



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Efecto de un inoculante multiespecies (EMMIM-1) en papa

***Solanum tuberosum*, cv. Atlantic, propagada en laboratorio y crecida en invernadero.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN:

BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA

Lic. Nutrición. Yair Santiago Saenz

ASESOR (ES) DE TESIS

D.C Jesús Muñoz Rojas

PUEBLA, PUE.

AGOSTO, 2014

Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea; la palabra imposible no tiene significado.
(Napoleón Bonaparte)

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Antes de comenzar con todo lo que implica un trabajo de tesis, me tomé unos momentos para escribir este apartado que ha mi criterio es muy satisfactorio y necesario para mencionar a todas las personas que formaron parte importante en mi estancia de posgrado.

Primordialmente le agradezco a Dios por mantenerme vivo y sano ya que sin él ninguna persona podría concluir sus planes y que por mi parte me permitió finalizar mis estudios de posgrado, así como a la persona a quién mas amo, mi Cariño, quien estuvo apoyándome en todo momento desde el inicio de este camino hasta el final, soportando la distancia, la cual fue muy dura, teniendo nuestras altas y bajas, por esto te agradezco al brindarme todo lo que necesitaba para que siguiera adelante y no permitiendo que nada me falte, nuestro esfuerzo valió la pena, gracias amor.

Esta tesis también se la dedico a mi hermosa familia a quien quiero, mis padres Olovaldo y Margaret y mis hermanas Niurka e Iraida a quienes a pesar de las decisiones fuertes que he tomado a lo largo de mi vida siempre me han brindado su apoyo y charlas de ánimo en los días más pesados y deprimentes que he tenido.

No quiero olvidarme de mis amigos, Julia María mi mejor amiga y a el buen amigo Rafael, quienes estuvieron siempre apoyándome, en caso de Julia enseñándome todo lo que sabía, y a ambos agradezco que me pusieran de buen humor en los momentos más negros así como la ayuda oportuna cuando más la necesitaba, me apoyaron mucho amigos míos, y al grupo del laboratorio que me ayudó en el tiempo de mi aprendizaje, muchas gracias a ustedes primeramente Dalia Molina y Osvaldo Andrade los que llevan los conocimientos más adelantados, agradezco su asesoría; Jessie, Dalia, Simón, Jhovani quien me tendió su ayuda grandemente en el trabajo de campo, Catherine y Laura Hernández, gracias por su ayuda emocional y laboral, al igual le doy gracias a los estudiantes de licenciatura en estancia de investigación Sonia y Bruce que me hecharon la mano en los experimentos, en verdad gracias por sus desveladas.

Agradezco de igual manera al D.C Arturo Elías Domínguez, D.C Ricardo Carreño López, D. C Antonio Munive Hernández y al M.C Héctor Gutiérrez, por su apoyo, asesoría y orientación en este proyecto de investigación.

Finalmente quiero mencionar a mi asesor de tesis, el D.C Jesús Muñoz Rojas y a la D. C Elizabeth Morales García, primero que nada por aceptarme a su grupo de investigación, por su esfuerzo y dedicación, por enseñarme y nunca perder la cordura, quienes con sus conocimientos, experiencia, y paciencia entendieron las etapas por las que pasaba mi vida y me brindaron la motivación necesaria para poder seguir adelante y terminar mis estudios con éxito.

Gracias a todos, hicieron mi estancia en el posgrado y en la ciudad de Puebla placentera. Estén bien y que todos sus planes y metas se cumplan.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
por permitirme ingresar y concluir el Posgrado.

Agradecimientos al apoyo brindado por Proyecto CONACYT (No. de Becario: **445884**) de apoyar
al presente trabajo científico.

Esta tesis fue realizada con financiamiento CONACYT 000000000156576, VIEP NAT13I-14I,
PRODEP y CUVyTT DITCo2014-09.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades de la planta de papa <i>Solanum tuberosum</i> .	
1.1.1 Descripción de la planta de papa <i>Solanum tuberosum</i> .	
1.1.1.1 Características.	
1.1.1.2 Crecimiento y desarrollo del cultivo.	
1.1.1.3 Temporadas del cultivo.	
1.1.1.4 Variabilidad en la planta de papa <i>Solanum tuberosum</i> y factores determinantes para su siembra y crecimiento.	
1.1.1.5 Análisis comparativo entre <i>Solanum tuberosum</i> variedad Alpha y Atlantic.	
1.1.2 Contenido nutrimental y enfoque en programas de seguridad alimentaria e intervención nutricional.	
1.1.3 Enfermedades microbianas en plantas. Fitopatógenos.	
1.1.3.1 Enfermedades Víricas en plantas.	
1.1.3.2 Enfermedades Bacterianas en plantas.	
1.1.4.3 Enfermedades Fúngicas en plantas.	
1.1.3 Fitopatógenos en plantas de papa <i>Solanum tuberosum</i> .	
1.1.4 Agroquímicos en plantas de papa <i>Solanum tuberosum</i> .	
2. Antecedentes.....	13
2.1 Interacciones entre poblaciones microbianas.	
2.1.1 Interacciones dentro de la misma población microbiana.	
2.1.2 Fijación de Nitrógeno en los nódulos radicales.	
2.2. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).	
2.3 Inoculantes Bacterianos.	
2.3.1 Elaboración de inoculantes.	
2.3.2 Inoculantes en cultivos.	
2.3.3 Normatividad en inoculantes.	
3. Justificación.....	23
4. Objetivos generales y específicos.....	23
5. Esquema Experimental.....	24
6. Material y Métodos.....	25
6.1 Exploración de condiciones para propagación de brotes de papa.	
6.2 Exploración de técnicas para propagación de plantas de papa.	
6.3 Curvas de crecimiento.	
6.4 Dinámicas de población.	
6.4.1 Suspensiones	
6.4.2 Adhesión.	
6.4.3 Colonización.	
6.5 Determinación de clorofila.	
6.6. Indicadores finales agronómicos.	
6.7. Análisis estadístico	
7. Resultados.....	37
7.1 Exploración de condiciones adecuadas para propagación de brotes de papa.	
7.1.1 Temperatura	
7.1.2 Humedad relativa	
7.1.3 Número de brotes obtenidos.	
7.2 Evaluación de la capacidad de adaptación de plantas inoculadas y controles en condiciones de invernadero.	
7.2.1 Porcentaje de supervivencia.	
7.2.1.1 Técnica de “Extracción de Brote” a 5, 30 y 50g de fertilizante.	
7.2.1.2 Técnica de “Semilla de Papa” a 5, 30 y 50g de fertilizante.	
7.3 Suspensiones, Adhesiones y Colonizaciones de las cepas del EMMIM-1 en plantas	

de papa.	
7.3.1 Técnica de “Extracción de Brote” a 5, 30 y 50g de fertilizante.	
7.3.2 Técnica de “Semilla de Papa” a 5, 30 y 50g de fertilizante.	
7.4 Efectos del EMMIM-1 como promotor del crecimiento en papa bajo condiciones de invernadero.	
7.4.1 Indicadores finales agronómicos en tratamientos de 5, 10, 30 y 50g de fertilizante por técnica de Extracción de Brote.	
7.4.2 Indicadores finales agronómicos en tratamientos de 5, 10, 30 y 50g de fertilizante por técnica de Semilla de papa	
7.5 Determinación de clorofila.	
7.5.1 Curva de absorbancia de clorofila.	
7.5.2 Obtención de clorofila por Método de extracción en frío.	
8. Discusión de resultados.....	66
9. Conclusiones.....	73
10. Perspectivas.....	74
11. Bibliografía.....	75
12. Anexos.....	90
12.1 Curvas de crecimiento bacteriano.	
12.1.1 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	
12.1.1.1 Curva de turbidez.	
12.1.1.2 Curva de crecimiento.	
12.1.1.3 Regresión lineal.	
12.1.2 <i>Sphingomonas</i> sp. OF178.	
12.1.2.1 Curva de turbidez.	
12.1.2.2 Curva de crecimiento.	
12.1.2.3 Regresión lineal.	
12.1.3 <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	
12.1.3.1 Curva de turbidez.	
12.1.3.2 Curva de crecimiento.	
12.1.3.3 Regresión lineal.	
12.1.4 <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	
12.1.4.1 Curva de turbidez.	
12.1.4.2 Curva de crecimiento.	
12.1.4.3 Regresión lineal.	
12.1.5 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 ^T	
12.1.5.1 Curva de turbidez.	
12.1.5.2 Curva de crecimiento.	
12.1.5.3 Regresión lineal.	
12.1.6 <i>Burkholderia unamae</i> MTI-641	
12.1.6.1 Curva de turbidez.	
12.1.6.2 Curva de crecimiento.	
12.1.6.3 Regresión lineal.	

RESUMEN

En el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana se ha desarrollado un inoculante multiespecies (EMMIM-1), con 6 cepas bacterianas cosmopolitas que confieren beneficios a las plantas o al ambiente. Por ejemplo con potencial para la biodegradación de compuestos xenobióticos o con potencial promotor del crecimiento de las plantas; como el Maíz (Morales-García, 2013). En el presente trabajo la formulación EMMIM-1 fue explorada en su capacidad para estimular el crecimiento de la papa, *Solanum tuberosum* variedad Atlantic. En primera instancia se realizaron las respectivas curvas de crecimiento de cada cepa, donde fue obtenida la curva de turbidez por medición de absorbancias, y la propia curva de crecimiento poblacional a las 24 o 48 h por cuantificación bacteriana (UFC/ml) mediante diluciones seriadas y goteo en placa tradicional en los medios de selección correspondiente, para finalmente obtener la tasa de generación de cada bacteria, determinando el tiempo requerido para que cada cepa llegue a la fase estacionaria. Posteriormente, se realizaron diversos experimentos, que permitieron conocer el comportamiento de las bacterias que integran el multinoculante en asociación con plantas de papa.

Diversas concentraciones de fertilizante (Triple 16), y dos técnicas distintas para propagar la plántula de papa fueron empleadas en esta tesis para evaluar los efectos del inoculante en condiciones de laboratorio e invernadero. Se midieron diversos indicadores para demostrar diferencias entre plantas que fueron tratadas con el EMMIM-1 más fertilizante y aquellas a las que solamente se adicionó agua más fertilizante. Los resultados mostraron que las plántulas de papa inoculadas presentaron un porcentaje de supervivencia más alto en comparación con las no inoculadas. La capacidad de adhesión de las cepas bacterianas, que conforman al inoculante multiespecies, fue adecuada a 48 horas posteriores a su aplicación. La colonización bacteriana a diversos tiempos (20, 50, 90 días) se observó en números adecuados, para promover el crecimiento de la planta, en el rango de 10^5 a 10^7 UFC/ml.

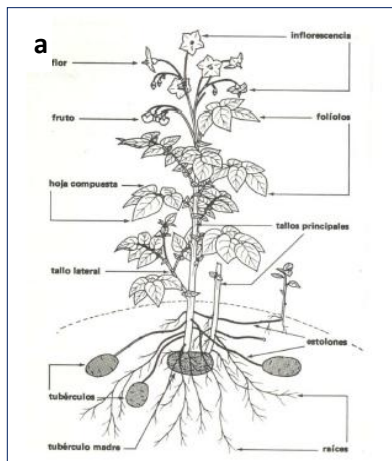
En el estudio también se realizó la determinación de clorofila por medición de absorbancias con valores estadísticamente similares para plantas de tratamientos inoculados y no inoculados. Posteriormente se midieron indicadores agronómicos finales como longitud del tallo, longitud de raíz, así como sus respectivos pesos frescos y secos, pesos de los tubérculos y número de producto obtenido. De esta manera las plantas inoculadas con EMMIM-1 manifestaron promedios estadísticamente mayores en algunos parámetros, con referencia a plantas controles no inoculadas.

INTRODUCCIÓN

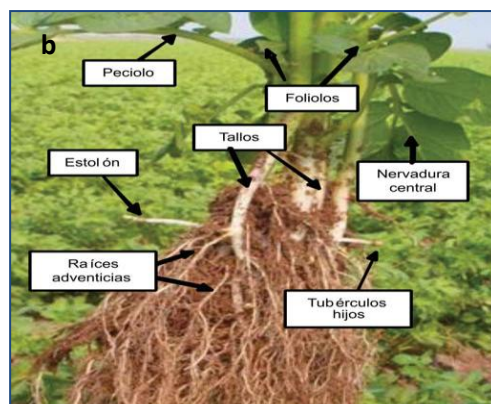
Generalidades de la planta de papa *Solanum tuberosum*.

- Descripción de la planta de papa
- Características

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate. Esta planta se compone de diversas estructuras, se reconocen dos secciones principales, la parte aérea y el sistema radicular (Figura 1). La región aérea comprende a los tallos, hojas flores y frutos. Los tallos y hojas constituyen los órganos de fotosíntesis de la planta; de su tamaño y actividad fotosintética depende la capacidad de la planta para la producción diaria y el crecimiento de los tubérculos. Varios niveles de ramificaciones resultan en un mayor número de hojas que normalmente derivan en una mayor duración del área foliar. En el sistema radicular, se encuentran los estolones, los tubérculos y las raíces adventicias. Los estolones son tallos laterales que se forman en los nudos que crecen debajo del suelo, con crecimiento diageotrópico, entrenudos largos y cuya punta termina en un gancho. Los tubérculos, son tallos modificados para el almacenamiento de reservas, principalmente almidón y tienen entrenudos muy cortos. Los entrenudos son mucho más grandes en diámetro que en largo. Las raíces adventicias, fasciculadas, nacen desde la base de los brotes y a nivel de los nudos subterráneos, son responsable de la absorción del agua y nutrientes desde el suelo y del anclaje de la planta.



Fuente: Struik and Ewing, 1994

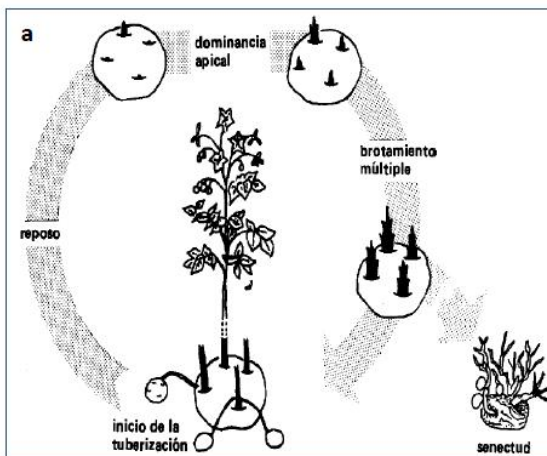


Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2007

Figura 1. Esquema de una planta de papa; a) Esquema detallado de las estructuras principales en una planta de papa en su fase final del cultivo. b) Fotografía de una planta de papa lista para cosecharse (120 días), mostrando algunos de sus componentes.

- Crecimiento y desarrollo del cultivo

Según Cortbaoui (1990) desde el inicio de la tuberización, el tubérculo de papa pasa por varios estados de desarrollo fisiológico: reposo, dominancia apical, brotamiento múltiple y senectud (Figura 2). En el reposo, no se han formado brotes, la emergencia es retardada y no uniforme. En la dominancia apical, solo se desarrolla el brote apical; el resultado es un cultivo no uniforme de plantas que tienen un solo tallo. En el estado de brotamiento múltiple, se desarrollan varios brotes, que llevan una buena emergencia y a un cultivo uniforme. De acuerdo con Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2007), esta etapa comprende la tuberización la cual inicia cuando los estolones aparecen. La duración de esta etapa varía de 10 a 14 días, un déficit de humedad en este periodo puede reducir el número de tubérculos producidos por cada planta. El desarrollo de tubérculos se caracteriza especialmente por la acumulación de carbohidratos (en forma de almidón), con un incremento constante en el tamaño y peso de los tubérculos, bajo condiciones óptimas de humedad. Esta etapa puede durar de 60 a 90 días, lo que depende del clima y sanidad del cultivo. La humedad tiene una relación directa con el tamaño y calidad de los tubérculos, principalmente a mediados de la tuberización, que se presenta de tres a seis semanas después del inicio del cultivo, el crecimiento de los tubérculos puede retardarse bajo condiciones de estrés hídrico y no es común que continúe uniformemente después de aplicarse el riego.



Fuente: Cortbaoui, 1990.



Fuente: Propia, 2013.

Figura 2. Desarrollo fisiológico de la semilla de papa; a) Esquema según Cortbaoui (1990) caracterizando las diversas fases fisiológicas en la planta de papa. b) Fotografías tomadas en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana y en condiciones de invernadero, se muestran los diversos estados que atraviesa la semilla de papa durante el desarrollo.

Finalmente la maduración empieza con la caída del follaje, donde las hojas viejas se tornan amarillas hasta llegar, gradualmente, a un color café. En esta etapa se observa un crecimiento mínimo de los tubérculos y los requerimientos hídricos van disminuyendo por la reducida

evapotranspiración de las hojas en el proceso de secado. En la senectud (en caso que la semilla de papa no haya sido utilizada), se observan brotes débiles y la emergencia es deficiente. Los tubérculos sembrados en estado fisiológico y condiciones de crecimiento óptimos, desarrollan sus brotes rápidamente, hasta la formación de suficiente follaje para la fotosíntesis. La planta vive de los nutrimentos suministrados por el tubérculo-semilla. Después, las raíces suministran agua y nutrimentos del suelo (Cortbaoui, 1990).

Cabe destacar que diversos autores manejan clasificaciones diferentes del desarrollo fisiológico de la planta, desde el inicio, tuberización y obtención de productos, con variedad de criterios (Bats *et al.*, 1980).

- Temporadas de cultivo

De acuerdo a Alonso (2002) y Kooman (1994), la papa es una planta perenne, por la forma continua de brote de sus tubérculos, sin embargo ésta se comporta como anual. La planta de papa puede llegar a producir frutos con semillas viables, pero la forma de propagación utilizada a nivel de la producción comercial es la vegetativa. A partir de tubérculos o trozos de tubérculos se instala un nuevo cultivo. Es sensible a heladas y crece bien en climas templados, con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere una estación de crecimiento con un largo mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean demasiado altas (> 30°C) ni demasiado bajas (<5°C). En las regiones frías se la cultiva durante el verano y en el invierno en las regiones cálidas.

En México la papa se siembra en tres ciclos agrícolas: invierno - primavera, primavera - verano y otoño - invierno, por lo que se cosecha durante todo el año, sin embargo sus costos de producción son altos, debido principalmente a los costos elevados de la semilla, bajos rendimientos, alta inversión para el control de plagas y enfermedades y altos costos de comercialización donde las empresas con mayor importancia terminan proporcionando sus productos con precios más accesibles en comparación a períodos donde empresas minoritarias aumentan sus costos por gastos elevados y disminución en los estados de producción (CONPAPA, 1997).

- Variabilidad en la planta de papa *Solanum tuberosum* y factores determinantes para su siembra y crecimiento.

Es importante mencionar que el crecimiento y productividad en papa, es el resultado de dos grandes determinantes: la conformación genética de la planta (genotipo) y su ambiente circundante. El genotipo es esencialmente constante en comparación con cambios ambientales que experimentan (Borrego *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión (fenotipo) de la información genética, es influenciada ampliamente por los cambios regulares e irregulares del ambiente de crecimiento. La longitud del ciclo de crecimiento del cultivo de papa, depende del tipo de siembra e inicio de tuberización, rapidez inicial de tuberización y pendiente de la curva de tuberización, durante la época de llenado de tubérculos, siendo afectado fuertemente por el ambiente: duración

del día, temperatura y la interacción de los factores más importantes, que pueden modificar la longitud del ciclo de crecimiento (Beadle, 1988; Fakorede *et al.*, 1980; Khedher *et al.*, 1985).

Existen más de 4.000 variedades de papa, lo que muestra la gran diversidad genética que presenta este cultivo. Esta riqueza en diversidad ha sido preservada, en gran medida, gracias a las prácticas tradicionales de los agricultores, ubicados en diversas regiones, además del cuidado de las semillas, que han adaptado a la papa a distintas altitudes, temperaturas y suelos. De estas características depende el destino y el tipo de consumo que tendrá el alimento (Bourges, 1999, 2000).

Existe diversidad de formas del cultivo de la papa, desde complejas y costosas por medios mecanizados utilizados en industrias agroalimentarias importantes hasta formas sencillas y con obtención de producto considerable utilizados por los agricultores. La forma tradicional del cultivo de papa exige gran cuidado por parte de los sembradores; esto incluye la selección adecuada de la semilla, donde se considera tamaño y condiciones físicas, que le permitirá producir un adecuado número de brotes y por lo tanto una emergencia rápida y uniforme, factores claves para un aumento en la producción.

El tamaño del tubérculo, debe ser suficientemente grande para atender la demanda inicial de nutrimentos para la planta que emergerá, estos tubérculos compensarán mejor las condiciones pobres de crecimiento o daño por clima frío, aproximadamente se escogen tubérculos con peso de 50 gramos (Cortbaoui, 1990).

La cantidad de luz y demás factores pueden influir seriamente en la cosechas de la planta de papa dentro del campo (McGee *et al.*, 1988). Las condiciones del suelo es otro factor importante que se considera en la agricultura, en donde se evalúa la estructura (se prefiere un suelo fino, que permita la penetración de las raíces, drenaje de agua y ausencia de piedras), la humedad (debe tener contacto con suelo húmedo pero sin humedad excesiva), y la temperatura (influye en la velocidad de brotes y emergencia, menor a 15°C, retarda el crecimiento y suelos calientes lo estimulan).

De esta manera el proceso que se lleva a cabo comprende 5 pasos básicos: Selección de tubérculos, preparación del suelo, profundidad de la siembra, distancia de la siembra, y sembrado (Cortbaoui, 1990). La profundidad de la siembra comprende, 1) ajustar la humedad del suelo, si el suelo está seco superficialmente, se siembra profundamente, si el suelo está húmedo en la superficie, se siembra superficialmente. 2) Ajustar la temperatura del suelo, si el suelo está caliente en la superficie, se siembra profundamente, si el suelo está frío superficialmente, se siembra en la superficie. Las siembras profundas protegen a los tubérculos de la infestación por enfermedades y plagas como el tizón y la polilla de la papa. La siembra superficial ayuda a disminuir las infecciones originadas por las enfermedades del suelo (Cortbaoui, 1990; Beukema *et al.*, 1990).

La distancia de la siembra, dependerá de la variedad, condiciones de crecimiento y tamaño deseado del tubérculo, se pueden realizar surcos, entre y dentro de los surcos.

Los procedimientos de la siembra utilizada en los campos será a mano, estas pueden ser en surcos donde se usan palas, arados para formarlos, luego se mezcla el fertilizante en el fondo del surco con tierra, se siembran los tubérculos en el fondo del surco y se cubren con tierra. En los camellones que es otra forma usual de cultivo, puede sembrarse a lado o en el centro de los camellones abriendo surcos auxiliares u hoyos individuales (Cortbaoui, 1990 ; Wiersema, 1987, 1985).

- Análisis comparativo entre *Solanum tuberosum* de las variedades Alpha y Atlantic

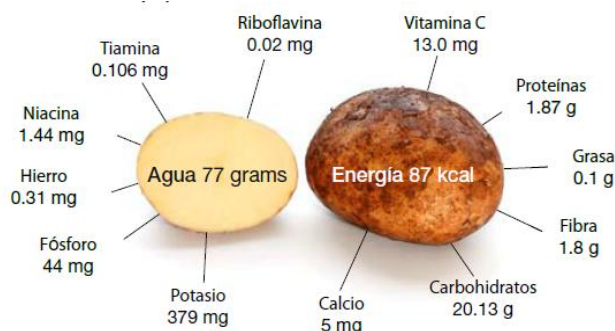
Entre las clases de papas que se utilizan en las industrias alimentarias para los consumidores encontramos la Atlantic y la Alpha como se ha mencionado anteriormente. Entre las características de la papa Atlantic, podemos hallar que es un tubérculo redondeado u ovalado, con cascara blanca y pulpa blanca. La planta es mediana a grande, erecta con hojas grandes, de crecimiento muy rápido, tiene rendimiento potencial alto, su madurez es media de 100 a 110 días, medianamente resistente a sarna común pero susceptible a *Phytophthora infestans*. En cuanto a su calidad culinaria manifiesta alta materia seca, pero con baja capacidad de almacenamiento, su mercado es excelente para hojuelas o papas fritas y mercado fresco. Por otro lado, la papa Alpha tiene sus orígenes en Holanda, posee un tubérculo ovalado con cáscara amarilla y pulpa amarilla ligera. La planta es mediana, extendida y tiene varias flores. Esta variedad es de rendimiento alto, su mercado es uso de mesa y para hervir. Su madurez es muy tardía de 130 a 140 días. La planta es resistente a la sequía, calor, mal trato, Tizón tardío y sarna común. En almacenamiento dura bastante tiempo con poca brotación (Lorenzo, 1992; Santiago, 1995). Al comparar las especies de papa Atlantic y Alpha, podemos notar que tienen ventajas y defectos, la papa Atlantic manifiesta un crecimiento más rápido en comparación a la Alpha sin embargo es susceptible a la infección por *Phytophthora infestans*, mientras que la Alpha posee una madurez tardía pero está capacitada para resistir situaciones de sequía y está habilitada para combatir la infección por *Phytophthora infestans* (Borrego, *et al.*, 2000).

- *Contenido nutrimental y enfoque en programas de seguridad alimentaria e intervención nutricional.*

La papa es un alimento versátil y tiene un gran contenido de carbohidratos. Recién cosechada, contiene un 80 por ciento de agua y un 20 por ciento de materia seca. Entre el 60 por ciento y el 80 por ciento de esta materia seca es almidón. Respecto a su peso en seco, el contenido de proteína de la papa es análogo al de los cereales, y es muy alto en comparación con otras raíces y tubérculos. Las papas tienen abundantes micronutrientes, sobre todo vitamina C: una papa media, de 150 gramos, consumida con su piel, aporta casi la mitad de las necesidades diarias del adulto (100 mg) (Figura 3). La papa contiene una cantidad moderada de hierro, pero el gran contenido de vitamina C fomenta la absorción de este mineral. Además, este tubérculo tiene vitaminas (B1, B3 y B6), otros minerales (potasio, fósforo y magnesio), así como folato, ácido pantoténico y riboflavina.

También contiene antioxidantes alimentarios, los cuales pueden contribuir a prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y tiene fibra, cuyo consumo es bueno para la salud (FAO, 2008).

La papa debería ser un importante elemento de las estrategias destinadas a proporcionar alimentos nutritivos a las personas con bajo nivel socioeconómico. Es idónea para producirse donde la tierra es limitada y la mano de obra abundante, condiciones que caracterizan a una gran parte del mundo en desarrollo. La papa produce un alimento más nutritivo en menos tiempo, con menos tierra y en climas más difíciles que cualquier otro cultivo importante. Hasta un 85% de la planta es comestible para las personas, en comparación con el 50% en el caso de los cereales. Aunque la papa no se considera un producto elemental en la dieta del mexicano como el maíz y el frijol, forma parte de la canasta básica alimentaria tanto del área urbana como rural (ONU-CEPAL e INEGI, 1993; Ávila, 1997; Bourges, 2000).



*Fuente: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Base de datos nacional de nutrientes. **Figura 3. Nutrientes obtenidos por cada 100 g de papa hervida y pelada antes del consumo.***

La papa se considera uno de los vegetales más productivos que se cultivan en el mundo, y provee la mayor fuente de nutrición e ingreso para muchas sociedades (Spooner y Hettterscheid, 2005). Ocupa un lugar importante en la agricultura, economía y seguridad alimentaria, situándose en el cuarto lugar de los cultivos o alimentos que sustentan la nutrición a nivel mundial, después del maíz, el trigo y el arroz, con una producción mundial para el año 2007 de 325,3 millones de toneladas y un valor estimado de la cosecha de 40 mil millones de US dólares. Se espera que para 2020 la demanda de la papa sea el doble de la consumida en 1993 (FAO, 2009).

- *Enfermedades microbianas en plantas.*

Las enfermedades de las plantas causadas por virus, bacterias, hongos o protozoos son de enorme importancia económica y ecológica (Stevens, 1974; Wheeler, 1975; Robinson, 1976; Agrios, 1978; Fitter, 1985). Algunos microorganismos pueden causar infecciones y enfermedades que a su vez pueden causar la muerte de la planta o disminuir enormemente su crecimiento. En

algunas ocasiones las enfermedades microbianas de las plantas han causado migraciones de las poblaciones humanas afectadas por el hambre al destruir las cosechas. El mildiú de la papa que afectó a Irlanda en el año de 1845 provocó una hambruna que fue la causa de una importante emigración hacia tierras Norteamericanas.

El desarrollo de enfermedades en las plantas debido a patógenos microbianos sigue normalmente un patrón que consiste en: un primer contacto entre el microorganismo y la planta; entrada del patógeno dentro de la planta; crecimiento de los microorganismos infecciosos y desarrollo de los síntomas de enfermedad. Los microorganismos patógenos pueden entrar en contacto con la planta desde la rizósfera. Dado que la mayoría de los hongos fitopatógenos dispersan sus esporas por el aire, a menudo entran en contacto con la planta a través de las hojas o los tallos. La mayoría de las enfermedades víricas se transmiten a través de insectos que actúan como vectores; estos patógenos entran en contacto con la planta principalmente por el filoplano. Algunas bacterias y hongos patógenos también se transmiten mediante insectos vectores (Harris y Maramorosch 1981). Las esporas de los hongos fitopatógenos que se distribuyen con las corrientes de aire necesitan un mecanismo de adherencia a las hojas o a los tallos de los hospedadores susceptibles. Los fitopatógenos pueden penetrar en la planta a través de heridas o de aberturas naturales como los estomas. Muchos virus penetran en la planta a través de las heridas causadas por los insectos vectores que los transportan, mientras que otros entran a través de las raíces con el agua absorbida por la planta. Algunos patógenos vegetales entran directamente a través de la cutícula; esta penetración comprende la adherencia del patógeno a la superficie de la planta, seguida de la formación de un gancho de penetración, capaz de atravesar la cutícula y la pared celular. De hecho cuando un anticuerpo específico bloquea la cutinasa de *Fusarium solani* no se produce la infección de la planta de judía susceptible, a pesar de que la espora sigue siendo viable (Maiti y Kolattukudy, 1979). La cutícula y los tejidos de la planta están sometidos a menudo al ataque enzimático del patógeno, que ablanda el lugar de penetración. Algunos ejemplos enfermedades causadas por microorganismos son el oidio ceniciento (especies de *Erysiphe*), la podredumbre gris (*Botrytis cinérea*) y *F. solani*.

Los patógenos microbianos que logran penetrar en la planta alteran las funciones normales de ésta, ya que producen enzimas degradativas, toxinas y reguladoras del crecimiento (Friend y Threlfall, 1976). Los fitopatógenos del suelo producen pectinasas, celulasas y hemicelulasas, que degradan la estructura de la planta y causan la podredumbre blanca de las raíces y otras lesiones. Cuando los patógenos destruyen los reguladores del crecimiento de la planta, se causa enanismo, mientras que la producción elevada del ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas origina la formación de agallas y de tallos excesivamente alargados. Algunos hongos fitopatógenos producen toxinas altamente selectivas, como algunos péptidos cíclicos de bajo peso molecular y policetosas lineares (Sheffer y Livingston 1984).

Los fitopatógenos pueden alterar la actividad metabólica de la planta. Las plantas enfermas a veces muestran cambios en su actividad respiratoria normal, que pueden estar causados por un desacoplamiento en la cadena de transporte de electrones, o bien por las rutas glucolíticas del metabolismo de los carbohidratos. También pueden interferir en la fijación del dióxido de carbono. En las hojas, los patógenos pueden causar clorosis, lo cual impide que la planta lleve a cabo la fotosforilación oxidativa y produzca así el ATP necesario para la fijación del dióxido de carbono. Cuando las plantas muestran los síntomas de alguna enfermedad causada por la invasión de un patógeno primario, están expuestas a una nueva invasión por patógenos secundarios oportunistas. La pérdida de integridad de las estructuras de superficie y de la pared celular permite la invasión por muchos microorganismos oportunistas.

- Enfermedades Víricas.

Muchos virus vegetales se clasifican en función de su capacidad de causar una determinada enfermedad. Los vectores son importantes en el transporte de virus fitopatógenos presentes en el suelo o en tejidos enfermos de plantas susceptibles. Diversos insectos homópteros e himenópteros y también algunos nemátodos pueden actuar como vectores de enfermedades víricas en plantas (Tabla 1). Un atributo necesario de los fitopatógenos en general, y de los virus en particular, es la capacidad de sobrevivir fuera de las células hospederas hasta encontrar una nueva planta viva susceptible al ataque (Baker y Snyder, 1965; Esau, 1968; Plumb and Thresh, 1983).

Tabla 1. Algunos virus fitopatógenos.

Virus con DNA
Grupo Caulimovirus: virus del mosaico de la coliflor
Virus con RNA
Virus con partículas flexuosas o filamentosas
Grupo Protexvirus: Virus X de la patata
Grupo Potyvirus: Virus de la patata
Virus Isométricos
Grupo Tombushvirus: Virus del enanismo piloso del tomate
Virus del moteado del tomate
Rhabdovirus
Virus del amarillamiento necrótico de la lechuga

Fuente: Atlas and Bartha, 2002.

- Enfermedades bacterianas.

Las especies bacterianas fitopatógenas pertenecen a los géneros *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia* entre otras (Tabla 2).

Tabla 2. Algunas enfermedades de plantas producidas por bacterias.

Organismo	Enfermedad	Organismo	Enfermedad
<i>Streptomyces</i> <i>S. scabies</i>	Sarna de la patata	<i>Erwinia</i>	Fuego bacteriano de perales y manzanos Marchitamiento del maíz
		<i>E. amylovora</i>	
		<i>E. stewartii</i>	

		<i>E. carotovora</i>	Tizón del crisantemo
		<i>Corynebacterium</i>	
		<i>C. michiganense</i>	Marchitamiento del tomate
		<i>Spiroplasma</i>	
		<i>S. sp</i>	Enanismo del maíz

Fuente: Atlas and Bartha, 2002.

- Enfermedades fúngicas.

La mayoría de las enfermedades de las plantas están causadas por hongos patógenos (Tabla 3). Quizás las enfermedades fúngicas más importantes económicamente están causadas por royas y tizones. Estos hongos son basidiomicetos con ciclos de vida muy complejos. Las royas requieren dos hospedadores intermedios no relacionados para completar su ciclo de vida normal. Los tizones (o carbones) son los que afectan a la avena, maíz, trigo y a la cebolla entre otras plantas.

La gran variedad de esporas que producen facilitan la transmisión aérea entre plantas y la producción de esporas de resistencia, permitiendo a estos patógenos permanecer viables fuera de la planta hospedera. Muchos hongos fitopatógenos presentan complicados ciclos de vida, una parte de las cuales se cumple durante la infección y el resto fuera de la planta hospedera, por ejemplo en el suelo o sobre los restos vegetales (Garrett, 1970).

Tabla 3. Algunas enfermedades de plantas producidas por hongos.

Organismo	Enfermedad	Organismo	Enfermedad
Myxomicotes			
<i>Spongospora</i>	Moteado polvoriento de las patatas		
Ficomycotes		Deuteromicotes	
<i>Synchytrium</i>	Verruga negra de los tubérculos de la patata	<i>Colletotrichum</i>	Antracnosis de los cultivos
		<i>Cylindrosporium</i>	Perdigonado de las hojas de varias plantas
<i>Pythium</i>	Decaimiento de las semillas y putrefacción de la raíz	<i>Alternaria</i>	Perdigonado de las hojas y fuego de las plantas
<i>Phytophthora</i>	Mildiú de la patata	<i>Cladosporium</i>	Gomosis del tomate
		<i>Fusarium</i>	Pie negro de las plantas
Ascomycotes		<i>Rhizoctonia</i>	Putrefacción de las raíces de diversas plantas
<i>Sclerotinia</i>	Podredumbre blanca de los vegetales		

Fuente: Atlas and Bartha, 2002.

- *Fitopatógenos en plantas de papa*

Un tubérculo papa-semilla puede ser portador de diversos agentes patógenos, los cuales pueden ocasionar serios problemas fitopatológicos a nivel de cultivo. Dentro de las enfermedades que puede portar un tubérculo semilla se encuentran aquellas producidas por Hongos, Bacterias y Virus (Strand and Rude, 2006).

Entre las enfermedades causadas por hongos de ocurrencia habitual destacan *Rizoctonia solani* (costra negra), *Helminthosporium solani* (sarna plateada), *Fusarium* sp. (pudrición seca) y *Phytophthora infestans* (tizón tardío). Las enfermedades causadas por bacterias más importantes, para la papa a nivel regional, son *Streptomyces scabies* (sarna común) y *Erwinia* sp. (pudrición blanda) (Llenderal and Nieto 2000; Rocha *et al.*, 1990). Actualmente en los cultivos de papa manejan diversidad de compuestos químicos para controlar la aparición de plagas. El estado fitosanitario de un tubérculo papa-semilla es altamente incidente en cuanto a la calidad y productividad del cultivo de papa. Este aspecto se encuentra determinado por la carga de enfermedades que pueda presentar.

- *Agroquímicos en plantas de papa*

Para combatir diversidad de fitopatógenos en la papa, se han usado variedad de sustancias agroquímicas peligrosas (pesticidas, antimicrobianos, plaguicidas y herbicidas) que ocasionan problemas graves en la salud de los campesinos y sus familias, además de ser una forma de contaminación de suelos y agua. La agricultura moderna con la implementación de monocultivos a gran escala ha provocado varios problemas, en cuanto a enfermedades y plagas resistentes y especializadas en las plantas cultivadas. La utilización de plaguicidas de origen químico de manera excesiva y sin previa asistencia técnica, en lugar de resolver el problema, ha producido fuertes daños a la productividad agrícola, al ser humano y a la naturaleza (Estrada, 2008). El consumidor de productos agrícolas es el receptor de los tóxicos usados en agricultura, los cuales se concentran y causan daños irreparables y permanentes en la salud humana (Brecht *et al.*, 1995). El impacto sobre el medio ambiente depende del tipo de sustancia tóxica utilizada. Frecuentemente los daños más comunes, debido a estos componentes químicos, son la contaminación del aire, suelo y agua, por acción de los organofosforados, organoclorados y en ambos respectivamente, la formación de resistencias contra los pesticidas, la eliminación de enemigos naturales (productos no selectivos), el envenenamiento de aves y peces, la reducción de la biodiversidad entre otros (Arning *et al.*, 1999; Brandjes *et al.*, 1990).

- *La producción de papa.*

 - *Comercialización*

En cuanto a la producción de este tubérculo, a nivel mundial Asia y Europa son las principales regiones productoras de papa del mundo y en 2007 suministraron el 80% de la producción mundial. Si bien en África y América Latina las cosechas fueron menores, la producción

fue extraordinaria. La papa es un alimento muy importante, no solamente por la superficie que anualmente se destina a su cultivo, sino por la cantidad de hidratos de carbono que aporta a la alimentación de la población en general, particularmente en los países asiáticos en los que es un alimento básico. Es uno de los alimentos que proporciona fuentes muy significativas de energía; y es el segundo lugar en cuanto a la producción por unidad de superficie de proteína diaria, después de la soya (Flores, 1995).

El cultivo de papa tiene en México una gran importancia económica, ya que es de los pocos cultivos que se desarrolla en casi todo el territorio nacional. Actualmente se cultiva en veintitrés estados de la República, pero sólo seis aportan aproximadamente el 66% de la producción total. En nuestro país existe un importante número de variedades entre las que destaca la Alpha, además de que se cuenta con otras como, la López, Rosita, Atlantic, Diamante, Motzamba, Tollocan, Atzimba, Greta, Murca, Furore, White Rose y Criolla, muchas de las cuales son variedades liberadas, resistentes del hongo *Phytophthora infestans*. Los principales estados productores por orden de importancia son: Sinaloa (principalmente los municipios de Guasave y los Mochis), Sonora, Chihuahua, Estado de México, Guanajuato y Nuevo León (Bonilla *et al.*, 1990). La producción de papa en México creció rápidamente en las últimas décadas, las variedades más utilizadas fueron Atlantic, Alpha y Frito lay, por lo que la demanda de papa ha mantenido una tendencia de crecimiento aceptable. Se estima que el 73% de la producción de papa se consume fresca, 14% en la industria de la fritura, y el 13% en semilla (CONPAPA, 1997).

En los últimos años ha ocurrido un incremento en la utilización de papa para la industria para productos elaborados como papas a la francesa, purés, sopas y ensaladas (López, 1994).

Las variedades de papa en mayor producción son: Alpha, Atlantic y Diamante (Gómez, 1995), cabe recalcar que las principales regiones de México donde se cultiva la papa son: la región del pacífico, que comprende el norte de Sinaloa, el sur de Sonora y el norte de Baja California, donde se produce papa Atlantic y Alpha. La región del Bajío que comprende León, Silao y Romita, en el estado de Guanajuato, donde se produce papa Alpha. La región de Saltillo es la tercera en importancia y comprende algunos municipios de Coahuila y Nuevo León, estos producen papa Alpha (López, 1994). La cuarta región corresponde a los valles altos de Chihuahua, Michoacán, Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Veracruz y Puebla, todos producen papa Alpha y los últimos 5 estados producen variedades rojas, como Rosita, Marciana, San José, Puebla y López.

Las cosechas se realizan en diferentes fechas a lo largo del año de acuerdo a las zonas específicas de cada estado debido a la diversidad climatológica. Por lo tanto el estado de Sinaloa es uno de los principales productores de papa e importante proveedor en la industria de frituras y semillas (Flores, 1995; SAGAR, 1998).

El motivo por el que la papa Atlantic es producida y cosechada en mayor proporción en las regiones del norte como es el caso de Sinaloa, es por su eficiente sistema de riego y la selección cuidadosa de la semilla. Cuenta a sí mismo con una importante infraestructura de almacenes de refrigeración que les permite conservar material para la siembra y para el mercado en períodos no

óptimos conservando un precio razonable, en comparación a los demás estados donde la producción disminuye, los gastos aumentan y por lo tanto el precio del producto se eleva (CONPAPA, 1997).

El clima caluroso o con temperatura fría, los suelos secos, la baja calidad fitosanitaria e infección foliar por tizón tardío (*Phytophthora infestans*) aparentemente son las causas principales que impiden una productividad adecuada de la papa Atlantic en los estados del centro del país tales como Puebla y Veracruz; donde predomina la papa Alpha. En las regiones céntricas de México existen las condiciones ambientales propicias para la reproducción sexual del hongo causante de la enfermedad del tizón tardío, la gran diversidad del patógeno y por lo tanto su alta incidencia, obligando a los agricultores a aplicar grandes cantidades de fungicidas lo que eleva igualmente los costos de producción y atenta contra la salud y el medio ambiente (SAGAR-INIFAP, 1997). Por consiguiente entre las limitaciones que se encuentran en el procesamiento de la papa Atlantic y afrontan diversidad de empresas, es que no se cuente con sistemas de producción sofisticados, la calidad de la materia prima sea baja y el producto manifieste susceptibilidad a enfermedades.

El desabastecimiento de papa fresca para la industria en determinadas épocas del año, mayo julio y diciembre conduce a una elevación de su precio (ONU-CEPAL, INEGI, 1993). Una alternativa para incrementar los cultivos en zonas céntricas de México como en el estado de Puebla, podría ser el uso de invernaderos que favorezcan el crecimiento del tubérculo. Los invernaderos tienen el objetivo de aprovechar los recursos naturales como la energía solar, y para proteger a los cultivos de los estados climatológicos extremos como lluvias, viento, heladas, plagas y así conservar los productos agrícolas en un estado adecuado, con bajos costos de producción. Además permite al agricultor cultivar durante todo el año. El uso de invernaderos dentro del proyecto, podría garantizar un aumento en la calidad y rendimiento de los cultivos de papa, obteniendo de esta manera productos fuera de época, con la posibilidad de obtener varios ciclos de producción al año, controlando las condiciones climáticas como la temperatura y la humedad.

ANTECEDENTES

Interacciones entre poblaciones Microbianas

De acuerdo a Atlas y Bartha (2002), generalmente los microorganismos interactúan de manera positiva o negativa entre sí; la neutralidad es poco frecuente. Dentro de una misma población, los microorganismos cooperan cuando las densidades celulares son bajas, pero compiten cuando son altas. Una población puede aprovecharse de otra en una relación comensal unilateral, o dos poblaciones diferentes pueden interactuar sinérgicamente. La proximidad física que se da, por ejemplo, en las biopelículas y en los flóculos, facilita tales interacciones beneficiosas. En una comunidad (El campo o terrenos expuestos a factores diversos), las interacciones positivas tienden a optimizar la utilización de los recursos disponibles como en el caso de algunas bacterias y las negativas actúan como controles de retroalimentación, ya que impiden el agotamiento de los recursos y la consiguiente desaparición de la población.

Efectos de las poblaciones microbianas de la rizosfera sobre las plantas.

Al igual que el sistema radical de las plantas causa un efecto directo sobre la Microbiota colindante, los microorganismos de la rizosfera ejercen una marcada influencia en el crecimiento de las plantas. En ausencia de las poblaciones microbianas rizosféricas apropiadas, el crecimiento de las plantas puede verse perjudicado (Lynch 1976; Dommergues y Krupa 1978; Campbell 1985). Las poblaciones microbianas de la rizosfera benefician a las plantas, ya que: aumentan el reciclado y la solubilización de los nutrientes minerales; sintetizan vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y giberelinas que estimulan el crecimiento; y muestran antagonismo hacia patógenos potenciales de la planta mediante la competencia y el desarrollo de relaciones amensales (organismo perjudicado mientras el otro no presenta alteración) basadas en la producción de antibióticos (Álvarez *et al.*, 1995). La mayoría de las interacciones que se dan en la rizosfera son beneficiosas tanto para las plantas como para los microorganismos y son de carácter sinérgico. Una mayor exploración y optimización de estas interacciones podrían permitir un aumento significativo de la producción de cosechas.

- Fijación de Nitrógeno.

Una de las principales asociaciones mutualistas entre microorganismos y plantas consiste en la invasión de las raíces de algunas plantas por bacterias fijadoras de nitrógeno, que causa la formación de un crecimiento tumoral de la raíz denominado nódulo. En general este fenómeno ocurre entre las leguminosas y bacterias de tipo rizobícea. Dentro del nódulo, las bacterias fijadoras de nitrógeno convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco, compuesto que proporciona el nitrógeno necesario para el crecimiento de la planta y de las bacterias (Dalton y Mortenson 1972; Brill 1975; Bergensen 1978; Evans *et al.*, 1991). La capacidad de los microorganismos de fijar nitrógeno se detecta mediante la prueba de reducción del acetileno. Esta

prueba se basa en el hecho de que el sistema nitrogenasa también puede catalizar la reducción del acetileno, que como el nitrógeno molecular posee un triple enlace. La reducción de acetileno produce etileno, que se detecta por cromatografía de gases.

Las asociaciones fijadoras de nitrógeno (diazotrofas) entre rizobios y plantas leguminosas tienen una gran importancia en el ciclo global del nitrógeno en la agricultura (Evans *et al.*, 1991; Postgate 1992; Somasegaran y Hoben 1994). Hasta hace poco las bacterias fijadoras de nitrógeno que producen nódulos en leguminosas se clasificaban en un solo género, *Rhizobium*. Actualmente se conocen dos géneros adicionales, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Tabla 4) e incluso se sabe que otras bacterias alejadas filogenéticamente son capaces de nodular a las leguminosas como es el caso del género *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001)

Tabla 4. Características de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Carácter	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
Crecimiento con N ₂ fijado fuera de las plantas.	No	No
Velocidad de crecimiento en cultivo	Normalmente rápida	Normalmente lenta
Localización de los genes <i>nod</i> y <i>nif</i>	Principalmente en un plásmido	Principalmente en el cromosoma
Rango de especificidad con el hospedador	Normalmente reducido	Normalmente amplio
Importancia Agrícola	La mayoría de las leguminosas, cereales y cultivos de forraje	Soja

Fuente: Sprent and Sprent, 1990.

Las condiciones del suelo tienen un marcado efecto sobre los rizobios puesto que afectan tanto la supervivencia como a la capacidad de infectar los pelos radicales (Alexander, 1985). Los rizobios son mesófilos, pero algunos pueden tolerar bajas temperaturas de hasta 5°C, y otras temperaturas de hasta 40°C. Algunos rizobios son sensibles a los pH bajos y no pueden establecer infecciones en suelos ácidos; concentraciones relativamente bajas de iones de nitrato y nitrito también inhiben la formación de los nódulos.

- PGPR (*Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal*)

Las células bacterianas desempeñan distintas actividades metabólicas que pueden otorgar beneficios desde una perspectiva biotecnológica, agrícola, ecológica, de bioremediación y de biomedicina. Por ejemplo, diversas bacterias estimulan el crecimiento de las plantas (Bloemberg and Lugtenberg 2001, Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2005; Lucy *et al.*, 2004; Oluranti, 2010), otras degradan compuestos tóxicos para el humano y el ambiente (Lindstrom *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2005), otras producen

compuestos antimicrobianos que pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades (Champness, 2000; Muñoz-Rojas, 2004; Riley and Wertz, 2002), ó productos importantes para la industria alimentaria o de otro tipo (Broadbent *et al.*, 2003).

Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento de las plantas son conocidas como PGPRs de sus siglas en inglés (Plant-Growth Promoting Rhizobacteria) y emplean mecanismos variados que producen una acción benéfica sobre el metabolismo de los vegetales; como la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) cuando el nitrógeno del suelo es limitado, la solubilización de minerales (como fósforo y hierro) y la producción de fitohormonas como auxinas y giberelinas. Además promueven la reducción de pesticidas y uso de fertilizantes químicos y pueden ejercer control biológico sobre patógenos (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Lugtenberg and Kamilova, 2009; Bashan, 1998). Existen muchos estudios que reportan la inoculación de bacterias benéficas denominadas PGPR en diversos cultivos, logrando un mayor desarrollo e incremento de biomasa de la planta y obteniendo un incremento en la productividad de estos cultivos. Se podrían citar bastantes formulaciones que han sido reportadas en la literatura como efectivas en la producción agrícola, entre las bacterias más representativas de mono-inoculación o en combinación con otras cepas está *A. brasilense* que tiene la capacidad de estimular el crecimiento en maíz, papa, café, tomate, lechuga, trigo, sorgo entre otros (Bashan *et al.*, 1989; Fuente *et al.*, 1993; Groppa *et al.*, 1998; Bashan *et al.*, 1998^a; Díaz-Vargas *et al.*, 2001; Bashan *et al.*, 2004; García- Olivares *et al.*, 2006; Bacilio *et al.*, 2006; Bashan *et al.*, 2010; Oluranti, 2010; Adriano *et al.*, 2011).

- *Inoculantes Bacterianos*

Considerando las potencialidades agrobiotecnológicas de las bacterias, se han desarrollado inoculantes bacterianos (biofertilizantes, fitoestimulantes, bioremediantes, biocontrolantes, biosolubilizadores u otro); que son formulaciones que contienen un soporte con microorganismos vivos que ejercen una función benéfica (Bashan *et al.*, 1998, Hungria *et al.*, 2001; Tamizh and Thangaraju, 2007); los microorganismos pudieron haber sido aislados tanto de suelo como de la rizósfera de plantas (Vessey, 2003). Los inoculantes son aplicados a semillas, superficies de plantas o el suelo, cuyas bacterias son capaces de colonizar la rizósfera o el interior de la planta, donde promueven el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos (Bloemberg and Lugtemberg, 2001; Hungria *et al.*, 2001; Oluranti, 2010), razón por la que han sido aplicados en cultivos de interés agrícola para aumentar su productividad (Bashan, 1998; Hungria *et al.*, 2001; Lucy *et al.*, 2004; Vessey, 2003). Sin embargo; el término inoculante bacteriano se ha confundido con los términos biofertilizante y bioestimulante debido a que estos últimos son más comerciales, incluso sus registros son más ágiles (Bashan, 1998; Blöemberg, 2001).

Varios factores pueden afectar el éxito de un inoculante y que se deben tomar en cuenta al preparar estas formulaciones (Bashan, 1998), como por ejemplo: 1) la elección de una cepa competitiva para el ambiente donde será aplicado; lo cual dependerá de la capacidad de la bacteria

para adaptarse a dicho ambiente y para captar nutrientes. Las bacterias que tienen una distribución ubicua, tanto geográfica como entre hospederos, son las que tendrán mayor posibilidad de adaptación. Los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente, por ejemplo, algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis (De Weert *et al.*, 2002; Muñoz Aguilar *et al.*, 1988). 2) Las bacterias usadas para la elaboración de un inoculante deben ser buenas promotoras del crecimiento de las plantas que se desean inocular. Para ello deben estar respaldadas por diversos estudios que contemplan, colonización de plantas, adherencia a la raíz y las bases moleculares que usan para conseguir la fitoestimulación (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Lugtenberg and Kamilova, 2009; Ortíz-Castro *et al.*, 2009). 3) La capacidad de las bacterias para colonizar adecuadamente a las plantas, sin causar daños, será determinante para obtener resultados positivos. Además, la colonización de las bacterias debe ser estable para tener más probabilidad de éxito en la promoción de crecimiento. Sin embargo, esto puede depender de la fisiología de las plantas y del genotipo de bacterias usadas (Muñoz-Rojas *et al.*, 2003). 4) La supervivencia de la bacteria durante la vida de anaquel del inoculante ya formulado (Bashan *et al.*, 2001, Clatroux *et al.*, 2001; Hungria *et al.*, 2001; Tamizh and Thangaraju 2007).

- Inoculaciones en Cultivos

El éxito de los inoculantes alrededor del mundo ha sido variable, por ejemplo la inoculación con *Azospirillum*, promueve el crecimiento de cultivos en distintos suelos y regiones climáticas, con éxito en el rango de 60 a 70% (Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2005; Okon and Labandera-González, 1994). Diferentes especies de *Rhizobia* se han inoculado en millones de hectáreas de varios cultivos de leguminosas (Clatroux *et al.*, 2001) con éxito relativo. No obstante, también se han reportado resultados negativos para estimular el crecimiento de plantas en los cultivos, después de la inoculación de las *Rhizobia* y distintas especies de *Pseudomonas* (Amarger, 2002).

En la naturaleza las plantas están asociadas a muchas bacterias tanto endófitas como rizosféricas, se propone que estas están en constante lucha por los recursos en una intensa guerra microbiana (Czarán *et al.*, 2002). Sin embargo, también se propone que las bacterias benéficas pueden coexistir como consorcios donde existe sinergismo entre las bacterias pobladoras, desencadenando una mejor fitoestimulación. De hecho, cuando se inoculan plantas de caña de azúcar con un multiinoculante hay una mejor fitoestimulación de las plantas (Oliveira *et al.*, 2008). Además, en algunos experimentos donde se ha llevado a cabo la coinoculación de dos especies bacterianas se obtuvieron resultados de estimulación de crecimiento o de control biológico más provechosos para las plantas en comparación que cuando se lleva a cabo la inoculación con una sola bacteria (Bashan, 1998). Algunos ejemplos exitosos incluyen la coinoculación de: a) *Azospirillum* con algunas bacterias solubilizadoras de fosfatos (Alagawadi and Gaur, 1992; Belimov *et al.*, 1995), b) *Azospirillum* con *Rhizobium* (Andreeva *et al.*, 1993; Fabbri and Del Gallo, 1995), c)

Azotobacter con *Streptomyces* (Elshanshoury, 1995), d) *Pseudomonas* con *Serratia* (Frommel *et al.*, 1991), e) *Pseudomonas jessenii* PS06 con *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 reportaron mayor productividad en plantas de garbanzo (52% en comparación al tratamiento no inoculado) y un incremento de peso fresco en nódulos, sugiriendo una actividad sinérgica entre estos dos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones de campo (Valverde *et al.*, 2006).

En papa se ha explorado la monoinoculación de bacterias benéficas que pueden incrementar los rendimientos de la planta como el caso de *Methylobacterium* sp., una bacteria endófitas que no posee actividad antagonista pero que induce la respuesta de defensa en plantas contra patógenos (Ardanov *et al.*, 2012). Para dilucidar el papel de las comunidades innatas endófitas en las respuestas de las plantas, se han estudiado los cambios en la comunidad, tanto en experimentos *in vitro* y en invernadero utilizando diversas combinaciones de plantas, inoculantes endófitos y patógenos. La inducción de resistencia se ha estudiado en varias especies de papa (*Solanum tuberosum* L.) por *Methylobacterium* sp. IMBG290 contra los patógenos *P. atrosepticum*, *Phytophthora infestans* y *Pseudomonas syringae* pv. En tomate DC 3000 y en madera de pino (*Pinus sylvestris* L.) por *M. extorquens* DSM13060 contra *Gremmeniella abietina*. Las capacidades de los inoculados por *Methylobacterium* sp. mostraron inducir resistencia a cepas que eran dependientes de la variedad de cultivo de plantas, agente patógeno, y de la densidad de *Methylobacterium* sp. Se ha observado que la composición de la comunidad endófitas cambió en respuesta a la inoculación en los tejidos de los brotes y se correlacionó con la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad. Los resultados que se han obtenido por la inoculación de *Methylobacterium* sp. tienen diferentes efectos sobre la resistencia de las plantas a enfermedades, que puede ser modulada a través de la comunidad endófitas del huésped (Ardanov *et al.*, 2012).

En la [Tabla 5](#) se encuentra una revisión de los diversos cultivos en los que se ha explorado el efecto promotor de crecimiento en plantas de diferentes formulaciones microbianas, así como el posible mecanismo de acción que ejercen dichas cepas.

- Normatividad de inoculantes e inoculante EMMIN-1

Los inoculantes deben cumplir varias características para considerarse de calidad, sin embargo muchos países del mundo no se han puesto de acuerdo, incluso no han llegado a tener una legislación sobre cómo debe ser un buen inoculante (Caballero-Mellado *et al.*, 2005). A este respecto, Brasil es uno de los países que sí cuenta con legislación al respecto y controles de calidad (Villamil, 2005). En el caso de México hay una norma oficial mexicana (NOM-077-FITO-2000) que menciona la definición de inoculante, las características benéficas que debe aportar a la planta entre otras cosas, pero aún no se ha implementado como tal.

Recientemente en el laboratorio de Supervivencia y Ecología de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se diseñó un inoculante multiespecies denominado EMMIM-1 (Morales-García, 2013), el cual está

compuesto por 6 especies bacterianas cosmopolitas: *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *Burkholderia unamae* MTI-641, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5^T y *Azospirillum brasilense* Sp7. Los resultados obtenidos en la parte experimental con la utilización de la mezcla de bacterias, sugiere que esta formulación podría aplicarse para la promoción del crecimiento en la papa debido a la capacidad de adaptación observada de estos microorganismos.

Tabla 5. Microorganismos utilizados en inoculantes sobre cultivos para promoción de crecimiento, biodegradación o biocontrol.

Cepa aislada	Mecanismo PGPR principal	Planta fitoestimulada	SGAC	Referencia Bibliográfica
<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	Síntesis de trehalosa, contrarresta el estrés por ROS de la rizosfera. Solubilización de fósforo y hierro. Producción de fitohormonas: AIA. Solubilización de fosfatos (ácido).	Frijol, Maíz, Lechuga, Melón Fresas, Tomates Cebolla.	Granada, España	Roca A. <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A11	Producción del biosulfatante, sideróforos, cianuro de hidrógeno, catalasa, amoníaco, solubilización de fosfato.	Parthenium hysterophorus	Nueva York, EUA	Kumar Singh. <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Producción de auxinas y sideróforos.	Maíz	Madrid, España	Grijalbo L. <i>et al.</i> , 2013
<i>Sphingobacteria y Thermococci</i>	Producción de auxinas y FBN.	Arroz	Madrid, España	Lucas J.A. <i>et al.</i> , 2013
<i>A. brasilense</i> UAP-154 y CFN-535 <i>P. fluorescens</i> F113	Síntesis de auxinas: AIA. Pseudomonas biocontrol el 2,4 diacetilphloroglucinol.	Maíz	Irlanda México Suiza	Couillerot. <i>et al.</i> , 2013.
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> CPAC <i>B. japonicum</i> <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	FBN, producción de Fitohormonas: auxinas, giberelinas (Rhizobia) y citocinas. Polisacáridos extracelulares (EPSs) *LCOS, Lipo-citooligosacáridos.	Soja, Maíz	Londrina, Paraná, Brasil	Marks B.B. <i>et al.</i> , 2013
<i>Azospirillum Brasilense</i> sp245	Producción de auxinas, giberelinas y citocininas. Solubilización y captación de minerales. Producción de nitrito y reducción de nitrato.	Lechuga	Plata, Argentina	Fasciglione. <i>et al.</i> , 2012

	Producción de exopolisacárido. Síntesis de sideróforos. Incrementa solutos orgánicos que contribuyen a la osmoregulación.			
<i>Burkholderia tropica</i> MTo 293	VOC, FBN, sideróforos y solubilización de fosfatos.	Maíz	Morelos, México	Tenorio. <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas putida</i> UW4	Producción de (ACC) deaminasa. Producción de fitohormonas y sideróforos. Biocontrol por metabolitos antimicrobianos y antifúngicos. Competencia por nutrientes y nichos. Estimulación de ISR.	Canola	Ontario, Canadá	Stearns J.C. <i>et al.</i> , 2012
<i>Azotobacter sp.</i> <i>Azospirillum sp.</i>	FBN. Producción de AIA.	Algodón	Tolima, Colombia	Guzmán A. <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus cereus</i>	ACC desaminasa y solubilización de fósforo	Larrea tridentata	Desierto Mohave, Chile	Jorquera M.A. <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus sp.</i>	Producción de exopolisacárido: biopelículas, IAA, solubilización de fosfato, enzimas (glucanasas, celulasas).	Cactus Maíz	Bahía Piauí Ceará Paraíba y Rio Grande do Norte, Brasil	Kavamura N. <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptomyces sp.</i> <i>Tsukamurella sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Resistencia a Pb, Zn y Cd: Rizorremediación.	Betula celtibérica Cytisus scoparius Festuca rubra	Mina Rubiales en Lugo España	Becerra-Castro C. <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterobacter sp.</i> UAPSO3001	Desconocido.	Maíz	Tlaxcala, México	Morales-García. <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Azospirillum sp.</i> <i>Paenibacillus sp.</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	FBN, solubilización de fosfatos, síntesis de sideróforos y fitohormonas.	Laguncularia racemosa, Rhizophora mangle, Avicennia schaueriana	Río de Janeiro, Brasil	Lima do Carmo. <i>et al.</i> , 2011

<i>Pantoea eucalypti</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Erwinia rhapontici</i>	Solubilización de fósforo.	Lotus tenui	Río Salado, Argentina	Castagno L.N. <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Biocontrol: producción de antimicrobianos, enzimas hidrolíticas. Producción de fitohormonas: AIA. Solubilización de fosfatos.	Papa	Montañas andinas, Perú	Calvo. <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhizobium tropici</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium gallucum</i>	FBN	Frijol	Tusiana, España	Fernandez-Aunión C. <i>et al.</i> , 2010
<i>Azotobacter</i> sp. <i>Azospirillum</i> sp. <i>Rhizobium</i> sp.	Producción de sideróforos y producción de AIA.	Pimentón y maíz	Tachira, Venezuela	Reyes I. <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia silvatlantica</i> SRMrh-20T	Desconocida	Caña de azúcar y maíz	Rio de Janeiro, Brasil	Perin L. <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia unamae</i> MTI-641T	FBN AAC desaminasa	Tomate	Morelos, México	Caballero-Mellado J.C. <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	FBN Fitohormonas: auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno. Sideróforos y ACC desaminasa. Estimulación de ISR.	Lupinus Albus	Madrid , España	J.A. Lucas Garcia. <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia tropica</i> Ppe8T	FBN	Caña de azúcar, maíz y teosintle	Brasil y México	Reis V. <i>et al.</i> , 2004
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 ^T	FBN Ácido Indol Acético	Café, Caña de azúcar, piña	México	Jiménez-Salgado. <i>et al.</i> , 1997 Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003

<i>Gluconacetobacter johanna</i> CFN-Cf55 ^T	Desconocido	Café	Chiapas, México	Fuentes-Ramírez L.E. <i>et al.</i> , 2001
<i>Azospirillum doebereiner</i> sp.	FBN	<i>Miscanthus sinensis</i> cv. Giganteus	Alemania y Brasil	Eckert B. <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	Biofungicida: producción de 3 péptidos, contra géneros de: <i>Rizhoctonia solani</i> , cepas de <i>Fusarium</i> sp y de <i>Phytophthora infestans</i>	Papa	Irapuato, México	Delgadillo R.J. <i>et al.</i> , 2001
<i>B. vietnamiensis</i> TVV75T	FBN	Maíz y Café	Morelos, Chiapas, Oaxaca, México	Estrada-de los Santos. <i>et al.</i> , 2001
<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i> CFN-Ca54 ^T	FBN	Café	Chiapas, México	Fuentes-Ramírez L.E. <i>et al.</i> , 2000
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	FBN	Soja	Brasil	Rumjanek N. <i>et al.</i> , 1993

JUSTIFICACIÓN

La baja productividad de papa de la variedad Atlantic en el centro del país muestra la necesidad de explorar alternativas para asegurar su producción. Es por ello que el presente trabajo se propuso propagar plántulas de papa de forma económica y bajo condiciones de laboratorio, acoplando bacterias con potencial PGPR de una formulación multiespecies (EMMIM-1). Se exploró el efecto de estas bacterias para potenciar el crecimiento y rendimiento de la papa bajo condiciones de cámara de plantas e invernadero. Este es el primer trabajo que explora el efecto de un inoculante multiespecies en papa en un ambiente protegido. La tecnología generada en este trabajo podría ser esencial para asegurar la producción de papa en zonas donde se presentan enfermedades de la planta o lugares con climas adversos, como sucede en las zonas del centro del país; lo que podría representar una alternativa de producción y oportunidad de comercialización de la papa.

OBJETIVOS

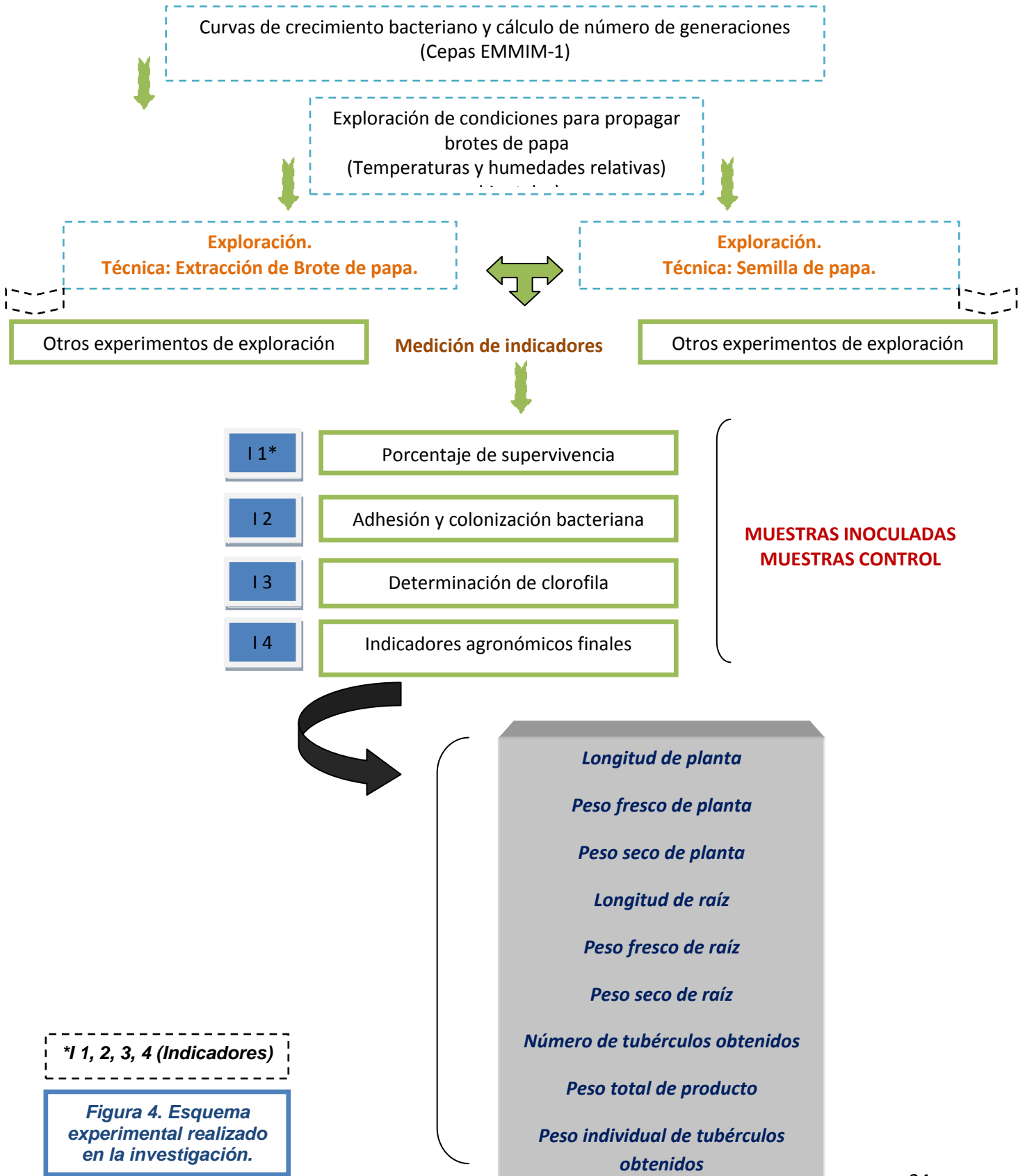
Objetivo general

Evaluar el efecto de un inoculante multiespecies (EMMIM-1) para promover el crecimiento de papa *Solanun tuberosum*, c.v. Atlantic, propagada bajo condiciones de laboratorio y crecida en invernadero.

Objetivos específicos

- Examinar condiciones de laboratorio adecuadas para propagar brotes de papa mediante una metodología, práctica, económica y eficiente, alternativa a la micropropagación.
- Propagar plántulas de papa bajo condiciones óptimas, para experimentos de promoción de crecimiento.
- Evaluar la capacidad de las bacterias del inoculante multiespecies para adherirse y colonizar a plantulas de papa propagadas.
- Evaluar la capacidad de adaptación de plantulas inoculadas y no inoculadas en condiciones de invernadero.
- Medir el efecto del inoculante multiespecies como promotor del crecimiento en papa bajo condiciones de invernadero.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

- *Exploración de condiciones para propagación de brotes de papa.*
- Selección de materia prima.

A partir de papa *Solanum tuberosum* c.v Atlantic, se realizó una selección minuciosa de las muestras que fueron sometidas a inducción de brotes. Las condiciones fisiológicas de los tubérculos de papa afectan la emergencia y crecimiento del cultivo, por lo que se deben seleccionar tubérculos de una edad fisiológica determinada, el crecimiento puede fracasar si los tubérculos sembrados no tienen en un estado adecuado de desarrollo fisiológico, ya que las condiciones de crecimiento y almacenamiento influyen en los estados fisiológicos de las papas (Wiersema, 1990) por lo que los criterios que se tomaron en cuenta para la inclusión dentro del estudio fueron: papas íntegras, firmes, ausencia de pudrición, plagas y sin presencia de brotes o moho (Figura 4).

- Condiciones para la inducción de brotes.

Las muestras seleccionadas, se colocaron en 4 cajas de cartón de 62 cm x 40 cm con capacidad de 15 kg, las cuales presentaron diferentes condiciones experimentales para la inducción de brotes; variando luz, humedad y temperatura (Tabla 6). Cada caja almacenó una cantidad de 20 papas. Cada día y durante 15 días se realizó el monitoreo de temperatura y humedad relativa para cada tratamiento, la medición se efectuó por un tiempo aproximado de 20 minutos por tratamiento. El horario de la medición fue constante (Hora) para evitar errores. Se evaluó la emergencia de plántulas en todos los tratamientos.

Tabla 6. Tratamientos para exploración de condiciones en la emergencia de brotes de papa.

Tratamiento	Condiciones	Observaciones
1	Fotoperíodo a 12 h.	En una caja de cartón se colocaron 20 tubérculos de papas. Las muestras se almacenaron en el área de plantas. Se dispuso de un período de luz/oscuridad de 12/12 horas, durante 15 días.
2	Luz / Temperatura ambiente	20 tubérculos de papas. La caja fue ubicada en el área número 2 de almacén de plantas con exposición directa a luz solar (No cerrada) y a temperatura ambiente, durante 15 días.
3	Oscuridad / Temperatura ambiente	20 tubérculos de papas. Estas muestras se cubrieron y sellaron completamente evitando la luz solar y manteniendo las condiciones de oscuridad a temperatura ambiente, durante 15 días.
4	Invernadero	20 tubérculos de papas. Se trasladó la caja y colocó en condiciones de invernadero, durante 15 días.

- Identificación de brotes viables

Quince días posteriores al sometimiento de las papas a condiciones para su brote, se evaluó el número de brotes totales, se enumeraron las papas y se seleccionaron las que presentaron mayor número de brotes adecuados, se excluyeron aquellas donde no hubo dominancia apical y finalmente el tratamiento donde se obtuvo el mayor número de plántulas

viales fue elegido como condición de elección para experimentos posteriores. El experimento se realizó por triplicado.

- *Exploración de técnicas para propagación de plantas de papa.*

En este estudio se utilizaron dos metodologías para propagar a las plántulas de papa, la técnica de “extracción de brote” (EB) y la técnica de la “semilla del tubérculo” (ST). Los indicadores medidos fueron los mismos para ambas técnicas y se realizaron 6 experimentos de exploración (2 por técnica de EB y 4 mediante la técnica de ST). Cada experimento incluyó dos tratamientos (plántulas multi-inoculadas y plántulas no inoculadas) adicionando distintas cantidades de fertilizante (0 g, 5 g, 10 g, 30 g, 50 g) (Figura 4).

- Técnica de propagación a partir de extracción de brote en semilla de papa.

1. Selección de semillas sanas.

Se seleccionan aquellas semillas firmes no blandas, sin quemado foliar, ausencia de pudrición, plagas (insectos, hongos) y sin presencia de brotes (Figura 5).



Figura 5. Semillas de papa para obtención de brotes.

2. Establecimiento de condición óptima.

Las muestras seleccionadas, fueron colocadas en condición de Tratamiento 3, el cuál fue elegido por resultar con mayor porcentaje de germinación (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones óptimas en la emergencia de brotes de papa.

Tratamiento 3	Oscuridad Temperatura ambiente	Temperatura: 24 – 26°C Humedad Relativa: (≥) 60%
-------------------------	--	---

3. Identificación de brotes viables.

Después de someter a la semilla a condiciones adecuadas y 15 días posteriores, se seleccionaron las semillas que manifestaron brotes óptimos con coloración morada y coloración blanquecina. Estos brotes identificados en buenas condiciones se denominaron viables ya que se usaron para la extracción posterior.

4. Traspaso de brotes a frascos de vidrio.

Después a su selección, se procedió a traspasar los brotes viables a frascos de vidrio de 5 cm de diámetro x 6 cm de largo. Primeramente las papas se organizaron en un recipiente a una distancia de 2 cm entre ellas y se dejaron en reposo en la campana de flujo laminar por 10 min, no se esterilizaron.



Figura 6. Extracción del brote de la semilla de papa.

Se localizó el brote viable y se extrajo cuidadosamente con bisturí y pinzas estériles. En caso brotes múltiples se eligió el más firme y en mejores condiciones, se cortó superficialmente un área de 1 cm y una profundidad no mayor a 1 cm (Figura 6). Se evitó dañar al brote o quemarlo, con las pinzas se desprendió el brote del tubérculo y se colocó en el frasco de vidrio correspondiente; donde fue sumergido dentro de la vermiculita de forma superficial. Se dejó la parte blanda por dentro y se agitó levemente el frasco para cubrir áreas faltantes del brote.

A partir del inoculante EMMIM-1, preparado en acuerdo con Morales-García (2013), se realizó una dilución usando 15 ml de inoculante aforados a 40 ml con agua estéril. Este volumen fue adicionado a los brotes contenidos en los frascos. Para controles solo se utilizaron 40 ml de agua estéril (Figura 7).

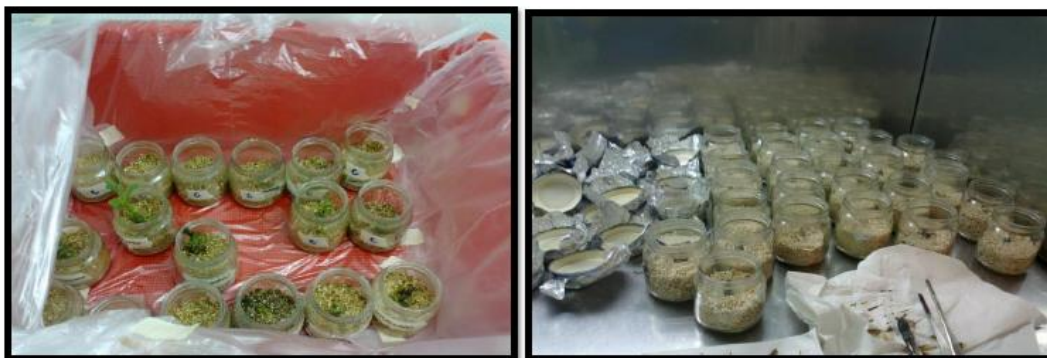


Figura 7. Brotes de papas extraídos y depositados en frascos.

Las muestras se mantuvieron en campana de flujo laminar de 60 a 70 minutos para reducir el nivel de humedad. Los frascos fueron tapados, con tapas de algodón previamente esterilizadas y se colocaron en una cámara de plantas a fotoperiodo Luz/obscuridad 12/12, temperatura de 30°C y humedad relativa ambiental (23°C). La cámara de plantas fue construida y consistió en una caja de metal de 90 cm de largo x 60 cm de ancho con capacidad de 100 muestras que fue etiquetado, y con un sistema de iluminación de 16 focos tipo flama de 110 volts (25 wts), que permitió el mantenimiento de las condiciones para el crecimiento de las plántulas (Figura 8).

En el tercer día se aplicaron 40 ml de solución diluida (1:8) de MS (Murashigue and Skoog, 1962), que consistió en sales minerales y fuente de nitrógeno.



Figura 8. Espacio de monitoreo de brotes de papa con sistema de iluminación con reloj temporizador.



Figura 9. Materiales utilizados para traspaso de brotes de papa a bolsas.

5. Traspaso de plantas de papa de frascos de vidrio a bolsas para maceta.

Después de 30 días se procedió a un segundo trasplante, de condiciones de laboratorio a condiciones de invernadero. Las plantas fueron trasplantadas de frascos de vidrio a bolsas negras de polietileno llenadas con vermiculita (Figura 9), con un frasco medidor de 300 g se colocaron un total de 11 cargas, obteniendo un peso total de 3,300 g por cada bolsa. Las bolsas negras fueron adicionadas con más vermiculita a medida que la longitud de la planta aumentó.

El traspaso se realizó sin condiciones de esterilidad donde fueron reinoculadas con 15 ml de EMMIM-1 que se aforó a 60 ml de agua estéril (Figura 10). Estas macetas fueron transportadas a invernadero, (se dejó la opción de monitorearlas por un período de 7 días en condiciones menos

estresantes antes de ubicarlas en invernadero). Al ubicarse en el invernadero fue necesario hidratar el primer día con 1 litro de agua estéril, subsecuente se realizó un riego equivalente para todas las macetas cada cuarto día (600 ml) con agua potable procurando humedecer toda la vermiculita para favorecer las condiciones de humedad. En cuanto a nutrientes se utilizaron diversas cantidades de triple 16 (N, P, K), a 5, 10, 30 y 50 g en su forma granulada así como sin adición de fertilizante, la aplicación se realizó el 5º día después del paso de la planta al invernadero (Figura 11).

El fertilizante triple 16 (T-16) es un fertilizante de alto valor, por su eficiencia en la aplicación, además de que dado su balance químico de los 3 macronutrientes primarios, es una fórmula de fertilización que permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes por las plantas. Es una fórmula que contiene un balance bien equilibrado de nutrientes (16%N-16%P-16%K) y con una concentración total alta (48%), ideal para aplicaciones de inicio o de arranque en diversos cultivos. El papel de los diversos componentes de la Triple 16 son esenciales en todo el crecimiento de la planta (CICLOPLAFEST, 2007).

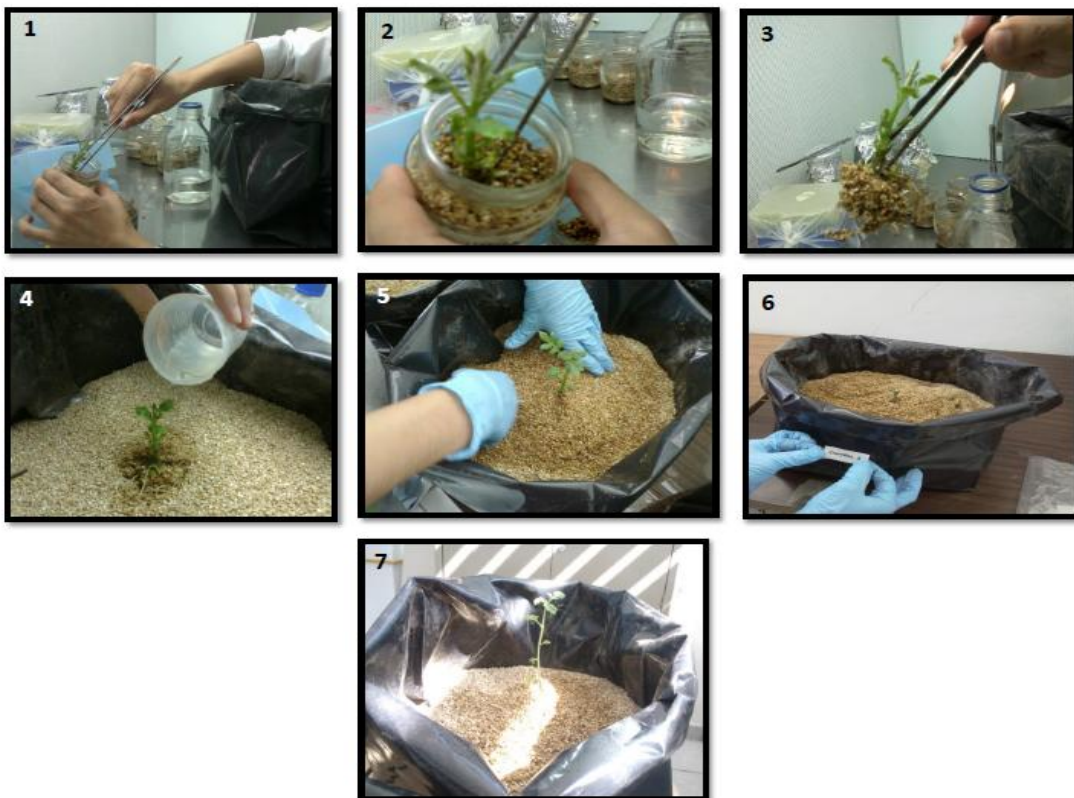


Figura 10. Traspaso de brotes de papa a bolsas negras de polietileno. 1) Se retiró cuidadosamente el brote del frasco 2) Se extrajo de forma circular, evitando el daño de la raíz y presionando la base de la planta ; 3) Se extrajo el brote suavemente del frasco sosteniéndola del tallo y evitando su caída, se depositó inmediatamente en maceta; 4)Se adicionó solución MS e inoculante multiespecies; 5) Se realizó esparcimentado de la vermiculita en la maceta para mejoramiento de la humedad; 6) Etiquetado de las bolsas; 7) Monitoreo de las plantas.



Figura 11. Condiciones de invernadero. a) Invernadero usado en el cultivo de papas. b) Bolsas de polietileno con semillas de papa previamente germinadas.

6. Control de plagas

El control etológico utiliza algunas características del comportamiento de las plagas para diseñar estrategias de control. Se conoce que muchas especies de insectos son fuertemente atraídas a fuentes de luz y el color amarillo. Estas características han permitido el perfeccionamiento de técnicas de trapeo para algunos lepidópteros y coleópteros (trampas de luz) y para algunos dípteros (trampas amarillas) los cuales son frecuentes en cultivos de papa. En la agricultura de subsistencia o en pequeños huertos se utilizan diversos tipos de extractos como por ejemplo: Extracto acuoso de jabón (insecticida, acaricida), extracto acuoso de ceniza vegetal (fungicida), azufre, cobre o cal (fungicida) lo cual permite un control de insectos y parásitos en los cultivos, atrayéndolos y reduciendo el número de poblaciones (Bejarano, 2002).

Para la reducción de plagas en los cultivos de papa se probaron diversas trampas ecológicas para la reducción de plagas además del efecto benéfico de las cepas bacterianas del EMMIM-1 (Biofungicidas). Fue adecuado usar plantas de *Citronella*, se usaron 12 plantas (Figura 12), cerca de los cultivos para la reducción de mosquitos dentro del invernadero, las trampas cromáticas a base de tapas de color amarillo que contuvieron agua y jabón, fueron usadas como medio de control para la mosca blanca, además de solución casera a base de ajo y cebolla.



Figura 12. Plantas de Citronella alrededor de las plantas de papa, para control de plagas.

- Técnica de propagación a partir de semilla de papa.

Las etapas que comprendieron esta técnica fueron similares a la extracción del brote. Sin embargo, la adición de inoculante se limita a una sola aplicación y se realizó en condiciones no estériles, en comparación de la otra metodología donde se realizó una segunda reinoculación al día 20 y se manejaron condiciones de esterilidad (Figura 4).

1. Selección de semillas sanas.

Descrito en técnica de extracción de brote.

2. Preparación de semillas.

Las semillas seleccionadas fueron separadas en dos recipientes con capacidad de 4 litros, 16 semillas por recipiente. En uno de los recipientes se colocaron 1200 ml de EMMIM-1 (tratamiento inoculado) y en el otro contenedor 1200 ml de agua destilada estéril (tratamiento no inoculado), las semillas fueron sumergidas durante una hora (Figura 13).

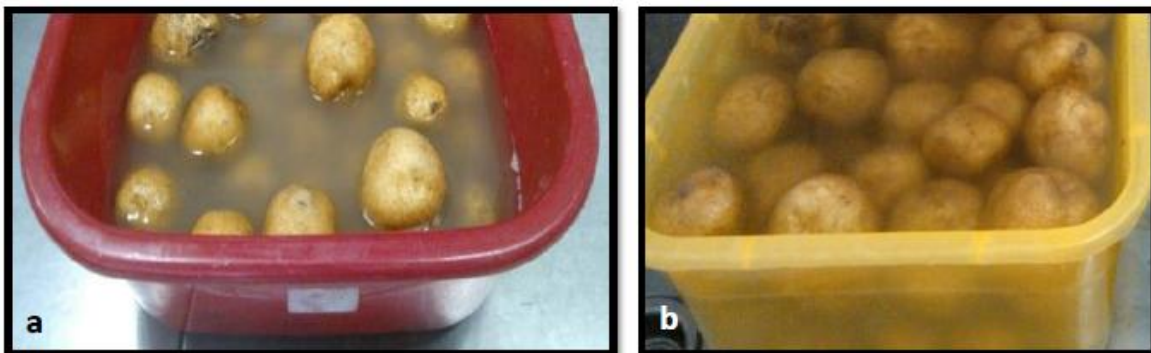


Figura 13. Inoculación de semillas de papa, a) suspensión EMMIM-1 y b) agua destilada.

3. Retiro de exceso de humedad

Después de la inoculación, las semillas fueron limpiadas cuidadosamente y colocadas durante 15 minutos a temperatura ambiente para reducir el exceso de humedad y disminuir la aparición de hongos durante la fase de brotamiento, aumentando la probabilidad de obtener mayor cantidad de brotes sanos.

4. Condición para obtención de brotes

Las semillas fueron llevadas a condiciones del tratamiento 3 para aparición de brotes, dejando 25 días en esta condición para su utilización mediante esta técnica. Se obtuvieron y usaron brotes fuertes y largos (Tabla 7) (Figura 14).



Figura 14. Obtención de brotes adecuados para su uso en la técnica de semilla de papa.

5. Sembrado en bolsas negras de polietileno.

De acuerdo a la técnica de extracción de brote, los tubérculos con brotes sanos fueron utilizados para pasar a bolsas negras de polietileno. Las semillas fueron sembradas directamente a la bolsa. Se realizó un sembrado cuidadoso evitando que los brotes fueran dañados. La semilla fue sumergida a unos 5 cm dentro de la vermiculita, y se procuró que el brote principal quedara expuesto en el ambiente, lo que permitió su crecimiento posterior. Las bolsas fueron transportadas a invernadero (Figura 15).



Figura 15. Sembrado directo en vermiculita de la semilla con brotes.

En el invernadero, las bolsas, fueron regadas con 1 litro de agua potable en el primer día, subsecuente se adicionaron 600 ml de agua potable cada 4 días, procurando humedecer toda la vermiculita para favorecer las condiciones de humedad. A los dos días después del sembrado se adicionaron 0, 5, 10, 30 y 50 g de triple 16 (N, P, K), dependiendo del experimento explorado.

- Curvas de crecimiento.

Para la parte experimental, se usó el inoculante multiespecies (EMMIM-1) conformado por 6 cepas bacterianas (Morales-García, 2013). En la [tabla 8](#) se muestran las especies que fueron

utilizadas con sus respectivos medios de selección. La metodología se describe en el [anexo 1](#) de esta tesis.

Tabla 8. Especies bacterianas (EMMIM-1) que fueron evaluadas en esta investigación.

Microorganismo	Medio de cultivo
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI5 ¹	LGI-CAZ ³⁰
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	LB-CL ⁵⁰
<i>Burkholderia unamae</i> MTI-641	BAC-CRO ³⁰ , CAZ ³⁰
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Rojo Congo
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	LB 5%-Cm ³⁰ , CTX ³⁰
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	TESMA-Ge ¹⁰ , AK ³⁰ , TE ³⁰

AK: Amikacina; Ge: Gentamicina; TE: Tetraciclina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftaidina; CL: Cloranfenicol. Superíndices: concentraciones µg /ml.

- *Monitoreo de bacterias inoculadas, capacidad de adherencia y colonización.*
- Suspensiones Bacterianas (UFC/ml).

Se cuantificó el número de UFC/ml en todas las suspensiones bacterianas utilizadas en los experimentos, lo que permitió conocer la población bacteriana que se está inoculando inicialmente. Para esto se utilizó 1 ml del EMMIM-1 por cada botella previamente preparada (Morales-García, 2013). Se realizaron diluciones 1:10 correspondientes y se realizó método de “goteo en placa” para la cuantificación (Herigstad *et al.*, 2001; Hoben and Somesegaran, 1982), usando los medios selectivos ordenados en la [tabla 8](#). Este experimento se realizó por triplicado ([Figura 16](#)).

- Determinación de adhesión Bacteriana (UFC/ml).

Esta cuantificación se realizó a las 48 horas posteriores a la inoculación. El procedimiento comprendió diversas etapas dependiendo de la técnica de propagación de la papa:

-Adhesión de bacterias en plantas obtenidas mediante la “extracción de brote”.

Para este caso se usaron 3 plantas inoculadas y 3 plantas control. Cada brote se extrajo cuidadosamente del frasco con pinzas estériles y se sumergió en 5 ml de agua estéril, contenida en un tubo Falcon. La suspensión se agitó vigorosamente con el Vortex por 10 segundos permitiendo el desprendimiento de las bacterias. Un mililitro de la suspensión fue colocada en un tubo eppendorf para su cuantificación bacteriana y el resto de la muestra fue congelada para una posterior detección molecular (Morales-García *et al.*, 2014). La cuantificación bacteriana se realizó por triplicado ([Figura 16](#)), mediante el método de goteo en placa (Herigstad *et al.*, 2001; Hoben and Somesegaran, 1982), en los 6 medios de selección correspondientes ([Tabla 9](#)). Las placas se incubaron a 30°C por 24-48 h, de acuerdo a la cepa bacteriana monitoreada.

- Adhesión de bacterias en plantas obtenidas mediante la metodología de “semilla de papa”.

En este ensayo se seleccionaron 6 semillas por cada tratamiento (3 tratadas con inoculante y 3 tratadas solamente con agua destilada no estéril), éstas se colocaron en frascos de 800 ml de capacidad con 125 ml de agua estéril. La semilla (52 g aproximado por semilla) fue sumergida y se dejó en reposo durante 30 minutos, se agitó vigorosamente con ayuda del Vortex durante 10 segundos y se tomó 1 ml de la suspensión generada, a partir del frasco, para su cuantificación bacteriana (por triplicado) mediante el método de goteo en placa, usando los medios selectivos propuestos (tabla 9). Las placas fueron colocadas a 30°C por 24-48 h (en acuerdo con la bacteria explorada).

- *Determinación de colonización bacteriana*

La cuantificación de las distintas especies bacterianas que colonizaron la rizósfera de las plantas fue realizada a los 20, 50 y 90 días posteriores a la inoculación (dpi). Para el caso de plantas por la técnica de extracción de brote, a los 20 dpi se extrajo la planta completa con pinzas estériles (aproximadamente 1.64 g por muestra). Después fueron sumergidas en un tubo Falcon con 10 ml de agua estéril, se agitó vigorosamente y finalmente se cuantificó el número de UFC/ml por el método de goteo en placa. En caso de la técnica por Semilla de papa, el producto fue removido de la maceta y en condiciones de esterilidad se extrajeron todas las raíces encontradas (3-4 g por muestra), las cuales fueron sumergidas en agua en proporción 1:10 p/v, para su posterior cuantificación por goteo en placa.

La determinación de la colonización que se realizó a los 50 y a los 90 dpi, fue similar para plantas obtenidas por ambos métodos de propagación. Para ello, bajo condiciones de campana de flujo laminar, se extrajeron 20 g de raíz por cada muestra (6 por tratamiento). Las muestras se colocaron en 150 ml de agua estéril, contenidos en recipientes de vidrio con capacidad de 1 litro, la raíz se dejó en reposo durante 1 hora, después el recipiente fue vortexeado y se realizaron diluciones seriadas (1:10) para cuantificación bacteriana mediante el método de goteo en placa (Figura 16). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

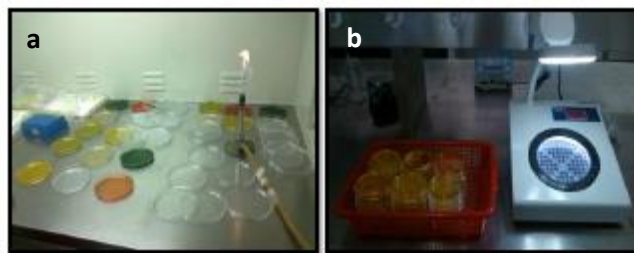


Figura 16. UFC/ml. a) Cuantificación de bacterias por método de goteo en placa, b) Lectura de resultados por contador de colonias.

Para poder mostrar los efectos del EMMIM-1 en los cultivos de papa, fueron medidos diversos indicadores, los cuales se analizaron y compararon con sus respectivos controles.

- *Porcentaje de supervivencia en plantas de papa.*

El porcentaje de supervivencia permitió evaluar el efecto que tiene el multinoculante EMMIM-1 sobre el número de plantas que sobreviven a los diferentes factores de estrés dentro del laboratorio y en condiciones de invernadero (temperatura, humedad y plagas) y que llegan al final del cultivo. La evaluación se realizó desde el primer día que los brotes fueron extraídos de la semilla y pasados a frascos (técnica por “extracción de brote”) o cuando fueron pasados a maceta directamente (“semilla de papa”), las plantas fueron monitoreadas semanalmente durante un período de 16 semanas (110 días), tiempo que le toma a la planta terminar su ciclo fisiológico en caso de condiciones favorables. El registro fue mediante una variable dicotómica, viva (V) o muerta (M) al término de cada semana. Se incluyeron las muestras utilizadas para cuantificación bacteriana (6 por tratamiento).

- *Determinación de Clorofila por método de extracción en frío.*

Para la medición de este indicador se realizó una curva de absorbancia de la clorofila en muestras de hoja de papa (3 muestras), por medio del espectrofotómetro (Perkin Elmer lambda 25 UV/Visible), lo que permitió conocer los picos de absorbancia más altos de la clorofila y utilizarlos como parámetro en la determinación absorbancia de ésta. Se obtuvo el pico más alto a una longitud de onda de 664 nm. Se realizó la extracción de clorofila por método de extracción en frío, el cual es clasificado como un método no destructivo tradicional (Ramos-Castillo, 2010). Se utilizaron hojas de plantas de papa a los 90 días (6 muestras por tratamiento) con peso de 0.05 g de cada una de ellas, se depositaron en tubos Eppendorf con 1 ml de etanol puro grado analítico. Las muestras fueron cerradas, etiquetadas y almacenadas en refrigeración (4°C) durante dos meses o hasta que la coloración de la hoja hubiese desaparecido. A los 2 meses las muestras fueron diluidas en etanol (1:4) y medidas en el espectrofotómetro (Jenway 6305) a una longitud de onda de 664 nm (Figura 17). Los resultados fueron calculados y analizados posteriormente.



Figura 17. Muestras de hojas de papa listas para lectura de absorbancias por espectrofotómetro.

- *Medición de indicadores agronómicos finales.*

A todas las plantas que llegaron al final del cultivo (110 días) se les realizó una evaluación de la promoción de crecimiento (inoculadas y controles) de acuerdo a los siguientes parámetros: se midió longitud del tallo (cm), longitud de la raíz (cm), pesos frescos y secos de parte aérea y raíz (g), número de tubérculos obtenidos, peso total de tubérculos obtenidos (g) y peso individual de tubérculos obtenidos (g) (Figura 18). Se utilizó cinta métrica para medición de longitudes y balanza para medición de pesos. En cuanto a los tubérculos estos fueron extraídos cuidadosamente de las raíces (forma de rotación) procurando no dañarlas, para su posterior medición. Las raíces fueron desprendidas suavemente del sistema de maceta, delineando toda la circunferencia, para la posterior extracción de la planta sin lacerarla. Para obtención de pesos secos las plantas fueron secadas en el horno a 65°C, durante 25 días.



Figura 18. Medición de indicadores agronómicos a los 110 (dpi).

- *Análisis estadístico*

Los resultados de los indicadores de promoción de crecimiento fueron sometidos a comparación estadística mediante la prueba *t*-student con el programa Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software.

RESULTADOS

▪ Condiciones para la propagación de brotes de papa.

Para este experimento se utilizaron 20 muestras por tratamiento (4 tratamientos) y las semillas de papa fueron sometidas a diversas condiciones (Tabla 7) para obtención de brotes sanos para su posterior empleo en técnicas de sembrado. Se registraron las condiciones de humedad y temperatura a las que fueron sujetas las semillas para la obtención de brotes, por un período de 15 días. En el tratamiento se registró un promedio de 29°C, el tratamiento 2 estuvo en el rango de 24 a 29°C, el tratamiento 3 estuvo en el rango de 23-24°C y el tratamiento 4 en un promedio de 36°C bajo condiciones de invernadero (los datos obtenidos de este tratamiento demostraron mucha variabilidad, al día 3, 4, 5 y 6, debido a la variación climática) (Gráfico 1).

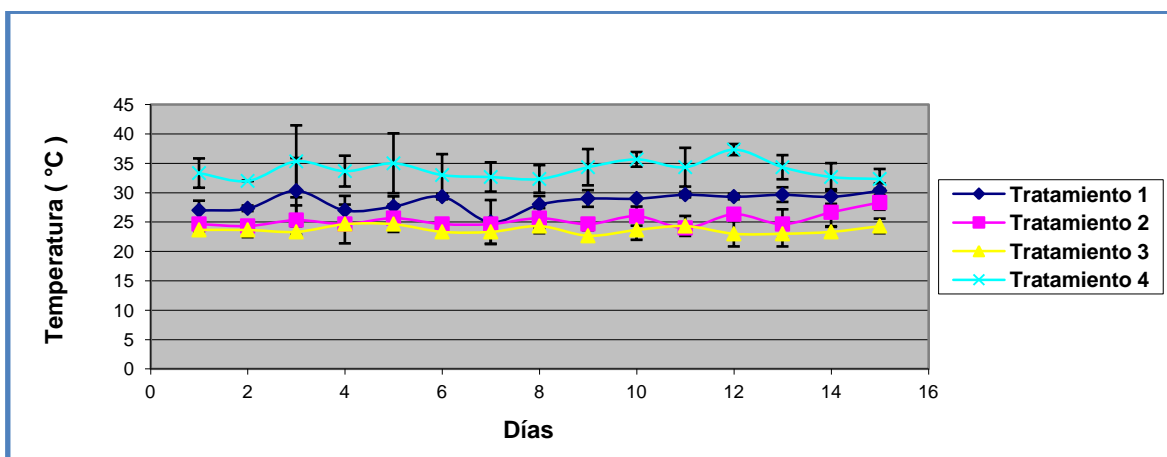


Gráfico 1. Temperaturas registradas en las 4 condiciones donde las semillas de papa fueron colocadas para la obtención de brotes. Se presenta la media de 3 determinaciones de cada tratamiento evaluado durante 15 días con su respectiva desviación estándar (σ).

Los valores de humedad relativa (HR) registrados para los tratamientos explorados fueron 65% para el tratamiento 3, 47% para el tratamiento 4, 55% para el tratamiento 1 y 60% para el 2. A los 15 días, el tratamiento 1 se obtuvo un promedio de 25 brotes, en el 2 se registraron 33 brotes, en el tratamiento 4 se registró una media de 38 y en el tratamiento 3 se observó una media mayor a 50. Estos porcentajes mostraron que el tratamiento 3 presenta un valor de HR más adecuado para propagación de brotes (Gráfico 2).

El número de brotes del tratamiento 1 es estadísticamente distinto al 3 ($P= .0041$), existiendo diferencias con una confianza de más del 99%. Por su parte el tratamiento 2 y 4 quedaron cerca del umbral de diferencia estadística significativa ($P= 0.0199$ y $P= 0.0399$), sin embargo, con una confianza del 95% son significativamente distintos del tratamiento 3, donde se obtuvo un promedio de 54 brotes en comparación a los demás tratamientos. Este experimento se realizó por triplicado (Gráfico 3). Bajo condiciones de fotoperíodo, existió dominancia apical escasa y las coloraciones fueron de color negro y opacas. Para el tratamiento a luz-temperatura ambiente

se observaron brotes con coloración café opaca y escasa aparición apical. Para el tratamiento de oscuridad-temperatura ambiente hubo presencia de brotes de coloración clara, púrpura y dominancia apical abundante. En invernadero, las semillas mostraron quemado foliar, aceleración del desarrollo y presencia de plagas. (Figura 19).

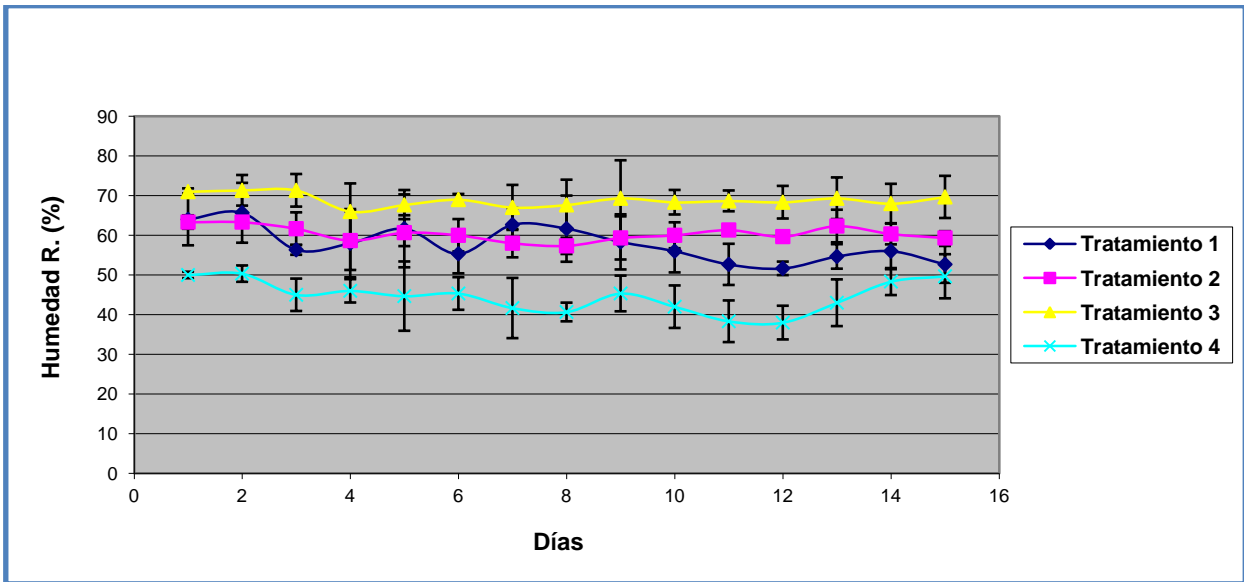


Gráfico 2. Monitoreo de HR (%) en semillas de papa sometidas a diversos tratamientos. Se presentan la media de cada tratamiento evaluado durante 15 días con su respectiva desviación estándar (σ).

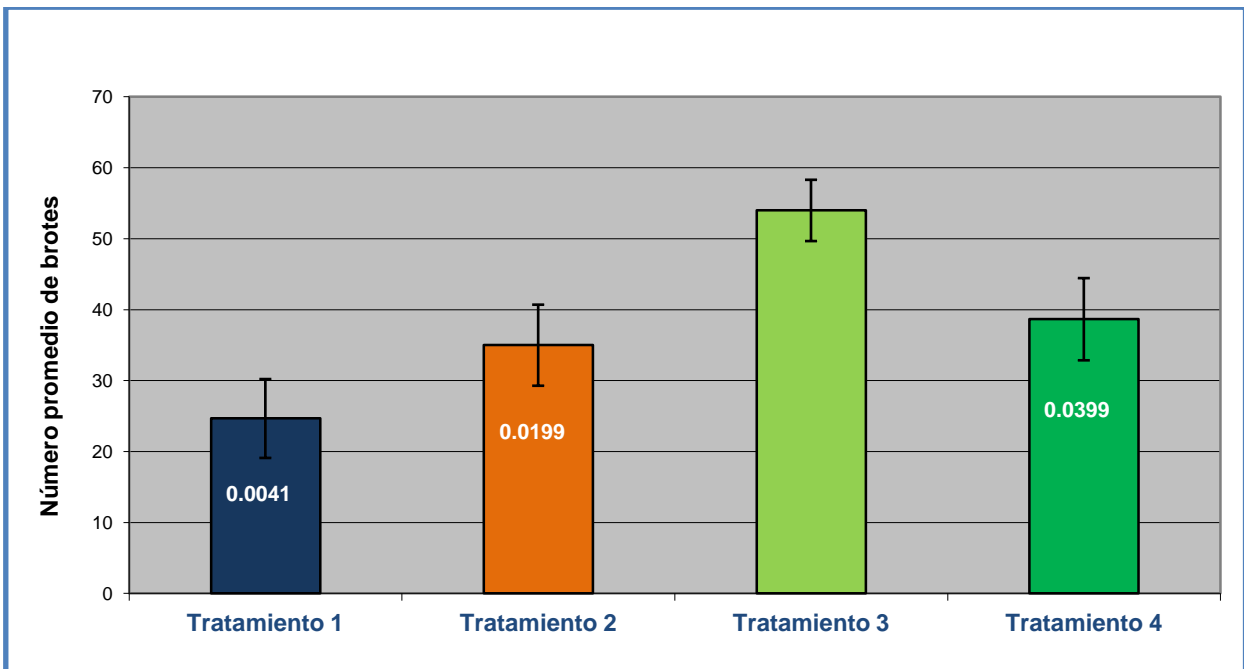


Gráfico 3. Media del número de brotes obtenidos según el tratamiento en cuestión. Cada barra contiene su respectiva desviación estándar (σ). El número dentro de las barras es el valor P de las pruebas t para las barras comparadas con el tratamiento 3.



Figura 19. Brotes obtenidos por cada tratamiento explorado variando condiciones de temperatura y humedad relativa. (A) Fotoperíodo de 12 horas, (B) luz y temperatura ambiente (C) y (D) Condición oscuridad, temperatura ambiente (E) Condición de Invernadero.

- **Capacidad de adaptación de plántulas inoculadas y no inoculadas en condiciones de invernadero.**

La supervivencia de las plantas de tratamientos inoculados y no inoculados, se evaluó en diferentes niveles de fertilización nitrogenada (5g, 30 g y 50 g de triple 16) y dependiendo de la técnica de sembrado utilizada, desde su extracción o sembrado hasta el periodo de cosecha (110 días).

-Técnica de extracción de brote.

Con 5 g de fertilizante al inicio del cultivo, se observó que las plantas inoculadas manifestaron mejores porcentajes de supervivencia a comparación de sus controles (Gráfico 4). Desde la primera semana se observaron diferencias entre las plantas inoculadas que sobrevivieron a la extracción de la semilla, a diferencia de las muestras controles que comenzaron a descender, debido a infecciones por fitopatógenos (no mostrado). Las muestras inoculadas a la semana 16 mostraron mayor resistencia a las condiciones de invernadero con un 60% de supervivencia sobre el 48% de las plantas controles. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante χ^2 usando las variables de planta viva o muerta. El número de plantas utilizadas fue de 50 (25 Inoculadas y 25 Controles).

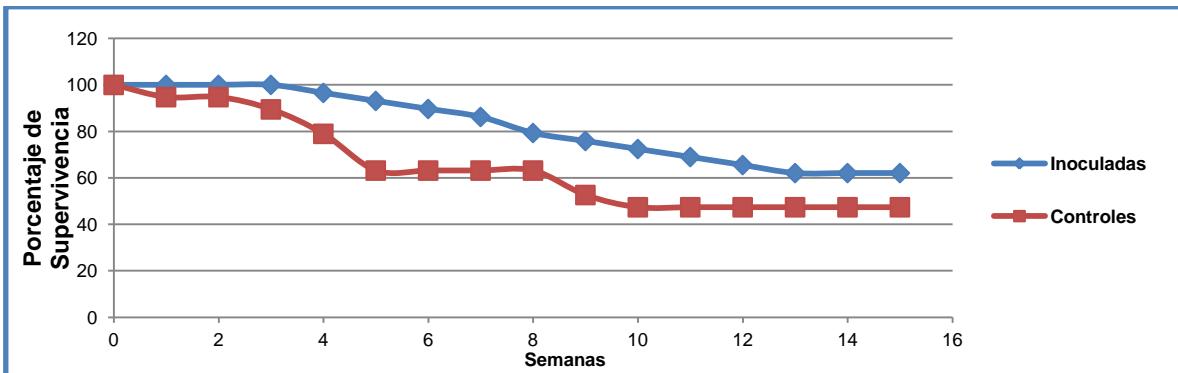


Gráfico 4. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa obtenidas por técnica de “extracción de brote” y adicionadas con 5 g de triple 16. El tiempo 0 representa el momento en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

En otro experimento donde se usaron 30 g de fertilizante para los cultivos. En el [Gráfico 5](#) se observa que a partir de la 5ª semana se comenzaron a notar diferencias en el número de plantas que sobrevivían frente a las condiciones de invernadero. Los resultados al término de los 110 días fueron 40% para muestras inoculadas y 20% para muestras controles. El número de muestras evaluadas fue de 25 inoculadas y 25 controles.

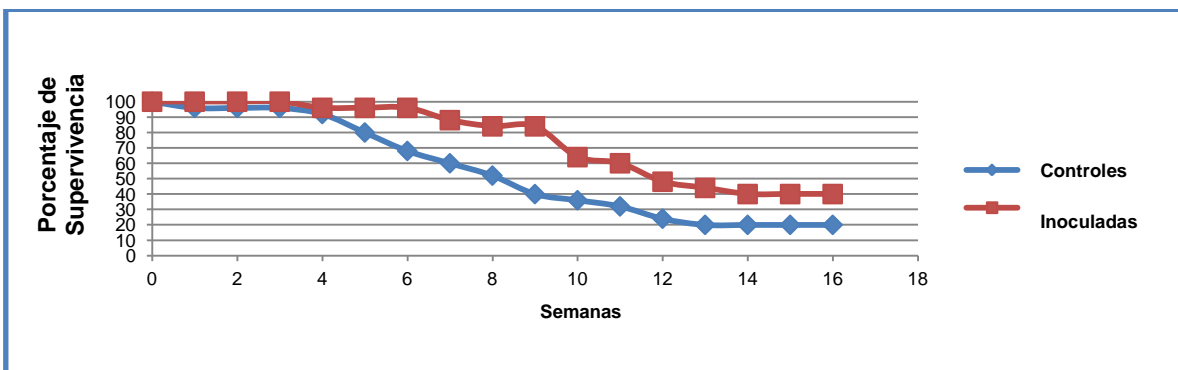


Gráfico 5. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa totales por técnica de “extracción de brote” con 30 g de fertilizante. El tiempo 0 representa el momento en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

Cuando se usaron 50 g de fertilizante también se observaron diferencias a partir de la 5ª semana (dpi); con 40% de plantas vivas inoculadas y 20% para las controles ([Gráfico 6](#)) . El número de muestras evaluadas fué de 25 inoculadas y 25 controles.

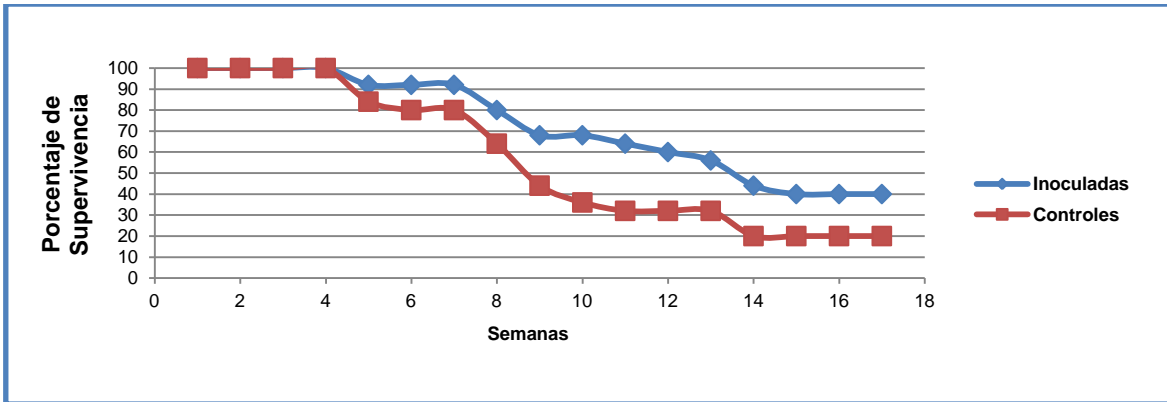


Gráfico 6. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa obtenidas por la técnica de “extracción de brote” adicionadas con 50 g de fertilizante. El tiempo 0 representa el momento en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

En general los resultados mostraron que las plantas de papa inoculadas mediante esta técnica tienen porcentajes mayores de supervivencia en comparación con las controles; con diferencias del 20%. Las condiciones de invernadero fueron extremas hasta para las plantas inoculadas, sin embargo durante el monitoreo se observó que las muestras tratadas con EMMIM-1 exhibieron mayor resistencia frente a áfidos y a hongos, con respecto a las controles que descendieron drásticamente por infestaciones de mosca blanca y fitopatógenos (no mostrado).

-Supervivencia de plantas obtenidas por la técnica de propagación “semilla de papa”.

En el experimento de 5 g de fertilizante triple 16, se observaron porcentajes de supervivencia de 60% de para plantas inoculadas (Gráfico 7) y 38% para controles, en la semana 16. La diferencia se observó a partir de la 9ª semana. El número de plantas utilizadas fue de 25 plantas inoculadas y 25 controles.

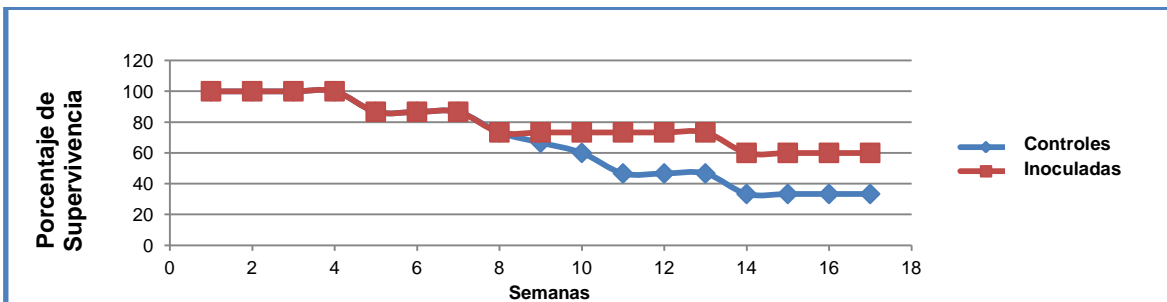


Gráfico 7. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa obtenidas por la técnica de “semilla de papa” adicionadas con 5 g de fertilizante. El tiempo 0 representa el momento en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

Posteriormente se realizaron experimentos donde se adicionaron 30 g y 50 g de fertilizante. Se observaron diferencias entre tratamientos controles e inoculados en la semana 7 y 8. Los porcentajes de supervivencia para el experimento a 30 g fueron de 90% (plantas inoculadas) y 40% (plantas no inoculadas). Con 50 g de fertilizante se registraron supervivencias de 61% para inoculadas y 22% para controles. Esto indicó que los grupos con el inoculante obtuvieron porcentajes superiores de supervivencia y por lo tanto mayor número de plantas vivas. Para el ensayo con 30 g de fertilizante se usaron 25 plantas inoculadas y 25 plantas control. Para el ensayo con 50 g de fertilizante se usaron 40 plantas inoculadas y 40 plantas control (Gráfico 8 y 9).

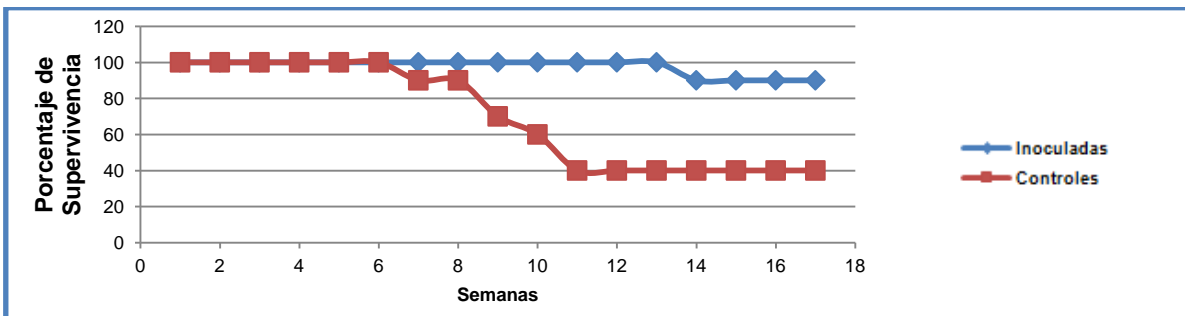


Gráfico 8. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa obtenidas por técnica de “semilla de papa” adicionadas con 30 g de Fertilizante. El tiempo 0 representa el tiempo en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

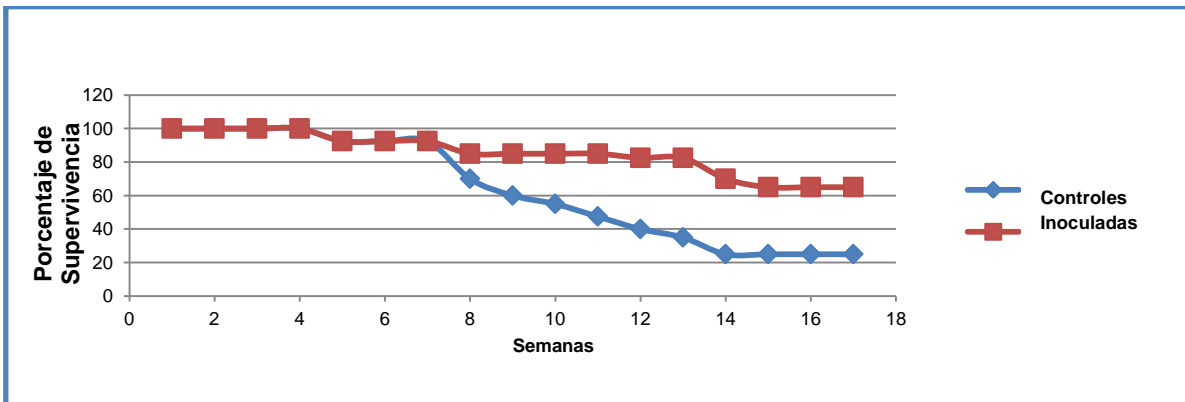


Gráfico 9. Porcentaje de supervivencia de las plantas de papa obtenidas por técnica de “semilla de papa” adicionadas con 50 g de Fertilizante. El tiempo 0 representa el tiempo en el que todas las plantas se encuentran vivas e inició el monitoreo, hasta el punto final después de 16 semanas.

Al igual que por la técnica de “extracción de brote” las plantas sometidas al EMMIM-1 tuvieron valores mas elevados de supervivencia en comparación de sus controles, cuyos número de plantas fueron disminuyendo a lo largo del tiempo, lo que indicó mayor susceptibilidad a las condiciones de invernadero. Sin embargo, en la técnica “semilla de papa” las plantas se adaptaron

mucho mejor, bajo condiciones de invernadero, que aquellas obtenidas por el método de “extracción de brote”; utilizando niveles de fertilización similares.

- **Evaluación de la capacidad de adhesión y colonización de las cepas que conforman el inoculante multiespecies en plantas de papa propagadas.**

Se calculó el número de bacterias presentes en las suspensiones bacterianas, usadas en los distintos experimentos de inoculación. Además se determinó la capacidad de las bacterias para adherirse a la semilla de papa o al brote (48 h) y la capacidad de poder colonizar a las plantas de papa a los (20, 50, 90 días). Cada cuantificación se realizó por triplicado.

- **Técnica de extracción de brote**

En el experimento con 5 g de triple 16, se realizaron dos inoculaciones, la primera el día de la extracción del brote y la segunda en el traspaso de frasco a maceta. Se cuantificó el número de células de cada cepa bacteriana presentes en el inoculante en sus respectivos medios de selección (Tabla 9). Se observó que las cepas que conforman el EMMIM-1 se encuentran en números mayores de 10^6 UFC/ml, suficientes para promover el crecimiento en plantas. En las dos suspensiones se observó que *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Azospirillum brasilense* Sp7 se encuentran en mayor número, a comparación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 con valores de 10^7 UFC/ml, *Burkholderia unamae* MTI-641 se mantuvo con valores mayores de 10^7 UFC/ml. No se observaron diferencias significativas entre el número de bacterias de la suspensión 1 y 2 (Gráfico 10).

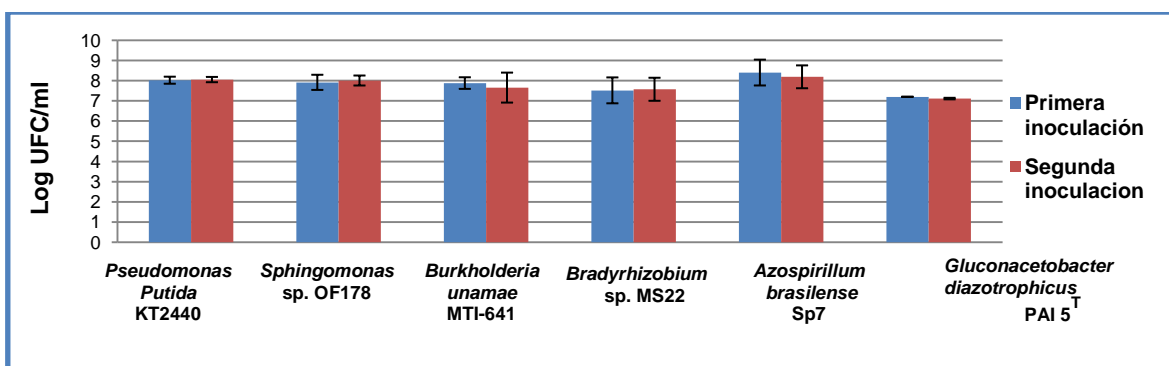


Gráfico 10. Promedios de Log UFC/ml de las cepas del EMMIM-1 utilizadas en el tratamiento a 5 g de Fertilizante. Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) y cada color una suspensión.

El número de bacterias que fueron capaces de adherirse al brote de papa (Gráfico 11) fué muy efectivo. *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* Sp7 se encontraron en número mayores de 10^7 UFC/ml, mientras que *G. diazotrophicus* PAI 5^T, *Bradyrhizobium* sp. MS22

y, *B. unamae* MTI-641 alcanzaron números de 10^7 UFC/ml o menores a este. Todas las cepas se mostraron competentes para adherirse al brote.

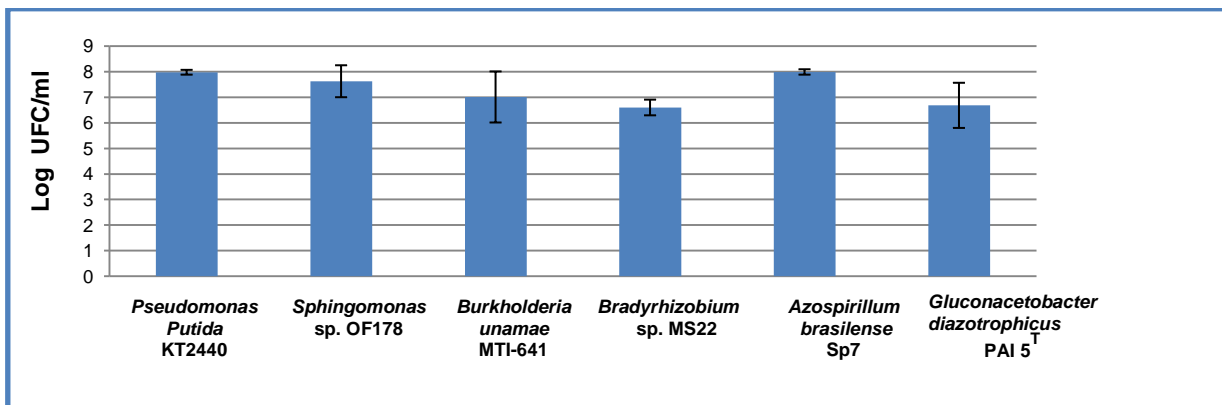


Gráfico 11. Promedios de Log UFC/ml de la adhesión mostrada por las bacterias del multiinoculante en el brote (tratamiento a 5 g de fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

Las bacterias resultaron ser aptas para adaptarse en condiciones de invernadero, todas las cepas colonizaron de forma eficiente a la rizósfera de las plantas. La reinoculación no afectó grandemente al número de bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas pero si aumentó ligeramente el número (datos no mostrados). *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* Sp7 se encontraron en valores de 10^7 UFC/ml el día 20 antes de ser reinoculadas, hasta el día 90 donde permanecieron en valores de 10^6 UFC/ml, sin embargo *G. diazotrophicus* PAI 5^T, *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *B. unamae* MTI-641 se encontraron en valores de 10^5 UFC/ml al día 90. A pesar de las variaciones todas las cepas manifestaron una correcta capacidad de colonización, unas mas que otras, pero permanecieron (Gráfico 12).

En el experimento con 30 g de triple 16, se observó que las cepas que conforman la suspensión de bacterias del EMMIM-1 se encuentran en números mayores de 10^7 UFC/ml. *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *B. unamae* MTI-641 se encontraron entre 10^7 y 10^8 UFC/ml, en cambio *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 muestran una población de 10^7 UFC/ml. No se observaron diferencias significativas entre el número de bacterias presentes entre suspensión 1 y 2, todas las bacterias permanecieron en números mayores de 10^6 UFC/ml (Gráfico 13).

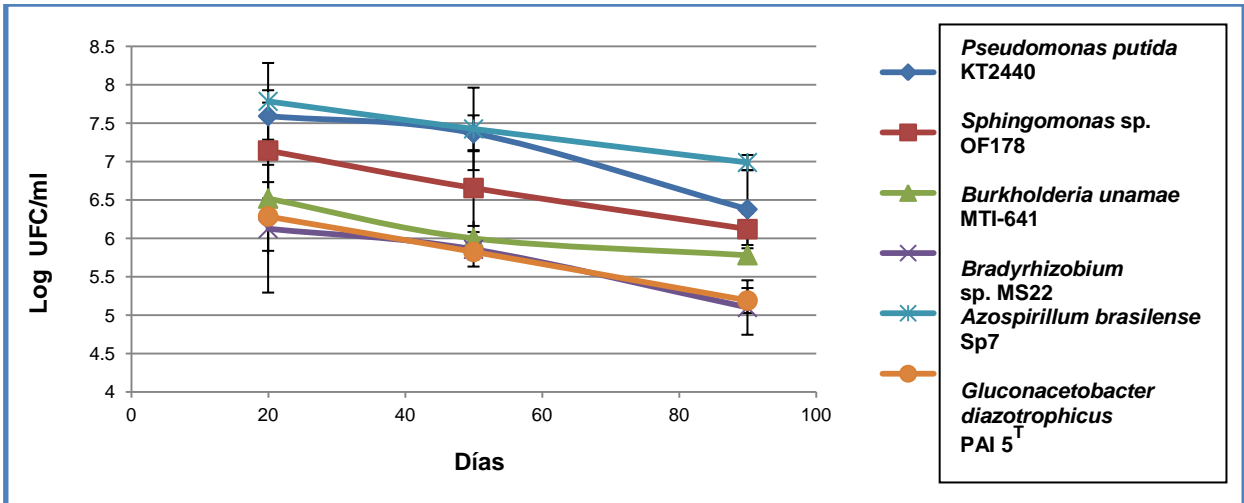


Gráfico 12. Promedios de Log UFC/ml de bacterias de la formulación EMMIM-1 que colonizan a la papa (20, 50 y 90 días dpi) adicionadas con 5 g de fertilizante. Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

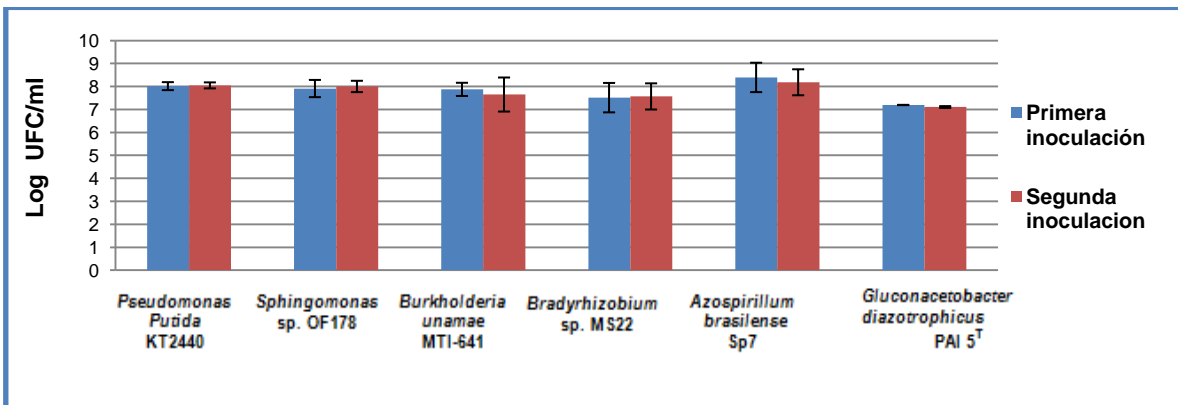


Gráfico 13. Promedios de Log UFC/ml de las cepas del EMMIM-1 utilizadas en el tratamiento a 30 g de Fertilizante. Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) y cada color una suspensión.

En este experimento (30 g de fertilizante) se observó nuevamente que todas las bacterias del EMMIM-1 se adhieren eficientemente al brote de papa. *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7, como es usual manifestaron valores de 10^8 UFC/ml, *B. unamae* MTI-641 y *Sphingomonas* sp. OF178 se encontraron en números de 10^7 UFC/ml, mientras que *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 permanecieron con valores de 10^6 UFC/ml (Gráfico 14). Nuevamente, la reinoculación no influyó en el número de bacterias de forma significativa (no mostrado).

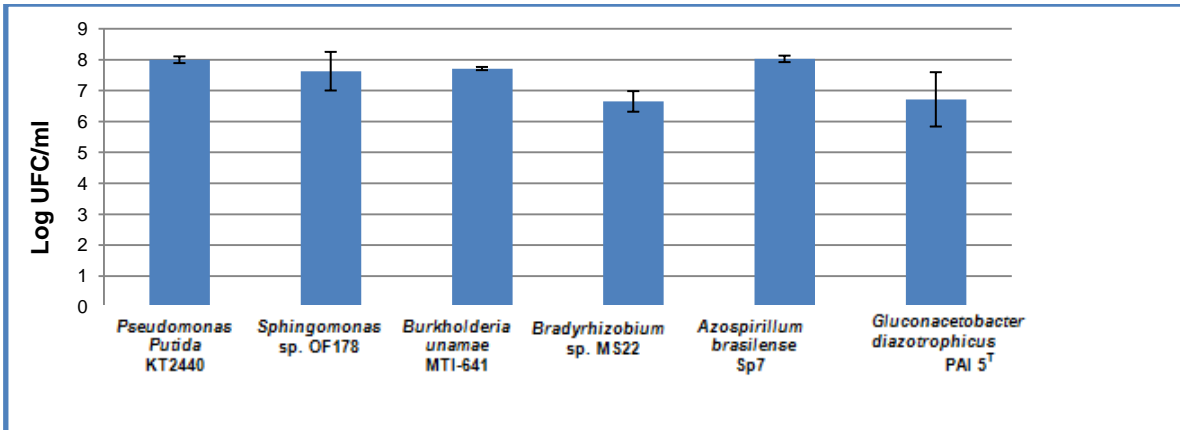


Gráfico 14. Promedios de Log UFC/ml de la adhesión mostrada por las bacterias del multiinoculante en el brote (tratamiento a 30 g de Fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

Las bacterias presentaron una buena capacidad de colonización a lo largo del crecimiento de las plantas (exp. 30 g de fertilizante) (Gráfico 15). *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 se encontraron en valores Log UFC/ml de 7.5 en el día 20 y permanecieron en 6.4 al día 50 y 7 al día 90. *Sphingomonas* sp. OF178 y *B. unamae* MTI-641 obtuvieron números de 6 y 5.8 Log UFC/ml al día 90. Finalmente *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 mostraron valores de colonización de 10^5 UFC/ml al día 90.

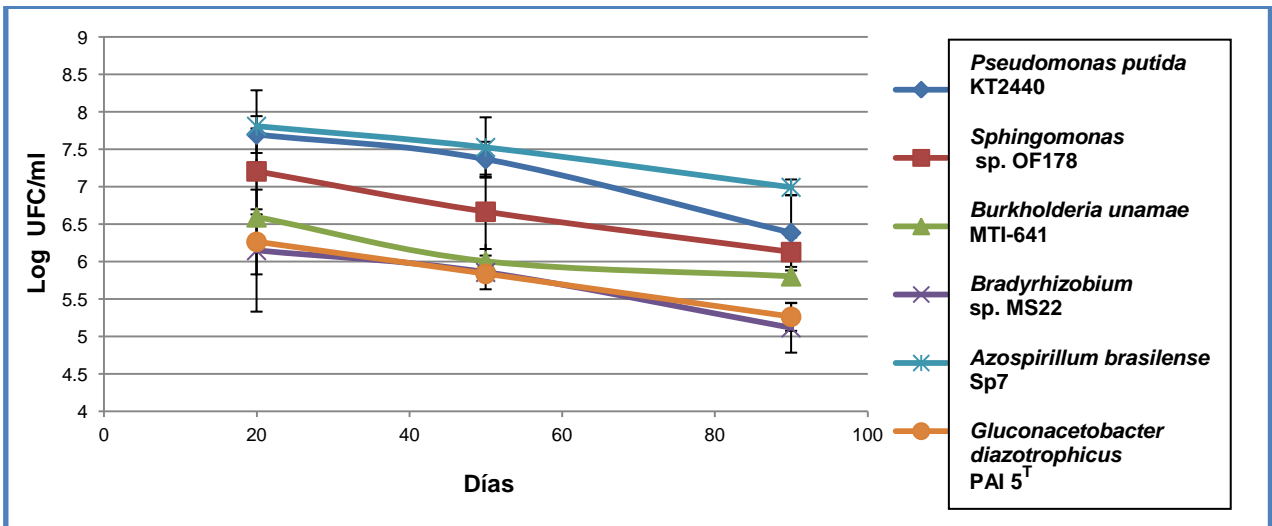


Gráfico 15. Promedios de Log UFC/ml de la colonización a diversos tiempos (20, 50 y 90 días dpi) por cada bacteria del multiinoculante en planta de papa (tratamiento a 30 g de Fertilizante). Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

En el experimento a 50 g de fertilizante se observó que las cepas que conforman el EMMIM-1 como fue descrito por los gráficos anteriores se encontraron en valores alrededor de 10^7

UFC/ml. En las dos suspensiones usadas, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7, *B. unamae* MTI-641, *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 permanecen en UFC/ml similares (Gráfico 16).

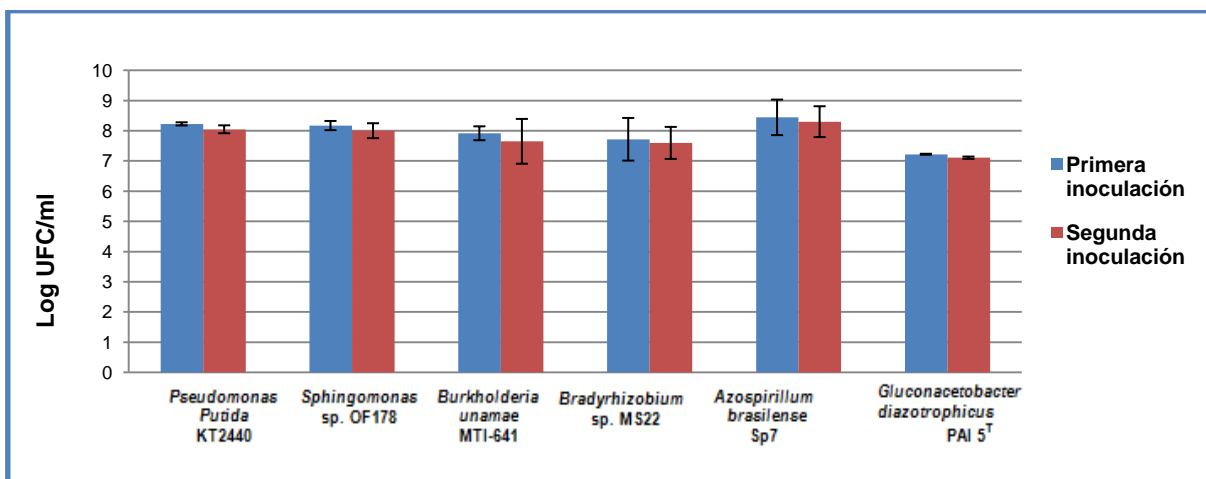


Gráfico 16. Promedios de Log UFC/ml de las cepas del EMMIM-1 utilizadas en el tratamiento a 50 g de Fertilizante. Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) y cada color una suspensión.

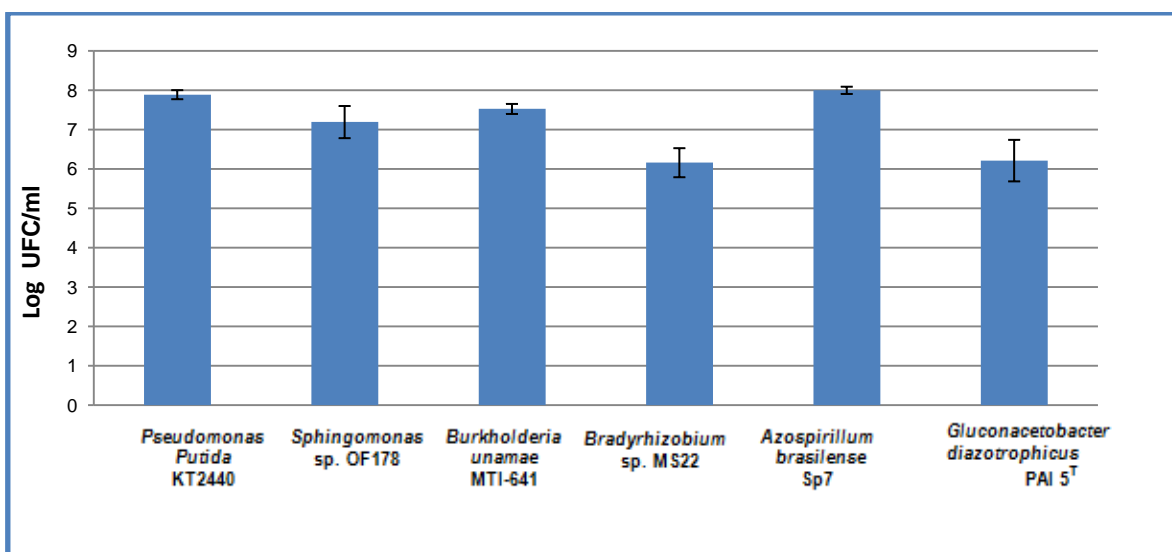


Gráfico 17. Promedios de Log UFC/ml de la adhesión mostrada por las bacterias del multiinoculante en el brote (tratamiento a 50 g de Fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

La capacidad de las bacterias para adherirse al brote de papa fue analizado en el experimento con 50 g de fertilizante. *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7, mostraron valores (Log UFC/ml) de 7.7 y 7.9 respectivamente. *B. unamae* MTI-641 y *Sphingomonas* sp. OF178 se encontraron en números de 10^7 UFC/ml. *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22

permanecieron con valores de 10^6 UFC/ml. Todas las bacterias fueron capaces de adherirse al brote (Gráfico 17). Las reinoculaciones permitieron un ligero aumento de las poblaciones de algunas bacterias; *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 hasta 10^8 UFC/ml y *B. unamae* a 7.5.

En acuerdo con el Gráfico 18, se observa que *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 colonizaron en el orden (Log UFC/ml) de 7 para el día 20 dpi y permanecieron en números mayores a 6 (Log UFC/ml) en el día 50 y 90. *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641 mostraron valores de 5 (Log UFC/ml) al día 90. *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 se encontraron en valores menores de 10^5 UFC/ml al día 90.

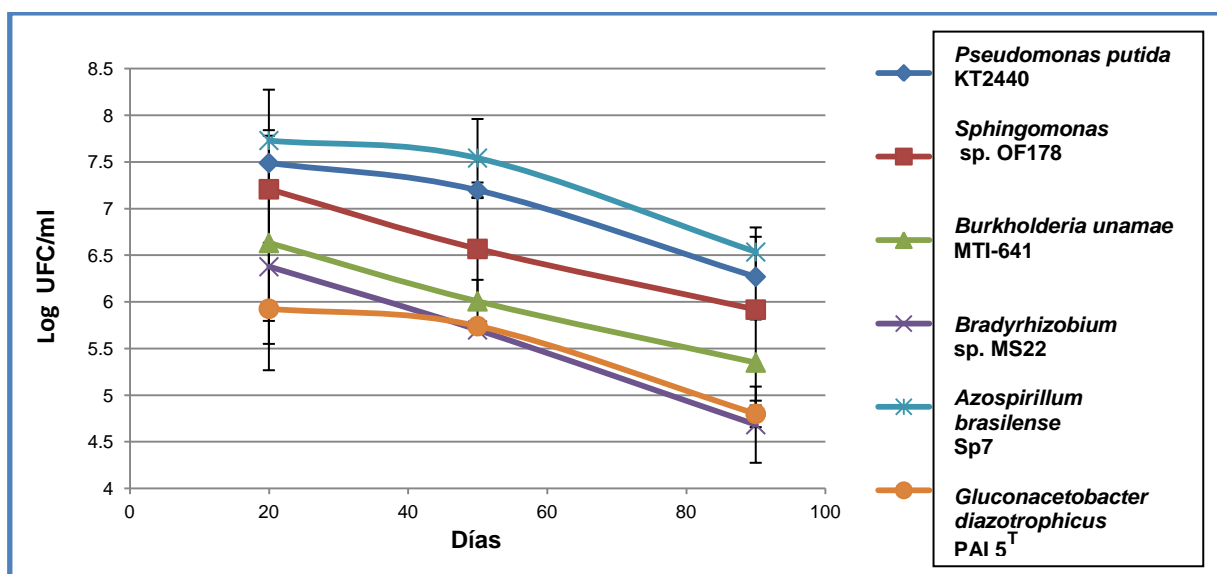


Gráfico 18. Promedios de Log UFC/ml de la colonización a diversos tiempos (20, 50 y 90 días dpi) por cada bacteria del multiinoculante en planta de papa (tratamiento a 50 g de Fertilizante). Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

- **Técnica de semilla de papa.**

Para la técnica de propagación a partir de la “semilla de papa”, también se realizaron experimentos con diferentes dosis de fertilizante donde se midió la adhesión y la colonización. En estos experimentos se usaron 4 dosis de inoculante por experimento y se midió el número de bacterias que vienen contenidas en la suspensión bacteriana.

Para el experimento a 5 g de fertilizante se observa que la mayoría de las bacterias del multinoculante se encontraron en valores de 10^7 UFC/ml. *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 en valores superiores (Gráfico 19).

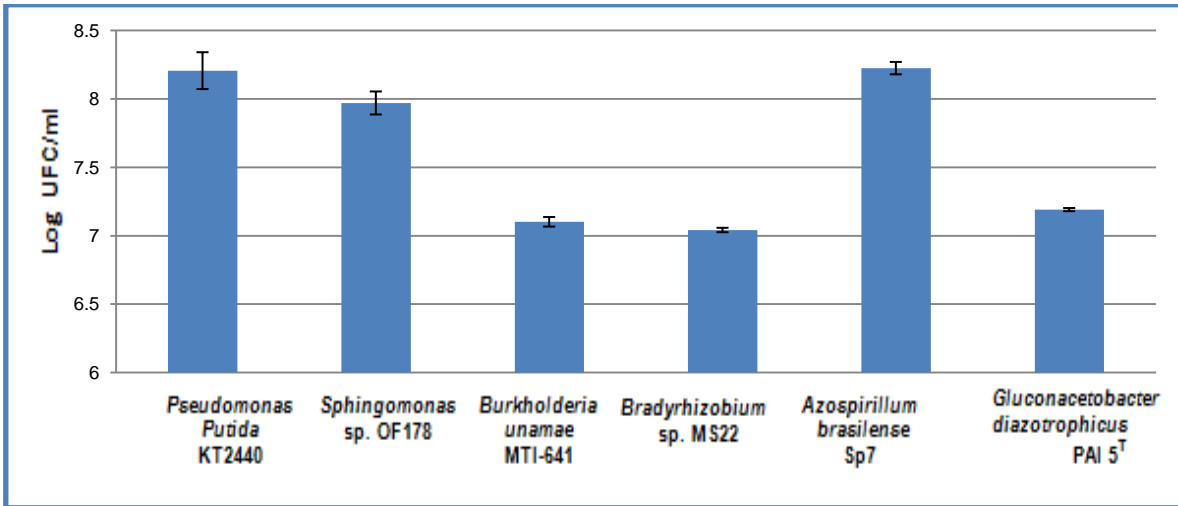


Gráfico 19. Media de las UFC/ml presentadas en escala logarítmica de las suspensiones utilizadas en el tratamiento a 5 g en técnica de “semilla de papa”. Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

La capacidad de las bacterias de adherirse a la semilla (a 48h dpi) es eficiente para las bacterias del EMMIM-1. *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 y *G. diazotrophicus* PAI 5^T exhibieron números de 10^7 UFC/ml, mientras que *B. unamae* MTI-641 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 permanecieron con valores de 10^6 UFC/ml (Gráfico 20).

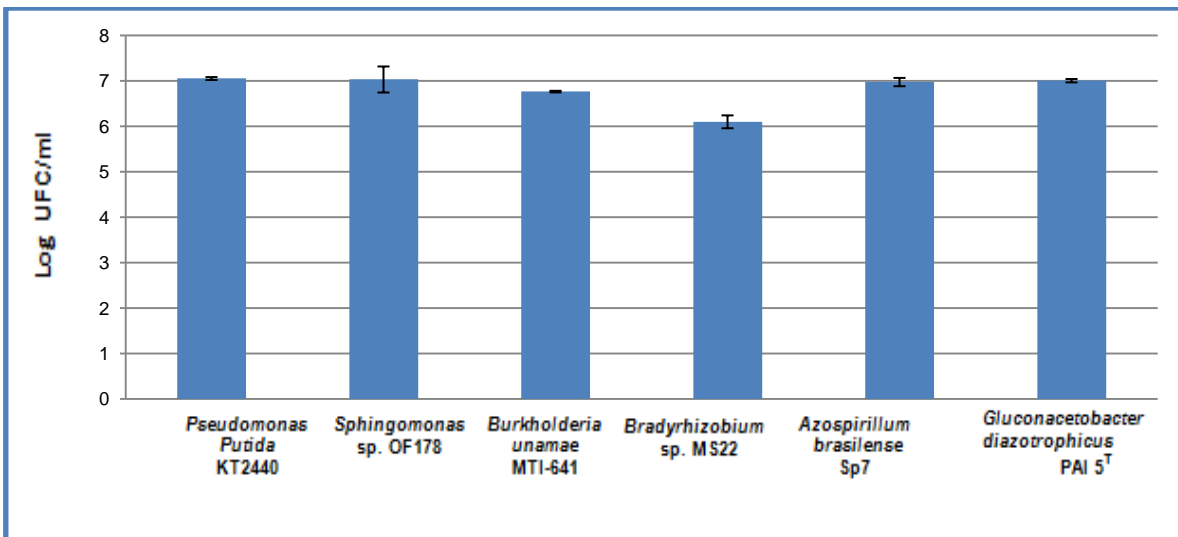


Gráfico 20. Media de las UFC/ml de la adhesión en escala logarítmica mostrada por las bacterias del multiinoculante en la “semilla de papa” (tratamiento a 5 g de Fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

La colonización se evaluó en períodos similares que en la técnica anterior y en todos los tratamientos de fertilizante. La colonización de las bacterias en este experimento (5 g de fertilizante) mostró que todas las bacterias de igual manera que por la técnica de “extracción de

brote” permanecieron asociadas a la rizósfera, aunque sus valores disminuyeron a lo largo del tiempo. Las bacterias comenzaron a descender después del día 50 en mayor proporción, quedando *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 y *G. diazotrophicus* PAI5^T en números (Log UFC/ml) de 5 al día 90. Mientras que *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *B. unamae* MTI-641 se encontraron en números menores de 10⁴ UFC/ml al día 90 (Gráfico 21).

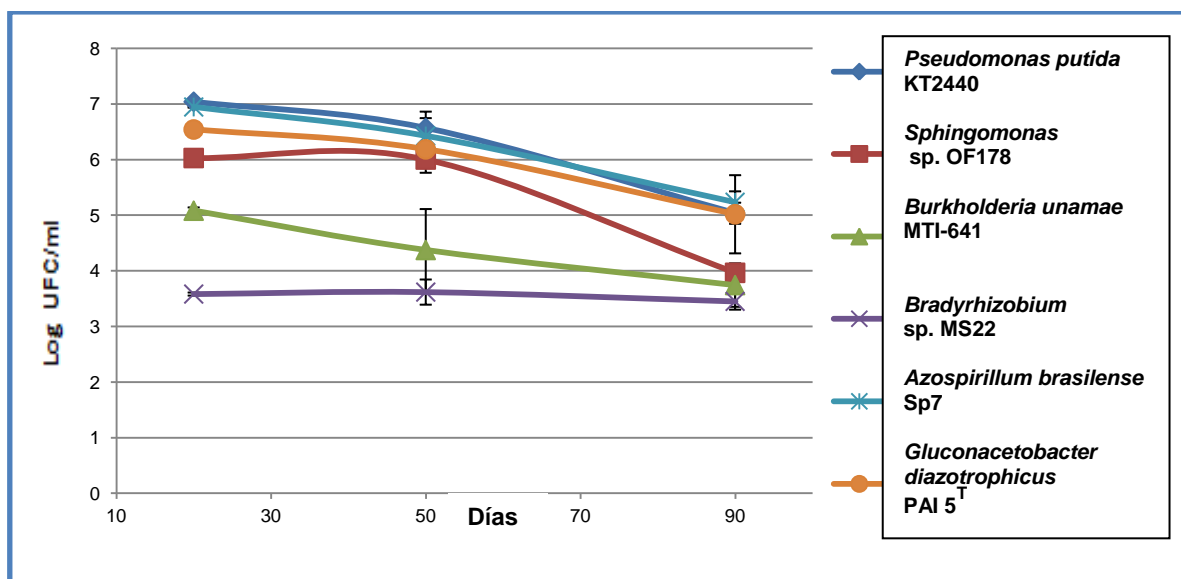


Gráfico 21. Media de Log UFC/ml de la colonización a diversos tiempos (20, 50 y 90 días dpi) por cada bacteria del multiinoculante en planta de papa (tratamiento a 5 g de Fertilizante). Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

En el experimento a 30 g de fertilizante se observó que todas las bacterias de la suspensión EMMIM-1 estaban en números de 10⁷ UFC/ml. Como es usual, *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* Sp7 se encontraron en mayor proporción (Gráfico 22).

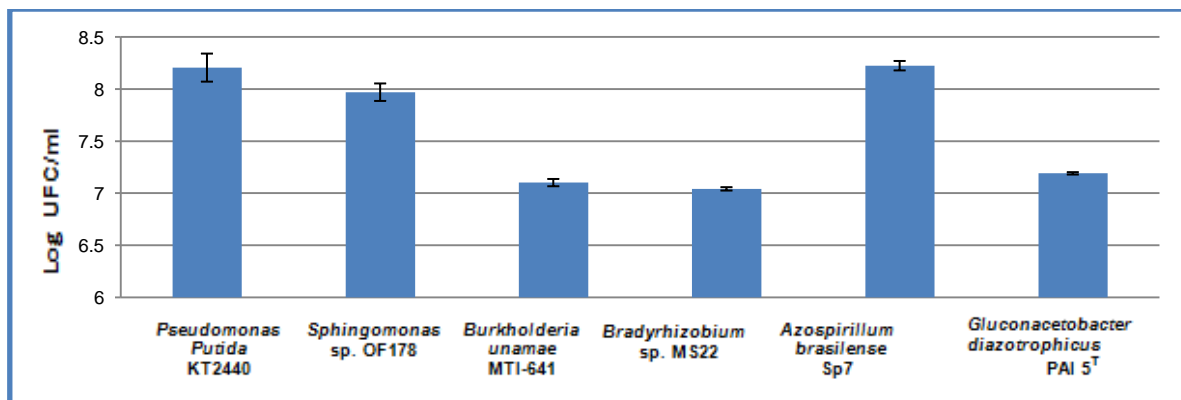


Gráfico 22. Media de las UFC/ml presentadas en escala logarítmica de las suspensiones utilizadas en el tratamiento a 30 g en técnica de "semilla de papa". Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

En cuanto a las capacidades de adhesión (experimento 30 g de fertilizante) se observó que *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178 exhibieron adhesiones de 10^7 UFC/ml, por otra parte *B. unamae* MTI-641, *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 mostraron adhesiones 10^6 UFC/ml (Gráfico 23).

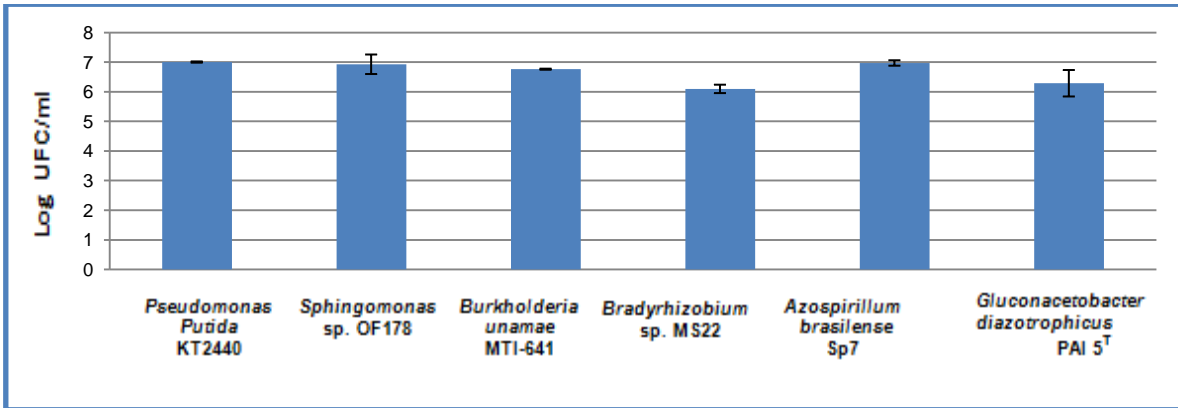


Gráfico 23. Media de las UFC/ml de la adhesión en escala logarítmica mostrada por las bacterias del multiinoculante en la “semilla de papa” (tratamiento a 30 g de Fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

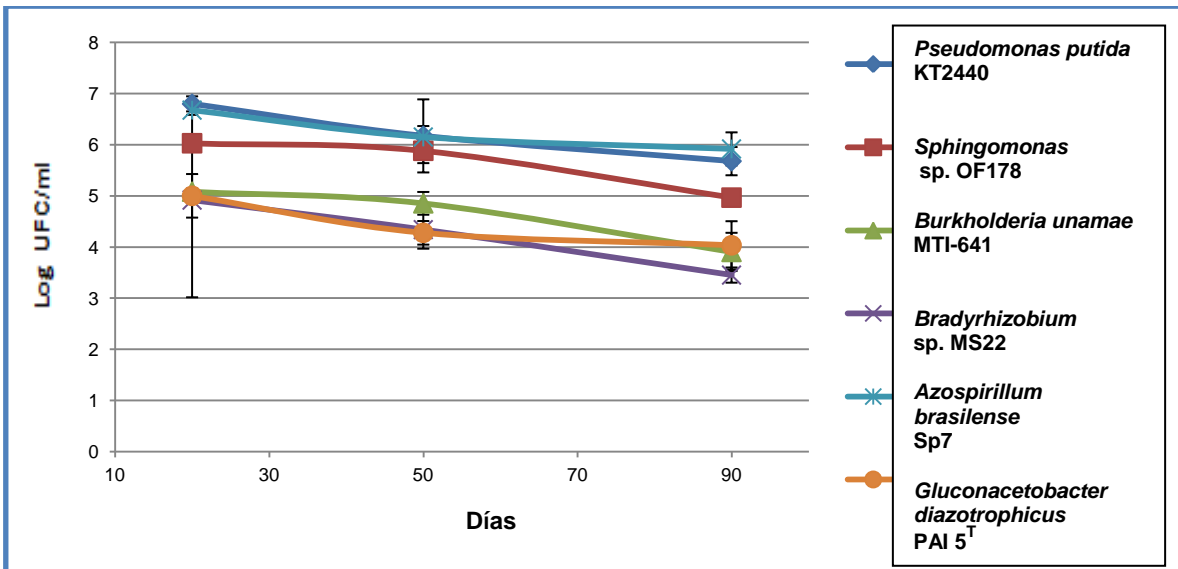


Gráfico 24. Media de Log UFC/ml de la colonización a diversos tiempos (20, 50 y 90 días dpi) por cada bacteria del multiinoculante en planta de papa (tratamiento a 30 g de Fertilizante). Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

Para el tratamiento a 30 g, la capacidad de las bacterias de permanecer a lo largo del tiempo demostró ser buena. Al igual que a 5 g de fertilizante este experimento resultó con cantidades de bacterias similares, a excepción de *G. diazotrophicus* PAI 5^T que descendió a comparación del tratamiento anterior. Los resultados mostraron que *P. putida* KT2440 y *A.*

brasiliense Sp7 tienen una mejor colonización en comparación de las demás cepas, seguidas de *Sphingomonas* sp. OF178. Las otras cepas exhibieron números iguales o menores a 10^4 UFC/ml al día 90 (Gráfico 24).

En el experimento donde se usaron 50 g de fertilizante, para las plantas de papa sembradas en invernadero, los inoculantes usados contuvieron números similares de bacterias a los inoculantes utilizados en experimentos anteriores (Gráfico 25).

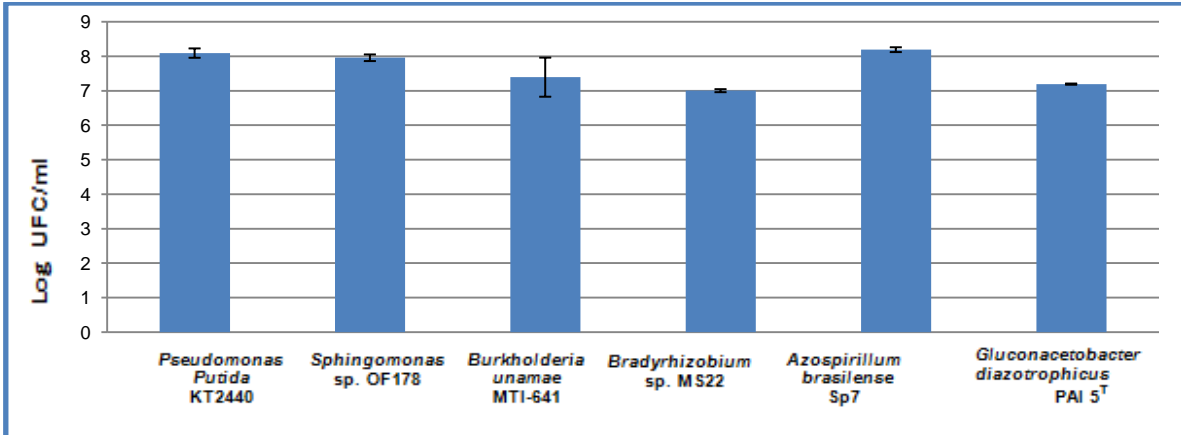


Gráfico 25. Media de las UFC/ml presentadas en escala logarítmica de las suspensiones utilizadas en el tratamiento a 50 g en técnica de la “semilla de papa”. Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

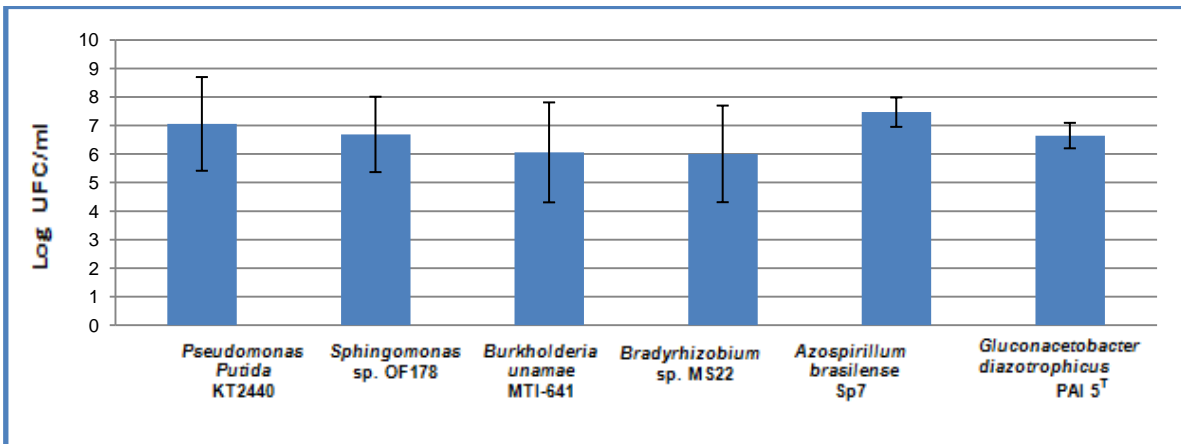


Gráfico 26. Media de las UFC/ml de la adhesión en escala logarítmica mostrada por las bacterias del multiinoculante en la semilla de papa (tratamiento a 50 g de Fertilizante). Cada barra representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ).

La adhesión de bacterias (experimento 50 g fertilizante) fue como sigue: *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178 fueron las que mejor adhesión mostraron con números de 10^7 UFC/ml, las demás bacterias manifestaron valores de 10^6 UFC/ml (Gráfico 26). El monitoreo de las bacterias a lo largo del tiempo (Colonización) a los tres períodos indicados,

mostró que todas las cepas en conjunto permanecen en la planta de papa, exhibiendo una buena capacidad de colonización. *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178 permanecieron en números de 10^6 - 10^7 UFC/ml a lo largo del periodo evaluado. El compartamiento de *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *B. unamae* MTI-641 fué diferente, quedando en números de 10^5 UFC/ml, finalmente *Bradyrhizobium* sp. MS22 demostró número mas bajos al inicio con 10^5 UFC/ml y finalizando al día 90 con valores menores a 10^4 UFC/ml (Gráfico 27).

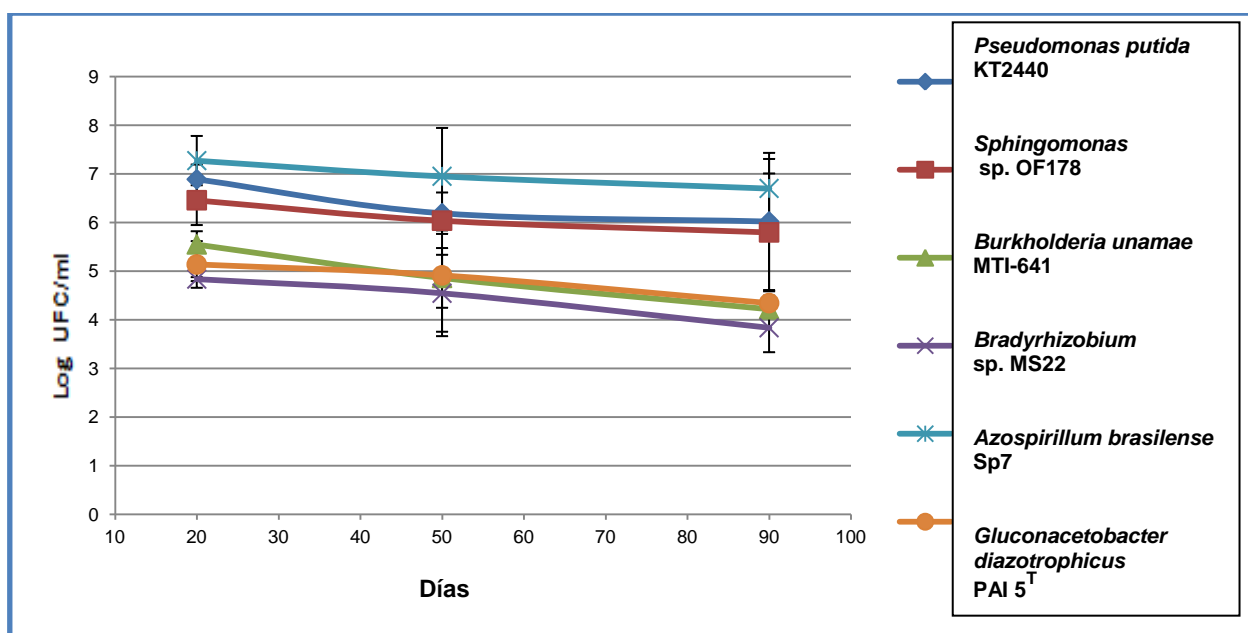


Gráfico 27. Media de Log UFC/ml de la colonización a diversos tiempos (20, 50 y 90 días dpi) por cada bacteria del multiinoculante en planta de papa (tratamiento a 50 g de Fertilizante). Cada línea representa una bacteria con su respectiva desviación estándar (σ) para cada tiempo.

En un análisis comparativo entre los indicadores de suspensión, adhesión y colonización en los diversos tratamientos por ambas técnicas se observó de manera general lo siguiente:

- 1) No hay variabilidad entre el número de UFC/ml de cada botella de EMMIM-1, todas las suspensiones utilizadas en los experimentos mantuvieron números de 10^6 - 10^8 UFC/ml, por lo que en las inoculaciones iniciales se utilizaron suficientes números de bacterias.
- 2) La adhesión presenta diferencias entre ambas técnicas, en cuanto a la técnica por “extracción de brote” las bacterias manifestaron mejor capacidad al entrar en contacto con el brote, de 10^8 UFC/ml a comparación de la técnica por “semilla de papa” donde se encontraron números menores para *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 con 10^7 UFC/ml. Sin embargo en ambas metodologías las cepas del EMMIM-1 lograron adherirse al brote o a la semilla en cantidades suficientes.
- 3) La colonización de bacterias fue diferente entre las metodologías de obtención de plantas. Se observó que las cepas de *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 no mostraron diferencia

entre ambas técnicas, quedando en número de 10^6 UFC/ml al día 90. *Sphingomonas* sp. OF178 demostró una variación al día 90, quedando en una media de 10^6 UFC/ml en caso de la metodología “extracción de brote” y con 10^5 UFC/ml para la técnica de “semilla de papa”. *B. unamae* MMTI-641 exhibió igualmente diferencias de 10^5 UFC/ml para “extracción de brote” y 10^4 UFC/ml para la segunda metodología. *G. diazotrophicus* PAI 5^T permaneció en números de 10^4 UFC/ml y finalmente *Bradyrhizobium* sp. MS22 mostró diferencias en colonización con números de 10^4 (extracción de brote) y 10^3 UFC/ml (“semilla de papa”). A pesar de esas diferencias entre las técnicas de propagación, las bacterias del EMMIM-1 presentaron una buena capacidad de colonización en la planta de papa, permaneciendo durante todo el período del cultivo, mientras que en los controles no se observaron las morfologías características de los microorganismos explorados en estos ensayos en los medios selectivos para el crecimiento de cada una de ellas (Figura 20).

- 4) La cantidad de fertilizante no influyó en el comportamiento asociativo de las cepas, mostrando variabilidad en su evolución dentro de la planta a lo largo del tiempo.

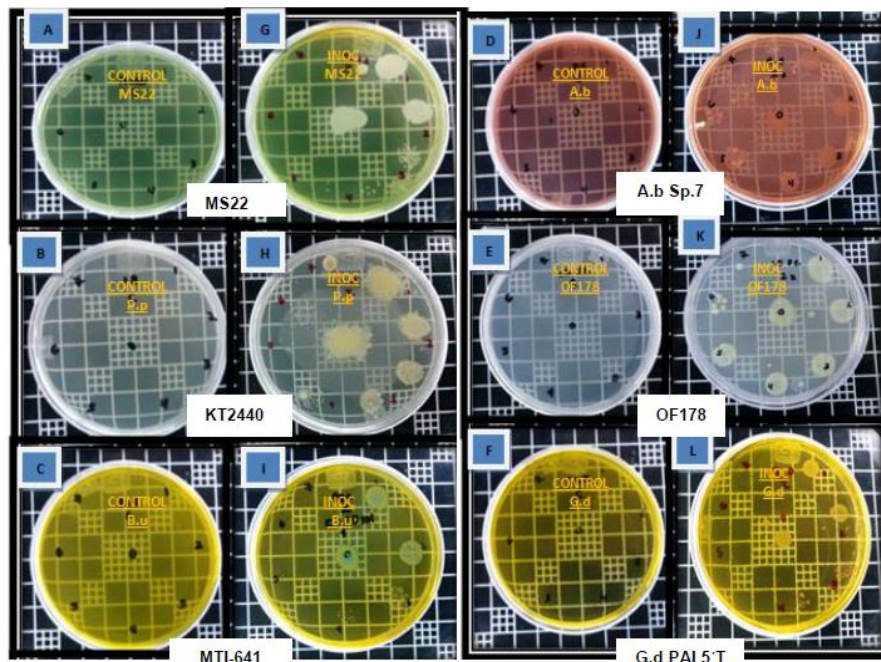


Figura 20. Colonización bacteriana a los 50 dpi en muestras inoculadas con sus respectivos controles: (A), (B), (C), (D), (E), y (F) corresponden a controles en medios de selección descritos (tabla 7). (G), (H), (I), (J), (K) y (L) corresponden a crecimientos característicos de las cepas de EMMIM-1 presentes en medios de selección descritos (tabla 9).

- **Efecto del inoculante multiespecies en la estimulación del crecimiento de papa bajo condiciones de invernadero.**

La medición de este indicador permitió conocer la ventaja que tuvo la asociación de las bacterias benéficas en plantas de papa en comparación con las que no fueron inoculadas. La evaluación de promoción de crecimiento se realizó tanto en plantas obtenidas por “extracción de brote” o de “semilla de papa”; adicionadas con diversas cantidades de fertilizante (5, 30 y 50 g de triple 16). Por la técnica de “semilla de papa”, además se exploró el efecto en 10 g de fertilizante y sin adición de fertilizante. A 0 g no existió crecimiento de plantas. Las mediciones se realizaron en plantas que sobrevivieron a los 110 dpi.

En plantas obtenidas por “extracción de brote” y adicionadas con 5 g de fertilizante (Figura 22), se observaron diferencias significativas (prueba t-student), en los indicadores evaluados, entre las plantas control e inoculadas; como la longitud de la parte aérea, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, peso fresco de raíz, longitud de raíz y número total de tubérculos obtenidos. Sin embargo para el peso total de tubérculos obtenidos así como para el peso individual, no se encontraron diferencias significativas. El número de plantas analizadas fueron de 15 para inoculadas y 10 para controles (Gráfico 28).

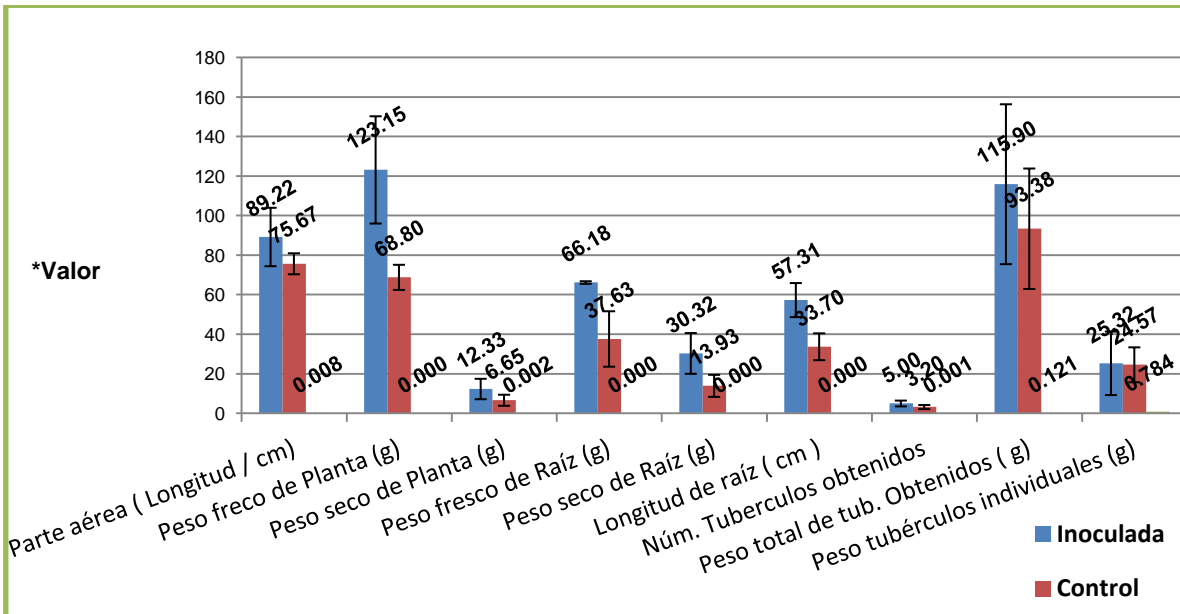


Gráfico 28. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 5 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador, y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba T (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

En plantas obtenidas por “extracción de brote” y adicionadas con 30 g de fertilizante los resultados mostraron que 6 de los parámetros evaluados presentaron diferencia significativa en el peso fresco, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz y longitud de raíz respectivamente. El restante de los indicadores no mostró diferencia estadística (*t*-student) entre ambos grupos. El número de plantas analizadas fueron de 14 para inoculadas y 10 para controles (Gráfico 29).

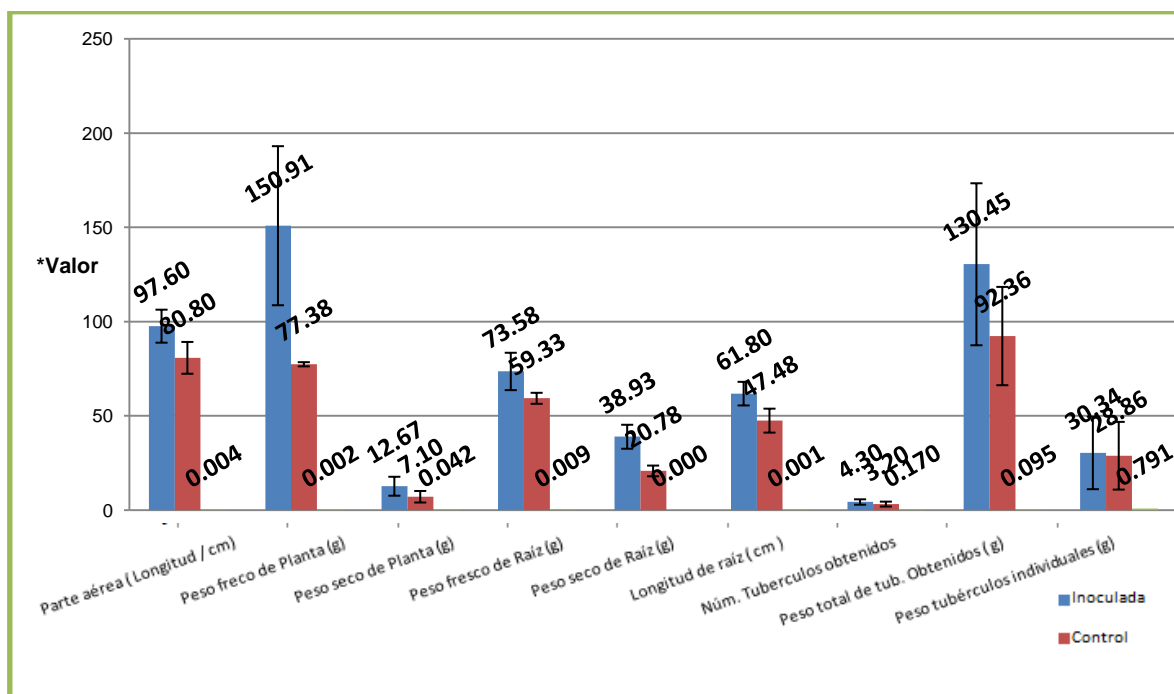


Gráfico 29. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 30 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador, y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

En plantas obtenidas por “extracción de brote” y adicionadas con 50 g de fertilizante, se observó un mejor crecimiento para plantas inoculadas que aquellas no inoculadas a los 110 dpi. Por ejemplo, en muestras inoculadas, se registró una mayor longitud en la parte aérea, mayor peso fresco y seco de las plantas, mayor peso total del producto. Sin embargo no se encontró diferencia estadística para el número de tubérculos obtenidos, con media de 4.2 en inoculadas, 3.6 para controles. El número de plantas analizadas fue de 18 inoculadas y 11 controles (Gráfico 30).

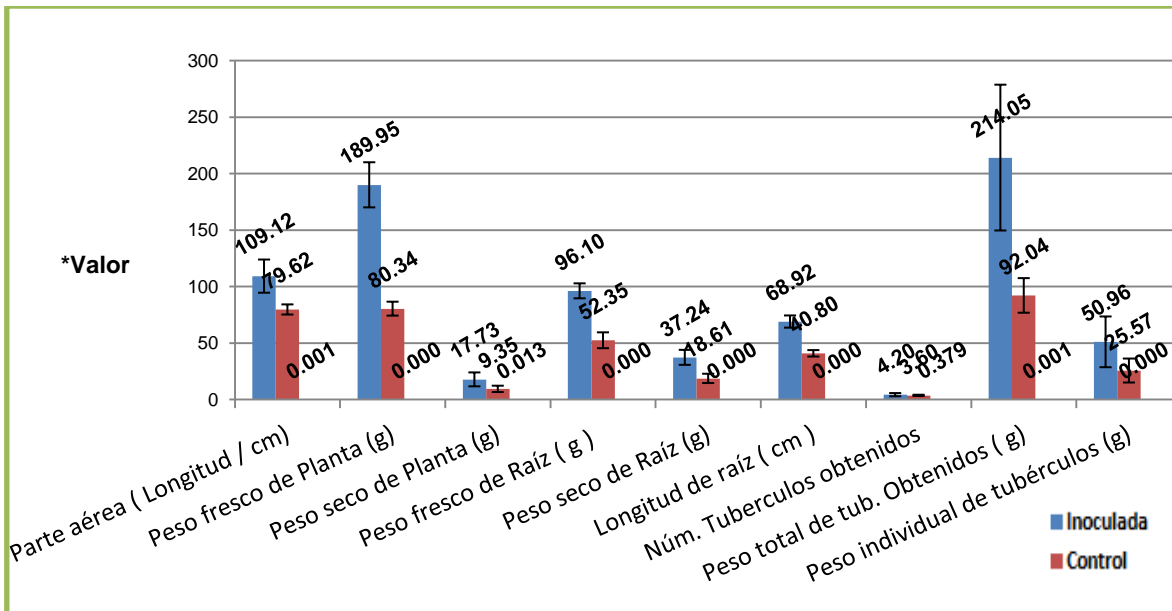


Gráfico 30. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 50 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador, y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

En plantas obtenidas por “semilla de papa” y adicionadas con 5 g de fertilizante se observó que los indicadores de parte aérea, peso seco de planta, peso fresco y seco de raíz, longitud de raíz y número de tubérculos obtenidos presentaron diferencias estadísticas, entre plantas inoculadas y no inoculadas (110 dpi). No fue el caso para el peso fresco de la región aérea, peso total de tubérculos obtenidos y peso individual de los tubérculos. En este experimento se analizaron 15 plantas inoculadas y 10 no inoculadas (Gráfico 31). En plantas obtenidas por “semilla de papa” y adicionadas con 10 g de fertilizante se observaron diferencias estadísticamente significativas, en todos los indicadores agronómicos explorados, entre plantas inoculadas y controles. Se analizaron 15 plantas inoculadas y 10 controles (Gráfico 32).

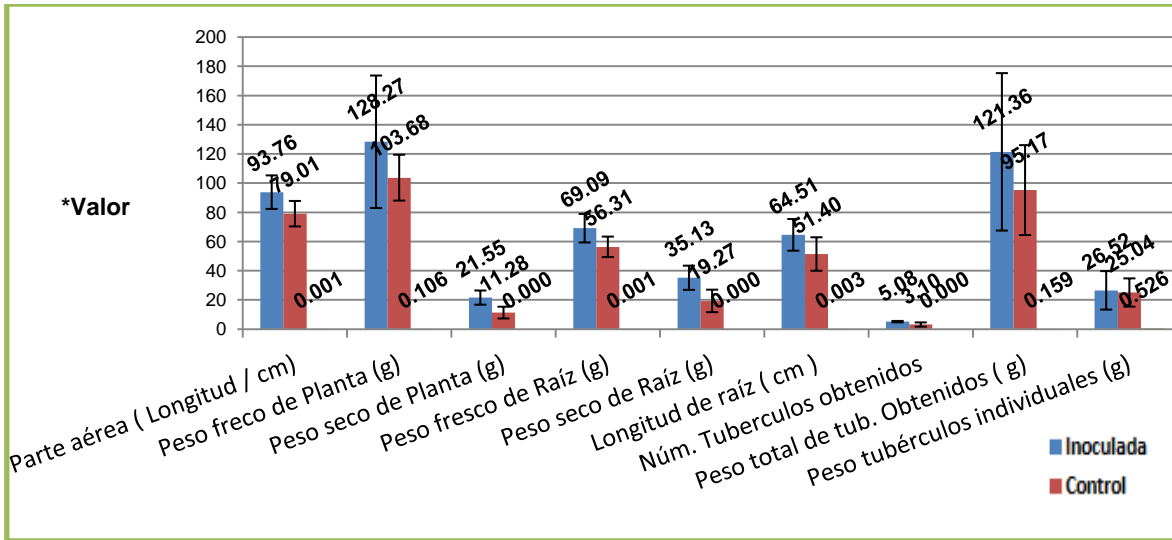


Gráfico 31. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 5 g de fertilizante (“semilla de papa”). Cada par de barras representa un indicador y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

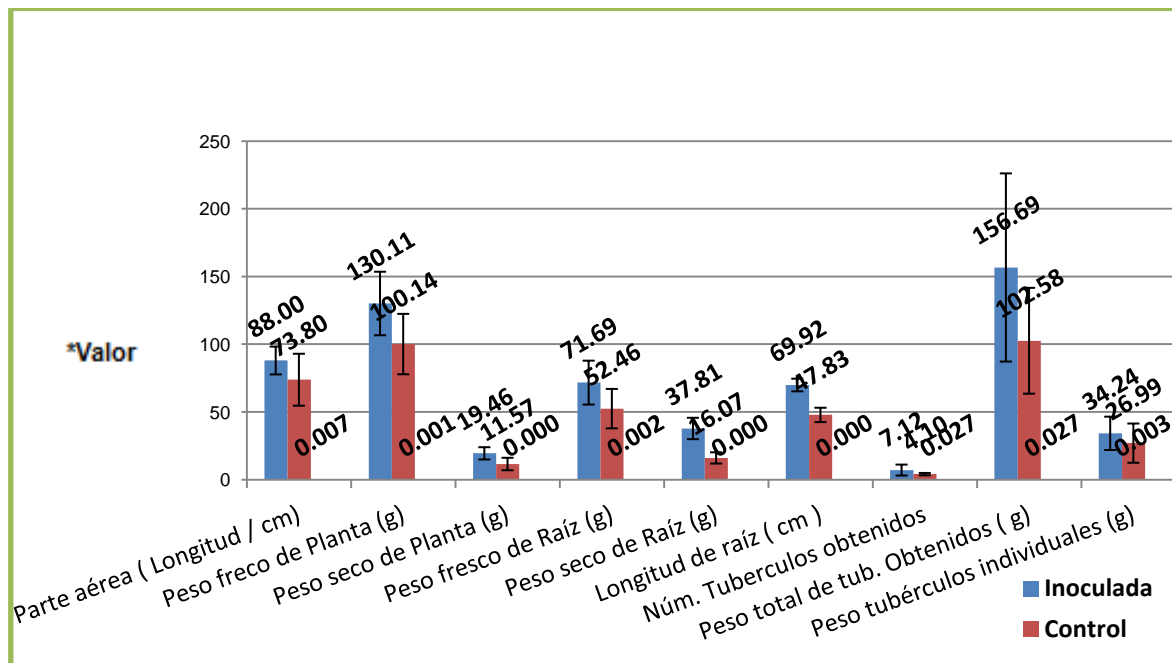


Gráfico 32. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 10 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

En plantas obtenidas por “semilla de papa” y adicionadas con 30 g de fertilizante se observó que el número de tubérculos obtenidos y el peso de tubérculos individuales no mostraron diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas. Los demás parámetros agronómicos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas y las no inoculadas. El número de plantas analizadas fueron de 16 para inoculadas y 11 para controles (Gráfico 33).

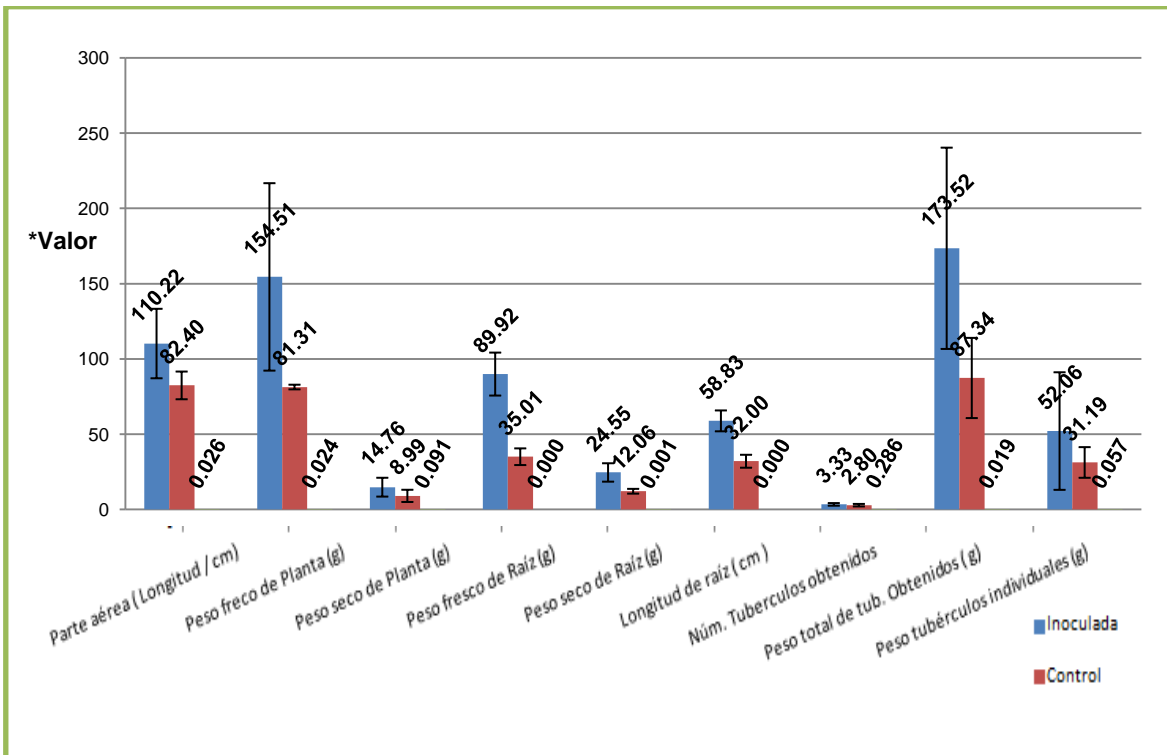


Gráfico 33. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 30 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

En plantas obtenidas por “semilla de papa” y adicionadas con 50 g de fertilizante se observó que la parte aérea, pesos frescos y secos de plantas, longitud de raíz y peso total e individual de tubérculos, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas. Sin embargo esto no fue observado para el número de tubérculos obtenidos con una media de 4 en tratamientos inoculados y no inoculados. El número de plantas analizadas fue de 20 para inoculadas y 10 no inoculadas (Gráfico 34).

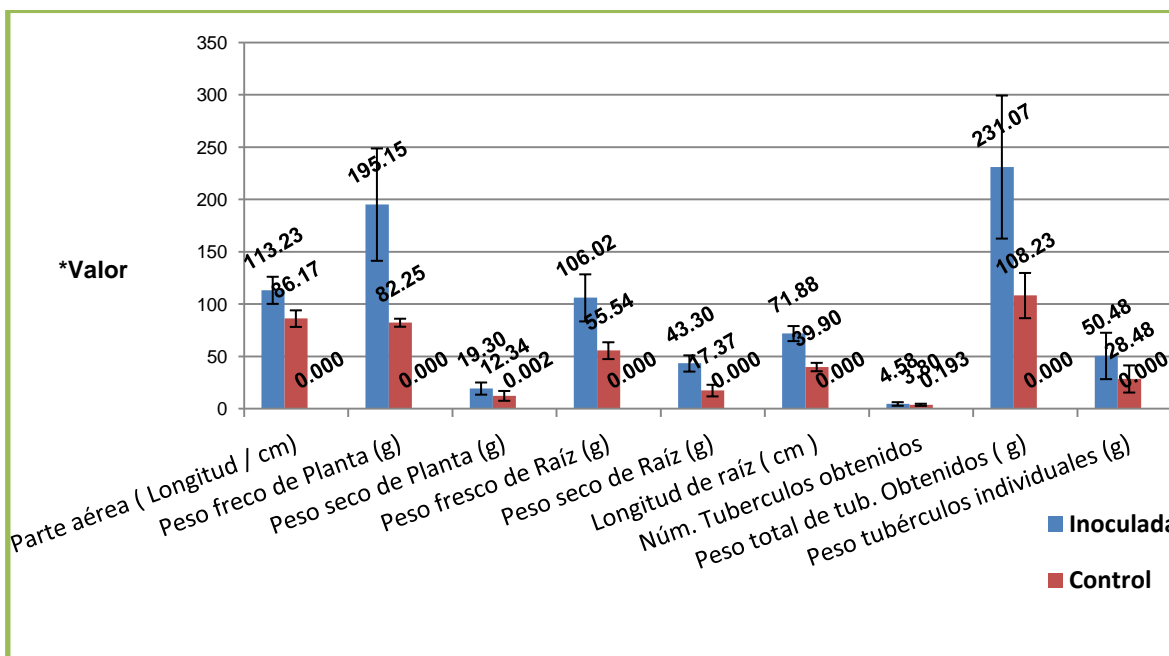


Gráfico 34. Media de indicadores agronómicos evaluados a los 110 días en el tratamiento con 50 g de fertilizante. Cada par de barras representa un indicador, y cada color un grupo (inoculadas y controles). Los indicadores presentan su respectiva desviación estándar (σ) y el valor P de la prueba t-student (tercera barra). *Representa la unidad que se considera para cada indicador.

Al comparar las dosis de fertilizante empleadas en cada experimento en la técnica de propagación “extracción de brote”, se observó que a mayor dosis de fertilizante algunos indicadores agronómicos se incrementan en ambos grupos, pero con mayor proporción en plantas inoculadas que en controles, a excepción del número de brotes que no presentó demasiadas variaciones, aunque se obtuvo mayor número con 5 g de fertilizante y una diferencia significativa entre grupos. En cuanto a los resultados obtenidos por técnica de “semilla de papa” también se observó que a mayor cantidad de fertilizante se incrementa el valor numérico de la mayoría de los indicadores agronómicos explorados, como el peso de los tubérculos y los pesos y longitudes de las raíces evaluadas en plantas inoculadas y controles, pero con mejores valores para las plantas inoculadas (Figura 21, 22, 23, 24).

Finalmente al hacer la comparación entre ambas técnicas de propagación de plantas, a diversas dosis de fertilizante usado, se observó que en el método de “semilla de papa”, los indicadores agronómicos son mejores que los observados en el método “extracción en brote”. Por ejemplo las partes aéreas, longitudes de raíces, pesos frescos y secos y peso de tubérculos.

Ambas técnicas funcionaron para la propagación de plantas de papa, sin embargo, la dosis de triple 16 en conjunto con la presencia de las especies bacterianas influyeron en los indicadores agronómicos obtenidos.



Figura 21. Cultivo de plantas de papa a 110 días, bajo condiciones de invernadero. Las plantas inoculadas y controles se encuentran distribuidas al azar.



Figura 22. Plantas de papas inoculadas con sus respectivos controles. (A) Muestras de plantas de papa evaluadas a 20 días (sistema radicular). (B) Plantas de papa a 110 días listas para medición de indicadores agronómicos. Donde E ó I. significa inoculada y C significa control.

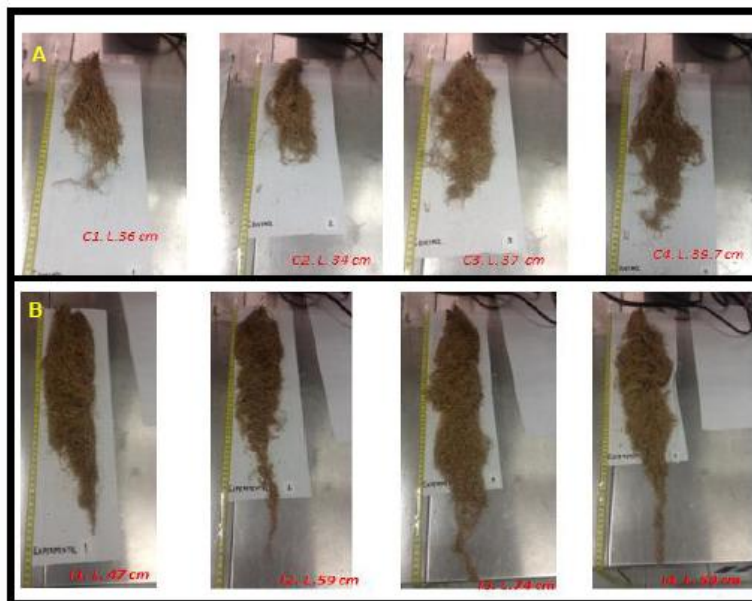


Figura 23. Medición de indicadores agronómicos (longitud de raíz) a 110 días. (A) Muestras de plantas controles, (B) Muestras de plantas inoculadas. Los números en rojo representan los valores obtenidos en cada muestra analizada.



Figura 24. Comparación de tubérculos de papa. (A) Tubérculos de plantas controles. (B) Tubérculos de plantas inoculadas con EMMIM-1.

- **Determinación de Clorofila**
 - **Curva de absorbancia de Clorofila.**

Para obtener la longitud de onda indicada y poder medir la clorofila en plantas de papa con su respectivo análisis comparativo, se realizó un barrido a diversas longitudes de onda de forma automatizada por medio del espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 25 UV/Visible, usando 3 muestras de hoja de papa no inoculada con 90 días de crecimiento. Los picos de absorbancia de la clorofila en la hoja de papa se observa en el [Gráfico 35](#).

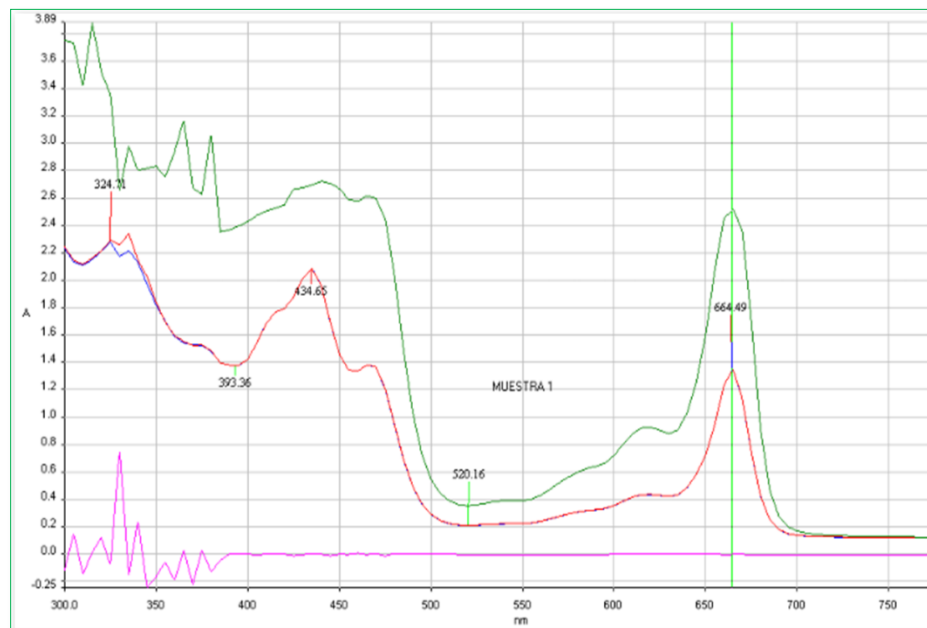


Gráfico 35. Curva de absorbancia de clorofila de 3 muestras de hoja de papa. Las líneas verdes claras representan los puntos de absorbancia (520.16 y 664.49). Muestra 1 línea de color verde oscuro, muestra 2 línea roja y muestra 3 línea azul.

- **Obtención de Clorofila por Método de extracción en frío y lectura a 664nm.**

La clorofila se determinó en experimentos a 10, 30 y 50 g de fertilizante para ambas técnicas de obtención de planta (“extracción de brote” y “semilla de papa”), en muestras controles y experimentales. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. El análisis estadístico (*t*-student) mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de todos los experimentos evaluados, para ambas técnicas (Tabla 9, 10, 11, 12, 13). No obstante, los valores de absorbancia de clorofila resultaron ligeramente mayores para las plantas inoculadas.

Tabla 9. Análisis comparativo de hojas de muestras inoculadas y controles en tratamiento a 30 g de fertilizante en plantas obtenidas por “extracción de brote”. Se presenta la media aritmética, Dev.Std y Valor P de prueba T. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 664nm.

Absorbancia (Longitud de onda)	Media Inoculadas	Dev.Std	Media Controles	Dev.Std
664nm	0.7850	±0.0944	0.6287	±0.1017

(P = 0.123)

Tabla 10. Análisis comparativo de hojas de muestras inoculadas y controles en tratamiento a 50 g de fertilizante en plantas obtenidas por “extracción de brote”. Se presenta la media aritmética, Dev.Std y Valor P de prueba T. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 664nm.

Absorbancia (Longitud de onda)	Media Inoculadas	Dev.Std	Media Controles	Dev.Std
664nm	0.6520	±0.1420	0.6153	±0.1992

(P = 0.808)

Tabla 11. Análisis comparativo de hojas de muestras inoculadas y controles en tratamiento a 10 g de fertilizante en plantas obtenidas por “semilla de papa”. Se presenta la media aritmética, Dev.Std y Valor P de prueba T. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 664nm.

Absorbancia (Longitud de onda)	Media Inoculadas	Dev.Std	Media Controles	Dev.Std
664nm	0.7587	±0.3574	0.5553	±0.2947

(P = 0.400)

Tabla 12. Análisis comparativo de hojas de muestras inoculadas y controles en tratamiento a 30 g de fertilizante de plantas obtenidas por “semilla de papa”. Se presenta la media aritmética, Dev.Std y Valor P de prueba T. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 664nm.

Absorbancia (Longitud de onda)	Media Inoculadas	Dev.Std	Media Controles	Dev.Std
664nm	0.8387	±0.2188	0.7417	±0.0552

(P = 0.498)

Tabla 13. Análisis comparativo de hojas de muestras inoculadas y controles en tratamiento a 50 g de fertilizante de plantas obtenidas por “semilla de papa”. Se presenta la media aritmética, Dev.Std y Valor P de prueba T. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 664nm.

Absorbancia (Longitud de onda)	Media Inoculadas	Dev.Std	Media Controles	Dev.Std
664nm	0.7203	±0.3457	0.7183	±0.2367

(P = 0.994)

DISCUSIÓN

Las PGPR son asociadas con efectos benéficos en las plantas, promueven su crecimiento mediante diversos mecanismos. De acuerdo al grado de asociación con las células de la raíz de la planta, las rizobacterias promotoras del crecimiento, podrían clasificarse como: ePGPR (PGPR extracelulares) e iPGPR (rizobacterias intracelulares). Las ePGPR pueden existir en la rizósfera, en el rizoplano o entre los espacios de la célula del cortex de la raíz, algunos ejemplos incluyen a los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Bhattacharyya, 2012). Las iPGPR son capaces de colonizar el interior de las células de la raíz y se localizan en general dentro del nódulo de la raíz, como ejemplos de éstas se sitúan a los géneros bacterianos de *Allorhizobium*, *Azhorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Atieno *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2011). *Gluconacetobacter diazotrophicus* es considerada como iPGPR, por ser una bacteria endófito asociada a caña de azúcar y tener capacidad de colonizar a rizósfera de plantas (Muñoz-Rojas *et al.*, 2003).

La interacción microorganismo- planta puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos por medio de los procesos de primer contacto como son la adhesión, la colonización, el incremento de la densidad de la población, aunado a ello está la comunicación entre las contrapartes, los metabolitos excretados por la planta llamados exudados serían los mediadores que favorecen al intercambio de señales con el microorganismo.

Existen mecanismos para la promoción del crecimiento en plantas ampliamente estudiados como son la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento (giberelinas, citocininas y auxinas); las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas. Esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrimentos, permitiendo que las plantas sean más vigorosas, productivas (Lugtenberg and Dekkers 1999; Holguin, 2001). Otros mecanismos empleados, son la fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo y de otros minerales (Ortíz, 2009; Bashan, 2002; Kloepper *et al.*, 1991; Morales-García *et al.*, 2010; Ortíz, 2009; Muñoz-Rojas *et al.*, 2005; Bashan, 2002; Holguin, 2001).

El empleo de bacterias es una práctica agronómica reconocida en todo el mundo por sus beneficios productivos y económicos, usualmente utilizadas en plantas gramíneas y leguminosas. En diversas investigaciones, se han asociado a los microorganismos en relación con los cultivos como partes esenciales para el logro de una alta producción y rendimientos en cuanto al producto obtenido. El mejoramiento en la calidad microbiológica de los suelos agrícolas debido a la incorporación de organismos seleccionados, contribuye a disminuir los costos de producción y el uso de pesticidas, como en el caso de la papa, cultivo poco estudiado en cuanto a interacción con microorganismos.

El empleo de inoculantes ha ido incrementando para potenciar el crecimiento de plantas, generalmente a través de la monoinoculación, por ejemplo el uso de *Azospirillum brasilense* (Tilak

and AnnaPurna 1993) y el de *Enterobacter* sp. (Morales-García., *et al* 2011). De hecho *A. brasilense* es la bacteria que más se ha inoculado en campos agrícolas, obteniendo rendimientos favorables (Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2005). *Enterobacter* sp. también ha mostrado la capacidad de incrementar los rendimientos cuando se asocia a la rizósfera de maíz hasta 1.5 veces mayor en referencia a plantas no inoculadas (Morales-García., *et al* 2011).

En esta investigación se usó un inoculante multiespecies que ha sido reportado como un excelente promotor del crecimiento en maíz de diversas variedades y en diversos ambientes favoreciendo su altura, naciencia y grosor de tallos (Morales-García *et al.*, 2012). Durante la presente investigación, se exploró el efecto del EMMIM-1 en plantas de papa. Se midieron diversos indicadores, para conocer la capacidad de las bacterias para permanecer y adherirse a la planta de papa o a los brotes y semillas, finalmente se analizaron indicadores agrícolas para mostrar diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas.

Primeramente en esta tesis se realizaron experimentos de exploración para obtener la condición más eficiente de propagación de brote para metodologías de crecimiento de la planta. Se compararon 4 tratamientos a diversas condiciones, se midieron parámetros de temperatura, humedad relativa (%) y número de brotes obtenidos por cada tratamiento.

Se encontró que el tratamiento 3 (24°C, 65% humedad relativa) se obtuvo el mayor número de brotes (50), por lo que resultó ser la mejor condición para la obtención de brotes. De hecho, las semillas de papa necesitan condiciones frescas no mayores de 28°C, y humedades relativas mayores de 60% que de otra manera, los brotes no serían capaces de resistir las condiciones de sembrado, o serían poco viables, además de que la probabilidad de crecimiento al obtener brotes en mayores cantidades y condiciones aumentaría. La papa es un cultivo de gran importancia, ya que es considerado como alimento básico por sus cualidades nutricionales (Estrada, 2000). Para la productividad masiva de la papa es necesaria la continua utilización de tecnologías agronómicas que permitan obtener mejores logros productivos traducidos en mejores rendimientos que cubran las necesidades alimentarias.

Las plantas responden a las condiciones ambientales y esto les ha permitido desarrollar mecanismos para tolerar y/o superar las condiciones adversas (falta de agua, altas y bajas temperaturas, escasez de nutrientes, depredación, etcétera) (Bradshaw, 1965). Entre los mecanismos adquiridos se encuentra la plasticidad, que es una medida de la proporción en que las expresiones de las características fenotípicas cambian debido al efecto de la variación ambiental. Es reconocido que la plasticidad vegetal es la característica por la cual una planta puede crecer y reproducirse en cualquier ambiente variando su forma o manteniendo una forma constante.

La estabilidad indica una condición en la cual no ocurren muchos cambios y la regulación interna es la tendencia de un sistema a mantener sus características morfológicas y fisiológicas constantes. Las variables ambientales pueden estar representadas por factores bióticos (enfermedades, depredación, etcétera) y abióticos (agua, luz, temperatura, humedad, sustrato,

etcétera), que influyen en mayor o menor grado en el patrón de desarrollo, la forma y el funcionamiento de los organismos vegetales (Bradshaw, 1965).

Una sugerencia al realizar sembrados con brotes de papa, es guiarse del postulado de Duncan que afirma que cuando un cultivo crece con altas densidades de población, el rendimiento promedio decrece como resultado de la competencia entre plantas vecinas por los recursos del suelo (agua y nutrientes minerales) y de la atmósfera (radiación fotosintéticamente activa, dióxido de carbono y oxígeno). Duncan (1958), postuló que el rendimiento promedio de las plantas sujetas a densidades en incremento puede comportarse como el rendimiento de plantas que crecen a poblaciones constantes y niveles decrecientes de nutrientes. Estos factores deberán tomarse en cuenta en experimentos futuros de campo con plantas inoculadas con EMMIM-1.

En el presente trabajo, también se compararon dos técnicas de propagación de papa (“extracción de brote” y “semilla de papa”); las plantas obtenidas fueron usadas en experimentos para evaluar los efectos de la inoculación de EMMIM-1 y la capacidad de las bacterias para adherirse y colonizar las plantas. En cuanto a las cuantificaciones se efectuaron en las suspensiones que serían utilizadas en cada uno de los experimentos, independientemente de la técnica empleada, estas no fueron relacionadas con la cantidad de fertilizante utilizado, ya que fueron las inoculaciones iniciales. Las bacterias evaluadas en el EMMIM-1 resultaron en mínimas variaciones en sus números, que iban de valores de 8, 7.5, 7.2, 7.1, 8, 7 Log UFC/ml para *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5^T respectivamente.

Los resultados obtenidos reflejaron que las cepas del inoculante presentaron buena capacidad de adhesión para ambas técnicas pero con mejores números por técnica de “extracción de brote”. Las bacterias con mejor adhesión mostrada fueron *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *Azospirillum brasilense* Sp7.

Para el comportamiento de las bacterias a lo largo del tiempo medido por el indicador colonización demostró que las cepas del EMMIM-1 permanecen en el cultivo hasta los 110 días cuando los indicadores agronómicos son evaluados por ambas técnicas. Las medias obtenidas fueron, a los 20 días de 7.5, 7.2, 6.5, 6.2, 7.6 y 6.2 por “extracción de brote” y 6.9, 6.1, 5.1, 4.4, 7 y 5.5 Log UFC/ml para “semilla de papa” en *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5^T respectivamente. En la colonización de día 50, las medias obtenidas fueron de 7.2, 6.5, 6, 5.6, 7.4 y 5.7 para “extracción de brote” contra 6.6, 5.9, 4.6, 4.3, 6.6 y 5 de la “semilla de papa” Log UFC/ml en *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5^T respectivamente. Finalmente en el día 90 se obtuvieron medias de 6.3, 6, 5.5, 5, 6.8 y 5 en “extracción de brote” y 5.6, 4.9, 3.9, 3.6, 6 y 4.4 en “semilla de papa”, Log UFC/ml en *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5^T respectivamente.

P. putida KT2440 tiene la capacidad de colonizar la rizósfera de diversas plantas (Benavides *et al.*, 2006) y en el presente trabajo también fue capaz de colonizar a la rizósfera, independientemente de la forma de propagación de papa utilizada. En este trabajo también se observó que *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* Sp7 resultaron excelentes colonizadores de la papa.

B. unamae MTI-641 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 descendieron en sus números en ambas técnicas, mientras que *G. diazotrophicus* PAI 5^T mostró variabilidad en su comportamiento, posiblemente porque este es un microorganismo endófito natural de la caña de azúcar (Martínez, 2005, Muñoz-Rojas *et al.*, 2003; Rojas, 2007) y no se adapta bien a las condiciones presentadas en la rizósfera de papa. Sin embargo a pesar de la disminución de la población de *G. diazotrophicus*, este microorganismo permaneció a lo largo del tiempo en el cultivo, posiblemente debido a que la papa es un alimento rico en almidones y azúcares.

En cuanto a las reinoculaciones aplicadas al día 20 en los brotes se puede deducir (“extracción de brote”), que permitieron que las bacterias permanecieran en mayores números a lo largo del tiempo, en comparación de las semillas que solo fueron inoculadas una solo vez. No se encontró relación entre la cantidad de fertilizante y el comportamiento de las cepas.

A los 110 días se realizó el experimento de medición de indicadores agronómicos y el análisis comparativo entre muestras inoculadas y controles. Las plantas fueron sometidas a diversas cantidades de fertilizante, un experimento que se realizó sin adición de fertilizante, no manifestó crecimiento descartando la existencia del proceso de FBN en el modelo explorado. La FBN se lleva a cabo en bacterias asociadas a plantas y en bacterias de vida libre pero solo se ha demostrado a nivel de laboratorio y los índices de fijación biológica de nitrógeno no son importantes en asociación con plantas no leguminosas (Morot-Gaudry, 2001). Las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Inoculante EMMIM-1), *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Fernandez-Aunión *et al.*, 2010; Mishra P.K *et al.*, 2011) forman nódulos en las raíces de plantas leguminosas como: soya, chícharo, cacahuate y alfalfa. El amonio generado por estas bacterias puede ser usado por las plantas hospederas como fuente de nitrógeno, dando a cambio la fuente de carbono requerida por las bacterias (Arora *et al.*, 2012). De esta manera la papa al no ser una leguminosa, posiblemente no se esté realizando este mecanismo. Sin embargo otras bacterias de vida libre también son capaces de fijar nitrógeno atmosférico a nivel de laboratorio y algunos ejemplos incluyen a *B. unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Caballero-Mellado *et al.*, 2007) y algunas bacterias pertenecientes a los géneros: *Beijerinckia* sp., *Bacillus* sp, *Azoarcus* sp., *Azotobacter* sp. (Guzmán A. *et al.*, 2012), pero asociadas a plantas no parecen otorgar aportes significativos de nitrógeno y los mecanismos principales de crecimiento son independientes a esta vía.

En las evaluaciones, se demostró que las plantas inoculadas manifestaron mejores resultados que las no inoculadas con diferencias significativas en la mayoría de sus indicadores. Las partes aéreas tuvieron medias de 89.2 cm-113.1 cm en plantas inoculadas, los controles

tuvieron rangos de 75.6-86.1 cm demostrando que las plantas con EMMIM-1 presentan un mayor crecimiento. Los pesos frescos estuvieron en rangos de 123.1-195 g, mientras que los controles tuvieron de 68.8-82 g. En cuanto a las longitudes de raíces fue notoria la significancia, demostrando que las muestras inoculadas pueden no solo alcanzar longitudes mayores a sus controles si no sistemas radiculares más desarrollados (Inoculadas 57.3- 71.8 cm vs Controles 33.7-47.4 cm). Esto también ha sido reportado para monoinoculaciones, por ejemplo *A. brasilense* (Incluida en el EMMIM-1), posee como mecanismo principal de promoción del crecimiento vegetal la producción de fitohormonas que estimulan el incremento del desarrollo de la raíz; lo que a su vez impacta en el aumento de la toma de agua y minerales (Fibach-Paldi *et al.*, 2012; Lugtemberg and Kamilova, 2009). *A. brasilense* actúa incrementando la longitud de raíces primarias, la cantidad de raíces secundarias e incrementa los pelos absorbentes (Bashan *et al.*, 2004). A pesar del incremento radicular observado en plantas de papa multi-inoculadas, el indicador del número de tubérculos obtenidos fue muy variable (Media de 3-4) y no se mostró ninguna diferencia significativa en la mayoría de los experimentos. En algunos casos el peso total obtenido y el peso individual presentó diferencias, principalmente cuando fue utilizado mayor cantidad de fertilizante. Los rendimientos de plantas con inoculante fue de 115.9- 231.07 g contra 93-108.2 g para las controles.

Comparando técnicas, la metodología por “semilla de papa” resultó ser más viable en cuanto a indicadores agronómicos se trata, las partes aéreas, pesos frescos y secos de plantas y raíz así como longitud de raíz y pesos obtenidos, fueron mejores.

Respectivo a los indicadores sin diferencia estadísticamente significativa (<0.05), la evidencia puede reflejar que las plantas necesitan condiciones más favorables, ventiladas no calurosas y cerradas en períodos de heladas, así como sistemas de macetas, más grandes para permitir el extendimiento de las raíces y el crecimiento de los tubérculos, puede sugerirse otros fertilizantes altos en B, S, Mg y Mn, los cuales promueven el crecimiento de los productos y su calidad. Cabe mencionar que en el cultivo de la papa la fertilización es uno de los rubros con más peso dentro de los costos totales de producción: cerca del 39% (Porrás, 2005); además, se ha hecho énfasis en el estudio de los elementos nitrógeno, fósforo y potasio, debido al evidente efecto que tienen sobre la producción y la respuesta positiva a la aplicación simultánea de estos (García y Pantoja, 1998); sin embargo, una fertilización con dichos elementos solo puede ser exitosa cuando todos los nutrientes requeridos por la planta están disponibles en cantidades suficientes en el suelo (Guerrero *et al.*, 2000).

De acuerdo con Guerrero (1998), el efecto de las épocas de aplicación y del fraccionamiento del fertilizante depende de varios factores, como la variedad, el ciclo de cultivo, la distribución de los estolones y las raíces y el régimen de precipitación. Así las respuestas de las diferentes variedades a las épocas de aplicación se deben principalmente a la diferencia de tiempo en la formación de los estolones y la duración del ciclo de cultivo (García y Pantoja, 1998). Otros trabajos de investigación describen que la variabilidad de esos nutrientes son esenciales para el

rendimiento de la papa. Se experimentó con papa criolla (*Solanum phureja*) y se determinó que el aporte de boro presentó diferencias significativas con el nivel de 1,5 kg·ha⁻¹, elemento que favoreció el rendimiento de tubérculos de categoría segunda, corroborando lo planteado por Bernal y Gómez (2004) quienes evaluaron la respuesta de la papa criolla a diferentes dosis de microelementos (Cu, Mo, Fe, Zn, Mn, B) y encontraron efecto significativo en los tratamientos de boro (0,8-1,6 kg·ha⁻¹) y cinc (5-15 kg·ha⁻¹) para las variables rendimiento total y calidad por tamaños, aunque no reportan efectos en los contenidos de materia seca, proteína y densidad. Las respuestas positivas a la aplicación de Boro se pueden explicar a partir de sus funciones, ya que el boro participa en el crecimiento y división celular, en el metabolismo de carbohidratos y proteínas y en papa se está produciendo básicamente almidón y carbohidratos constituyentes de los tubérculos. El boro, como micronutriente más importante para obtener altos rendimientos en los cultivos, en papa puede estar relacionado en parte con la participación de ese elemento en la síntesis de citoquininas las cuales son necesarias en el proceso de tuberización; es así como los tratamientos a los cuales se les suministró boro se caracterizaron por presentar un rendimiento mayor que los que no lo contenían. Esta respuesta concuerda con lo encontrado por Barrera (2000), Bernal y Gómez (2004) y Aguirre y Preciado (2005) (Pérez., *et al* 2008).

Las condiciones del invernadero fueron adversas para las plantas de los tratamientos por los factores a los que eran sometidas, como temperatura y presencia de plagas, sin embargo las plantas inoculadas lograron manifestar una mejor resistencia a hongos en períodos fríos, y a plagas en períodos de calor, posiblemente puede deberse a la actividad fungicida reportada en *Sphingomonas* sp. OF178, bacteria gram negativa de la clase proteobacterias alfa que también se ha utilizado para la bioremediación en maíz (Madueño, 2009).

Posteriormente en este trabajo se realizó la determinación de clorofila, la cual no presentó diferencias estadísticamente significativas en ningún tratamiento y tampoco entre grupos analizado (inoculada y control). Esto demostró que todas las muestras se encontraban en un estado de nutrición adecuado, con aporte suficiente de N₂. La clorofila absorbe la luz del sol y usa esa energía para sintetizar carbohidratos del CO₂ y el agua. Este proceso se conoce como fotosíntesis y es la base para el proceso vital de las plantas. El nitrógeno es un elemento clave en la molécula de la clorofila para mejorar la fotosíntesis. Así pues, la clorofila puede usarse como índice para medir el contenido en nitrógeno de una planta. La medición de la clorofila y del nitrógeno (evaluación sugerida) ayudan de varias maneras, tales como conocer el nivel de nitrógeno presente en la planta como un indicador de la salud de la planta y su capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis, y por ende, la producción vegetal. De esta manera puede decirse que el contenido de clorofila en la hoja está estrecha y positivamente relacionado a la concentración de nutrientes en la hoja y, por lo tanto, refleja la condición nitrogenada (mayoritariamente) del cultivo (Wolfe *et al.*, 1988).

En el [anexo 2](#), se describen las curvas de crecimiento de cada uno de los miembros del EMMIM-1, se puede comentar que las bacterias que conforman el EMMIM-1 llegan a fase estacionaria y es ahí donde se toman las células que conforman el inoculante multiespecies.

En esta tesis, los parámetros evaluados mostraron que sí hay relación con la cantidad del fertilizante empleado, ya que las plantas inoculadas y no inoculadas manifestaron mejores resultados a mayor cantidad de fertilizante, sin embargo las muestras tratadas con EMMIM-1 mostraron mejores rendimientos y parámetros más significativos respecto a sus controles. Con esto se puede decir que la opción de aplicación de un multinoculante, no solo mejora los indicadores y rendimiento de los cultivos si no que aportan otros beneficios a las plantas con reducción de costos en la producción, y en este la planta de papa no es una excepción de efectos benéficos por parte de las rizobacterias promotoras del crecimiento.

CONCLUSIONES

- Las plantas de papa tratadas con EMMIM-1 manifestaron un mejor proceso de adaptación en condiciones de laboratorio (“extracción de brote”) e invernadero (“extracción de brote” y “semilla de papa”), con porcentajes de supervivencia de 40% y 60% en comparación de las controles con menor cantidad de plantas vivas al final del experimento.
- La técnica de “semilla de papa” manifestó mejores resultados en el número de plantas vivas muestreadas en cada tratamiento.
- Las UFC/ml de las suspensiones bacterianas utilizadas en todos los experimentos, permanecieron en números suficientes y estables (Mayor de 10^6 UFC/ml).
- Las bacterias del inoculante multiespecies exhibieron buena capacidad para adherirse y colonizar los brotes y semillas de papa encontrándose en números mayores de 10^5 UFC/ml en el caso de la adhesión, y 10^7 - 10^5 UFC/ml en caso de la colonización. Todas las bacterias permanecieron a lo largo del tiempo dentro del cultivo (110 días).
- *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178 mostraron mejor capacidad de adhesión y números más estables en la colonización (10^5 - 10^6 UFC/ml). Mientras que *Bradyrhizobium* sp. MS22, *G. diazotrophicus* PAI 5^T y *B. unamae* MTI-641, presentaron diversos comportamientos a lo largo del tiempo. MS22 y PAI 5^T quedaron en números de 10^4 - 10^3 UFC/ml en algunos tratamientos.
- En cuanto a la comparación de técnicas, las bacterias del inoculante permanecieron en números más elevados por la metodología de “extracción de brote”, esto pudo deberse a que fué aplicada una segunda reinoculación al día 20 en las plántulas, mientras que en la semilla, solo se utilizó una sola inoculación. La cantidad de fertilizante probablemente no tenga efecto en el comportamiento de las cepas.
- Los indicadores agronómicos resultaron ser mejores en plantas inoculadas. La cantidad de fertilizante y la presencia de las cepas dentro del cultivo, efectivamente influye en los datos obtenidos. El número de tubérculos no resultó con diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos.
- La técnica de “semilla de papa” resultó, con mayor peso en los tubérculos obtenidos e indicadores más significativos a comparación de la técnica de “extracción de brote”.
- La clorofila evaluada en todos los tratamientos en ambos grupos no resultó con diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los casos.
- Las curvas de crecimiento exhibieron que las cepas del EMMIM-1 entran a fase estacionario a sus tiempos correspondientes (24-48h) y permanecen en números suficientes para la preparación de las suspensiones bacterianas.

PERSPECTIVAS

- Explorar el efecto de otros Fertilizantes Químicos con variabilidad de micronutrientes, como Zn, Fe, Mg, Mn, B, Ca, S.

- Evaluar el Indicador de N2 Total por método de micro-Kjeldahl automatizado.

- Evaluación del contenido nutrimental (almidón, micronutrientes) del producto obtenido.

- Determinación de absorbancia de clorofila por metodología más objetiva, en muestras de hoja de papa. Posiblemente una metodología automatizada.

- Incluir en indicadores agronómicos, diámetro del tubérculo y materia seca para mayor objetividad del rendimiento obtenido.

- Corroboración de las especies bacterianas que colonizan la rizósfera de las plantas de papa inoculadas, empleando un análisis molecular tipo ARDRA.

BIBLIOGRAFÍA

*Ardanov, P., Sessitsch, A., Hauggman, H., Kozyrovska, N., and Pirttila, A.M. (2012). Methylobacterium-Induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. PLoS ONE 7(10): e46802. doi:10.1371/journal.pone.0046802.

*Ávila, C.A., Shamah, L.A., and Chavez, A.V. (1997). Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural, resultados por entidad. Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

*Alagawadi, A.R., and Gaur, A.C. (1992). Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. Trop. Agric. 69:347-350.

*Andreeva, I., Redkina, T., and Izmailov, S. (1993). The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of Rhizobium-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. Russian J.PI Phys. 40: 901-906.

*Adriano Anaya M. L., Jarquín Gálvez R., Hernández Ramos C. Salvador Figueroa, Monreal Vargas C. T. (2011). Biofertilizer of organic coffee in stage of seedlings in Chiapas, Mexico. Mex. Cienc. Agrícolas. 2 (3): 417 – 431.

*Atieno M., Herrmann L., Okalebo R. (2012). Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. World J Microbial Biotechnology. 28: 2541-2550.

*Amarger, N. (2002). Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie 84:1061-1072.

*Arning, I., and Lizárraga, Y.A. (1999). Manejo Ecológico de Plagas. Una propuesta para la agricultura sostenible. Editorial. Travaglini. Lima, Perú. pp. 12-15

*Atlas, R.M and Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. En Capella I (Ed.). Pearson educación. S. A. Madrid. ISBN. 978-84-7829-039-0. pp. 3:59-62,64-82, 4: 97-101; 106-109; 118-131, 16: 621,622, 626, 628,629.

*Agrios, G. N. (1978). Plant Pathology Academic Press, New York.

*Alexander, M. (1985). Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. *Advances in Microbial Ecology* 8:163-183.

*Alvarez, M. A. B., S. Gagné, and H. Antoun. (1995). Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacter. *Applied and Environmental Microbiology* 61:194-199.

*Alonso, A. F. (2002). *El Cultivo de la patata. Segunda edición*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España, p. 495.

*Aguirre, A. e I. Preciado. (2005). Evaluación del efecto de la aplicación foliar de B, Ca y Zn sobre el rendimiento de tubérculos en la variedad de papa Roja Nariño (*Solanum tuberosum* L.). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

*Allen, E.J. (1978). The potato. The scientific basis for improvement. Harris and Hall, Londres. pp. 71-189.

*Bradshaw, A.D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *ADV. Genet* 13, 115-155.

*Barrera, L. (2000). El boro: importante en el cultivo de papa en suelos de Cundinamarca y Boyacá. pp. 90-95. En: *Papas Colombianas con el mejor entorno ambiental*. Fedepapa, Bogotá.

*Bernal, H. y P. Gómez. (2004). Comportamiento de la papa criolla (*Solanum phureja*) a la aplicación de elementos menores Fe, Cu, Mn, Zn, B en suelos de la serie Bermeo. Trabajo de grado. Carrera de Ingeniería Agronómica, Universidad de Ciencias Aplicadas Ambientales (UDCA), Bogotá. Censo Nacional de la Papa. 2003. Revista Papa.

*Bourges, H. (2000). Modernización de la dieta mexicana, en III Foro sobre seguridad y soberanía alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias 3. pp. 34-37.

*Bourges, R.H. (1999). Notas sobre alimentación, nutrición y salud, cocina, nutrición y salud, pp. 19-34.

*Bourges, R.H. (2000). La alimentación de los mexicanos. El Colegio Nacional. México, pp. 97-134.

*Beadle, C.F. (1988). Análisis del crecimiento vegetal. Técnicas en fotosíntesis y bioproductividad. Colegio de postgraduados. Chapingo, Edo. De México, México.

*Beukema, H.P., Zaag, D.E., and Van der, L. (1990). Potato improvement. Some factors and fact. International Agricultural Centre, Wageningen, Netherlands. pp. 224.

*Bonilla, J.J., Rangel, A.A., and Villa real, M. (1990). Situación actual y perspectivas comerciales e industriales de cultivo de la papa en México. Artículo, desarrollo de productos de raíces y tubérculos, Vol.II-América Latina. Perú. pp. 45-52.

*Bejarano, F. (2002) La Espiral del Veneno. RAPAM, Texcoco, Estado de México. pp. 123.

*Brandjes, P., Van Dongen, P., Van der Veer, A. (1990). Green manuring and other forms of soil improvement in the tropics. AGRODOK 28, CTA, Wageningen, Netherlands.

*Brechtel, A., and Fernández, C.L. (1995). El Nim: un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Fundación de la Agricultura y Medio Ambiente. Santo Domingo, Rep. Dominicana. Pp.15, 19.

*Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotech Advances. 16:729-770.

*Bashan Y., Hernández, J.P., Leyva, A. L., Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Biol Fertil Soils. 35:359–368.

*Belimov, A. A., Kojemiakov, A.P., and Chuvarliyeva, C. V. (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant Soil. 173:29-37.

*Broadbent, J. R., McMahon, D. L., Welker, C. J., and Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. J Dairy Sci; 86: 407-23.

*Baker, K. F., and W. C. Snyder (eds.). (1965). *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens: Prelude to the Biological Control*. University of California Press, Berkeley.

*Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 4:343-350.

*Borrego, F., Fernández, J.M., López, A., Parga, V.M., Murillo, M., and Carvajal, A. (2000). *Agronomía Mesoamericana. Análisis de crecimiento en siete variedades de papa (Solanum tuberosum L.)*. 11(1): 145-149.

*Burba, N. (2008). *La papa: un alimento básico*. RAP-AL. Uruguay.

*Bacilio M., Hernández H.P., Bashan Y. (2006). Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soil*. 43:112-119. 64.

*Bashan Y., Ream Y., Levanony H., Sade H. (1989). Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*. 67 : (5) 1317-1324. ABSTRACT.

*Bashan Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Adv*. 16(4):729-770.

*Bashan Y., Holguin G. (1998). Proposal for the division of plant growth- promoting rhizobacteria into two classifications. *Biocontrol-PGPB (Plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem*. 30(819):1225-1228.

*Bashan Y. Holguin G. (2001). Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees*.16: 159-166.

*Bashan Y., Holguin G., Bashan L. (2004). *Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003)*. *Can. J. Microbiol* 2004; (50): 521-577.

*Bashan Y., Bashan L. (2010). *How the Plant Growth-Promoting Bacterium Azospirillum Promotes Plant Growth—A Critical Assessment* *Advances in Agronomy*, Elsevier Inc. ISSN 0065-2113; (108).

*Blöemberg Guido V. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Biotic interactions*.

* Bhattacharyya, P.M. and Jha, D.K.N (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 28:1327-1350.

*Bergersen, F. J. (1978). Physiology of legume symbiosis. En Y. R. Dommergues y S. V. Krupa (eds.). *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants*. Elsevier, Amsterdam, pp. 304-334.

*Brill, W. J. (1975). Regulation and genetics of Bacterial nitrogen fixation. *Annual Review of Microbiology* 29:109-129.

*Campbell, R. (1985). *Plant Microbiology*. Edward Arnold, London.

*Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G. and Estrada-de los Santos P. (2004) *Burkholderia unamae* sp. Nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1165–1172.

*Caballero-Mellado J., legislación y normativa sobre la comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en México (2005). CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma DE Biotecnología, Red III. D. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura-BIOFAG.

*Caballero-Mellado J., Tenorio Salgado S., Onofre Lemus J., Castro González R., Estrada de los Santos P., Paredes ValdezG., Peña-Cabriales J J, Díaz-Méndez R., and Martínez-Aguilar L. (2007). Mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas expresados por nuevas especies de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno. *Rev. Latinoamericana Microbiology*; 48 (2): 154-161.

*CONPAPA. (1991). Posición de la conferencia Nacional de productores de papa frente a la participación de México en la zona de libre comercio de Norteamérica. Documento CONPAPA. México, D.F.

*CONPAPA. (1997). Sustitución actual de la producción de papa en la República Mexicana. Documento CONPAPA. México, D.F.

*Cortbaoui, R. (1990). Siembra de papa. Centro Internacional de la papa. 2ª ed. Revisada. Lima pp. 17 (Información Técnica 11).

*Castro- Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., and Jurkevitch, E. (2007). Effects of inoculation with plant growth- promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 276:1-11.

*Catroux, G., Hartmann, A., and Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*. 230:21-30.

*Champness, W. (2000). In Brun Y. V., and L. J. Skimkets (Eds.). *Prokaryotic development*. American Society for Microbiology, Washington DC. 11-31.

*Czárán, T. L., Hoekstra, R.F., and Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:786-790.

*De Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R., and Lugtenberg, B.J. (2002) Flagelladriven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 15:1173-1180.

*Dillworth, M. J., and A. R. Glenn (eds.). (1991). *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier, Amsterdam.

*Dommergues, Y. R., and S. V. Krupa. (1978). *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants*. Elsevier, Amsterdam.

*Dalton, H., and L. E. Mortenson. (1972). Dinitrogen (N₂) fixation (with a biochemical emphasis). *Bacteriological Reviews* 36:231-260.

*Duncan, J.M. (1999). *Phytophthora* – an abiding threat to our crops. *Microbiol Today* 26, 114-116.

*Duncan, W.D. (1958). The relationship between corn population and yield. *Agronomy Journal* 50(2), 82 –84.

*Ernesto Sifuentes Ibarra, Jaime Macías Cervantes, Miguel Ángel Apodaca Sánchez, Edgardo Cortez Mondaca. (2009). Predicción de la fenología de papa Principios y aplicaciones prácticas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Fundación Produce Sinaloa A.C.

*Evans H., G. Stacey, and R. H. Burris. (1991). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, New York.

*Esau, K. (1968). *Viruses in plant hosts: Form, distribution, and pathogenic effects*. University of Wisconsin Press, Madison, WI.

*Estrada, C.N. (2008). Control Biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquía. Colombia. pp. 20-27, pp. 109-131.

*Elshanshoury, A. R. (1995). Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*. in relation to their effect on wheat development. J. Agron. Crop. Sci. 175:119-127.

*Fitter, A. H. (1985). *Ecological Interactions in the soil environment: Plants, microbes and animals*. Blackwell, Oxford, England.

*Friend, J., and D. R. Threlfall. (1976). *Biochemical aspects of plant parasite relationships*. Academic Press, London.

*Fabri, P., and Del Gallo, M. (1995). *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 257-267.

*Frommel, M. I., Pazos, G.S., and Nowak, J. (1991). Plant-growth stimulation and biocontrol of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratina plymuthica* and *Pseudomonas* sp. Fitopatologica. 26:66-73.

*Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado, J. (2005). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Z.A. Siddiqui (Ed). Springer Science. Dordrecht, the Netherlands. 143-172.

*Fakorede, M.A.B., MOCK, J.J. (1980). Growth analysis of maize variety hybrids from two recurrent selection programmes.

*Fuente M.E. Bashan Y. (1993). Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the Giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis; 15:49-60.

*Fernandez-Aunión, C., Hamouda, T.B., Iglesiad-Guerra, F., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J.J., Aouani, M.E. and Vargas, C., (2010) Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. BMC Microbiology. 10:192.

*Flores, G.F.X. (1995). Aspectos de producción y comercialización de semilla de papa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

*FAO. www.potato2008.org.

*<http://www.foxitsoftware.com>. Registro CICOPAFEST: RSCO-137/XII/01.

*Gómez, C.C.K. (1995). La negociación del subsector papa en el tratado de libre comercio. Tesis fundación Universidad de las Américas Puebla. México.

*Garret, S. D. (1970). *Pathogenic root- infecting fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

*García-Olivares J.G., Moreno-Medina V. R., Rodríguez-Luna I. C., Mendoza Herrera A., Mayek-Pérez N. (2006). Azospirillum brasilense Biofertilization in Sorghum at Northern Mexico. *Agric. Téc. Mexico*; 32(2): 135-141.

*Groppa M. D., Zawoznik M. S., Tomaro M. L. (1998). Effect of co-inoculation with Bradyrhizobium japonicum and Azospirillum brasilense on soybean plants. *European Journal of Soil Biology*. 34(2): 75-80 ABSTRACT.

*García, B. y C. Pantoja. (1998). Fertilización del cultivo de la papa en el departamento de Nariño. pp. 8-26. En: Guerrero, R. (ed.). Fertilización de cultivos de clima frío. Segunda edición. Monómeros Colombo-Venezolanos, Bogotá.p. 370.

*Guerrero, R. (1998). Fertilización de cultivos de clima frío. Segunda edición. Monómeros Colombo-Venezolanos, Bogotá. p. 370.

*Guzmán U, Arias S, Dávila P. (2012). Catálogo de cactáceas mexicanas. México: UNAM-Conabio.

*Herigstad, B., Hamilton and J. Heersink. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods*; 44:121-129.

*Hoben H. J., and Somasegaran P. (1982). Comparison of the Pour, Spread and Drop Plate Methods for enumeration of Rhizobium spp. In inoculants made from prestirilized Peatt. *Appl. Environ. Microbiology*; 44: 1246-1247.

*Harris, E., and K. Maramorosch. (1981). *Pathogens, vectors, and plant diseases*. Academic Press, New York.

*Holguin G., Vazquez P., Bashan Y. (2001). The role sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Fertil Soils*; 33: 265-278.

*Hungria, M., Loureiro, M., Méndez, I., Campo, R., and Graham, P. (2005). Inoculant Preparation, Production and Application. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. 4: 223-253.

*Hay, R. y A. Walker. (1989). An introduction to the physiology of crop yield. Chapingo, México.

*Kooman, P.L., Haverkort, A.J.(1994). Modeling development and growth of the potato crop influenced by temperature and daylength: LINTUL-POTATO. En: A.J. Haverkort y D.K.L. MacKerron (Eds.) Potato Ecology and modeling of crops under conditions limiting growth, Kluwer Academic Publishers. p. 379.

*Khedher, B.M., Ewing, E. (1985). Growth analysis of eleven potato cultivars grown in the greenhouse under long photoperiods with and without heat stress. American Potato Journal. Vol. 62:537-554.

*Kloepper, J. W. (1991). Host specificity in microbe-microbe Interactions. *BioScience* 46:406-409.

*López, D.S. (1994). Situación actual y perspectivas de la producción de papa ante la apertura comercial. Tesis. C.E. Colegio de posgraduados. Montecillos, México.

*Lorenzo, P.E. (1992). Caracterización del comercio al mayoreo de papa en la central de abastos del Distrito Federal. Tesis. C.E. Colegio de posgraduados. Montecillos, México.

*Lucy, M., Reed, E., and Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86:1–25.

*Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiology*. 63:541-556.

*Lugtenberg B., Dekkers L.C. (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*; 1(1): 9–13.

*Lynch, J. M. (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5:67-107.

*Liliana C. Pérez, Luis E. Rodríguez y Manuel I. Gómez (2008). Efecto del fraccionamiento de la fertilización con N, P, K y Mg y la aplicación de los micronutrientes B, Mn y Zn en el rendimiento y calidad de papa criolla (*Solanum phureja*) variedad Criolla Colombia. *Agronomía Colombiana* 26(3), 477-486.

*Llenderal, C. C. y R. Nieto. (2000). "Manejo de la palomilla de la papa (*Phthorimaea operculella*)", en *Temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas*. Instituto de fitosanidad-CP. ISBN 968-839-289-8, Montecillo, Estado de México, pp. 41-46.

*Murashige C, T. y F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

*Maiti, I. B., and P. E. Kolattukudy. (1979). Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* 205:507-508.

*M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker. Brock. *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Pearson – Prentice Hall, Madrid (España), (2004). pp. 6:142; 144,145.

* Mishra, P.K., Bisht, S.C., Ruwari, P., Joshi, G. K., Singh, G., Bisht, J.K. and Bhatt, J.C. (2011) Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. And *Rhizobium leguminosarum* – PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.) *European Journal of Soil Biology*. 47(1):35-43.

*Morales-García Y. E., Aguilera-Méndez, A., Huerta-Gómez A. del C., Fuentes-Ramírez L.E. and Muñoz-Rojas J (2009). Evaluación del antagonismo entre bacterias de interés agrícola y formulación de un inoculante multiespecies. Memoria VI encuentro —Participación de la mujer en la Ciencia *In extenso*. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-0-3. León Guanajuato, México.

a) Morales-García Y. E. Duque E., Rodríguez-Andrade O., De la Torre J., Martínez-Contreras R. D., Pérez-y-Terrón R., Muñoz-Rojas J (2010). Bacterias 73 preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Biotecnología*; 14 (2): 11-29.

b) Morales García Y. E., Pazos Rojas L.A., Bustillos Cristales M.R., Krell T. Muñoz Rojas J (2010). Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. *Elementos* 80. 35-38.

*Morales-García Y. E, Juárez-Hernández D., Aragón-Hernández C., Mascarua-Esparza M. A., Bustillos-Cristales M. R., Fuentes Ramírez L.E. Martínez-Contreras R. D., Muñoz Rojas J

(2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp., as a model for alternative agriculture. *Rev. Arg. Microb* 43: 287-293.

*Muñoz-Rojas J., Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005; (54): 57-66.

*Morot-Gaudry, J.F. Nitrogen assimilation by plants. Physiological, biochemical and molecular aspects. Science Publisher Inc. Plymouth, RU, 2001.

*Muñoz-Aguilar, J. M., Sabih, A.M., Richards, A.J.M., Loake, G.J., Watson, M.D., and Shaw, C.H. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J. Gen. Microbiology*. 134:2741-2746.

*Muñoz-Rojas J. and Caballero-Mellado J. (2004) Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microbial Ecology*. 46 pp 454-464.

*Muñoz-Rojas J., Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J. (2003) Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiology Ecology* 54. 57–66.

*Morales-García, Y. E., Aguilera-Méndez, N., Huerta-Gómez, A. del C., Fuentes-Ramírez, L. E., y Muñoz-Rojas, J. (2009) Evaluación del antagonismo entre bacterias de interés agrícola y formulación de un inoculante multiespecies. Memoria VI encuentro “Participación de la mujer en la Ciencia”. *In extenso*. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-0-3. León, Guanajuato, México.

*Martínez-Fleutes C., Ortíz-Lombardía M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor E.J., Arriera J.G., Hernández L., and Davies G. J. (2005). Cristal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J*. August 15; 390(Pt 1): 19–27.

*Mataix, V.J. (2009) Tratado de nutrición y alimentación. Los alimentos y el Índice glucémico. 2ª Edición. Edit. Océano. Ergón. 2010. México. D.F. Vol. I. pp. 497-516. Vol.II. pp. 1573.

*Molina-Romero D., Bustillos-Cristales M.R., Rodríguez-Andrade O., Morales-García Y.E., Santiago-Saenz Y.O., Castañeda-Lucio M., Fuentes-Ramírez L.E y Muñoz-Rojas J. (2014). Mecanismos moleculares usados por las bacterias rizosféricas para estimular el crecimiento

vegetal y mantener la salud de las plantas. Revista de biotecnología y bioingeniería. Documento no publicado.

*Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Masson, C. (2001). Nodulations of legumes by members of the β - subclass of Proteobacteria. *International weekly journal of Science, Nature*, 411, 948-950

*NOM-077-FITO-2000 Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1era sección. Diario Oficial, 2000.

*ONU-CEPAL., INEGI. (1993). Magnitud y evolución de la pobreza en México 1984-1992. Informe metodológico. pp. 104-109.

*Okon, Y., and Labandera-Gonzales, C. A. (1994) Agronomic Applications of Azospirillum: and evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*. 26:1591-1601.

*Oliveira, A. L. M., Stoffels, M., Schimid, M., Reis, V.M., Baldani, J.I., and Hartmann, A. (2008) Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations whit diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology*. 45(1):106-113.

*Oluranti, O. B. (2010). Benefical bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559-1570.

*Ortíz, C.R., Contreras, C.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plan Signal & Behavior*. 4(8): 701-712.

*Paul, D. G., Pandey, J., and Jain, R. K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS Biotechnol*. 23:135-42.

*Palacios, R., J. Mora, and W. E Newton (eds.). (1993). *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic, Dordrecht, Germany.

*Peters, J. W., K. Fisher, and D. R. Dean. (1995). Nitrogenase structure: A biochemical-genetic perspective. *Annual Review of Microbiology* 49:335-366.

*Plumb, R. T., and J. M. Thresh. (1993). *Plant virus epidemiology*. Blackwell, Oxford, England.

- *Postgate, J. (1992). *Nitrogen fixation*. Cambridge University Press, New York.
- *Porras, P. (2005). Problemática general del sistema productivo de papa con énfasis en fisiología y manejo de suelos. En: Fisiología y nutrición vegetal en el cultivo de la papa. Cevipapa, Bogotá. p. 99.
- *Rocha, R. R., K. F. Brierly, R. Bujanos y M. Villarreal. (1990). *Manejo integrado de la palomilla de la papa Phthorimaea operculella (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Bajío, México*. SARH-INIFAP-CIFAGCEB, Celaya, Guanajuato, p. 52.
- *Raina M. Maier; Ian L. Pepper; Charles P. Gerba. Environmental Microbiology. Academic Press. (2000). Department of soil and Water Science. University of Arizona. Tucson, Arizona. pp. 3:43-45; 48, 49.
- *Ramos, J. L., González-Pérez, M.M., Caballero, A., and Van Dillewijn, P. (2005). Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. Current Opinion Biotech. 16:275-281.
- *Rojas M. M., González O., Rojas N. y Heydrich M. (2007). Interacciones entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* y la comunidad bacteriana endófito de la caña de azúcar. Cultivos Tropicales; 28 (3): 11-16.
- *Ramos-Castillo G. (2010). Actividad antimicrobiana producida por bacterias reguladoras de poblaciones de hongos. Grado de Bióloga. Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología. 21p.
- *Robinson, R. A. (1976). *Plant pathosystems*. Springer-Verlag, Berlin.
- *Santiago, M.J., y Rovalcaba, J.L. (1995). Competitividad de los productores de papa de los llanos de Puebla en una economía abierta. Agroeconomía de la papa en México, ORSTOM, México, 1995. pp. 179-190.
- *SAGAR. (1998). Consumos aparentes de productos agrícolas 1925-2000. Centro de Estadística Agropecuaria. México, D.F. pp. 123-124.
- *SAGAR-INIFAP. (1997). Programa Nacional de investigación en el cultivo de la papa. Publicación especial No13. Comp.O. Rubio, C. Y F.X. Flores, G. México. pp.61.

*Somasegaran, P., and H. J. Hoben. (1994). *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag, New York.

*Sprent, J. I., and P. Sprent. (1990). *Nitrogen fixing organisms pure and applied aspects*. Chapman and Hall, London.

*Stacey, G., R. H. Burris, and H. J. Evans (eds.). (1992). *Nitrogen fixation*. Chapman and Hall, London.

*Sheffer, R. P., and R. S. Livingston. (1984). Host-selective toxins and their role in plant disease. *Science* 223:17-21.

*Stevens, R. B. (1974). *Plant disease*. The Ronald Press Co., New York.

*Spooner, D.M. y W.L.A. Hettterscheid. (2005). Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. pp. 285-307. En: Motley, T.J., N. Zerega y H. Cross (eds.). *Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops*. Columbia University Press, New York, NY.

*Strand, L. L. y P. A. Rude. (2006). *Integrated pest management for potatoes in the western United State. Segunda edición*. University of California, Oakland, California, p.167.

*Struik, P.C., Ewing, E.E. (1994). Crop physiology of potato (*Solanum tuberosum*): responses to photoperiod and temperature relevant to crop modeling. En: A.J. Haverkort y D.K.L. MacKerron (Eds.) *Potato Ecology and modeling of crops under conditions limiting growth*, Kluwer Academic Publishers. p. 379.

*Tamizh, V.R., Thangaraju, M. (2007). Development and standardization of cyst Based liquid formulation of *Azospirillum* Bioinoculant. *Acta Microbiologica et Inmunologica Hungarica*, 54 (2): 167–177.

*Tilak, K., Annapurna, K. (2001). Role of *Azospirillum* in the improvement of crop production and plant nutrition. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* B59 Nos. 3 and 4 pp. 315-324.

*Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodriguez, C.B., Cervantes, E., Chamber, M., Igual, J.M. (2006). Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium cicero* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant and Soil* 287:43–50.

*Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255:571-586.

*Villamil, B. E. (2005). Metodología do controle de qualidade de dos produtos inoculantes no Brasil. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma DE Biotecnología, Red III. D. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura-BIOFAG.

*Wiersema, S. (1990). Efecto de la densidad de los tallos en la producción de papa. Información técnica 1. Centro internacional de la papa, Lima, Perú. pp. 16.

*Wiersema, S. (1985). Desarrollo fisiológico de tubérculos-semillas de papa. Información técnica 20. Centro internacional de la papa, Lima, Perú. pp. 16.

*Wheeler, H. (1975). *Plant pathogenesis*. Springer-Verlag, New York.

ANEXOS

En esta tesis se elaboraron curvas de crecimiento por cada cepa que conforma el EMMIM-1. Se aborda la metodología utilizada, así como los resultados obtenidos, observando compartimientos individuales, de manera conjunta, y estableciendo un panorama de sus tasas de generación.

Anexo 1.

En este anexo se detalla la metodología utilizada para la obtención de las curvas de crecimiento, y tasas de generación.

Se llevaron a cabo las curvas de crecimiento para cada una de las cepas que conforman el inoculante multiespecies EMMIM-1. Para ello se inoculó el volumen inicial necesario de una suspensión bacteriana en fase estacionaria en 50 ml de medio de cultivo líquido de selección nuevo, con una densidad óptica inicial (d.o.) de 0.05, en el inicio de la curva. Las células fueron crecidas a 30 °C y agitación constante de 200 rpm durante el tiempo explorado (24 a 48 h). El volumen inicial (Vo) que se transfirió al medio de cultivo fresco en matraces de 50 ml, se calculó como se muestra a continuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Se realizaron tres curvas independientes para cada cepa. A distintos tiempos experimentales (cada 2h para bacterias de 24 h y cada 3 h para bacterias de 48 h) se tomaron 3 muestras, a cada una de las cepas se midió absorbancia (620nm), y se cuantificó el número de UFC/ml, por método de goteo en placa (Herigstad *et al.*, 2001; Hoben and Somesegaran, 1982). Estos datos permitieron construir las curvas respectivas. Al término de cada curva de crecimiento se procedió a la identificación de fase exponencial, a la que se le realizó una regresión lineal y se cálculo del número de generaciones para cada cepa (Maier *et al.*, 2000). Los datos conseguidos fueron analizados por el programa Sigma Plot, Versión 12.0 de Systat Inc. Software. El cálculo se describe a continuación:

Formula algoritmo de división

$$2^n$$

TASA DE CRECIMIENTO

Constante de multiplicación celular en bacterias

↑ Turbidez = fase estacionaria (establecimiento)

↑ Crecimiento poblacional a través del tiempo

ANTES DE LA TASA: PREDICCIÓN DE NÚMERO DE CELULAS

Estacionaria = # de crecimiento = # de muertes

PREDICCIÓN DEL NÚMERO DE CELULAS

CELULAS FINAL (X) = $2^n \times x_0$

Dónde:

n = número de generaciones

$$n = \frac{\text{Tiempo de crecimiento}}{\text{Tiempo de generación}}$$

$$\text{Tiempo de generación} = \frac{\text{Tiempo de crecimiento}}{n}$$

TIEMPO DE GENERACIÓN

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Dónde:

dx = Diferencia del crecimiento total

dt = Diferencia del tiempo de crecimiento

μx = Tasa de crecimiento específico

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

$$dx = \mu x dt$$

$$\int \frac{dx}{x} = \int \mu dt$$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu t$$

Donde:

$\ln X$ = logaritmo crecimiento inicial

$\ln X_0$ = logaritmo crecimiento final

Si se considera que durante una duplicación

$$X = 2X_0$$

$$\frac{2X_0}{X_0} = e^{\mu t}$$

Para saber división en el tiempo

Dónde:

μ = Tasa de crecimiento específico

t = tiempo de generación

$$t = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Tiempo que la bacteria requiere para cada generación

Anexo 2

En este anexo se presentan los resultados obtenidos (curvas de crecimiento) de manera individual, en conjunto, sus respectivos análisis informáticos y número de generaciones por cada cepa del EMMIM-1.

Para este experimento se crecieron los microorganismos que conforman el EMMIM-1 en sus respectivos medios de selección en forma líquida (Tabla 7). Cada microorganismo fue monitoreado de forma individual, y medido a diversos tiempos, cada (2h) para cepas con crecimiento de 24h (*Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *Burkholderia unamae* MTI-641), y cada 3h para cepas con crecimiento de 48h (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T y *Azospirillum brasilense* Sp.7). Se realizó curva de turbidez con medición de absorbancias y se confirmó con curva de crecimiento mediante UFC/ml. Todas las muestras se tomaron por triplicado.

○ *Pseudomonas putida* KT2440

Se efectuó 2 diversas mediciones de esta cepa bacteriana para identificar la hora en que llegaba a Fase estacionaria, ya que a partir de esta se obtendría el microorganismo para la formulación del inoculante, de igual manera esta metodología se aplicaría para el resto de las bacterias.

En primera instancia se realizó una curva de turbidez, donde se observó que desde el comienzo *Pseudomonas putida* KT2440 mostraba valores de absorbancia altos, sin embargo a partir de la hora 20, inicia su estabilidad (Gráfico 1).

Posteriormente se confirma esta fase con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio LB. En los resultados se pudo observar que la bacteria llegaba a fase estacionaria a partir de la hora 19 en adelante con un número de 10⁹ UFC/ml (Gráfico 2).

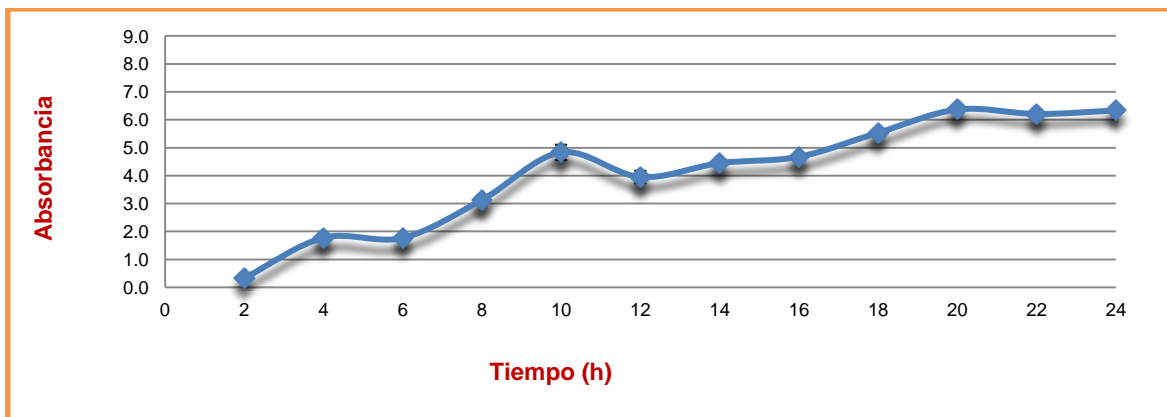


Gráfico 1. Curva de turbidez de *Pseudomonas putida* KT2440. Absorbancia en relación al tiempo (h).

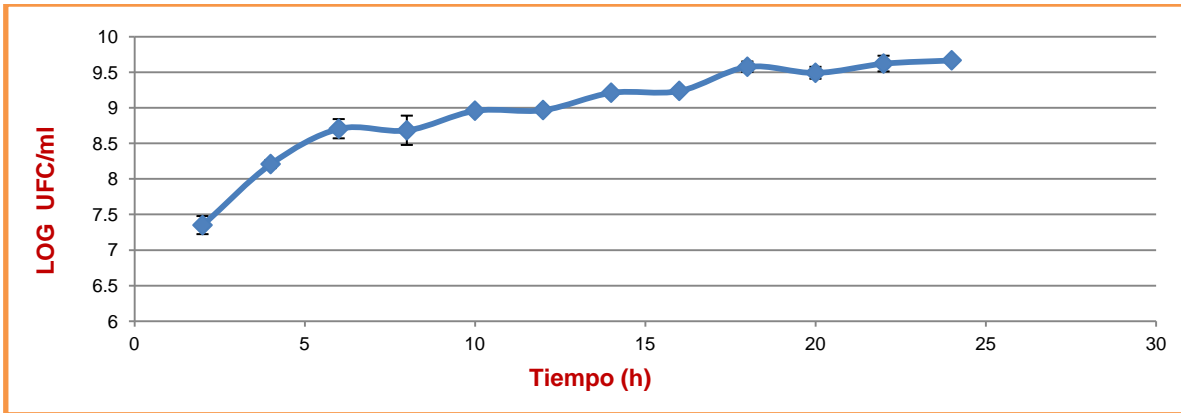


Gráfico 2. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440. Log UFC/ml en relación al tiempo.

Finalmente los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de y para las horas 4 y 18, $b(0)$, $b(1)$, para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 3).

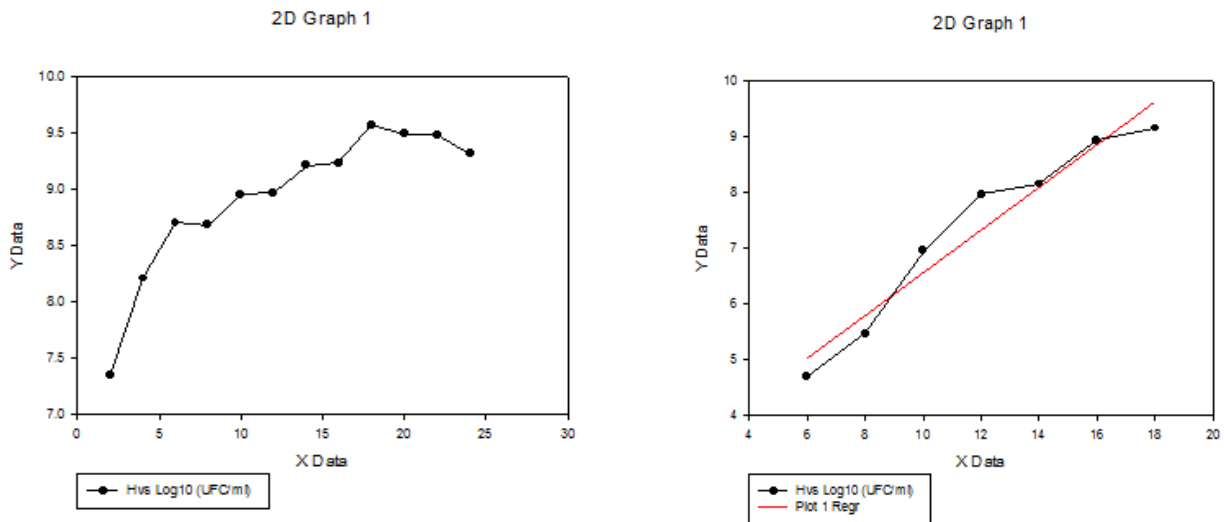


Gráfico 3. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

- ***Sphingomonas* sp. OF178**

Se realizó curva de turbidez, curva de crecimiento y análisis estadístico para identificación de Fase exponencial. En curva de turbidez se observó que *Sphingomonas* sp. OF178 desplegó valores de absorbancias variables en algunos tiempos (12h, 13h), sin embargo a partir de la hora 23 y 24 comienza la fase Lag (Gráfico 4).

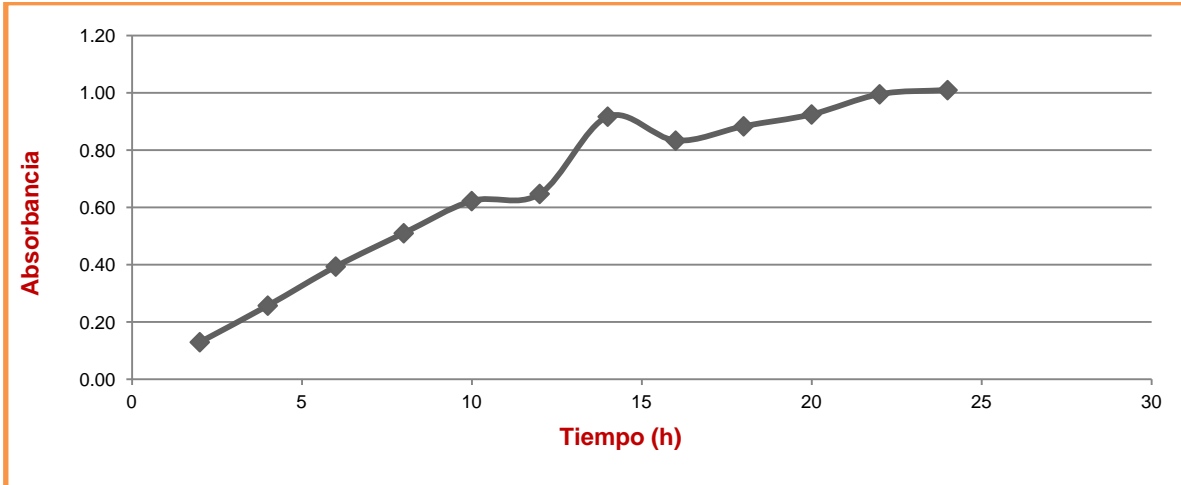


Gráfico 4. Curva de turbidez de *Sphingomonas* sp. OF178. Absorbancia en relación al tiempo (h).

Se realizó curva de crecimiento con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio LB 5%. En los resultados se pudo observar que la bacteria entraba a fase estacionaria entre las 19 y 20h con un número de 10^9 UFC/ml (Gráfico 5).

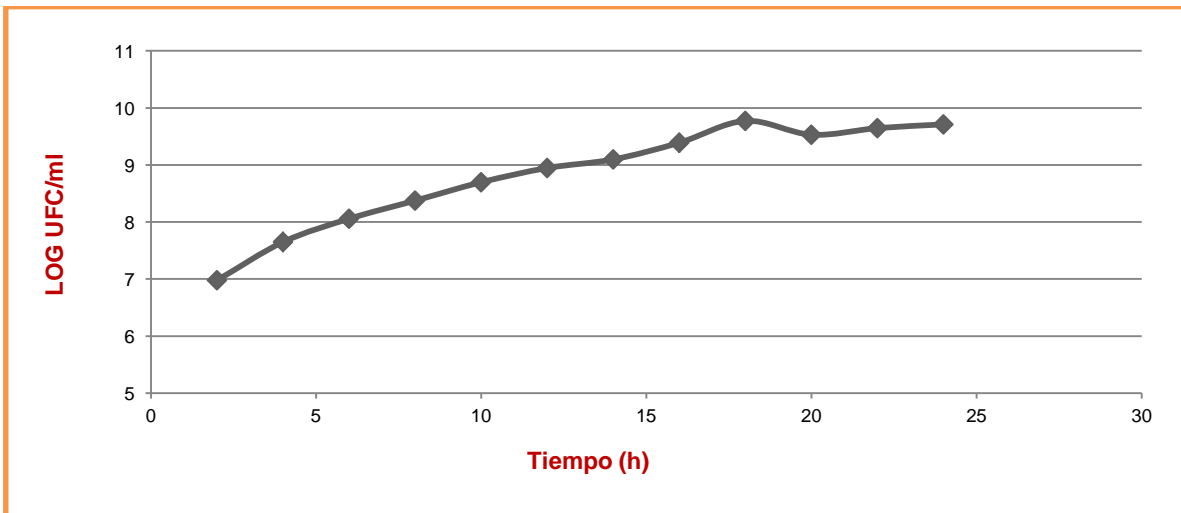


Gráfico 5. Curva de crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178. Log UFC/ml en relación al tiempo.

Los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de a y b para las horas 2 y 14, $b(0)$, $b(1)$, para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 6).

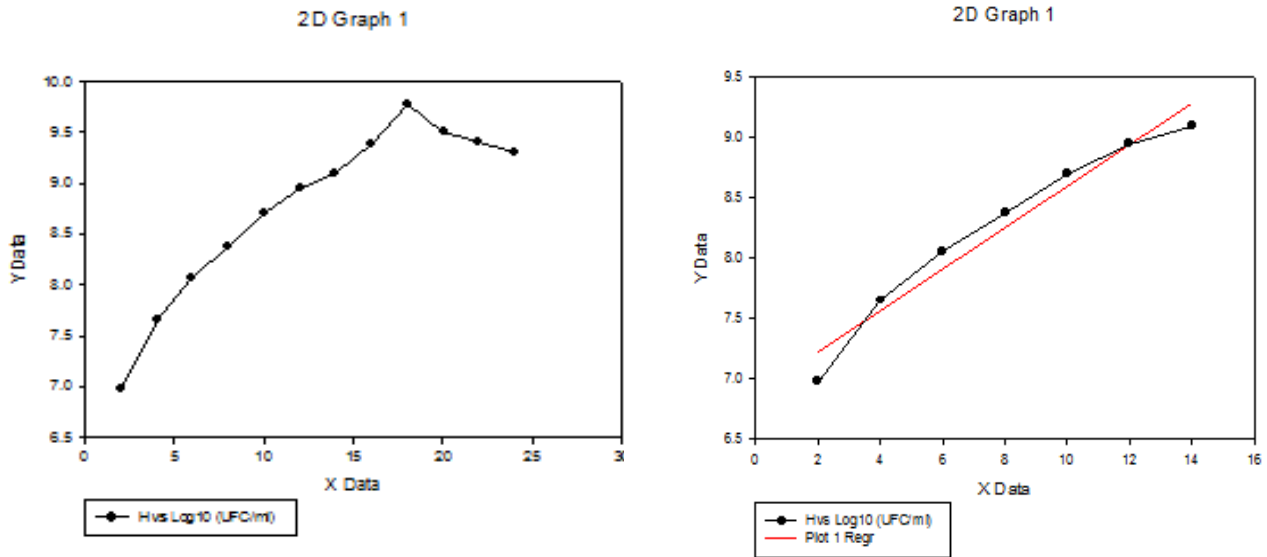


Gráfico 6. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178 (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

- ***Bradyrhizobium* sp. MS22**

Se realizó curva de turbidez, curva de crecimiento y análisis estadístico para identificación de Fase exponencial. En curva de turbidez se observó que *Bradyrhizobium* sp. MS22 exhibió absorbancias con dos saltos, llegando posiblemente a fase Lag a partir de la hora 20 (Gráfico 7).

Se realizó curva de crecimiento con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio Tesma. Los resultados que se mostraron, es que la bacteria entraba a fase estacionaria entre la hora 20-24 con un número de 10^8 UFC/ml (Gráfico 8).

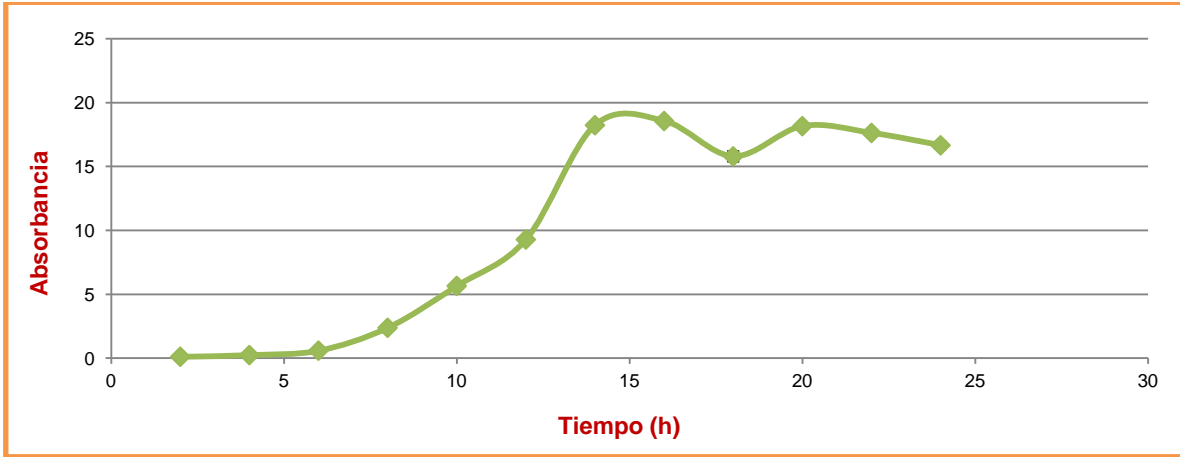


Gráfico 7. Curva de turbidez de *Bradyrhizobium* sp. MS22. Absorbancia en relación al tiempo (h).

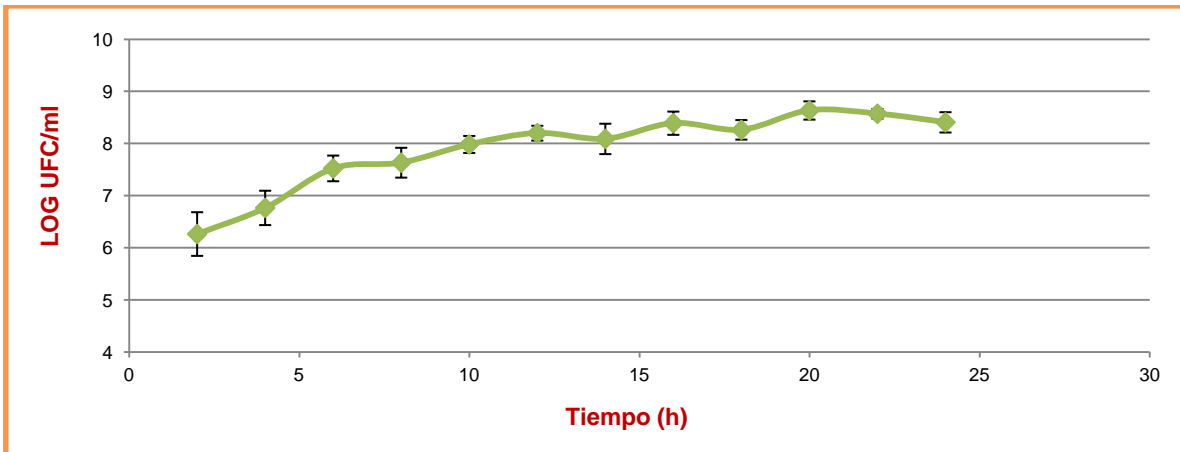


Gráfico 8. Curva de crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. MS22. Log UFC/ml en relación al tiempo.

Los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de a y b para las horas 8 y 16, $b(0)$, $b(1)$, para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 9).

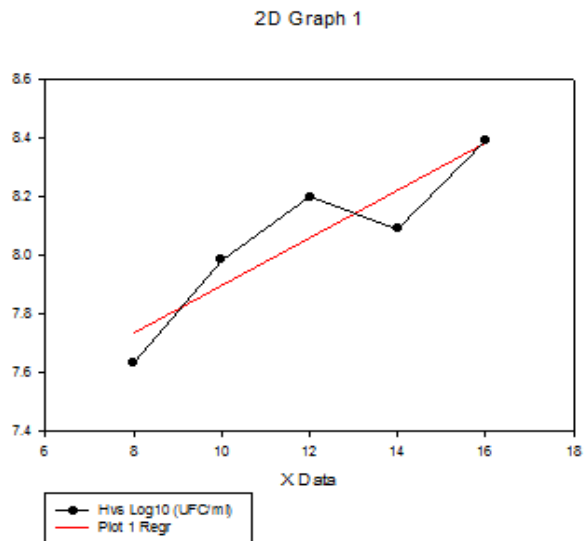
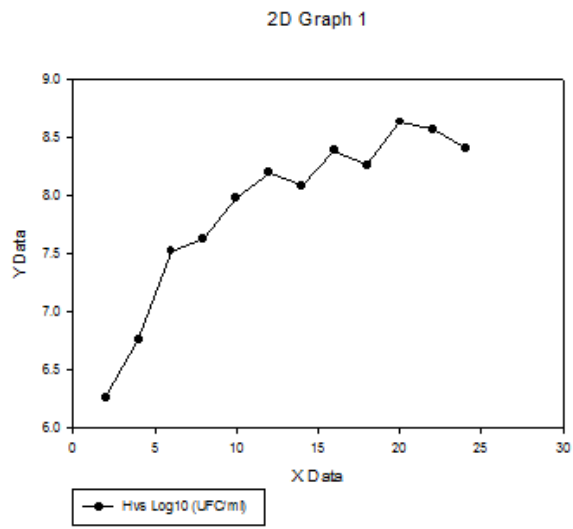


Gráfico 9. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. MS22 (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

- ***Azospirillum brasilense* Sp. 7**

Se realizaron las correspondientes curvas para esta cepa. En la curva de turbidez se observó que *Azospirillum brasilense* Sp. 7 mostró que inicia un descenso a partir de la hora 37, por ser un microorganismo de 48 h de crecimiento se pudo observar que entra posiblemente a fase Lag a partir de la hora 40 (Gráfico 10).

Se realizó curva de crecimiento con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio Tesma. Los resultados que se mostraron, es que la bacteria entraba a fase estacionaria entre la hora 30-34 con un número de 10^8 UFC/ml (Gráfico 11).

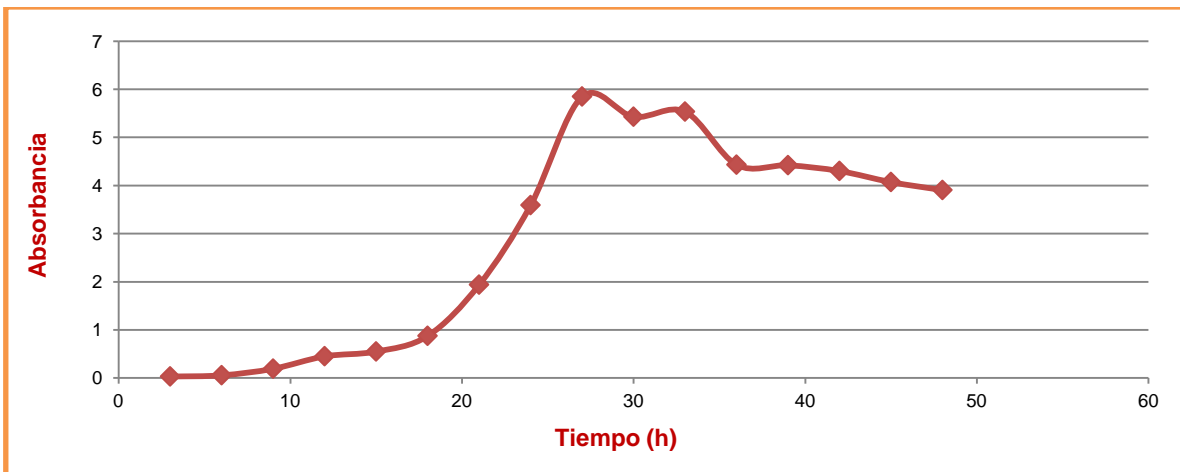


Gráfico 10. Curva de turbidez de *Azospirillum brasilense* Sp. 7. Absorbancia en relación al tiempo (h).

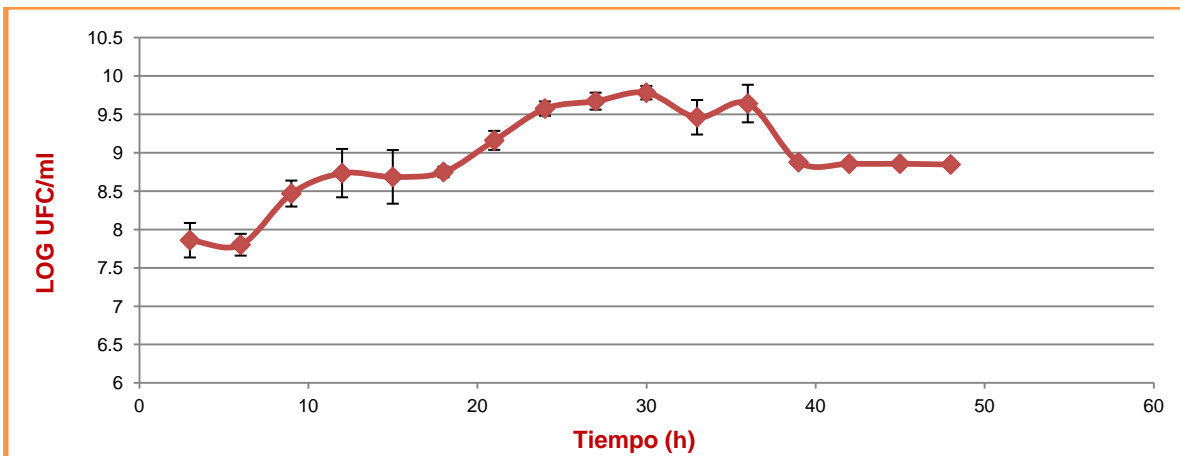


Gráfico 11. Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* Sp. 7. Log UFC/ml en relación al tiempo.

Los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de a y b para las horas 6 y 24, $b(0)$, $b(1)$, para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 12).

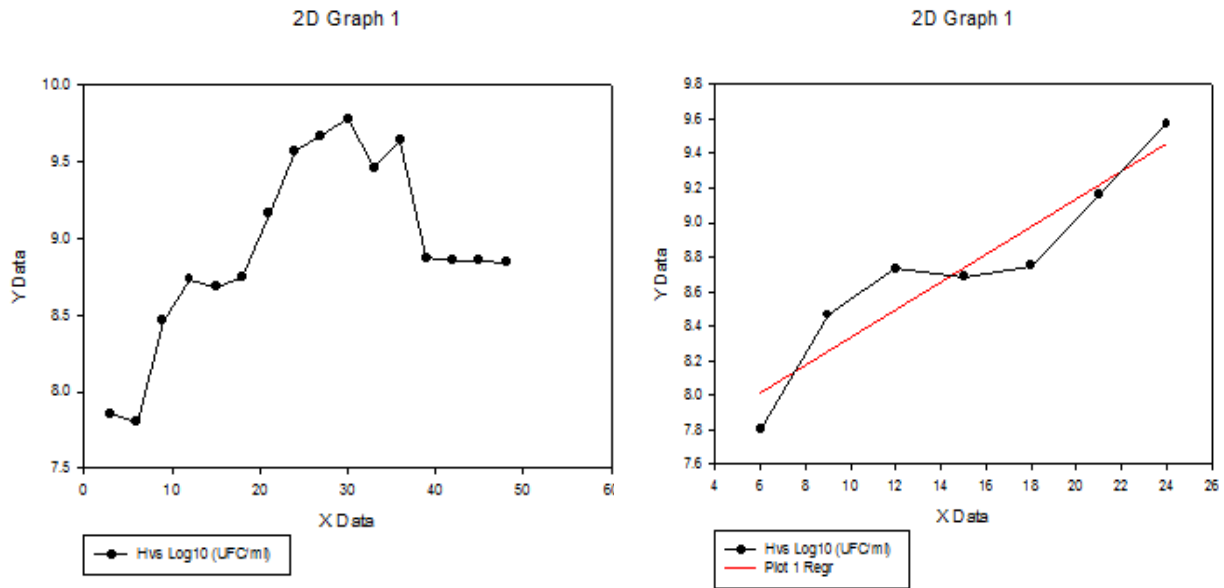


Gráfico 12. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de Azospirillum brasilense Sp. 7 (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

- ***Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T**

Este experimento resultó ser complicado, ya que la bacteria no podía crecer en su medio de selección indicado, o en dado caso el medio líquido se contaminaba fácilmente. La curva fue realizada 4 veces (Las demás curvas fueron realizadas 3 veces cada una para corroborar resultados), hasta que el microorganismo creció en su medio selectivo. Se podría sugerir probar en Medio Tesma.

En la curva de turbidez *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T se observó que se hay una gran variabilidad en las lecturas, mostrando saltos y descensos a lo largo del tiempo, aunque posiblemente llega a fase estacionaria a partir de la hora 40 (Gráfico 13).

Para confirmar se realizó la curva de crecimiento con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio LB y LGI. Los resultados obtenidos, fue que en medio LB no se encontró crecimiento de colonias, pero si en LGI, en este se observó que la bacteria entraba a fase estacionaria a las 43h donde se observó un descenso más notable quedando con un promedio de 10^7 - 10^8 UFC/ml, aunque se encontró mucha variación en los números (Gráfico 14).

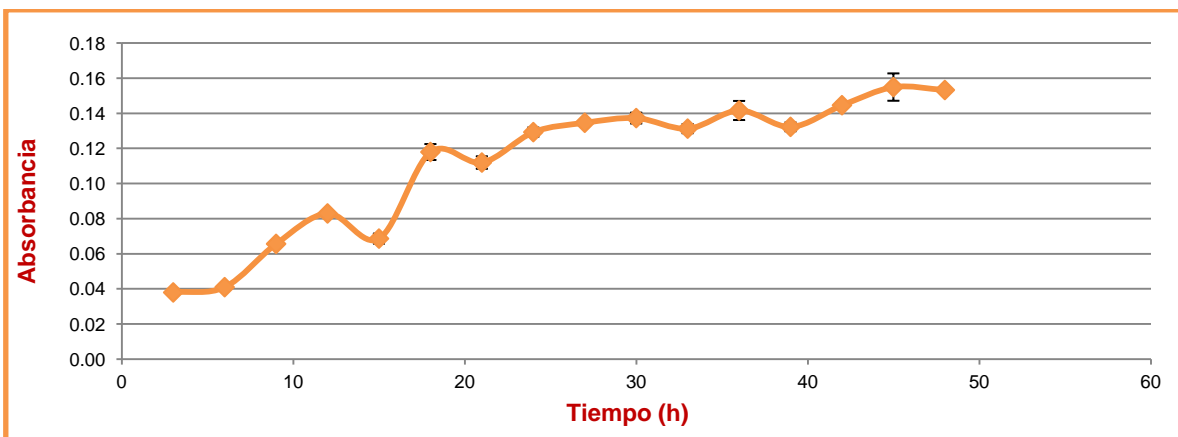


Gráfico 13. Curva de turbidez de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T. Absorbancia en relación al tiempo (h).

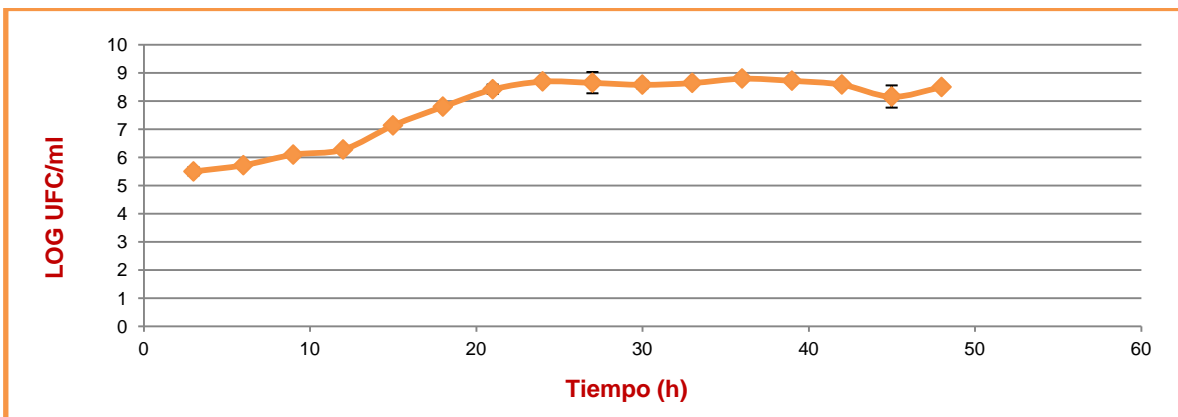


Gráfico 14. Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T. Log UFC/ml en relación al tiempo.

Los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de y para las horas 15 y 30, $b(0)$, $b(1)$, para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 15).

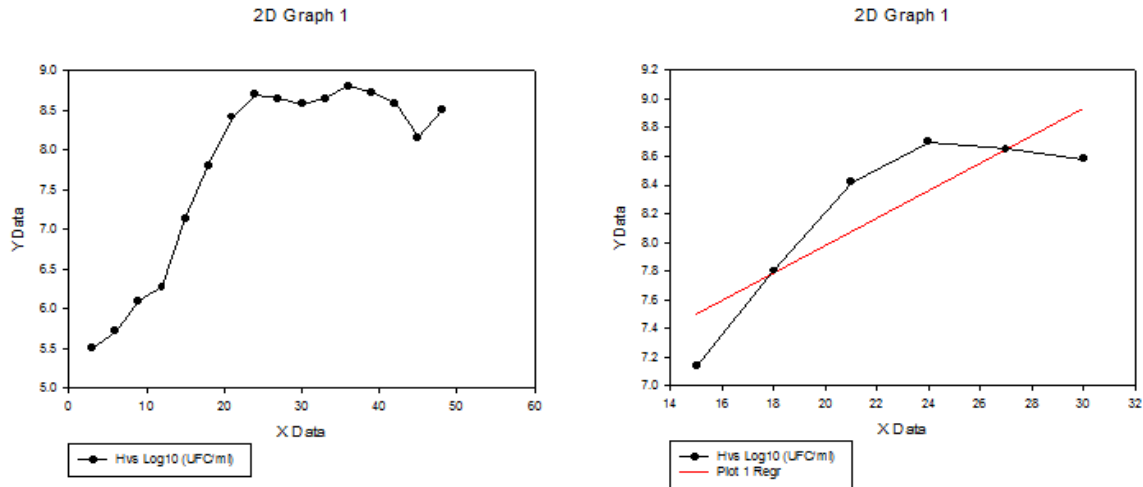


Gráfico 15. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

- **Burkholderia unamae MTI-641**

El crecimiento de esta bacteria al igual que *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5^T, mostró complicaciones en su desarrollo, por lo que se utilizó nuevamente medio LB sin antibióticos, con antibióticos, y el medio Bac con antibiótico y sin antibiótico, pero sin presencia de crecimiento. Posiblemente la cepa utilizada como inóculo no fue la correcta o presentó alguna variación génica. Finalmente tras 5 intentos se obtuvo crecimiento en medio Bac a concentración normal de antibiótico. Se sugiere corroborar por otros medios o por otra técnica para recuperar a la bacteria.

Se midió absorbancias del inóculo crecido en medio Bac y se obtuvo que *Burkholderia unamae* MTI-641, probablemente esté llegando a fase estacionaria a partir de las hora 17-18 (Gráfico 16).

Para confirmar se realizó la curva de crecimiento con cuantificación bacteriana mediante goteo en placa tradicional en medio Bac. Los resultados obtenidos reflejaron que a la hora 18 en adelante la bacteria comienza a estabilizarse y a llegar a un crecimiento equilibrado con números de 10⁷ UFC/ml (Gráfico 17).

Los datos de la curva de crecimiento fueron ingresados y analizados, para identificar la Fase exponencial con el Log/UFC/ml. Se realizó Regresión Lineal, y se obtuvieron valores de y para las horas 10 y 18, b (0), b (1), para el cálculo posterior del número de generaciones por hora (Gráfico 18).

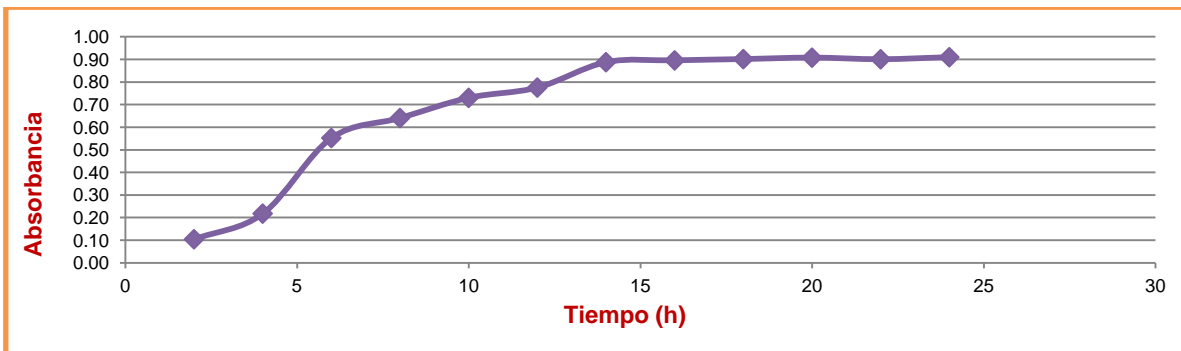


Gráfico 16. Curva de turbidez de *Burkholderia unamae* MTI-641. Absorbancia en relación al tiempo (h).

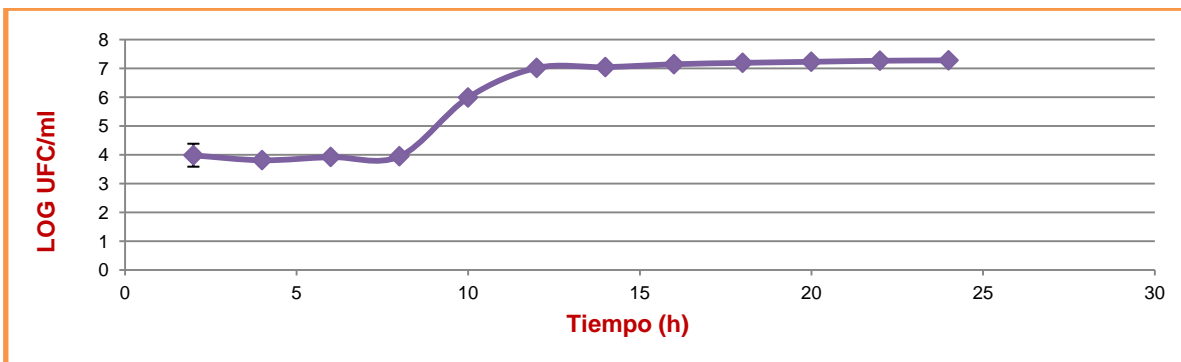


Gráfico 17. Curva de crecimiento de *Burkholderia unamae* MTI-641. Log UFC/ml en relación al tiempo.

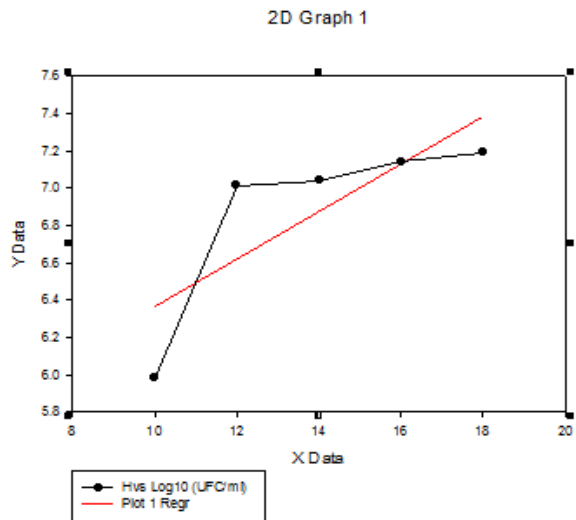
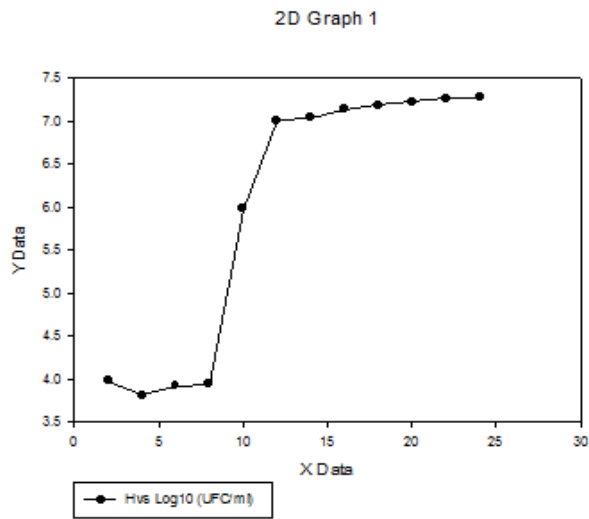


Gráfico 18. Análisis de curva de crecimiento. (A) Curva de crecimiento de *Burkholderia unamae* MTI-641 (B) Identificación de Fase Exponencial mediante Regresión Lineal. La pendiente es representada como una línea roja (Sigma Plot Versión 12.0 de Systat Inc. Software).

La importancia de realizar estas curvas fué para demostrar que las cepas que conforman el EMMIM-1 llegan a Fase estacionaria a sus tiempos correspondientes (24 o 48h) y en cantidades suficientes (10^6 - 10^8 UFC/ml), ya que para obtener las suspensiones, se necesitan cultivos en Fase Lag (Gráfico 19).

La fase Lag usualmente tarda de unos minutos hasta horas. La longitud de la fase de retardo se puede controlar en cierta medida, ya que depende del tipo de medio, así como en el tamaño inicial de inóculo.

El análisis de la Fase Exponencial tuvo el objetivo de explorar el aproximado de número de bacterias obtenidas por hora. Cada curva mostró diversas variabilidades, por lo tanto puede decirse que los datos analizados también son muy variables. Las horas tomadas para los cálculos pueden modificarse dependiendo de la visión de cada investigador, aunque conviene explorar los datos obtenidos (Fase exponencial) en el tiempo y usarlos en las fórmulas del número de generaciones para cada bacteria evaluada.

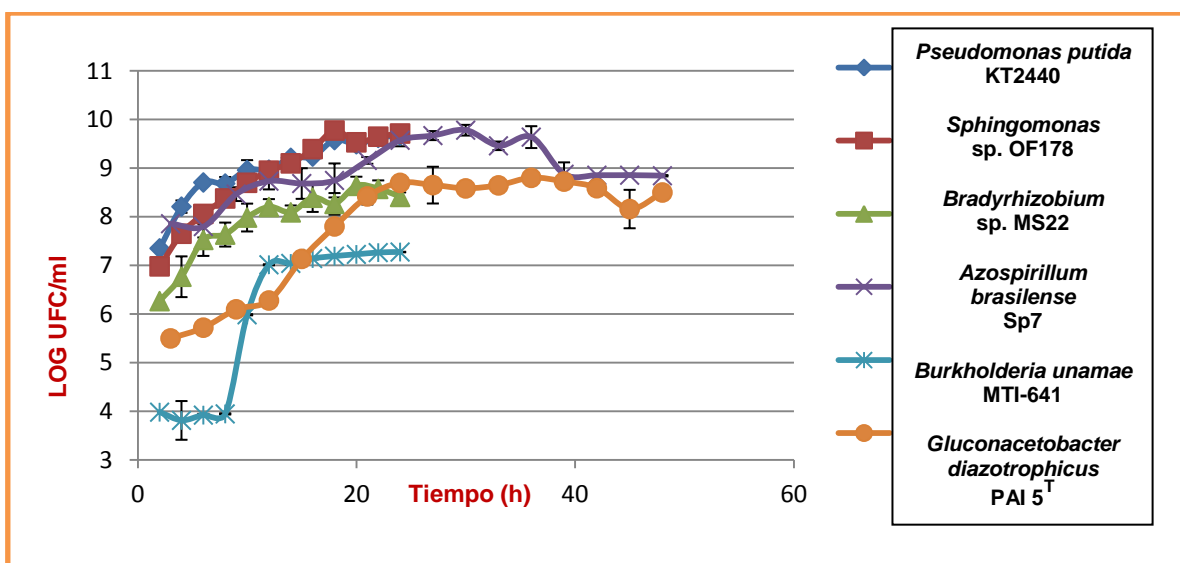


Gráfico 19. Cepas bacterianas (EMMIM-1) en conjunto. UFC/ml en relación al tiempo. Cada línea representa una cepa bacteriana.

Tabla 1. Cálculo del número de generaciones por cada cepa bacteriana. Se presenta los valores de la tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de generación (t) y número de generaciones obtenidas por hora (n) por cada cepa bacteriana.

Microorganismo	μ	t	n (Generaciones / h)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	0.8834	0.7846	15.29
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	0.3943	1.7579	6.82
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	0.1865	3.7166	2.15
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	0.1846	3.7548	4.79
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 ^T	0.2209	3.1378	4.70
<i>Burkholderia unamae</i> MTI-641	0.2920	2.3737	3.37