	=	120 m2
Distancia entre unid. exp.	=	4.0 m
Area total del ensayo	=	1800 m2

#### - Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis ( litros / 20 litros agua)
1	ACARITOP	0.6
2	ACARITOP	0.5
3	ACARITOP	0.4



4	Acarin T (Acaricida comercial)	Dosis comercial (0.04)
5	Testigo	-

La estrategia de control fue la standard para cultivos susceptibles, que consistió en realizar aplicaciones preventivas, es decir, antes de que aparezcan las plagas. Las restantes aplicaciones se realizaron de acuerdo a la presión de la plaga, con un intervalo de 15 a 30 días..

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se determinó el grado de daño o porcentaje de follaje afectado por la araña. Las evaluaciones empezaron con la aparición de los primeros síntomas. En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

Asimismo, se determinó la incidencia y el grado de daño ocasionado por la araña. La evaluación se realizó utilizando la siguiente escala de severidad:

**Cuadro 1.** Escala usada para la evaluación del grado de daño por araña.

Escala	Área Afectada (%)
1	0.0 (sanos)
2	1 – 5
3	5.1- 10
4	10.1- 25
5	25.1- 50
6	Mayor a 50

Con los datos de severidad, se calculó el Índice de Intensidad de Daño de acuerdo al procedimiento de Townsend-Heuberger.

### 3.7. Análisis estadístico

Con los datos de las evaluaciones del grado de daño (incidencia e índice de daño) y rendimiento, se realizó el respectivo análisis de varianza (ANOVA 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo de durazno y para la incidencia de las plagas (araña). Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de durazno. Paracaya, Punata, Cochabamba.

Mes	Temperatura °C			Precipitación mm
	Máxima	Mínima	Ambiente	

Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
<b>Total</b>				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

#### 4.2. Aplicación de productos

En total se realizaron seis aplicaciones en los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Las aplicaciones se realizaron empezando antes de que aparezca la plaga, es decir después de la floración. Las restantes aplicaciones se realizaron de acuerdo a requerimiento, con un intervalo de 15-30 días. Las aplicaciones las realizó el productor en las dosis recomendadas (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Inicio y frecuencia de aplicaciones bajo cinco tratamientos de control de la arañuela del durazno. Paracaya, Punata, Cochabamba.**

	Tratamiento Invierno	Post-floración	15 d	15 d	15 d	15 d	30 d	30 d
<b>T1</b>			ACARITO P (0.6)	ACARITO P (0.6)	ACARITO P (0.6)	ACARITO P (0.6)	ACARITO P (0.6)	ACARITOP (0.6)
<b>T2</b>			ACARITO P (0.5)	ACARITO P (0.5)	ACARITO P (0.5)	ACARITO P (0.5)	ACARITO P (0.5)	ACARITOP (0.5)
<b>T3</b>			ACARITO P (0.4)	ACARITO P (0.4)	ACARITO P (0.4)	ACARITO P (0.4)	ACARITO P (0.4)	ACARITOP (0.4)
<b>T4</b>			Acarin T	Acarin T	Acarin T	Acarin T	Acarin T	Acarin T
<b>T5 (Test)</b>			-	-	-	-	-	-

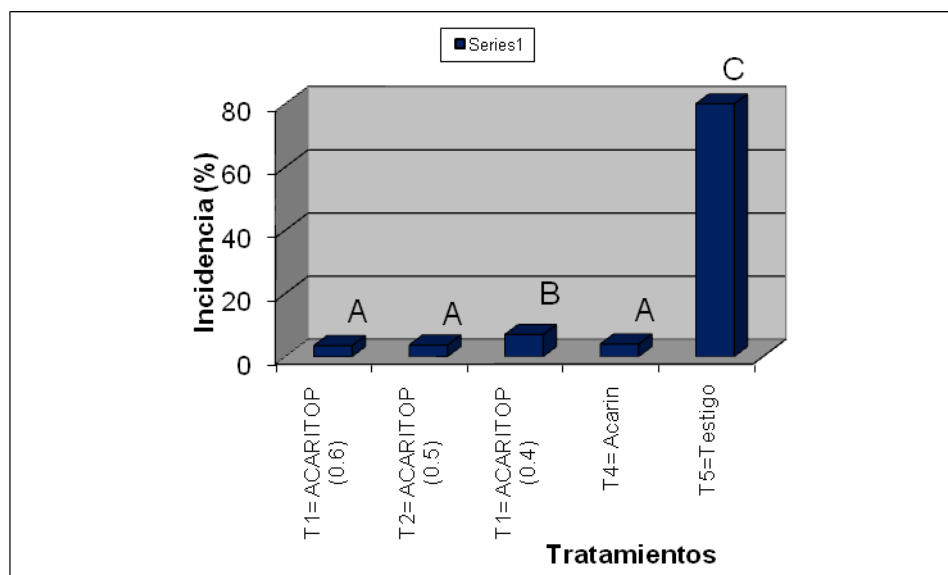
- d= Días después

#### 4.3. Grado de daño

##### - Incidencia e Índice de Daño

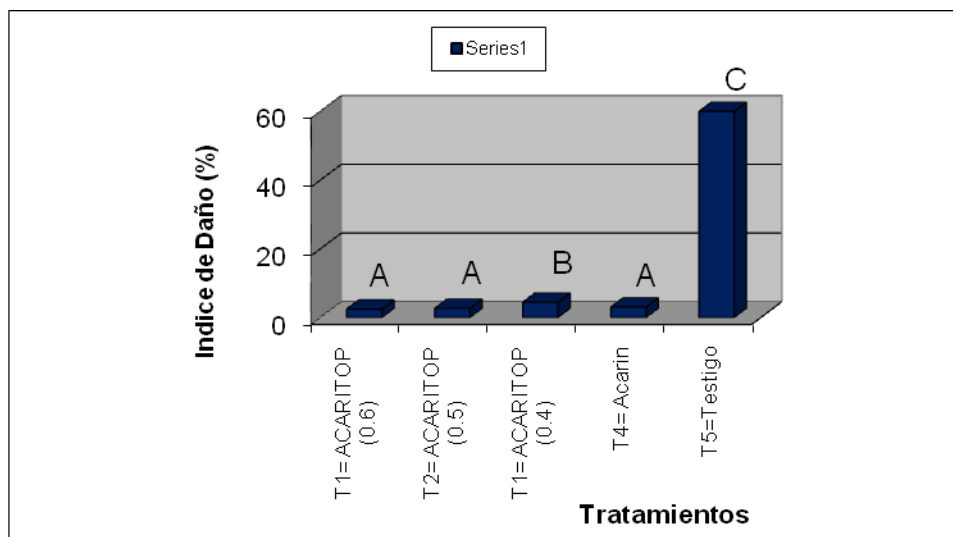
En general, se tuvo un control eficiente de la arañuela del durazno. Los tratamientos T1 y T2 (ACARITOP, a las dosis de 0.6 y 0.5 l/20 l agua) y T4(Acarin T), tuvieron el control más eficiente de la arañuela, seguidos del tratamiento T3 (ACARITOP, 0.4 l/20 l agua). El Testigo (T5), sin

aplicación de acaricida, presentó valores muy altos de grado de daño (80% y 60%, incidencia e índice de daño, respectivamente)(Figuras 1 y 2).



**Figura. 1.** Incidencia bajo cinco tratamientos para el control de la arañuela del durazno. Ensayo ACARITOP. . Paracaya, Punata.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ).

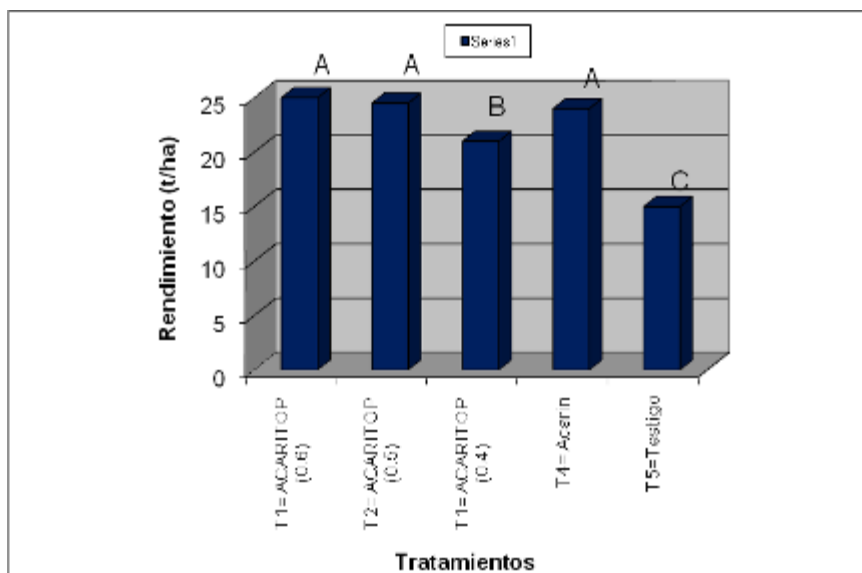


**Figura. 2.** Índice de Daño (ID) bajo cinco tratamientos para el control de la arañuela del durazno. Ensayo ACARITOP. Paracaya, Punata.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ).

#### 4.4. Rendimiento

Se obtuvieron altos rendimientos. Los mayores rendimientos, con diferencias estadísticamente significativas, se obtuvieron con los tratamientos T1 (ACARITOP, 0.6 l/20 l agua), T2 (ACARITOP, 0.5 l/20 l agua) y T4 (Acarin T), seguido de T3 (ACARITOP, 0.4 l/20 l agua). El Testigo (T5), tuvo un rendimiento bajo



**Figura 3.** Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos de control de la araña del durazno. Ensayo ACARITOP. Paracaya, Punata.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 3. Análisis de varianza para Rendimiento bajo cinco tratamientos de control de la araña del durazno. Ensayo ACARITOP. Paracaya, Punata.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	15.60	7.800	4.84	0.0420
Tratamientos	4	207.60	51.900	32.19	0.0001 **
Error	8	12.90	1.612		
No aditividad	1	6.29	6.286	6.65	0.0365
Residual	7	6.61	0.945		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>236.10</b>			

CV = 5.80 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 6. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo del durazno y la incidencia de la araña del durazno.
- ◆ Los tratamientos T1 (ACARITOP, 0.6 l/20 l agua) y T2 (ACARITOP, 0.5 l/20 l agua), tuvieron un control eficiente de la araña y altos rendimientos con respecto a los otros tratamientos y el testigo (T5). El testigo, presentó valores altos de grado de daño (incidencia e índice de daño) y rendimientos bajos.
- ◆ No se observaron síntomas de fitotoxicidad.
- ◆ Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que el eco- acaricida de contacto ACARITOP es eficiente en el control de la araña del durazno. Se recomienda la dosis de 0.5 l/20 l agua.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica Lima - Perú. 643 p.

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1996. Manejo Integrado de Plagas. Turrialba Costa Rica. Fitopatología 40: 24-34.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA-CIP. 1996. Principales enfermedades, nemátodos e insectos de la papa. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa- Cochabamba, Bolivia, PROINPA. 108p.

CONSEJO NACIONAL DE SEMILLAS (CNS). 1990. Semillas Bolivianas Vol I. Cochabamba, Bolivia

CASTRO JORGE. 1993. Curso de Fruticultura General. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 79 p.

DAI- DEVELOPMENT ALTERNATIVES, INC. 1993. Desarrollo del duraznero en los valles Altos de Cochabamba, Bolivia. 70p.

FERNANDEZ\_NORTHCOTE.E.N., NAVIA, O., and GANDARILLAS,A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. Fitopatología 35 (3): 137-149

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (INIA), 1980. El cultivo de la papa Buenos Aires, Argentina.

MACA. 1992 Estadísticas Nacionales. La Paz, Bolivia

PARKER, J.N. 1995 Curso nacional sobre enfermedades, plagas y control integrado en el cultivo de la papa. Cochabamba - Bolivia pp 23-25.

PROINPA. 2009. Eco-acaricida ACARITOP. Catalogo de BIOINSUMOS. Cochabamba, Bolivia.

WOOLFE, J. A. 1987. The Potato in the human Diet. Cambridge University Press. CIP, Lima, Perú. 228 p.

### **EVALUACION DEL HONGO ENTOMOPATOGENO *Metarhizium spp* PARA EL CONTROL DE GORGOJO CONFUSO DE LAS HARINAS (*Tribolium confusum*)**

Responsable: Israel Botello, Mayra Claros y Noel Ortuño

#### **1. INTRODUCCIÓN**

El gorgojo *Tribolium confusum*, se encuentra distribuido en todo el mundo, por su característica de resistencia a bajas temperaturas, el clima del sur no es un impedimento para su proliferación en los molinos de trigo.

Se considera una plaga primaria para los productos de la molienda de cereales, legumbres y oleaginosas. Es muy común encontrarla en molinos de trigo y diversas fábricas que trabajan con cereales molidos. Por lo general, se le encuentra en sacos vacíos con residuos de harina, en pellets y harinilla de afrecho de trigo. Sus hábitos alimenticios son amplios por lo que es frecuente

encontrarlo en fábricas en donde la limpieza no es muy frecuente. Junto con *Ephestia kuehniella* y *Gnathocerus cornutus* constituye la principal plaga de la harina de los molinos de trigo.

Tiene un ciclo completo que demora de 6 a 8 semanas y los adultos viven de 12 a 18 meses donde la hembra ovoposita hasta 450 huevecillos entre la harina o residuos de los granos, los huevecillos están cubiertos con una secreción pegajosa que permite que se adhieran a la superficie y facilita la infestación, de ahí la importancia de su control.

Los huevos incuban entre 5 y 12 días, dando origen a larvas pequeñas, delgadas, cilíndricas que llegan a medir 5 mm de longitud, de color blanco matizado de amarillo. La pupa al principio es blanca, gradualmente cambia a amarillo, después a café y finalmente se transforma en adulto. El adulto tiene un cuerpo de forma aplanada, antenas ensanchadas gradualmente desde la base a los extremos, ojos pequeños, redondos. Protórax densamente cubierto con diminutos puntos negros.

El control de estos insectos se ha basado en el uso de insecticidas, sin embargo, la movilidad de las larvas en el perfil del suelo por cambios de humedad, temperatura y disponibilidad de raíces para alimento disminuyen la efectividad, cuando ya se estableció el cultivo, el control curativo se puede lograr aplicando diversos insecticidas, lo que hace que el costo de producción y mantenimiento de un producto sean más elevados. Además, existe un problema aun mas grande con estos insecticidas y es que los porcentajes de toxicidad y residualidad son muy elevados y han llevado a buscar otras alternativas de control como el uso de antagonistas, entre los cuales se encuentra el hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. [1]

## 2. OBJETIVOS

- CONOCER LAS CARACTERÍSTICAS ESPECIFICAS QUE TIENE EL HONGO *METARHIZIUM* SOBRE EL INSECTO *TRIBOLIUM CONFUSUM*
- DETERMINAR EL TIEMPO DE ACCIÓN QUE TIENE EL *METARHIZIUM* SOBRE EL *TRIBOLIUM CONFUSUM*.

## 3. MATERIALES Y METODOS

**Material de laboratorio.** El material de laboratorio utilizado en el presente estudio es el siguiente:

- VASOS DESECHABLES CON TAPA
- AGUA DESTILADA
- ALCOHOL 70%
- PINZA
- TIJERAS
- PIPETAS DE 1 Y DE 10 ML
- PAPEL TOALLA
- PISETA
- TUBOS DE ENSAYO
- GRADILLA

**Material biológico.** El material biológico utilizado es:

- CEPAS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM* SPP
- GORGOS ADULTOS DE LA ESPECIE *TRIBOLIUM CONFUSUM*

### Metodología.

#### Preparación del medio

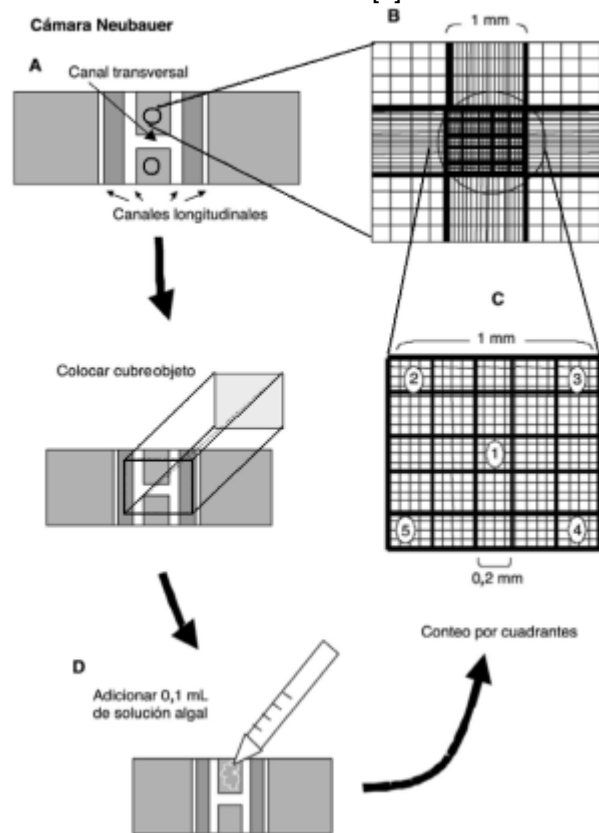
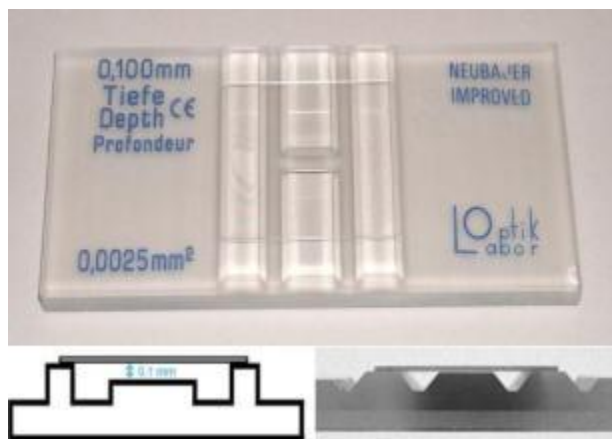
Para la preparación de medios, el método utilizado fue el de la cámara de Neubauer

**Cámara de Neubauer:** Uno de los métodos para determinar la densidad celular empleado en muchos laboratorios es con un Hematocitometro o cámara Neubauer y un microscopio.

Una cámara de conteo celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir, el cual presenta señales que determinan un volumen conocido, por lo que al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen. La cámara Neubauer es un portaobjetos de conteo para su uso en el microscopio óptico, con una depresión en el centro en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante, una retícula micrométrica.

Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos este dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre por el área una de las áreas sombreadas de la retícula y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 litro.

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos de conteo, que requieren de un tiempo considerable, además de resultar muy cansador visualmente hablando. [2]



### Recuento por dilución

Con esta técnica se logra una estimación del número de bacterias en la población, que pueden multiplicarse en un medio líquido. Cualquier medio puede emplearse, siempre que fomente el crecimiento de los microorganismos por estudiar.

El recuento por dilución es más exacto si se inoculan varios tubos de medios de cultivos en porciones de 1 ml de cada dilución. Varias porciones de las diluciones críticas, en estas circunstancias, contienen un microorganismos viable y otras no lo contienen. Se han calculado tablas para saber en un momento dado el número más probable de bacterias en la muestra.



El procedimiento para el recuento es el siguiente:

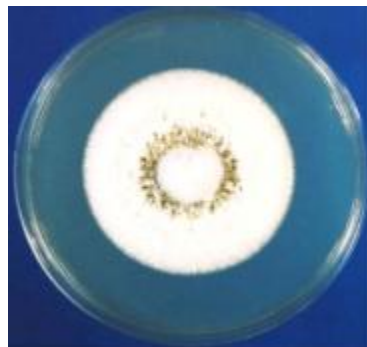
- PREPARAR UNA SUSPENSIÓN DE CONIDIAS EN AGUA DESTILADA
- CON UNA PIPETA PASTEUR LLENAR LA CÁMARA CON LA SUSPENSIÓN DE CONIDIAS Y CUBRIRLA CON EL CUBREOBJETOS.
- OBSERVAR AL MICROSCOPIO UTILIZANDO EL AUMENTO CONVENIENTE DE ACUERDO AL TAMAÑO DE LA ESTRUCTURA (40X ES UN AUMENTO ADECUADO)
- CONTAR LAS CONIDIAS PRESENTES EN LOS CUADRADOS ELEGIDOS (GENERALMENTE SE CUENTAN EN LOS CUADRADOS DE LOS CUATRO ÁNGULOS Y EL CENTRO, O EN FORMA DIAGONAL EMPEZANDO POR EL PRIMERO DE LA PARTE SUPERIOR IZQUIERDA. TAMBIÉN SE DEBEN CONTAR LAS CONIDIAS QUE ESTÁN UBICADAS TOCANDO LA PRIMERA DE LAS TRES LÍNEAS QUE SE ENCUENTRAN CIRCUNDANDO EL CUADRADO, LAS QUE SE ENCUENTRAN EN LA PARTE SUPERIOR Y LA DERECHA DEL CUADRADO. SE CUENTAN EN TOTAL 10 CUADRADOS, CINCO EN CADA CÁMARA [CINCO ARRIBA Y CINCO ABAJO])
- DETERMINAR EL NÚMERO DE CONIDIAS POR ML Y EL NÚMERO TOTAL DE CONIDIAS UTILIZANDO LA SIGUIENTE FÓRMULA:

CONIDIAS / ML = # DE CONIDIAS CONTADAS X 25,000 X FACTOR DE DILUCIÓN

Conidias total = conidias / ml x Vol. de la suspensión original de conidias.



Tubos de ensayo con dilución



Hongo *Metarhizium anisopliae*

#### Trabajo de laboratorio:

Se lavaron 18 vasos de plástico pequeños con detergente y una vez que se secaron los vasos se paso a desinfectar con alcohol al 70 % de pureza

Luego se coloco 5 granos de maíz y papel absorbente el fondo del vaso para que la humedad se mantenga estable en el vaso, y se contaron y aislaron los insectos ***Tribolium Confusum*** (10 para cada vaso)

Se separo cinco cepas el hongo *Metarhizium ssp* donde cada una de estas fue diluida para que nos dé una concentración adecuada para trabajar, excepto en el tubo 5 que se trabajo con una concentración mas diluida debido a que se realizo el conteo por el método de cámara de neubauer donde se determino la cantidad de conidias u hongos por ml de la disolución, se puso a la congeladora todos los tubos de ensayo con las diferentes concentraciones.

Se extrajo de la congeladora los tubos de ensayo con las conidias dejando reposar de 30 a 60 minutos para que estas estén a temperatura ambiente y para que al hacer la inoculación, los gorgojos no se mueran. Se preparo todo el material para el momento de la inoculación.

Antes de la inoculación se deja caer una gota de aceite natural para que las conidias se dispersen y no estén sobrepuestas. Se espera un momento y se procede a la inoculación, durante 30 segundos se tiene que sumergir los gorgojos y luego se extraen a un papel absorbente para que estos no se ahoguen.

Cuando los gorgojos reaccionan estos ya pueden ser depositados en los vasos con los respectivos códigos. Y luego almacenados a una temperatura de 28 °C y una humedad promedio del 45 %.

Cada día se va revisando y controlando la humedad y temperatura que tiene la sala de cría y la cantidad de muertos que hay en los vasos, también se controla que los papeles toalla se encuentren húmedos.

Cuando los gorgojos empiezan a morir, estos se colocan en otros vasos desechables con sus respectivas tapas y con un papel toalla para que el hongo pueda seguir en crecimiento, este proceso se realiza en forma diaria durante 10 días.

El proceso para el análisis de las muestras de gorgojos muertos es como sigue:

Se remojo el gorgojo *Tribolium Confusum* en hipoclorito de sodio al 0.5 % del producto activo durante 5 minutos. Luego se saco el insecto de él hipoclorito de sodio y se enjuago de tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

Se coloco papel toalla en una caja petri esterilizada y se agrego agua destilada estéril, y se coloco el insecto sobre el papel filtro dentro la caja. Se sello la caja petri con parafilm y se incubo por siete días a una temperatura de 20 C.

Todo este procedimiento se llevo a cabo en la cámara de flujo debido a que se requiere de un ambiente estéril.

#### 4. RESULTADOS

Resultados esperados

De acuerdo a lo que se trabajo en el laboratorio con las concentraciones del hongo *Metarhizium* ( $\times 10^9$ ), se esperaba que este hongo infecte y exterminar a todos los insectos (*Tribolium Confusum*) en un tiempo máximo de 10 días.

La acción del hongo no es por vía digestiva, la conidia del hongo debe adherirse al insecto logrando atravesar la cutícula del insecto sólo si dispone del conjunto adecuado de enzimas.

Una vez adherida la conidia al insecto, ésta germina y produce una estructura (apresorio). Cuando el apresorio, gracias a sus enzimas, penetra el tegumento y alcanza el interior del insecto, se extiende, se ramifica y produce toxinas.

Como resultado de esta acción, el insecto modifica su comportamiento, deja de alimentarse, reduce su movimiento y finalmente muere. El insecto muerto es rápidamente colonizado por el hongo, interiormente, y luego el micelio sale por aberturas naturales (espiráculos, boca y ano) y zonas blandas. El micelio, que varía de color según la especie, cubre el insecto, impide el desarrollo de otros hongos y le da una apariencia momificada.

#### Resultados obtenidos

De acuerdo al bioensayo realizado los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Día 2. se tuvo 4 insectos muertos pero al someter los insectos muertos a las cámaras húmedas para el desarrollo de los hongos, no creció nada, por lo tanto estos insectos murieron por causas naturales.

Día 7 Murió un testigo, este insecto como no fue infectado con ningún tipo de hongo no fue tomado en cuenta.

Día 8. Murió otro insecto pero no con las características del hongo infectado.

Día 9.- murieron tres insectos de diferentes cepas y de diferentes pruebas.

#### 5. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados que se esperaba, la experiencia pudo determinar que la cepa de hongos utilizada (*Metarhizium*) no tiene efecto sobre el gorgojo harinero.

#### 6. RECOMENDACIONES

Se determino que el hongo *Metarhizium* no afecta en casi nada a la vida del insecto, por lo tanto se recomienda utilizar otro hongo u otra cepa para determinar su efecto contra el Gorgojo harinero (*Tribolium confusum*)

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados que se esperaba, la experiencia pudo determinar que la cepa de hongos utilizada (*Metarhizium*) no tiene un efecto mortal sobre los insectos (*Tribolium Confusum*) ya que los nueve muertos que se registro hasta el día doce, murieron por causas naturales, concluyéndose que el hongo no tiene ningún efecto sobre el insecto.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] CROP PROTECTION COMPENDIUM, CABI 2006
- [2] <http://aurea-dt.com/documentos/PruebaCS.pdf>
- [3] <http://www.idrc.ca/openebooks/147-7/f0091-01.gif>

# PRODUCTO 5

## Bolivia

### EVALUACION PARTICIPATIVA DE BIOINSUMOS

#### EVALUACION DE BIOINSUMOS EN CAMPOS DE AGRICULTORES

##### Tricobal, biofertilizante su validación en campo.

**Responsable:** Bioinsumos

**Equipo técnico:** Daniel Barja, Meneses Edson, Oscar Navia, Noel Ortuño, Equipo de Lab.,

**Instituciones colaboradoras o socias:** Fautapo

**Compendio:**

**Palabras claves:** Microorganismos, Bioinsumos.

**262. Objetivos:** Desarrollar un bioinsumo para mejorar la fertilidad de suelo en producción de QUINUA en el altiplano.

**263. Hipótesis:**

Los bioinsumos desarrollados se comportan en diferentes pisos ecológicos con buenos resultados,

**264. Revisión de literatura**

La aplicación de productos a base de antagonistas en pulverizaciones al surco en la siembra resulta en reducción del número de propágulos de enfermedades del suelo y la acción de competitividad entre dos microorganismos provén de metabolitos secundarios a favor del desarrollo radicular. (Lobo Jr. Et al., 2005)

**265. Materiales y métodos** Ambos diseños se ajustan para la evaluación con completamente al azar en lab. Y en campo para las parcelas demostrativas como bloques y a veces se podría verificar alguna interacción con latices u ortogonales,com es el caso.

Para componente de Tricobal, se observo la efectividad de *Trichoderma* como promotor de crecimiento, sin embargo, su mayor eficiencia se pudo verificar con la combinación de la bacteria *Bacillus sp.*, con la sinergia de competencia natural que poseen estos dos microorganismos.

La aplicación a la siembra con mezcla de estiércol de oveja, se procedió con la siembra por golpe y con la adaptación de la sembradora Satiri III.

En la que fabricaron un compartimento de manejo con 6 Kg/ha de tricobal, otro par la semilla y otro para el huano descompuesto.

### Localización

Durante dos campañas agrícolas, en forma participativa con los productores, se establecieron las parcelas en la zona de Quillacas, departamento de Oruro, zona caracterizada por presentar condiciones favorables para la producción de quinua organica.

Tratamientos:

Se utilizó semilla del cultivar Blanca Real. Se probaron dos tecnologías de manejo del cultivo: T1= Tecnología con Bioinsumos, y T2= Tecnología tradicional.

La tecnología con Bioinsumos (biofertilizantes sólidos, biofertilizantes líquidos, promotores de crecimiento, biofungicidas, bioinsecticidas) consistió en la incorporación de los productos en base a microorganismos benéficos. En la primera campaña agrícola, se utilizaron los productos FERTITRAP-Q (*Bacillus subtilis*), BIOFERT-Q ((*Bacillus subtilis* + Humus + Harina S) a la siembra, junto con estiércol. En la segunda campaña se utilizó TRICOBAL (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma* spp.) a la siembra, junto con estiércol. Durante el desarrollo del cultivo, se realizaron aplicaciones con los bioinsumos FERTISOL (biofertilizante foliar), ACARITOP (bioinsecticida- fungicida) y BIOBAT (bioinsecticida en base a *Bacillus thuringensis*). La tecnología tradicional consistió en el manejo tradicional que realizan los agricultores de quinua orgánica de las zonas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat		
T1	Tecnología con Bioinsumos	
T2	Tecnología tradicional	

- Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones tanto del desarrollo del cultivo (tamaño, área foliar, etc.) como de rendimiento.

### 266. Resultados

- c) Se definió la concentración y el plus de estos microorganismos como promotores de crecimiento y activadores de la resistencia a enfermedades, en dosis de 2 Kg/ha. (caso de QUINUA por la maquinaria, se utiliza, 6 Kg/ha)

- d) La actividad de sinérgica, positiva para ser un bifertilizante de siembra de Quinoa como producto final comercialmente ofertado.
- e) Durante el ciclo del cultivo, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo.

**f) - Efecto de los tratamientos en el desarrollo y el rendimiento del cultivo de quinua.**

. Tanto en la primera como en la segunda campaña agrícola, los resultados obtenidos muestran que la tecnología con Bioinsumos tuvo un efecto altamente positivo en el desarrollo y la producción del cultivo de quinua. Las parcelas mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mayor tamaño de las plantas, mayor diámetro de tallos, mayor largo de las panojas, mayor sanidad de las plantas, y mayores rendimientos y mayor calidad con respecto al manejo tradicional (Cuadros 1 y 2).

**Cuadro 1.** Efecto de los tratamientos en el desarrollo y el rendimiento de la quinua. Quillacas, 2008-2009.

Tratamientos	Tamaño plantas (cm)	Diámetro de tallos (cm)	Area foliar (%)	Largo panoja (cm)	Sanidad	Rendimiento (qq/ha)
T1= Tecnología con Bioinsumos	125	3	70	40	Buena	<b>20</b>
T2= Tecnología tradicional	80	2	50	25	Regular	<b>11</b>

**Cuadro 2.** Efecto de los tratamientos en el desarrollo y el rendimiento de la quinua. Quillacas, 2009-2010.

Tratamientos	Tamaño plantas (cm)	Diámetro de tallos (cm)	Area foliar (%)	Largo panoja (cm)	Sanidad	Rendimiento (qq/ha)
T1= Tecnología con bioinsumos	150	3.5	80	42	Buena	-
T2= Tecnología tradicional	110	2.5	55	30	Regular	-

Parcelas en desarrollo

Los resultados muestran (**figura 1**) que el uso de bioinsumos en base a microorganismos benéficos como las bacterias y hongos benéficos aplicados con materia orgánica y complementada con fertilizantes foliares orgánicos y bioinsecticidas-fungicidas es una

alternativa importante para un manejo del cultivo de quinua más sustentable, más sensible con el medio ambiente y la salud del productor.



**Figura 1.** Producción de quinua orgánica en el Altiplano sud de Bolivia. A la izquierda con Bioinsumos y derecha como realiza el agricultor.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefasciens*, son microorganismos de vida libre que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de PGPR ha ganado aceptación en la última década y varios de sus posibles mecanismos ha sido propuesto por sus efectos. Estos incluyen efectos tales como la supresión de enfermedades de plantas (Smith et al., 1999), la exclusión de patógenos de la raíz por competencia (Dekkers et al., 1998), favorecer la liberación de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo (Nautiyal et al., 2000, Richardson et al., 2001; Idriss et al., 2002) y la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de plantas, tales como el ácido indol-3-acético (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

#### **267. Discusión**

La utilización de otros microorganismos deben ser estudiados para fines similares a biofertilizantes para el cultivo de la quinua.

La formulación y forma de aplicación son factores importantes para el desarrollo de Bioinsumos en las diferentes condiciones de aplicación, formas y tipos de formulaciones.

#### **268. Conclusiones**

Tricobal, actualmente se comercializa este producto en base a este trabajo y otras pruebas que se venían desarrollando con el caso de compatibilidad de microorganismos, el cual queda reforzado unavez mas la actividad microbiana en suelos de baja fertilidad.

#### **269. Recomendaciones**

El tratamiento de la fertilidad es muy complicado, la alternativa de la revitalización de suelos pobres en MO no será solucionado por la aplicación de Tricobal, debe ser considerada junto a otras practicas de enmiendas o incorporación poco a poco de huanos y otras fuentes de compostaje por ejemplo.

La vitalidad del suelo par una dinámica y revivir su actividad natural y local de suelos altioplánicos, debe promoverse con fuentes naturales, locales en muchos casos

#### **270. Bibliografía consultada**

4. Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffe, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Improving plant productivity with Rhizosphere Bacteria, Ryder, M.H. et al. (eds.), CSIRO division of soils, Glen Osmond.
5. Bochow, H., El-Sayed, S.F., Junge, H., Stavropoulou, A. and Schmiedeknecht, G. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as bio control agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108:21-30.
6. Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K, Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R 2002: Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth promoting effect. *Microbiology* 148:2097-2109.
7. Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B, Junge, H., Schmiedeknecht, G. and Hain, R. 2000. FZB24@*Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-nachrichten Bayer* 1/00, 1.
8. Franco, J; N. Ortuño y J. Herbas. 2004. Potencial de rehabilitación de tierras degradadas por el desarrollo y uso de un biofertilizante en beneficio de los agricultores pobres de Bolivia. *Revista de Agroecología LEISA*. Volumen 19. Perú.
9. Jimenez Diaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. *Fitopatología* 38 (2): 62- 73.
10. Navia, O. y Fernandez-Northcote, E. N. 1999. Manejo integrado del tizón. En: memorias del Taller sobre Manejo Integrado del Tizón Tardío de la Papa en la Eco región Andina. Quito, Ecuador. Abril 7-9, 1997. p. 1-12.
11. Ortuño, N.; O., Navia; V. Angulo; D. Barja y G. Plata. 2009. Desarrollo de biofertilizantes en base a microorganismos nativos para una producción soberana en Bolivia. Memoria V Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Oruro, Bolivia. p. irr.
12. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4786-4790.

### **Resistencia sistémica inducida y estrategias de manejo integrado del tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*) para una agricultura sostenible**

**Responsable: Oscar Navia M., Antonio Gandarillas , Noel Ortuño.**

#### **INTRODUCCION**

El tizón causado por el seudohongo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es una de las enfermedades más importantes de la papa en el mundo y también en Bolivia en zonas húmedas. En estas zonas, donde las condiciones climáticas son normalmente favorables para la enfermedad, las pérdidas pueden llegar hasta un 100 % debido al desconocimiento por parte de los agricultores de estrategias adecuadas de control. A menudo los campos son abandonados por la impotencia de los agricultores para el control de la enfermedad.

Por otra parte, las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia a enfermedades tanto constitutivos como inducibles para una defensa efectiva contra la infección de patógenos. Las plantas como reacción a la presencia y actividades del patógeno, producen estructuras y sustancias químicas que pueden ser tanto locales o sistémicas, propias o inducidas (Kessmann et al., 1996). Además de la reacción localizada las plantas también responden con un sistema de defensa llamado “**Resistencia Sistémica Inducida**” la cual es activada en toda la planta. Este fenómeno, se refiere al incremento en la resistencia de una planta hacia los patógenos, después de que la planta ha estado expuesta a, o tratada con, organismos o químicos que pueden provocar ésta respuesta (Sutton, 2005). Es una nueva e innovativa forma de protección de las plantas adicionalmente a la de los fungicidas, no es solo un nuevo fenómeno sino una nueva tecnología.

## OBJETIVOS

Determinar la eficiencia de la integración de Resistencia Sistémica Inducida por *Bacillus subtilis* con estrategias de manejo integrado del tizón.

## 3 . MATERIALES Y METODOS

Se establecieron dos ensayos en la zona de Colomi (3200 msnm) del Departamento de Cochabamba, con los cultivares Waycha (susceptible) y Robusta (resistente). El diseño utilizado fue el de bloques completos al azar con seis tratamientos. La estrategia de control químico estuvo basada en la aplicación preventiva de fungicidas a los diez días después del 80% de emergencia, antes de que aparezca el tizón; la alternancia de un fungicida sistémico y de contacto, frecuencias de aplicación de 7-14 días según las condiciones climáticas muy favorables a poco favorables respectivamente, y la no utilización de fungicidas sistémicos en más de tres oportunidades. En ambos ensayos, los tratamientos fueron: T1= *Bacillus subtilis* (al surco) + Estrategia con fungicidas (Acrobat- Polyram), T2= Estrategia con fungicidas (Acrobat- Polyram), T3= *Bacillus subtilis* (al surco) + Estrategia con fungicidas (Cabrio Top- Polyram), T4= Estrategia con fungicidas (Cabrio Top- Polyram), T5= Estrategia con fungicidas ( Ridomil-Dithane), T6= Testigo. La bacteria se aplicó a la siembra por aspersion a surco abierto, sobre el estiércol.

## 4. RESULTADOS

Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo y el desarrollo del tizón tardío, lo cual permitió una buena evaluación de las estrategias.

En ambos ensayos, las estrategias de control del tizón mostraron un control eficiente de la enfermedad. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 y T3 (*Bacillus subtilis* + Estrategia con fungicidas), mostrando significativamente una mayor emergencia, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor, mayor sanidad de las plantas y de los tubérculos cosechados, mayores rendimientos y beneficios económicos con respecto a los otros tratamientos T2, T4, T5 (Estrategias con fungicidas) y al testigo. El testigo (T6), presentó menor desarrollo y valores muy altos de grado de daño y rendimientos bajos.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La estrategia de control del tizón, el empleo de la bacteria, y los fungicidas, permiten controlar la enfermedad e incrementar los rendimientos por un mejor manejo del cultivo y del suelo, reducir el número de aplicaciones, reducir el costo de producción, y reducir los riesgos de daño a la salud del productor y del medio ambiente. Las estrategias del tizón y los resultados obtenidos con las tecnologías consideradas están fundamentadas en bases técnicas científicas y es una tecnología para una agricultura sostenible.

La incorporación de la bacteria *Bacillus subtilis*, es una tecnología muy novedosa para el manejo del cultivo y el suelo, ya que los agentes de control biológico (como *Bacillus subtilis*) pueden ser empleados para incrementar la resistencia de una planta hacia los patógenos, fenómeno denominado "Resistencia Sistémica Inducida" Asimismo, *Bacillus subtilis* se caracteriza por ser un promotor de crecimiento de plantas (PGPR), tiene alta competencia en la rizósfera; coloniza el rizoplano; es persistente en el suelo, suprime algunos patógenos principales incluyendo: *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*; y además tiene antibiosis directa (ej. Iturin, amplio espectro), y son activos en una gran variedad de condiciones (8-40°C, pH 5-9, óptima 7) (Sutton, 2005; , Dion, 2009).



## REVISION DE LITERATURA

1. FERNANDEZ\_NORTHCOTE.E.N., NAVIA, O., and GANDARILLAS,A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35 (3): 137-149.
2. FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N.; NAVIA, O. GANDARILLAS, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11: 1-25.
3. GREGORY,P. 1996. Combatiendo al tizón tardío. Circular CIP 22: 1-4.
4. JIMENEZ DIAZ, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. *Fitopatología* 38 (2): 62- 73.
5. NAVIA,O.; A. TRUJILLO, A. GANDARILLAS, E.N. FERNANDEZ-NORTHCOTE, and J. GABRIEL. 1999. Strategies of chemical control of late blight (*Phytophthora infestans*) for resistant and susceptible cultivars in Bolivia. En: Late Blight: A threat to global food security. Quito,Ecuador. March 16-19, 1999. p. 15-16 .(Abstract).
6. SCHWIN, FJ.; and P. MARGOT. 1991. Control with chemicals. En: the cause of late blight of potato. *Advances in Plant Pathology*. D.S. Ingram and P.H. Williams (eds), Academic Press, London. p. 225-265.
7. SUTTON, J. 2005. Control biológico de enfermedades en invernaderos. En: Curso de control biológico de enfermedades en invernaderos, Department of environmental biology, University of Guelp, Canada.
8. THIELE, G.; O. NAVIA, y E.N. FERNANDEZ-NORTHCOTE. 1998. Análisis económico de la estrategia de control químico del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) para cultivares de papa susceptibles en Cochabamba, Bolivia. *Fitopatología* 33 (3):176-181.

### **Efecto de biocontroladores sobre la expresión de la enfermedad *Helminthosporium solani* que afecta la calidad de la papa nativa en Bolivia**

**Responsable:** Mamani, P.; Limachi J.; Chavez, E.; Almanza, J.; Ortuño, N.

**Instituciones colaboradoras o socias:** Proyectos Consorcio Andino (Fondos de Holanda), Papa Andina (Fondos de COSUDE)

## **Introducción**

En los últimos tiempos se ha incrementado la incidencia de la enfermedad *Helminthosporium solani* (Mancha plateada), que afecta en la calidad de la papa con fines de acceso a mercados más exigentes. Si bien el cultivo de papa puede mantener su productividad en presencia de esta enfermedad, su calidad baja considerablemente porque la piel de los tubérculos muestra manchas con un brillo plateado que se tornan opacos con el transcurrir del tiempo, especialmente en las variedades de piel oscura. Anteriormente no se valoraba esta enfermedad porque los mercados masivos aprecian la cantidad antes que la calidad del producto. Actualmente esta valoración a cambiando y los nuevos mercados exigen una mejor presentación. Los fungicidas aplicados al cultivo no han dado muy buenos resultados, es por esto que se hace necesario evaluar productos de origen biológico.

## **Objetivos**

Determinar el efecto de los microorganismos *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* en el control de la enfermedad *Helminthosporium solani* (Mancha Plateada) que afecta la calidad de la papa nativa.

### Materiales y métodos

El trabajo se realizó en la campaña 2008-09 en la comunidad de Sora Sora del municipio de Colomi, Cochabamba, Bolivia. Se utilizó la variedad de papa nativa Pinta Boca. El diseño usado fue BCA con cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron: T1 = Testigo Tradicional (sin aplicación de ningún microorganismo); T2 = *Bacillus amyloliquefaciens* (40 kg/ha); T3 = *Bacillus amyloliquefaciens* (100 kg/ha); T4 = *Bacillus amyloliquefaciens* (160 kg/ha); T5 = *Bacillus subtilis* (40 kg/ha); T6 = *Bacillus subtilis* (100 kg/ha); T7 = *Bacillus subtilis* (160 kg/ha); T8 = *Trichoderma* (40 kg/ha); T9 = *Trichoderma* (100 kg/ha) y T10 = *Trichoderma* (160 kg/ha). Las formulaciones por producto fueron: *Bacillus amyloliquefaciens*:  $2,5 \times 10^7$  Esporas/cc; *Bacillus subtilis*:  $5 \times 10^9$  esporas/cc y *Trichoderma*:  $4 \times 10^{10}$  conidios/gr. La aplicación de estos biocontroladores se realizó al suelo y al momento de la siembra. Las variables de evaluación fueron: Altura de planta, cobertura foliar, número de tallos, rendimiento e incidencia y severidad de la enfermedad.

### Resultados discusión

Los tres biocontroladores lograron reducir la incidencia y severidad de la enfermedad *Helminthosporium solani*, pero destaca el efecto de *Trichoderma* en la dosis de 100 Kg/ha, porque logra reducir en mayor proporción la enfermedad respecto al testigo. Este efecto puede deberse a su propiedad fungistática o a que actúa como inductor para la secreción de fitoalexinas por las raíces como mecanismo de defensa contra la invasión de hongos patógenos (Cuadro 1).

La Figura 1 muestra que existe diferencias estadísticas en los efectos de las bacterias *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y del hongo *Trichoderma*, en el rendimiento de papa. *Trichoderma* tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de papa y no así *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. De acuerdo a la Figura 2, se puede indicar que no existen diferencias estadísticas por efecto de las dosis de estos biocontroladores, pero si existen diferencias estadísticas entre los biocontroladores dentro de cada dosis de aplicación, es decir que estadísticamente dentro de las dosis 100 y 160 kg/ha, el efecto de *Trichoderma* es superior al de *B. amyloliquefaciens* y de *B. subtilis*. No se pudo demostrar estadísticamente el efecto de los biocontroladores en las variables altura de planta, número de tallos y cobertura foliar. El efecto en el rendimiento por *Thichoderma* probablemente tenga que ver con su efecto a nivel radicular antes que foliar.

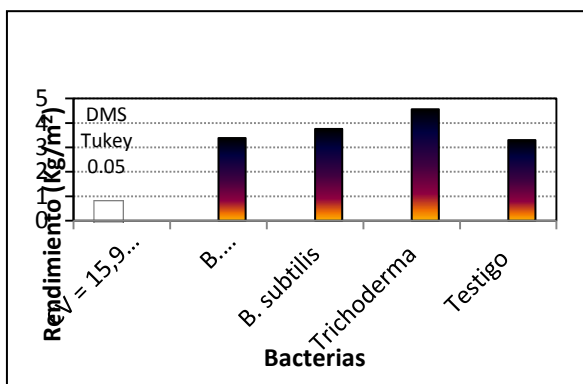


Figura. 1. Efecto de biocontroladores en el Rend de papa nativa

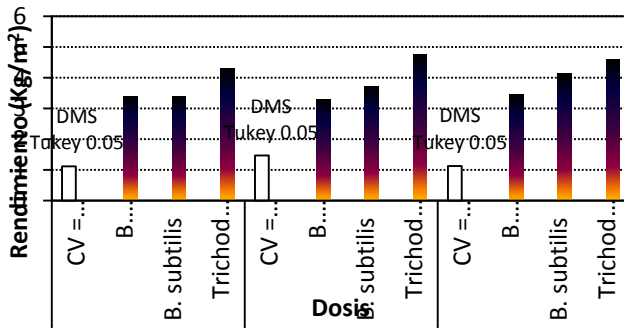


Figura. 2. Efecto de las dosis de biocontroladores en el Rend de papa.

Cuadro 1. Efecto de los biocontroladores en la incidencia y severidad de *Helminthosporium solani*

TRATAMIENTOS	INCIDENCIA %	SEVERIDAD %
T1 = Testigo Tradicional	86	71
T2 = <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (40 kg/ha);	71	61
T3 = <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100 kg/ha)	73	62
T4 = <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (160 kg/ha)	72	63
T5 = <i>Bacillus subtilis</i> (40 kg/ha)	83	67
T6 = <i>Bacillus subtilis</i> (100 kg/ha)	77	62
T7 = <i>Bacillus subtilis</i> (160 kg/ha)	76	64
T8 = <i>Trichoderma</i> (40 kg/ha)	75	62
T9 = <i>Trichoderma</i> (100 kg/ha)	56	57
T10 = <i>Trichoderma</i> (160 kg/ha)	60	58

### Conclusiones

El hongo *Trichoderma* en la dosis de 100 kg/ha además de reducir la incidencia y severidad de la enfermedad *Helminthosporium solani* en 30% y 14% respectivamente, permite el incremento del rendimiento de la papa nativa, aspecto que se muestra como una alternativa biológica interesante para mejorar la calidad y productividad de la papa nativa para mercados más exigentes en calidad.

### Referencias bibliográficas

- Arcia, A. M. 1995. Uso de Antagonistas en el Control de Fitopatógenos del Suelo In Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en Cultivos. Barquisimeto, Venezuela. 20 p.
- Madigan M; Martinko J. 2005. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall.

Nuevas tecnologías generadas para el manejo integral y ecológico de plagas y enfermedades que afectan a la calidad y productividad de la papa nativa

Responsable: P. Mamani

Equipo técnico: J. Almanza, E. Chávez

**Instituciones colaboradoras o socias:** Proyectos Consorcio Andino (Fondos de Holanda), Papa Andina (Fondos de COSUDE)

**Compendio:**

Con el propósito de mejorar la calidad de la papa nativa a través del manejo integral y ecológico de plagas y enfermedades y así poder contar con un producto más competitivo para acceder a mercados más exigentes, está en proceso de desarrollo diferentes tecnologías de uso práctico para los productores de Colomi. La evaluación del bioinsumo comercial FERTITRAP permitió ver que este producto no logra reducir la incidencia y severidad de la enfermedad *Rhizoctonia* en ninguna de las dosis aplicadas, contrariamente a los resultados encontrados la campaña pasada. Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra, tampoco logro controlar esta enfermedad. Por otra parte Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra, no tuvo efecto en la reducción de la enfermedad *Helminthosporium solani* (Mancha Plateada) en las variedades Yana Qoyllu y Pinta Boca. El efecto de Maxim sobre el rendimiento de estas variedades nativas fue negativo, debido posiblemente a que quemo los brotes de la semilla ya que la emergencia del cultivo fue afectada drásticamente por el producto. Los problemas en los ensayos de *Trichoderma* como posible biocontrolador de estas enfermedades tuvieron problemas, es por esto que se sugiere continuar con los estudios de este biocontrolador.

**Palabras claves:** Manejo integral de plagas, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium solani*, Mancha Plateada, control químico

**271. Objetivo**

Mejorar la calidad de la papa nativa a través del manejo integral y ecológico de plagas y enfermedades

**272. Hipótesis**

Con el uso de tecnología química y ecológica es posible controlar a las enfermedades que afectan a la calidad y productividad de la papa nativa

**273. Revisión de literatura**

*Helminthosporium solani*

*Helminthosporium solani*, conocida como Mancha Plateada, es una enfermedad que se presenta como pequeños puntos circulares definidos de color castaño claro y márgenes indefinidos que se agrandan hasta cubrir áreas considerables del tubérculo. Las áreas afectadas presentan un brillo plateado característico, fácilmente observables cuando la superficie de los tubérculos esta húmeda. Con la edad el color de estas partes afectadas tiende a oscurecerse.

*Helminthosporium solani* Dur. And Mont. Tiene el micelio hialino septado, ramificado, que toma una coloración castaño con la edad. Los conidióforos son septados sin ramificaciones, sobre los cuales se forman las conidias en disposición verticilada a partir del extremo distal de las células. Las conidias tienen hasta 8 septos, miden 7 a 8 x 16 a 64 micras, son de color castaño oscuro, redondeado en la base y agudo en el vértice. La transmisión del hongo es mayormente por medio de la semilla infectada; en menor proporción puede transmitirse por el suelo. La infección se realiza antes de la cosecha a través de las lenticelas y del peridermo. El micelio se desarrolla solamente en la capa que conforma el peridermo, invadiendo inter e intracelularmente.

Para el desarrollo de la enfermedad se requiere de la presencia de alta humedad. Cuando mayor es la permanencia de los tubérculos maduros en el suelo mayores son las probabilidades de infección y severidad de la enfermedad. Las condiciones mínimas para la infección son 3°C y 90% de humedad relativa. El incremento de la enfermedad continúa en almacenaje, produciéndose además la infección de tubérculos sanos. Diversos fungicidas han sido probados para el control de

*Helminthosporium solani*. En plántulas provenientes de semilla botánica en almácigos para la producción de tubérculos- semillas como el Maxim.

### *Rhizoctonia solani*

El hongo *R. Solani* ataca a unas 200 especies de plantas comprendidas en aproximadamente 66 familias, vive como parásito o saprofito en las plantas, ocasionando pérdidas económicas en la mayoría de las plantas anuales, incluyendo a las malas hierbas, casi a todas las hortalizas y plantas florales, varios cultivos mayores y también a las plantas perennes tales como los pastos, plantas ornamentales perennes, arbustos y árboles (Montaldo, 1984).

En la papa, la enfermedad afecta brotes, raíces, estolones, tallos y tubérculos, que son órganos que están en contacto con el suelo. En los cuatro primeros produce lesiones o chancros hundidos, los cuales van estrangulando dichos órganos (Mont Koc y Fernández-Northcote, 1978). Los daños más severos a la planta se producen poco después de la siembra, especialmente en suelos fríos y muy húmedos. El hongo mata los brotes subterráneos, retardando o anulando su emergencia. Los brotes que llegan a emerger también se infectan, formándose chancros en los tallos en desarrollo (Frank, 1980).

El patógeno se mantiene en el suelo y sobre los tubérculos de una campaña a otra en su forma de esclerote o micelio en restos vegetales en el suelo. En la primavera, el hongo invade los tallos de papa o los brotes emergentes. La formación de esclerotes sobre los tubérculos nuevos se realiza en cualquier momento, dependiendo de las condiciones ambientales, sin embargo el desarrollo máximo ocurre después de que ha muerto la planta, cuando los tubérculos permanecen enterrados. El hongo no puede soportar las altas temperaturas del terreno en los veranos secos y cálidos (Walker, 1973; Frank, 1980).

La infección de las plantas jóvenes es mas severa cuando el crecimiento de la planta es lento, debido a las condiciones ambientales adversas para su desarrollo. Las plantas de crecimiento rápido tienen la posibilidad de escapar a la infección por *Rhizoctonia solani*, aun cuando la humedad y la temperatura sean favorables para el desarrollo del hongo (Agrios, 1988).

El empleo de vapor de agua es recomendable para desinfectar el suelo o sustrato (en invernaderos y almácigos). Además cuando aparecen razas específicas del patógeno, puede ser conveniente una rotación de cultivos cada tres años con otro cultivo (Agrios, 1988). Diversos fungicidas han sido probados para el control de *R. Solani*.

### *Trichoderma*

Los hongos de género *Trichoderma* producen diversas enzimas hidrolíticas y moléculas con actividad antibiótica que les permiten controlar biológicamente la actividad de los parásitos de los cultivos. Estos hongos están presentes en casi todos los suelos agrícolas. El interés actual en este género proviene esencialmente de sus propiedades enzimáticas y antibióticas; las facultades de antagonismo de *Trichoderma* han sido descritas desde el siglo pasado por Vuillemin en 1887 (Rifai, 1969) y actualmente este hongo es, entre los microorganismos utilizados en el control biológico, uno de los casos raros de resultados consistentes en el combate de hongos patógenos. Las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el biocontrol, son las especies *T. harzianum* y *T. viride*, de las cuales la primera es la que ha sido más estudiada.

*Trichoderma harzianum* es un fungicida con un amplio espectro de acción. Es eficaz contra diversos organismos; tanto en el suelo contra pudriciones de raíces como *Armillaria*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium*, *Phitophtora*, *Fusarium*, enfermedades que se presentan en numerosas especies tanto anuales como perennes; o bien, contra enfermedades de órganos aéreos como *Botritis* o *Stereum*. Se han estudiado cuatro modos de acción de esta especie de hongo: la competencia por nutrimentos, la antibiosis, el micoparasitismo y la estimulación de defensas de la planta (Dubos, 1992).

Algunos hongos tienen un comportamiento saprofítico. Al colonizar desechos vegetales producen una infección primaria y gracias a los elementos nutritivos de esos desechos, el patógeno logra contaminar los órganos sanos. *Trichoderma harzianum* compete y coloniza más rápidamente los desechos vegetales y retarda la instalación de otros hongos.

Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático debilitando al agente patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos solubles. *Trichoderma harzianum* produce numerosos antibióticos como son: la trichodermina, la suzukacilina, la alameticina, la dermadina, la penicilina, los trichotecenos, las trichorzianinas, entre otros (Olivier y Germain, 1993).

El *Trichoderma harzianum* manifiesta propiedades parasitarias contra diversos hongos, produciendo alteraciones en las hifas del parásito. Inicialmente *Trichoderma* realiza un reconocimiento y adherencia sobre la pared del patógeno (Chet y Elad, 1993). En segundo término, *Trichoderma* promueve la hidrólisis de las hifas y esclerocios del patógeno por medio de las enzimas producidas (xilinasas, quitinasas, pectinasas, glucanasas y glucosidasas, entre otras). *Trichoderma harzianum* induce a la planta, por medio de sustancias secretadas por el microorganismo a producir fitoalexinas, a las cuales son sensibles algunos hongos patógenos.

Las fitoalexinas son producidas en forma natural por la planta como respuesta a heridas. La cumarina actúa como una defensa de la planta contra animales; otros productos sólo son formados cuando se produce la invasión de las raíces u otros órganos por hongos como el orquinol, la trifolirizina o la isocumarina, las que hipotéticamente actúan en forma comparable a los anticuerpos en los animales (Salisbury y Ross, 1998). En el caso de *Trichoderma harzianum*, éste induce altos niveles de fitoalexinas de tal forma que el nivel tóxico alcanzado evita que otros hongos patógenos se puedan establecer.

Se ha observado que en experimentos utilizando plantas de bajo vigor provenientes de semillas sometidas a estrés oxidativo, al ser sometidas a tratamiento con *Trichoderma*, recuperaron su vigor al ser colonizadas por el hongo, revertiendo los daños por oxidación de los componentes de las membranas celulares de la raíz (Björkman et al., 1998).

En diferentes trabajos reportados en la literatura, *Trichoderma* ha demostrado tener la habilidad de controlar diferentes enfermedades de plantas provocadas por hongos; sin embargo, para conseguir resultados consistentes, se deben de cumplir al menos tres requisitos:

- 1) Se debe contar con una cepa de *Trichoderma* activa y con agresividad suficiente contra los organismos que se desea controlar; así como presentar una persistencia suficiente en el medio en que deba operar.
- 2) El método de aplicación debe ser el adecuado para cada caso de plantas y de patógeno a controlar, cuando el patógeno se encuentra en la raíz, la aplicación en la superficie puede ser lenta en presentar resultados a diferencia de una aplicación directa a la zona afectada. En el caso de las enfermedades de la parte aérea de la planta, el tratamiento debe de hacerse en forma preventiva de preferencia, ya que para que el hongo exprese su poder de control se requiere un mínimo de tiempo para que las esporas germinen e inicien su crecimiento.
- 3) Es deseable que en los suelos en que se utilice *Trichoderma* exista una cantidad mínima de materia orgánica. En suelos desprovistos de ella el establecimiento de *Trichoderma* es más lento y de menor eficiencia.

Resulta pertinente mencionar que no existen restricciones para el uso de *Trichoderma* debido a que no hay evidencias de efectos de tipo tóxico en plantas, animales y humanos, por lo tanto su uso está exento de restricciones de residualidad (EPA, 1990).

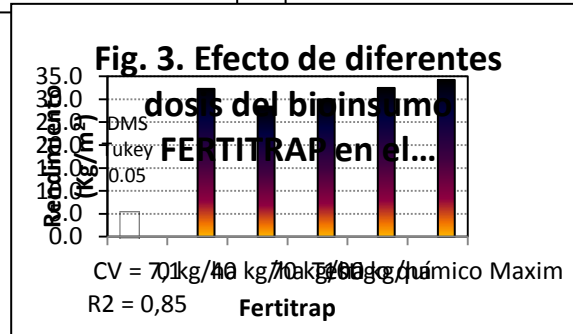
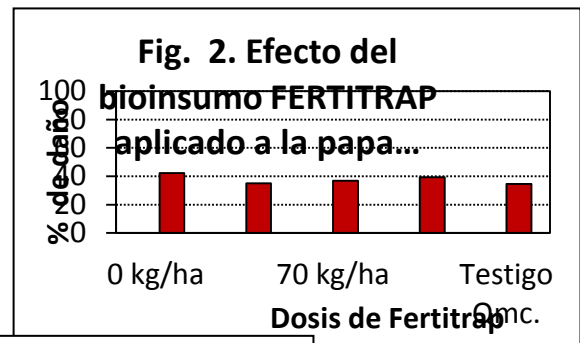
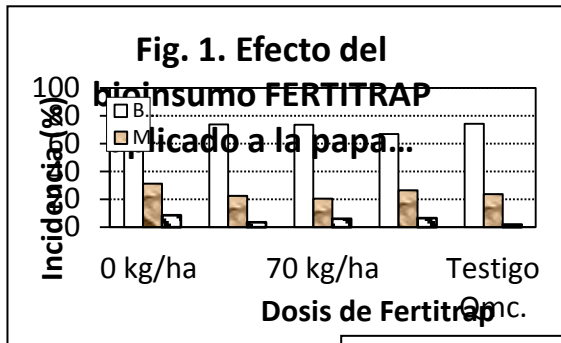
## **274. Materiales y métodos**

Cuadro 1. Descripción de los ensayos implantados en Colomi. 2008 – 2009.

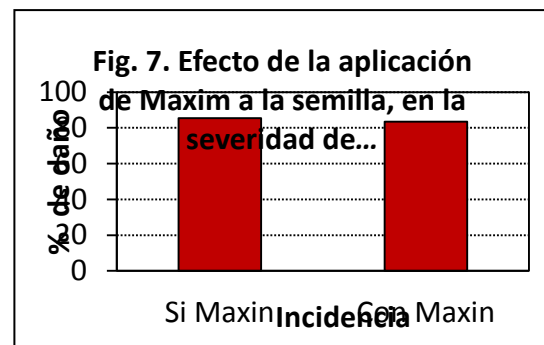
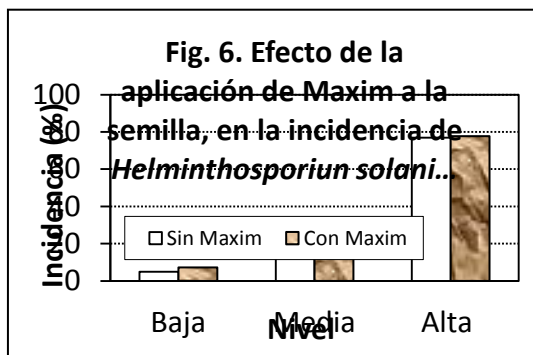
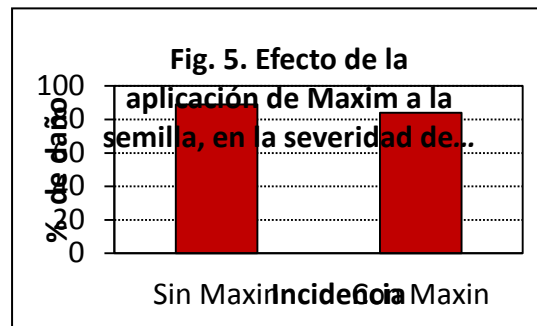
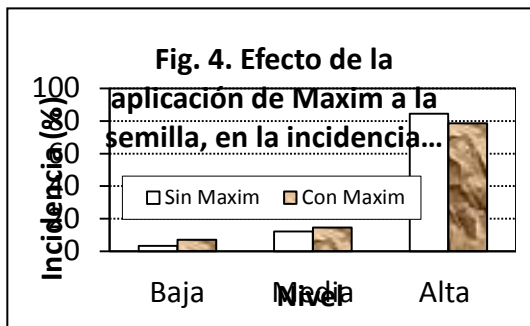
Nº ensayo	Tema	Descripción
1	Control biológico de <i>Rhizoctonia</i> para mejorar la calidad de papa con fines de mercado	<p>Comunidad: Tonkoli  Agricultor: Jorge  Fecha de siembra: 29/10/08  Variedad: Waych'a  Diseño experimental: BCA con 4 repeticiones  Tratamientos: Todos los tratamientos tuvieron como base gallinaza (10 t/ha)</p> <p>T1 = Testigo tradicional  T2 = Dosis 1 de Fertitrap sólido (40 Kg/ha) aplicado al suelo en la siembra  T3 = Dosis 2 de Fertitrap sólido (70 Kg/ha) aplicado al suelo en la siembra  T4 = Dosis 3 de Fertitrap sólido (100 Kg/ha) aplicado al suelo en la siembra  T5 = Testigo químico: Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra</p>
2	Control químico de <i>Helminthosporium solani</i> (mancha plateada) para mejorar la calidad de papa con fines de mercado	<p>Comunidad: Chomoco, Rincón Waychani  Fecha de siembra: 30/10/08  Material vegetal: Semilla de papa infestada de las variedades Yana Q'oyllu y Pinta Boca  Diseño experimental: Parcelas Divididas en BCA con cuatro repeticiones.  Todos los tratamientos tuvieron como base de fertilización a la gallinaza (10 t/ha), similar al usado tradicionalmente.</p> <p>Variedad a nivel parcela: v1 = Yana Q'oyllu; v2 = Pinta Boca  Maxim a nivel sub parcela: m1 = Sin Maxim; m2 = Con Maxim (100 cc/100 kg de semilla). La combinación de los niveles de estos factores da lugar a los siguientes tratamientos:</p> <p>T1 = v1 x m1 = Yana Q'oyllu x Sin Maxim  T2 = v1 x m2 = Yana Q'oyllu x Con Maxim (100 cc/100 kg de semilla)  T3 = v2 x m1 = Pinta Boca x Sin Maxim  T4 = v2 x m2 = Pinta Boca x Con Maxim (100 cc/100 kg de semilla)</p> <p>La aplicación de Maxim se realizó por aspersión a la semilla antes de su siembra, usando para este efecto una mochila. La aplicación se realizó sobre un plástico y homogenizando para pintar bien la semilla a través del movimiento con el plástico.</p>
3	Efecto del hongo <i>Trichoderma</i> en el control de la enfermedad <i>Helminthosporium solani</i> (mancha plateada) que afecta la calidad de papa con fines de mercado	<p>Comunidad: Primera Candelaria  Agricultor: Elena Rodríguez  Fecha de siembra: 29/10/08  Material vegetal: Se usó semilla enferma con Mancha plateada de la variedad: Yana Qoyllu  Diseño experimental: BCA con 4 repeticiones  Todos los tratamientos tuvieron como base de fertilización a la gallinaza (10 t/ha), similar al del testigo tradicional.</p> <p>T1 = Testigo tradicional: Sin aplicación de <i>Trichoderma</i>  T2 = 40 kg/ha de <i>Trichoderma</i>  T3 = 100 kg/ha de <i>Trichoderma</i>  T4 = 160 kg/ha de <i>Trichoderma</i>  T5 = Testigo químico: Semilla tratada con Maxim y sin <i>Trichoderma</i></p> <p>La aplicación del hongo <i>Trichoderma</i> se realizó al momento de la siembra, sobre la gallinaza, en forma solida para inmediatamente humedecerlo con aspersión de agua y posterior tapado del surco.</p>

## 275. Resultados

### 5.1. Control de Rhizoctonia (Ensayo 1 descrito en el Cuadro 1)



5.2. Control de *Helminthosporium solani* (Ensayo 2 descrito en el Cuadro 1)



Cuadro 2. ANVA del ensayo de aplicación de Maxim en variedades nativas.

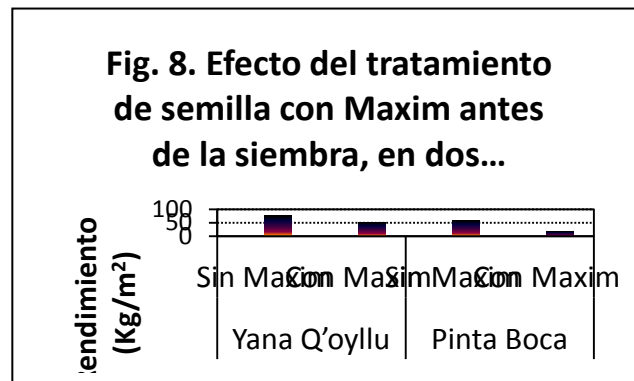
FV	GI	CM	Significancia
Repetición	3	8.50973958	*



Variedad	1	27.43140625	**
Rep x Var	3	7.66390625	*
Tratamiento	1	22.9201562	**
Var x Trat	1	14.34515625	*
Error Exp	6	1.71973958	
TOTAL	15		

\* = Significativo al 5% de probabilidad estadística

\*\* = Altamente significativo al 1% de probabilidad estadística



## 276. Discusión

### 6.1. Control de Rhizoctonia

De acuerdo a las Figuras 1 y 2, donde se observa que en general la incidencia de Rhizoctonia fue baja y la severidad alcanzó un promedio de 40 %, se puede indicar que el bioinsumo comercial FERTITRAP no logro reducir la incidencia y tampoco la severidad de esta enfermedad en ninguna de las dosis aplicadas. También se observa que el testigo químico Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra, tampoco logro controlar esta enfermedad. Experiencias pasadas muestran que para un mejor efecto de Maxim sobre la enfermedad es necesaria su aplicación en diferentes momentos durante el cultivo (semilla, siembra y aporque). En la Figura 3 donde se muestra el efecto de este bioinsumo en el rendimiento, muestra que FERTITRAP tampoco afecto la productividad del cultivo, lo que contradice a los resultados encontrados el pasado año donde se observo que las dosis entre 50 a 100 kg/ha permiten mejorar el rendimiento de papa.

### 6.2. Control de *Helminthosporium solani*

De acuerdo a las figuras 4, 5, 6 y 7 se observa que la aplicación de Maxim a la semilla antes de la siembra, no tuvo efecto en la reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad *Helminthosporium solani* mas conocida como Mancha Plateada, tanto en la variedad Yana Qoyllu como en la variedad Pinta Boca respectivamente. Estos resultados son contrarios a los encontrados el pasado año donde se observo que Maxim y Dividen permiten mejorar la calidad de la papa al controlar esta enfermedad en algunas más que en otras variedades.

En relación al efecto en el rendimiento de Maxim aplicado a la semilla, de acuerdo a la Figura 8 se puede indicar que este afecto es negativo tanto en la variedad nativa Yana Qoyllu como en la variedad Pinta Boca. Estudios pasados mostraron que el efecto de Maxim sobre la variedad Waycha si bien no mejoraron el rendimiento, no fueron negativos tal como se aprecia en estas

variedades nativas. El porcentaje de emergencia fue de 84 y 51 para las papas sin tratamiento y las tratadas con Maxim respectivamente, esto muestra que este fungicida pudo afectar a los brotes de la semilla lo que limitó su emergencia y como consecuencia permitió un bajo rendimiento.

En relación a los ensayos de *Trichoderma* para el control de la Mancha Plateada y Rhizoctonia, estos tuvieron problemas de anegamiento lo que promovió la pudrición de la semilla y como consecuencia una baja emergencia del cultivo. Se espera repetir estos ensayos la siguiente campaña.

### **277. Conclusiones**

El bioinsumo comercial FERTITRAP no logró reducir la incidencia y severidad de la enfermedad Rhizoctonia en ninguna de las dosis aplicadas, contrariamente a los resultados encontrados la campaña pasada. Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra, tampoco logró controlar esta enfermedad.

Maxim aplicado a la semilla antes de la siembra, no tuvo efecto en la reducción de la enfermedad *Helminthosporium solani* (Mancha Plateada) en las variedades Yana Qoyllu y Pinta Boca.

El efecto de Maxim sobre el rendimiento de Yana Qoyllu y Pinta Boca fue negativo, debido posiblemente a que quemó los brotes de la semilla ya que la emergencia del cultivo fue afectada drásticamente por el producto.

### **278. Recomendaciones**

Se debe continuar con los estudios de *Trichoderma* como biocontrolador de Rhizoctonia y la Mancha Plateada.

### **279. Bibliografía consultada**

- AGRIOS, GN. 1998. Fitopatología: Enfermedades de las plantas. Trad. Del inglés por Manuel Guzmán Ortiz. México, D.F., LIMUSA. 755p.
- COCA, M.: A. MOREIRA. Sf. Incidencia de *Rhizoctonia solani solana* en cultivos de papa en las Zona Altas de las Provincias de Arani-Carrasco del Departamento de Cochabamba.
- FRANK, J.A. 1980. Rhizoctonia solanisis. In HOOKER, W.J. Compendio de enfermedades de la Papa. Trad. Del inglés por Teresa Ames. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 166p.
- HUERRES, C. 1990. Horticultura. Edit. Pueblo y educación. Habana, CU.P. 95 – 105p.
- JAUCH, C. 1979. Patología vegetal. 2ed. Buenos Aires, Arg., ATENEO. 289p.
- MONT KOC, R; E. FERNANDEZ-NORTHCOTE. 1978. Fitopatología agrícola; Enfermedades Bacterianas y Fungosas. Lima Perú. Departamento de sanidad vegetal – Sección Fitopatología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Tomo II. 229 p.

## **EFFECTO DE Fertitrap EN EL CULTIVO DE CEBOLLA**

Responsable: Oscar Navia y Noel Ortuño. Fundación PROINPA. Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia

### **Introducción**

Una transición exitosa del sistema agrícola convencional basado en la aplicación de productos químicos (fertilizantes y plaguicidas) al de una agricultura sustentable dependerá de lo que los agricultores puedan hacer para proteger la salud del agricultor y el medio ambiente, así como

para mejorar y mantener la calidad de los suelos, el cuál se constituye en la llave para el desarrollo de un sistema agrícola sostenible.

Con el fin de mejorar y mantener la calidad de los suelos es necesario implementar alternativas fiables y sostenibles como la utilización de abonos y biofertilizantes en combinación con microorganismos benéficos para las plantas. Las Fertitrap son microorganismos que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de la Fertitrap ha venido ganando aceptación en la última década y están siendo utilizados en muchos cultivos a nivel mundial.

En este contexto, para realizar nuevas innovaciones en el manejo integrado del cultivo de cebolla y en un contexto más amplio de un manejo más sostenible, en el presente trabajo se estudió el efecto de Fertitrap sobre el desarrollo del cultivo de cebolla.

## Objetivos

Evaluar el efecto de Fertitrap en el desarrollo del cultivo de cebolla.

## Materiales y Métodos

El ensayo se estableció en la zona de La Villa, Provincia Punata (2700 msnm) del Departamento de Cochabamba, caracterizada por ser zona productora de cebolla. Se utilizó el diseño de bloques completos al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Se utilizó el cultivar Criolla Roja, muy difundida en la zona.

Los tratamientos fueron: T1= Fertitrap (inmersión de plántulas al transplante), T2= Fertitrap (aspersión al cuello de la planta después del transplante) T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea). La dosis de aplicación de la Fertitrap fue, por aspersión a la dosis de 15 kg/200 litros agua/ha, y por inmersión a la dosis de 15 kg/15 litros agua/ha. La dosis de urea utilizada por el agricultor fue de 100 kg/ha.

La unidad experimental tuvo 18 surcos de 15 m de largo, siendo la distancia entre surcos de 0.2 m, la distancia entre plantas 0.1 m y un área total de 672 m<sup>2</sup>. La distancia entre bloques, fue de 1.0 m. Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones tanto del desarrollo del cultivo como el rendimiento.

### *Resultados y discusión*

#### **- Efecto de los tratamientos en el ciclo del cultivo**

Tanto la aplicación de Fertitrap por inmersión de plántulas al transplante (T1) como la aplicación por aspersión al cuello de la planta después del transplante (T2), mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo de la cebolla, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta y mayor vigor con respecto al tratamiento Testigo (T3). El testigo (práctica del agricultor) mostró un menor desarrollo a pesar de haber recibido la incorporación de fertilizante químico úrea. (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Efecto de la incorporación de **Fertitrap** en el desarrollo del cultivo.

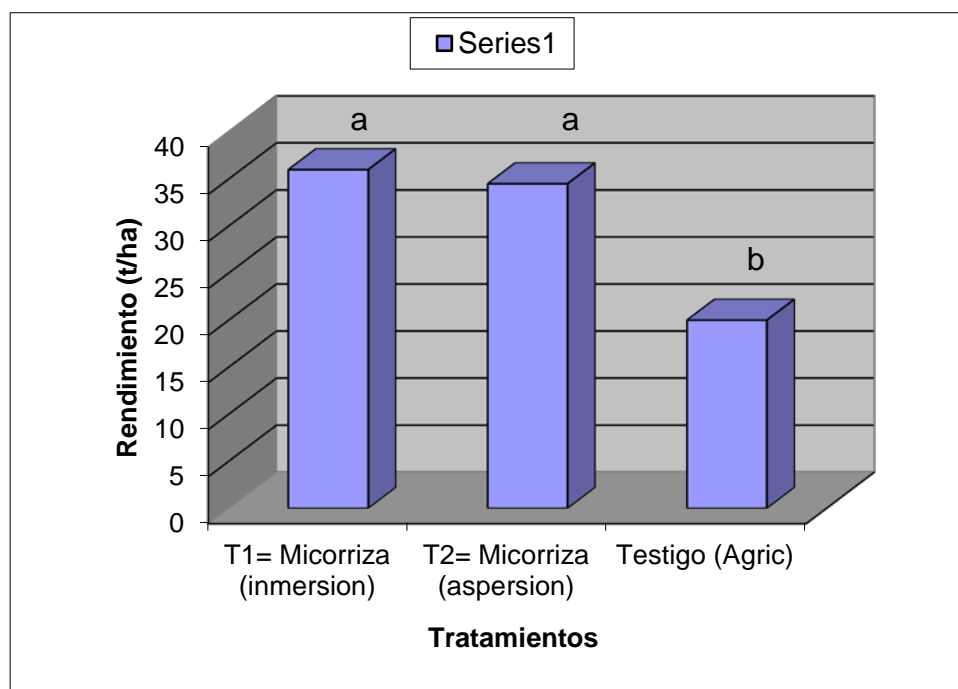
de la cebolla. Cultivar Criolla Roja. La Villa, 2005.

Tratamientos	Prendimiento al transplante (%)	Altura planta al Primer aporque (cm)	Altura planta (a los 90 días) (cm)	Grosor del cuello de la planta (cm)
T1= Fertitrap (inmersión de plántulas al transplante)	100 a*	17 a	82 a	1.8 a
T2= Fertitrap (aspersión al cuello de la planta después del transplante)	100 a	15 a	78 a	1.6 a
T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea)	97 a	7 b	40 b	0.8 b

\* Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

### - Rendimiento

En general se obtuvieron altos rendimientos (bulbo más follaje). La aplicación de Fertitrap, tanto por inmersión al transplante (T1) como la aplicación al cuello de la planta después del transplante (T2), tuvieron los mayores rendimientos, mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento testigo (práctica del Agricultor). El testigo (con aplicación de úrea), mostró un rendimiento bajo (Figura 2). Los tratamientos con Fertitrap, T1 y T2, mostraron incrementos en los rendimientos de 80 y 72 % más, respectivamente, con respecto al tratamiento Testigo.



**Figura 1.** Rendimiento (t/ha), bajo tres tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. La Villa, 2005.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo

a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ).



**Figura 2.** Tratamientos con Fertitrap (T1, T2) mostrando plantas vigorosas, de buen desarrollo y alto rendimiento en comparación con plantas del tratamiento testigo (T3).  
La Villa, 2005.

### *CONCLUSIONES*

Las Fertitrap, incorporadas tanto por inmersión como por aspersión, mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor y mayores rendimientos con respecto al tratamiento testigo (práctica Agrícola).

Este efecto se debe a que las Fertitrap son agentes que mejoran la nutrición de la planta. Aumentan la superficie de absorción de nutrientes, aumenta la capacidad de las raíces para obtener nutrientes, especialmente fósforo, pero también potasio, nitrógeno, calcio, magnesio, zinc, cobre, boro y molibdeno.

Por lo tanto, las Fertitrap son una alternativa importante para tener un manejo del cultivo de cebolla más sostenible y sensible con el medio ambiente y la salud del agricultor.

## **PRUEBA DE EFICIENCIA DEL BIOFERTILIZANTE- ENRIQUECIDO CON NITROGENO BIOFERT (*Bacillus subtilis* 1.1 % + *Glomus fasciculatum* 10 % + Harina-S con Humus 88.9 %) EN EL CULTIVO DE CEBOLLA.**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia M.

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja

**Instituciones colaboradoras o socias:** SENASAG

### **COMPENDIO**

Se estableció un ensayo en la zona de La Villa (Cochabamba) para determinar la eficiencia del biofertilizante BIOFERT en el desarrollo del cultivo de cebolla. Se utilizó el cultivar Criolla, bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos. Los tratamientos fueron T1 ( BIOFERT, 200 kg/ha), T2 (BIOFERT, 180 kg/ha), T3 (BIOFERT, 160 kg/ha), T4 (Urea), T5 (Testigo). La aplicación del producto se realizó al aporque. Los tratamientos con BIOFERT mostraron sus bondades en el desarrollo del cultivo de cebolla. Los tratamientos T1 (BIOFERT, 200 Kg/ha) y T2 (BIOFERT, 180 Kg/ha), mostraron un mayor desarrollo del cultivo, mayor área foliar, mayor tamaño de las plantas, mayor sanidad y los mayores rendimientos, con respecto a los otros tratamientos y el testigo. Por lo tanto, BIOFERT, mostró ser eficiente para el mayor desarrollo del cultivo de cebolla.

**Palabras claves:** BIOFERT, cebolla, *Bacillus subtilis*, micorriza, nitrógeno.

### **1. INTRODUCCION**

Uno de los elementos clave en la práctica de la agricultura sostenible es el uso eficiente de los recursos naturales y de los insumos agrícolas ( suelo, agua, material vegetal, energía, fertilizantes, plaguicidas, etc.), puesto que con ello debe reducirse significativamente la intensidad o frecuencia en que sea necesaria su utilización para asegurar la producción. Por ello, con el fin de mejorar y mantener la calidad de los suelos es necesario implementar alternativas fiables y sostenibles como la utilización de biofertilizantes, para una producción más económica de los cultivos y que redunden en la conservación y fertilidad de los suelos agrícolas.

Actualmente, surge la alternativa de la utilización de biofertilizantes en combinación con microorganismos naturales del suelo que son benéficos para las plantas. Entre estos, tenemos a las rizo-bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), los cuales son microorganismos de vida libre que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de PGPR ha venido ganando aceptación en la última década y están siendo utilizados en muchos cultivos a nivel mundial.

En base a estos antecedentes, para realizar nuevas innovaciones en el manejo de las hortalizas, y en particular del cultivo de cebolla, en el presente trabajo se estudió la eficacia del biofertilizante BIOFERT (*Bacillus subtilis* 1.1 % + *Glomus fasciculatus* 10 % + Harina-S cn Humus 88.9 %) en el desarrollo del cultivo de cebolla.

## OBJETIVOS

- e) Evaluar la eficiencia del biofertilizante BIOFERT (*Bacillus subtilis* 1.1 % + *Glomus fasciculatum* 10 % + Harina-S con Humus 88.9 %) en el desarrollo del cultivo de cebolla.
- f) Evaluar fitotoxicidad.

## 3. REVISION DE LITERATURA

### - BIOFERT:

BIOFERT Es un biofertilizante sólido, bioabono de fondo, para aplicación al aporque o a la siembra, en base a microorganismos benéficos, con excelentes resultados en varios cultivos como papa, quinua, hortalizas (cebolla, tomate, repollo) y ornamentales.

Este producto es enriquecido con fuente de nitrógeno e incrementa la actividad microbiana del suelo. Por su contenido de nitrógeno, puede ser utilizado como alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Las micorrizas del producto hace más eficiente la asimilación de fósforo y humedad, y mejora la estructura del suelo. Al contener bacterias del tipo *Bacillus*, provee de promotores de crecimiento a la planta y protege de patógenos de suelo.

### COMPOSICIÓN:

<i>Bacillus subtilis</i> .(4x10 <sup>9</sup> ufc).....	1.1 %
<i>Glomus fasciculatum</i> (15 esporas/g)....	10 %
Harina-S (12 % N) más Humus.....	88.9 %
TOTAL .....	100.00 %

BIOFERT, es un producto formulado en particular para su aplicación al aporque, y excepcionalmente a la siembra. Es un biofertilizante y promotor de crecimiento caracterizado por su alto contenido de Nitrógeno.

Esta formulación, permite a la planta:

- Nitrógeno disponible para su desarrollo
- Mayor absorción de nutrientes: P, N, K, S, Cu, Mg, Zn, Mo, entre otros.
- Mayor absorción de agua, tolerancia y recuperación al estrés hídrico
- Resistencia a condiciones adversas, sales, contaminación por metales pesados
- Agregación del suelo: **GLOMALINA**

Asimismo:

- la supresión de enfermedades de plantas,
- favorecer la liberación de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo, la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA ó ácido indol-3-acético,

## 3 . MATERIALES Y METODOS

### 3.2. Localización

El ensayo se implementó en la localidad de La Villa (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba. Esta zona está caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de la cebolla.

### 3. 2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

### 3. 3. Materiales

#### 3. 3. 1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Criolla Roja, el más difundido en la zona.

#### 3. 3. 2. Productos

Se utilizaron el biofertilizante-biofungicida BIOFERT y Urea (Producto comercial).

### 3. 4. Procedimiento experimental

El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

#### Características de la unidad experimental:

Distancia entre surcos =	0.2 m
Distancia entre plantas =	0.1m
Largo del surco	= 10 m
N° de surcos /unid. exp.	= 10
Area de la unid. Exp. =	20 m2
Distancia entre unid. exp.	= 1.0m
Area total del ensayo	605 m2

#### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis (kg/ha)
1	BIOFERT	200
2	BIOFERT	180
3	BIOFERT	160
4	Urea (Producto comercial nitrogenado)	184
5	Testigo	-

La aplicación del BIOFER se realizó al aporque, al cuello de las plantas, y posterior aporcado. .

### 3.5. Evaluaciones



Durante el ciclo del cultivo, se determinó el efecto de los tratamientos en el desarrollo y rendimiento del cultivo de cebolla.

En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

### 3.6. Análisis estadístico

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ), con los datos de las evaluaciones.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el desarrollo del cultivo de cebolla. Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de cebolla. La Villa, Punata, Cochabamba.**

Mes	Temperatura °C			Precipitación
	Máxima	Mínima	Ambiente	mm
Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
<b>Total</b>				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

### 4.2. Efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo

Los tratamientos con BIOFERT tuvieron un efecto positivo en el desarrollo del cultivo de cebolla. Los tratamientos T1 (BIOFERT, 200 Kg/ha) y T2 (BIOFERT, 180 Kg/ha) tuvieron el mayor desarrollo del cultivo, mostrando mayor mayor área foliar, mayor altura de planta, y mayor vigor, con respecto a los tratamientos T3 (BIOFERT, 3160 kg/ha) y T4 (Urea) y el Testigo. El testigo, mostró un menor desarrollo del cultivo (Cuadro 2).



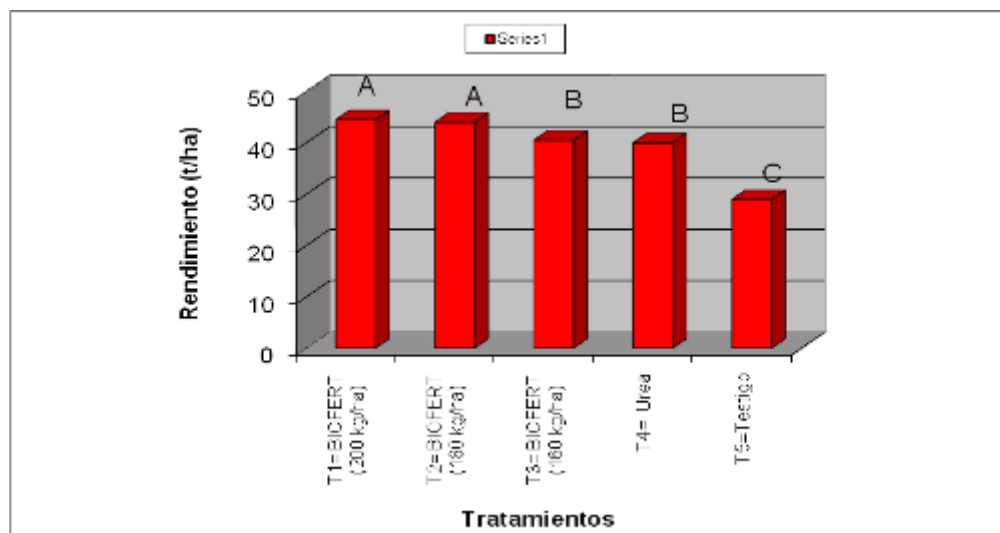
**Cuadro 2.** Efecto de cinco tratamientos en el desarrollo del cultivo de cebolla.  
Ensayo BIOFERT.

Tratamientos	Area Foliar (%)		Altura Planta (cm)	
	Al aporque	A floracion	Al aporque	A floracion
T1=BIOFERT (200)	20 a	100 a	18 a	85 a
T2= BIOFERT (180)	20 a	100 a	18 a	83.5 a
T3= BIOFERT (160)	20 a	93 b	18 a	78.5 b
T4= Urea (Producto comercial)	20 a	92 c	18 a	77 c
T5= Testigo	19 a	85 d	17 a	65 d

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Rendimiento**

Se obtuvieron buenos rendimientos. Los mayores rendimientos (bulbo más follaje, como se comercializa en la zona), se obtuvieron con los tratamientos T1 (BIOFERT, 200 Kg/ha) y T2 (180 Kg/ha), mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento T3 (BIOFERT, 160 kg/ha), T4 (Urea) y el testigo (T5). El testigo, mostró un rendimiento bajo (Figura 1). Con los tratamientos con BIOFERT T1 y T2, se obtuvieron incrementos de 53 y 51 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (T5) (Figura 1).



**Figura 1.** Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. Ensayo BIOFERT.

Los promedios con igual letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 3. Análisis de varianza para Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. Ensayo BIOFERT.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	15.70	7.850	5.56	0.0307
Tratamientos	4	470.10	117.525	83.20	0.000 **
Error	8	11.30	1.413		
No aditividad	1	6.09	6.085	8.17	0.0244
Residual	7	5.21	0.745		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>497.10</b>			

CV = 3.0 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 7. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron favorables para el cultivo de cebolla.
- ◆ . Los tratamientos T1 (BIOFERT, 200 Kg/ha) y T2 (BIOFERT, 180 Kg/ha), mostraron un mayor desarrollo del cultivo, mayor área foliar, mayor tamaño de las plantas y los mayores rendimientos, con respecto a los otros tratamientos y el testigo. Los tratamientos con BIOFERT mostraron sus bondades en el desarrollo del cultivo de cebolla.

- ◆ El buen desarrollo del cultivo está relacionado con la utilización del BIOFERT, que es un producto enriquecido con fuente de nitrógeno y además tiene microorganismos benéficos (PROINPA, 2009).

Esta formulación, permite a la planta:

- Nitrógeno disponible para su desarrollo
- Mayor absorción de nutrientes: P, N, K, S, Cu, Mg, Zn, Mo, entre otros.
- Mayor absorción de agua, tolerancia y recuperación al estrés hídrico
- Resistencia a condiciones adversas, sales, contaminación por metales pesados
- Agregación del suelo: **GLOMALINA**

Asimismo:

- la supresión de enfermedades de plantas,
- ◆ favorecer la liberación de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo, la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA o ácido indol-3- acético
- ◆ Por los resultados obtenidos, el biofertilizante BIOFERT, mostró ser eficiente en el mayor desarrollo del cultivo de cebolla. Se recomienda la dosis de 180 kg/ha.

#### LITERATURA CITADA

9. AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. Trad. Por Miguel Guzmán Ortíz. 2da. De. México, D.F., Limusa.
10. CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica Lima - Perú. 643 p.
11. Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffe, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Improving plant productivity with Rhizosphere Bacteria, Ryder, M.H. *et al.* (eds.), CSIRO division of soils, Glen Osmond.
12. Fernandez-Northcote.E.N., Navia, O., and Gandarillas, A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35 (3): 137-149.
13. Jimenez Diaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. *Fitopatología* 38 (2): 62- 73.
14. NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, N., CRESPO, C.; FRANCO, J. 2007. INTEGRACION DE RESISTENCIA SISTEMICA INDUCIDA Y ESTRATEGIAS DE MANEJO INTEGRADO DEL TIZON DE LA PAPA Y DEL TOMATE (*Phytophthora infestans*) PARA UNA AGRICULTURA SOSTENIBLE. En: Memorias XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología – XXXIV Congreso Mexicano de Fitopatología- XLVII Anual Meeting of the American Phytopathological Society. Cancùn, México. Mayo 2007. pp. 76-77.

15. NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, O. 2006. El control de enfermedades, desde los fungicidas hasta los biopesticidas. Enfermedades: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control de enfermedades. En: Memorias IV Congreso Boliviano de Protección Vegetal. . Oruro, Bolivia. Abril 2006. pp. 215- 225.
16. PROINPA. 2009. Catalogo de Bioinsumos. Ed. Polygraf. Cochabamba, Bolivia. 38 p.
17. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4786-4790.
18. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
19. Sutton, B. 1996. A century of mycology. Ed. Cambridge University Press. USA.
20. TERRANOVA. 1995. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Terranova Editores, Santa Fé de Bogotá, Colombia. 544 p.

**PRUEBA DE EFICIENCIA DEL BIODEGRADADOR DE MATERIA ORGANICA BIOGRAD (Azúcares naturales 50 GB + *Saccharomices cereviceae*  $2 \times 10^8$  ufc + Hongos totales  $2.5 \times 10^7$  ufc+ Actinomicetos  $3 \times 10^8$  .ufc) PARA LA ELABORACION DE COMPOST PARA EL CULTIVO DE REPOLLO.**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia M.

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja

**Instituciones colaboradoras o socias:** SENASAG

**COMPENDIO**

La incorporación de abonos orgánicos al suelo es de suma importancia ya que mejora las diversas características físicas, químicas y biológicas del suelo que permiten mejorar la fertilidad del suelo. Para determinar la eficiencia del biodegradador de materia orgánica BIOGRAD (azúcares naturales 50 Gb + *Saccharomices cereviceae*  $2 \times 10^8$  ufc + Hongos totales  $2.5 \times 10^7$  ufc+ actinomicetos  $3 \times 10^8$  .ufc) para la elaboración de compost para el cultivo de repollo, se implementaron dos ensayos en la zona de Punata (Cochabamba), bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos. En el ensayo de compostaje, los tratamientos con BIOGRAD mostraron su efecto positivo en el proceso de compostaje de materia orgánica. Con los tratamientos con BIOGRAD T1 (2.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T2 (1.5 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T3 (1.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato) y el tratamiento T4 (Compostree) se obtuvo un mayor porcentaje de compost y el menor tiempo de duración del proceso en comparación con el Testigo (T5) (Compostaje tradicional). Los tratamientos con BIOGRAD, redujeron el tiempo de compostaje en un 50% (de 120 días el tradicional, a solo 60 días con BIOGRAD). En el ensayo de campo establecido con el compost obtenido, utilizando el cultivo de repollo, los tratamientos con BIOGRAD mostraron sus ventajas. El mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, se obtuvieron con los tratamientos T1, T2, T3. Los resultados muestran que BIOGRAD, mostró ser eficiente como biodegradador de materia orgánica en el proceso de compostaje.

**Palabras claves:** BIOGRAD, Compost, Biodegradador de materia orgánica, repollo.

## 1. INTRODUCCION

La incorporación de abonos orgánicos al suelo es de suma importancia ya que mejora las diversas características físicas, químicas y biológicas del suelo que permiten mejorar la fertilidad del suelo. Actúan sobre las propiedades físicas, mejorando la textura y estructura del suelo, la permeabilidad del suelo influyendo en el drenaje y aireación de éste, aumentando la retención del agua y disminuyendo la erosión del suelo; las propiedades químicas, aumentando el poder tampón del suelo (reduce las oscilaciones de pH del suelo) y la capacidad de intercambio catiónico del suelo con lo que se mejora la fertilidad y las propiedades biológicas favoreciendo la aireación y oxigenación del suelo por lo que hay mayor actividad radicular y de los microorganismos aeróbicos, constituyendo una fuente de energía para una más rápida multiplicación de los microorganismos.

Esta mejora de las diversas características del suelo no sólo permite alcanzar mayores rendimientos como respuesta inmediata a la incorporación de la materia orgánica, sino permite recuperar y conservar la fertilidad de los suelos en aquellas localidades de suelos empobrecidos, que constituyen la única fuente para alcanzar una agricultura sustentable en la región andina de Bolivia.

En Bolivia, los productores utilizan materia orgánica (estiércoles) de diversas fuentes para el cultivo de papa, hortalizas, frutales, etc. Sin embargo, en muchos casos, estos estiércoles no están bien descompuestos y por lo tanto con nutrientes poco disponibles para las plantas. Por otra parte, la elaboración de compost, bocashi y otros, toma mucho tiempo.

Por otra parte, BIOGRAD es un biodegradador de residuos orgánicos que permite acelerar la descomposición de materia orgánica, posibilitando una rápida disponibilidad de nitrógeno para la planta. Es aplicable en residuos de cosechas, humificar estiércoles, y disminuye el tiempo de compostado (PROINPA, 2009).

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se estudió la eficacia del biodegradador de materia orgánica BIOGRAD (azúcares naturales 50 GB + *Saccharomyces cereviceae*  $2 \times 10^8$  ufc + hongos totales  $2.5 \times 10^7$  ufc+ actinomicetos  $3 \times 10^8$ . ufc) para la elaboración de compost y su efecto en el cultivo de repollo.

### OBJETIVOS

- a) Evaluar la eficiencia del biodegradador de materia orgánica **BIOGRAD** (Azúcares naturales 50 GB + *Saccharomyces cereviceae*  $2 \times 10^8$  ufc + Hongos totales  $2.5 \times 10^7$  ufc + Actinomicetos  $3 \times 10^8$  ufc.) para la elaboración de compost.
- b) Evaluar el efecto del compost obtenido, en el desarrollo del cultivo de repollo.

## 4. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. COMPOST:

El **Compost** es un compuesto orgánico que constituye un abono natural excelente para la agricultura, que se obtiene como resultado de un proceso biológico aeróbico, mediante el cual los microorganismos actúan sobre sustratos orgánicos de origen vegetal y/o animal que son rápidamente descompuestos (restos de cosecha, estiércol de animales y residuos urbanos). El mejor compost es el que utiliza ambos tipos de sustratos, ya que en esta forma contienen carbohidratos, proteínas, y lípidos que son fácilmente procesados por los micro-organismos del suelo, lombrices e insectos.

## 2.2. Cómo es el proceso de Compostaje?

. El proceso de compostaje puede dividirse en cuatro períodos o etapas, debiendo tenerse presente que en la práctica, el paso de una etapa a otra se produce de forma gradual, y siempre influenciado tanto por factores ambientales como por el pre-tratamiento de selección y disminución del volumen de partícula al que se ha sometido previamente el residuo orgánico.

- **Mesolítica (24-48 h, elevación de temperatura a 40-50 °C ).**

En esta etapa la masa vegetal está a temperatura ambiente y los microorganismos mesófilos (bacterias y hongos mesofílicos) se multiplican rápidamente. El número de actinomicetos permanece relativamente bajo. Como consecuencia de la actividad metabólica la temperatura se eleva y se producen ácidos orgánicos que hacen bajar el pH.

- **Termofílica (calentamiento máximo, periodo a 40-65 °C )**

Cuando se alcanza una temperatura de 40 °C, los microorganismos termófilos (bacterias termófilas, actinomicetos y hongos termófilos) transforman el nitrógeno en amoníaco y el pH del medio se hace alcalino. A los 60 °C los hongos termófilos desaparecen y aparecen las bacterias esporígenas y hongos actinomicetos. Estos micro-organismos son los que descomponen las ceras, proteínas y hemicelulosas.

- **De enfriamiento.** Cuando la temperatura es menor de 60 °C, reaparecen los hongos termófilos que reinviden el mantillo y descomponen la celulosa. Al bajar de 40 °C, los mesófilos también reinician su actividad y el pH del medio desciende ligeramente.

- **De maduración.** Es un periodo que requiere de cierto tiempo (semanas) a temperatura ambiente, durante el cual se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización del humus. Los actinomicetos adquieren especial importancia en la formación de ácidos húmicos y en la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de bacterias y patógenos, mientras que los macroorganismos incrementan su actividad removiendo y masticando los materiales.

El color del producto final debe ser negro o marrón oscuro y su olor a tierra húmeda, además ya no debemos reconocer los residuos iniciales.



## 2.3. Cuáles son las ventajas del uso del Compost?

El uso del compost tiene muchas ventajas para mejorar la producción de cultivos y conservar la fertilidad de los suelos agrícolas. Las más importantes, por su efecto en el suelo son:

- *Mejora las propiedades físicas del suelo:*
  - Favorece la estabilidad de la estructura de los agregados del suelo agrícola,
  - Reduce la densidad aparente, aumenta la porosidad y permeabilidad, y
  - Aumenta la capacidad de retención de agua en el suelo.
- *Mejora las propiedades químicas:*
  - Aumenta el contenido de macronutrientes como N, P,K, y de micronutrientes,
  - Incrementa la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.), y
  - Es fuente y almacén de nutrientes para los cultivos.
- *Mejora la actividad biológica del suelo:*
  - Actúa como sustrato y alimento de los micro-organismos que viven a expensas del humus y contribuyen a su mineralización.



- *El compost contiene antagonistas microbiales . Los principales son :*

*Bacillus spp., Enterobacter spp., Flavobacterium balustinum, Pseudomonas spp., Streptomyces spp., Penicillium spp., Trichoderma spp.*

## **2.4. BIOGRAD:**

BIOGRAD, es un biodegradador de residuos orgánicos que permite acelerar el proceso del compostaje (PROINPA, 2009).

### **COMPOSICIÓN:**

*Azúcares naturales 50 GB*

*Saccharomices cereviceae (2x10<sup>8</sup>.ufc)*

*Hongos totales (2.5 x10<sup>7</sup> ufc)*

*Actinomicetos (3x10<sup>8</sup> ufc)*

TOTAL.....100.00 %BIOGRAD, es un biodegradador de residuos orgánicos constituido por microorganismos que permiten acelerar el proceso de descomposición de materia orgánica , posibilitando una rápida disponibilidad de nitrógeno para la planta. Es aplicable en residuos de cosechas, humificar estiércoles, y disminuye el tiempo de compostado. El compost, producto resultado de la descomposición, disminuye el periodo de cultivo e incrementa los rendimientos

## **3 . MATERIALES Y METODOS**

### **3.3. Localización**

El ensayo se implementó en la localidad de El Rosal (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba.

### **3. 2. Datos Meteorológicos**

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

### **3. 3. Materiales**

#### **3. 3. 1. Material**

Estiercol vacuno y restos vegetales (paja de trigo).

#### **3. 3. 2. Productos**

Se utilizaron el biodegradador BIOGRAD y Compostree (Producto comercial).

Para el segundo ensayo en campo, se utilizò el compost obtenido con los diferentes tratamientos.

### **3. 4. Procedimiento experimental**

Los ensayos se establecieron bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

### **Características de la unidad experimental:**

Para el ensayo de compostaje (Ensayo 1), se realizaron los diferentes tratamientos en Pilas de compost de estiércol y residuos de materia orgánica de 3 m<sup>3</sup>.

El segundo ensayo, en campo con el cultivo de repollo, tuvo las siguientes características:

Distancia entre surcos	=	0.5 m
Distancia entre plantas	=	0.3m
Largo del surco	=	10 m
N° de surcos /unid. exp.	=	10
Area de la unid. Exp.	=	30 m <sup>2</sup>
Distancia entre unid. exp.	=	1.0m
Area total del ensayo	=	1045 m <sup>2</sup>

#### Tratamientos:

##### Ensayo 1:

Los tratamientos en el proceso de compostaje fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis (litros/ 20 l agua/ m <sup>3</sup> sustrato)
1	COMPOSTAJE CON BIOGRAD	2.0
2	COMPOSTAJE CON BIOGRAD	1.5
3	COMPOSTAJE CON BIOGRAD	1.0
4	COMPOSTAJE CON COMPOSTREE (producto comercial)	-
5	COMPOSTAJE (Tradicional)	-

La aplicación del BIOGRAD se realizó por aspersión con mochila, al momento de realizar el compostaje de estiércol vacuno y residuos orgánicos.

##### Ensayo 2:

Los tratamientos en el ensayo de campo (utilizando el compost del primer ensayo) fueron los siguientes:

Trat	Producto	
1	T1= COMPOST ( BIOGRAD, 2.0)	
2	T2= COMPOST ( BIOGRAD, 1.5)	
3	T3= COMPOST ( BIOGRAD, 1.0)	
4	T4= COMPOST (COMPOSTREE)	
5	T5= COMPOST (tradicional)	

### 3.5. Evaluaciones

Durante el transcurso del ensayo, se determinó el efecto de los tratamientos en el proceso de compostaje, y el tiempo que duró el compostaje en cada tratamiento. Asimismo, el efecto del compost obtenido en el desarrollo y rendimiento del cultivo de repollo.

### 3.6. Análisis estadístico

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05), con los datos del ensayo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 1). Por lo tanto, las condiciones climáticas fueron muy favorables para la realización del ensayo, y el desarrollo del cultivo de repollo.

**Cuadro 2. Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de repollo. El Rosal, Punata, Cochabamba.**

Mes	Temperatura °C			Precipitación
	Máxima	Mínima	Ambiente	mm
Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
Total				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

### 4.2. Efecto de los tratamientos en el compostaje:

Los tratamientos mostraron su efecto positivo en el proceso de compostaje de materia orgánica. Con los tratamientos con BIOGRAD T1 (2.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T2 (1.5 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T3 (1.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato) y el tratamiento T4 (Compostree) se obtuvo un mayor porcentaje de compost y el menor tiempo de duración del proceso en comparación con el Testigo (T5) (Compostaje tradicional). Estas diferencias, fueron estadísticamente significativas (Cuadro 2). Los tratamientos con BIOGRAD, redujeron el tiempo de compostaje en un 50% (de 120 días el tradicional, a solo 60 días con BIOGRAD).

**Cuadro 2.** Efecto de cinco tratamientos en el proceso de compostaje. Ensayo BIOGRAD.

Tratamientos	Porcentaje de compostado	Tiempo de compostado (Días)	
T1= COMPOSTAJE CON BIOGRAD (2.0)	97 a	60 a	
T2= COMPOSTAJE CON BIOGRAD (1.5)	96 a	60 a	
T3= COMPOSTAJE CON BIOGRAD (1.0)	96 a	60 a	
T4= COMPOSTAJE CON COMPOSTREE	95.5 a	60 a	
T5= COMPOSTAJE (tradicional)	90 b	120 b	

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Efecto del Compost obtenido, en el desarrollo y rendimiento del cultivo de repollo**

En el ensayo de campo establecido con el compost obtenido, con los diferentes tratamientos, utilizando el cultivo de repollo, los tratamientos con BIOGRAD mostraron sus ventajas.

Los mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, se obtuvieron con los tratamientos T1 (BIOGRAD, 2.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T2 (BIOGRAD, 1.5 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T3 (BIOGRAD, 1.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato) y T4 (Compostree), con diferencia significativa con respecto al tratamiento T5 (Compost tradicional). (Figura 1). Con los tratamientos con Compost obtenido con BIOGRAD T1, T2 y T3, se obtuvieron incrementos de 24, 23, 21 y 20 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo T5 (compost tradicional) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Desarrollo y rendimiento del cultivo de repollo, bajo cinco tratamientos de manejo con compost. Ensayo BIOGRAD.

Tratamientos	Area Foliar (%)		Altura Planta (cm)		Rendimiento (t/ha)
	Al aporque	A floracion	Al aporque	A floracion	
T1= COMPOST (BIOGRAD, 2.0)	17 a	100 a	20 a	46 a	41.0 a
T2= COMPOST (BIOGRAD, 1.5)	16 a	100 a	20 a	45 a	40.5 a
T3= COMPOST (BIOGRAD, 1.0)	16 a	100 a	20 a	45 a	40.0 a
T4= COMPOST (COMPOSTREE)	16 a	100 a	19 a	44 a	39.5 a
T5= COMPOST (tradicional)	12 b	90 d	16 b	37 b	33.0 b

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

## 8. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron favorables para el proceso de compostaje y para el posterior desarrollo del cultivo de repollo.
- ◆ Los tratamientos con BIOGRAD mostraron su efecto positivo en el proceso de compostaje de materia orgánica. Con los tratamientos con BIOGRAD T1 (2.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T2 (1.5 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T3 (1.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato) y el tratamiento T4 (Compostree) se obtuvo un mayor porcentaje de compost y el menor tiempo de duración del proceso en comparación con el Testigo (T5) (Compostaje tradicional).
- ◆ Los tratamientos con BIOGRAD, redujeron el tiempo de compostaje en un 50% (de 120 días el tradicional, a solo 60 días con BIOGRAD).
- ◆ En el ensayo de campo establecido con el compost obtenido, utilizando el cultivo de repollo, los tratamientos con BIOGRAD mostraron sus ventajas. El mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, se obtuvieron con los tratamientos T1 (BIOGRAD, 2.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T2 (BIOGRAD, 1.5 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato), T3 (BIOGRAD, 1.0 litros /1 m<sup>3</sup> de sustrato) y T4 (Compostree).

Estos resultados están relacionados con la utilización de BIOGRAD, que es un biodegradador de residuos orgánicos constituido por microorganismos que permiten acelerar el proceso de descomposición de materia orgánica, posibilitando una rápida disponibilidad de nitrógeno para la planta. Es aplicable en residuos de cosechas, humificar estiércoles, y disminuye el tiempo de compostado. El compost, producto resultado de la descomposición, disminuye el periodo de cultivo e incrementa los rendimientos (PROINPA, 2009).

- Por los resultados obtenidos, BIOGRAD, mostró ser eficiente como biodegradador de materia orgánica en el proceso de elaboración de compost (acelerador de compostaje). Se recomienda la dosis de 1.0 litros/20 litros de agua/1 m<sup>3</sup> de sustrato.

#### LITERATURA CITADA

21. AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. Trad. Por Miguel Guzmán Ortiz. 2da. De. México, D.F., Limusa.
22. CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica Lima - Perú. 643 p.
23. CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1996. Manejo Integrado de Plagas. Turrialba Costa Rica. Fitopatología 40: 24-34.
24. Jimenez Díaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. Fitopatología 38 (2): 62- 73.
25. NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, N., CRESPO, C.; FRANCO, J. 2007. INTEGRACION DE RESISTENCIA SISTEMICA INDUCIDA Y ESTRATEGIAS DE MANEJO INTEGRADO DEL TIZON DE LA PAPA Y DEL TOMATE (*Phytophthora infestans*) PARA UNA AGRICULTURA SOSTENIBLE. En: Memorias XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología – XXXIV Congreso Mexicano de Fitopatología- XLVII Anual Meeting of the American Phytopathological Society. Cancùn, México. Mayo 2007. pp. 76-77.
26. PROINPA. 2009. Catalogo de Bioinsumos. Ed. Polygraf. Cochabamba, Bolivia. 38 p.
27. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4786-4790.
28. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
29. Sutton, B. 1996. A century of mycology. Ed. Cambridge University Press. USA.
30. TERRANOVA. 1995. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Terranova Editores, Santa Fé de Bogotá, Colombia. 544 p.

### **EFFECTO DE UN PROMOTOR DE DESARROLLO (VIGORTOP) EN LOS CULTIVOS DE TOMATE, PAPA, ZANAHORIA, UVA**

Responsables: Oscar Navia y Noel Ortuño.

#### **Introducción**

A nivel mundial y en Bolivia, las hortalizas y los frutales representan un grupo de cultivos de amplia demanda por su alto valor nutritivo, diversos usos y su adaptación a diferentes zonas. Estos cultivos son exigentes en suelos sueltos, fértiles y ricos en materia orgánica, demandando una gran cantidad de nutrientes.

Estos cultivos implican una utilización intensiva de productos químicos especialmente plaguicidas con los consiguientes impactos negativos en el medio ambiente y la salud de los agricultores. Por lo tanto, es fundamental desarrollar alternativas más sostenibles para el manejo de estos cultivos.

En este contexto, para realizar nuevas innovaciones en el manejo integrado de estos cultivos y en un contexto más amplio de un manejo más sostenible, en el presente trabajo se estudió el efecto de un promotor de desarrollo sobre el desarrollo de varios cultivos.

## Objetivos

Evaluar el efecto del promotor de crecimiento VIGORTOP en el desarrollo de cultivos importantes en Bolivia.

## Materiales y Métodos

Se implementaron seis parcelas experimentales en diferentes zonas de producción del departamento de Cochabamba. Los cultivos y las zonas donde se establecieron los ensayos se detallan a continuación.

ENSAYO	CULTIVO	LOCALIDADES
VIGORTOP	Tomate	Paracaya (Prov. Punata)
	Uva	Paracaya (Prov. Punata)
	Zanahoria	La Villa (Prov. Punata)
	Papa	Colomi (Prov. Chapare)
	Papa	La Villa (Prov. Punata)
	Haba	La Villa (Prov. Punata)

En cada parcela experimental se probaron dos tratamientos:

T1= Vigortop (promotor)

T2= Agricultor (fertilizante foliar)

El promotor se aplicó a la dosis de 100 gramos/ha y el fertilizante foliar a la dosis comercial (3 l/ha). Las aplicaciones las realizó el agricultor. El área de cada ensayo experimental fue entre 500 a 600 m<sup>2</sup>. Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones tanto del desarrollo del cultivo, la sanidad, como el rendimiento.

### *Resultados y discusión*

En todos los cultivos y en todas las zonas, los tratamientos con Vigortop (T1) mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo de los cultivos , mayor altura de planta, mayor vigor y mayores rendimientos con respecto a los tratamientos testigo T2 (práctica agricultor, aplicación de fertilizante foliar) . En todos los casos, los testigos tuvieron un menor desarrollo y menores rendimientos (Cuadro 1, Figuras 1, 2, 3).

**Cuadro 1.** Efecto de la aplicación de Vigortop (promotor de desarrollo) en el desarrollo de los cultivos de tomate, uva, lechuga, papa y haba. Cochabamba, 2005.

<b>ENSAYOS</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Altura de planta (cm)</b>	<b>Rendimiento (t/ha)</b>
Tomate	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>150</b> 130	<b>37</b> 25
Uva	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>200</b> 170	<b>25</b> 20
Zanahoria	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>25</b> 15	<b>33,3</b> 19,9
Papa	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>130</b> 100	<b>32</b> 27
Papa	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>125</b> 100	<b>29</b> 22
Haba	T1= Vigortop T2= Agricultor	<b>150</b> 130	<b>21.5</b> 17.0



**Figura 1.** Parcela experimental de tomate mostrando un buen desarrollo y altos rendimientos por efecto de la aplicación de Vigortop. Paracaya.





**Figura 2.** Zanahoria con VIGORTOP (izquierda) y sin (Testigo Agricultor).  
La Villa

## **CONCLUSIONES**

En todas las zonas y en todos los cultivos, la aplicación del promotor (Vigortop) mostró sus ventajas. Tanto en el cultivo de tomate como en los cultivos de zanahoria, papa, uva, y haba el Vigortop mostró un mayor desarrollo del cultivo, altura de planta, vigor y mayores rendimientos con respecto a los otros tratamientos testigo (práctica de agricultor, aplicación de fertilizante foliar)

Por lo tanto, el uso del VIGORTOP, por ser un producto natural, se constituye en una alternativa importante para tener una mayor producción y una agricultura más sostenible.

## **EFFECTO DE BIOFERTILIZANTES EN EL CULTIVO DE PAPA**

Responsables: Oscar Navia & Noel Ortuño.

## **INTRODUCCION**

La papa es un cultivo básico y de seguridad alimentaria para la población de Bolivia, involucrando a más de 200,000 familias de pequeños agricultores que constituyen entre el 30 al 40% del total de campesinos del país (Zeballos, 1997). Por la importancia del cultivo, es fundamental proporcionar tecnologías de manejo integrado del cultivo que sean eficientes y sensibles con el medio ambiente y la salud del agricultor.

En este contexto, se realizó el presente trabajo de investigación con el objetivo de determinar el efecto de la utilización de biofertilizantes en el manejo del cultivo de la papa.

## **MATERIALES Y METODOS**

El ensayo se estableció en la zona de Colomi (Provincia Chapare, 3200 msnm), utilizando el cultivar Runa Toralapa, zona caracterizada por presentar condiciones climáticas favorables para el cultivo. El diseño utilizado fue el de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos fueron: T1 = Fertilizante comercial (Crecifol), T2 = Fertilizante comercial (Kelpak), T3 = Biofertilizante (dosis normal), T4= Biofertilizante (dosis doble), T5= Testigo (sin aplicación).

Los fertilizantes comerciales se utilizaron a la dosis de 100 cc/20 l agua (Crecifol), 30 cc/20 l agua (Kelpak). El biofertilizante a la dosis de 0.5 l/20 l agua y 1.0 l/20 l agua (dosis doble).

Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones del desarrollo del cultivo (emergencia, altura de planta, vigor, etc). En la cosecha se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

## RESULTADOS

Las condiciones climáticas durante el ciclo del cultivo, fueron muy favorables para el cultivo.

### - Aplicación de los tratamientos

En base a los tratamientos planteados, en total se realizaron cuatro aplicaciones en todos los tratamientos (Cuadro 1). Las aplicaciones las realizó el agricultor en las dosis recomendadas.

**Cuadro 1. Inicio y frecuencia de aplicaciones bajo cinco tratamientos con fertilizantes comerciales y biofertilizantes. Cultivar Runa Toralapa. Colomi, 2005.**

Tratam	30 dds	14 d	14 d	14 d
T1	Cobrethane	Cobrethane	Cobrethane	Cobrethane
T2	Priori	Priori	Priori	Priori
T3	Biopreparado 1	Biopreparado 1	Biopreparado 1	Biopreparado 1
T4	Biopreparado 2	Biopreparado 2	Biopreparado 2	Biopreparado 2
T5 (Test)	Cobrethane	Cobrethane		

- dds = días después de la siembra

### - Efecto en el desarrollo del cultivo y el rendimiento

Tanto los tratamientos con los fertilizantes foliares comerciales (T1, T2) como los tratamientos con el biofertilizante (T3, T4) tuvieron un buen desarrollo del cultivo, altura de planta, vigor y altos rendimientos. El testigo (T5), tuvo un menor desarrollo del cultivo y rendimiento muy bajo (Cuadro 1, Figura 1).

**Cuadro 1. Efecto de fertilizantes foliares comerciales y biofertilizantes en el desarrollo y rendimiento del cultivo de papa. Cultivar Runa Toralapa. Colomi, 2005.**

Tratamientos	Número de aplicaciones	Altura planta a floración (cm)	Rendimiento (t/ha)
T1=Fertilizante comercial (Crecifol)	4	130 b	32.0 a

T2=Fertilizante comercial (Kelpak)	4	140 a	33.0 a
T3= Biofertilizante	4	135 ab	32.5 a
T4= Biofertilizante (doble)	4	140 a	33.0 a
T5=Testigo	-	100 c	27.0 b

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).



**Figura 1.** Tratamiento con fertilizante comercial (T1, izquierda) y con biofertilizante (T3, derecha), mostrando un buen desarrollo y vigor de las plantas. Cultivar Runa Toralapa. Colomi, 2005.

## - CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el desarrollo del cultivo, lo cual permitió una buena evaluación de los tratamientos.
- ◆ Tanto los tratamientos con los fertilizantes foliares comerciales (T1,T2) como los tratamientos con el biofertilizante (T3, T4) tuvieron un buen desarrollo del cultivo y altos rendimientos. El tratamiento Testigo presentó menor desarrollo y rendimiento bajo. Por lo tanto, el uso de biofertilizantes se constituye en una alternativa para el manejo del cultivo de la papa..

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica ,Lima - Perú. 643 p.
- CONSEJO NACIONAL DE SEMILLAS (CNS). 1990. Semillas Bolivianas Vol I. Cochabamba, Bolivia

FERNANDEZ\_NORTHCOTE.E.N., NAVIA, O., and GANDARILLAS,A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35 (3): 137-149

FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N.; NAVIA, O. GANDARILLAS, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11: 1-25.

## **EFECTO DE MICORRIZAS (*Glomus fasciculatum*) EN EL CULTIVO DE CEBOLLA**

Responsable : **Oscar Navia y Noel Ortuño.**

### **Introducción**

Una transición exitosa del sistema agrícola convencional basado en la aplicación de productos químicos (fertilizantes y plaguicidas) al de una agricultura sustentable dependerá de lo que los agricultores puedan hacer para proteger la salud del agricultor y el medio ambiente, así como para mejorar y mantener la calidad de los suelos, el cuál se constituye en la llave para el desarrollo de un sistema agrícola sostenible.

Con el fin de mejorar y mantener la calidad de los suelos es necesario implementar alternativas fiables y sostenibles como la utilización de abonos y biofertilizantes en combinación con microorganismos benéficos para las plantas. Las micorrizas son microorganismos que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de la micorrizas ha venido ganando aceptación en la última década y están siendo utilizados en muchos cultivos a nivel mundial.

En este contexto, para realizar nuevas innovaciones en el manejo integrado del cultivo de cebolla y en un contexto más amplio de un manejo más sostenible, en el presente trabajo se estudió el efecto de micorrizas sobre el desarrollo del cultivo de cebolla.

### **Objetivos**

Evaluar el efecto de Micirrizas en el desarrollo del cultivo de cebolla.

### **Materiales y Métodos**

El ensayo se estableció en la zona de La Villa, Provincia Punata (2700 msnm) del Departamento de Cochabamba, caracterizada por ser zona productora de cebolla. Se utilizó el diseño de bloques completos al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Se utilizó el cultivar Criolla Roja, muy difundida en la zona.

Los tratamientos fueron: T1= Micorrizas (inmersión de plántulas al transplante), T2= Micorrizas (aspersión al cuello de la planta después del transplante) T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea). La dosis de aplicación de la micorriza fue, por aspersión a la dosis de 15 kg/200 litros agua/ha, y por inmersión a la dosis de 15 kg/15 litros agua/ha. La dosis de urea utilizada por el agricultor fue de 100 kg/ha.

La unidad experimental tuvo 18 surcos de 15 m de largo, siendo la distancia entre surcos de 0.2 m, la distancia entre plantas 0.1 m y un área total de 672 m<sup>2</sup>. La distancia entre bloques, fue de 1.0 m. Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones tanto del desarrollo del cultivo como el rendimiento.

## Resultados y discusión

### - Efecto de los tratamientos en el ciclo del cultivo

Tanto la aplicación de micorrizas por inmersión de plántulas al transplante (T1) como la aplicación por aspersión al cuello de la planta después del transplante (T2), mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo de la cebolla, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta y mayor vigor con respecto al tratamiento Testigo (T3). El testigo (práctica del agricultor) mostró un menor desarrollo a pesar de haber recibido la incorporación de fertilizante químico úrea. (Cuadro 1).

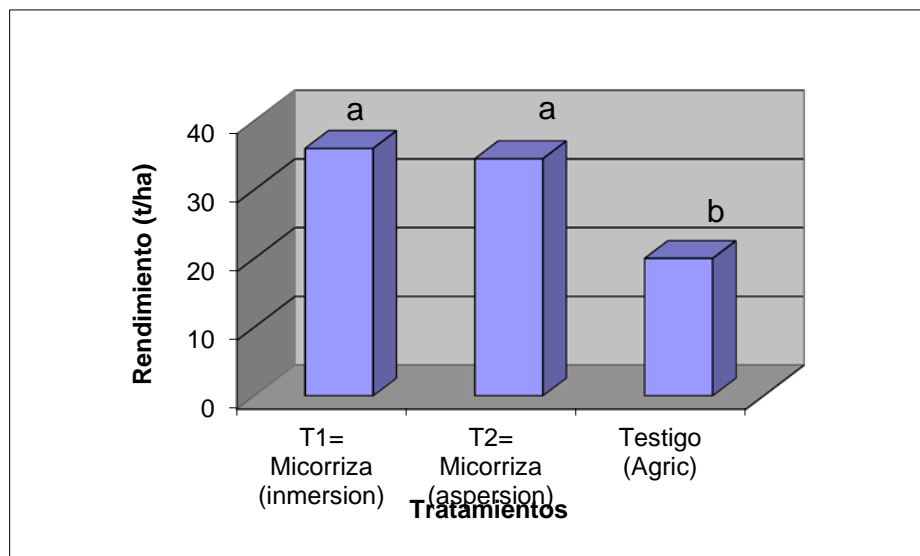
**Cuadro 1.** Efecto de la incorporación de **Micorrizas** en el desarrollo del cultivo de la cebolla. Cultivar Criolla Roja. La Villa, 2005.

Tratamientos	Prendimiento al transplante (%)	Altura planta al Primer aporque (cm)	Altura planta (a los 90 días) (cm)	Grosor del cuello de la planta (cm)
T1= Micorrizas (inmersión de plántulas al transplante)	100 a*	17 a	82 a	1.8 a
T2= Micorrizas (aspersión al cuello de la planta después del transplante)	100 a	15 a	78 a	1.6 a
T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea)	97 a	7 b	40 b	0.8 b

\* Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

### - Rendimiento

En general se obtuvieron altos rendimientos (bulbo más follaje). La aplicación de micorrizas, tanto por inmersión al transplante (T1) como la aplicación al cuello de la planta después del transplante (T2), tuvieron los mayores rendimientos, mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento testigo (práctica del Agricultor). El testigo (con aplicación de úrea), mostró un rendimiento bajo (Figura 2). Los tratamientos con micorrizas, T1 y T2, mostraron incrementos en los rendimientos de 80 y 72 % más, respectivamente, con respecto al tratamiento Testigo.



**Figura 1.** Rendimiento (t/ha), bajo tres tratamientos de manejo del cultivo de cebolla.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ).



**Figura 2.** Tratamientos con Micorrizas (T1, T2) mostrando plantas vigorosas, de buen desarrollo y alto rendimiento en comparación con plantas del tratamiento testigo (T3).

## Conclusiones

Las Micorrizas, incorporadas tanto por inmersión como por aspersión, mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor y mayores rendimientos con respecto al tratamiento testigo (práctica Agricultor).

Este efecto se debe a que las micorrizas son agentes que mejoran la nutrición de la planta. Aumentan la superficie de absorción de nutrientes, aumenta la capacidad de las raíces para obtener nutrientes, especialmente fósforo, pero también potasio, nitrógeno, calcio, magnesio, zinc, cobre, boro y molibdeno.

Por lo tanto, las micorrizas son una alternativa importante para tener un manejo del cultivo de cebolla más sostenible y sensible con el medio ambiente y la salud del agricultor.

## **Evaluación de diferentes dosis de Vigortop (vigorizante foliar) en el cultivo de quinua**

**Responsables: Oscar Navia, Oscar Oruña, Noel Ortuño**

En Bolivia existen movimientos ecológicos que fortalecen estos principios y ha llegado a constituirse en una necesidad de Estado. Esto motiva a sectores de la sociedad agrícola quienes demandan la necesidad de producir alimentos sin tóxicos, además que genera un ingreso importante para los productores del Altiplano.

Por esas razones, es necesario desarrollar tecnología que apoye una producción ecológica, como los biofertilizantes foliares, permitiendo así disminuir efectos nocivos al medio ambiente, producir alimentos sin contaminantes y bajar costos de producción para los pequeños agricultores.

Por otra parte, experimentos realizados por PROINPA durante varias campañas agrícolas en diferentes zonas del país han permitido desarrollar bioinsumos (biofertilizantes sólidos, biofertilizantes líquidos, promotores de crecimiento, biofungicidas, bioinsecticidas).

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se determinó el efecto y la dosis de biofertilizantes foliares (VIGORTOP) en el desarrollo y rendimiento del cultivo de quinua.

### **Objetivo**

- Determinar el efecto y la dosis adecuada y económica del vigorizante foliar Vigortop, en el desarrollo y rendimiento del cultivo de la quinua.

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **Localización.**

El ensayo se implementó en la comunidad de Amachuma (3447msnm) perteneciente al Municipio de Challapata de la Provincia Eduardo Avaroa del Departamento de Oruro, zona caracterizada por presentar condiciones climáticas favorables para la producción de quinua orgánica.

#### **Procedimiento experimental.**

El ensayo se estableció con el cultivar Pandela rojo, que tiene muy buenas características en cuanto a la producción de grano. El diseño que se utilizó fue el de bloques completos al azar con 5 tratamientos y tres repeticiones.

### Características de las parcelas.

Distancia entre surcos	=	0,9 m
Distancia entre plantas	=	0,9 m
Área de las parcelas	=	8000 m <sup>2</sup>

### Tratamientos.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat.	Producto	dosis 20 l agua
T1	Vigortop	4l
T2	Vigortop	3l
T3	Vigortop	2l
T4	Vigortop	1l
T5	Testigo	

La aplicación del Vigortop (Vigorizante foliar) se realizó por aspersión al follaje de la planta. Se realizaron 3 aplicaciones, en las primeras fases del cultivo

Estos tratamientos, fueron aplicados de acuerdo a la siguiente estrategia:

- Estrategia de aplicaciones:

Emerg.	Días después (d)			120
	30 -45 d*	65-70 d*	90 d*	
	8 hojas verdaderas	inicio panojamiento	inicio floración	
Productos	Vigortop	Vigortop	Vigortop	

\* Dependiendo de las condiciones climática

### Evaluación:



Durante el ciclo del cultivo, se realizaron evaluaciones del desarrollo de las plantas de quinua (tamaño área foliar, etc.) y de rendimiento. En la cosecha se evaluaron los dos surcos centrales de cada unidad experimental eliminando los surcos laterales y descartándoles las plantas de los extremos para evitar efectos de borduras.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las condiciones medio ambientales durante el ciclo del cultivo, fueron muy favorables para el cultivo de la quinua. Las temperaturas fueron, -7 y 27,2 °C, mínima y máxima,(Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Medias de temperatura y precipitación acumulada registrada durante el ciclo del cultivo de la quinua. Challapata, Oruro 2010-2011

Mes	Temperatura		Precip. (mm)	Precip. max 24Hrs	Días con Lluvia	Evap. (mm)
	Máxima	Mínima				
AGO	21,9	-11,0	12,3	12,3	1	5,6
SEP	23,0	-7,1	14,4	9,3	3	5,2
OCT	24,0	-7,0	24,7	11,0	5	6,3
NOV	25,3	-5,0	0,0	0,0	0	7,1
DIC	27,2	-0,5	48,3	12,0	12	6,8
ENE	25,5	0,9	15,5	5,6	9	5,7
FEB	21,8	2,2	169,1	35,6	17	4,5
MAR	24,5	0,5	39,3	25,0	5	5,4
ABR	23,1	-5,0	21,8	19,1	3	5,1

Fuente: SENAMI Oruro

### Efecto de los tratamientos en el desarrollo y el rendimiento del cultivo de quinua.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento T1 (Vigortop 4l/20l agua), seguido de los T2 (Vigortop 3l/20l agua), T3 (Vigortop 2l/20l agua) y T4 (Vigortop 1l/20l agua), tuvieron un efecto altamente positivo en el desarrollo y la producción del cultivo de quinua. Las parcelas mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mayor tamaño de las plantas, mayor diámetro de panoja, mayor largo de las panojas, mayor sanidad de las plantas, y mayores rendimientos con respecto al tratamiento T5 ( Testigo) (Cuadros 2 y Figura 1).

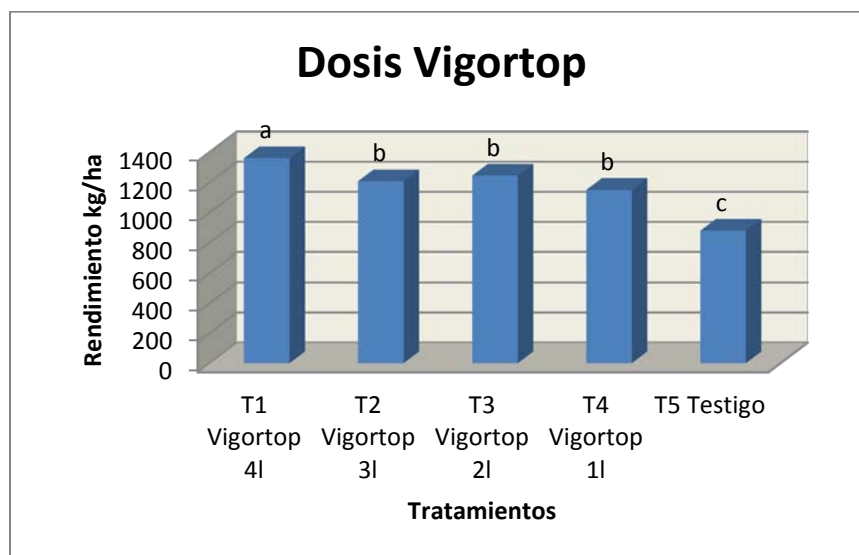
**Cuadro 2.** Efecto de los tratamientos en el desarrollo y el rendimiento de la quinua. Challapata

Tratamientos	Al planta	Largo panoja	Diámetro panoja	Rendimiento	Rendimiento
--------------	-----------	--------------	-----------------	-------------	-------------

	(cm)	(cm)	(cm)	Kg/ha	qq/ha
T1= Vigortop (4l/ha)	88,08	22,00	4,84	1.341,67	29,17 a
T2= Vigortop (3 l/ha)	87,58	20,34	5,25	1.207,67	26,25 b
T3= Vigortop (2 l/ha)	91,50	20,35	4,73	1.245,00	27,07 b
T4= Vigortop (1 l/ha)	81,50	24,00	4,43	1.149,67	24,99 b
T5= Testigo	70,99	22,45	3,36	878,00	19,09 c

### Rendimiento.

En general se tuvieron altos rendimientos. El mayor rendimiento se obtuvo con el tratamiento T1 = (Vigortop 4l/agua), seguido de los tratamientos T2 (Vigortop 3l/20l agua), T3 (vigortop 2l/20l agua) y T4 (Vigortop 1l/20l agua), mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento T5 (Testigo). El Testigo, mostró un rendimiento bajo (Figura). Con los tratamientos de diferentes dosis de Vigortop T1, T2, T3 y T4 se obtuvieron incrementos de 52, 48, 45 y 40 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (T5) (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto de la diferentes dosis de Vigortop en el desarrollo y rendimiento (Kg/ha) del cultivo de quinua

### CONCLUSIONES

Las condiciones climáticas fueron favorables para el cultivo de quinua

Todos los tratamientos tuvieron un buen desarrollo y rendimiento. El mayor rendimiento se obtuvo

con el tratamiento T1 (Vigortop 4l/20lagua) con diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos (T2, T3, T4). El testigo (T5), presentó rendimientos bajos. Desde el punto de vista de eficiencia y económico, se recomienda utilizar la dosis de 1 l/ 20 litros de agua.

Los resultados obtenidos muestran que VIGORTOP, tuvo un efecto positivo en el desarrollo y rendimiento de quinua.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Navia, O.; Pozo, J.L.; Ortuño, N.; Meneses, E.; Arce, W. 2010. Incorporación de bioinsumos en base a microorganismos benéficos en la producción orgánica de quinua. Memorias: Congreso Mundial de la Quinua 2010. Oruro, Bolivia.
2. Ortuño, N.; Navia, O.; Medrano, A.; Rojas, K.; y Torrico, L. (2010) Desarrollo de bioinsumos: Un aporte a la soberanía alimentaria de Bolivia. En revista de Agricultura. Numero 47. Cochabamba. UMSS. FCAYP. Fundación Proinpa.

### **EFECTO DE Fertitrap EN EL CULTIVO DE CEBOLLA**

**Responsables:** Oscar Navia y Noel Ortuño.

#### **Introducción**

Una transición exitosa del sistema agrícola convencional basado en la aplicación de productos químicos (fertilizantes y plaguicidas) al de una agricultura sustentable dependerá de lo que los agricultores puedan hacer para proteger la salud del agricultor y el medio ambiente, así como para mejorar y mantener la calidad de los suelos, el cuál se constituye en la llave para el desarrollo de un sistema agrícola sostenible.

Con el fin de mejorar y mantener la calidad de los suelos es necesario implementar alternativas fiables y sostenibles como la utilización de abonos y biofertilizantes en combinación con microorganismos benéficos para las plantas. Las Fertitrap son microorganismos que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de la Fertitrap ha venido ganando aceptación en la última década y están siendo utilizados en muchos cultivos a nivel mundial.

En este contexto, para realizar nuevas innovaciones en el manejo integrado del cultivo de cebolla y en un contexto más amplio de un manejo más sostenible, en el presente trabajo se estudió el efecto de Fertitrap sobre el desarrollo del cultivo de cebolla.

#### **Objetivos**

Evaluar el efecto de Fertitrap en el desarrollo del cultivo de cebolla.

## Materiales y Métodos

El ensayo se estableció en la zona de La Villa, Provincia Punata (2700 msnm) del Departamento de Cochabamba, caracterizada por ser zona productora de cebolla. Se utilizó el diseño de bloques completos al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Se utilizó el cultivar Criolla Roja, muy difundida en la zona.

Los tratamientos fueron: T1= Fertitrap (inmersión de plántulas al transplante), T2= Fertitrap (aspersión al cuello de la planta después del transplante) T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea). La dosis de aplicación de la Fertitrap fue, por aspersión a la dosis de 15 kg/200 litros agua/ha, y por inmersión a la dosis de 15 kg/15 litros agua/ha. La dosis de urea utilizada por el agricultor fue de 100 kg/ha.

La unidad experimental tuvo 18 surcos de 15 m de largo, siendo la distancia entre surcos de 0.2 m, la distancia entre plantas 0.1 m y un área total de 672 m<sup>2</sup>. La distancia entre bloques, fue de 1.0 m. Durante el ciclo del cultivo, se hicieron evaluaciones tanto del desarrollo del cultivo como el rendimiento.

### Resultados y discusión

#### - Efecto de los tratamientos en el ciclo del cultivo

Tanto la aplicación de Fertitrap por inmersión de plántulas al transplante (T1) como la aplicación por aspersión al cuello de la planta después del transplante (T2), mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo de la cebolla, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta y mayor vigor con respecto al tratamiento Testigo (T3). El testigo (práctica del agricultor) mostró un menor desarrollo a pesar de haber recibido la incorporación de fertilizante químico úrea. (Cuadro 1).

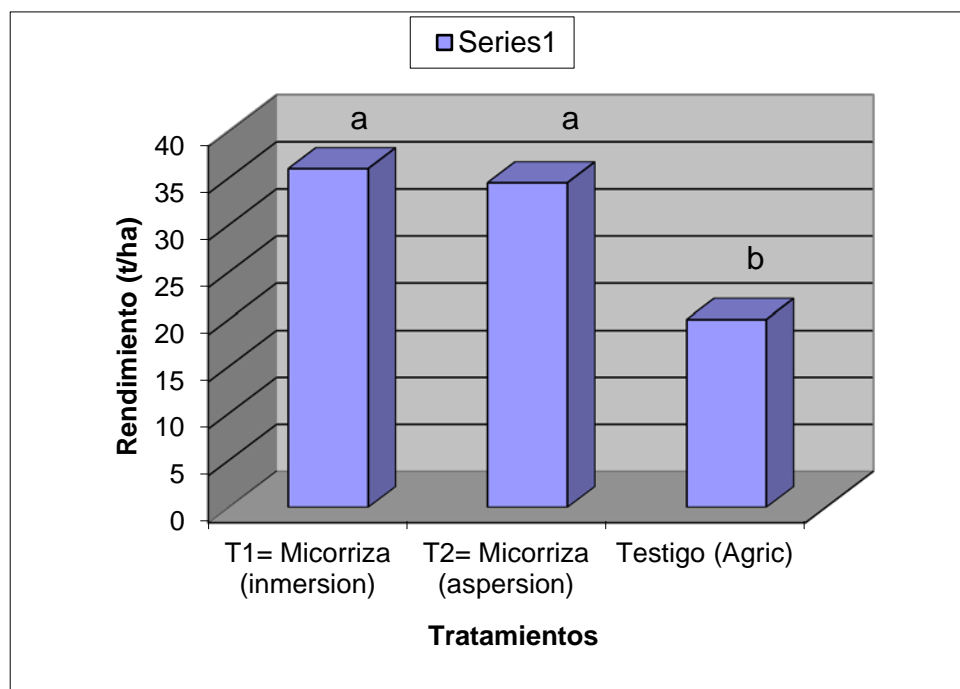
**Cuadro 1.** Efecto de la incorporación de **Fertitrap** en el desarrollo del cultivo de la cebolla. Cultivar Criolla Roja. La Villa.

Tratamientos	Prendimiento al transplante (%)	Altura planta al Primer aporque (cm)	Altura planta (a los 90 días) (cm)	Grosor del cuello de la planta (cm)
T1= Fertitrap (inmersión de plántulas al transplante)	100 a*	17 a	82 a	1.8 a
T2= Fertitrap (aspersión al cuello de la planta después del transplante)	100 a	15 a	78 a	1.6 a
T3= Testigo (práctica Agricultor, aplicación de Urea)	97 a	7 b	40 b	0.8 b

\* Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

#### - Rendimiento

En general se obtuvieron altos rendimientos (bulbo más follaje). La aplicación de Fertitrap, tanto por inmersión al transplante (T1) como la aplicación al cuello de la planta después del transplante (T2), tuvieron los mayores rendimientos, mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento testigo (práctica del Agricultor). El testigo (con aplicación de úrea), mostró un rendimiento bajo (Figura 2). Los tratamientos con Fertitrap, T1 y T2, mostraron incrementos en los rendimientos de 80 y 72 % más, respectivamente, con respecto al tratamiento Testigo.



**Figura 1.** Rendimiento (t/ha), bajo tres tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. La Villa.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).



## **CONCLUSIONES**

Las Fertitrap, incorporadas tanto por inmersión como por aspersión, mostraron significativamente un mayor desarrollo del cultivo, mayor uniformidad en desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor y mayores rendimientos con respecto al tratamiento testigo (práctica Agricultor).

Este efecto se debe a que las Fertitrap son agentes que mejoran la nutrición de la planta. Aumentan la superficie de absorción de nutrientes, aumenta la capacidad de las raíces para obtener nutrientes, especialmente fósforo, pero también potasio, nitrógeno, calcio, magnesio, zinc, cobre, boro y molibdeno.

Por lo tanto, las Fertitrap son una alternativa importante para tener un manejo del cultivo de cebolla más sostenible y sensible con el medio ambiente y la salud del agricultor.

**Evaluación del fungitop para el control del mildio de la cebolla (*Peronospora destructor*).**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia .

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja  
**Instituciones colaboradoras o socias:** IP-Holanda

## **COMPENDIO**

Para determinar la eficiencia del eco-fungicida de contacto FUNGITOP para el control del mildio de la cebolla, se estableció un ensayo en la zona de La Villa (Punata, Cochabamba) bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Se utilizó el cultivar Criolla Roja, susceptible al mildio y el más difundido en la zona. Los tratamientos fueron T1 (FUNGITOP, 0.6 l/20 l agua), T2 (FUNGITOP, 0.5 l/20 l agua), T3 (FUNGITOP, 0.4 l/20 l agua), T4 (Acoidal), T5 (Testigo). Los tratamientos con FUNGITOP tuvieron un control eficiente de la enfermedad y altos rendimientos con respecto a los otros tratamientos y al testigo. Los resultados muestran que el eco-fungicida FUNGITOP fue eficiente en el control del mildio de la cebolla.

**Palabras claves:** Mildio, *Peronospora destructor*, estrategias, FUNGITOP

## **1. INTRODUCCION**

La cebolla es un cultivo ampliamente difundido en todo el mundo. En Bolivia, el cultivo de la cebolla es de gran importancia involucrando a un gran número de familias, y es un negocio que mueve aproximadamente 10 millones de dólares al año (FDTA Valles, 2004). La oferta de cebolla en Bolivia proviene principalmente de la propia producción, la que está concentrada en los valles del país y en algunas zonas altas con condiciones especiales (Paria y Tolapalca en Oruro). Los departamentos de Cochabamba, Tarija, Chuquisaca y Santa Cruz son los principales proveedores.

Por otra parte, el FUNGITOP es un ecofungicida utilizado para el control de manchas foliares y mildius en diferentes cultivos, como cebolla, papa, locoto, durazno y vid (PROINPA, 2009).

Para realizar nuevas innovaciones en el manejo de las hortalizas, y en particular del cultivo de cebolla, en el presente trabajo se estudió la eficacia del ecofungicida **FUNGITOP** para el control del mildio de la cebolla (*Peronospora destructor*).

## OBJETIVOS

- g) Evaluar la eficiencia del ecofungicida **FUNGITOP** (Polisulfitos 90 % + extracto plantas AS 10%) para el control del mildio de la cebolla (*Peronospora destructor*).
- h) Evaluar fitotoxicidad.

## 5. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Características del Mildio (*Peronospora destructor* o *schleiden*)

En las hojas nuevas aparecen unas manchas alargadas que se cubren de un fieltro violáceo. El tiempo cálido y húmedo favorece el desarrollo de esta enfermedad, como consecuencia, los extremos superiores de las plantas mueren totalmente y los bulbos no pueden llegar a madurar. Si las condiciones de humedad se mantienen altas darán lugar a una epidemia. Esta enfermedad se propaga por los bulbos, renuevos infectados, semillas o por el suelo (Infoagro, 2004).

### 2.2. Métodos de control

Medidas culturales. Se recomienda los suelos ligeros, sueltos y bien drenados. Evitar la presencia de malas hierbas, así como una atmósfera estancada alrededor de las plantas. Se evitará sembrar sobre suelos que recientemente hayan sido portadores de un cultivo enfermo.

#### Control químico

Muchos autores recomiendan que es muy conveniente el empleo de fungicidas como medida preventiva o bien al comienzo de los primeros síntomas de la enfermedad. La frecuencia de los tratamientos debe de ser en condiciones normales de 12-15 días. Si durante el intervalo que va de tratamiento a tratamiento lloviese debe aplicarse otra pulverización inmediatamente después de la lluvia (Terranova, 1995).

#### Tipos de fungicidas utilizados para el control del mildio:

Dos tipos de fungicidas son utilizados para el control químico del mildio, los de contacto (más propiamente no sistémicos) llamados también residuales, y los sistémicos (Fernández-Northcote et al, 2000).

Los fungicidas de contacto afectan las estructuras del patógeno en la superficie de la planta actuando en sus fases de germinación y penetración. Con los fungicidas de contacto es muy necesario mantener una capa apropiada del fungicida en el follaje tanto en el haz (cara superior) como en el envez (cara inferior) de la hoja. Se necesita bañar toda la parte área de la planta. Su acción será efectiva mientras persistan en la hoja y mientras no sean lavados por la lluvia, es decir tengan una buena tenacidad.

Los fungicidas sistémicos penetran en la planta y se movilizan translaminarmente del haz al envez o viceversa y luego del punto donde cayeron hacia arriba de la planta es decir tienen un movimiento acropétralo. Solo algunos de los fungicidas sistémicos que se utilizan para el control del mildio, se movilizan también basipétalmente es decir de donde penetra hacia abajo de la planta. Luego de su aplicación el fungicida sistémico penetra a

la planta y se moviliza acropétalmente aún hacia partes de la planta en donde no hubo depósito de la aplicación.

### 2.3. FUNGITOP

FUNGITOP Es un ecofungicida que actúa por contacto. Controla manchas foliares, mildius y oidio en cultivos de hortalizas (cebolla,tomate), frutales (durazno, vid, manzano), papa y ornamentales (PROINPA, 2009).

#### COMPOSICIÓN:

Polisulfitos.....	90 %
Extracto de plantas AAS.....	10 %
TOTAL .....	100.00 %

FUNGITOP, es un ecofungicida de contacto para el control de enfermedades en plantas. .Al ser un ecofungicida de contacto, solo afecta las estructuras del patógeno en la superficie de la planta actuando en sus fases de germinación y penetración. Con los fungicidas de contacto es muy necesario mantener una capa apropiada del fungicida en el follaje tanto en el haz (cara superior) como en el envez (cara inferior) de la hoja. Se necesita bañar toda la parte área de la planta. Su acción será efectiva mientras persistan en la hoja y mientras no sean lavados por la lluvia, es decir tengan una buena tenacidad.

Controla manchas foliares, mildius y oidio en cultivos de hortalizas (cebolla,tomate), frutales (durazno, vid, manzano), papa y ornamentales.

## 3 . MATERIALES Y METODOS

### 3.4. Localización

El ensayo se estableció en la localidad de La Villa (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba. Esta zona esta caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de cebolla y la incidencia del mildio .

### 3. 2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima, donde las lecturas se realizaron cada día:

### 3. 3. Materiales

#### 3. 3. 1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Criolla Roja , que es susceptible al mildio y es el más difundido en la zona .

#### 3. 3. 2. Productos

Se utilizó el eco- fungicida de contacto FUNGITOP y el fungicida Acoidal (Azufre 80 %).

### 3. 4. Procedimiento experimental



El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

### Características de la unidad experimental

Distancia entre surcos	=	0.2 m
Distancia entre plantas	=	0.1m
Largo del surco	=	10 m
N° de surcos /unid. exp.	=	15
Area de la unid. Exp.	=	30 m <sup>2</sup>
Distancia entre unid. exp.	=	1.0m
Area total del ensayo	=	817 m <sup>2</sup>

### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis
1	FUNGITOP	0.6 (litros/ 20 l agua)
2	FUNGITOP	0.5 (litros/ 20 l agua)
3	FUNGITOP	0.4 (litros/ 20 l agua)
4	Acoidal (Producto comercial)	0.1 (kg/20 l agua)
5	Testigo	-

La estrategia de control fué la standard para cultivares susceptibles, que consiste en realizar aplicaciones preventivas a los 15-30 días después del transplante. Es decir, antes de que aparezca el mildio. Las restantes aplicaciones se realizó con una frecuencia de 7 - 14 días según las condiciones climáticas muy favorables a poco favorables.

- Estrategia de control químico del mildio para cultivares susceptibles:

Transplante	Días después (d)					
	15 d	7-14 d*	7-14 d	7-14 d	7-14 d	7-14 d
Fungicidas	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida

\* Dependiendo de las condiciones climáticas

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, cada siete días se determinó el grado de daño o porcentaje de follaje afectado por mildio, para lo cual se utilizó la siguiente escala, modificado de la escala internacional del CIP (1-9) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Escala usada para la evaluación del mildio de la cebolla en el campo.

Escala	Promedio	% Area Afectada	Descripción de daños
1	0	0.0	No se observa ninguna lesión.
2	1.55	0.1-3	Muy pocas plantas con una lesión dentro de una parcela grande. No más de diez lesiones por planta.
3	6.55	3.1-10	Hasta 30 lesiones pequeñas por planta ó hasta una lesión por cada 20 folíolos.
4	17.55	10.1-25	La mayoría de las plantas están visiblemente afectadas. Pocas lesiones múltiples por folíolo.
5	37.55	25.1-50	Casi todos los folíolos con lesiones. La parcela luce a verde pero todas las plantas están afectadas.
6	62.55	50.1-75	La parcela luce verde con manchas pardas. Las hojas de la mitad inferior de la planta están destruidas.
7	82.55	75.1-90	La parcela no está predominantemente verde ni parda. Sólo las hojas superiores están verdes.
8	93.55	90.1-97	La parcela se ve parda. Unas cuantas hojas superiores aún presentan algunas áreas verdes.
9	98.55	97.1-100	Todas las hojas y tallos están muertos

En la cosecha se evaluaron los dos surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de fungicidas. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

### 3.6. Análisis estadístico

Con los datos de las evaluaciones del grado de daño se determinó la curva de progreso de la enfermedad, utilizando para fines de graficación, no el grado de la escala, si no el porcentaje promedio del follaje afectado correspondiente al grado de daño. Se calculó además el AUDPC ("Area Under Disease Progress Curve" ó Area debajo de la curva de progreso de la enfermedad mediante la fórmula descrita por Shaner y Finney para obtener un solo dato para comparación estadística.

Donde

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n ((X_{i+1} + X_i) / 2) * (T_{i+1} - T_i)$$

Xi = Proporción del tejido afectado en la observación i.  
 Ti+1-Ti = Tiempo en días entre dos lecturas  
 n = Número total de observaciones  
 $\Sigma$  = Sumatoria

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05), con los datos de grado de daño y rendimiento.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 2). Por lo tanto, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo de cebolla y para la incidencia del mildio.

**Cuadro 2. Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de cebolla. La Villa, Punata, Cochabamba.**

Mes	Temperatura °C			Precipitación
	Máxima	Mínima	Ambiente	mm
Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
<b>Total</b>				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

### 4.2. Aplicación de los productos

Según los tratamientos planteados, en total se realizaron seis aplicaciones en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (Cuadro 3). El tratamiento T5 (Testigo) recibió dos aplicaciones en momentos críticos. Las aplicaciones las realizó el agricultor en las dosis recomendadas.

**Cuadro 3. Inicio y frecuencia de aplicaciones bajo cinco tratamientos de control del mildio de la cebolla. La Villa, Punata.**

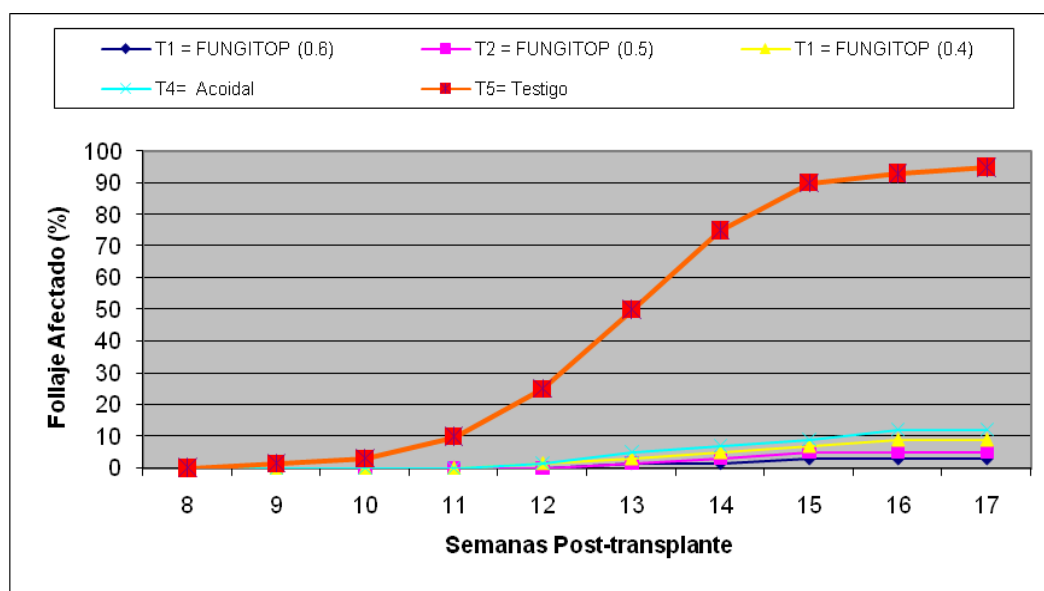
Trat.	Transplante	14 d	14 d	7 d	7 d	14 d	14 d
T1		FUNGITOP (0.6)	FUNGITOP (0.6)	FUNGITO P (0.6)	FUNGITO P (0.6)	FUNGITO P (0.6)	FUNGITO P (0.6)
T2		FUNGITOP (0.5)	FUNGITOP (0.5)	FUNGITO P (0.5)	FUNGITO P (0.5)	FUNGITO P (0.5)	FUNGITO P (0.5)
T3		FUNGITOP (0.4)	FUNGITOP (0.4)	FUNGITO P (0.4)	FUNGITO P (0.4)	FUNGITO P (0.4)	FUNGITO P (0.4)
T4		Acoidal	Acoidal	Acoidal	Acoidal	Acoidal	Acoidal
T5 (Test)		FUNGITOP	-	FUNGITO P	-	-	-

- d= Días después

### 4.3. Grado de daño

#### 4.3.1. Curva de Avance de la enfermedad

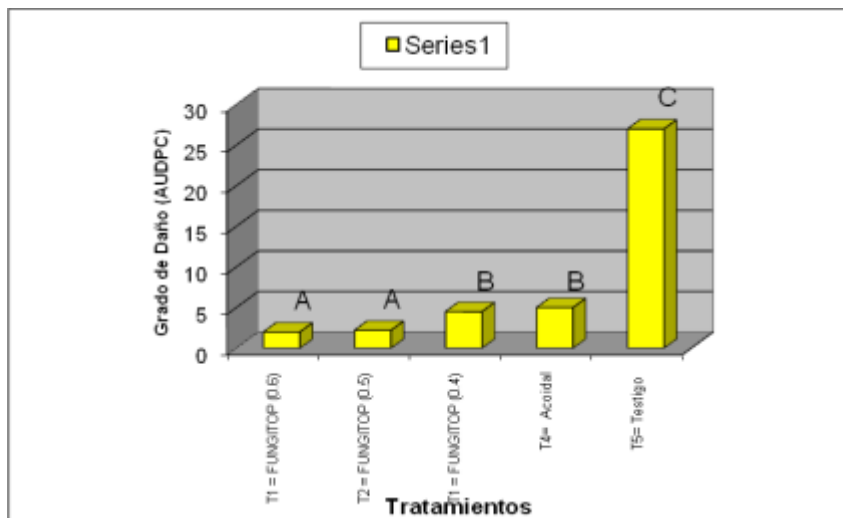
Los tratamientos tuvieron un control eficiente de la enfermedad. Los tratamientos con FUNGITOP, T1 y T2, tuvieron el control más eficiente de la enfermedad con respecto a los otros tratamientos (T3, T4) y al testigo. El testigo (T5) tuvo un porcentaje de daño muy alto (95 %). (Figura 1).



**Figura 1.** Avance de la enfermedad, bajo cinco tratamientos para el control del mildio de la cebolla. La Villa, Punata.

#### 4.3.2. Area debajo de la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC)

Los tratamientos T1 (FUNGITOP, 0.6 l/20 l agua) y T2 (FUNGITOP, 0.5 l/20 l agua) tuvieron el control más eficiente de la enfermedad mostrando valores muy bajos de AUDPC (grado de daño), con diferencia significativa con respecto a los tratamientos T3 (FUNGITOP, 0.4 l/20 l agua), T4 (Acoidal) y el Testigo. El testigo (T5), con dos aplicaciones, presentó valores muy altos de AUDPC (grado de daño)(Figura 2).

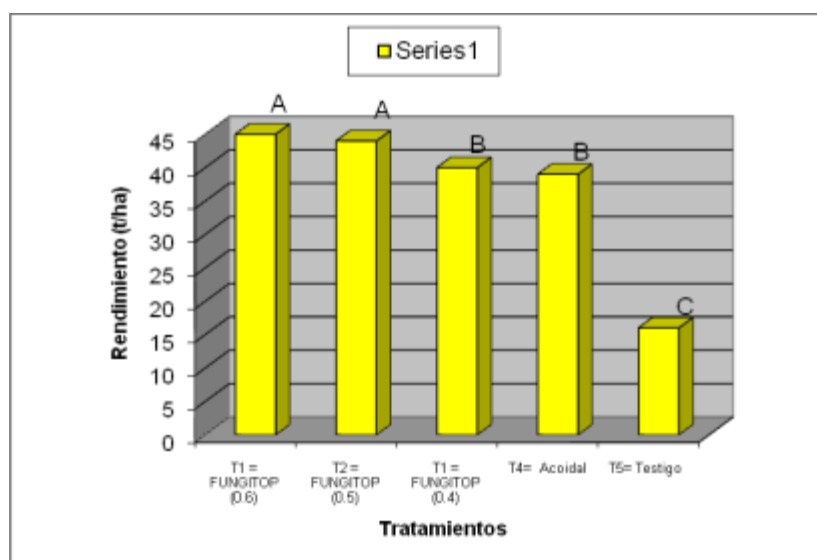


**Figura. 2.** Grado de daño (AUDPC), bajo cinco tratamientos para el control del mildío de la cebolla. La Villa, Punata.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

#### 4.4. Rendimiento

En la zona, la producción de cebolla se comercializa en verde, es decir la planta completa (bulbo más follaje). Por lo tanto, en rendimiento se consideran ambos componentes. En general, se obtuvieron altos rendimientos. Los mayores rendimientos, con diferencias estadísticas significativas, se obtuvieron con los tratamientos T1 (FUNGITOP, 0.6 l/20 l agua) y T2 (FUNGITOP, 0.5 l/20 l agua), seguidos de T3 (FUNGITOP, 0.4 l/20 l agua) y T4 (Acoidal). El testigo (T5), mostró un rendimiento bajo (Figura 3).



**Figura 3.** Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos de control del Mildio de la cebolla. La Villa, Punata.

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 4. Análisis de varianza para rendimiento, bajo cinco tratamientos de control del mildio de la cebolla.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	19.60	9.800	7.54	0.0144
Tratamientos	4	1700.40	425.100	327.00	0.000 **
Error	8	10.40	1.300		
No aditividad	1	5.39	5.395	7.54	0.0286
Residual	7	5.01	0.715		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>1730.40</b>			

CV = 3.10 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 5. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron muy favorables para el desarrollo del cultivo y la incidencia del mildio, lo cual permitió una buena evaluación de los tratamientos.

Los tratamientos T1 (FUNGITOP, 0.6 l/20 l agua) y T2 (FUNGITOP, 0.5 l/20 l agua), tuvieron un control más eficiente de la enfermedad mostrando valores muy bajos de AUDPC (grado de daño) y mayores rendimientos con respecto a los otros tratamientos y el testigo. El testigo (T5), mostró valores muy altos de AUDPC (grado de daño) y bajos rendimientos.

- ◆ Por lo tanto, el eco-fungicida FUNGITOP mostró ser eficiente en el control del mildio de la cebolla. Se recomienda la dosis de 0.5 l/20 l agua.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. Enfermedades de las plantas. Trad. Del inglés por Manuel Guzmán O. Segunda edición. Editorial Limusa. México D.F.
- CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica Lima - Perú. 643 p.
- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1996. Manejo Integrado de Plagas. Turrialba Costa Rica. Fitopatología 40: 24-34.
- FERNANDEZ\_NORTHCOTE, E.N., NAVIA, O., and GANDARILLAS, A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. Fitopatología 35 (3): 137-149
- FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N.; NAVIA, O. GANDARILLAS, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa 11: 1-25.

- FDTA - VALLES. 2004. El cultivo de la cebolla. [www.fdtavalles.org/publicaciones](http://www.fdtavalles.org/publicaciones)
- INFOAGRO. 2004. El cultivo de la cebolla. WWW.infoagro.com
- MONT KOC, R. 1993. Principios del control de enfermedades de las plantas. Editorial CPUNALM (Centro Pre-Universitario Nacional Agraria La Molina) 1ª. Edición.
- NAVIA, O., FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N. 1996. Estrategias de control químico del tizón, Ficha Técnica 2, Fitopatología. Programa de Investigación de la papa, (PROINPA). Cochabamba – Bolivia
- NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, N., CRESPO, C.; FRANCO, J. 2007. INTEGRACION DE RESISTENCIA SISTEMICA INDUCIDA Y ESTRATEGIAS DE MANEJO INTEGRADO DEL TIZON DE LA PAPA Y DEL TOMATE (*Phytophthora infestans*) PARA UNA AGRICULTURA SOSTENIBLE. En: Memorias XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología – XXXIV Congreso Mexicano de Fitopatología- XLVII Anual Meeting of the American Phytopathological Society. Cancùn, México. Mayo 2007. pp. 76-77.
- NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, N., FRANCO, J. ; ARDAYA, J. 2007. EFECTO DE LA INCORPORACION DE *Bacillus subtilis*, *Bacillus amiloliquefasciens* Y MICORRIZAS EN EL MANEJO SOSTENIBLE DEL CULTIVO DE DURAZNO (*Prunus persica* Sieb). En: Memorias XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología – XXXIV Congreso Mexicano de Fitopatología- XLVII Anual Meeting of the American Phytopathological Society. Cancùn, México. Mayo 2007. pp. 200-201.
- NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, O. 2006. El control de enfermedades, desde los fungicidas hasta los biopesticidas. Enfermedades: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control de enfermedades. En: Memorias IV Congreso Boliviano de Protección Vegetal. Oruro, Bolivia. Abril 2006. pp. 215- 225.
- PROINPA. 2009. Ecofungicida FUNGITOP. Catalogo de bioinsumos. Cochabamba, Bolivia.
- TERRANOVA. 1995. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Bogota, Colombia, Terranova Editores Ltda. 552p.

## Evaluación de Fertitrap en el cultivo de cebolla

**RESPONSABLE:** Oscar Navia, Edson Meneses, Daniel Barja  
**COMPENDIO**

Para determinar la eficiencia del biofungicida-biofertilizante para transplante FERTITRAP (*Bacillus subtilis* 5% + *Glomus fasciculatum* 37.5% + *humus* 57.5%) para el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) del cultivo de cebolla., se estableció un ensayo en la zona de La Villa (Cochabamba) bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos. Se utilizó el cultivar Criolla. Los tratamientos fueron T1 ( FERTITRAP, 25 kg/ha), T2 (FERTITRAP, 20 kg/ha), T3 (FERTITRAP, 15 kg/ha), T4 (Divident), T5 (Testigo). La aplicación del producto se realizó al transplante. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 (FERTITRAP, 45 Kg/ha) y T2 (40 Kg/ha), mostrando menores valores de incidencia e intensidad de daño de las enfermedades, un mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, con respecto a los otros tratamientos y el testigo. Por los resultados obtenidos, el biofungicida-biofertilizante FERTITRAP, mostró ser eficiente en el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) y en el mayor desarrollo del cultivo de cebolla.

**Palabras claves:** FERTITRAP, *Bacillus subtilis*, *Glomus fasciculatum* , Cebolla, *Fusarium sp.*

### 1. INTRODUCCION



Una transición exitosa del sistema agrícola convencional basado en la aplicación de productos químicos (fertilizantes inorgánicos y plaguicidas) al de una agricultura sustentable dependerá de lo que se pueda hacer para proteger la salud del agricultor, su familia, y el medio ambiente, así como para mantener y mejorar la calidad de los suelos, el cuál se constituye en la llave para el desarrollo de un sistema agrícola sostenible.

Con el fin de mejorar y mantener la calidad de los suelos es necesario implementar alternativas fiables y sostenibles como la utilización de biofertilizantes, para una producción más económica de los cultivos y que redunden en la conservación y fertilidad de los suelos agrícolas.

Actualmente, surge la alternativa de la utilización de biofertilizantes en combinación con microorganismos naturales del suelo que son benéficos para las plantas. Entre estos, tenemos a las rizo-bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), los cuales son microorganismos de vida libre que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces. El concepto de PGPR ha venido ganando aceptación en la última década y están siendo utilizados en muchos cultivos a nivel mundial. Asimismo, es fundamental, la utilización de biofungicidas y bioinsecticidas para el control de enfermedades y plagas que afectan a los cultivos.

Por otra parte, la cebolla es un cultivo ampliamente difundido en todo el mundo. En Bolivia, el cultivo de la cebolla es de gran importancia involucrando a un gran número de familias, y es un negocio que mueve aproximadamente 10 millones de dólares al año (FDTA Valles, 2004). La oferta de cebolla en Bolivia proviene principalmente de la propia producción, la que está concentrada en los valles del país y en algunas zonas altas con condiciones especiales (Paria y Tolapalca en Oruro). Los departamentos de Cochabamba, Tarija, Chuquisaca y Santa Cruz son los principales proveedores.

Para realizar nuevas innovaciones en el manejo de las hortalizas y en particular del cultivo de cebolla, en el presente trabajo se estudió la eficacia del biofungicida-biofertilizante para transplante FERTITRAP (*Bacillus subtilis* 5% + *Glomus fasciculatum* 37.5 % + *humus* 57.5%) para el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) y el desarrollo del cultivo de cebolla.

## **OBJETIVOS**

- i) Evaluar la eficiencia del biofungicida-biofertilizante para transplante FERTITRAP (*Bacillus subtilis* 5% + *Glomus fasciculatum* 37.5 % + *humus* 57.5%) para el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) y el desarrollo del cultivo de cebolla.
- j) Evaluar fitotoxicidad.

## 6. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. El cultivo de cebolla

Se trata de un cultivo muy extendido por todo el mundo, pues hay gran número de cultivares con distinta adaptación a las diferencias de climatología que influyen en su vegetación. A pesar de ello no todos los países cubren sus necesidades, y han de importar una parte de su consumo. La superficie total plantada de cebolla en el mundo asciende a más de 2 millones de hectáreas, produciéndose 32.5 millones de toneladas. En la Unión Europea se producen anualmente unos 3 millones de toneladas de esta hortaliza, en 95.000 ha de superficie. Europa es el único continente productor que importa (1.600.000 t) bastante más de lo que exporta (1.100.000). Los grandes importadores de cebolla europeos (Francia y Alemania) están incrementando rápidamente su producción. En Alemania la producción de cebolla aumenta a un ritmo del 5%. Fuera de Europa, países como China están incrementando la producción. En los últimos cinco años, Nueva Zelanda ha triplicado su producción. En América, los principales países productores son: México, Ecuador, Jamaica y Paraguay.

### 2.4. Enfermedades de la cebolla por patógenos de suelo

#### 2.4.1. Podredumbre basal de la cebolla (*Fusarium sp.*)

Esta enfermedad tiene una importancia económica de primer orden en muchas regiones productoras de cebolla del mundo, causando pérdidas entre 25 y 35 % de la producción (Lacy y Roberts, 1982).

La enfermedad se manifiesta de diferentes maneras según el estadio fenológico de la planta. En presencia de una alta densidad de inóculo en el suelo y en condiciones ambientales favorables *Fusarium oxysporum* puede atacar desde el mismo momento de la germinación, provocando retrasos en la misma, disminución del crecimiento o damping off o muerte prematura de las plántulas.

Cuando la infección se produce en plantas maduras, comienza por el disco basal del bulbo, que toma una coloración pardusca que desemboca más adelante en una podredumbre húmeda. Tanto las raíces como los bulbos terminan por desprenderse del disco basal a la mínima tracción. La conexión entre la raíz y el resto de la planta se interrumpe progresivamente a medida que la enfermedad se desarrolla y esto se manifiesta en la parte aérea en síntomas como clorosis y necrosis del ápice de las hojas. Muy frecuentemente la planta muere antes de la madurez comercial. El hongo es capaz de afectar también raíces de algunas malas hierbas, cereales, leguminosas y otras hortalizas. (Nico y Gonzales, 2009).

### 2.5. FERTITRAP :

FERTITRAP es un biofertilizante y promotor de crecimiento sólido con excelentes resultados en hortalizas y otros cultivos. Se aplica al transplante, por inmersión de raíces. Protege las raíces del ataque de patógenos de suelo, favorece el crecimiento de raíces, acelera el prendimiento de plántulas, induce resistencia en la planta debido a la presencia de *Bacillus subtilis*.

#### COMPOSICIÓN:

<i>Bacillus subtilis</i> .(4x10 <sup>9</sup> ufc)	.....5 %
<i>Glomus fasciculatum</i> (15 esporas/g)	..... 37.5 %
Humus .....	57.5 %TOTAL .....
	100.00 %

FERTITRAP, es un producto formulado en particular para su aplicación al transplante en hortalizas. También puede ser aplicado en otros cultivos. Es un biofertilizante-biofungicida y promotor de crecimiento en base a *Bacillus subtilis*, micorrizas (*Glomus spp.*) y humus de lombriz.

Esta formulación, permite a la planta:

- Mayor absorción de nutrientes: P, N, K, S, Cu, Mg, Zn, Mo, entre otros.

- Mayor fitomasa
- Mayor Figurasíntesis
- Efectos hormonales
- Mayor absorción de agua, tolerancia y recuperación al estrés hídrico
- Resistencia a condiciones adversas, sales, contaminación por metales pesados
- Agregación del suelo: **GLOMALINA**

Asimismo, por tener la bacteria *Bacillus subtilis*, tiene efecto en:

- la supresión de enfermedades de plantas,
- inicia la Resistencia Sistémica Inducida, la exclusión de patógenos de la raíz por competencia, *tiene* antibiosis directa (ej. Iturin, amplio espectrofavorecer la liberación de nutrientes limitadamente disponibles en el suelo, la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA o ácido indol-3- acético,

### 3 . MATERIALES Y METODOS

#### 3.5. Localización

El ensayo se implementó en la localidad de La Villa (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba. Esta zona está caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de la cebolla y para la incidencia de enfermedades.

#### 3.2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

#### 3.3. Materiales

##### 3.3.1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Criolla Roja, el más difundido en la zona.

##### 3.3.2. Productos

Se utilizaron el biofertilizante-biofungicida FERTITRAP, y un producto comercial (Tricodamp)..

#### 3.4. Procedimiento experimental

El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

#### Características de la unidad experimental:

Distancia entre surcos	=	0.2 m
Distancia entre plantas	=	0.1m
Largo del surco	=	10 m
N° de surcos /unid. exp.	=	10
Area de la unid. Exp.	=	20 m <sup>2</sup>
Distancia entre unid. exp.	=	1.0m
Area total del ensayo	=	605 m <sup>2</sup>

#### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis (kg/ha)
1	FERTITRAP	45
2	FERTITRAP	40
3	FERTITRAP	35
4	Tricodamp (Producto comercial)	Dosis comercial
5	Testigo	-

La aplicación del FERTITRAP se realizó al transplante, por inmersión de las raíces en el producto. Para la preparación del producto, se diluye la dosis del producto, por ejemplo 40 kg en 40 litros de agua (relación 1.1), formando una solución pastosa, en la cuál se hace la inmersión de las plántulas.

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se determinó el efecto de los tratamientos en el control de enfermedades de suelo, y el desarrollo y rendimiento del cultivo de cebolla.

**Cuadro 1.** Escala usada para la evaluación del grado de daño por las enfermedades.

Escala	Área Afectada (%)
1	0.0 (sanos)
2	1 – 5
3	5.1- 10
4	10.1- 25
5	25.1- 50
6	Mayor a 50

En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

### 3.6. Análisis estadístico

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05), con los datos de grado de daño y rendimiento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 2). Por lo tanto, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo de cebolla y para la incidencia de enfermedades.

**Cuadro 2. Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de cebolla. La villa, Punata, Cochabamba.**

Mes	Temperatura °C			Precipitación
	Máxima	Mínima	Ambiente	mm
Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
<b>Total</b>				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

#### **4.2. Efecto de los tratamientos en el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) del cultivo de cebolla**

Los tratamientos con FERTITRAP fueron eficientes en el control de las enfermedades de suelo (podredumbre basal causado por *Fusarium oxysporum*). El control más eficiente, con diferencias significativas, se obtuvo con los tratamientos T1 (FERTITRAP, 45 Kg/ha) y T2 (40 Kg/ha), mostrando menores valores de incidencia e intensidad de daño de las enfermedades. Le siguen T3 (FERTITRAP, 35 kg/ha) y posteriormente T4 (Tricodamp) y el testigo (T5) (Cuadro 3) .

**Cuadro 3. Incidencia e Índice de Daño bajo cinco tratamientos de control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) del cultivo de cebolla. Ensayo FERTITRAP.**

Tratamientos	Incidencia (%)	Índice Daño (%)
T1=FERTITRAP (45)	2.0 a	1.2 a
T2= FERTITRAP (40)	2.2 a	1.3 a
T3= FERTITRAP (35)	5.0 b	3.0 b
T4= Tricodamp (Producto comercial)	9.0 c	6.0 c
T5= Testigo	30.0 d	22.0 d

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo**

Los tratamientos T1 (FERTITRAP, 45 Kg/ha) y T2 (FERTITRAP, 40 Kg/ha) tuvieron el mayor desarrollo del cultivo, mostrando mayor prendimiento al transplante, mayor uniformidad en desarrollo, mayor área foliar, mayor altura de planta, y mayor vigor, con respecto a los tratamientos T3 (FERTITRAP, 35 kg/ha) y T4 (Tricodamp) y el Testigo. El testigo, mostró un menor desarrollo del cultivo (Cuadro 4).



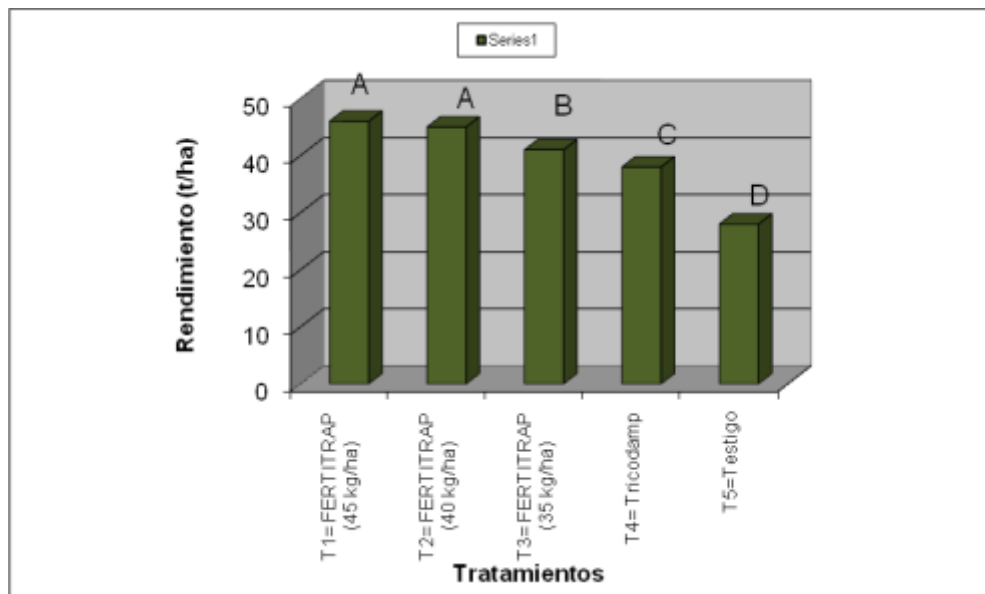
**Cuadro 4.** Efecto de cinco tratamientos en el desarrollo del cultivo de cebolla.  
Ensayo FERTITRAP.

Tratamientos	Prendimiento al trasplante (%)	Area Foliar (%)		Altura Planta (cm)		Enfermedades	
		Al aporque	A floracion	Al aporque	A floracion	Incidencia (%)	Severidad (%)
T1=FERTITRAP (45)	100 a	20 a	100 a	20 a	82 a	2.0 a	1.2 a
T2= FERTITRAP (40)	100 a	20 a	100 a	20 a	80 a	2.2 a	1.3 a
T3= FERTITRAP (35)	100 a	17 b	95 b	17 b	75 b	5.0 b	3.0 b
T4= Tricodamp (Producto comercial)	95 b	14.5 c	90 c	15 c	70 c	9.0 c	6.0 c
T5= Testigo	90 c	12 d	84 d	12 d	50 d	30.0 d	22.0 d

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

### 4.3. Rendimiento

Los mayores rendimientos (bulbo más follaje), se obtuvieron con los tratamientos T1 (FERTITRAP, 45 Kg/ha) y T2 (40 Kg/ha), mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento T3 (FERTITRAP, 35 kg/ha), T4 (Tricodamp) y el testigo (T5). El testigo, mostró un rendimiento bajo (Figura 1). Con los tratamientos con FERTITRAP T1 y T2, se obtuvieron incrementos de 64 y 60 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (T5) (Figura 1).



**Figura 1.** Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. Ensayo FERTITRAP.

Los promedios con igual letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 5. Análisis de varianza para Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de cebolla. Ensayo FERTITRAP.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	26.13	13.067	6.32	0.0225
Tratamientos	4	615.07	153.767	74.40	0.000 **
Error	8	16.53	2.067		
No aditividad	1	10.61	10.614	12.55	0.0094
Residual	7	5.92	0.846		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>657.73</b>			

CV = 3.64 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 9. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron favorables para el cultivo y la incidencia de las enfermedades.
  - ◆ Los tratamientos con FERTITRAP fueron eficientes en el control de las enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) y el desarrollo del cultivo de cebolla. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 (FERTITRAP, 45 Kg/ha) y T2 (40 Kg/ha), mostrando menores valores de incidencia e intensidad de daño de las enfermedades, un mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, con respecto a los otros tratamientos, T3 (FERTITRAP, 35 kg/ha), T4 (Tricodamp) y el testigo (T5).
  - ◆ Estos resultados se deben a la utilización del FERTITRAP, que es un producto formulado en particular para su aplicación al transplante en hortalizas. También puede ser aplicado en otros cultivos. Es un biofertilizante-biofungicida y promotor de crecimiento en base a *Bacillus subtilis*, micorrizas (*Glomus spp.*) y humus de lombriz.(PROINPA, 2009).
  - ◆ Esta formulación, permite a la planta:
    - Mayor absorción de nutrientes: P, N, K, S, Cu, Mg, Zn, Mo, entre otros.
    - Mayor fitomasa
    - Mayor Fotosíntesis
    - Efectos hormonales
    - Mayor absorción de agua, tolerancia y recuperación al estrés hídrico
    - Resistencia a condiciones adversas, sales, contaminación por metales pesados
    - Agregación del suelo: **GLOMALINA**
- Asimismo, por tener la bacteria *Bacillus subtilis*, tiene efecto en :
- ◆ la supresión de enfermedades de plantas,
  - ◆ inicia la Resistencia Sistémica Inducida, la exclusión de patógenos de la raíz por competencia,
  - ◆ tiene antibiosis directa (ej. Iturin, amplio espectrofavorecer la liberación de nutrientes



limitadamente disponibles en el suelo, la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como el IAA o ácido indol-3- acético,

- Por los resultados obtenidos, el biofungicida-biofertilizante FERTITRAP, mostró ser eficiente en el control de enfermedades de suelo (*Fusarium sp.*) y en el mayor desarrollo del cultivo de cebolla. Se recomienda la dosis de 40 kg/ha.

## LITERATURA CITADA

31. AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. Trad. Por Miguel Guzmán Ortiz. 2da. De. México, D.F., Limusa.
32. CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica Lima - Perú. 643 p.
33. Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffe, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Improving plant productivity with Rhizosphere Bacteria, Ryder, M.H. *et al.* (eds.), CSIRO division of soils, Glen Osmond.
34. Fernandez-Northcote.E.N., Navia, O., and Gandarillas, A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35 (3): 137-149.
35. Jimenez Diaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. *Fitopatología* 38 (2): 62- 73.
36. NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, N., CRESPO, C.; FRANCO, J. 2007. INTEGRACION DE RESISTENCIA SISTEMICA INDUCIDA Y ESTRATEGIAS DE MANEJO INTEGRADO DEL TIZON DE LA PAPA Y DEL TOMATE (*Phytophthora infestans*) PARA UNA AGRICULTURA SOSTENIBLE. En: Memorias XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología – XXXIV Congreso Mexicano de Fitopatología- XLVII Anual Meeting of the American Phytopathological Society. Cancùn, México. Mayo 2007. pp. 76-77.
37. NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, O. 2006. El control de enfermedades, desde los fungicidas hasta los biopesticidas. Enfermedades: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control de enfermedades. En: Memorias IV Congreso Boliviano de Protección Vegetal. . Oruro, Bolivia. Abril 2006. pp. 215- 225.
38. PROINPA. 2009. Catalogo de Bioinsumos. Ed. Polygraf. Cochabamba, Bolivia. 38 p.
39. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4786-4790.
40. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
41. Sutton,B. 1996. A century of mycology. Ed. Cambridge University Press. USA.
42. TERRANOVA. 1995. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Terranova Editores, Santa Fé de Bogotá, Colombia. 544 p.

**Evaluación del biofungicida-biofertilizante- TRICOTOP (*Trichoderma harzanium* y *Trichoderma koningiopsis*) para el control de enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) del cultivo de repollo**

**RESPONSABLE:** Oscar Navia M.

**EQUIPO TECNICO.** Noel Ortuño, Edson Meneses, Daniel Barja

**Instituciones colaboradoras o socias:** SENASAG

## **COMPENDIO**

- Se estableció un ensayo para determinar la eficiencia del biofungicida- biofertilizante TRICOTOP para el control de enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) del cultivo de repollo. El ensayo se implementó en la zona de El Rosal, Punata (Cochabamba) bajo el diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos. Se utilizó el cultivar Criolla. Los tratamientos fueron T1 ( TRICOTOP, 0.4 l/ha), T2 (TRICOTOP, 0.5 l/ha), T3 (TRICOTOP, 0.6 l/ha), T4 (Tricodamp), T5 (Testigo). La aplicación del producto se realizó por aspersión al aporque, al cuello de las plantas , sobre el estiércol . El volumen de aplicación fue de 200 litros/ha. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con TRICOTOP , especialmente T1 y T2, tuvieron un control eficiente de las enfermedades, mostrando valores bajos de incidencia e intensidad de daño, un mayor desarrollo del cultivo y altos rendimientos. El testigo (T5), presentó menor desarrollo, valores muy altos de grado de daño y rendimientos bajos. Por lo tanto, el biofungicida-biofertilizante TRICOTOP, mostró ser eficiente en el control de enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) y en el mayor desarrollo del cultivo de repollo.

**Palabras claves:** TRICOTOP, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* , repollo.

## **1. INTRODUCCION**

El repollo es un cultivo muy antiguo, se cree que es originaria de Asia menor, de donde pasó primero a Italia, Francia, España, Inglaterra y luego al resto de Europa, y luego al resto del mundo, existiendo indicios de que se cultivaba desde hace 2000 años (Terranova, 1995). En Bolivia, las hortalizas (tomate, cebolla, repollo, etc) son cultivos importantes para la población. Sin embargo, estos cultivos son vulnerables a la pérdida de la fertilidad del suelo y al ataque de un gran número de enfermedades y plagas, además de otros factores abióticos.

Por otra parte, el biofungicida- biofertilizante- TRICOTOP (*Trichoderma harzanium* y *Trichoderma koningiopsis* ) es un producto en base a microorganismos benéficos, con excelentes resultados en varios cultivos, como tomate, cebolla, repollo, papa, maíz, frutales, etc. En general, influencia positivamente en la vitalidad de las plantas y la sanidad. También controla el mal de almaciguera (damping off).

En base a estos antecedentes, para realizar nuevas innovaciones en el manejo de las hortalizas, en el presente trabajo se estudió la eficacia del biofungicida-biofertilizante **TRICOTOP** en el cultivo de repollo.

## OBJETIVOS

- k) Evaluar la eficiencia del biofungicida- biofertilizante- **TRICOTOP** ((*Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningiopsis* ) para el control de enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) y el desarrollo del cultivo de repollo.
- l) Evaluar fitotoxicidad.

## 7. REVISION DE LITERATURA

### 2.5. TRICOTOP :

**TRICOTOP** es un –biofungicida, biofertilizante y promotor de crecimiento , en base a microorganismos benéficos, con excelentes resultados en varios cultivos (hortalizas, frutales, ornamentales). Al contener el hongo *Trichoderma spp.*, provee de promotores de crecimiento a la planta y protege de patógenos de suelo. *Trichoderma spp.* tiene alta competencia en la rizósfera; suprime una gran variedad de patógenos , promueve el crecimiento de raíces y exploración del suelo; reduce estrés ambiental, aplicado en una gran variedad de suelos, substratos hidropónicos; pH 4-8, 10-35 °C. (PROINPA, 2009).

#### COMPOSICIÓN:

*Trichoderma harzianum* y

*Trichoderma koningiopsis* (1.2 x10<sup>9</sup> esporas/g).....100 %

TRICOTOP, es un producto formulado en base a *Trichoderma spp.*, para su aplicación en almacigueras, y también en campo.

Esta formulación, permite a la planta:

- la supresión de enfermedades de plantas, en particular el Damping off de almacigueras, y otras enfermedades
- promover el crecimiento de raíces y exploración del suelo
- la liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas reducir el estrés ambiental

## 3 . MATERIALES Y METODOS

### 3.6. Localización

El ensayo se implementó en la localidad de El Rosal (2700 msnm), perteneciente a la Provincia Punata del Departamento de Cochabamba, ubicado a 50 km. de la ciudad de Cochabamba. Esta zona está caracterizada por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de repollo y para la incidencia de enfermedades.

#### 3. 2. Datos Meteorológicos

Se instaló un pluviómetro de lectura directa, efectuando las lecturas después de cada precipitación pluvial, y un termómetro de máxima y mínima.

### 3. 3. Materiales

#### 3. 3. 1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Criolla , el más difundido en la zona.

#### 3. 3. 2. Productos

Se utilizaron el biofungicida - biofertilizante- TRICOTOP y Tricodamp (Producto comercial).

### 3. 4. Procedimiento experimental

El ensayo se estableció bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

#### Características de la unidad experimental:

Distancia entre surcos	=	0.5 m
Distancia entre plantas	=	0.3m
Largo del surco	=	10 m
N° de surcos /unid. exp.	=	10
Area de la unid. Exp.	=	30 m2
Distancia entre unid. exp.	=	1.0m
Area total del ensayo	=	1045 m2

### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto	Dosis (litros/ha)
1	TRICOTOP	0.6
2	TRICOTOP	0.5
3	TRICOTOP	0.4
4	Tricodamp (Producto comercial)	Dosis comercial
5	Testigo	-

La aplicación del TRICOTOP se realizó por aspersión con mochila al primer aporque, al cuello de las plantas, sobre el estiércol. El volumen de aplicación fue de 200 litros/ha.

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se evaluó el efecto de los tratamientos en el control de las enfermedades (síntomas de chancros en las raíces y muerte de plantas), el desarrollo y rendimiento del cultivo de repollo.

**Cuadro 1.** Escala usada para la evaluación del grado de daño por las enfermedades.

Escala	Área Afectada (%)
1	0.0 (sanos)
2	1 – 5
3	5.1- 10
4	10.1- 25
5	25.1- 50
6	Mayor a 50

En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total y por categorías.

### 3.6. Análisis estadístico

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ( $P=0.05$ ), con los datos de grado de daño y rendimiento.

## 4. RESULTADOS

#### 4.1. Datos climáticos

Las temperaturas fueron 11 - 30 °C, medias mínima-máxima, respectivamente y precipitación total de 862 mm (Cuadro 2). Por lo tanto, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo de repollo y para la incidencia de enfermedades.

**Cuadro 2. Medias de temperatura y precipitación acumulada registradas durante el ciclo del cultivo de repollo. El Rosal, Punata, Cochabamba.**

Mes	Temperatura °C			Precipitación mm
	Máxima	Mínima	Ambiente	
Diciembre	30	12	24	155
Enero	30	13	24	205
Febrero	30	13	24	212
Marzo	29	12	23	180
Abril	28	12	22	110
Mayo	28	11	21	-
Total				<b>862</b>

\*Temperaturas registradas a las 12:00 del medio día

#### **4.2. Efecto de los tratamientos sobre las enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) del cultivo de repollo**

Los tratamientos con TRICOTOP fueron eficientes en el control de las enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*), causantes de chancros y muerte de plantas, del cultivo de repollo. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 (TRICOTOP, 0.6 Kg/ha) y T2 (0.5 Kg/ha), mostrando menores valores de incidencia e intensidad de daño de las enfermedades. Le siguen T3 (TRICOTOP, 0.4 kg/ha) y posteriormente T4 (Tricodamp) y el testigo (T5). Estas diferencias, fueron estadísticamente significativas (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Incidencia e Índice de Daño bajo cinco tratamientos de control de enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) del cultivo de repollo. Ensayo TRICOTOP.

Tratamientos	Incidencia (%)	Índice Daño (%)
T1=TRICOTOP (0.6)	2.5 a	1.4 a
T2= TRICOTOP (0.5)	2.6 a	1.5 a
T3= TRICOTOP (0.4)	6.0 b	3.5 b
T4= Tricodamp (Producto comercial)	12.0 c	8.0 c
T5= Testigo	35.0 d	20.6 d

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Efecto de los tratamientos en el desarrollo del cultivo de repollo**

El mayor desarrollo del cultivo, mostrando mayor uniformidad en desarrollo, mayor área foliar, mayor altura de planta, y mayor vigor, se obtuvo con los tratamientos T1 (TRICOTOP, 0.6 Kg/ha) y T2 (0.5 Kg/ha), seguido del tratamiento T3 (TRICOTOP, 0.4 kg/ha) y luego T4 (Tricodamp) y el Testigo. Estas diferencias, fueron estadísticamente significativas (Cuadro 4).

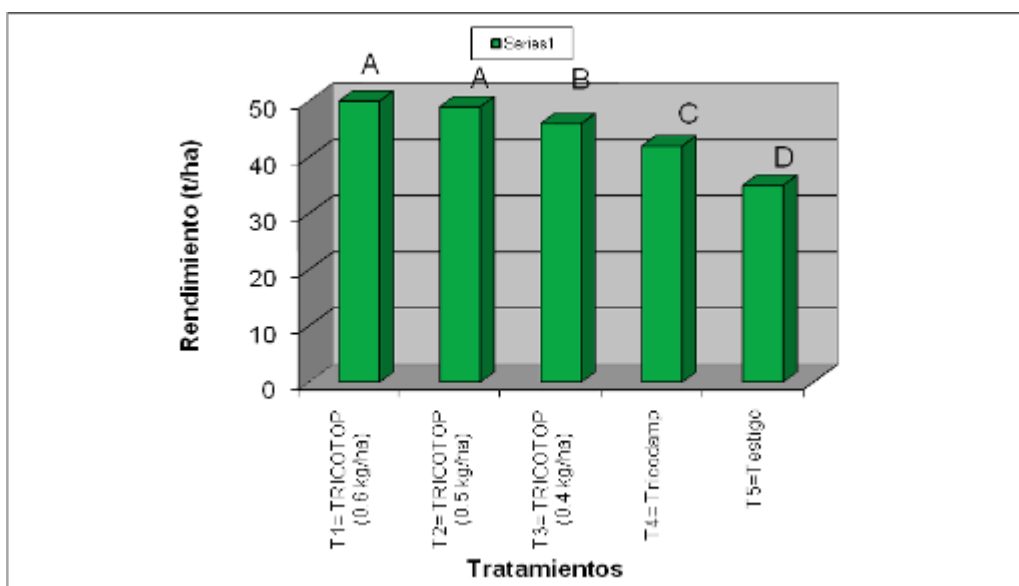
**Cuadro 4.** Efecto de cinco tratamientos en el desarrollo del cultivo de repollo. Ensayo TRICOTOP.

Tratamientos	Área Foliar (%)		Altura Planta (cm)	
	Al aporque	A floración	Al aporque	A floración
T1=TRICOTOP (0.6)	20 a	100 a	25 a	50 a
T2= TRICOTOP (0.5)	19 a	100 a	24 a	49 a
T3= TRICOTOP (0.4)	16 b	90 b	21 b	45 b
T4= Tricodamp (Producto comercial)	13 c	85 c	18 c	40 c
T5= Testigo	10 d	80 d	14 d	35 d

Promedios con la misma letra, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan (P=0.05).

#### **4.3. Rendimiento**

Se obtuvieron altos rendimientos. Los mayores rendimientos se obtuvieron con los tratamientos T1 (TRICOTOP, 0.6 Kg/ha) y T2 (0.5 Kg/ha), mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento T3 (TRICOTOP, 0.4 kg/ha), T4 (Tricodamp) y el testigo (T5). El testigo, mostró un rendimiento bajo (Figura 1). Con los tratamientos con TRICOTOP T1 y T2, se obtuvieron incrementos de 43 y 40 % en los rendimientos, respectivamente, con respecto al tratamiento testigo (T5) (Figura 1).



**Figura 1.** Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de repollo. Ensayo TRICOTOP.

Los promedios con igual letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan ( $P=0.05$ ).

**Cuadro 5. Análisis de varianza para Rendimiento, bajo cinco tratamientos de manejo del cultivo de repollo. Ensayo TRICOTOP.**

F.V.	GL	S.C.	C.M.	Fc	Prob.
Repeticiones	2	22.80	11.400	6.00	0.0256
Tratamientos	4	447.60	111.900	58.89	0.000 **
Error	8	15.20	1.900		
No aditividad	1	2.84	2.835	1.61	0.2457
Residual	7	12.36	1.766		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>485.60</b>			

CV = 3.10 %

NS = No significativo

\*\* = Altamente significativo

## 10. CONCLUSIONES

- ◆ Las condiciones climáticas fueron favorables para el cultivo y la incidencia de las enfermedades.
- ◆ Los tratamientos con TRICOTOP fueron eficientes en el control de las enfermedades (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*) y el desarrollo del cultivo de repollo. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T1 (TRICOTOP, 0.6 Kg/ha) y T2 (0.5 Kg/ha), mostrando menores valores de incidencia e intensidad de daño de las enfermedades, un mayor desarrollo del cultivo y los mayores rendimientos, con respecto a los otros tratamientos, T3 (TRICOTOP, 0.4 kg/ha) y T4 (Tricodamp) y el testigo (T5).



- ◆ Estos resultados están relacionados con la utilización de TRICOTOP, que es un biofungicida-biofertilizante y promotor de crecimiento, en base a microorganismos benéficos, con excelentes resultados en varios cultivos (hortalizas, frutales, ornamentales). Al contener el hongo *Trichoderma* spp., provee de promotores de crecimiento a la planta y protege de patógenos de suelo. *Trichoderma* spp, tiene alta competencia en la rizósfera; suprime una gran variedad de patógenos, promueve el crecimiento de raíces y exploración del suelo; reduce estrés ambiental, aplicado en una gran variedad de suelos, sustratos hidropónicos; pH 4-8, 10-35 °C. (PROINPA, 2009).
- Por los resultados obtenidos, el biofungicida-biofertilizante TRICOTOP, mostró ser eficiente en el control de enfermedades (*Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp.) y en el mayor desarrollo del cultivo de repollo. Se recomienda la dosis de 0.5 kg/ha.

#### LITERATURA CITADA

43. Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffe, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Improving plant productivity with Rhizosphere Bacteria, Ryder, M.H. et al. (eds.), CSIRO division of soils, Glen Osmond.
44. Fernandez-Northcote.E.N., Navia, O., and Gandarillas, A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. *Fitopatología* 35 (3): 137-149.
45. Fernandez - Northcote, E. N.; Navia, O. y Gandarillas, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11: 1-25.
46. Jimenez Diaz, R. 2003. El papel que juega la Fitopatología en la agricultura sostenible. *Fitopatología* 38 (2): 62- 73.
47. NAVIA,O.; A. TRUJILLO, A. GANDARILLAS, E.N. FERNANDEZ-NORTHCOTE, and J. GABRIEL. 1999. Strategies of chemical control of late blight (*Phytophthora infestans*) for resistant and susceptible cultivars in Bolivia. En: Late Blight: A threat to global food security. Quito,Ecuador. March 16-19, 1999. p. 15-16 .(Abstract).
48. PROINPA. 2009. Catalogo de Bioinsumos. Ed. Polygraf. Cochabamba, Bolivia. 38 p.
49. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4786-4790.

50. Sutton, J.C. 2005. Present and future perspectives of biological disease control in crops. En: Libro de resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología- III taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Córdoba, Argentina. Abril 19-22, 2005. p. 11-14.
51. Sutton, B. 1996. A century of mycology. Ed. Cambridge University Press. USA.
52. TERRANOVA. 1995. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Terranova Editores, Santa Fé de Bogotá, Colombia. 544 p.
53. Zeballos, H. 1997. Aspectos económicos de la producción de papa en Bolivia. COSUDE – Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
54. Zapata, J. L. 1991. Combinación de inmunidad a los virus X e Y de la papa, y resistencia a *P. infestans*, en clones de papa. Tesis M.Sc. Univ. Nac. Agraria, La Molina, Lima, Perú.

### **Manejo de la fertilidad del suelo en base a biofertilizantes basados en microorganismos benéficos para el cultivo de quinua**

Responsables: Oscar Navia, Oscar Oruña, Noel Ortuño

#### **RESUMEN**

Se realizaron experimentos para determinar el efecto de biofertilizantes en base a microorganismos benéficos para un manejo de la fertilidad y la sanidad del suelo. Los resultados muestran que el uso de biofertilizantes como TRICOBAL, BIOBACILLUS, TRICOTOP y MICOBAC son una alternativa importante para un manejo de la fertilidad y del suelo, y en un contexto más amplio del cultivo de quinua, más sustentable, más sensible con el medio ambiente y la salud del productor.

Palabras clave: Biofertilizantes, quinua.

#### **INTRODUCCION**

Una transición exitosa del sistema agrícola convencional al de una agricultura sustentable dependerá entre otros factores, de la disponibilidad de tecnología alternativa para mejorar y mantener la calidad de los suelos, además de asegurar una producción rentable, protegiendo la salud de los productores, consumidores y el medio ambiente.

Por otra parte, la quinua *Chenopodium quinoa* Will es una especie originaria de las zonas alto andinas, particularmente de Bolivia, y es considerada como el “Grano de Oro” de los Andes, cuyo origen se remonta a épocas prehispanicas y que en la actualidad es el principal alimento de la región y un alimento con creciente demanda en el mundo entero por sus bondades nutritivas en proteínas, vitaminas, y minerales; siendo además el sustento principal de los agricultores del

altiplano de Bolivia. Sin embargo, los rendimientos son bajos, debido a diversos factores, principalmente la pérdida de la fertilidad del suelo.

Se estima que el 40% de los suelos del altiplano está en proceso de desertización, por lo tanto, el potencial productivo han disminuido. Por otro lado la erosión ha ocasionado que los suelos tengan menos del 1% de materia orgánica (PROINPA, 2009), baja actividad microbiana, poca retención de humedad, escasa disponibilidad de nutrientes y alta infestación por patógenos de suelo. En esa línea, el desarrollo y uso de biofertilizantes se constituyen en una alternativa tecnológica para ese propósito (Casco e iglesias, 2005).

Por esta razón PROINPA realizó investigaciones sobre las reservas microbiológicas nativas benéficas en el país, buscando rizobacterias (microorganismos de vida libre que poseen efectos favorables sobre las plantas al colonizar sus raíces) llamadas también promotores de crecimiento de plantas. Luego de identificar y caracterizar estos microorganismos, se evaluó y seleccionó para posteriormente multiplicar y formular para su utilización en campo.

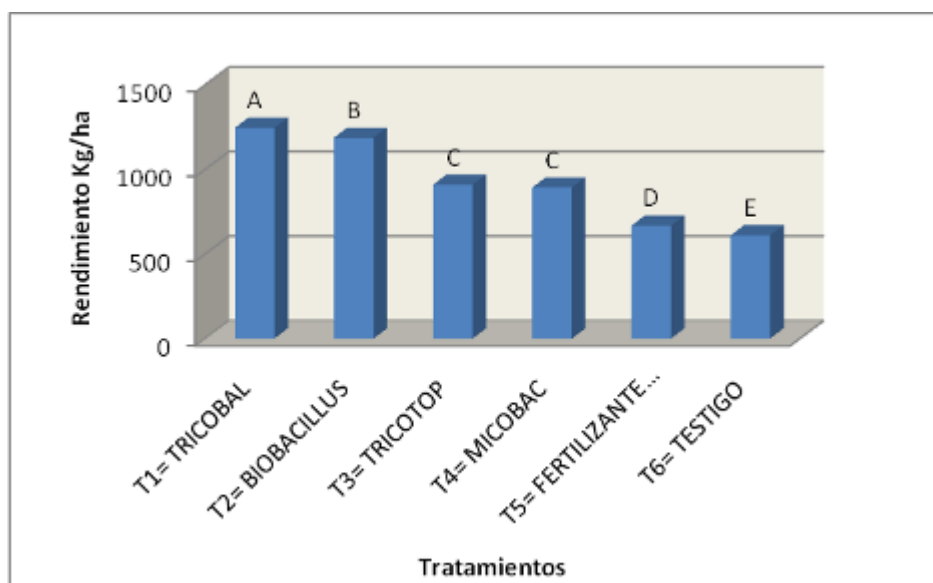
#### **INCORPORANDO BIOFERTILIZANTES PARA EL MANEJO DE LA QUINUA**

En fertilidad, se han probado microorganismos benéficos como *Bacillus subtilis* y *Trichoderma spp.*, los cuales son aplicados a la siembra, junto con abonos orgánicos, y actúan como biofertilizantes, promotores de crecimiento y biofungicidas para enfermedades de suelo. La interacción de estos microorganismos libera sustancias reguladoras de crecimiento para las plantas, libera nutrientes que están escasamente disponibles en el suelo (como P), estimula la Resistencia Sistémica Inducida en la planta, permitiendo como resultado, una buena emergencia, mayor vigor y sanidad, mayor tamaño y área foliar y radicular de las plantas, lo cual se traduce en altos rendimientos (50 a 100% más) y buena calidad del grano, constituyéndose en una alternativa importante para un manejo del cultivo de quinua más sustentable, más sensible con el medio ambiente y la salud del productor.

En el cuadro 1, se muestra los resultados obtenidos en parcelas con los biofertilizantes basados en microorganismos benéficos, *TRICOBAL* (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma spp.*), *BIOBACILLUS* (*Bacillus subtilis* + *Bacillus amyloliquefasciens*), *TRICOTOP* (*Trichoderma spp.*), *MICOBAC* (*Bacillus subtilis* + *Micorrizas Glomus fasciculatum*).

**Cuadro 1.** Efecto de biofertilizantes en el desarrollo y el rendimiento de la quinua.  
Challapata,Oruro

Tratamientos	Tamaño plantas (cm)	Rendimiento Kg/ha	Rendimiento qq/ha
T1= TRICOBAL	140	1245,48 A	27,08 A
T2= BIOBACILLUS	120	1187,32 B	25,81 B
T3= TRICOTOP	110	909,57 C	19,77 C
T4= MICOBAC	107	893,56 C	19,43 C
T5= FERTILIZANTE COMERCIAL	100	667,34 D	14,51 D
T6= TESTIGO	80	609,43 E	13,25 E



**Figura 1.** Efecto de biofertilizantes en el desarrollo y el rendimiento de la quinua. Challapata,Oruro

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el uso de biofertilizantes como TRICOBAL, BIOBACILLUS, TRICOTOP y MICOBAC son una alternativa importante para un manejo de la fertilidad y del suelo, y en un contexto más amplio del cultivo de quinua, más sustentable, más sensible con el medio ambiente y la salud del productor.

## BIBLIOGRAFIA:

55. Navia, O.; Pozo, J.L.; Ortuño, N.; Meneses, E.; Arce, W. 2010. Incorporación de bioinsumos en base a microorganismos benéficos en la producción orgánica de quinua. Memorias: Congreso Mundial de la Quíinoa 2010. Oruro, Bolivia.
56. Ortuño, N.; O., Navia; V. Angulo; D. Barja y G. Plata. 2009. Desarrollo de biofertilizantes en base a microorganismos nativos para una producción soberana en Bolivia. Memoria V Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Oruro, Bolivia. p. irr.
57. Smith, K.P., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interaction with disease-suppressive bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4786-4790.

## EVALUACIÓN PARTICIPATIVA DE BIOINSUMOS EN EL CULTIVO DE MAÍZ

**RESPONSABLE:** Oscar Navia, Victor Alvarez, N. Ortuno

**COLABORADORES:** María Rea, Antonio Vocal, José Luis Velasco, Juan Ardaya, Humberto Vargas, Zulma Claros, H. Alcaldía Municipal de Cliza, Equipo técnico

## 1. INTRODUCCION

En el valle Alto de Cochabamba, el cultivo de maíz es de gran importancia involucrando a un gran número de familias. Por otra parte, uno de los elementos clave en la práctica de la Agricultura Sostenible es el uso eficiente de los insumos ( suelo, agua, material vegetal, energía, etc.) puesto que con ello debe reducirse significativamente la extensión en que es necesaria su utilización para asegurar la producción. Por ello, y dado que la incidencia de enfermedades, plagas y malas hierbas contribuye directa o indirectamente a disminuir dicha eficiencia en el uso de los insumos, uno de los componentes referidos con más consistencia en los programas propuestos para implementar la Agricultura Sostenible concierne el manejo integrado y/o ecológico de estreses bióticos y abióticos de los cultivos (Jiménez Díaz, 2007).

En este contexto, el desarrollo y evaluación de bioinsumos en la producción agrícola es fundamental para una agricultura sostenible, y en particular para un manejo del cultivo de maíz más sostenible que permita que los pequeños productores puedan producir productos mas sanos, proteger su salud y el medio ambiente, además de bajar sus costos de producción.

Para realizar nuevas innovaciones en el manejo del cultivo de maíz, en el presente trabajo se evaluó el efecto de los bioinsumos en base a microorganismos benéficos en el desarrollo, sanidad y rendimiento del cultivo de maíz.

## OBJETIVOS

Evaluar participativamente bioinsumos en base a microorganismos benéficos en la producción y sanidad del cultivo de maíz.

### 3 . MATERIALES Y METODOS

#### 3.7. Localización

En forma participativa, se implementaron cuatro parcelas de investigación, tres en la localidad de Banda Arriba (Municipio Cliza, Preovincia Germán Jordan) y uno en Paracaya (Municipio San Benito, Provincia Punata) del Departamento de Cochabamba. Estas zonas estan caracterizadas por presentar condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de maíz.

#### 3. 2. Materiales

##### 3. 2. 1. Material vegetal

Se utilizó el cultivar Waltaco, susceptible al Chaki Onkoy , y el más difundido en las zonas.

##### 3. 2. 2. Productos

Se utilizaron bioinsumos en base a diferentes microorganismos benéficos.

#### 3.3. Procedimiento experimental

Los ensayos se establecieron bajo el diseño experimental de bloques completos al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones.

##### *Características de la unidad experimental*

Distancia entre surcos	=	0.6 m
Distancia entre plantas	=	0.5 m
Largo del surco	=	25 m
N° de surcos /unid. exp.	=	6
Área de la unid. Exp.	=	90 m <sup>2</sup>
Distancia entre unid. exp.	=	1.0 m
Área total / ensayo	=	1896 m <sup>2</sup>

#### Tratamientos:

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trat	Producto
1	<i>Bacillus subtilis</i>
2	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>
3	<i>Bacillus subtilis</i> + Micorrizas
4	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i> + Micorrizas

5	Testigo
---	---------

Los tratamientos se realizaron a la siembra, por aspersión a surco abierto. Las dosis de aplicación de las bacterias fue de 1.0 kg/ha/200 l agua, y de la micorriza de 10 kg/ha/ 200 l agua.

### 3.5. Evaluaciones

Durante el ciclo del cultivo, se evaluaron el desarrollo, sanidad y rendimiento del cultivo de maíz. Para evaluar sanidad (especialmente a la enfermedad de Chaki Onkoy) se determinó el grado de daño o porcentaje de plantas afectadas por las enfermedades, para lo cual se utilizó la escala modificado de la escala internacional del SBM (0-100 %).-

En la cosecha se evaluaron los surcos centrales de cada unidad experimental, eliminando los surcos laterales y descartando las plantas de los extremos para evitar efectos de bordura y arrastre de productos. Se tomaron datos de rendimiento total. .

Se realizó el respectivo análisis de varianza (Anova 2), y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05), con los datos de grado de daño y rendimiento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos climáticos

Durante el ciclo del cultivo, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el cultivo y para el desarrollo de la enfermedad.

### 4.2. Efecto de los tratamientos en el desarrollo, sanidad (Chaki Onkoy) y rendimiento del cultivo de maíz.

De una manera general, en todos las parcelas, tanto de Cliza como de Punata, los tratamientos con los microorganismos benéficos mostraron sus bondades. Todos los tratamientos mostraron significativamente un mayor desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor, mayor sanidad de las plantas y mayores rendimientos con respecto al tratamiento testigo (T5) (Cuadros 1,2,3,4). En la parcela de Punata no se observó síntomas de Chaki Onkoy. En las parcelas de Cliza, donde la incidencia de la enfermedad Chaki Onkoy es alta, los tratamientos tuvieron un control eficiente del Chaki Onkoy. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T3 (*Bacillus subtilis* + Micorrizas) y T1 (*Bacillus subtilis*), seguidos de los tratamientos T3 (*Bacillus amyloliquefasciens* + Micorrizas) y T2 (*Bacillus amyloliquefasciens*). Los testigos (T5), presentaron valores altos de incidencia del Chaki Onkoy. (Cuadros 1,2,3).

En general, los tratamientos con bioinsumos tuvieron un incremento en rendimiento con respecto a los testigos, variando entre 24 y 67 % más, dependiendo de los tratamientos (Cuadros 1,2,3,4)

**Cuadro 1.** Desarrollo, sanidad y Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos con bioinsumos en el cultivo de maíz. Parcela María Rea, Cliza.

Trat	Tamaño plantas (cm)	Incidencia final (Chaki Onkoy) (%)	Rendimiento ( t/ha)		Incremento en rendimiento respecto al testigo (%)	
			Grano (Choclo)	Follaje	Grano (Choclo)	Follaje
T1= <i>Bacillus subtilis</i>	285 a	9.09 c	23.14 a	53.7 b	38.9	20.8

T2= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	283 a	6.7 b	<b>23.51 a</b>	<b>52.25 b</b>	41.1	17.6
T3= <i>Bacillus subtilis</i> + Micorrizas	288 a	0.0 a	<b>25.36 a</b>	<b>60.5 a</b>	52.2	36.1
T4= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i> + Micorrizas	286 a	3.0 b	<b>24.07 a</b>	<b>54.14 b</b>	44.4	21.8
T5= Testigo	238 b	61.6 d	<b>16.66 b</b>	<b>44.44 c</b>	-	-

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).



**Cuadro 2.** Desarrollo, sanidad y Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos con bioinsumos en el cultivo de maíz. Parcela José Luis Velasco, Cliza.

Trat	Tamaño plantas (cm)	Incidencia final (Chaki Onkoy) (%)	Rendimiento ( t/ha)		Incremento en rendimiento respecto al testigo (%)	
			Grano (Choclo)	Follaje	Grano (Choclo)	Follaje
T1= <i>Bacillus subtilis</i>	317 a	0 a	25.0 a	40.0 a	30.8	31.1
T2= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	315 a	0 a	24.51 a	38.8 a	28.3	27.2
T3= <i>Bacillus subtilis</i> + Micorrizas	320 a	0 a	25.5 a	40.5 a	33.5	32.8
T4= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i> + Micorrizas	316 a	0 a	24.5 a	39.8 a	28.2	30.4
T5= Testigo	270 b	10 b	19.1 b	30.5 b	-	-

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 3.** Desarrollo, sanidad y Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos con bioinsumos en el cultivo de maíz. Parcela Antonio Vocal, Cliza.

Trat	Tamaño plantas (cm)	Incidencia final (Chaki Onkoy) (%)	Rendimiento ( t/ha)		Incremento en rendimiento respecto al testigo (%)	
			Grano (Choclo)	Follaje	Grano (Choclo)	Follaje
T1= <i>Bacillus subtilis</i>	302 a	2.5 b	23.5 b	39.5 ba	34.2	38.5
T2= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	297 a	3.1 b	22.7 b	39.0 b	29.7	36.8
T3= <i>Bacillus subtilis</i> + Micorrizas	305 a	0 a	26.3 a	45.1 a	50.2	58.2
T4= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i> + Micorrizas	300 a	2.4 b	23.0 b	40.2 b	31.4	41.1
T5= Testigo	245 b	40 b	17.5 c	28.5 c	-	-

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

**Cuadro 4.** Desarrollo, sanidad y Rendimiento (t/ha), bajo cinco tratamientos con bioinsumos en el cultivo de maíz. Parcela Juan Ardaya, Punata.

Trat	Tamaño plantas (cm)	Incidencia final (Chaki Onkoy) (%)	Rendimiento ( t/ha)		Incremento en rendimiento respecto al testigo (%)	
			Grano (Choclo)	Follaje	Grano (Choclo)	Follaje
T1= <i>Bacillus subtilis</i>	290 b	0 a	22.22 b	39.1 b	52.1	34.5
T2= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	286 b	0 a	18.11 c	35.33 c	23.9	21.6
T3= <i>Bacillus subtilis</i> + Micorrizas	300 a	0 a	24.5 a	48.11 a	67.6	65.6
T4= <i>Bacillus amyloliquefasciens</i> + Micorrizas	290 b	0 a	18.6 c	39.6 b	27.3	36.3
T5= Testigo	253 c	0 a	14.61 d	29.05 d	-	-

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (P=0.05).

## 5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Tanto en Cliza como en Punata, las condiciones climáticas fueron muy favorables para el desarrollo del cultivo de maíz. En Punata no se observó síntomas de la enfermedad Chaki Onkoy. En Cliza, las parcelas se implementaron en zonas con alta incidencia de la enfermedad, lo cual permitió una buena evaluación de los tratamientos.

De una manera general, en todas las parcelas, tanto de Cliza como de Punata, los tratamientos con los microorganismos benéficos mostraron sus bondades. Todos los tratamientos mostraron significativamente un mayor desarrollo, mayor altura de planta, mayor vigor, mayor sanidad de las plantas y mayores rendimientos con respecto al tratamiento testigo.

En las parcelas de Cliza, donde la incidencia de la enfermedad Chaki Onkoy es alta, los tratamientos tuvieron un control eficiente del Chaki Onkoy. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T3 (*Bacillus subtilis* + Micorrizas) y T1 (*Bacillus subtilis*), seguidos de los tratamientos T3 (*Bacillus amyloliquefasciens* + Micorrizas) y T2 (*Bacillus amyloliquefasciens*). Los testigos (T5), presentaron valores altos de incidencia del Chaki Onkoy.

De una manera general, todos los tratamientos tuvieron un control promisorio del Chaki Onkoy. El control más eficiente se obtuvo con los tratamientos T5 (*Bacillus subtilis* + Micorrizas), T7 (*Bacillus subtilis* + Qmc) y T8 (*Bacillus amyloliquefasciens* + Qmc), seguidos de los tratamientos T6 (*Bacillus amyloliquefasciens* + Micorrizas), T4 (*Azotobacter*), T3 (*Bacillus amyloliquefasciens*), T2 (*Bacillus subtilis*) y T1 (Qmc). El testigo (T9) tuvo un porcentaje de daño alto y rendimientos bajos.

Los resultados obtenidos muestran que los microorganismos benéficos y de control biológico utilizados, ya sea aplicado en forma individual o combinados, son alternativas importantes para el desarrollo del cultivo de maíz, y por otra parte para el control del Chaki Onkoy (marchitez).

Esta eficiencia en control esta relacionada con las características y propiedades de los microorganismos usados. *Bacillus subtilis* se caracteriza por ser una bacteria promotora del crecimiento de plantas (PGPR), que

tiene alta capacidad competitiva en la rizósfera; coloniza el rizoplano; es persistente en el suelo, suprime algunos patógenos principales incluyendo: *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Además ejerce *antibiosis* directa (ej. Iturin, amplio espectro), utiliza exudados radicales y células de raíces muertas como nutrientes (“limpiadores” de raíces); tiene competencia por nutrientes y produce compuestos orgánicos volátiles (Ej. 2,3-butanediol) y son activos en una gran variedad de condiciones (8-40°C, pH 5-9, óptimo 7) (Sutton, 2005).

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

AGRIOS,G.N. 1995. Fitopatología. Enfermedades de las plantas. Trad. Del inglés por Manuel Guzmán O. Segunda edición. Editorial Limusa. México D.F. 756 p.

CALZADA - BENZA, B. J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 de. Jurídica ,Lima - Perú. 643 p.

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1996. Manejo Integrado de Plagas. Turrialba Costa Rica. Fitopatología 40: 24-34.

FDTA - VALLES. 2004. El cultivo de la cebolla. [www.fdto-valles.org/publicaciones](http://www.fdto-valles.org/publicaciones)

INFOAGRO. 2004. El cultivo de la cebolla. [WWW.infoagro.com](http://WWW.infoagro.com)

FERNANDEZ\_NORTHCOTE.E.N., NAVIA, O., and GANDARILLAS,A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. Fitopatología 35 (3): 137-149

FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N.; NAVIA, O. GANDARILLAS, A. 1999. Bases de las estrategias de control químico del tizón desarrolladas por PROINPA en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa 11: 1-25.

MONT KOC,R. 1993. Principios del control de enfermedades en plantas. Primera edición. Editorial CPUNALM (Centro Pre-Universitario Nacional Agrario La Molina). 288 p.

NAVIA, O.; GANDARILLAS, A., ORTUÑO, O. 2006. El control de enfermedades, desde los fungicidas hasta los biopesticidas. Enfermedades: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control de enfermedades. En: Memorias IV Congreso Boliviano de Protección Vegetal. . Oruro, Bolivia. Abril 2006. pp. 215- 225.

NAVIA, O. ; GANDARILLAS, A.; E.N. FERNÁNDEZ-NORTHCOTE. 2005. Nuevas estrategias de control químico del mildio de la cebolla. En : Resúmenes XV Congreso Internacional de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología. Cordova, Argentina.

NAVIA, O.; FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N. 1996. Estrategias de control químico del tizón, Ficha Técnica 2, Fitopatología. Programa de Investigación de la papa, (PROINPA). Cochabamba - Bolivia

TERRANOVA. 1995. El cultivo de la cebolla. En. Enciclopedia Agropecuaria Terranova. Panamericana Formas e impresos SA, Bogotá, Colombia. 552 p.

SCHWINN AND MARGOT, 1991. Control with chemicals. En: *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Advances in Plant Pathology. D.S. Ingram and P.H. Williams, (eds), Academic Press, London. P. 225-265.



**Figura 1.** Planta de maíz con síntomas severos de Chaki Onkoy (izquierda) y planta sana (derecha). Cliza..



**Figura 2.** Evaluación participativa de las parcelas con bioinsumos en el cultivo de maíz. Cliza.



**Figura 3.** Evaluación participativa de las parcelas con bioinsumos en el cultivo de maíz.



**Figura 4.** Evaluación participativa de las parcelas con bioinsumos en el cultivo de maíz.

**Efecto de la inoculación de 13 cepas de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de papa (*solanum tuberosum*) en parcelas de la estación experimental de Quipaquipani.**

**Responsable: Marlene Angulo**

**Equipo técnico: Samuel O. Villca C., Omar A. Mollinedo G., Marlene Angulo R.**

**Compendio:**

Para determinar el efecto de 13 cepas de bacterias nativas caracterizadas por fijar nitrógeno y solubilizar fósforo sobre el cultivo de la papa en condiciones de campo, cada una de las cepas se inocularon y se evaluaron bajo el diseño de bloques incompletos con 2 repeticiones, en los cuales se midieron altura de planta, diámetro de cuello y número de ramas, a la cosecha: unidades formadoras de colonia (UFC), número de tubérculos por categoría, rendimiento por planta, rendimiento tomando en cuenta la categorización por tamaño por unidad experimental y rendimiento total como la suma de las categorías por cepa. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas para entre las cepas y el testigo, las cepas que más destacan en el

desarrollo de la planta son 1Bp, 5Bp, 143, 3p, 2Bp, 3Bp, 4Bp y 139. De estas en base al agrupamiento, 4 cepas son las que se destacan en cuanto a altura de planta número de ramas, número de tubérculos y rendimiento son las cepas 143 y 139 identificadas como fijadoras de nitrógeno y las cepas 1Bp y 5Bp identificadas como *Bacillus pumilus* solubilizadores de fósforo.

**Palabras claves:** Bacterias promotoras de crecimiento, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus*.

**280. Objetivos:**

Determinar el efecto de 13 cepas de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de la papa en condiciones de campo.

Seleccionar el mejor grupo de cepas que presenten el mejor comportamiento agronómico.

**281. Hipótesis**

No existe efecto de las 13 cepas en el cultivo de papa.

**282. Revisión de literatura**

Muchas bacterias y hongos pueden asimilar nitrógeno inorgánico en forma de  $\text{NO}_3^-$ , para ello, reducen en primer lugar el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  mediante una enzima llamada reductasa asimilatoria del  $\text{NO}_3^-$ , luego reducen el  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_4^+$  mediante una enzima llamada reductasa asimilatoria del  $\text{NO}_2^-$  reductasas, pero todas ellas son molibdo-proteínas. Compuestos tales como el  $\text{NH}_4^+$ , la glutamina y el glutamato, en lugar de  $\text{NO}_3^-$ , son usados preferentemente por los microorganismos del suelo en el caso de estar disponibles. Así, inhiben el uso del  $\text{NO}_3^-$ , evitando en primer lugar que el  $\text{NO}_3^-$  penetre en las células microbianas y luego inhibiendo la síntesis o actividad de la  $\text{NO}_3^-$  reductasa (Coyne, 2000).

El ciclo microbiano del fósforo implica la transformación del fósforo entre los depósitos orgánicos e inorgánicos, así como entre las formas insolubles y solubles, los microorganismos juegan un papel primordial en la solubilización, la inmovilización y la mineralización. La cantidad de fósforo requerido a la cosecha es de 10 a 30 Kg de fósforo por hectárea, la capacidad de los microorganismos para solubilizar y mineralizar los depósitos de fósforo disponibles en los suelos resulta crucial. Las bacterias que solubilizan activamente el fósforo representan un 10% de la población microbiana del suelo, fundamentalmente de la rizosfera como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y algunos hongos, los mecanismos básicos para la solubilización del fósforo son: la quelación, la reducción del hierro y la acidificación (Coyne, 2000).

*Bacillus pumilus* es una bacteria promotora de crecimiento más conocida por las propiedades anti fúngicas, reportes como la de Bottone y Peluso (2003) indican que *Bacillus pumilus* emite componentes anti fúngicos que inhiben la germinación de esporas y el desarrollo de las hifas en las especies *Mucoraceae* y *Aspergillus*.

Diversas bacterias endófitas pueden colonizar plantas incluyendo en aquellas silvestres, la caracterización de estas, muestran el tipo de función que pueden cumplir como endófitos o

aquellas que actúan a nivel de la rizosfera, diversas bacterias endófitas fueron aisladas y caracterizadas a partir de muestras del cultivo de camote, la principal características de estas bacterias fue la función de fijar nitrógeno atmosférico, producción de ácido acético (AIA) además de mostrar cierta tolerancia a estrés, características propias de las bacterias promotoras de crecimiento (Khan y Doty, 2009).

La inoculación de bacterias endófitas en las plantas confirma la colonización y la habilidad de la misma como promotor de crecimiento alrededor de la raíz en la zona rizosférica y en la raíz en sí, sin embargo la interacción endófito planta no siempre es positiva en las diferentes especies de plantas, ya que estas pueden presentar cierta especificidad debido a la función a cumplir en cada una de las situaciones (Andreote et al., 2010).

Diversas poblaciones de bacterias están presentes en el suelo de rizosfera de campos cultivados que, directa o indirectamente promueven un mejor desarrollo de los mismos. Después del género *Bacillus*, el género *Paenibacillus* spp. es una de las poblaciones microbianas más frecuentes (McSpadden, 2004). Dentro del género *Paenibacillus* spp. se encuentran *P. polymyxa* y *P. massiliensis* que fijan nitrógeno en cultivos como el maíz, ballico y cebada (Ding et al., 2004).

### **283. Materiales y métodos** (Hacer énfasis en la metodología, procesos estadísticos, experimentales)

Ubicación del ensayo.- El presente trabajo se realizó en predios del centro experimental de Quipaquiapani, el cual, está ubicado a 41 Km de la ciudad de La Paz, 4 Km del municipio de Viacha, a 16° 40' 30" de latitud sur y a 68° 17' 58" longitud oeste y con una precipitación de 368 mm/año.

#### 1) Características de las cepas.

Una colección de bacterias endófitas ha sido aislada en el laboratorio de microbiología de Cochabamba a partir de tejido vegetal, tanto de tallo como de hojas, los cuales, se sometieron a evaluaciones en invernadero y se realizó la selección e identificación de 13 aislamientos de bacterias en base a las mejores características agronómicas del cultivo de lechuga, rabano y papa.

- 1Bp, 2Bp, 3B, 4Bp, 5Bp *Bacillus pumillus* (solubilizadores de fósforo).
- 139, 143, 149 mejores cepas de bacterias, resultado de una tesis de maestría en papa (fijador de nitrógeno).
- 1p, 2p, 3p, 4p, 5p *Paenibacillus* (fijador de nitrógeno).

Estos aislamientos han sido multiplicados y formulados en sólido en el laboratorio de microbiología de Cochabamba para su evaluación en campo.

#### 2) Inoculación en campo.

La inoculación se realizó al momento de la siembra, la dosificación fue la misma que Biobacillus 2 Kg/200 Lt/Ha (producto comercial).



**Figura 1. Peso e inoculación de las cepas para la siembra en campo.**

Se pesaron 3.2 gr del inóculo/cepa para cada unidad experimental, la técnica de inoculación consistió en espolvorear los 3.2 gr del inóculo en una bolsa contenido con los tubérculos y se homogenizó de manera que todos los tubérculos se recubran del inóculo, esto debido que la aplicación de *Biobacillus* en papa se la realiza generalmente por aspersión, lo que no ha sido factible por el número de cepas a probar.

3) Preparación del terreno.

Se realizó la roturación del terreno, luego la mullida y posteriormente el surcado.

La incorporación del compost se realizó manualmente utilizando una relación de 10 Tn/ Ha, la aplicación se la realizó inmediatamente luego del riego y por surco.

4) Siembra.

En papa se utilizaron 1.400 tubérculos para un área total del ensayo de 392 m<sup>2</sup>. Cada unidad experimental consta de 4 surcos de 4 m de largo, la distancia entre surcos de 0.7 m y entre plantas de 0.4 m.

5) Diseño experimental

Las 13 cepas más el testigo sin inocular conformaron los 14 tratamientos, los mismos fueron acomodados de acuerdo al diseño de bloques incompletos en un arreglo de látice simple con 2 repeticiones.



- 1 Bp ----- T 1
- 2 Bp ----- T 2
- 3 Bp ----- T 3
- 4 Bp ----- T 4
- 5 Bp ----- T 5
- 139 ----- T 6
- 143 ----- T 7
- 149 ----- T 8
- 1 p ----- T 9
- 2 p ----- T 10
- 3 p ----- T 11
- 4 p ----- T 12
- 5 p ----- T 13
- TESTIGO---- T 14

Croquis del diseño para el ensayo establecido en papa.



<b>BLQ</b> <b>1</b>	T 6	T 1	T 3	T 7	T 5	T 4	T 2
------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<b>BLQ</b> <b>2</b>	T 11	T 14	T 13	T 9	T 10	T 8	T 12
------------------------	------	------	------	-----	------	-----	------

<b>BLQ</b> <b>3</b>	T 7	T 9	T 5	T 11	T 1	T 3	T 13
------------------------	-----	-----	-----	------	-----	-----	------

<b>BLQ</b> <b>4</b>	T 2	T 8	T 6	T 10	T 4	T 14	T 12
------------------------	-----	-----	-----	------	-----	------	------

Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

i= 1,2,3,4 bloques.

j= 1,2,3,4,5,..., 14 cepas de bacterias más el testigo.

$Y_{ij}$ = valor de una variable de respuesta observado en el i-ésimo bloque donde se aplicó el j-ésimo aislamiento de bacteria.

$\mu$ = media general

$\beta_i$ = efecto aleatorio del i-ésimo bloque

$\alpha_j$ = efecto fijo del j-ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ij}$ = efecto aleatorio de los residuales.

6) Variables de respuesta.

Cada una de las variables de respuesta fueron de tomadas de 8 plantas muestra por unidad experimental.

- Altura de planta: se tomó la medida en cm desde el cuello hasta el ápice de la planta.
- Diámetro del tallo: se midió el grosor de la base del tallo de la planta utilizando un escalímetro.
- Numero de ramas: se contaron el número de ramas de cada planta.

A la cosecha:

- Numero de tubérculos por categoría: se contaron el número de tubérculos por categoría.
- Peso de tuberculos: se pesaron los tuberculos por categoría expresado en términos de rendimiento ton/ha.
- Longitud de raíz: se tomo la medida en cm desde el cuello de la planta hasta la el termino de la raíz.
- Peso de raíz: se tomo el peso de raíz en gr.
- Determinación de UFC: se realizo el conteo de desarrollo de colonias en medio LMA expresado en UFC/gr de suelo.

## 284. Resultados

### **Altura de planta.**

En base al cuadro 1, existen diferencias altamente significativas entre las cepas, siendo las cepas 143, 5Bp, 1Bp y 3p las que presentaron mayor altura de planta en comparación con el resto y el testigo como indica la Figura 1.

### **Diámetro de cuello.**

Las cepas que presentaron mayor diámetro fueron las cepas 3p, 5Bp, 3Bp, 1Bp, 143, 139 y 4Bp en el mismo orden de importancia, siendo esta variable un indicador de vigor de la planta (Figura 2).

### **Numero de ramas.**

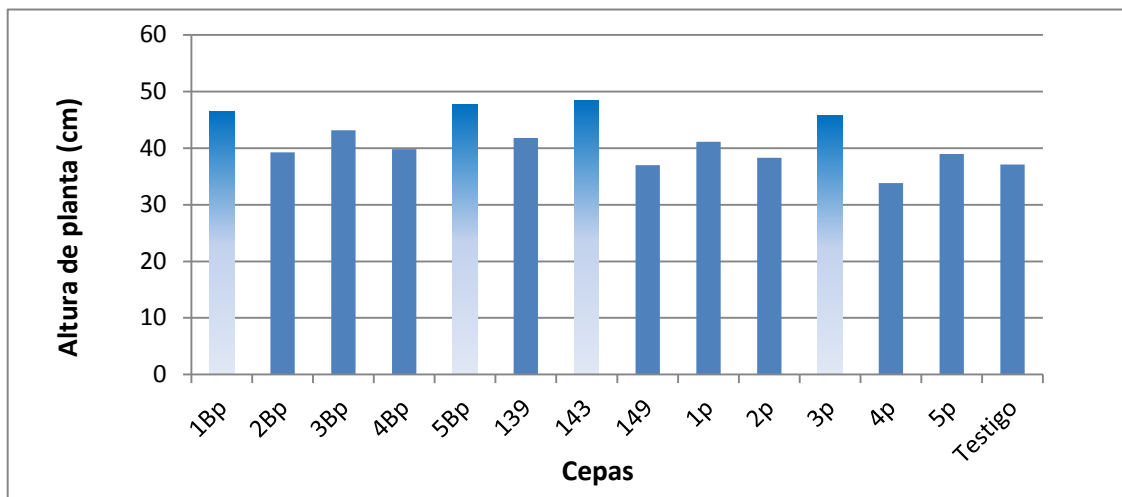
De acuerdo al cuadro 1, no hubo diferencias significativas entre cepas, lo que indica que el número de ramas fue el mismo entre las cepas y el testigo.



**Figura 2.** Desarrollo de la planta en etapa de floración y el acomodo bajo el arreglo del diseño de bloques incompletos.

**Cuadro 1.** Cuadro ANVA sobre las variables altura de planta, diámetro de cuello y número de ramas.

Fuentes de variación	GL	Alt_planta	Diam_cuello	N_ramas
Bloque	3	0.0001	0.0026	0.1884
Cepas	13	0.0001**	0.0001**	0.1541



**Figura 1.-** Variable altura de planta de cada una de las cepas.

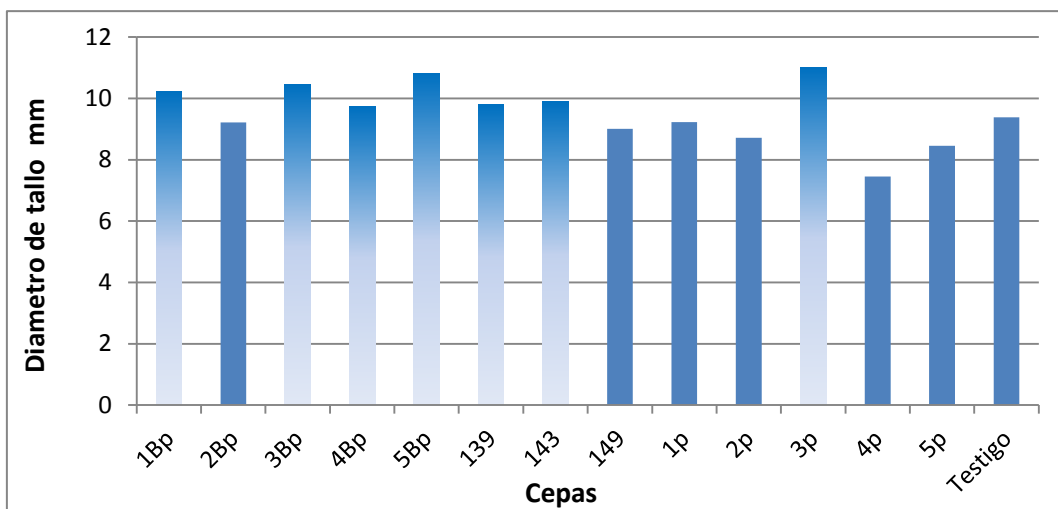


Figura 2. Variable diámetro de cuello.

### Número de tubérculos por planta.

El número de tubérculos por planta fue diferente entre las categorías y entre las cepas, sin embargo, las cepas tuvieron el mismo número dentro de cada categoría (Cuadro 2.). A nivel general, las categorías extra, primera y segunda son las que se consideran aptas para la comercialización pero fueron las que tuvieron menor número por el tamaño grande que representa, la categoría tercera es más considerada con fines de semilla y de la misma manera contiene menor número de tubérculos, luego, las categorías cuarta y quinta son destinadas generalmente para conservación (chuño) y contienen mayor número que el resto de las categorías, lo que se esperaba por la existencia de bastantes tubérculos pequeños. Las cepas con mayor número de tubérculos fueron 5Bp, 1Bp, 139, 143, 3p y 2Bp que el resto de las cepas incluyendo al testigo (Figura 3). A pesar de que no existieron diferencias entre categorías por cepas, cabe resaltar que la cepa 143 tuvo el primer lugar en las categorías extra, primera, segunda y tercera como indica la Figura 4., característica que indica que esta cepa podría incrementar el tamaño de los tubérculos que son categorizados para su comercialización y producción de semilla, lo que no ocurre con el resto de las cepas.

**Cuadro 2. Cuadro ANVA de las variables tomadas a la cosecha: número de tubérculos, rendimiento por cepas, rendimiento por el total de la unidad experimental (U/E), longitud y peso de raíz, unidades formadoras de colonia.**

Fuentes de variación	de GL	N_tuberculos	Rendimiento	Rendimiento U/E	L_raiz	P_raiz	UFC
Categoría	5	0.0001**		0.0001**			
Bloque	3	0.0144	0.0152	0.2293	0.5200	0.8591	10.000
Cepas	13	0.0352*	0.0002**	0.0463*	0.2838	0.9648	0.0691
Categoría *Cepa	65	0.3380		0.9852			

Longitud de raíz, peso de raíz y unidades formadoras de colonia (UFC).

El cuadro 2, indica que las variables longitud y peso de raíz fueron iguales entre las cepas y semejantes al testigo, lo que indica que no hubo efecto de las diferentes cepas en el desarrollo de la raíz. De la misma manera, las poblaciones bacterianas (UFC) en 1 gramo de suelo fueron de comportamiento igual al testigo.

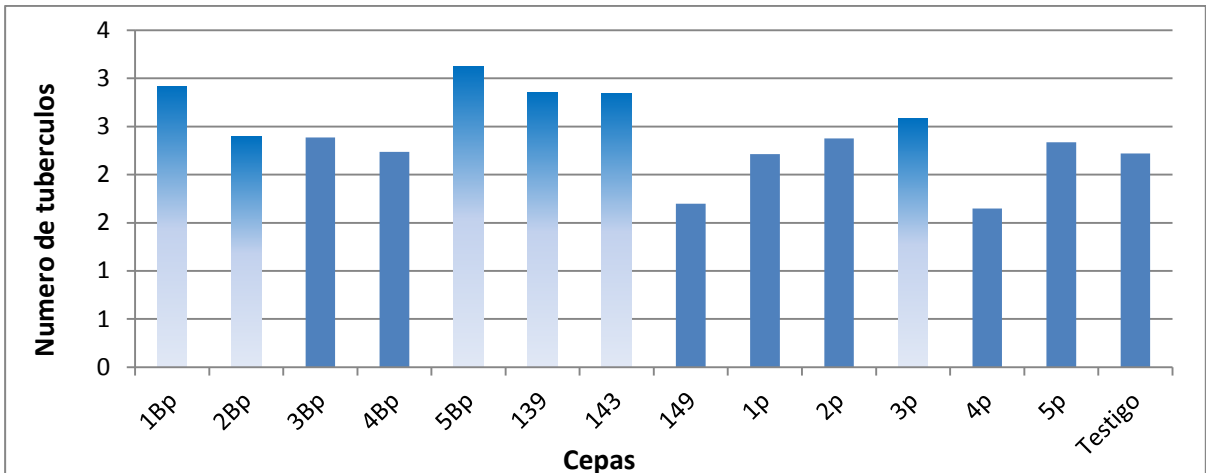


Figura 3. Variable número de tuberculos.

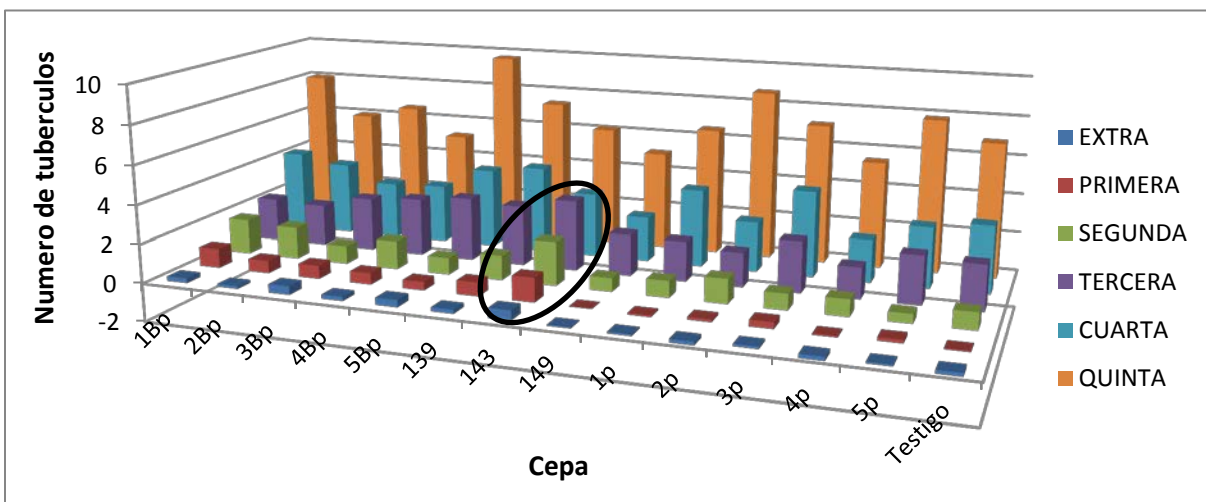


Figura 4. Número de tuberculos por categoría.

#### Rendimiento por planta.

El rendimiento por planta indica que al menos una de las cepas fue diferente (Cuadro 2), las cepas con mayores rendimientos fueron 143 con 32,97 Ton/Ha y la cepa 1Bp con 28,57 Ton/Ha en comparación al resto de las cepas y el testigo que oscilo desde 23,34 a 12,73 Ton/Ha (Figura 5).



Figura 4. Tuberculos de plantas individuales donde se inoculó la cepa 143 (T7).



Figura 3. Tuberculos de plantas individuales donde se inoculo la cepa 1Bp (T1).

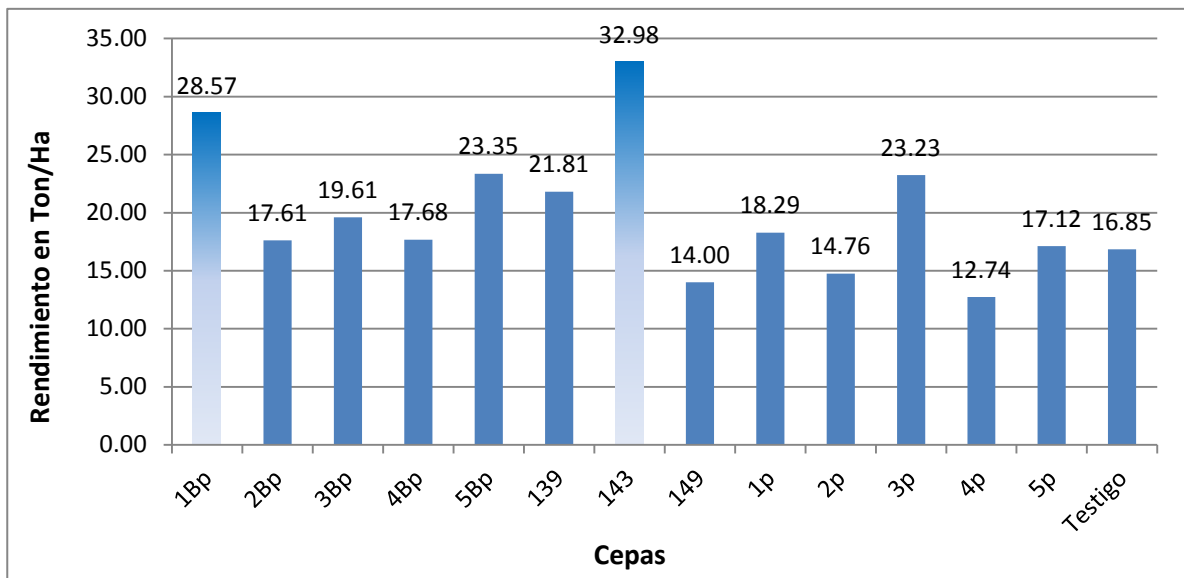


Figura 5. Variable rendimiento de tubérculos por cepa.

#### Rendimiento en base a categorías por unidad experimental (UE).

El rendimiento por unidad experimental muestran diferencias significativas entre las categorías y las cepas y no así en la interacción categoría por cepa (Cuadro 2), lo que sugiere que las cepas presentaron el mismo comportamiento dentro de cada categoría; así mismo, las

categorias segunda y tercera fueron las que presentaron mayores rendimientos de 2,76 y 3,22 Ton/Ha respectivamente en comparacion a las categorias que presentaron menores rendimientos primera y cuarta que presentaron 1.42 y 1.79 Ton/Ha respectivamente. De acuerdo con la Figura 6, las cepas que presentaron mayores rendimientos fueron 143, 1Bp, 139 y 5Bp (entre 3,45 y 2,79 Ton/Ha) que el resto y el testigo. El mismo comportamiento se presenta dentro de cada una de las categorias como muestra la Figura 7.

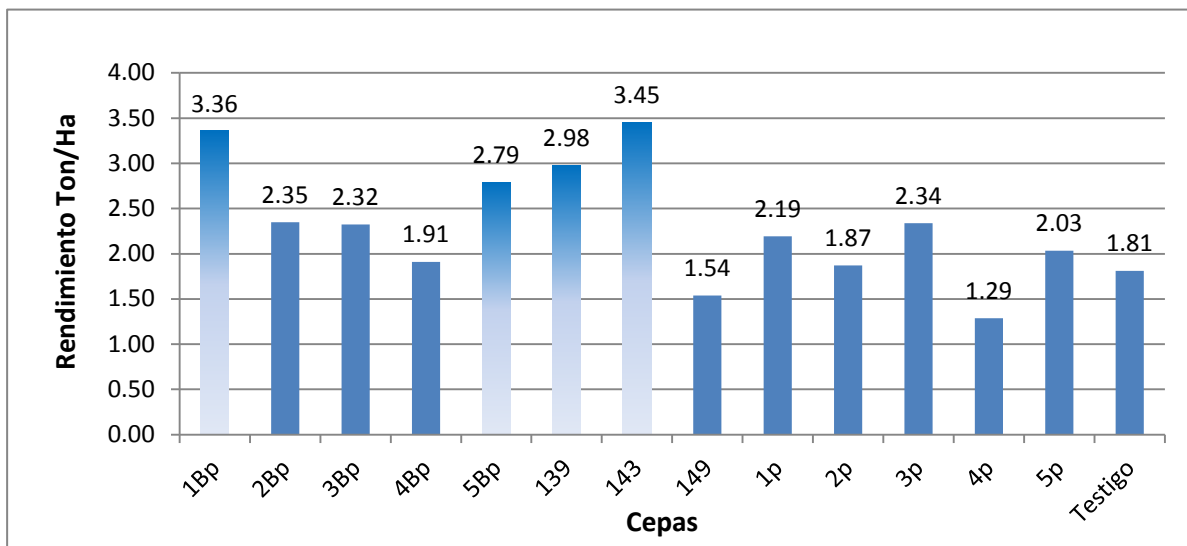


Figura 6. Rendimiento de cada cepa por unidad experimental (UE).

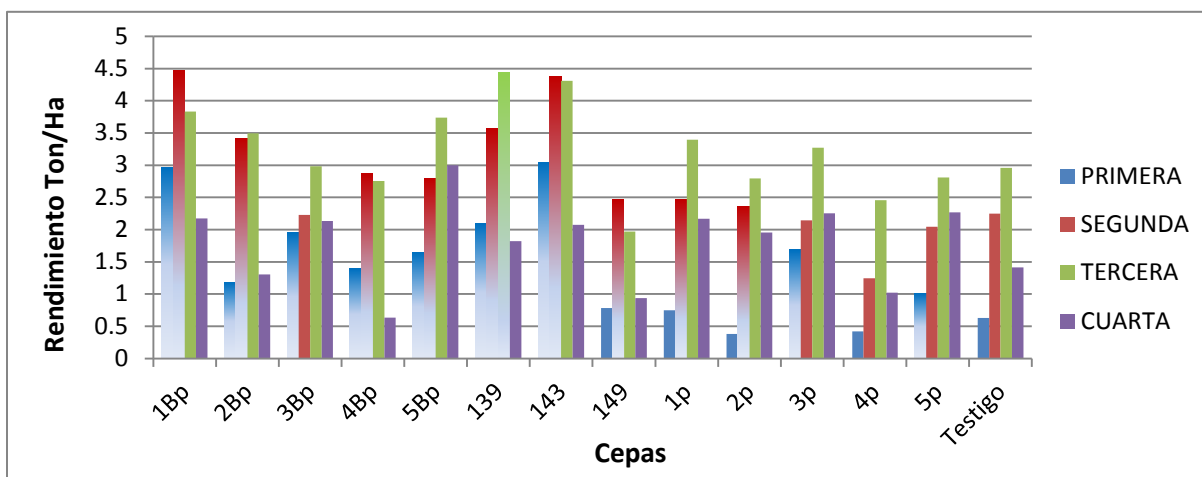
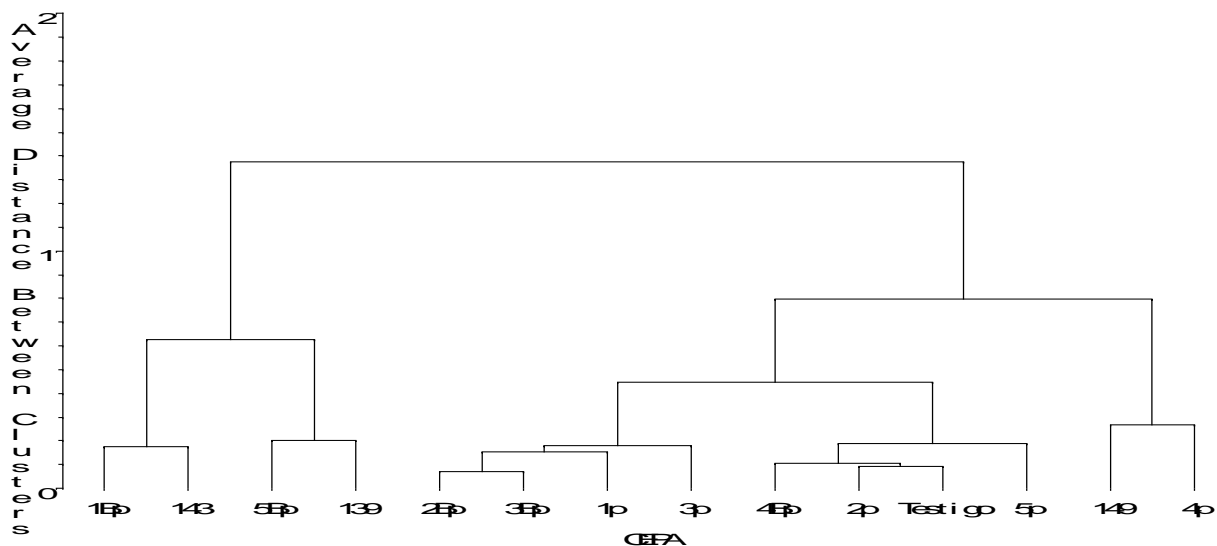


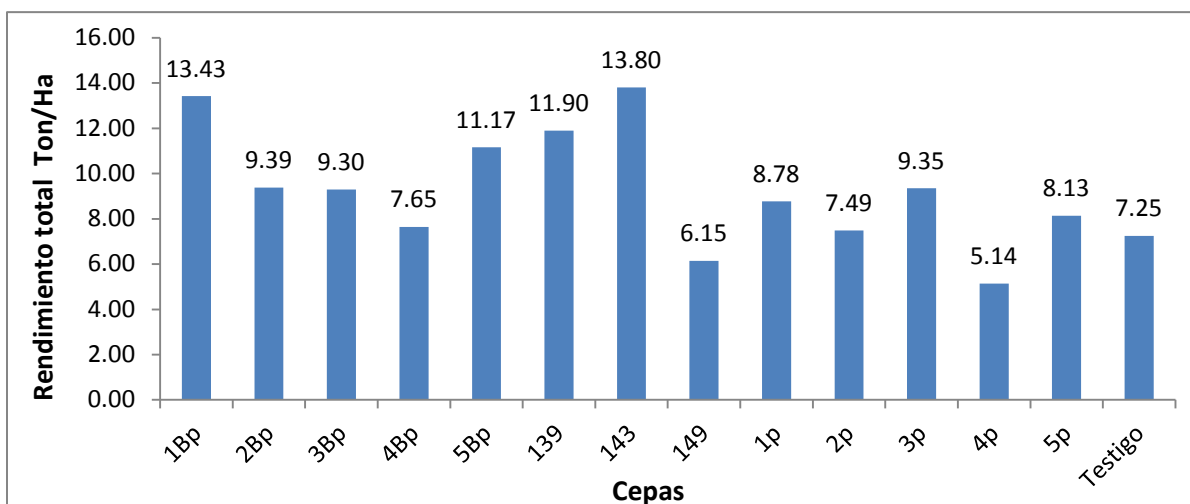
Figura 7. Rendimiento por unidad experimental por categoría.

El agrupamiento de CLUSTER (Figura 8), en base a las variables altura de planta, diametro de cuello, rendimiento por planta y rendimiento por unidad experimental distinguen a las cepas 1Bp y 5Bp identificadas como *Bacillus pumilus* solubilizadores de fosforo, las cepas 143 y 139 identificadas como fijadoras de nitrogeno son aquellas bacterias que promueven y mejoran tanto el desarrollo y rendimiento del cultivo de papa.



**Figura 8. Agrupamiento de las mejores cepas en base a altura de planta, diámetro de cuello, rendimiento por planta, rendimiento por UE y número de tubérculos.**

Estas cepas coinciden con el rendimiento total (suma de los rendimientos de las categorías por cepa) que se muestra en la Figura 9, las cepas 143 con un rendimiento de 13,80 Ton/Ha, la cepa 1Bp con 13,43 Ton/Ha, la cepa 139 con 11,90 Ton/Ha y finalmente la cepa 5Bp con 11,17 Ton/Ha.



**Figura 9. Suma total de los rendimientos de las categorías por cepa.**

## 285. Discusión

El desarrollo de la planta coincide con lo mencionado por Cordova (2011), donde el efecto de la inoculación con diferentes cepas en vivero presentó un incremento progresivo en altura de planta y número de tallos, así mismo, el rendimiento fue mayor en la variedad waych'a donde destaca a 2 cepas para el incremento de las mismas, como también la cepa de menor rendimiento frente al testigo.



La inoculación con bacterias endófitas tienen efectos positivos sobre los cultivos como el camote en el que también encontraron una colección de cepas que promovían el crecimiento caracterizados por la fijación de nitrógeno y la producción de ácido indol acético (AIA)(Khan y Doty, 2009).

Las poblaciones microbianas están fuertemente sujetos al metabolismo de la especie de la planta y las condiciones medioambientales, según Dini et al (2010), las bajas poblaciones microbianas inoculadas en papa se deben a la competencia con los microorganismos nativos, lo que corrobora que las cepas seleccionadas que fueron aisladas del altiplano tienen un comportamiento poblacional (UFC) igual que el resto de las cepas, los cuales no tendrán competencia con algún otro microorganismo.

#### **286. Conclusiones**

En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se concluye que:

El efecto de la inoculación entre las diferentes cepas, fue diferente en el desarrollo de la planta, siendo 8 las cepas que tuvieron un mejor efecto 1Bp, 5Bp, 143, 3p, 2Bp, 3Bp, 4Bp y 139 sobre altura de planta, número de ramas, número de tubérculos y rendimiento en condiciones de campo.

Las cepas con mejores características en cuanto a altura de planta número de ramas, número de tubérculos y rendimiento son las cepas 1Bp y 5Bp identificadas como *Bacillus pumilus* solubilizadores de fósforo, las cepas 143 y 139 identificadas como fijadoras de nitrógeno.

#### **287. Recomendaciones**

Dentro de las cepas seleccionadas se encuentran 2 cepas que fijan nitrógeno y 2 que solubilizan fósforo, funciones fundamentales en el desarrollo del cultivo, la combinación de estas cepas sería objeto a seguir con estudios que determinen la compatibilidad de estas bacterias y su efecto en el cultivo con el objetivo de desarrollar un biofertilizante con ambas funciones el de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo.

#### **288. Bibliografía consultada**

Andreote F, Rocha U., Araujo W., Azevedo J., Overbeek L., 2010, Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*), *Antonie Van Leeuwenhoek* (2010) 97:387-399, Brazil.

Bottone E. y Peluso R., 2003, Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report, *Journal of medical microbiology* (2003) 52, 69-74, New York, United States.

Cordova M., 2011, Evaluación de bacterias endófitas nativas, en dos variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum andigena*), como promotoras de crecimiento vegetal, para el desarrollo de biofertilizantes, Tesis de Posgrado para obtener el título de Maestría en

“Proteccion Vegetal y Medio Ambiente”, Universidad Mayor de San Simon, Facultad de Ciencias Agricolas Pecuarias, Forestales y Veterinaria “Dr. Martin Cardenas”, Direccion de Posgrado, Cochabamba – Bolivia.

Coyne M., 2000, Soil Microbiology: An Exploratory Approach by Mark Coyne, Editorial Paraninfo, Madrid – España.

Ding Y., Wang J., Liu Y and Chen S., 2004, Isolation and identification of nitrogen – fixing from plant rhizosphere in Beigin region, Sanfeng Chen, Department of Microbiology, China Agricultural University, China, Journal of Applied Microbiology 2005, 99, 1271–1281.

Dini F., Nunes da Rocha U., Araujo W., Azevedo J, van Overbeek L., 2010, Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*), Antonie van Leeuwenhoek (2010) 97:389–399.

Khan Z. y Doty S., 2009, Characterization of bacterial endophytes in sweet potatos plants, Plant soil (2009) 322:127-207, Washington, United Estates.

McSpadden B., 2004, Ecology of Bacillus and Paenibacillus spp. In Agricultural systems, Departament of Plant Pathology, Ohio Estate University OARDC, EEUU, Phytopathology 94:1252-1258.

## **PRODUCTO 6 DIFUSION DEL CONOCIMIENTO**

### **Cursos de bioinsumos para agricultores**

<b>FECHA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>TEMA</b>	<b>PARTICIPANTES</b>	<b>NUMERO DE PARTICIPANTES</b>
30/Abril/2009	San Benito, San Lorenzo	Curso “Elaboracion de abonos organicos”	Técnicos, Asociaciones ERO, ASORIER, productores	24
Sep/2009	Cliza	Curso. “Bioinsumos en frutales, y fisiología de las plantas frutales”	HA Municipal de Cliza, Técnicos, Asociaciones AGROVAL, productores	17
8/Oct/2009	San Benito, San Lorenzo	Curso “Elaboracion de biofertilizantes y abonos organicos	Técnicos, Asociaciones ERO, ASORIER, productores	20
15/Oct/2009	San Benito, San Lorenzo	Curso “Produccion organica y Bioinsumos”	Técnicos, Asociaciones ERO, ASORIER, productores	31

22/Oct/2009	San Benito, Urey Rancho	Curso "Produccion organica y Bioinsumos"	Técnicos, Asociaciones ADAPUR, productores	27
24/Oct/2009	San Benito, San Lorenzo	Curso "Manejo de plagas y enfermedades con bioinsumos"	Técnicos, Asociaciones ERO, ASORIER, productores	30
26/Oct/2009	Cochabamba-UMSS	Curso "Produccion organica y Bioinsumos"	Docentes, Técnicos, universitarios	18
12/Nov/2009	Capinota	Curso. "Manejo de cultivos con Bioinsumos"	HA Municipal de Capinota, PDA Capinota, SEPA, Técnicos, Asociaciones, productores	18
12/Nov/2009	Cliza	Curso. "Manejo de hortalizas con Bioinsumos"	HA Municipal de Cliza, Técnicos, Asociaciones AGROVAL, productores	15
13/Nov/2009	San Benito, Urey Rancho	Curso "Manejo de plagas y enfermedades con bioinsumos"	Técnicos, Asociaciones ADAPUR, productores	25
26/Nov/2009	Capinota	Curso. "Manejo de semilla y plagas y enfermedades de la papa"	HA Municipal de Capinota, PDA Capinota, SEPA, Técnicos, Asociaciones, productores	15
Feb/2010	Arbieto	Curso "Bioinsumos en frutales, hortalizas, maíz"	HA Municipal Arbieto, técnicos, Asociaciones APACA, productores	12
Mayo/2010	Punata	Curso "Estrategias de manejo de cultivos con Bioinsumos"	HA Municipal de Punata, técnicos, Asociaciones AAPP, productores	65
3/julio/2010	San Benito	Curso "Produccion organica y Bioinsumos"	Técnicos, Asociaciones AGRIFECCO, productores	30
10/Sep/2010	Punata	Curso "Bioinsumos en frutales, hortalizas, maíz"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	36
Sep/2010	Quillacollo	Curso "Bioinsumos en frutales, hortalizas, maíz, floricultura"	HA Municipal Quillacollo, Técnicos, Asociaciones, productores	35
Dic/2010	San Benito	Curso "Manejo de plagas y enfermedades con bioinsumos"	Técnicos, Asociaciones AGRIFECCO, productores	26
8/jun/2011	San Benito	Curso "bioinsumos en frutales, hortalizas, maíz"	FAUTAPO, Técnicos, productores	32
27/Jun/2011	Santa Ana (Punata)	Curso "bioinsumos en frutales, hortalizas, maíz"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones, productores	40
1/Julio/2011	Punata	Curso "Poda moderna en frutales"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	25

15/Julio/2011	Punata	Curso "Tratamiento de invierno en frutales"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	35
12/agosto/2011	Punata	Curso: "Implementación de huertos nuevos modernos, con bioinsumos"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	30
15/sep/2011	Santa Ana (Punata)	Curso: "Elaboración y uso de bioinsumos en maíz"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	30
11/Nov/2011	Punata	Curso "Estrategias de manejo de enfermedades en frutales"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	25
19/Nov/2011	Punata	Curso "Aplicación de biofertilizantes en frutales"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	21
Nov/2011	Mizque	Curso "Estrategia de manejo de la quinua orgánica"	Proyecto semilla PNUD, Técnicos, productores	100
23/Dic/2011	Punata	Curso "Manejo de mosca de la fruta"	HA Municipal Punata, Técnicos, Asociaciones AAPP, productores	20
Feb/2012	Colomi	Curso "Bioinsumos en el cultivo de papa y haba"	PIC, HA Colomi, SEDAG, SENASAG, Asociaciones, productores	30
Marzo/2012	Arbieto	Curso "Bioinsumos en multiplicación de plantines de frutales y manejo de huertos frutales"	PIC-frutales, HA Arbieto, Asociaciones, productores	40
Abril/2012	San Benito	Curso "Bioinsumos en multiplicación de plantines de frutales y manejo de huertos frutales"	PIC-frutales, HA Municipal San Benito, Asociaciones, productores	26
Mayo/2012	San Benito	Curso-taller: "Bioinsumos en producción de Vid"	HA Municipal San Benito, CENAVIT, Técnicos, Asociaciones, productores	20