

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS



PERFIL DE TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR EL TITULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA INDUSTRIAL

Evaluación de bacterias promotoras del crecimiento de la quinua
(*Chenopodium quinoa* Willd) y su tolerancia a estrés hídrico

Univ. Ema Concepción Silva Huanca

Tutores: Carla Crespo Melgar PhD

Lic Marina Quispe Arapa

La Paz – Bolivia

1. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un cultivo originario de Los Andes, que ha sido domesticado hace miles de años por las antiguas culturas de la Región Andina de Sud América. Existen evidencias de que fue alimento básico para las poblaciones pre-hispánicas hasta la época de la conquista. La quinua es un cultivo andino de alto valor nutricional, con alta calidad proteica (ALADI, 2011) rica en aminoácidos como lisina, fenilalanina y metionina que son deficientes en otros cereales, además es una fuente natural de ácidos grasos poliinsaturados esenciales como el ácido linoleico (omega 6) y el ácido linoleico (omega 3) (Patrón M. 2019). Estas propiedades convierten a la quinua en una fuente potencial para la seguridad alimentaria, no solo nacional sino también mundial.

En este sentido, estos últimos años el cultivo de la quinua se ha convertido en un cultivo estratégico y de exportación, formando parte importante del sistema productivo. Para asegurar un buen cultivo, es imperante iniciar tomando en cuenta la calidad de la semilla, que se considera un insumo estratégico para la agricultura, siendo la pureza varietal, la pureza física, la calidad fitosanitaria, la calidad genética, la calidad fisiológica, el vigor y germinación, cualidades importantes para garantizar la viabilidad de la semilla, para que esta germine aún en condiciones adversas, y así asegurar emergencia rápida de tal forma que sea visible en la uniformidad de las plantas en los suelos de cultivo.

Las características de las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y las condiciones de suelo y condiciones ambientales donde esta se cultiva, hacen que la germinación sea la etapa más crítica en el ciclo de su desarrollo, que se indica en la guía de cultivo de quinua (Gómez L. y Aguilar E. 2016). La germinación es el inicio del periodo de transformación de los órganos de las plantas (fenología) y así pues del cultivo; la buena o mala germinación en consecuencia determinará una población aceptable o una baja densidad de plantas y por tanto esta a su vez determinará el rendimiento de grano por unidad de superficie.

Entonces el proceso de germinación es particularmente importante, atraviesa por tres etapas sucesivas iniciadas, con la absorción de agua por la semilla que se da por las diferencias de potencial hídrico (Castro A. 2019); sin embargo esta depende

principalmente del factor externo que es la humedad de suelo, que está ligada a la cantidad de precipitación pluvial o riego que se proporcione; de ahí la importancia ya que muchas veces la época de siembra coincide con la escasa precipitación pluvial, lo que conlleva frecuentemente a una baja humedad del suelo y del ambiente mismo, que pueden afectar la eficacia de las reacciones bioquímicas para el inicio de la germinación (Doria J. 2010), convirtiéndose en un factor decisivo para el establecimiento del cultivo y consecuentemente para la producción.

Los suelos de Bolivia son variados y muestran distinta topografía, particularmente el suelo del altiplano boliviano, es un área con características difíciles, con bajas temperaturas, pocas lluvias, de terrenos frágiles en cuanto a degradación y con pocos nutrientes, convirtiéndose en condiciones de suelos adversos para prácticas agrícolas. Los factores limitativos para el establecimiento y cultivo de la quinua, en las zonas áridas y semiáridas son reducidos dada la adaptabilidad de este cultivo a estas condiciones. Sin embargo, la precipitación cada vez más escasa (200 a 300 mm en el Altiplano sur de Bolivia según los datos de Canedo R., (2014), el cambio climático y la baja fertilidad del suelo están limitando su cultivo y su rendimiento. Por otra parte, algunas actividades de cultivo en las que se incluye prácticas tradicionales, uso de sistemas mecanizados, monocultivos, aplicación de pocos fertilizantes orgánicos, disminución de los periodos de descanso y ampliación de fronteras agrícolas (PIA ACC-UMSA 02) están generando disminución no solo en la producción de quinua, sino que también están ocasionando un deterioro serio en la composición física, química y biológica de los suelos de cultivo.

Para lograr un manejo sostenible e integral del suelo es necesario correlacionar todas sus propiedades, siendo que las plantas toman los elementos nutritivos a través de sus raíces individualmente o en simbiosis con microorganismos; estableciendo así una relación mediante la cual se benefician o afectan. Estos microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios) en los suelos son componentes importantes de este, ya que son la parte viva y son responsables de la dinámica de su transformación y desarrollo. Un suelo es considerado fértil cuando contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para las plantas, y una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal.

Son millones los microorganismos que se puede encontrar en una pequeña muestra de suelo, los más abundantes son las bacterias, hongos y virus, que generalmente se asocian a enfermedades de los cultivos. Sin embargo, existe una simbiosis entre plantas, suelo y organismos, con factores bióticos y abióticos que articulan el sistema productivo y en donde con certeza son más las bacterias, hongos y virus benéficos que los patógenos. Por esta razón es de gran importancia el estudio de la diversidad microbiana y los efectos que tienen sobre la actividad en las plantas, específicamente las de quinua. Con el fin de incrementar los conocimientos acerca del potencial benéfico de los microorganismos en el cultivo de quinua, el presente trabajo de investigación pretende evaluar el efecto de la adición de bacterias tolerantes a sequía como promotores de crecimiento durante la germinación de semillas de quinua, para seleccionar posibles inoculantes a ser evaluados posteriormente en plantines de quinua cultivados en macetas. Este trabajo pretende revelar los beneficios de los microorganismos como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, para dar criterios posteriores a la formulación de bioinsumos para así contribuir al potenciamiento del sector agrícola quinuero.

2. ANTECEDENTES

En Bolivia la producción de quinua es uno de los siete cultivos prioritarios que en los últimos años tuvo un crecimiento histórico, debido a sus propiedades y potencial nutricional. Siendo que Bolivia es el segundo productor de quinua del mundo después de Perú, con 67000 toneladas producidas en 2017 (FAO 2019). En el altiplano en la región andina, la quinua es el principal cultivo comercial y de exportación; de suma importancia para pequeños agricultores que la cultivan de forma individual o asociados en organizaciones departamentales y nacionales, en pequeñas fincas o parcelas de entre una y seis hectáreas.

Los suelos de Bolivia en la región altiplánica son frágiles debido a diferentes condiciones naturales adversas ocasionadas ahora por el constate cambio climático; pero también por el mismo agricultor. El altiplano boliviano está dividido en altiplano norte, centro y sur; esta clasificación está determinada por la temperatura, precipitación pluvial y la ubicación geográfica de las provincias y departamentos que componen el mismo (Salamanca L. 2018).

En los últimos años se ha presentado un interés y creciente demanda del grano de quinua, por ello las superficies de cultivo son ampliadas casi constantemente, al punto incluso de reducir otras actividades, como la cría de la ganadería camélida, pero también al mismo tiempo se acelera la degradación de suelos y la pérdida de fertilidad de los mismos. El suelo es la capa superficial terrestre, es un cuerpo natural, dinámico, trifásico (mezcla de materiales sólidos, líquidos y gaseosos), (Aguirre L. 2010) compuesto de materiales minerales, orgánicos y de formas vivientes en el que crecen las plantas, desarrollan sus raíces y toman los alimentos necesarios.

Las características del suelo determinan el potencial productivo de uso agropecuario, por esta razón su conservación es fundamental. Es importante señalar que los suelos del altiplano están siendo sobreexplotados debido al incremento de la demanda de la quinua en los mercados nacionales e internacionales, que han obligado al agricultor a ampliar la frontera agrícola, utilizar sistemas de monocultivos, reducir los periodos de descanso, todas estas actividades están provocando la disminución de la productividad en los cultivos y por ende están reduciendo la fertilidad de los mismos. (Barrientos E. 2017)

Los suelos deben fertilizarse para mantener el contenido adecuado de elementos minerales que los cultivos necesitan; para un buen crecimiento de la quinua, esta necesita muchos nutrientes, sobre todo macronutrientes como el oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre; pero también necesitan micronutrientes como el hierro, boro, zinc, cobre, sodio, molibdeno, cloro, cobalto y sílice para su correcto desarrollo a través de su absorción en el momento preciso y en las cantidades específicas.

Los suelos fertilizados con todos los macro y micronutrientes garantizan una mayor producción, abaratan costos y mejoran la vida del agricultor. Para tal objetivo, hoy en día se recurre a la aplicación de fertilizantes químicos como mecanismos inmediatos y directos, para contrarrestar la baja fertilidad, sin tomar en cuenta las características del tipo de suelo o las necesidades del mismo. La aplicación en dosis altas es poco recomendable, debido a las condiciones de escasa precipitación que es característica en el altiplano boliviano, especialmente en el sector sur. Problemática que no solo se

da en esta parte del planeta, sino que también es preocupación a nivel mundial. Para cambiar esta situación desde hace varios años se viene trabajando en investigaciones (Medrano A., 007, Tencio R., 2.017, Wilches, A., 2017; Peñasco F. 2021, Pognante F., 2.022), evaluando cómo incrementar los rendimientos agrícolas, mejorar la calidad e inocuidad de los productos y al mismo tiempo ser amigables con el medio ambiente. Tales investigaciones han permitido generar productos en base a recursos naturales con alto potencial de uso agrícola conocidos hoy en día como bioinsumos.

Según el Comité Asesor en Bioinsumos de Uso Agropecuario un bioinsumo se define como: “Todo producto biológico que consista o haya sido producido por microorganismos o macroorganismos o extractos vegetales o compuestos bioactivos y derivados de éste y que estén destinados a ser aplicados como insumos en la producción agropecuaria, agroalimentaria, agroindustrial, agrogenética e incluso en el saneamiento ambiental agropecuario” de forma sana, segura y amigable con el ambiente.

La presente investigación se centrará en la evaluación de la aplicación de microorganismos *in vitro* e *in vivo* para otorgar tolerancia al estrés hídrico y a su vez, con potencial promotor de crecimiento vegetal en la fase de germinación y en sus diferentes etapas, en semillas de quinua. Para ello, se utilizarán inóculos de cepas bacterianas criopreservadas, seleccionadas por su tolerancia a estrés hídrico (PEG 30% equivalente a 1 MPa de presión osmótica), con características de capacidad solubilizadora de fosfato, capacidad fijadora de nitrógeno, productoras de la fitohormona ácido indol acético (AIA), que fueron aisladas de suelos de cultivos de quinua del sur del altiplano boliviano, correspondientes a las comunidades de Soniquera-Potosí, Canquilla-Potosí y Jayukota-Oruro (Proyecto PIA ACC-UMSA.02).

Para potenciar la promoción del crecimiento de la quinua en condiciones de estrés hídrico empleando microorganismos, es conveniente realizar una previa selección de aquellas bacterias que tengan mecanismos directos e indirectos de promoción de crecimiento vegetal que permitan estimular el desarrollo de las plantas, que puede luego ser evidenciado por la inducción del crecimiento en etapa de germinación,

inciendiando en el desarrollo de la longitud de raíz, el tallo, crecimiento total de la plántula, entre otros.

El estudio de las interacciones, planta microorganismos es complejo y se basa en mecanismos moleculares, a nivel macroscópico se pueden observar cambios morfológicos en la germinación de las semillas y o su desarrollo o el efecto que puedan ser atribuidos a los microorganismos en beneficio del y al suelo (C y N de la biomasa microbiana, respiración, contenido de humedad y temperatura, N potencialmente mineralizable, entre otros). Por otro lado, la información científica disponible sobre el efecto de las bacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal en el cultivo de quinua en zonas áridas y semiáridas con escasas precipitaciones pluviales, es limitada. También son escasas las investigaciones sobre especies bacterianas aisladas de suelos productores de quinua del altiplano boliviano que se asocian de forma natural con las plantas en condiciones de humedad deficiente. Analizando la dinámica de la población humana que año tras año explota los recursos naturales, buscando satisfacer sus necesidades alimenticias y que le ha llevado además a utilizar agroquímicos de alta eficiencia en el cultivo de cereales resistentes a plagas y enfermedades, con ciclos de producción más cortos, que provean protección frente a factores bióticos adversos. Sin embargo, esta estrategia ha generado impactos ambientales negativos, como la contaminación de aguas, desertificación de suelos, aumento de gases con efecto invernadero y acumulación de sustancias tóxicas, producto del uso indiscriminado de agroquímicos. Como alternativa a la utilización de estos, se propone el uso de bacterias nativas aisladas de lugares de cultivo de quinua, con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, para estimular el crecimiento de la quinua en un formulado conocido como bioinsumo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la demanda de quinua en el mercado tanto interno como externo, ha conducido al incremento sustancial del cultivo de la quinua, incluso hasta el punto de convertir aquellas tierras que eran destinadas a pastoreo la dedican a la producción intensiva de la quinua, sin considerar la pérdida de la vegetación natural, el uso de maquinaria agrícola muchas veces de forma inadecuada, la siembra del cultivo de

forma consecutiva, sin respetar periodos de descanso, todos estos aspectos sumados al efecto del cambio climático han permitido que surjan problemas como la baja fertilidad de los suelos, la reducida sobrevivencia de vegetación nativa, la erosión eólica, cuyo efecto se ve de forma directa en los bajos niveles de producción de este grano tanpreciado y milenario.

Una alternativa que tiene cada vez mayor participación en el esquema de manejo de suelos de cultivo, complementando al manejo convencional, es el uso de bioinsumos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas), ya que representan opciones económicas atractivas y ecológicamente aceptables (Mamani A. 2018). Una manera de recuperar los suelos consiste en aprovechar la microbiota de los mismos. Estos microorganismos pueden facilitar de manera directa e indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes para la planta tales como: el nitrógeno, el fósforo y el agua, además de producir sustancias denominadas fitohormonas que promueven y regulan el crecimiento vegetal, adicionalmente algunas bacterias son capaces de construir biopelículas que pueden auxiliar a las plantas contra el estrés abiótico como la sequía, situación descrita por INECOL, 2021.

De allí surge la necesidad de plantear el presente trabajo, con el propósito de contribuir a la agricultura sostenible, evaluando microorganismos nativos, específicamente bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la etapa de la germinación de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) para mejorar rendimiento del cultivo en lugares áridos y mejorar la tolerancia al estrés hídrico.

4. JUSTIFICACIÓN

En Bolivia, la quinua es típicamente cultivada en zonas altas e interandinas, que superan los 4000 metros sobre el nivel del mar, en climas extremos y adversos; pese a estas condiciones los cultivos de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) florecen como principal fuente de alimentación para los pobladores del altiplano andino, tanto del sur como del norte.

La región sur del altiplano boliviano es una gran llanura que se extiende entre los 3600 y los 4100 msnm, rodeada por las cordilleras andinas oriental y occidental, cuyas cumbres alcanzan 5630 msnm. El salar de Uyuni, con una superficie de 12500 kilómetros cuadrados SENAPI, 2009, define muchos aspectos ecológicos de la

región, que se caracteriza por un clima árido con temperaturas extremas que van desde los -11°C a los 30°C ; entre 160 y 257 heladas anuales y una precipitación de 140 a 250 milímetros por año. Según la guía de exhibición de la quinua andina entre las variedades que Bolivia produce esta la Quinua Real, la cual es rica en minerales y nutrientes debido a que crece en las regiones cercanas a los salares de Uyuni y Coipasa. Los suelos de estas regiones se componen principalmente de ceniza volcánica y lava; son salinos, arenosos y tienen escasa materia orgánica (alrededor de 0,7%); también son pobres en nutrientes, con escasez hídrica y baja capacidad de retención de agua. El nivel de erosión oscila entre 4 y 30%, variando entre las distintas regiones. A pesar de estas características, en Bolivia se registró más de 67 mil toneladas de producción de quinua en el 2019, habiendo mostrado un decrecimiento del 4% comparado al 2018, dentro de una superficie de cultivo de 116 mil hectáreas. Donde casi el 85% de la producción proviene de los departamentos de Oruro y Potosí. Se reporta esta disminución como una consecuencia del cambio climático habiendo zonas con bastante sequía, una falta de implementación tecnificada para la siembra y cosecha, y una disminución de los precios internacionales desincentivando esfuerzos para incrementar la producción, sin embargo, las principales regiones productoras tienen a la quinua como su motor económico de desarrollo. Aun así, Bolivia se mantiene entre los líderes del mercado internacional en cuanto a producción de Quinua Real y productor de quinua orgánica, factores destacables en el mercado internacional.

En el 2020, se logró el reconocimiento de declaración de “Marca de Certificación” para la “Quinua Real del Altiplano Sur de Bolivia” para la protección de las Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas, designando a la quinua Real un producto originario de Bolivia, a fin de diferenciar y promocionar a los productores y actores involucrados de la cadena productiva, para que puedan obtener mejores precios, ingresar a mercados internacionales. Es importante considerar la adaptación de las variedades de quinua a las diferentes condiciones de clima y altitud; si bien la quinua tiene amplia adaptación como especie, muchas variedades tienen adaptación muy específica a ciertos ambientes. En este estudio se planea evaluar ecotipos locales de la comunidad de Soniquera del departamento de Potosí, dado que

esta comunidad se constituye en una de las zonas más vulnerables a los efectos del cambio climático y podría albergar ecotipos de quinua, como recursos biológicos resilientes importantes, cuyas características no han sido evaluadas previamente

Por otro lado, según informes del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, se señala que la diversidad microbiana en los suelos empleados para el cultivo de la quinua presenta una mayor proporción de bacterias que hongos (2:1); sin embargo, en regiones del altiplano sur presenta una diversidad baja en comparación a otras regiones. Las poblaciones de microorganismos juegan un rol fundamental en la liberación de nutrientes y por tanto en el establecimiento de especies vegetales en diferentes áreas.

El desarrollo del presente trabajo tiene como propósito evaluar cepas bacterianas, aisladas de suelos productores de quinua del Altiplano Sur de Bolivia que corresponde a poblaciones aledañas al salar de Uyuni, para seleccionar bacterias potenciales promotoras de crecimiento vegetal (PGPB). Dicha evaluación será realizada *in vitro* empleando estrés hídrico como factor de selección en etapa germinativa de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*). Considerando, que la germinación es el reinicio del crecimiento del embrión, que se ha generado durante las fases finales de maduración. Los procesos fisiológicos de crecimiento de las plantas exigen actividades metabólicas que son aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste en la activación de dichos procesos caracterizados por el incremento de la humedad y actividad respiratoria de la semilla, de ahí la importancia de la evaluación en esta primera etapa. Tomando en cuenta además que las subpoblaciones localmente adaptadas que presentan grados óptimos y límites de tolerancia a las condiciones de lugar (Gonzales R. 2014) se estudiara el efecto de bacterias en ecotipos específicos del lugar.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación de bacterias tolerantes a estrés hídrico por su actividad promotora de crecimiento de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*)

Objetivos Específicos

- Determinar parámetros físicos, de viabilidad y capacidad de germinación de 5 ecotipos de quinua de la Comunidad de Soniquera y de la variedad Real Noventón en condiciones normales, estrés hídrico y estrés por frío
- Seleccionar *in vitro* bacterias tolerantes a estrés hídrico por su actividad promotora de germinación de la Variedad Real Noventon y 5 ecotipos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) propios de la comunidad de Soniquera del altiplano sur de Bolivia.
- Realizar un ensayo demostrativo de la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal seleccionadas empleando la variedad de quinua Real Noventon

6. DISEÑO TEÓRICO

La fertilidad del suelo es la capacidad que tiene el terreno para sustentar el crecimiento de las plantas y optimizar el rendimiento de los cultivos. Ello puede potenciarse por medio de fertilizantes orgánicos e inorgánicos que nutran el suelo.

Es conocido el proceso de la erosión de la fertilidad de los suelos agrícolas en el Altiplano boliviano tanto en el Norte como en el sur del país, llegando a grado de desertización aguda, por la aridez de los suelos y la escasa precipitación, que generan suelos con baja cobertura vegetal y escasa reposición de materia orgánica. Estos problemas han generado disminuciones drásticas en la producción en los cultivos andinos, disminuyendo así los ingresos a los agricultores, induciendo a utilizar agroquímicos para aumentar su producción y así superar sus problemas. Los agroquímicos utilizados muchas veces no son los adecuados tanto que llegan a alterar la calidad y fertilidad del suelo o el uso indiscriminado del mismo también provoca la erosión. Frente a esta situación desde hace varios años se viene estudiando las propiedades de abonos orgánicos sólidos y líquidos (bioinsumos). Son una fuente alternativa para una agricultura sostenible, y son considerados como una herramienta biotecnológica (INTA, 2014), que permitiría utilizar recursos naturales renovables en la agricultura, orientadas a resolver diferentes problemas como el estrés hídrico (Pérez et al 2015).

6.1. Bioinsumos

El término bioinsumos hace referencia a los productos elaborados a partir de organismos benéficos tales como bacterias, hongos, virus, e insectos, o bien a extractos naturales obtenidos de plantas, y que pueden ser utilizados en la producción agrícola para controlar plagas, o promover el desarrollo de las plantas. Son productos que no dejan residuos tóxicos en el medio ambiente y cuya utilización no implica riesgos para la salud de los agricultores y de los consumidores.

Introducir este tipo de productos en semillas, en el suelo o en los sistemas de riego, ya sea en cultivos de leguminosas, gramíneas, hortalizas o frutales, depende de diversos factores: el tipo de suelo, la temperatura, las características climáticas de la zona, la cantidad de luz, la interacción con otros productos biológicos y agroquímicos, entre otros. Son aspectos cuyo manejo requiere un proceso de capacitación y acompañamiento por parte de las dependencias gubernamentales y de las empresas dedicadas a fabricar este tipo de productos a fin de ayudar a entender la mejor forma de utilizarlos para lograr mayores beneficios (Whelan A. 2013).

6.2. Los Biofertilizantes y sus beneficios

Los biofertilizantes son fertilizantes orgánicos que proporcionan a las plantas los nutrientes necesarios para su desarrollo, al mismo tiempo mejoran la calidad del suelo y ayudan a conseguir un entorno microbiológico más óptimo y natural.

Son imprescindibles para la agricultura ecológica, ya que ayudan a mejorar la producción agrícola y a conseguir grandes cosechas sin dañar en ningún momento el medio ambiente y siguiendo directrices totalmente respetuosas con el suelo, la naturaleza y el desarrollo sostenible. Estos biofertilizantes pueden presentar grandes ventajas como una producción a menor costo, protección del ambiente y aumento de la fertilidad y biodiversidad del suelo.

Por su uso, los biofertilizantes se podrían dividir en 4 grandes grupos de acuerdo a los mecanismos empleados para promover el crecimiento de las plantas (Acuña, 2003 y Kannaiyan, 2002); fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, captadores de fósforo y promotores del crecimiento vegetal (INTAGRI, 2014).

6.3. La quinua

Quinua (palabra derivada de la traducción al español de la palabra quechua - kinwa), es un grano originario de las tierras altas de la cordillera de los Andes. Tradicionalmente crece en suelos áridos y semiáridos, tiene una gran variedad de diversidad genética y excelente adaptabilidad para climas hostiles y diferentes ecosistemas. Perú y Bolivia tienen la mayor variedad de quinua (Guía de exhibición cancillería Bolivia).

La quinua es una planta herbácea de crecimiento anual, llegando a medir entre 0.20 a 3 metros de altura, este desarrollo va a depender de las condiciones ambientales. Una característica fundamental de la quinua es que el grano, las hojas y las inflorescencias son fuentes de proteínas de muy buena calidad. La calidad nutricional del grano es importante por su contenido de aminoácidos, siendo rico en lisina y azufrados, mientras que las proteínas de los cereales son deficientes en estos aminoácidos.

La quinua, es el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas y no contiene gluten (Oliva M. 2018). Los aminoácidos esenciales se encuentran en el núcleo del grano, a diferencia de otros cereales que los tienen en el exosperma o cáscara, como el arroz o trigo. (Fundación Milenio 2013).

6.4. Fases fenológicas de la quinua

La quinua presenta fases fenológicas bien marcadas y diferenciables, las cuales permiten identificar los cambios que ocurren durante el desarrollo de la planta. Se han determinado diez fases fenológicas (Mujica y Canahua, 1989):

- Emergencia: cuando la planta sale a la superficie, se produce entre los 7 y 10 días después de la siembra.
- Dos hojas verdaderas: momento de aparición de las dos hojas verdaderas.
- Cuatro hojas verdaderas: aparición de cuatro hojas verdaderas.
- Seis hojas verdaderas: aparición de seis hojas verdaderas y coloración amarilla de hojas cotiledonales.

- Ramificación: aparición de ocho hojas verdaderas, caída de hojas cotiledonales y crecimiento de “ramitas”. De los 31 a los 50 días desde la siembra.
- Panojamiento: emergencia de las primeras panojas con gran cantidad de hojitas, para luego sobresalir por encima de estas. De los 51 a los 99 días.
- Floración: momento de apertura de las primeras flores en la parte apical de la panoja. De los 100 a los 120 días.
- Grano lechoso: el grano al ser presionado presenta un líquido lechoso.
- Grano pastoso: el grano al ser presionado presenta consistencia pastosa de color blanco

6.5. Morfología

6.5.1. Raíz.

La raíz de quinua es del tipo pivotante, consta de una raíz principal de la cual salen un gran número de raíces laterales muy ramificadas. La longitud de las raíces es variable, de 0.8 a 1.5 m. Su desarrollo y crecimiento está determinado por el genotipo, tipo de suelos, nutrición y humedad entre otros factores.

6.5.2. El tallo.

Es la unión con el cuello de raíz es cilíndrico y a medida que se aleja del suelo se vuelve anguloso en las zonas de nacimiento de hojas y ramas. La corteza es firme y compacta formada por tejidos fuertes y lignificados. Cuando los tallos son jóvenes la médula es suave, cuando los tallos maduran la médula es esponjosa y seca y en la cosecha se cae y el tallo queda hueco o vacío.

6.5.3. Hojas

Las hojas tienen dos partes diferenciadas: el peciolo y la lámina. El peciolo de las hojas es largo y acanalado, su longitud depende de su origen; son más largos los peciolos que se originan directamente del tallo y más cortos los que se originan en las ramas. El color del peciolo puede ser verde, rosado, rojo y púrpura.

6.5.4. Inflorescencia

Es una panoja con una longitud variable de 15 – 70 cm. Generalmente se encuentra en el ápice de la planta y en el ápice de las ramas. Tiene un eje principal, ejes secundarios y eje terciarios. Considerando la forma y posición de los glomérulos (grupos de flores) se clasifican en amarantiformes, glomerulatas e intermedias.

6.5.5. Flores

Las flores son sésiles o pediceladas y están agrupadas en glomérulos. La posición del glomérulo en la inflorescencia y la posición de las flores dentro del glomérulo, determinan el tamaño y el número de los granos o frutos.

6.5.6. Fruto

Es un aquenio de forma lenticular, elipsoidal, cónico o esferoidal, cubierto por el perigonio sepaloide o las envolturas florales que rodean el fruto y se desprenden con facilidad a la madurez; sin embargo, en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la cosecha y el procesamiento industrial de los granos.

6.5.7. Semilla

Presenta tres partes bien definidas que son: epispermo, embrión y polispermo. El epispermo, es la capa que cubre la semilla y está adherida al pericarpio. El embrión, está formado por dos cotiledones y la radícula y constituye, aproximadamente, el 30% del volumen total de la semilla y envuelve al polispermo como un anillo, con una curvatura de 320 grados. La radícula, muestra una pigmentación de color castaño oscuro. El polispermo es el principal tejido de almacenamiento; reemplaza al endospermo y está constituido mayormente por granos de almidón, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la semilla.

6.6. Germinación

Las semillas de quinoa en condiciones adecuadas de humedad, oxígeno y temperatura pueden germinar rápidamente. El agua es esencial para la iniciación del proceso y el mantenimiento de un metabolismo apropiado. Las temperaturas del suelo son igualmente importantes para la iniciación del proceso (Mujica, et

al., 2005). La primera estructura en emerger es la radícula la cual se alarga hacia abajo dentro del suelo y da inicio a la formación del sistema radicular (Gómez y Aguilar, 2016). El hipocotilo sale de la semilla y crece hacia arriba y atraviesa el suelo o emerge llevando los cotiledones que se abren y se tornan verdes iniciando el proceso de fotosíntesis (Gómez y Aguilar, 2016). En este estado puede haber daños de pájaros y podredumbre radicular. Se considera una fase crítica ya que es afectado por los estreses de agua y temperatura (Gómez y Aguilar, 2016)

6.7. Fases de la germinación

1) *Imbibición* (F1). La primera etapa de la germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla desde el medio exterior, imbibición. La hidratación de los tejidos de la semilla es un proceso físico con una duración variable según la especie considerada.

2) *Germinación "sensu stricto"*(F2). Una vez que la semilla se ha hidratado adecuadamente, entra en una segunda etapa del proceso de germinación, la denominada fase de germinación "sensu stricto" (en sentido estricto), que se caracteriza, entre otros hechos, porque se produce una disminución en la absorción de agua por las semillas. Durante esta etapa tiene lugar una activación generalizada del metabolismo de la semilla, lo cual es esencial para que se desarrolle la última fase del proceso de germinación, la fase de crecimiento.

3) *Fase de crecimiento* (F3). En esta última fase de la germinación, paralelamente al incremento de la actividad metabólica, se produce el crecimiento y emergencia de la radícula a través de las cubiertas seminales.

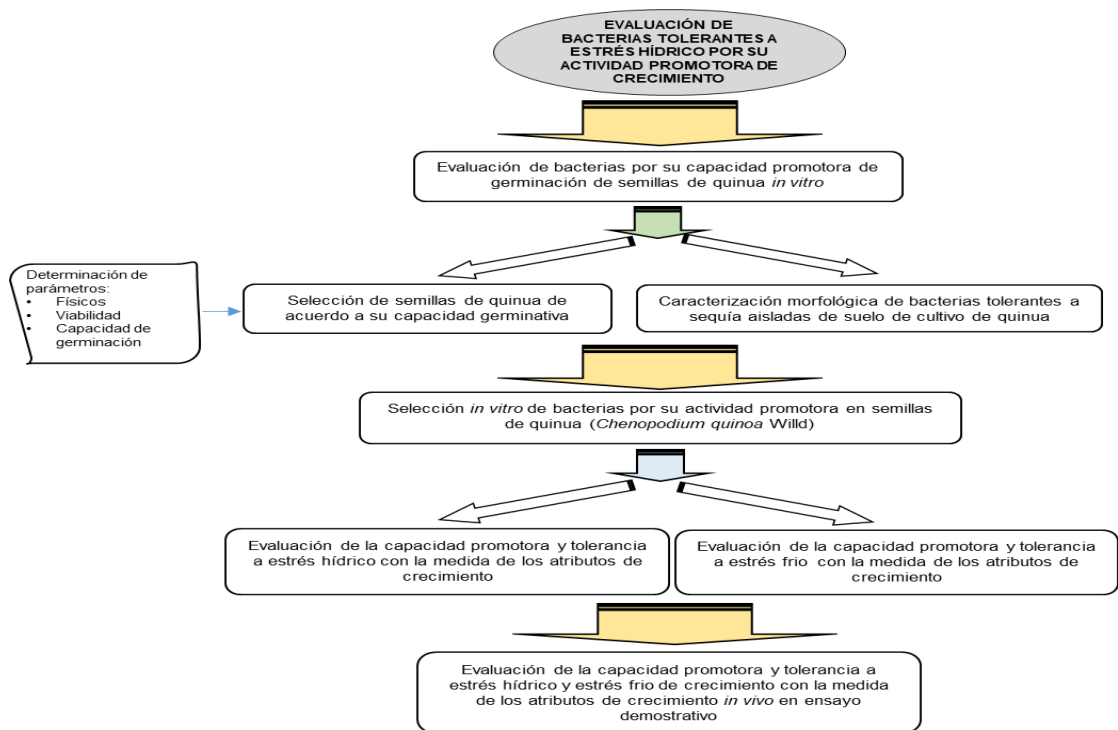
6.8. Factores que afectan la germinación

La germinación es un proceso que está influenciado por factores internos y externos. Dentro de los factores internos está la viabilidad, que se puede medir a través de la prueba bioquímica de tetrazolio y la madurez fisiológica que se alcanza al mismo tiempo que la morfológica, como en la mayoría de las especies cultivadas; o bien puede haber una diferencia de semanas, meses y hasta años entre ambas. (Universidad Politécnica de Valencia, 2003.); entre los factores externos están principalmente la humedad ya que la entrada de agua en el interior de la semilla de debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre

la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal; siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico. Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión. (Universidad Politécnica de Valencia, 2003.), la temperatura que influye directamente sobre las enzimas que tienen un máximo y mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio y los gases que las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. (Aicamaña K. 2018)

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Esquema General



7.2. Población en estudio.

Cinco ecotipos locales de la comunidad de Soniquera del departamento de Potosí, y 29 aislados bacterianos provenientes del Cepario del Instituto de

Investigaciones Fármaco Bioquímicas, de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, serán evaluados en el presente estudio.

Los aislados bacterianos fueron recuperados de suelos de cultivo de quinua de las comunidades de Soniquera-Potosí, Canquella-Potosí y Jayukota-Oruro, del sur del Altiplano de Bolivia. Estos aislados fueron recuperados en el marco del Proyecto "ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS DE CULTIVOS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) Y SU POTENCIAL PARA MEJORAR LA RESISTENCIA AL STRESS ABIÓTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE BIOINSUMOS" COSUDE, cuyas características se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Aislados bacterianos recuperados de suelos de cultivo de quinua provenientes de las comunidades de Soniquera (Z), Canquella (C) y Jayukota (J).

CODIGO NUMERAL ASIGNADO	CODIGO INICIAL DE AISLAMIENTO	Parámetros de aislamiento
4	16. Z1332 S+R/SF	Agar con NaCl (5 %)
12	7. C3232 -S1	Agar con NaCl (5 %)
74	1. C2232-S	Agar con NaCl (5 %)
77	4. C3232-1Suelo	Agar con NaCl (5 %)
79	10. C2230	Agar con NaCl (5 %)
13	8. C5232-S/SF	Agar con NaCl (5%) y Shock frio (-15°C durante 1 hora)
80	13. C4232-S/SF	Agar con NaCl (5%) y Shock frio (-15°C durante 1 hora)
15	86. J5230 B1	Agar con *PEG 15% (dilución 10 ⁻⁶ y agar con NaCl 2%)
73	49. J3230 A6	Agar con *PEG 15% (dilución 10 ⁻⁶ y agar con NaCl 2%)
107	J1230 B2	Agar con *PEG 15% (dilución 10 ⁻⁶ y agar con NaCl 2%)
16	J1230B	*PEG 15% (dilución 10 ⁻⁸ ; NaCl 5%)
19	J2230A	*PEG 15% (dilución 10 ⁻⁸ ; NaCl 5%)
23	J4230A	*PEG 15% (dilución 10 ⁻⁸ ; NaCl 5%)
24	J4333 SF2 B	*PEG al 8%
42	C1333 SF2	*PEG al 8%
72	Z3333 3D	*PEG al 8%
94	J4333-3	*PEG al 8%
50	C1230 B	*PEG 15%(dilución 10 ⁻⁸); NaCl (2%)
89	Z4230 A	*PEG al 30% (dilución 10 ⁻⁸)
134	Z4230 B	*PEG al 30% (dilución 10 ⁻⁸)
106/1	C1230 A	*PEG 30%(dilución 10 ⁻⁸); NaCl (2%)

126	C2230A	*PEG 30% y dilución 10 ⁻⁶); NaCl (5%)
134	Z4230 B	*PEG al 30% (dilución 10 ⁻⁸)
165	Z 3230 A	*PEG 15% (dilución 10 ⁻⁶)
156	C 2233 SF suelo	Agar con NaCl (5%) y Shock frio (-15°C durante 1 hora)
3Y	Suelo	Agar jNFb (dilución 10 ⁻⁸)
9Y	Suelo	Agar jNFb (dilución 10 ⁻⁸)

* PEG: Polietilen glicol 6000

7.3. **Ámbito en estudio.**

El ámbito de estudio se enmarcará principalmente en el desarrollo de bioinsumos como medida de resiliencia al cambio climático.

En estudios previos realizados de la comunidad de Soniquera del departamento de Potosí, la comunidad fue considerada en una de las zonas más vulnerables frente a los efectos del cambio climático, sin embargo, pudiera albergar ecotipos de quinua real, como recursos biológicos resilientes importantes, cuyas características adaptativas no han sido evaluadas y descritas. Por esta razón es de importancia estudiar ecotipos homogéneos adaptados a esta zona ya que la agricultura ha estado siempre basada en el acceso y al intercambio de semillas no en lo exclusivo, lo que considera dinámicas fuertes de experimentación y adaptación (Bazile D. 2015)

7.4. **Periodo de investigación.**

El tiempo estimado de investigación es de 8 meses, de acuerdo al cronograma detallado en la sección 8.

7.5. **Tipo de investigación.**

Los pasos a seguir en esta investigación es en base a un diseño cuali- cuantitativo, que permitirá explorar de forma cualitativa, porque actualmente no se presentan estudios específicos para comprender la acción de bacterias en etapa de germinación de semillas de quinua y cuantitativa ya que permitirá establecer orientaciones longitudinales de desarrollo de plántulas de quinua en determinados periodos.

Por otro lado, se realizará una investigación descriptiva para investigar con mayor amplitud y precisión los porcentajes de germinación de diferentes ecotipos de

quinua en cuanto a su adaptación asociados a diferentes condiciones ambientales de germinación.

La investigación será también de tipo experimental ya que consistirá en la manipulación de aplicaciones no comprobadas, en condiciones no controladas, con el fin de describir el efecto que causan las bacterias en la germinación de ecotipos de quinua.

7.6. Elaboración.

7.6.1. Análisis de parámetros físicos, de viabilidad y capacidad de germinación de ecotipos de quinua y de la variedad Real Noventón.

Para éste análisis se trabajará con 5 ecotipos de quinua (Amarilla, Negra, Pandela A, Pandela R y Roja rosada) provenientes de la Comunidad de Soniquera, seleccionados por su tolerancia a la sequía y helada, de acuerdo a la descripción aportada por los productores de la región.

Parámetros físicos

Pureza física, Humedad (contenido de agua), forma, color, diámetro y tamaño (Internacional Biodiversity et al, 2013)

Poder germinativo

Se determinará el poder germinativo y la calidad de las variedades de acuerdo al procedimiento descrito por Arenas L. (2017).

7.6.2. Ensayo de promoción de crecimiento vegetal por bacterización (Promoción de la germinación de semillas de quinua *in vitro*)

a) Ensayo en agar agua (WA)

Este ensayo permitirá evaluar bacterias y su potencial de promoción de crecimiento vegetal en semillas de quinua, bajo condiciones de estrés abiótico. Para ello, se utilizará el medio sólido Agar Agua (15g/L de agar agar), se evaluará la capacidad de las cepas seleccionadas para promover el desarrollo de la germinación en condiciones limitadas de nutrientes. Para ello, se empleará placas de agar nutritivo como control de referencia. Ambos medios

de cultivo serán preparados y esterilizados por calor húmedo a 121 °C durante 15min. 100uL de un cultivo activo de cada cepa bacteriana será inoculado por agotamiento empleando un asa de drigalsky. Se realizará un recuento de colonias a las 48hrs de incubación a 22 °C.

b) Preparación de las semillas

Para este ensayo se emplearán semillas seleccionadas, para la evaluación de germinación por bacterización de acuerdo a protocolo descrito por Yañez – Yazlle M.F., (2021). Para ello, se realizará la desinfección de semillas con solución de hipoclorito de sodio de concentración (0,2% en v/v) por 5 minutos con agitación constante de 150 rpm, seguidamente se eliminará la fracción líquida y se adicionará etanol (70°GL) agitando 5 minutos a 150 rpm, a continuación, se procederá al lavado de las semillas con agua potable estéril por 3 veces.

c) Preparación del inóculo bacteriano

Para la preparación del inóculo, se activarán las cepas bacterianas criopreservadas en caldo nutritivo y después de un segundo sub-cultivo en el mismo medio se ajustará la densidad celular al tubo n°1 de la escala de MacFarland ($3 \cdot 10^8$ ufc/mL) resuspendiendo las colonias en tubos con agua destilada estéril.

d) Bacterización de semillas de quinua desinfectadas

Con las semillas previamente desinfectadas y el inóculo preparado se procederá a la bacterización de las semillas por un tiempo de 20 minutos en agitación constante de 150 rpm, se empleará una proporción 160semillas:100mL de suspensión bacteriana para luego proceder a la recuperación de semillas a través de filtración, empleando papel filtro whatman n°1. Todo el procedimiento se realizará en condiciones estériles. 40 semillas bacterizadas serán depositadas en la superficie de cuatro placas de agar agua para germinación, en número de 10 semillas por cada placa. La germinación será efectiva en cámara de cultivo a temperatura ambiente en

condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, la cual se evaluará diariamente hasta completar los 7 días. Para este ensayo además se emplearán semillas bacterizadas con cepas de referencia con capacidad promotora de crecimiento como control (+) y semillas sin bacterizar como control abiótico (-)

e) *Medidas fenotípicas*

De todos los ensayos realizados se registrará indicadores de crecimiento vegetal: porcentaje de germinación (G) por día y los atributos de crecimiento: longitud total de la plántula (PT), longitud de la raíz primaria (LR) para cada plántula, longitud de tallo (LT) y peso seco (PS) para cada repetición.

f) *Determinación del Índice de Crecimiento Relativo*

Todos los datos colectados serán combinados y ponderados de acuerdo a los datos obtenidos con el control abiótico. Luego se aplicará la siguiente fórmula para la determinación del Índice de Crecimiento Relativo (RGI) para cada uno de los ensayos, de acuerdo a lo descrito por Yañez – Yazlle M.F., (2021).

$$RGI = \frac{G_t}{G_c} * \frac{\frac{TL_t}{TL_c} + \frac{RL_t}{RL_c} + \frac{PWE_t}{PWE_c}}{a}$$

Dónde: G_t: Número de germinados test, G_c: Número de germinados del control. TL_t: longitud de tallo test, TL_c: longitud de tallo control, RL_t: longitud de raíz test, RL_c: longitud de raíz control, PWE_t: peso seco de plántula test, PWE_c: peso seco plántula control, *a*: número de atributos evaluados.

g) *Análisis estadístico*

Todos los datos serán analizados empleando Anova de dos vías (p<0.05) y análisis de comparación múltiple mediante Test de Dunnet (p<0.05) empleando el paquete estadístico Prism 6 GraphPad.

7.6.3. Ensayo de promoción de crecimiento vegetal por bacterización en condiciones normales, de estrés hídrico y estrés por frío (Promoción de la germinación de semillas de quinua *in vitro*)

a) *Ensayo en agar agua (WA) en condiciones de estrés hídrico*

Para este ensayo se empleará el procedimiento descrito previamente en la sección 7.6.2. con la siguiente modificación: en la preparación del medio se utilizará agar agua (15g/L de agar agar), el que será esterilizado por calor húmedo a 121 °C durante 15min. Seguidamente se procederá a la preparación de Polietilen Glicol 6000 (20%, p/v) en agua destilada estéril, esta solución será esterilizada por filtración al vacío empleando una membrana de 0,22 µm. La solución estéril de PEG al 20% se depositará en placas de agar agua en relación 1:1 (v/v) permaneciendo durante 24 horas, para luego ser retirado el exceso hasta sequedad completa de superficie. Todo el procedimiento será realizado en condiciones estériles.

b) *Preparación de las semillas*

Se trabajará de acuerdo a lo mencionado previamente en el inciso b de 7.6.2. De las semillas de quinua a utilizarse, cinco son ecotipos locales y utilizados como semilla de productores (Comunidad Soniquera – Villa Alota) y una variedad certificada (INIAF) (Tabla 2).

Tabla 2. Procedencia de ecotipos y variedad de semillas de quinua en estudio

CODIGO	ECOTIPO	VARIEDAD	PROCEDENCIA	NOBRE DE PRODUCTOR
AM	Amarilla		Soniquera – Potosí	Sonia Bautista
NE	Negra		Soniquera – Potosí	Sergio López
PA	Pandela		Villa Alota	Sergio Huanca
PR	Pandela		Soniquera – Potosí	Roberta Huanca
RoR	Roja Rosada		Soniquera – Potosí	Tomas Bernal

RN		Real Noventon	Irpani Salinas de Garcí Mendoza - Oruro	Pánfilo Perez
----	--	------------------	---	---------------

Cada uno de los ecotipos y la variedad mencionada serán analizados y germinadas por separado, con cada una de las bacterias seleccionadas en estudio.

c) Preparación del inóculo bacteriano

Se trabajará de acuerdo a la descripción del inciso c de 7.6.2

d) Bacterización de semillas de quinua desinfectadas

En esta sección se trabajará de acuerdo a protocolo descrito en el inciso d de la sección 7.6.2, y para la prueba de estrés frío, las condiciones de germinación serán en cámara frigorífica (5.5 °C) en completa oscuridad.

7.6.4. Caracterización de bacterias seleccionadas como promotoras de crecimiento vegetal, tolerantes a estrés hídrico y frío.

Las cepas bacterianas en estudio se seleccionarán en función a su capacidad promotora de crecimiento en condiciones normales, estrés hídrico y estrés por frío. Así mismo, las bacterias seleccionadas serán caracterizadas de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica en agar nutritivo incubándolas a 20°C durante 48 horas, se determinará su aptencia tintorial a Gram y se caracterizarán por reacciones bioquímicas que servirán, para su posterior clasificación.

La respuesta fisiológica a las siguientes características bioquímicas se llevará a cabo mediante pruebas bioquímicas para fermentación de azúcares en medio TSI (Hierro triple azúcar), catalasa, motilidad, Indol, Citrato y Rojo de metilo.

7.6.5. Evaluación de mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal de cepas tolerantes a estrés hídrico

a) Evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico

Para la evaluación de cepas bacteriana, se empleará medio de cultivo Ashby Manitol, agar (15 g/L) (Avellana, 2007), el cual será esterilizado por calor

húmedo a 121 °C por 15 min., como prueba cualitativa que permite identificar bacterias en medio carente de nitrógeno.

b) Evaluación de bacterias solubilizadoras de fosfato

Prueba cualitativa que permitirá identificar la conversión de fosfato insoluble en formas solubles y asimilables, para la evaluación se trabajará con el medio NBRIP y agar bacteriológico (15g/L) (Nautiy, 1999), el cual será esterilizado en mismas condiciones descritas en el anterior procedimiento.

c) Evaluación para la determinación de la producción de ácido acético indol (AIA)

Para la evaluación de este mecanismo se utilizará el medio JNFB suplementado con triptófano 0,2% (W/V), como precursor de la fitohormona (Ortuño et al, 2013), el cual será esterilizado según descripción de anteriores evaluaciones, mismo que permitirá determinar la producción de ácido 3-indol acético (AIA)

7.6.6. Promoción de la germinación y crecimiento de semillas de quinua *in vivo* (Ensayo en macetas demostrativas)

Ensayos *in vivo* serán realizados con las cepas bacterianas seleccionadas en anteriores experimentos como las mejores promotoras de crecimiento y las mejores tolerantes a estrés hídrico de forma axénica. Para ello se trabajará tomando en cuenta como variables: cepa promotora P y cepa tolerante T. Se tomará en cuenta dos niveles de riego: riego normal (condiciones normales, 100 % de riego de acuerdo a capacidad de campo) y riego deficitario (estrés hídrico, 50 % de riego de acuerdo a capacidad de campo).

El total de experimentos a realizar será tomando en cuenta tres variables y dos niveles para la elaboración de la matriz $2^3 = 8$, Las variables son: cepa promotora P, cepa tolerante T y abiótico A (sin bacterización); los niveles son: riego deficitario y riego normal (50% y 100% de capacidad de campo y 50% de capacidad de campo). Para cada experimento se trabajará con 10 repeticiones haciendo un total de 80 unidades muestrales. La densidad de siembra contemplada en cada maceta será de 10 semillas por maceta,

Todo el desarrollo del experimento se realizará en instalaciones del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

a) Ensayo en macetas, preparación y tratamiento del sustrato

Este ensayo permitirá comprobar la eficacia de las cepas seleccionadas como promotoras de crecimiento, tolerantes a estrés hídrico y estrés por frío, en ambos casos la mejora en el crecimiento de una plántula de quinua. Para el ensayo se utilizarán macetas, bolsas de polietileno de baja densidad de 8,8 cm de ancho por 22,5 cm de largo, con capacidad para 1,5 Kg de suelo como sustrato, a las cuales se les realizará un corte en la parte inferior para drenaje.

Para la preparación del sustrato se trabajará con suelo no estéril al que se adicionará agua potable hasta su capacidad de campo requerida, de acuerdo a cálculo de humedad relativa específica; con el sustrato preparado se rellenará cada una de las macetas con un kilogramo de sustrato un día previo a la siembra de semillas.

b) Preparación de las semillas antes de la siembra e inóculo promotor de crecimiento

Para este ensayo se empleará semillas de quinua de la variedad Real Noventon, semilla certificada tipo 2 por sus características.

Para la preparación del inóculo se activaran las cepas bacterianas criopreservadas seleccionadas en caldo nutritivo y después de un segundo sub-cultivo en caldo papa, para luego ajustar la densidad celular al tubo n°3 de la escala de MacFarland (9×10^8 ufc/mL), el cultivo permanecerá entre 18 a 24 horas en incubación a temperaturas entre 20 a 25°C. Pasado el tiempo de incubación se tomará 3% como inóculo para su aplicación en un volumen de 40 mL de caldo papa y se llevará a incubación en constante agitación a una temperatura de 18 a 24°C por un tiempo mínimo de 48 horas.

c) Preparación del inóculo bacteriano por encapsulamiento

Para la preparación de encapsulados bacterianos se empleará un formulado que contiene un protector celular a base a carragenina (Gutierrez C., 2019), para ello se procederá a preparar perlas de carragenina con el inóculo

previamente preparado de acuerdo a la descripción del inciso c de 7.6.2, en principio se preparará una disolución de 2,44 gramos de carragenina con 40 mL de agua destilada estéril por calor húmedo a 121 °C durante 15min.

Seguidamente se llevará a incubación por un tiempo de 20 minutos a 40°C la disolución de carragenina e inóculo bacteriano con la cepa seleccionada, a continuación, se procederá a mezclar el inóculo con disolución de carragenina 1:1 en (V/V) para proceder a encapsulamiento y posterior almacenamiento antes de su aplicación.

d) Método de siembra de semillas de quinua.

Se empleará el método de siembra localizado, para lo cual en la parte central se empleará una densidad de siembra de 10 semillas por maceta, las cuales serán cubiertas con 280 a 300 gramos de sustrato preparado que dejen a las semillas a una profundidad de 2 centímetros por debajo de la superficie.

En las macetas con tratamiento de cepa promotora de crecimiento, en principio se adicionará 3 gramos de perlas de inóculo bacteriano, a continuación, las semillas y por último la cubierta con el sustrato preparado en las mismas condiciones que la anterior siembra, se colocará una capa de paja delgada para reducir la pérdida de humedad y proteger la emergencia de la plántula y crecimiento en todos los casos de siembra.

EL diseño experimental se realizará de acuerdo a esquema 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (Tabla N°3).

Tabla N°3: Diseño experimental con 10 réplicas para esquema de trabajo en macetas.

1) Esquema: Estrés Hídrico - Control	2) Esquema: Promotora con estrés hídrico
<p style="text-align: center;">Semilla</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Hojas verdaderas (20 – 25 días)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Riego deficitario</p>	<p style="text-align: center;">Semilla + Cepa P</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Hojas verdaderas (20 – 25 días)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Riego deficitario</p>
3) Esquema: Evaluación cepa tolerante	4) Esquema: Sinergismo cepa promotora y tolerante en estrés hídrico

Semilla ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) + Cepa T ↓ Riego deficitario	Semilla + Cepa P ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) + Cepa T ↓ Riego deficitario
5) Esquema: Control sin estrés hídrico	6) Esquema: Acción cepa promotora en condición normal
Semilla ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) ↓ Riego normal	Semilla + Cepa P ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) ↓ Riego normal
7) Esquema: Posible patogenicidad	8) Esquema: Sinergismo cepa promotora y tolerante en condición normal
Semilla ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) + Cepa T ↓ Riego normal	Semilla + Cepa P ↓ Hojas verdaderas (20 – 25 días) + Cepa T ↓ Riego normal

Cepa **P**: cepa seleccionada como promotora de crecimiento vegetal; Cepa **T**: cepa seleccionada como tolerante a estrés hídrico

e) Preparación del inóculo de cepa tolerante a estrés hídrico y aplicación

A partir de un criovial se activará cepa tolerante a estrés hídrico y se procederá de acuerdo al inciso c de la sección 6.7.3 descrito anteriormente.

Para la formulación del inóculo bacteriano se trabajará en base a grano partido de quinua, con ajuste de pH, tomando en cuenta la siguiente distribución 25% de grano partido de quinua, 6% de solución buffer, 39% de agua y 30% de inóculo bacteriano. Para la aplicación con el inóculo preparado, se adicionará a los tratamientos designados como 3, 4, 7 y 8 con 3 gramos de inóculo de cepa tolerante (3g/maceta) alrededor del pseudotallo con aporque de 200

gramos de sustrato, las plantas permanecerán en crecimiento hasta completar inicio de inflorescencia.

f) Evaluación del estrés hídrico.

A partir de la inoculación de cepa tolerante el riego será suprimido en los tratamientos designados con los números 1, 2, 3 y 4 hasta el 50% del total de capacidad de campo y en los tratamientos designados con los números 5, 6, 7 y 8 continuarán con el riego normal del 100% de la capacidad total de campo.

g) Evaluación de fases del ciclo fenológico de la etapa vegetativa.

Para evaluar las etapas del ciclo fenológico de la etapa vegetativa se registrarán los cambios externos visibles del proceso de desarrollo de la plántula. La quinua presenta fases fenológicas bien marcadas y diferenciables, las cuales permiten identificar los cambios que ocurren durante el desarrollo de la planta, de la que se evaluará días a germinación-emergencia, aparición de primera hoja verdadera, días a formación de 4 hojas verdaderas, días a formación de 6 hojas verdaderas y aparición de inflorescencia

A todos los ensayos realizados se registrará indicadores de crecimiento vegetal: porcentaje de germinación y emergencia (GE) por día a partir del tercer día y los atributos de crecimiento: longitud total de la plántula (PL), longitud de la raíz primaria (LR), peso de la raíz (PR), Número de hojas (NH) para cada plántula, longitud de tallo (LT) y peso seco (PW) para cada repetición.

h) Labores culturales de mantenimiento y cuidado

Se realizará mullido, raleo o desahije y aporque, con el fin de permitir el desarrollo óptimo de las plantas y evitar estrés por competencia de nutrientes.

Las labores de mantenimiento de mullido será para romper la corteza que se forma en el suelo y facilitar así la aireación de la plántula, el apoque permitirá el anclaje de las plantas y el suministro de nutrientes; el raleo, se realizará para controlar la densidad de siembra determinada en el ensayo y de acuerdo a la emergencia de las plántulas. Todas las labores culturales y control de crecimiento serán evaluados por día de crecimiento detallado en el cuadro 2.

Cuadro N°2: Diseño central de actividades culturales según esquema de trabajo en macetas experimentales de siembra de semillas de quinua por etapa fenológica.

FECHA	DÍAS ANTES Y DESPUÉS DE LA SIEMBRA	ETAPA FENOLÓGICA	ACTIVIDADES A REALIZARSE
	-3	-	Control condiciones ambientales
	- 2	-	Preparación de inóculos
	-1	-	Preparación de suelos para macetas
	0	Siembra	Siembra directa y localizada
	1		Verificación estado de macetas, control condiciones ambientales
	4		Control de emergencia, aplicación de riego normal
	5		Control de emergencia y presencia de hojas falsas
	6		Control de emergencia y presencia de hojas falsas
	7	Emergencia	Control de emergencia y presencia de hojas falsas
	8	Emergencia	Control de emergencia y presencia de hojas falsas, aplicación de riego normal
	9	Emergencia	Control de emergencia y determinación de % Germinación
	10	Emergencia	Control de emergencia y presencia de hojas falsas
	11	Emergencia	Control de emergencia
	12	Emergencia	Control de emergencia y determinación de % Total de Germinación, aplicación de riego
	15	Dos hojas verdaderas	Primera evaluación de observaciones fenológicas
	18	Dos hojas verdaderas	Aplicación de bioinsumo (cepa tolerante), aporque, aplicación de riego normal
	20	Dos hojas verdaderas	Segunda evaluación de observaciones fenológicas
	22	Dos hojas verdaderas	Labores culturales de Raleo o desahíje, aplicación de riego deficitario
	25	Cuatro hojas verdaderas	Tercera evaluación de observaciones fenológicas y aplicación de Riego diferenciado.

	26	Cuatro hojas verdaderas	Aplicación de bioinsumo (cepa tolerante) y aplicación de riego diferenciado.
	30	Cuatro hojas verdaderas	Cuarta evaluación de observaciones fenológicas Aplicación de riego diferenciado.
	34	Cuatro hojas verdaderas	Aplicación de riego diferenciado.
	35	Seis hojas verdaderas	Quinta evaluación de observaciones fenológicas
	38	Seis hojas verdaderas	Aplicación de riego diferenciado.
	42	Seis hojas verdaderas	Aplicación de riego diferenciado.
	45	Seis hojas verdaderas	Sexta evaluación de observaciones fenológicas
	46	Ramificación	Aplicación de riego diferenciado.
	50	Ramificación	Aplicación de riego diferenciado.
	55	Panojamiento	Séptima evaluación de observaciones fenológicas
	56	Panojamiento	Muestreo destructivo
	100	Trasplante	Octava evaluación de observaciones fenológicas

i) Determinación del Índice de Crecimiento Relativo

Todos los datos colectados serán combinados y ponderados de acuerdo a los datos obtenidos con el control abiótico. Luego se aplicará la siguiente fórmula para la determinación del Índice de Crecimiento Relativo (RGI) para cada uno de los ensayos, de acuerdo a lo descrito por Yañez – Yazlle M.F., (2021).

$$RGI = \frac{GE_t}{GE_c} * \frac{\frac{PL_t}{PL_c} + \frac{LR_t}{LR_c} + \frac{PR_t}{PR_c} + \frac{NH_t}{NH_c} + \frac{PR_t}{PR_c} + \frac{LT_t}{LT_c} + \frac{PW_t}{PW_c}}{a}$$

Donde: GE_t: Número de germinados y emergidos test, GE_c: Número de germinados y emergidos control. LT_t: longitud de tallo test, LT_c: longitud de tallo control, RL_t: longitud de raíz test, RL_c: longitud de raíz control, PWE_t: peso seco de plántula test, PW_c: peso seco plántula control, PR_t: peso de la raíz test, PR_c: peso de la raíz control *a*: número de atributos evaluados.

j) Análisis estadísticos

Todos los datos de referencia serán introducidos y determinados por análisis estadístico de varianza para cada uno de los atributos y su respectivo índice de crecimiento, empleando Anova de dos vías ($p < 0.05$) y análisis de comparación múltiple mediante Test de Dunnet ($p < 0.05$) empleando el paquete estadístico Prism 6 GraphPad

7.6.7. Evaluación de la morfología y rendimiento

a) Trasplante de plántulas

Las plántulas producidas en recipientes son más precoces y más uniformes que las producidas en el campo. Su crecimiento puede controlarse fácilmente a través del manejo de la luz, los riegos y nutrientes (Cerny et al., 2004). Para continuar con el estudio de los estados fenológicos de la variedad Real Noventon, después de cuantificar los días de hojas verdaderas, días a ramificación (DR), días a Panojamiento (DP), se procederá al trasplante de plántulas de maceta a suelo para determinar las variables de respuesta agronómica: días a floración (DF), días a grano lechoso (DGL), días a grano pastoso (DGP), días a madures fisiológica (MF); cada una de las fases, se tomará desde la siembra.

Para el trasplante a lugar definitivo, se realizará una remoción de suelo de cultivo de papa de campaña anterior, labor que será realizada de forma manual, para permitir el desarrollo normal de las raíces de las plántulas trasplantadas. El trasplante se realizará cuando las plántulas completen la edad respectiva en maceta y estas estarán sometidas a condiciones ambientales naturales hasta completar todo su ciclo fenológico.

b) Cosecha, secado y trillado

Para ello se observará el momento óptimo de cosecha (Rodas V. 2018) de acuerdo a el color de la panoja, el color de las hojas, maduración del grano y desprendimiento de grano de panoja.

El corte de los tallos se realizará de forma manual a una altura de entre 5 a 10 cm por encima del cuello de la planta, para luego llevar a secado por un tiempo

8. BIBLIOGRAFÍA

Moreno Sanguña V.A. (2016); Validación del protocolo de control interno de calidad para la producción de semillas de quinua variedad (INIAP *Tunkahuan*), bajo dos tipos de fertilización; Quito – Ecuador.

Historia y domesticación: Mujica, A.; Jacobsen, S.E.; Izquierdo, J.; y Marathe, J. P. (Editores). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.); Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro FAO. Santiago de Chile. 2001.

Arenas Rivera L. C.; Calidad y Germinación de Semillas de Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd*). Almacenadas Artesanalmente por Productores; Universidad De Ciencias Aplicadas Y Ambientales U.D.C.A; Bogotá D.C 2017

Aquino Huichi F.; (2010-2013); Análisis de los factores determinantes en la producción orgánica de quinua en el Distrito de Cabana; Puno Perú 2015

Niniquispe Zare V. P.; (2014); Caracterización Proximal de la Quinoa V(*Chenopodium Quinoa Willd*) Variedad Salcedo inia del Caserio Colpiun del Distrito de Humachuco en la Provincia de Sanchez de Carrión; Trujillo Perú 2014

Consuelo Montes- Rojas, Guido Ary Burbano G., Muñoz E. F. (2018); Description of phenological cycle of four ecotypes of (*Chenopodium quinoa* Willd.), at Puracé – Cauca, Colombia

Carolina Alanoca Quispe, Delma Guzman (2012); Evaluación de la germinación de accesiones del Banco de Germoplasma de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) del Estado Plurinacional de Bolivia; Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, Av. Blanco Galindo Km 5.5, Casilla 832, Cochabamba, Bolivia

Tapia, M. (1979). La Quinoa y la Kañahua. Cultivos Andinos. Serie de libros y materiales educativos N°40. IICA/CATIE Oficina Regional para América Latina. Bogotá, Colombia.

Chaparro D., Pismag R., y Elizalde A.((2011); Efecto de la germinación sobre el contenido de hierro y calcio en amaranto, quinua, guandul y soya; Facultad de Ciencias Agropecuarias. Popayán- Colombia.

Montes R. C., Ary B. G., et all; (2018); Descripción del ciclo fenológico de cuatro ecotipos de (*Chenopodium quinua* Willd.), en Puracé – Cauca, Colombia

Nunez T. N. (2015); La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) alternativa de seguridad alimentaria para zonas desérticas; Revista Ciencia y Desarrollo; Tacna Perú

Rocha N., Claros M. et all. (2019); Selección de bacterias endófitas tipo *Bacillus* como promotoras de crecimiento n el cultivo de papa variedad Huaycha (*Solanum uberosum* subsp. *andigena*); Revista Latinoamericana de la Papa

Farfan R. D.; (2017); Microorganismos promisoriosfijadores de nitrógeno, movilizadores de fósforo y potasio para la formulación de un Bioinsumo de uso agrícola; Universidad Distrital Francisco José de Caldas; Bogotá Colombia.

Rodas A. V. E.; (2018); Evaluación Del Comportamiento Del Trasplante De La Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) De Bandejas A Campo En Sus Diferentes Fases Fenológicas En Kiphakiphani, Viacha; Universidad Mayor de San Andrés La Paz – Bolivia.

De La Vega P. S.; (2022); Evaluación de la fenología, morfología y rendimiento de seis cultivares de quinua (*Chenopodium quinoa* Will) en condiciones agroecológicas de Vilcabamba - Grau – Apurímac; Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac; Abancay, Perú

Bernardo R. J. A.; (2020); Respuesta De Una Población M3 De Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Var. Amarilla Marangani Al Mildiu (*Peronospora Variabilis*) En La Molina; Universidad Nacional Agraria La Molina; Lima – Perú