

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de *Trifolium pratense* peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero, Ayacucho 2019

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR:
Enrique Hinostroza Ccenta**

Ayacucho - Perú

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS

Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de *Trifolium pratense* peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero, Ayacucho 2019

Expedito : 09 de diciembre de 2020

Sustentado : 23 de diciembre de 2020

Calificación : Muy Bueno

Jurados :



M.Sc. JOSÉ ANTONIO QUISPE TENORIO
Presidente



M.Cs. ROBERTA ESQUIVEL QUISPE
Miembro



Ing. DIMAS QUINTANILLA MELGAR
Miembro



Ph.D. NERY LUZ SANTILLANA VILLANUEVA
Asesora

A mi madre Esperanza, por enseñarme los valores de la responsabilidad, puntualidad y el amor.

A mis hermanos: Richard, Jhon y Leidy por acompañarme y aconsejarme en cada paso de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradecimiento a la prestigiosa Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, institución en la cual me formé y pude desarrollarme profesionalmente.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Escuela Profesional de Agronomía en especial a los docentes, quienes me brindaron los conocimientos necesarios para terminar mi carrera profesional satisfactoriamente.

A la Blga PhD. Nery Santillana Villanueva, asesora del presente trabajo, que con su paciencia y conocimientos me guio a lo largo de la realización y culminación de mi tesis.

Al Programa de Investigación en Pastos y Ganadería, en especial al laboratorio de Rhizobiología por brindarme sus ambientes para poder desarrollar el presente trabajo de investigación.

A mis amigos, que me apoyaron durante la realización del presente trabajo de investigación

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
CAPÍTULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. ANTECEDENTES	4
1.2. EL TREBOL ROJO.....	5
1.2.1. Origen e historia	5
1.2.2. Importancia.....	5
1.2.3. Clasificación taxonómica	6
1.2.4. Descripción botánica	6
1.2.5. Requerimientos climáticos y edáficos	7
1.2.6. Trébol rojo variedad Quiñequeli.....	7
1.2.7. Situación forrajera del Perú	7
1.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.....	8
1.3.1. Generalidades	8
1.3.2. El proceso de fijación biológica del nitrógeno	9
1.3.3. Factores que afectan la fijación biológica del nitrógeno (FBN).....	9
1.3.4. <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii.....	11
1.4. INOCULACIÓN DE SEMILLAS	11
1.4.1. Inoculante	11
1.4.2. Ventajas de la inoculación.....	13
1.5. PELETIZACIÓN DE SEMILLAS.....	13
1.5.1. Materiales de recubrimiento usados para la peletización de semillas	14
1.5.2. Materiales adherentes usados para la peletización de semillas	16

CAPÍTULO II.....	17
METODOLOGÍA.....	17
2.1. UBICACIÓN.....	17
2.1.1. Ubicación política.....	17
2.1.2. Ubicación geográfica.....	17
2.1.3. Ubicación ecológica.....	17
2.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	18
2.2.1. Materiales de laboratorio.....	18
2.2.2. Materiales de recubrimiento.....	18
2.2.3. Materiales adherentes.....	19
2.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS.....	19
2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
2.5. TRATAMIENTOS.....	20
2.6. INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO.....	22
2.6.1. Preparación de tratamientos.....	22
2.6.2. Viabilidad de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> en semillas peletizadas de trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>) en condiciones de laboratorio.....	22
2.6.3. Viabilidad de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> en semillas peletizadas de trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>) en condiciones de invernadero.....	25
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
CAPÍTULO III.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1. VIABILIDAD DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> EN SEMILLAS PELETIZADAS DE TRÉBOL ROJO (<i>Trifolium pratense</i>) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	27
3.1.1. Población bacteriana a los 0 días.....	27
3.1.2. Población bacteriana a los 7 días.....	29
3.1.3. Población bacteriana a los 12 días.....	32
3.1.4. Población bacteriana a los 18 días.....	34
3.1.5. Población bacteriana a los 24 días.....	37
3.1.6. Tendencia de la dinámica poblacional.....	39
3.2. VIABILIDAD DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> EN SEMILLAS PELETIZADAS DE TRÉBOL ROJO (<i>Trifolium pratense</i>) EN CONDICIONES DE INVERNADERO.....	42

3.2.1. Índice de nodulación a los 0 días.....	42
3.2.2. Índice de nodulación a los 7 días.....	44
3.2.3. Índice de nodulación a los 12 días.....	46
3.2.4. Índice de nodulación a los 18 días.....	49
3.2.5. Índice de nodulación a los 24 días.....	51
3.2.6. Tendencia del índice de nodulación	54
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Tratamiento para condiciones de laboratorio.....	21
Tabla 2.2. Tratamiento para condiciones de invernadero	21
Tabla 2.3. Indicadores para la determinación del IN	26
Tabla 3.1. Análisis de varianza del número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 0 días.....	27
Tabla 3.2. Análisis de varianza del número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 7 días.....	30
Tabla 3.3. Análisis de varianza del número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 12 días.....	32
Tabla 3.4. Análisis de varianza del número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 18 días.....	35
Tabla 3.5. Análisis de varianza del número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 24 días.....	37
Tabla 3.6. Ecuación para la determinación exacta del tiempo máximo post peleteado que la población de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> se encuentra con valores superiores a 1000 rizobios/semilla	39
Tabla 3.7. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado .	42
Tabla 3.8. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado .	45
Tabla 3.9. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 12 días post peleteado	47
Tabla 3.10. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 18 días post peleteado	50
Tabla 3.11. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 24 días post peleteado	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 3.1. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 0 días.	28
Figura 3.2. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 0 días.....	29
Figura 3.3. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 7 días.	30
Figura 3.4. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 7 días.....	31
Figura 3.5. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 12 días.	33
Figura 3.6. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 12 días.....	34
Figura 3.7. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 0 días.	35
Figura 3.8. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 18 días.....	36
Figura 3.9. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 24 días.	38
Figura 3.10. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> /semilla a los 24 días.....	39
Figura 3.11. Dinámica poblacional de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> en cinco tratamientos a través del tiempo, en condiciones de laboratorio.....	41
Figura 3.12. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 0 días.....	43
Figura 3.13. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado.....	44
Figura 3.14. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de	

nodulación del trébol rojo a los 7 días.....	45
Figura 3.15. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 7 días post peleteado.....	46
Figura 3.16. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 12 días.....	48
Figura 3.17. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 12 días post peleteado.....	49
Figura 3.18. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 18 días.....	50
Figura 3.19. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 18 días post peleteado.....	51
Figura 3.20. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 24 días.....	53
Figura 3.21. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 24 días post peleteado.....	54
Figura 3.22. Índice de nodulación de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> en cinco tratamientos a través del tiempo, en condiciones de invernadero.	56

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Evaluaciones de resultados a los 0 días	65
Anexo 2. Evaluaciones de resultados a los 7 días	65
Anexo 3. Evaluaciones de resultados a los 12 días	66
Anexo 4. Evaluaciones de resultados a los 18 días	66
Anexo 5. Evaluaciones de resultados a los 24 días	67
Anexo 6. Datos ordenados de la población de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	67
Anexo 7. Índice de nodulación a los 0 días	68
Anexo 8. Índice de nodulación a los 7 días	69
Anexo 9. Índice de nodulación a los 12 días	70
Anexo 10. Índice de nodulación a los 18 días	71
Anexo 11. Índice de nodulación a los 24 días	72
Anexo 12. Panel fotográfico	73

RESUMEN

La investigación se desarrolló con el fin de evaluar la viabilidad del *Rhizobium leguminosarum* bv. en semillas de *Trifolium pratense* (Trébol rojo) peletizadas con diferentes materiales y en condiciones de laboratorio e invernadero. Los tratamientos en laboratorio fueron: T1= Goma Arábica + Carbonato de Calcio (control), T2= Maicena + Roca fosfórica, T3= Maicena + Harina de Trigo, T4= Melaza de caña + Roca fosfórica y T5= Melaza de caña + Harina de Trigo. En condiciones de invernadero se usaron los mismos tratamientos agregando un tratamiento (Testigo) que son semillas sin peletizar. El experimento se condujo en el diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones en condiciones de solarío y cuatro repeticiones en condiciones de invernadero, y se realizó 5 muestreos (0, 7, 14, 18 y 24 días). En condiciones de laboratorio el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* por semilla se determinó utilizando la técnica de dilución e infección en plantas. Los resultados se sometieron a un análisis de variancia y la prueba de significación de Tukey ($p=0.05$). El tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) mantiene el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 17 días post peleteado. Los tratamientos T3 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica) mantienen el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 16 días post peleteado. El tratamiento T5 (Melaza de caña + harina de trigo) mantiene adecuada viabilidad de los rizobios en las semillas solamente hasta los 11 días. En condiciones de invernadero los tratamientos T2 (Maicena + roca fosfórica), tratamiento T3 (Maicena + harina de trigo), muestran un buen índice de nodulación hasta los 18 días postpeleteado, el tratamiento T4 (Melaza + roca fosfórica) solo hasta los 7 días postpeleteado y el tratamiento T5 (Melaza de caña+ azúcar) muestra un índice de nodulación bajo. Según los resultados, la mezcla de maicena + roca fosfórica y maicena + harina de trigo son los mejores adherente y material de recubrimiento para reemplazar la goma arábica y el carbonato, por haber obtenido la mayor viabilidad del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en condiciones de laboratorio e invernadero.

Palabras clave: Inoculación, rizobio, viabilidad, pelet, trébol rojo.

INTRODUCCIÓN

La ganadería es una de las principales actividades económicas que se realiza en el Perú, siendo el manejo pecuario (alimentación) uno de los factores fundamentales para su éxito. En la actualidad se vienen desarrollando diferentes técnicas para mejorar el desarrollo de pasturas siendo una de ellas, la peletización de semillas, mediante técnicas de inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico como los rizobios. El uso de estas bacterias en la siembra de pastos como la alfalfa y los tréboles disminuye el uso de fertilizantes nitrogenados y mejora el establecimiento de las leguminosas y de las especies asociadas.

El trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una de las principales leguminosas que constituye la base de los pastos que sirven como alimento para el ganado, su importancia radica en que las leguminosas se pueden asociar con rizobios que ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico (Abad, 2008).

La simbiosis leguminosa-rizobio es la más conocida e importante en la naturaleza, las bacterias inducen la formación de nódulos radicales y la planta otorga a las bacterias la fuente de energía orgánica para la fijación del nitrógeno atmosférico. Las bacterias de los nódulos cumplen una importante función en la agricultura porque otorgan nitrógeno asimilable a las leguminosas (Madigan et al., 2015). El uso de estas bacterias en la agricultura se realiza a través de la inoculación, que consiste en incorporar cepas de rizobio a las semillas de leguminosas antes de la siembra, con el propósito de mejorar la implantación de la especie (Solid, OPD, 2010). Una de las formas de inocular rizobios a las semillas es mediante la peletización, que originalmente fue usada para cambiar la forma y tamaño de las semillas, con la finalidad de una mejor manipulación de las semillas hortícolas, además de ser usadas como un sistema de identificación, protección y siembra de precisión (Bennett, 2015). Asimismo, Jerlin et al. (2008) mencionan la peletización como una técnica que mejora el rendimiento de los cultivos, porque

uniformiza las condiciones externas de las semillas, sobre todo si estas son pequeñas, además de contribuir a la nutrición complementaria.

La peletización de semillas de trébol rojo con biofertilizantes (rizobio) es una alternativa interesante porque permite la viabilidad de los rizobios por un periodo de tiempo más largo con relación a la inoculación directa, pero debido al alto costo que tiene los materiales que se usan para realizar el peletizado, los agricultores no lo realizan por no ser rentables. El presente trabajo de investigación plantea la utilización de distintos materiales de peletización que son más baratos y accesibles para los agricultores. Con estas consideraciones expuestas se planteó los siguientes objetivos.

Objetivo general

Evaluar la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de adherentes y materiales de recubrimiento en la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en condiciones de laboratorio.
2. Comprobar el efecto de adherentes y materiales de recubrimiento en la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en condiciones de invernadero.
3. Establecer el mejor adherente y material de recubrimiento que sustituya a la goma arábica y al carbonato de calcio en el proceso de peletización de semillas.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Como antecedente se ha considerado la investigación realizada por Pacotaype (2018) en semillas de alfalfa inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* y peletizadas con diferentes materiales. Determinó que la viabilidad de los rizobios en las semillas peletizadas disminuye a través del tiempo y que algunos materiales como la melaza de caña, harina de trigo, roca fosfórica y maicena mantienen la viabilidad de los rizobios de manera similar a la goma arábica y el carbonato de calcio, comúnmente utilizados en la peletización de semillas de leguminosas. Asimismo, Alcaraz et al. (1994) informan que la velocidad de muerte del *Rhizobium meliloti* B-36 en semilla de alfalfa preinoculada es independiente de la cobertura ensayada (carbonato, perlita y caolin) usando goma arábica o etilmetilcelulosa como adhesivo y que el número de bacterias sobre la semilla preinoculada disminuye a través del tiempo, pero la concentración remanente es del nivel de 10^4 células viables/semilla (p. 167).

Por su parte, Anyaipoma (2014), al evaluar diferentes tipos de adhesivos y cubiertas para la preparación de pelets de semillas de trébol inoculadas con *Pseudomonas* cepa Ps42 observó que, la cubierta de arcilla:cal:aserrín (99:1:10) en combinación con el adhesivo conformado por la mezcla del inoculante y agua azucarada al 50%, muestra la mejor estructura de pelet. Al evaluar la supervivencia de *Pseudomona* en el pelet, determinó al tercer día de almacenamiento, que el tratamiento PG (pelet+G) supera en 31%, al tratamiento PLMC (pelet+LMC). Asimismo, informa que los tratamientos PLMC y PG mostraron una tendencia a incrementar los pesos secos de las plántulas con respecto al control N+, en 13,26% y 13.02% respectivamente (p. 8).

De igual manera, Vergani-Boza y Zúñiga-Dávila (2018) demostraron que la viabilidad de las bacterias (*Pseudomonas* C32, *Streptomyces* AC7 y diazótrofo DZ50) en las

semillas peletizadas de maca (*Lepidium meyenii* W.) es superior, debido a la menor pérdida de humedad. Mencionan también que las semillas peletizadas presentan mayor peso seco de plántulas germinadas (in vitro) y mayor peso seco radicular (invernadero) después de 35 días de crecimiento (p.333).

Santillana (1998) al comparar la sobrevivencia de cepas de rizobios en semillas de trébol rojo con inoculación simple y peleteado, utilizando la técnica de Dilución e Infección en plantas, determinó que los rizobios sobreviven por más tiempo en semillas peletizadas.

1.2. EL TREBOL ROJO

1.2.1. Origen e historia

Canals (2002) menciona que el trébol rojo (*Trifolium pratense*) es originario del sudeste de Europa. Su cultivo como forrajera se inició en el norte de Europa y actualmente se ha extendido a todo el planeta. Ruiz (1987), citado por Durand (2008), indica que al Perú llegó hace aproximadamente 80 años, en la región de Cerro de Pasco y Junín, a través de los técnicos de la Copper Corporation y en el norte del país en la región de Porcon (Cajamarca), a través de los Gildemeister y SIPA. Indica también que posteriormente gracias a los Convenios con los Gobiernos de Suiza, Holanda, Nueva Zelanda y Bélgica, se sembraron nuevas variedades en las localidades de Ayacucho, Cajamarca Puno, Huancayo (p. 12).

1.2.2. Importancia

Durand (2014), cita a Príncipe (2008) para señalar que el trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una leguminosa anual con alto valor nutritivo y de alta producción, que puede usarse para corte o pastoreo en praderas asociadas predominantemente en épocas de lluvia. Hay variedades adaptadas a la defoliación (pastoreo) frecuente, pero deben pastorearse con bajas cargas para permitir su persistencia (p. 9).

Anyaipoma (2014) indica que el trébol rojo es conocido y utilizado para mejorar los suelos debido a su alta capacidad de fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Martínez (2020) enfatiza que en suelos de buena fertilidad y humedad se obtiene producciones de forraje hasta de 12 tn de materia seca por hectárea año. Además, animales que la consumen pueden llegar a producir de 16-18 litros de leche al día.

Canals (2002) señala que el trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una leguminosa muy productiva, incluso en verano, si recibe suficiente aporte hídrico. La producción anual puede alcanzar las 12-15 t ms/ha. Tiene buen valor nutritivo con elevada proporción de glúcidos y una mayor digestibilidad.

Miñon et al. (2013) mencionan que su consumo puede producir meteorismo por lo que se recomienda la siembra en asociación con gramíneas. Algunas variedades tienen elevado contenido de isoflavonas y producen una considerable actividad estrogénica que podría dañar la fertilidad de ovejas en pastoreo. Sin embargo, es de escasa importancia, debido a la poca información sobre este efecto en animales domésticos (p. 34)

1.2.3. Clasificación taxonómica

Según Martínez (2020), el trébol rojo (*Trifolium pratense*) presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae
Género	: <i>Trifolium</i>
Especie	: <i>Trifolium pratense</i>

1.2.4. Descripción botánica

SNAVM (2010), indica que:

El trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una planta herbácea - perenne de 10-60 cm de altura, pudiendo llegar hasta 110 cm de altura y presenta pilosidad variable. Los tallos son erectos en un comienzo para luego ser decumbentes y ascendentes. Su sistema radicular consta de una raíz pivotante, y muchas raíces adventicias que nacen de los tallos que están en contacto con el suelo. Las hojas son trifoliadas, se disponen de manera alterna y poseen dos estípulas basales que se estrechan en una arista. Las flores, se presentan agrupadas en cabezuelas globosas, sésiles y cubiertas en su base por las estípulas de las hojas superiores. El fruto es una legumbre, incluida en el cáliz,

indehisciente, de forma ovoide conteniendo una sola semilla de forma acorazonada, muy pequeñas y de tonalidades que varían del amarillo al violeta (párr. 3-5).

Bojórquez et al. (2015) mencionan que son de gran utilidad en asociaciones con pastos como el rye grass italiano porque se comportan como plantas protectoras en el establecimiento de pastos y aumentan la calidad del pasto. Las variedades con buena adaptación en el valle son: el “Kendland”, “Hamua”, “Turoa” y “Pawera”, “Quiñequeli (p. 8).

1.2.5. Requerimientos climáticos y edáficos

Canals (2002) considera que al trébol rojo le favorece los climas templados. Resiste el frío y el sombreo pero poco tolerante a la sequía. Vegeta en todo tipo de suelos, aunque prefiere los profundos y con buen nivel de bases. Es exigente en humedad edáfica pero no soporta los encharcamientos prolongados (p. 9).

SNAVM (2010), menciona que el *Trifolium pratense* crece mejor en climas templados – húmedos. Crece entre 7 a 35°C. Temperaturas altas debilitan las plantas, adelantan la floración y disminuyen la longitud de los tallos. La tolerancia a heladas aumenta desde el estado cotiledonar hasta que tiene 3-4 hojas verdaderas. El límite inferior de pH para el trébol rojo es de 5.5 y el óptimo entre 6 y 7.5 (párr.12).

1.2.6. Trébol rojo variedad Quiñequeli

Durand (2014) indica que esta variedad posee gran vigor de sus plántulas, tallos vigorosos, rápida y buena recuperación al corte, posee un alto contenido de glúcidos por lo tanto con mejores aptitudes para el ensilado. Buena tolerancia a enfermedades foliares, pero susceptible al nematodo de la raíz (*Ditylenchus dipsaci*). Muy exigente en fosforo, su persistencia de 2 a 3 años depende de la condición ambiental en que se encuentre (p. 10).

1.2.7. Situación forrajera del Perú

Perúlactea (2019), menciona que la ganadería en la zona andina que se desarrolla a base de pastizales naturales y cultivados, no tiene competitividad en la producción de carne, leche y lana, debido a diferentes razones como la distribución de precipitaciones, desconocimiento del uso de semillas certificadas, con alto valor productivo, asociación

de gramíneas con leguminosas que otorga un alimento balanceado al ganado (párr.1).

El MINAGRI (2020) señala que para el año 2021 la ganadería en el Perú habrá crecido hasta en un 6%, gracias al Programa Nacional de Pastos y Forrajes. Para el 2017, se tuvo previsto sembrar 25,500 hectáreas en todo el país, siendo la meta final al 2021, la siembra total de 150 mil hectáreas con este forraje, que es de alto valor nutritivo para el ganado (párr.1).

1.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

1.3.1. Generalidades

Newton et al. (2002) citado por Chipana (2016) mencionan que la fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual el nitrógeno molecular se reduce a amonio. A pesar de que el nitrógeno molecular (N_2) se encuentra en la atmósfera en una concentración de casi el 80%, es una molécula muy estable químicamente y no está disponible para la mayoría de los organismos vivos (p. 16)

Existen varias formas de fijación de nitrógeno, por lo que es posible obtener un importante suministro de nitrógeno. En la biosfera se estiman unos 275 millones de toneladas anuales, de los cuales 175 corresponden a la fijación biológica, 70 a la industrial y 30 a la espontánea. La fijación biológica puede ser llevada a cabo por microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas y no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Zapata, 2015).

Rodríguez et al. (2011) indican que la nodulación es una característica de las leguminosas en general, sin embargo, existen géneros que no forman tales estructuras. En la subfamilia Papilionoideae, donde se incluye alfalfa, veza, soja, judía, garbanzo, se observan nódulos en un 95 % de los individuos examinados, en la Caesalpinioideae no se ha encontrado nodulación en un 67 % de los miembros estudiados (p. 34).

Con relación a las cantidades de nitrógeno fijado simbióticamente, Urzúa (2005) menciona que depende principalmente de la especie leguminosa, de la efectividad del rizobio, de las condiciones edafoclimáticas, del manejo del cultivo y, eventualmente, del manejo del ganado. Los valores pueden fluctuar entre 50 y 800 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de

Nitrógeno (p. 136).

1.3.2. El proceso de fijación biológica del nitrógeno

Salas (2015) señala que los rizobios y leguminosas se asocian a través de un complejo proceso de señalización que finaliza en la formación de nódulos. La formación de esta interacción comprende una serie de cambios morfológicos y fisiológicos tanto del rizobio como de su planta huésped, todos procesos sumamente regulados por los interactuantes e influenciados por el ambiente en el que se encuentran (p. 23).

Madigan et al. (2015) explican que la asociación leguminosa-rizobio se inicia con el reconocimiento mutuo de la planta y la bacteria. Se produce la adhesión de la bacteria a los pelos radiculares, luego la secreción de los factores nod. Se origina la invasión bacteriana a través de los filamentos de infección. Se forman los bacteroides en el interior de las células vegetales y la formación de los nódulos, donde el nitrógeno atmosférico es convertido en amonio, el que es utilizado por la planta para la formación de proteínas. Por su parte la planta otorga la energía necesaria que requiere este proceso (pp. 728-729).

Según Halbleib y Luden (2000) citados por Mays (2004), la fijación biológica de nitrógeno es realizada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general:



Esta reacción requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H_2 producido por mol de N_2 reducido (pág. 1).

1.3.3. Factores que afectan la fijación biológica del nitrógeno (FBN)

García et al. (2003) consideran que aquellos factores que afectan la formación de nódulos, como la interacción de las raíces con rizobios compatibles, el crecimiento de las raíces, las condiciones del suelo, o factores ambientales, limitan la simbiosis y la fijación biológica del nitrógeno (p. 208).

Valles (2003) hace referencia a Hungría y Vargas (2000) para mencionar que también las altas temperaturas inhiben la FBN, la nodulación y la formación de pelos radiculares.

Suelos que alcanzan 40°C o más en los primeros cinco cm de profundidad, reducen su población bacteriana. Las leguminosas de raíces profundas extraen agua de mayores profundidades para mantener su potencial hídrico y evitar una reducción en el índice de FBN (p. 125)

Paredes (2013) menciona que el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad de la nitrogenasa pueden ser inhibidas por altas concentraciones de nitratos en el suelo, asimismo, la carencia de fósforo disminuye la formación de nódulos y, por consiguiente, la FBN. La falta de agua en etapas tempranas, retrasa la aparición de los nódulos y la falta de agua en etapas reproductivas limita la FBN restringiendo el rendimiento (p. 44).

Rolando (2004) menciona que alta dosis de nitrógeno combinado tiene un efecto negativo sobre el peso y número de nódulos, sin embargo, dosis moderadas de nitrógeno influyen en forma positiva sobre la nodulación y la fijación biológica. Asimismo, Coyne (2000) menciona que la fijación de nitrógeno no se produce cuando el amonio, el nitrato o el nitrógeno orgánico están disponibles, debido a que puede dirigir el flujo de electrones lejos de la nitrogenasa, de modo que no hay electrones ni reducción alguna. Otra teoría es que la reducción del nitrato (NH_3) en nódulos causa el enlace nitrito (NH_2) de compuestos que protegen la nitrogenasa del oxígeno (p. 416).

Coyne (2000) explica también que temperaturas superiores o inferiores al rango 20-25°C afectan la capacidad infectiva de los rizobios y la actividad de la nitrogenasa en los nódulos. A temperaturas altas normalmente los *Rhizobium* suelen perder plásmidos, como el de pSym o plásmido simbiótico, en el que se ubican la mayoría de los genes necesarios para la nodulación (nod) y para la fijación biológica (Nif y Fix) (p. 144).

Otros factores como el pH, la presencia de niveles de toxicidad de aluminio y manganeso, o deficiencia de calcio, fósforo y molibdeno en suelos ácidos puede reducir la fijación biológica del nitrógeno. De igual manera, las condiciones de alcalinidad del suelo limitan la disponibilidad del hierro, zinc, manganeso y boro en el suelo, reduciendo el crecimiento de la planta y la fijación de nitrógeno (Rolando, 2004, p.22)

1.3.4. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Taxonomía

Según Terpolilli et al. (2014), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* posee la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Alphaproteobacteria
Orden	: Rhizobiales
Familia	: Rhizobiaceae
Género	: <i>Rhizobium</i>
Especie	: <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* cepa WSM1325 es un bacilo o bastón móvil, gramnegativo, que no forma esporas, presenta colonias mucosas en medios sólidos. Tiene un tiempo de generación de 3.9 h a la temperatura de crecimiento óptima de 28°C (Reeve et al., 2010). Además, Terpolilli et al. (2014) añaden que *R. leguminosarum* bv. *trifolii* cepa WSM1689 es una bacteria que no presenta cápsula, es aerobio, mesófilo, utiliza diferentes fuentes de carbono. Su genoma presenta 6.903.379 pb y 6.709 genes que codifican proteínas y 89 genes que solo codifican ARN. Muestra un genoma multipartito que contiene seis replicones distintos; un cromosoma de tamaño 4.854.518 pb y cinco plásmidos de tamaño 667.306, 518.052, 341.391, 262.704 y 259.408 pb (p. 527).

1.4. INOCULACIÓN DE SEMILLAS

1.4.1. Inoculante

Según Peticari (s.f.) la inoculación consiste en incorporar directamente al suelo o a través de semillas, rizobios infectivos (capaces de formar simbiosis con la leguminosa cultivada) y efectivos (con alta eficiencia de fijación biológica de nitrógeno) con la finalidad de obtener mayor producción de materia seca y de contenido total de nitrógeno (párrs 12-13). Basham et al. (1998) mencionan que inoculante se refiere a la formulación que contiene una o más cepas bacterianas beneficiosas (o especies) en un material vehículo o soporte, fácil de usar y económico, ya sea orgánico, inorgánico o sintetizado a partir de moléculas definidas.

Sueiro et al. (2011), considera que la inoculación de semillas con rizobios es necesaria cuando la población de rizobios en el suelo es insuficiente para establecer una simbiosis efectiva con la leguminosa o cuando el rizobio nativo no tiene la capacidad de fijar cantidad suficiente de nitrógeno.

Racca et al., (2001) citado por Guevara (2020), manifiestan la importancia de la calidad de los inoculantes, recomiendan 1×10^9 rizobios por g de producto a la elaboración y de 1×10^8 rizobios por g de producto al vencimiento de 6 meses (p. 32).

Bashan et al. (2014) indican que los inoculantes pueden ser de diferentes tipos:

a) Inoculante sólido

El inoculante sólido es producido en base a un soporte turboso (tierra vegetal), con un contenido de materia orgánica superior al 80% y alta capacidad de absorción de agua, lo que posibilita obtener inoculantes de buena calidad.

b) Inoculante líquido

El inoculante líquido, es elaborado mediante un proceso de fermentación que permite alcanzar una masa celular superior a mil millones de rizobios por mililitro de inoculante. Este producto contiene estabilizantes que garantizan una prolongada sobrevivencia de las bacterias rizobio en condiciones de almacenamiento naturales.

c) Cultivos liofilizados

En este caso los rizobios son deshidratados a bajas temperatura y se envasan en ampollas de vidrio. Tienen la ventaja de su larga duración, pero presentan una elevada mortalidad de bacterias. Pueden ser utilizados con las semillas. Su utilización comercial no es común.

d) Caldos Concentrados

Son una forma modificada de los inoculantes líquidos, en que se elimina una gran parte del agua del cultivo hasta lograr formar bloques sólidos. Se utilizan en tratamientos a la semilla y son de corta vida útil.

e) Los inoculantes granulados

Se pueden aplicar al suelo o previa mezcla con fertilizantes apropiados. Se producen en turba, yeso, en poliacrilamida (PER), alginatos (AER) o en xantatos (XER). Su viabilidad varía de acuerdo al material que se utiliza.

1.4.2. Ventajas de la inoculación

El Departamento Técnico Barenbrug - Palaversich (2008) indica los beneficios de inocular semillas de leguminosas forrajeras:

Satisface el 80% de sus requerimientos de nitrógeno por fijación biológica, obteniendo entre 200-400 kg de nitrógeno por año. -Se estima un promedio de 30 kg N fijado por cada tonelada de materia seca producida por la leguminosa. Las gramíneas asociadas se benefician por la transferencia y utilización de hasta un 60 % del nitrógeno fijado por las leguminosas. -Mejora la velocidad de implantación de las leguminosas y adelanta los primeros pastoreos. -Mayor producción total de forraje de la pastura durante su ciclo productivo. -Aumenta la concentración de N y proteína en el forraje mejorando su valor nutritivo. -Se dinamiza el reciclaje de nitrógeno bajo pastoreo. Sustitución parcial de fertilizantes nitrogenados mejorando los resultados económicos de los productores. - Menores pérdidas del nutriente, disminuye la contaminación con nitratos de las aguas superficiales y subterráneas. -Mayor sustentabilidad de los sistemas de producción pastoriles al utilizar recursos naturales renovables (energía solar y nitrógeno del aire). - Mejora la fertilidad de los suelos y contribuye a mejorar los rendimientos de grano en rotaciones de pasturas con cultivos (párr. 5).

Por su parte, Saldaña y Zapata (2018) señalan que la simbiosis Rhizobium – leguminosa puede fijar de 24 a 584 Kg de nitrógeno por hectárea y suplir en algunos casos hasta el 90% de las necesidades de la planta. Contribuye a reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, a remediar los problemas de contaminación de los suelos y el agua, así como a disminuir los costos de producción de manera sustentable (p. 7990).

1.5. PELETIZACIÓN DE SEMILLAS

Según Bashan et al. (2014) la peletización es una técnica de inoculación de semillas, en la que se utilizan adhesivos con la finalidad de garantizar un adecuado número de rizobios por semilla y prevenir que el inoculante no se desprenda de la semilla. La

granulación de semillas con carbonato de calcio se realiza para equilibrar el pH ácido del suelo. (p.20)

Alarcón et al. (2000) citado por Anyaipoma (2014) consideran que el establecimiento exitoso de las semillas peletizadas depende de factores como el vigor de las semillas, tipo de suelo y fertilidad, condiciones climáticas, presencia o ausencia de microorganismos patógenos o benéficos.

El Departamento Técnico Barenbrug -Palaversich (2013), indica las ventajas de peletizar semillas:

El peleteado forma alrededor de cada semilla una zona con condiciones óptimas para la germinación y la emergencia de las plántulas. -El recubrimiento de las semillas es higroscópico por lo que atrae el agua disponible en el entorno de la semilla y mejora su absorción. -Asegura la disponibilidad inmediata de nutrientes alrededor de la semilla durante la emergencia radicular. -Mejora el vigor inicial de las plántulas y resulta en una implantación más rápida y uniforme. Incrementa la supervivencia de las semillas. -Garantiza el mantenimiento de altas densidades de rizobios activos sobre la semilla. -Asegura una alta productividad de la pastura. -Transferencia del nitrógeno fijado a las gramíneas acompañantes, reduciendo la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados. -Facilita la manipulación manual y mecánica de las semillas (párrs. 1-10)

1.5.1. Materiales de recubrimiento usados para la peletización de semillas

Peñuelas (2002) hace referencia a Scott (1989) para explicar que los materiales de recubrimiento pueden ser sustancias minerales u orgánicas tales como: limo, yeso, dolomita, roca fosfatada, montmorillonita y vermiculita que tengan una porosidad entre 15 y 25%. Los materiales de recubrimiento se deben unir a sustancias adhesivas, como la goma arábiga, gelatina, caseína o sales de caseinato, que eviten que el cubridor se rompa o quiebre con cualquier impacto. Los adhesivos deben ser solubles en agua y son generalmente utilizando polímeros orgánicos, amidos, resinas naturales, azúcares, colas de origen animal y mucílagos vegetales que son dispersos en agua para producir un fluido pulverizable, luego son agregados los sólidos de recubrimiento a las semillas (pág.4)

a) Carbonato de calcio

Ríos y Velásquez (2016), mencionan que el carbonato de calcio, cuya fórmula química es CaCO_3 es una sustancia muy abundante en la naturaleza, formando rocas, es también componente principal de conchas y esqueletos de muchos organismos (p.ej. moluscos, corales) o de la cáscara de huevo. Es la causa principal del agua dura. Es fundamental en la producción de vidrio y cemento. Se obtiene por molienda fina o micronización (reducir a polvo fino, de 1 μm de diámetro) de calizas extremadamente puras, por lo general con más del 98.5% de contenido en CaCO_3 (p. 49).

b) Roca fosfórica

La roca fosfórica es la materia prima básica para la producción de los fertilizantes fosfatados. El compuesto fosfatado es algún tipo de apatita que pueden presentar propiedades físicas, químicas y cristalográficas diferentes. Con las rocas fosfóricas se hallan asociados grupos definidos de minerales accesorios de diversos orígenes y edades geológicas. Las fuentes de roca fosfórica de calidad conocida pueden ser utilizadas como materiales de referencia para los fines de comparación (FAO, 2007, p. 19).

Zapata (2007) señalan la composición de la roca fosfórica: Fósforo (P_2O_5) 31.07%, Calcio (CaO) 43.16%, Potasio (K_2O) 0.06%, Silicio (SiO_2) 10.05%, Aluminio (Al_2O_3) 3.28%, Hierro (FeO) 0.96% y Sodio (Na_2O) 0.507%.

Según la FAO (2007) mencionan que las leguminosas son particularmente adecuadas para la utilización de las rocas fosfóricas. Son efectivas en la disolución de la roca fosfórica y en la absorción de los productos de disolución debido a su demanda de Ca y al efecto acidificante de la fijación de nitrógeno en el suelo cerca del sistema radicular (rizósfera) (p. 44).

c) Harina de trigo

Montoya (2010) mencionado por Aquino y Vara (2016) indica que la harina, es el polvo fino que se obtiene de cereales molidos y de otros alimentos ricos en almidón. En Europa suele aplicarse el término harina para referirse a la harina de trigo, y se refiere indistintamente tanto a la refinada como a la integral. El uso de la harina de trigo en el pan es gracias al gluten, que surge al mezclarla con agua. El gluten es una proteína compleja que le otorga al pan su elasticidad y consistencia (p. 18)

INEM (2006) menciona que la harina de trigo es el producto que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano de trigo, hasta un grado de extracción determinado, considerando al restante como un subproducto (p. 1).

1.5.2. Materiales adherentes usados para la peletización de semillas

a) Goma arábiga

Carpio y Figueroa (2017) explican que la goma arábiga (goma de acacia) es una resina de color ámbar, recolectada de árboles o arbustos espinosos del género acacia. Es un material muy heterogéneo, generalmente formada por cadenas de polisacáridos con poco o ningún material nitrogenado y por moléculas de peso molecular alto, que tienen proteínas. Las cadenas principales están formadas por unidades β -Dgalactopiranosilo unidas por enlaces (1,3) con cadenas laterales de unidades de Galactopiranosilo (1,6) terminadas en residuos de ácido glucurónico ó 4-O-metil-Dglucurónico. (p 38)

b) Melaza de caña

De acuerdo con Amaya y Portillo (2013), las melazas son residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. La composición de las melazas es muy heterogénea, depende de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix ó sólidos disueltos de 68- 75 % y un pH de 5.0- 6.1 %. (p. 51)

c) Maicena

Flores (2010) señala que la maicena, fécula o almidón de maíz, es un polímero de la dextrosa, constituido por amilopectina y amilosa. También señala que es utilizado como agente espesante, estabilizante, ligante, agente de volumen, formador de gel, aglutinante, fuente de carbohidratos, adhesividad y formación de película (p. 115).

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en dos ambientes:

- Laboratorio de Rhizobiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en el que se realizó la peletización de las semillas de *Trifolium pratense* (Trébol rojo) y se evaluó la viabilidad del *Rhizobium* a través del tiempo.

- Invernadero del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se sembró en pequeños maceteros semillas de *Trifolium pratense* (Trébol rojo) peletizadas y se evaluó la formación de nódulos de cada tratamiento.

2.1.1. Ubicación política

Departamento : Ayacucho

Provincia : Huamanga

Distrito : Ayacucho

2.1.2. Ubicación geográfica

Latitud : 13°09'56" S

Longitud : 74°13'40" O

Altitud : 2,735 msnm

2.1.3. Ubicación ecológica

Según la clasificación ecológica de Holdridge (1986), citado por Tineo (1999), se encuentra dentro de la zona de vida natural Bosque Seco - Montano Bajo Subtropical (bs-MBS).

2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Para ejecutar el trabajo de investigación se utilizó los siguientes materiales y equipos:

2.2.1. Materiales de laboratorio

Pipeta graduada 10ml, matraz 200 ml, tubos de ensayo 12 x 150 mm, pabilo, bolsas plásticas, gradilla de madera, botellas de vidrio, tubo de EPENDORF 1.5 mm, pipetas automáticas de 100 μ Lt, Pipetas automáticas de 200 μ Lt, mechero de bunsen, asa de kolle, algodón, papel kraff, agua destilada, clorox, alcohol, balón de gas, puntas amarillas y puntas azules.

a) Reactivos

Cloruro de Sodio, Fosfato de Calcio, Fosfato de Potasio, Sulfato de Magnesio, Cloruro de Hierro, Ácido Bórico y Agar.

b) Equipos

Solario, autoclave 60 L, Agitador y timer.

c) Insumos

Semillas de trébol rojo de la variedad Quiñequeli, inoculante, goma arábica, carbonato de calcio, roca fosfórica, harina de trigo, melaza y maicena.

d) Materiales de escritorio

Laptop, cámara digital, impresora, libros, publicaciones físicas y digitales.

2.2.2. Materiales de recubrimiento

a) Carbonato de calcio

Compuesto químico, de fórmula CaCO_3 . Es una sustancia muy abundante en la naturaleza, formando rocas, como componente principal, en todas partes del mundo y es el principal componente de conchas y esqueletos de muchos organismos (p.ej. moluscos, corales) o de las cáscaras de huevo. Es obtenido por molienda fina o micronización (reducir a polvo fino, de 1 μm de diámetro) de calizas extremadamente puras, por lo general con más del 98.5% de contenido en CaCO_3 . (Ríos y Velásquez, 2016, p. 49).

b) Roca fosfórica

Materia prima básica para la producción de los fertilizantes fosfatados, contiene fósforo (P_2O_5) 31.07%, Calcio (CaO) 43.16%, Potasio (K_2O) 0.06%, Silicio (SiO_2) 10.05%, Aluminio (Al_2O_3) 3.28%, Hierro (FeO) 0.96% y Sodio (Na_2O) 0.507%. Dado que las rocas fosfóricas son materiales relativamente insolubles, el tamaño de sus partículas tiene un efecto importante en su tasa de disolución en el suelo.

c) Harina de trigo

Polvo fino que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano de trigo, hasta un grado de extracción determinado, considerando al restante como un subproducto (residuos de endospermo, germen y salvado). (Amaya y Portillo, 2013, p.18).

2.2.3. Materiales adherentes

a) Goma arábica

Resina de color ámbar, formada por polisacáridos con poco o ningún material nitrogenado y por moléculas de peso molecular más alto, que tienen proteínas como parte integral de sus estructuras.

b) Melaza de caña

Residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Se caracteriza por tener grados Brix ó sólidos disueltos de 68- 75 % y un pH de 5.0- 6.1 %.

c) Maicena

Fécula o almidón de maíz es un polímero de la dextrosa, constituido por una mezcla de dos tipos de polisacáridos; la amilopectina y amilosa. Agente espesante, estabilizante, ligante, agente de volumen, formador de gel, aglutinante, fuente de carbohidratos, adhesividad y formación de película (Flores, 2010).

2.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1. ¿De qué manera influye el tipo de adherente y material de recubrimiento en la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo en condiciones de laboratorio?

2. ¿De qué manera influye el tipo de adherente y material de recubrimiento en la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo en condiciones de invernadero?
3. ¿En qué medida es posible remplazar la goma arábica y el carbonato de calcio en la peletización de semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*)?

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En laboratorio el diseño estadístico utilizado fue DCR con arreglo factorial de $2A \times 2B + 1$ (A= Adherente; B= Recubrimiento; 1=Testigo), con 3 repeticiones y 5 tratamientos, haciendo un total de 15 unidades experimentales, los cuales se evaluó a los 0,7, 12, 18, 24 días postpeleteado. En invernadero el diseño estadístico utilizado fue DCR con arreglo factorial de $2A \times 2B + 2$ (A= Adherente; B= Recubrimiento; con 2 Testigos), con 4 repeticiones y 5 tratamientos, haciendo un total de 20 unidades experimentales, los cuales se evaluó a los 0, 7, 12, 18 y 24 días postpeleteado. Con los resultados de las variables evaluadas, se realizó los análisis de variancia, la prueba de tukey y el análisis de regresión correspondiente.

El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + R_j + (AxR)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : Variable respuesta

μ : Efecto común a todas las observaciones

A_i : Efecto de i-ésimo nivel del factor A

R_j : Efecto del j-ésimo nivel del factor R

$(AxR)_{ij}$: Efecto de interacción del i-ésimo nivel de factor A y j-ésimo nivel del factor R

ϵ_{ij} : Error experimenta

2.5. TRATAMIENTOS

Los tratamientos para condiciones de laboratorio (solario) en el presente trabajo de investigación, fueron sembrados en medio Jensen, los cuales fueron los siguientes:

Tabla 2.1. Tratamiento para condiciones de laboratorio

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN	
	ADHERENTE	RECUBRIMIENTO
T1(Testigo)	Goma arábica (3.5 ml)	Carbonato de calcio (30g) (control)*
T2	Maicena (3.5 ml)	Roca fosfórica (30g)*
T3	Maicena (3.5 ml)	Harina de trigo (30g)*
T4	Melaza de caña (3.5 ml)	Roca fosfórica (30g)*
T5	Melaza de caña (3.5 ml)	Harina de trigo (30g)*

*Cantidad por 50 g de semilla

Los tratamientos para condiciones de laboratorio (solario) invernadero en el presente trabajo de investigación, fueron sembrados en suelo de puna (sustrato), los cuales fueron los siguientes:

Tabla 2.2. Tratamiento para condiciones de invernadero

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN	
	ADHERENTE	RECUBRIMIENTO
T1 (Testigo 1)	Goma arábica (3.5 ml)	Carbonato de calcio (30g) (control)*
T2	Maicena (3.5 ml)	Roca fosfórica (30g)*
T3	Maicena (3.5 ml)	Harina de trigo (30g)*
T4	Melaza de caña (3.5 ml)	Roca fosfórica (30g)*
T5	Melaza de caña (3.5 ml)	Harina de trigo (30g)*
T6 (Testigo 2)	Semilla sin peletizar	

El primer tratamiento es la que se usa usualmente para la peletización de semillas que es la Goma arábica + carbonato de calcio, para los demás tratamientos se reemplazó el carbonato de calcio con roca fosfórica y harina de trigo debido a que el tamaño de las partículas es muy similar al del carbonato de calcio, además de su fácil adquisición y bajo costo.

Para reemplazar la goma arábica se usó la maicena y melaza de caña, debido a que ambos tienen la propiedad de ser materiales adhesivos al igual que la goma arábica además que son muy fáciles de conseguir debido a que se encuentra en nuestro mercado y el costo es bajo. El tratamiento 6 en condiciones de invernadero sirvió para evaluar la existencia o no de rizobios nativos en el suelo a utilizar.

2.6. INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

2.6.1. Preparación de tratamientos

a) Lavado y selección de semillas

Se adquirió semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) de la variedad Quiñequeli, en una tienda de productos agrícolas ubicado en la Av. Ramón Castilla del Distrito de San Juan Bautista – Ayacucho. Luego en el laboratorio de Rhizobiología de la Facultad de Ciencias Agrarias se procedió a seleccionar semillas de mayor tamaño y que no estén chupados para posteriormente lavarlos con abundante agua y finalmente dejarlos secar.

b) Preparación de adherentes y del material de revestimiento

Se utilizó la técnica recomendada por el laboratorio de Rhizobiología. Se procedió a preparar la goma arábica al 40%, la maicena al 7% y la melaza al 53.5% en la proporción de 1300 ml por 20 Kg de semilla de trébol rojo. El carbonato de calcio, la roca fosfórica y la harina de trigo se utilizó en la proporción de 12 Kg por 20 Kg de semilla de trébol rojo.

c) Peleteado de semillas

Se procedió a mezclar el material adherente con el inoculante en proporción (250 g por 20 Kg de semilla) luego se adicionó la semilla y por último el material de recubrimiento. Las semillas peletizadas fueron conservadas hasta su uso en bolsas de plástico guardadas en una caja de tecnopor para evitar que se sequen.

2.6.2. Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en condiciones de laboratorio

La viabilidad de los *Rhizobium* en las semillas peletizadas con los diferentes materiales adherentes y de recubrimiento se controlaron a los 0, 7, 12, 18 y 24 días, post inoculación.

Para el control de viabilidad se empleó el método de Dilución e Infección en Plantas, que consta de lo siguiente:

a) Preparación del medio JENSEN

Como medio de cultivo para la siembra de plantas en tubos se utilizó el medio Jensen, cuya composición es la siguiente:

Reactivos

Solución Stock:

H ₃ BO ₃	0.31gr
Na ₂ MoO ₄	0.01gr
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01gr
KCl	0.041gr
CaCl ₂	0.001gr

Todos estos reactivos se disolvieron en 250ml de agua destilada.

Elementos

CaHPO ₄	1.0gr
K ₂ HPO ₄	0.2gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2gr
NaCl	0.2gr
FeCl ₃	0.1gr
Solución stock	5 ml
Agar Merk	6.5gr
Agua destilada	1000 ml

En el agua destilada, se disolvió todos los elementos indicados en la formula. El CaHPO₄ es de difícil disolución aun empleando calor, por lo que se diluyó lo más que se pueda y el precipitado se distribuyó homogéneamente a todos los tubos.

El medio fue distribuido en tubos de 25 x 150 mm a razón de 20 ml por tubo, luego se procedió a esterilizar a 121°C x 35 minutos.

b) Desinfección y germinación de semillas

La desinfección y la posterior germinación de la semilla se procedieron de la siguiente forma:

- ✓ Escoger semillas sanas y de tamaño uniforme
- ✓ Colocar las mismas en frascos estériles
- ✓ Luego desinfectar sucesivamente con clorox al 2.5% por 3 minutos.
- ✓ Seguidamente se lavan vigorosamente con agua destilada estéril 5 a 6 veces.

c) Siembra de plantas

Transcurrida las 24 horas en cada tubo con medio Jensen esterilizados, se sembró cuatro semillas con la ayuda de un asa de kolle en forma de “S” dichas semillas se sembraron junto a las paredes del tubo para permitir un intercambio gaseoso y facilitar la observación de los nódulos. Los tubos con las plantas sembradas se colocaron en gradillas de madera (las que tienen la finalidad de sujetar el tubo y evitar la incidencia de la luz en la zona radicular) y llevados al ambiente oscuro que permita su germinación. Posteriormente de las 4 semillas se escogieron 2 semillas, las que germinaron y las que este más vigorosas para dejar solo 2 plántulas por tubo. Estos tubos seleccionados fueron marcados de acuerdo a las claves de cada tratamiento.

d) Toma de muestras, preparación de las diluciones e inoculación de plantas

Para cada control de viabilidad se procedió a tomar muestras de la siguiente manera:

De los diferentes tratamientos, es decir de las semillas peletizadas con diferentes materiales adherentes y de recubrimiento se separaron 100 semillas (para cada tratamiento y repetición) en papel kraft posterior a la toma de muestras las semillas peletizadas se guardaron a temperatura ambiente hasta el siguiente muestreo.

La preparación de diluciones y la inoculación de plantas se realizaron de la siguiente manera:

Las 100 semillas tomadas como muestra se colocaron en un frasco con 100ml de solución salina al 0.85% previamente esterilizada obteniéndose la dilución 10^{-2} , este frasco se agitó vigorosamente aproximadamente 100 veces, a partir de este frasco, con una pipeta previamente desinfectada se tomaron 100 μ l para pasar a un tubo EPENDORF de 1.5mm con 900 μ l de solución salina esterilizada, constituyéndose la dilución 10^{-3} , a partir de esta dilución y utilizando puntas desinfectadas para cada dilución se pasó 100 μ l previamente agitadas con la ayuda de un agitador a tubos sucesivos hasta obtener la dilución 10^{-6} . De las última cuatro diluciones (10^{-6} a 10^{-3}), y utilizando la pipeta de la última dilución, se aplicó 200 μ l por tubo, en orden decreciente, es decir la inoculación se inició con la dilución 10^{-6} y terminó en la dilución 10^{-3} . Cabe aclarar que para las muestras correspondientes a los días 12, 18 y 24 se consideraron las diluciones 10^{-5} a 10^{-2} , ya que el número de *Rhizobium* fue disminuyendo con el transcurso de los días.

Las plantas inoculadas se dejaron en solarío por un periodo de 40 días, las cuales recibieron 12 horas de iluminación artificial, al cabo de dicho tiempo se procedió a la evaluación para determinar el número de *Rhizobium* por semilla.

e) Determinación del número más probable de *Rhizobium*.

Se evaluó la formación de nódulos de cada tubo, considerando como positivo (+) aquellas plantas que presentaron nodulaciones y como negativas (-) los que carecían de ellas. Con el número de tubos positivos se buscó en la tabla de Fisher y Yates para obtener el número más probable de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii*, posteriormente se hizo el cálculo del número más probable de *Rhizobium* por semilla peletizada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de } Rhizobium \text{ leguminosarum } bv \text{ trifolii por semilla: } \frac{M \times D}{V \times G}$$

Dónde:

M = NMP de tabla de Fisher y Yates

D = Menor dilución de serie impregnada

V = Volumen (ml) de muestra inoculada

G = 100 semillas peletizadas

2.6.3. Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* en semillas peletizadas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en condiciones de invernadero

La viabilidad de *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* en condiciones de invernadero fue evaluada mediante la determinación del índice de nodulación, que se explica a continuación:

a) Instalación del experimento

Preparación de maceteros

- Se utilizó suelo de puna, cuyo análisis demostró que tenía una buena fertilidad en todos sus elementos y no fue necesario la fertilización.
- El suelo se colocó en recipientes de 200 g los cuales fueron regados a capacidad de campo.

Siembra

A los 0, 7, 12, 18 y 24 días pos inoculación se sembraron 10 semillas peletizadas por

macetero, considerando cuatro repeticiones por tratamiento. Para el tratamiento 6 (testigo) se utilizó semillas sin peletizar.

b) Evaluación de variables

A los dos meses de siembra se procedió a evaluar el índice de nodulación (IN) tomando en cuenta los siguientes indicadores: tamaño, cantidad, y color de los nódulos. El índice de nodulación (IN) se calculó de acuerdo con los indicadores que se muestran en la tabla 2.3 y se consideró alto cuando fue mayor o igual a 15, medio de 8 a 14 y bajo de 0 a 7.

Tabla 2.3. Indicadores para la determinación del IN

CARACTERÍSTICAS DEL NÓDULO	VALOR
TAMAÑO (A)	
Grande	3
Mediano	2
Pequeño	1
COLOR (B)	
Rojo	3
Rosado	2
Blanco	1
CANTIDAD (C)	
Mucha	3
Poca	2
Ninguna	1
IN = AxBxC	

Fuente: Becquer et al (2013) p.324

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cumplir el objetivo “Evaluar la viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero” y los objetivos específicos, se desarrolló el diseño factorial estableciendo los factores y testigos: (Adherentes: maicena, melasa; Recubrimiento: roca fosfórica, harina de trigo), Testigo 1: goma arábiga + carbonato de calcio (laboratorio e invernadero) y Testigo 2: sin peletizar (invernadero). Al encontrar significación estadística, se procedió a realizar la prueba de significación de Tukey (0.05), utilizando el paquete estadístico Infostat 2020.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VIABILIDAD DE *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* EN SEMILLAS PELETIZADAS DE TRÉBOL ROJO (*Trifolium pratense*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO

3.1.1. Población bacteriana a los 0 días

En la Tabla 3.1 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 0 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre los factores de variación de los efectos principales de adherente y recubrimiento de la semilla de Trébol rojo, también se encontró diferencia significativa en los efectos de la interacción entre el adherente y el recubrimiento.

El coeficiente de variación de 0.44% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.1. Análisis de varianza del número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 0 días.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	4	1586766667	396691667	23801.5	<0.0001	**
Adherente	1	500520833.3	500520833	30031.24	<0.0001	**
Recubrimiento	1	500520833.3	500520833	30031.24	<0.0001	**
Adherente*recubrimiento	1	475020833.3	475020833	28501.24	<0.0001	**
Factorial vs Testigo	1	2904000000	2904000000	174240	<0.0001	**
Error	10	133333.33	16666.67			
Total	14	1586933333				

CV= 0.44%

En la prueba de Tukey del N° promedio de rizobios por semilla peletizados con distintos materiales (figura 3.1), se observa que el adherente maicena, obtuvo un valor

promedio de 34666.67 rizobios/semillas superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 21750 rizobios/semilla a los 0 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 34666.67 rizobios/semilla el cual supera estadísticamente a la harina de trigo que obtuvo un valor de 21750 rizobios/semilla a los 0 días inmediatamente post peleteado.

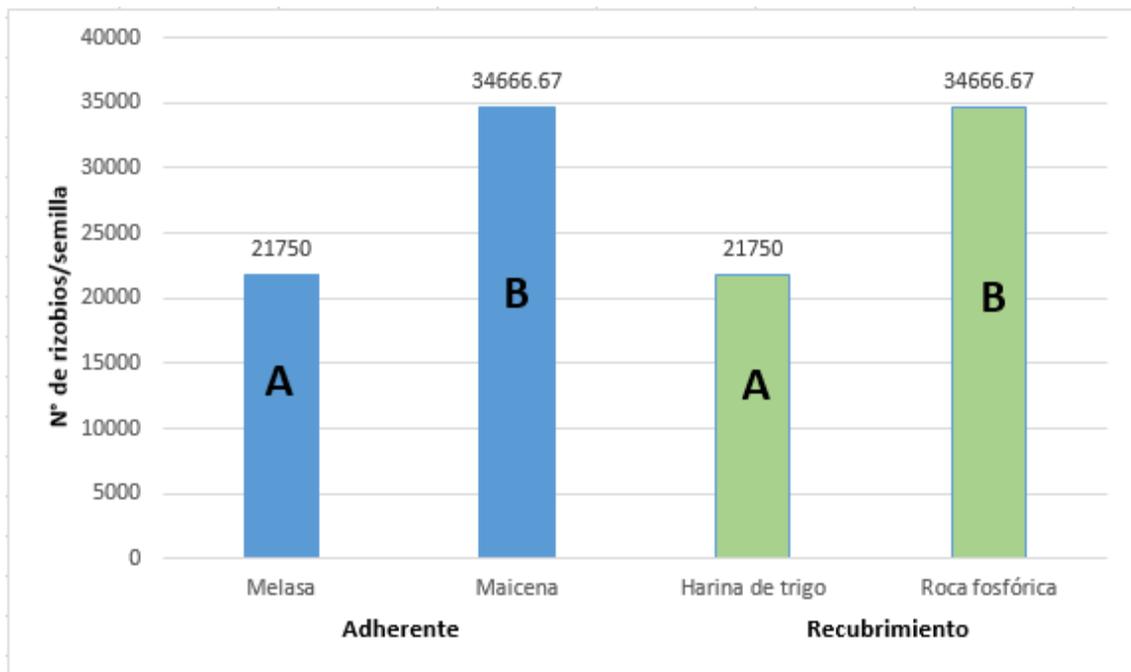


Figura 3.1. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 0 días.

En la Figura 3.2 se muestra la Prueba de Tukey del efecto de la interacción de los factores adherente y recubrimiento en la población promedio de rizobios/semilla a los 0 días. El mayor valor se encontró en el tratamiento testigo T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un valor de 35000, seguido del tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica), y seguidas estas de los tratamientos T3 (melaza + caña de azúcar) y tratamiento T4 (maicena + harina de trigo), ambos con valores de 34500 rizobios/semilla. Todos los tratamientos antes mencionados presentaron diferencia estadística significativa respecto al tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo), que presentó el menor valor que fue de 9000 rizobios/semilla.

Pacotaype (2018) en semillas de alfalfa peleteadas, a los 0 días, encontró 34500 rizobios/semilla, similares a los obtenidos en el presente muestreo.

Racca et al. (2001) indican que para una excelente nodulación en semillas pequeñas como el trébol rojo, se requiere mínimamente 1000 rizobios/semilla, número que fue superado ampliamente en todos los tratamientos evaluados.

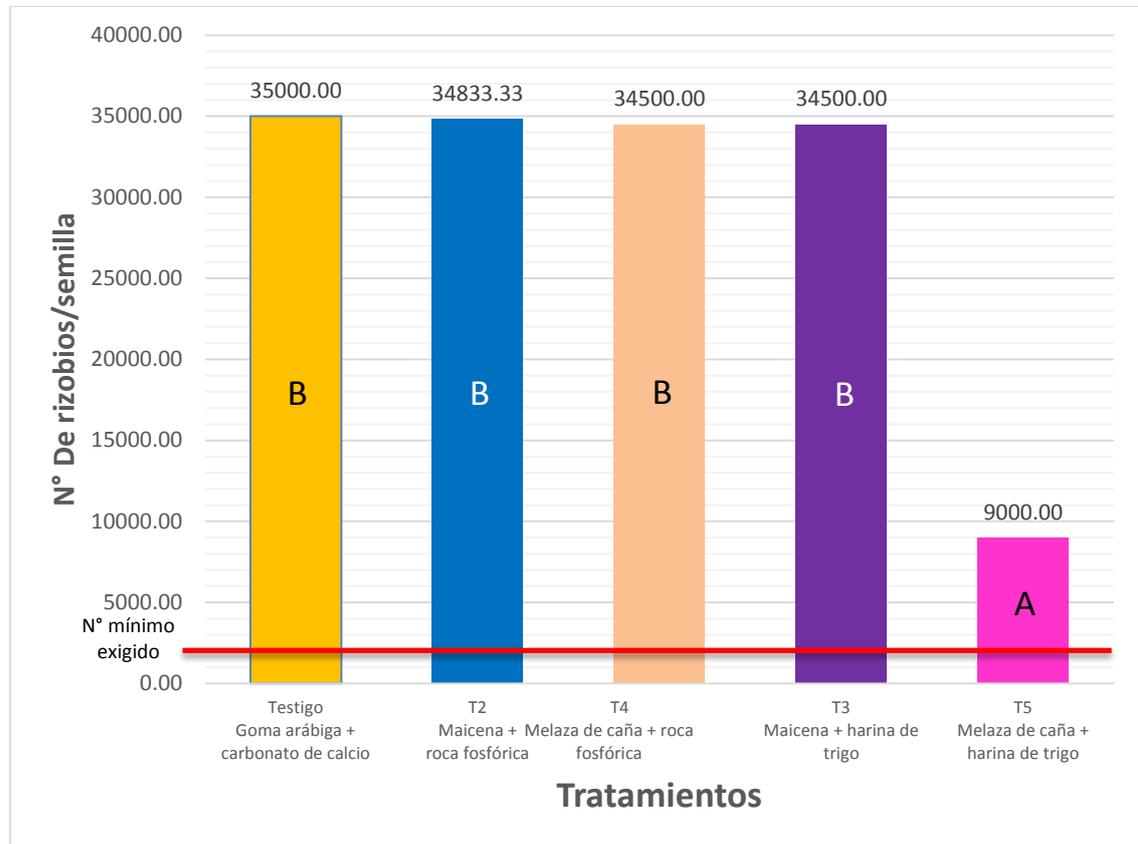


Figura 3.2. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 0 días.

3.1.2. Población bacteriana a los 7 días

En la Tabla 3.2 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 7 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre el factor de variación del efecto principal del adherente, mientras que el efecto del factor recubrimiento no tuvo significación estadística. También se encontró diferencia significativa en los efectos de la interacción entre el adherente y el recubrimiento.

El coeficiente de variación de 0.53% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.2. Análisis de varianza del número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 7 días.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	4	2361566667	590391667	35423.5	<0.0001	**
Adherente	1	1963520833	1963520833	117811.23	<0.0001	**
Recubrimiento	1	20833.33	20833.33	1.25	0.3559	ns
Adherente*recubrimiento	1	1735423464	1963520833	117811.23	<0.0001	**
Factorial vs testigo	1	2882041667	2882041667	172922.5	<0.0001	**
Error	10	133333.33	16666.67			
Total	14	2361733333				

CV= 0.53%

En la prueba de Tukey del N° promedio de rizobios por semilla peletizados con distintos materiales (figura 3.3), se observa que el adherente maicena, con 34583.33 rizobios/semillas supera estadísticamente al adherente melaza que alcanzó un valor de 9000 rizobios/semilla a los 7 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que no existe diferencia estadística entre los 2 factores (Harina de trigo y Roca fosfórica)

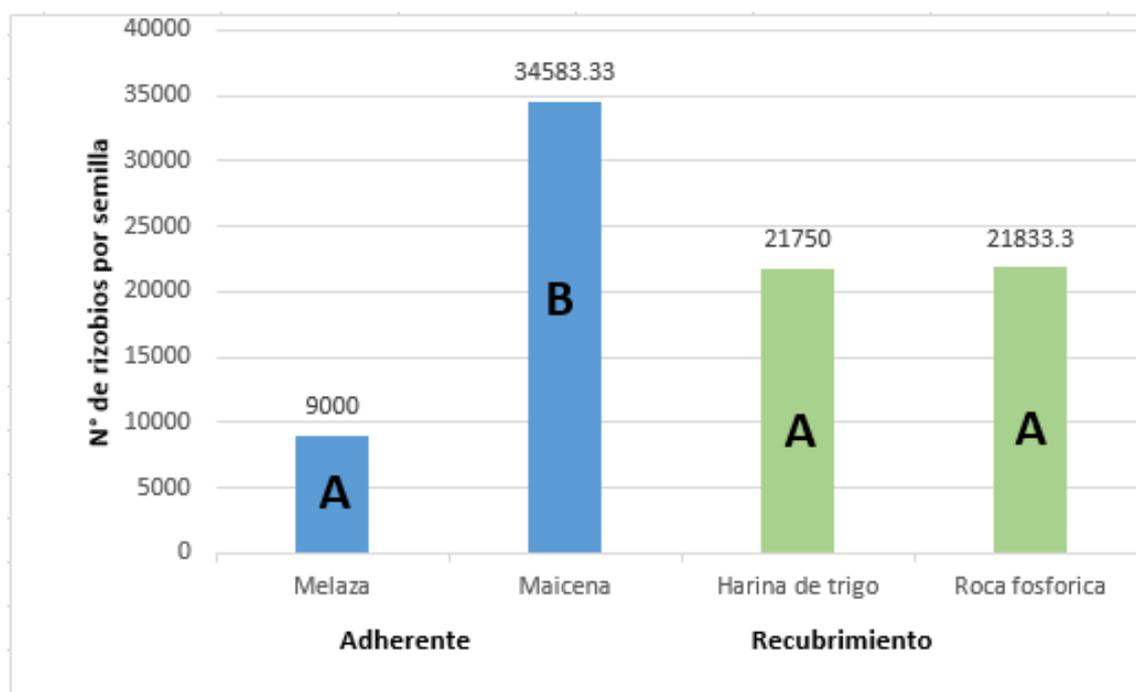


Figura 3.3. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 7 días.

En la Figura 3.4 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 7 días. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un valor de 34883, seguido de los tratamientos T3 (melaza + caña de azúcar) y T2 (maicena + roca fosfórica), ambos con valores de 34500 rizobios/semilla. Todos los tratamientos antes mencionados presentaron diferencia estadística significativa respecto a los tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo), que presentaron el menor valor que fue de 9000 rizobios/semilla. En el presente muestreo, el número de rizobios/semilla fue también superior a lo recomendado por Racca et al. (2001).

Pacotaype (2018) en semillas de alfalfa peleteadas, a los 7 días, encontró 34500 rizobios/semilla. Podemos señalar que los resultados obtenidos a los 7 días son similares.

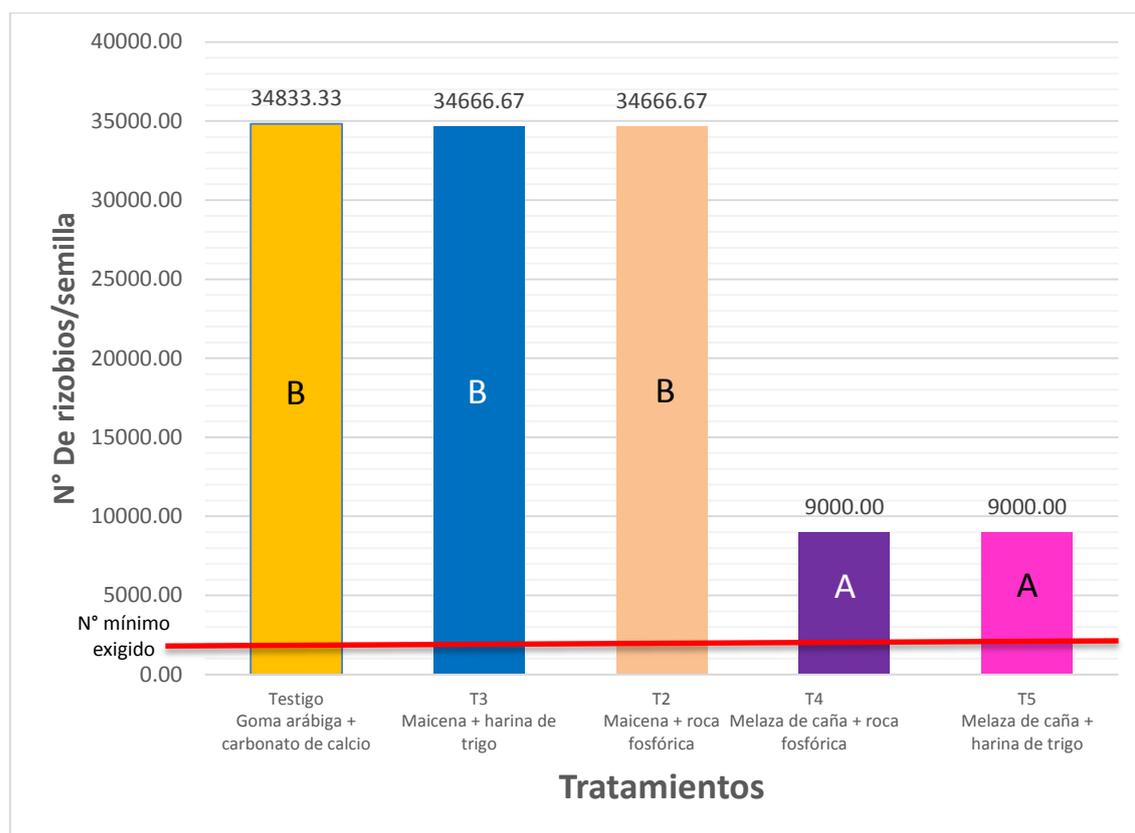


Figura 3.4. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 7 días.

3.1.3. Población bacteriana a los 12 días

En la Tabla 3.3 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 12 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en los factores de variación de los efectos principales de adherente y recubrimiento en la semilla de Trébol rojo, también se encontró diferencia significativa en los efectos de la interacción entre el adherente y el recubrimiento.

El coeficiente de variación de 0.62% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.3. Análisis de varianza del número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 12 días.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	4	15761666.7	3940416.67	13510	<0.0001	**
Adherente	1	5070000	5070000	14601.6	<0.0001	**
Recubrimiento	1	4940833.33	4940833.33	14229.6	<0.0001	**
Adherente*recubrimiento	1	4813333.33	4813333.33	13862.4	<0.0001	**
Factorial vs testigo	1	28383750	28383750	97315.71	<0.0001	**
Error	10	2333.33	291.67			
Total	14	15765000				

C.V.=0.62%

En la prueba de Tukey del N° promedio de rizobios por semilla peletizados con distintos materiales (figura 3.5), se observa que el adherente maicena, con 3475 rizobios/semillas supera estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 2175 rizobios/semilla a los 12 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 3466.67 rizobios/semilla el cual supera estadísticamente a la harina de trigo que obtuvo un valor de 2183 rizobios/semilla a los 12 días inmediatamente post peleteado.

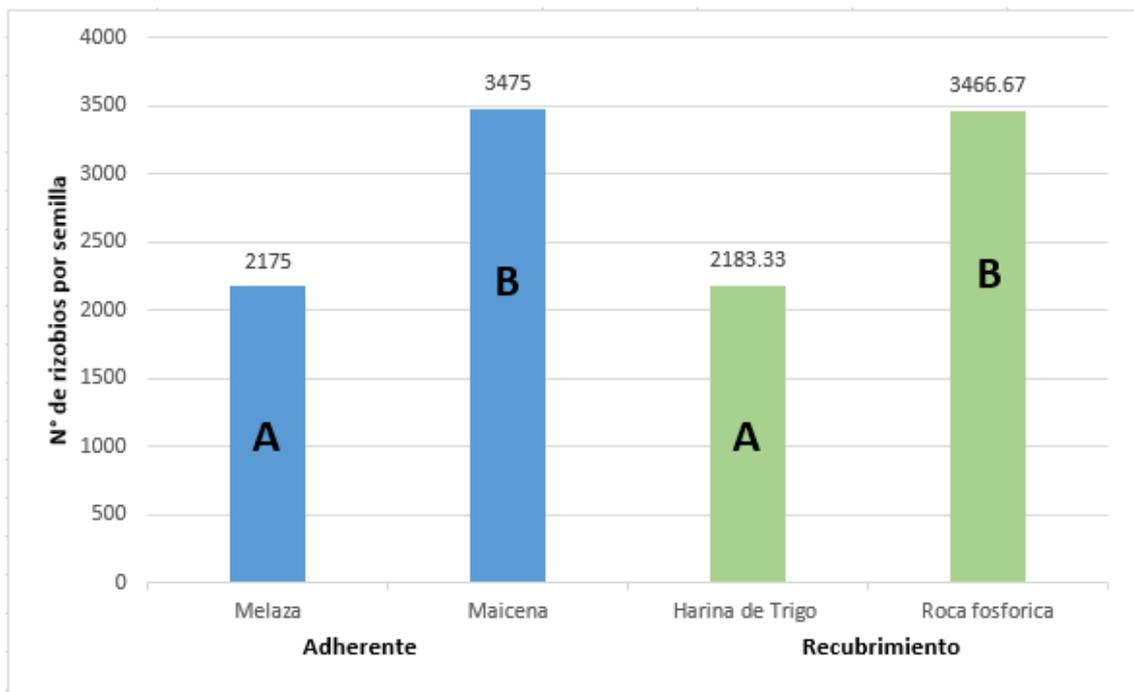


Figura 3.5. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 12 días.

En la Figura 3.6 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 12 días. El mayor valor se encontró en el tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un valor de 3483, seguido del tratamiento T3 (melaza + caña de azúcar) con un valor de 3466, tratamiento T1(goma arábica + carbonato de calcio) y tratamiento T4 (maicena + harina de trigo), ambos con valores de 3450 rizobios/semilla, finalmente el menor valor fue del tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) con un valor de 900 rizobios/semilla.

En el presente muestreo, todos los tratamientos evaluados, excepto el tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) superaron los 1000 rizobios/semilla recomendado por Racca et al. (2001)

Pacotaype (2018) en semillas de alfalfa peleteada, a los 14 días, encontró 3450 rizobios/semilla. Podemos señalar que los resultados obtenidos a los 12 días son similares.

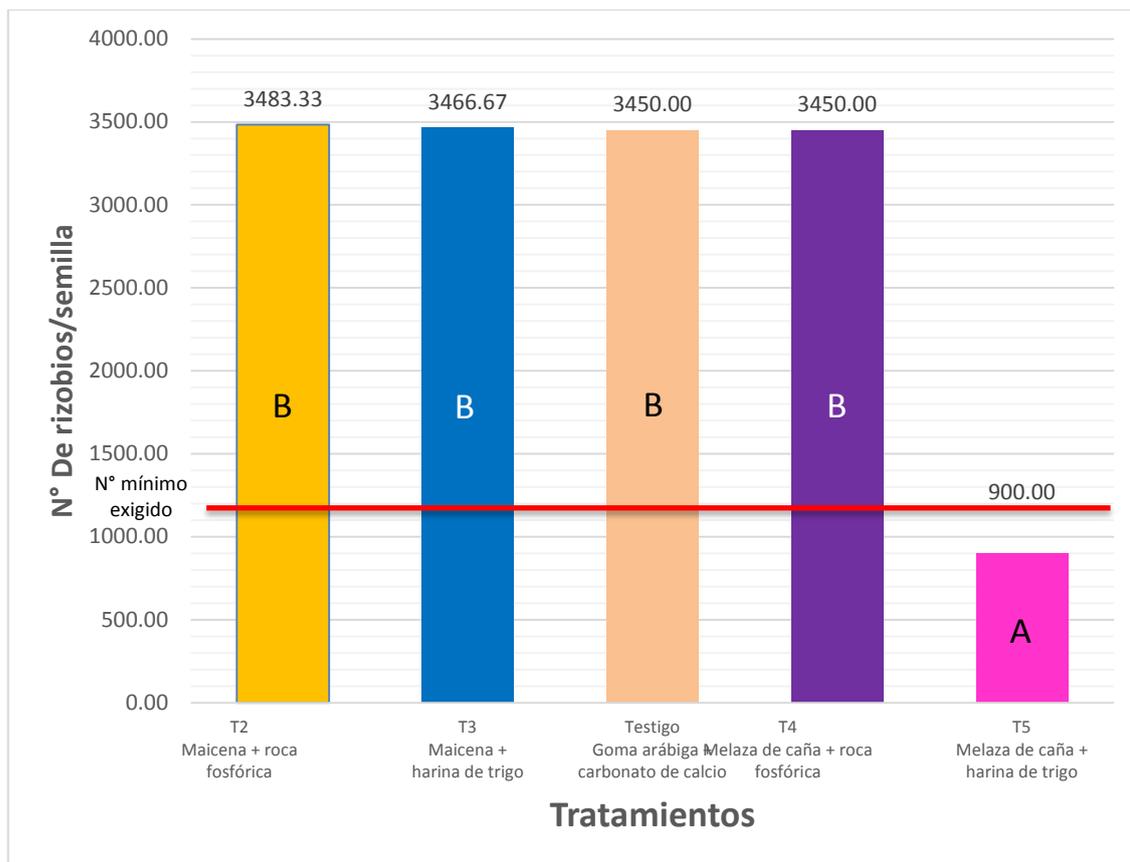


Figura 3.6. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 12 días.

3.1.4. Población bacteriana a los 18 días

En la Tabla 3.4 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 18 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en los factores de variación de los efectos principales de adherente y recubrimiento de la semilla de Trébol rojo, también se encontró diferencia significativa en los efectos de la interacción entre el adherente y el recubrimiento.

El coeficiente de variación de 0.44% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.4. Análisis de varianza del número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 18 días.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	4	1683732.57	420933.14	15024.38	<0.0001	**
Adherente	1	37520.08	37520.08	1071.36	<0.0001	**
Recubrimiento	1	28910.08	28910.08	825.51	<0.0001	**
Adherente*recubrimiento	1	91525.33	91525.33	2613.45	<0.0001	**
Factorial vs testigo	1	773684.08	773684.08	27615.14	<0.0001	**
Error	10	224.13	28.02			
Total	14	1684012.73				

C.V.=2.02%

En la prueba de Tukey del N° promedio de rizobios por semilla peletizados con distintos materiales (figura 3.7), se observa que el adherente maicena, con un valor de 158.58 rizobios/semillas supera estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 46.75 rizobios/semilla a los 18 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor de 151.75 rizobios/semilla el cual supera estadísticamente a la harina de trigo que obtuvo un valor de 53.58 rizobios/semilla a los 12 días inmediatamente post peleteado.

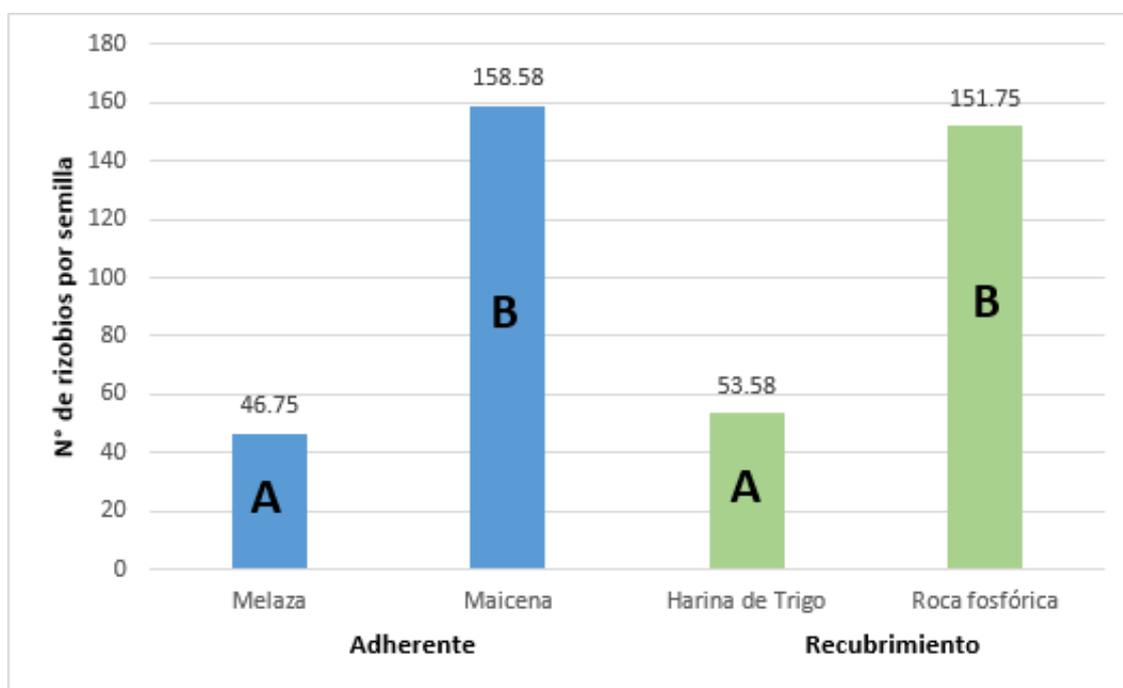


Figura 3.7. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 0 días.

En la Figura 3.8 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 18 días post peletado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con 900 rizobios/semilla, el cual estadísticamente superó con diferencia significativa a todos los tratamientos. El tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un valor de 295 rizobios por semilla, superó estadísticamente al tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo), el cual tienen un valor de 85 rizobios/semilla. Los tratamientos T3 (melaza + caña de azúcar) y tratamiento T4 (maicena + harina de trigo), fueron los que tuvieron el valor más bajo con 22.17 y 8.50 rizobios/semilla respectivamente.

A los 18 días, todos los tratamientos presentaron valores inferiores a lo recomendado por Racca et al (2001). De igual manera, Pacotaype (2018) en semillas de alfalfa peleteadas, a los 18 días, encontró menos de 1000 rizobios/semillas de alfalfa.

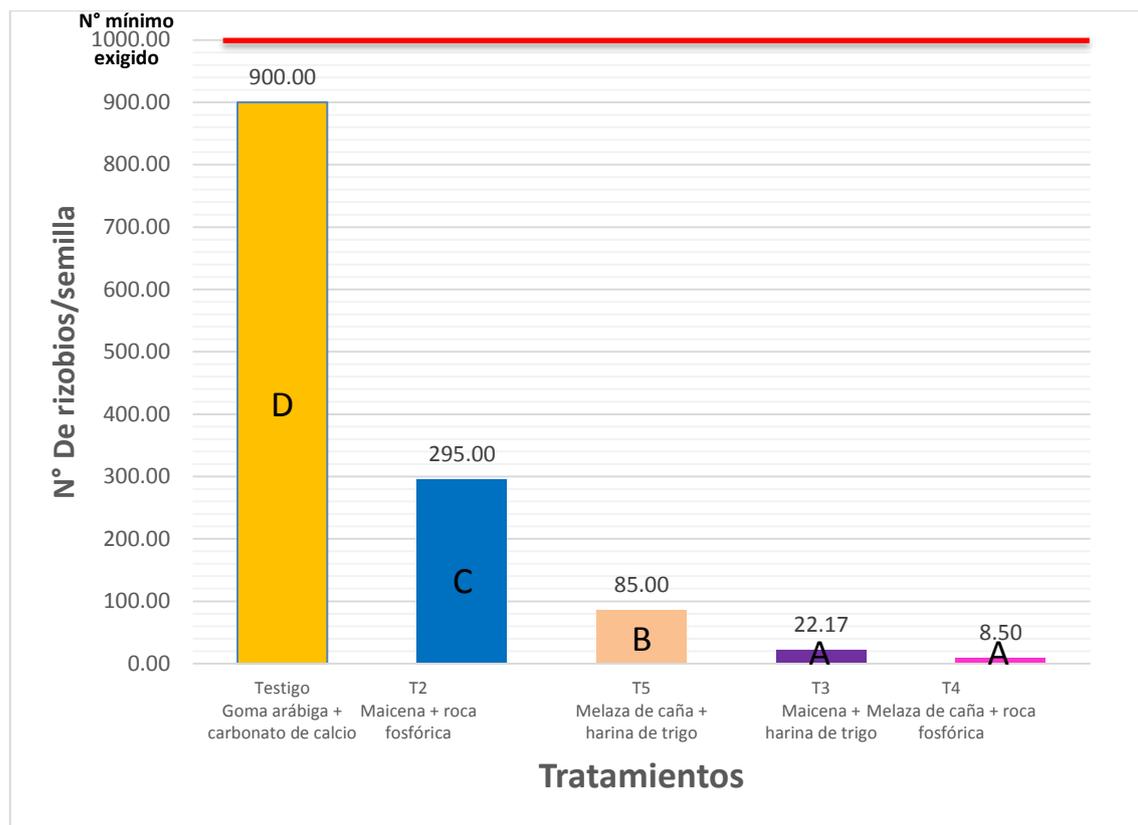


Figura 3.8. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 18 días.

3.1.5. Población bacteriana a los 24 días

En la Tabla 3.5 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 24 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre el factor de variación del efecto principal del adherente, mientras que el efecto del factor recubrimiento no tuvo significación estadística. También se encontró diferencia significativa en los efectos de la interacción entre el adherente y el recubrimiento.

El coeficiente de variación de 2.55% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptable.

Tabla 3.5. Análisis de varianza del número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 24 días.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	4	13807.14	3451.79	6156.57	<0.0001	**
Adherente	1	2197.81	2197.81	3924.66071	<0.0001	**
Recubrimiento	1	2.8	2.8	5	0.0924	ns
Adherente*recubrimiento	1	2.8	2.8	5	0.0924	ns
Factorial vs testigo	1	1.12	0.56	1	0.4096	
Error	10	4.49	0.56			
Total	14	13812.75				

C.V.=2.55%

En la prueba de Tukey del N° promedio de rizobios por semilla peletizados con distintos materiales (figura 3.9), se observa que el adherente maicena, con 29 rizobios/semillas supera estadísticamente al adherente melaza que alcanzó un valor promedio de 1.93 rizobios/semilla a los 24 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que no existe diferencia estadística entre los 2 factores (Harina de trigo y Roca fosfórica).

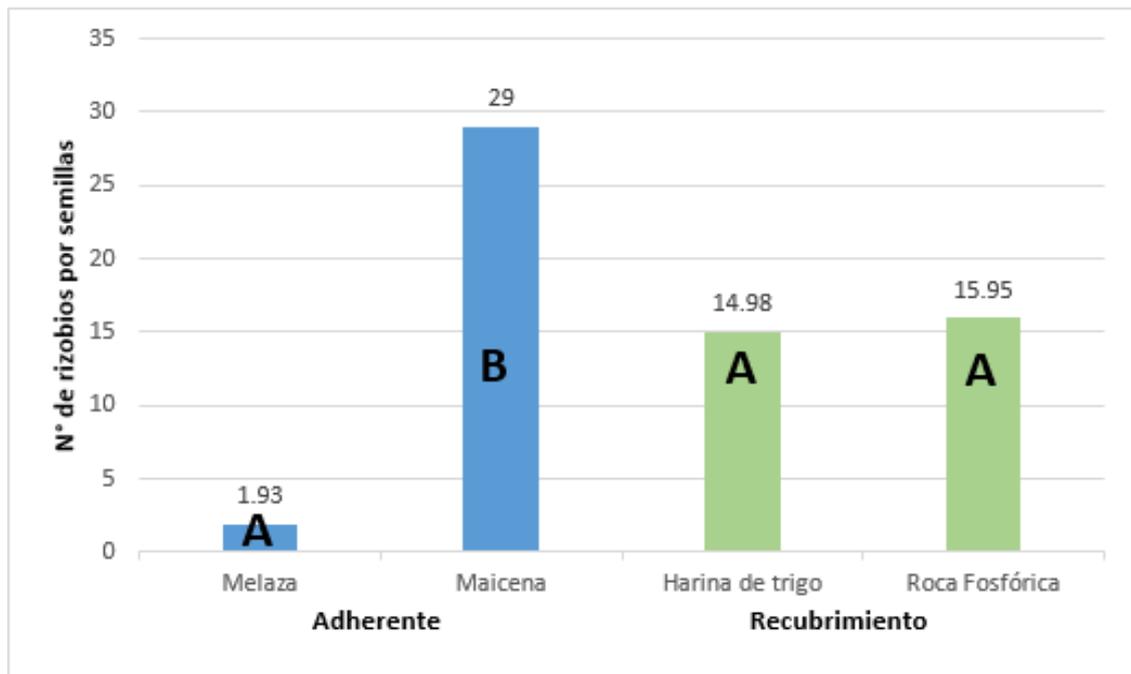


Figura 3.9. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 24 días.

En la Figura 3.10 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 24 días post peletado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con 85 rizobios/semilla, el cual estadísticamente superó con diferencia significativa a todos los tratamientos, seguido de los tratamientos T2 (maicena + roca fosfórica) y tratamiento T3 (melaza + caña de azúcar) los cuales tienen un valor de 29 rizobios por semilla, los tratamientos que obtuvieron menor valor fueron los tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo), los cuales obtuvieron valores de 2.90 y 0.97 rizobios/semilla respectivamente.

Los resultados obtenidos a los 24 días en todos los tratamientos están por debajo de lo mínimo exigido, citado por Racca et al. (2001).

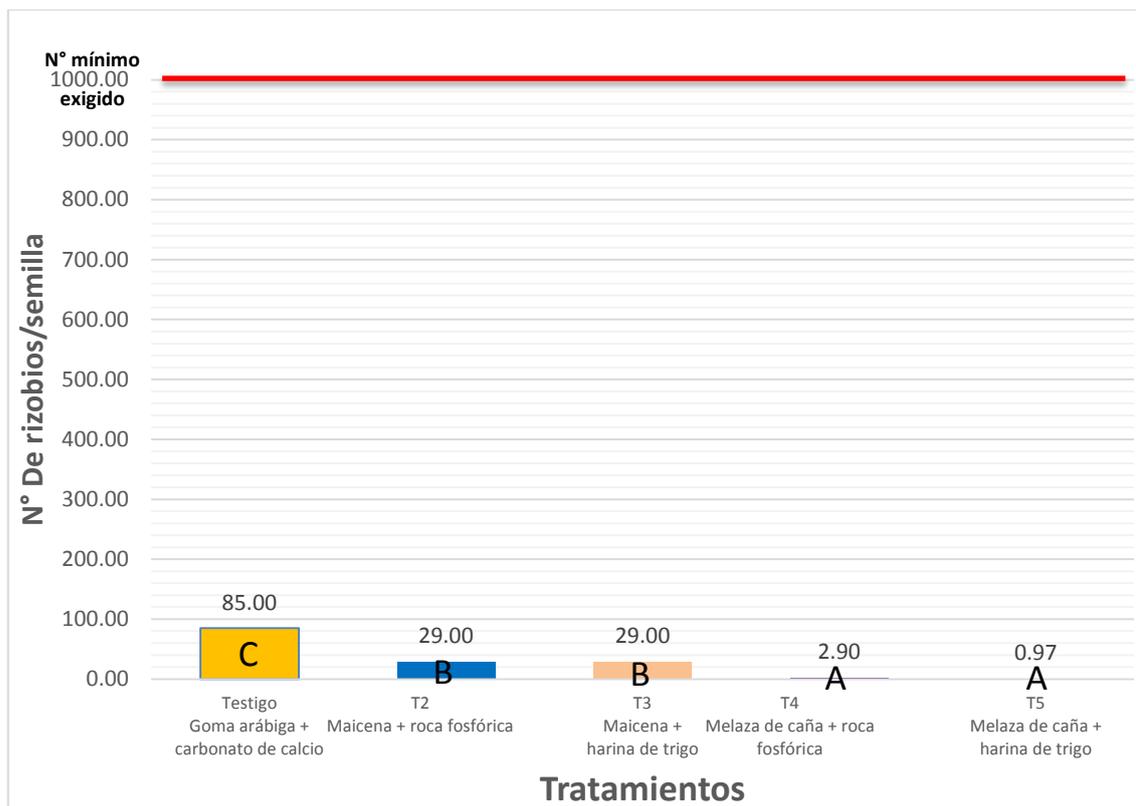


Figura 3.10. Prueba de Tukey (0.05) de la interacción de los factores de variación + el testigo en el número de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*/semilla a los 24 días.

3.1.6. Tendencia de la dinámica poblacional

En la Figura 3.6 se muestra la tendencia de la variación de la dinámica poblacional a lo largo del período de evaluación en cada tratamiento, donde se puede observar el número de días donde la población de rizobios se encuentra por encima de los 1000 rizobios/semillas, valor mínimo exigido, indicado por Racca et al. (2001).

Tabla 3.6. Ecuación para la determinación exacta del tiempo máximo post peleteado que la población de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* se encuentra con valores superiores a 1000 rizobios/semilla

Tratamiento	Ecuación	Tiempo máximo obtenidos (días)
T1 (Goma arábica + carbonato de calcio)	$Y = -1727.6x + 32931$	18
T2 (Maicena + roca fosfórica)	$Y = -1728.8x + 31720$	17
T3 (Maicena + harina de trigo)	$Y = -1721.7x + 29008.4$	16
T4 (Melaza de caña + roca fosfórica)	$Y = -1342.6x + 22566.8$	16
T5 (Melaza de caña + harina de trigo)	$Y = -448.04x + 9263.3$	11

De acuerdo a las ecuaciones de la Tabla 3.11 el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) mantiene el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 18 días post peleteado. El tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) mantiene el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 17 días post peleteado. Los tratamientos T3 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica) mantienen el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 16 días post peleteado. El tratamiento T5 (Melaza de caña + harina de trigo) mantiene adecuada viabilidad de los rizobios en las semillas solamente hasta los 11 días. La tendencia general en todos los tratamientos es la disminución del número de rizobios a lo largo del tiempo, al respecto Lodeiro (2015) indica que la muerte de rizobios en semillas peletizadas se debe principalmente a la pérdida de humedad, por lo que recomiendan almacenar las semillas a temperaturas entre 5 y 15°C. En este trabajo de investigación, las semillas de trébol rojo peletizadas fueron almacenadas en cajas de tecnopor a temperatura ambiente, así evitar la pérdida de humedad y mantener la viabilidad de rizobios por más tiempo. Racca et al. (2001) indican que una buena peletización puede almacenarse desde pocos días hasta un mes según la calidad final del pelet y el polvo usado. En ese sentido, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede indicar que los adherentes maicena y melaza de caña pueden reemplazar a la goma arábica, mientras que el carbonato de calcio puede ser sustituido por la harina de trigo y roca fosfórica, excepto la mezcla maicena + roca fosfórica, ya que ésta mantiene la viabilidad adecuada de los rizobios solo hasta los 6 días.

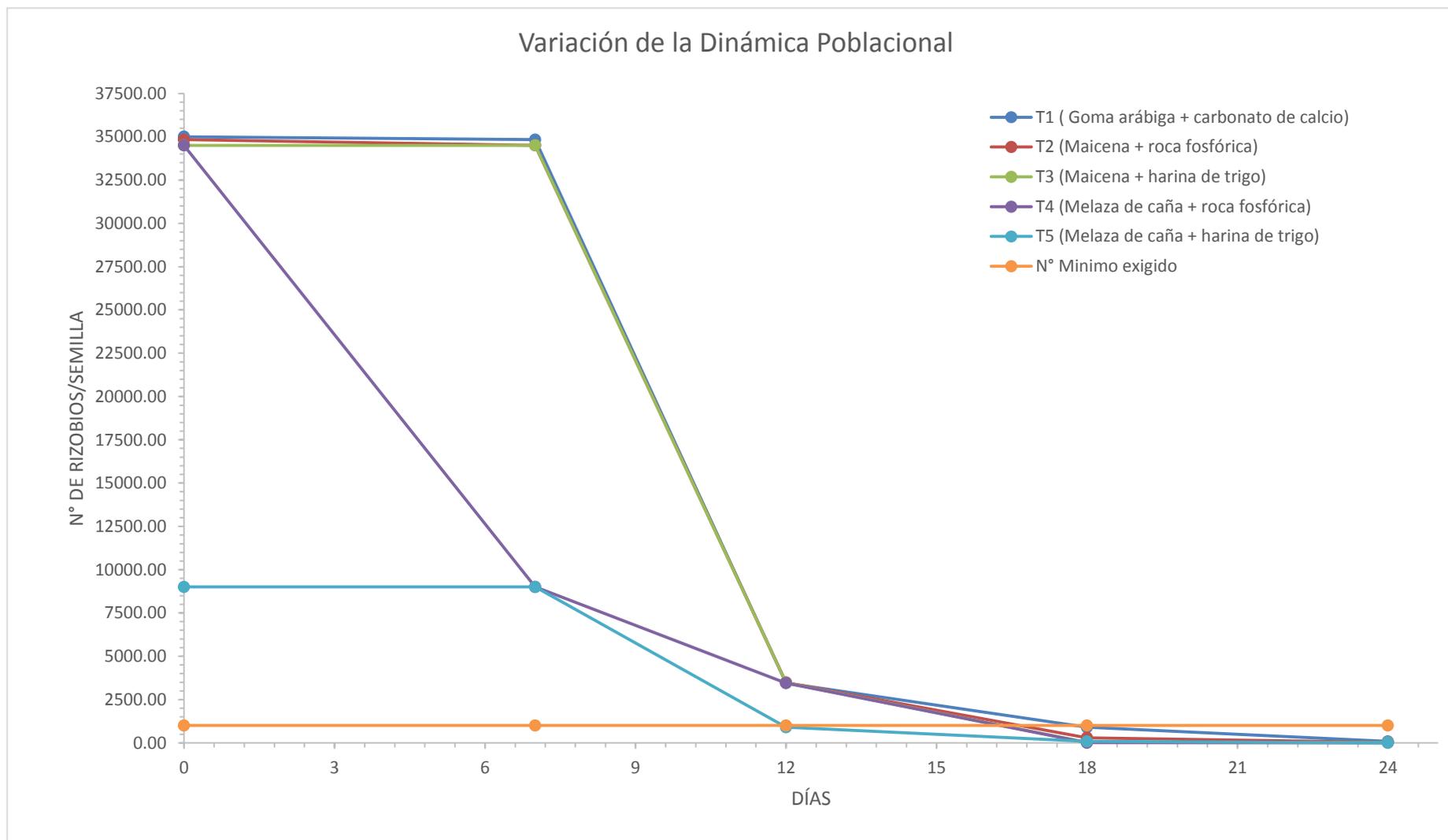


Figura 3.11. Dinámica poblacional de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en cinco tratamientos a través del tiempo, en condiciones de laboratorio

3.2. VIABILIDAD DE *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* EN SEMILLAS PELETIZADAS DE TRÉBOL ROJO (*Trifolium pratense*) EN CONDICIONES DE INVERNADERO

3.2.1. Índice de nodulación a los 0 días

En la Tabla 3.7 se presenta el ANVA del índice de nodulación a los 0 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en los factores de variación de los efectos principales de adherente y recubrimiento en semillas de Trébol rojo, no se encontró significación estadística de la interacción entre los factores de variación.

El coeficiente de variación de 26.16% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.7. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	5	1872.21	374.44	27.1	<0.0001	**
Adherente	1	105.06	105.06	7.60	0.0577	*
Recubrimiento	1	280.56	280.56	20.30	0.0062	**
Adherente*recubrimiento	1	22.56	22.56	1.63	0.34	ns
Factorial vs testigos	1	6.02	6.02	0.44	0.5192	ns
Testigo1 vs testigo 2	1	1458	1458	105.5	<0.0001	**
Error	18	207.29	13.82			
Total	23	2093.96				

C.V.=26.16

En la prueba de Tukey del índice de nodulación de semillas de trébol rojo peletizadas con distintos materiales (figura 3.12), se observa que el adherente maicena, obtuvo un índice de nodulación promedio de 17.13 superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 12 IN a los 0 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 18.75 índice de nodulación el cual supera estadísticamente a la harina de trigo que obtuvo un valor de 10.38 índice de nodulación a los 0 días inmediatamente post peleteado.

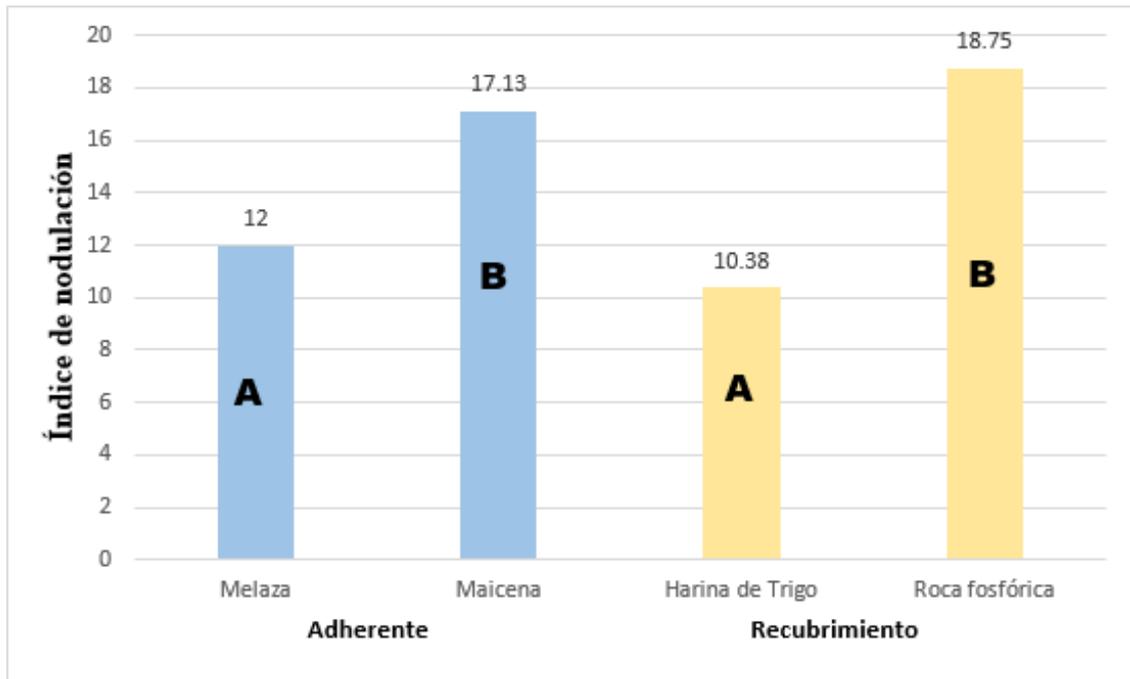


Figura 3.12. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 0 días.

En la Figura 3.13 se muestra la Prueba de Tukey del índice de nodulación promedio a los 0 días. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un valor de 27.0, seguido del tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un índice de nodulación de 22.50, estos 2 tratamientos antes mencionados superaron estadísticamente a los tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) que tuvo en promedio un IN = 15, tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) con un IN= 11.75 y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presentó un IN= 9.

De los tratamientos mencionados se puede apreciar que los T1, T2 y T4, tuvieron un índice de nodulación alto, en cambio los tratamientos T3 y T5 obtuvieron un índice de nodulación medio.

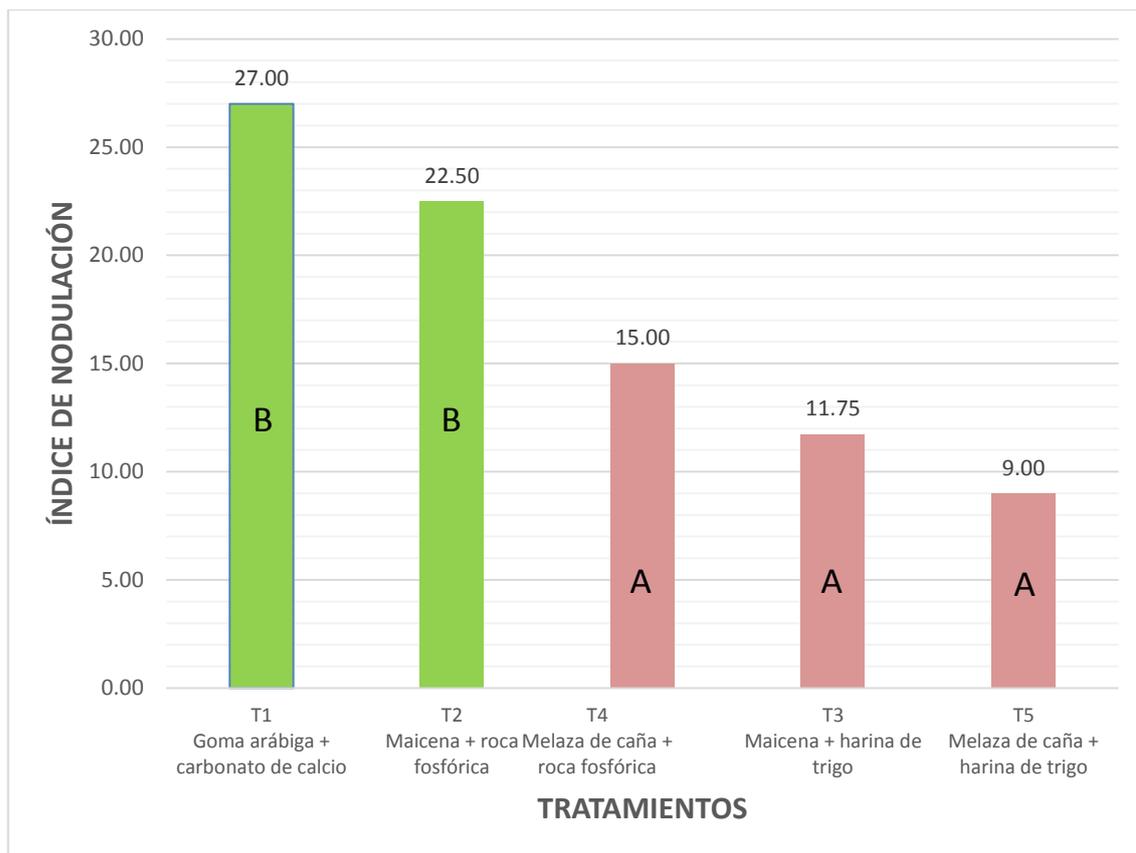


Figura 3.13. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado.

3.2.2. Índice de nodulación a los 7 días

En la Tabla 3.8 se presenta el ANVA del índice de nodulación a los 0 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en los factores de variación de los efectos principales de adherente y recubrimiento en semillas de Trébol rojo, no se encontró significación estadística de la interacción entre los factores de variación.

El coeficiente de variación de 25.79% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.8. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 0 días post peleteado

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	5	2194.21	438.84	50.27	<0.0001	**
Adherente	1	564.06	564.06	45.92	0.0001	**
Recubrimiento	1	76.56	76.56	6.23	0.0341	*
Adherente*recubrimiento	1	45.56	45.56	3.71	0.0862	ns
Factorial vs testigos	1	50.02	50.02	5.73	0.0302	**
Testigo1 vs testigo 2	1	1458	1458	167	<0.0001	**
error	18	130.96	8.73			
total	23	2365.96				

C.V.=25.79

En la prueba de Tukey del índice de nodulación de semillas de trébol rojo peletizadas con distintos materiales (figura 3.14), se observa que el adherente maicena, obtuvo un índice de nodulación promedio de 16.38 superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 4.5 IN a los 7 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 12.63 de índice de nodulación el cual supera estadísticamente a la harina de trigo que obtuvo un valor de 8.25 de índice de nodulación a los 7 días inmediatamente post peleteado.

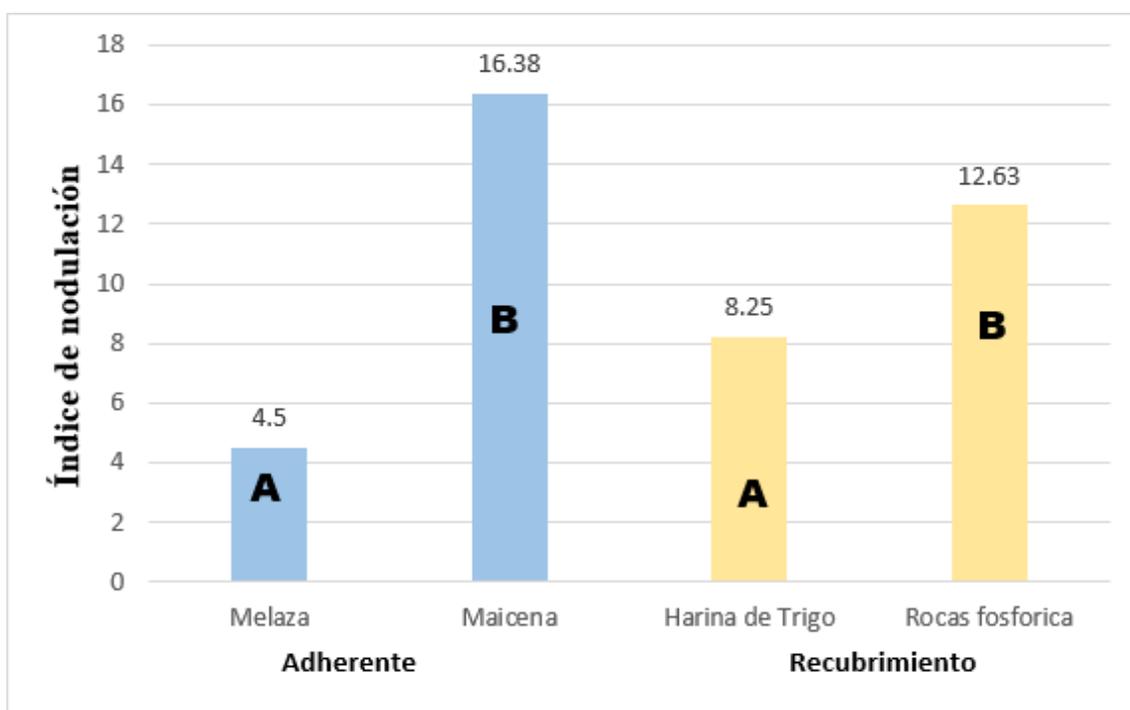


Figura 3.14. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 7 días.

En la Figura 3.15 se muestra la Prueba de Tukey del índice de nodulación promedio a los 7 días post peleteado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un valor de 27.00, seguido del tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un índice de nodulación de 20.50, estos 2 tratamientos antes mencionados superaron estadísticamente al tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) que tuvo un IN= 12.50, a la vez este tratamiento superó estadísticamente a los tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) que tuvo en promedio un IN = 5 y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presentó un IN= 4.

De los tratamientos mencionados se puede apreciar que los T1 y T2, tuvieron un índice de nodulación alto, el tratamiento T3 tuvo un índice de nodulación medio y los tratamientos T4 y T5 un índice de nodulación bajo.

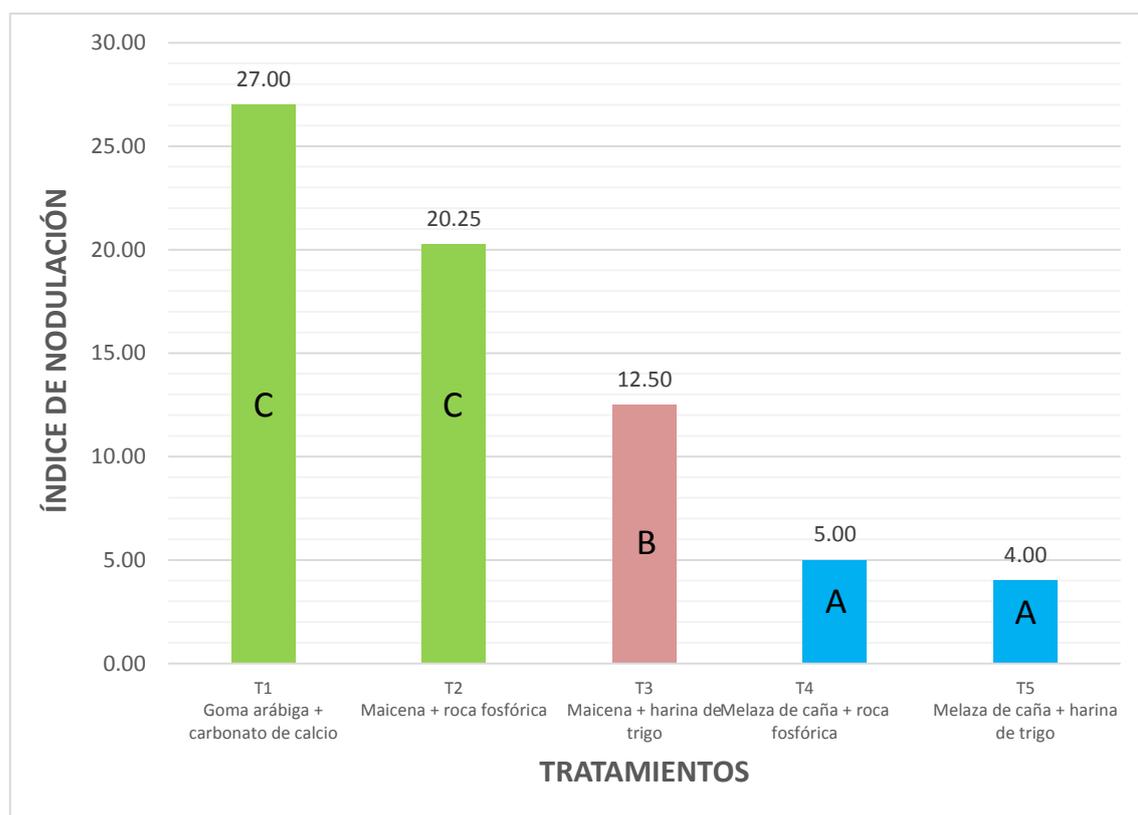


Figura 3.15. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 7 días post peleteado.

3.2.3. Índice de nodulación a los 12 días

En la Tabla 3.9 se presenta el ANVA del índice de nodulación a los 12 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en el factor adherente en semillas peletizadas de trébol rojo mientras que el factor recubrimiento no

se encontró diferencia estadística, no se encontró significación estadística de la interacción entre los factores de variación.

El coeficiente de variación de 34.32% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.9. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 12 días post peleteado

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	5	1311.33	262.27	25.71	<0.0001	**
Adherente	1	240.25	240.25	23.55	0.0003	**
Recubrimiento	1	12.25	12.25	1.20	0.2356	ns
Adherente*recubrimiento	1	2.25	2.25	0.22	0.5992	ns
Factorial vs testigos	1	44.08	44.08	4.32	0.0552	ns
Testigo 1 Vs Testigo 2	1	1012.5	1012.5	99.26	<0.0001	**
Error	18	153	10.2			
Total	23	1467.33				

C.V.=34.32

En la prueba de Tukey del índice de nodulación de semillas de trébol rojo peletizadas con distintos materiales (figura 3.16), se observa que el adherente maicena, obtuvo un índice de nodulación promedio de 12.25 superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 4.5 IN a los 12 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 9.25 y la harina de trigo que obtuvo un valor de 7.5 de índice de nodulación a los 12 días inmediatamente post peleteado, entre los cuales no existe diferencia estadística.

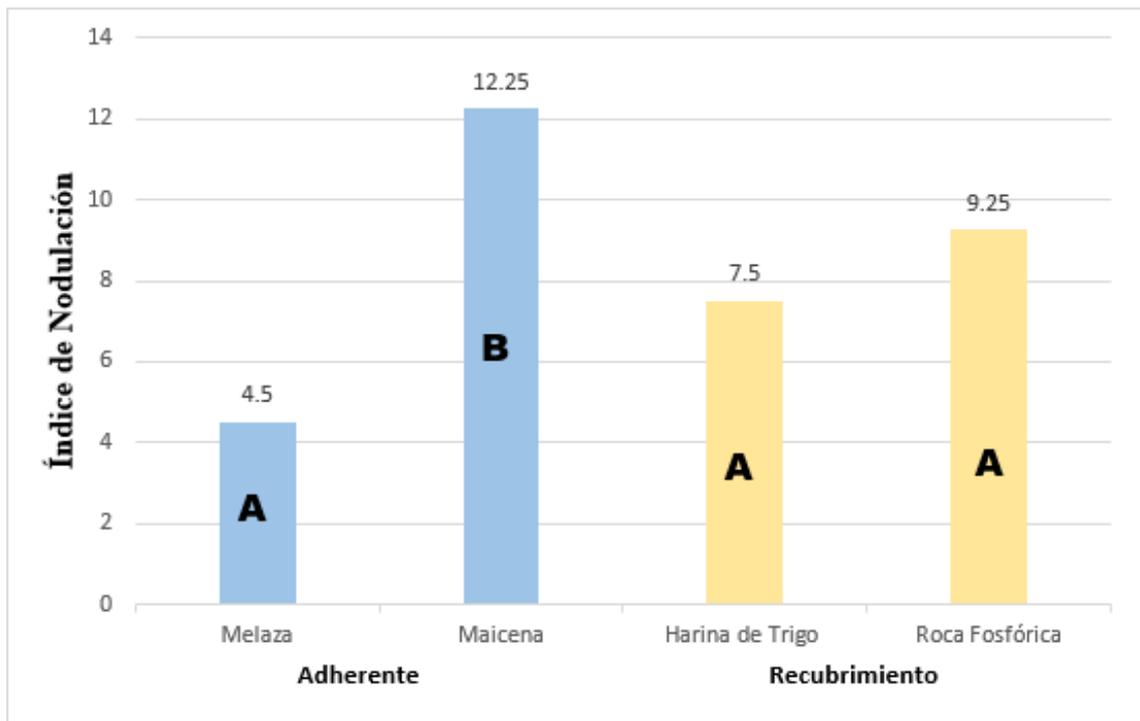


Figura 3.16. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 12 días.

En la Figura 3.17 se muestra la Prueba de Tukey del índice de nodulación promedio a los 12 días post peleteado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un valor de 22.50 el cual supero estadísticamente a los demás tratamientos, los tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un índice de nodulación de 13.50 y tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) con un índice de nodulación de 11 superaron estadísticamente a los tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) que tuvo en promedio un IN = 5 y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presento un IN= 4.

De los tratamientos mencionados se puede apreciar que el tratamiento T1 sigue teniendo un índice de nodulación alto a los 12 días, en cambio los tratamientos T2 y T3 tienen un índice de nodulación medio y finalmente los T4 y T5 tuvieron un índice de nodulación bajo.

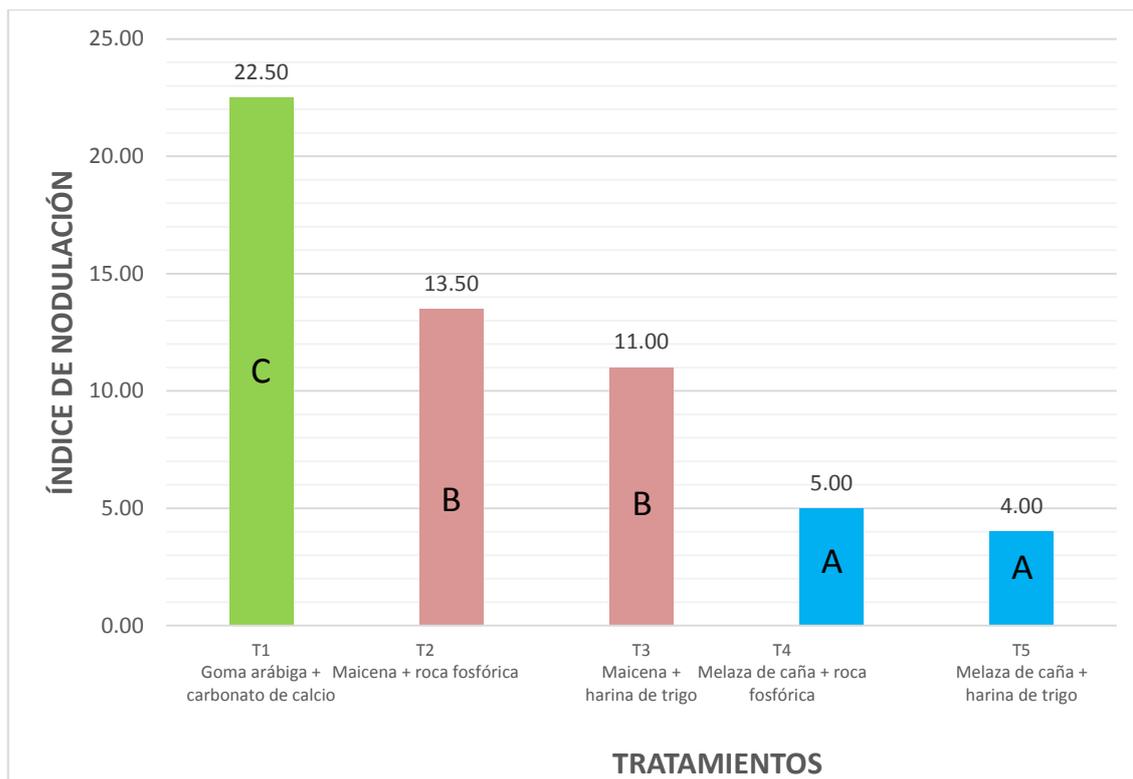


Figura 3.17. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 12 días post peleteado.

3.2.4. Índice de nodulación a los 18 días

En la Tabla 3.10 se presenta el ANVA del índice de nodulación a los 18 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en el factor adherente en semillas peletizadas de trébol rojo mientras que el factor recubrimiento no se encontró diferencia estadística, no se encontró significación estadística de la interacción entre los factores de variación.

El coeficiente de variación de 28% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.10. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 18 días post peleteado

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	5	680.83	136.17	59.2	<0.0001	**
Adherente	1	36	36	27	0.0006	**
Recubrimiento	1	4	4	3	0.1173	ns
Adherente*recubrimiento	1	0	0	0	>0.9999	ns
Factorial vs testigos	1	96.33	96.33	41.88	<0.0001	**
Testigo 1 Vs Testigo 2	1	544.5	544.5	236.74	<0.0001	**
Error	18	34.5	2.3			
Total	23	731.83				

C.V.=28%

En la prueba de Tukey del índice de nodulación de semillas de trébol rojo peletizadas con distintos materiales (figura 3.18), se observa que el adherente maicena, obtuvo un índice de nodulación promedio de 5.5 superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 2.5 IN a los 18 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 4.5 y la harina de trigo que obtuvo un valor de 3.5 de índice de nodulación a los 18 días inmediatamente post peleteado, entre los cuales no existe diferencia estadística.

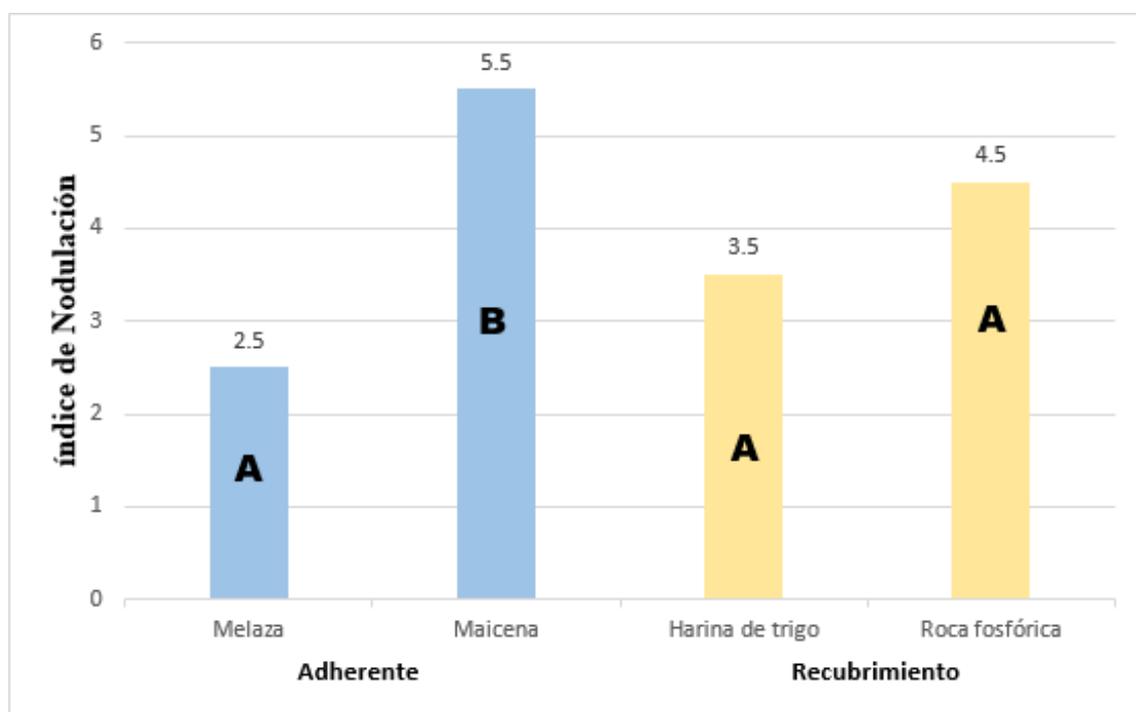


Figura 3.18. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 18 días.

En la Figura 3.19 se muestra la Prueba de Tukey del índice de nodulación promedio a los 18 días post peleteado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un índice de nodulación de 16.50 el cual supero estadísticamente a los demás tratamientos, los tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un índice de nodulación de 6.0, tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) con un índice de nodulación de 5.0 y tratamientos T4 (maicena + harina de trigo) que tuvo en promedio un IN = 3.0 estos tratamientos superaron estadísticamente al tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presento un IN= 2.0.

De los tratamientos mencionados se puede apreciar que el tratamiento T1 sigue teniendo un índice de nodulación alto a los 18 días post peleteado, en cambio los tratamientos T2, T3, T4 Y T5 tuvieron un índice de nodulación bajo.

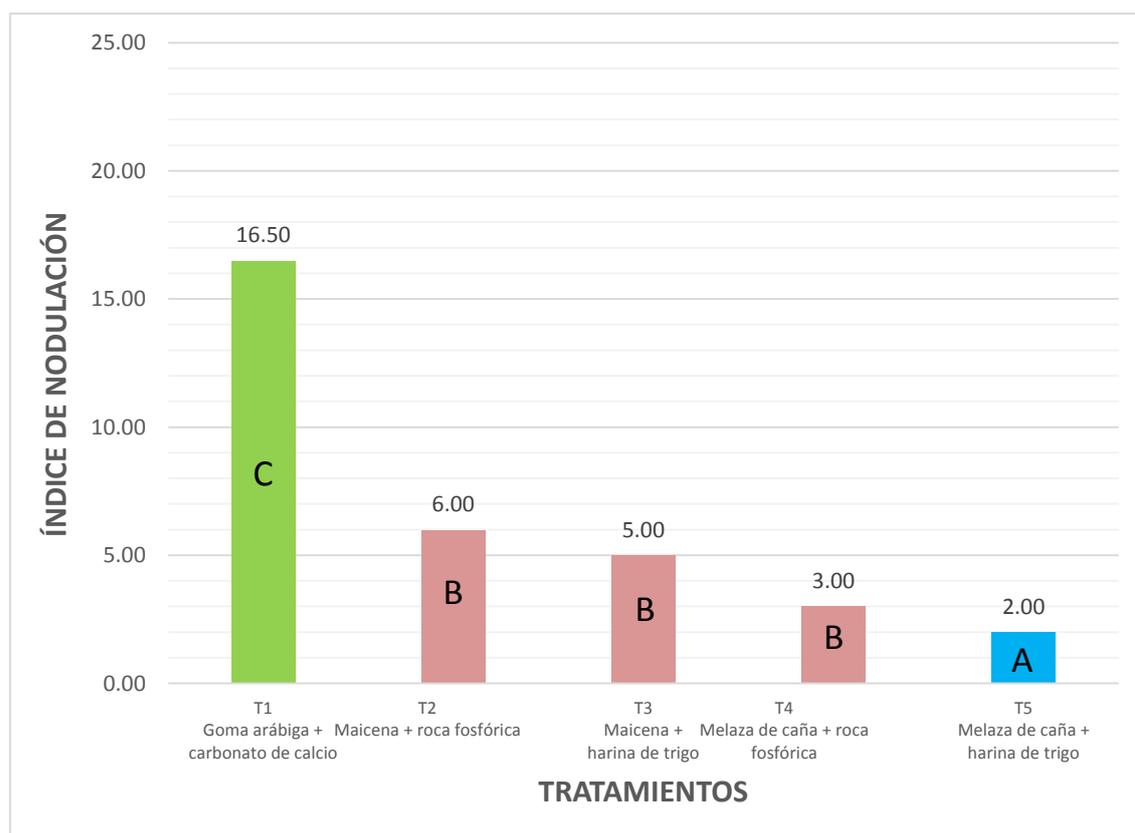


Figura 3.19. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 18 días post peleteado.

3.2.5. Índice de nodulación a los 24 días

En la Tabla 3.11 se presenta el ANVA del índice de nodulación a los 24 días, inmediatamente post peleteado, se encontró significación estadística entre en el factor

adherente en semillas peletizadas de trébol rojo mientras que el factor recubrimiento no se encontró diferencia estadística, no se encontró significación estadística de la interacción entre los factores de variación.

El coeficiente de variación de 34.70% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.11. Análisis de varianza del Índice de Nodulación a los 24 días post peleteado

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	
Tratamiento	5	43.21	8.64	30.2	<0.0001	**
Adherente	1	7.56	7.56	26.07	0.0027	**
Recubrimiento	1	0.56	0.56	1.93	0.2932	ns
Adherente*Recubrimiento	1	0.56	0.56	1.93	0.2932	ns
Factorial vs testigos	1	2.52	2.52	8.81	0.0096	**
Testigo1 Vs Testigo 2	1	32	32	111.84	<0.0001	**
Error	18	4.29	0.29			
Total	23	47.96				

C.V.=34.70%

En la prueba de Tukey del índice de nodulación de semillas de trébol rojo peletizadas con distintos materiales (figura 3.20), se observa que el adherente maicena, obtuvo un índice de nodulación promedio de 2 superando estadísticamente a la adherente melaza que alcanzó un valor de 0.63 IN a los 24 días inmediatamente post peleteado. En cuanto al recubrimiento se observa que la roca fosfórica obtuvo un valor 1.5 y la harina de trigo que obtuvo un valor de 1.13 de índice de nodulación a los 24 días inmediatamente post peleteado, entre los cuales no existe diferencia estadística.

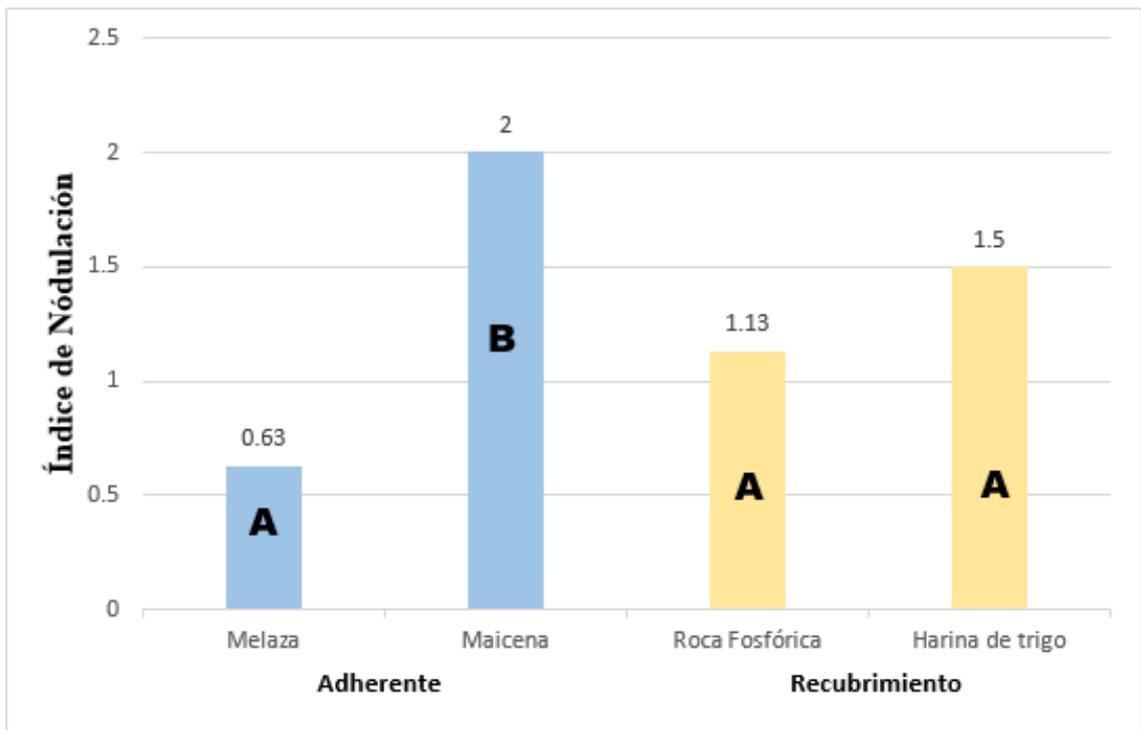


Figura 3.20. Prueba de Tukey (0.05) de los factores de variación en el índice de nodulación del trébol rojo a los 24 días.

En la Figura 3.21 se muestra la Prueba de Tukey del índice de nodulación promedio a los 24 días post peleteado. El mayor valor se encontró en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) con un índice de nodulación de 4.0 el cual supero estadísticamente a los demás tratamientos, los tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con un índice de nodulación de 2.0 y el tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) con un índice de nodulación de 2.0 superaron estadísticamente a los tratamientos T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presento un IN= 1.0 y tratamiento T4 (maicena + harina de trigo) que tuvo en promedio un IN = 0.25.

A los 24 días se observó que todos los tratamientos incluyendo el tratamiento T1 (Goma arábica + carbonato de calcio), presentaron índices de nodulación bajo (4 a 0.25).

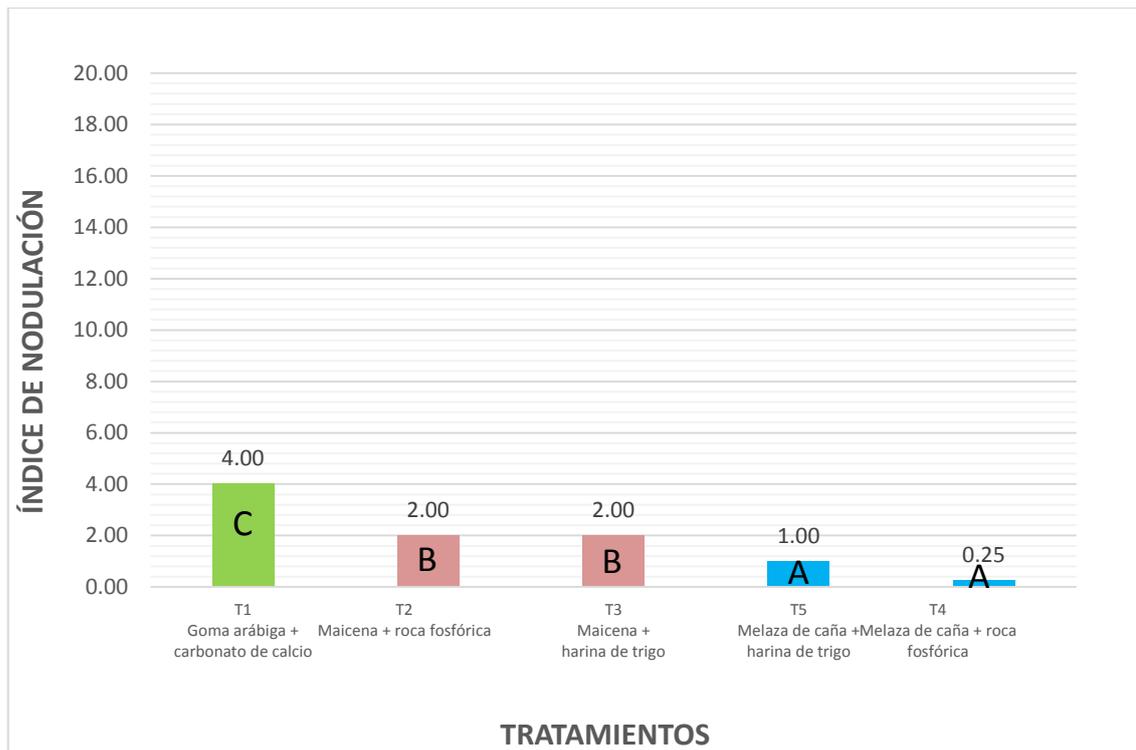


Figura 3.21. Prueba de Tukey (0.05) del Índice de Nodulación a los 24 días post peleteado.

3.2.6. Tendencia del índice de nodulación

En la Figura 3.22 se muestra la tendencia del índice de nodulación del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de trébol rojo peletizadas, en condiciones de invernadero, los tratamientos T2 (Maicena + roca fosfórica), tratamiento T3 (Maicena + harina de trigo), muestran un índice de nodulación alto y medio hasta los 18 días postpeleteado, el tratamiento T4 (Melaza + roca fosfórica) solo hasta los 7 días postpeleteado y el tratamiento T5 (Melaza de caña+ azúcar) desde los 0 días muestra un índice de nodulación medio, adicionalmente el tratamiento testigo que son semillas sin peletizar muestra que a lo largo de la evaluación no formó nódulos por lo que su índice de nodulación fue igual a 0.

Al realizar una comparación entre la tendencia de la dinámica poblacional de la Figura 3.6 y la tendencia del índice de nodulación de la figura 3.12 del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de trébol rojo peletizadas, se puede observar que la tendencia tiende a bajar conforme transcurre los días, el tratamiento T1 (Goma arábica + carbonato de calcio) es el que supera en valores estadísticamente a los demás tratamientos tanto en condiciones de laboratorio (hasta 18 días) e invernadero (hasta los 18 días). El tratamiento T2 (Maicena + roca fosfórica) presentó resultados similares

tanto en laboratorio (hasta 17 días) como en invernadero (hasta 16 días), de igual manera el tratamiento T3 (Maicena + harina de trigo), en condiciones de laboratorio presentó presencia de población bacteriana por encima de lo mínimo exigido hasta los 16 días y en invernadero su índice de nodulación fue medio hasta los 15 días, el tratamiento T4 (Melaza de caña + roca fosfórica) en condiciones de laboratorio, también estuvo por encima de lo exigido hasta los 16 días en cambio en condiciones de invernadero a los 5 días fue decayendo teniendo un índice de nodulación bajo, el tratamiento T5 (Melaza de caña + harina de trigo) en condiciones de laboratorio la población bacteriana estuvo, solamente hasta los 7 días, por encima de lo mínimo exigido y en condiciones de invernadero a partir del 3 días ya presentaba un índice de nodulación bajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los tratamientos T2 (Maicena + roca fosfórica) y T3 (Maicena + harina de trigo) serían los tratamientos, que podrían reemplazar al peleteado tradicional (Goma arábica + carbonato de calcio). Pacotaype (2018) al evaluar estos materiales en semillas de alfalfa, encontró que la maicena + harina de trigo podría reemplazar a la goma arábica y al carbonato de calcio, similar al resultado obtenido, sin embargo, también encontró que la melaza + harina de trigo y melaza + roca fosfórica presentaron buenos resultados, lo que no se observó en la presente investigación, resultados que indican que el tipo de semilla influye en la viabilidad de los rizobios.

Referente a la tendencia observada, Lodeiro (2015) explica que la “baja tasa de supervivencia de los rizobios sobre las semillas, depende, entre otros factores, de la edad del inóculo, de la eventual presencia y tipos de contaminantes y del grado de sequedad de la semilla. Señala que la mayor parte de los rizobios inoculados mueren a las 4 h, luego se produce un decaimiento lento, el que se estabiliza a las 24 h. Enfatiza que la desecación induce en *Bradyrhizobium diazoefficiens* la biosíntesis de trehalosa, de polisacáridos extracelulares, de pili y de enzimas encargadas de la reparación del ADN. (p 265-266)

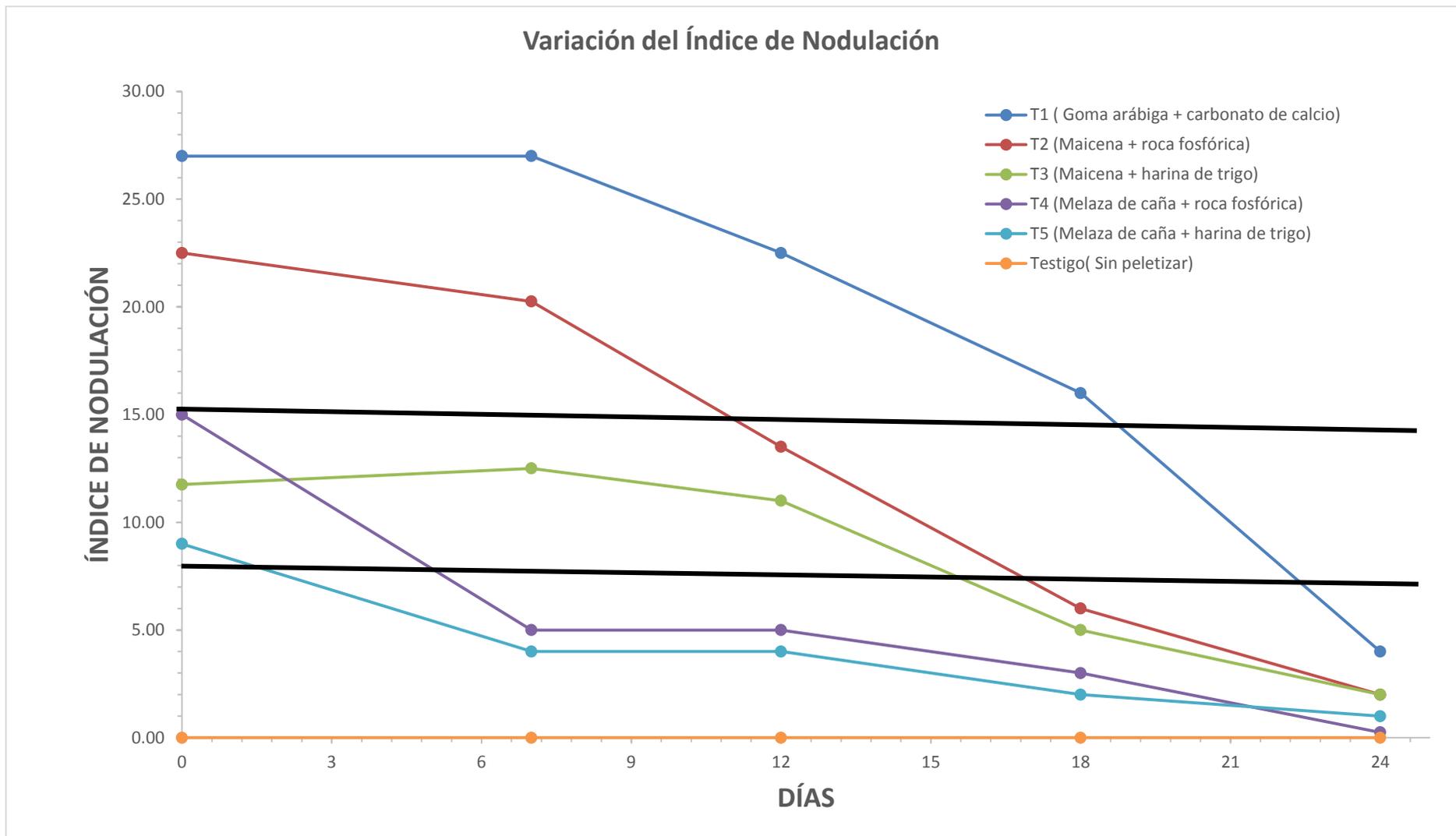


Figura 3.22. Índice de nodulación de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en cinco tratamientos a través del tiempo, en condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, las discusiones realizadas y bajo las condiciones del presente trabajo de investigación, resulta evidente que la viabilidad del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* va reduciéndose con el pasar del tiempo, considerando esta evidencia como premisa importante, se concluye que:

1. Los materiales adherentes (maicena y melaza de caña) y material de recubrimiento (harina de trigo y roca fosfórica), excepto melaza de caña + harina de trigo (T5), no afectan la población de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en condiciones de laboratorio, obteniéndose valores similares al tratamiento control (T1) (goma arábica + carbonato de calcio), superiores a 1000 rizobios/semilla, hasta los 16 días post peleteado.
2. Los materiales adherentes (maicena y melaza de caña) y material de recubrimiento (harina de trigo y roca fosfórica), excepto melaza de caña + roca fosfórica (T4) y melaza + harina de trigo (T5), no afectan el índice de nodulación del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en condiciones de invernadero, obteniéndose valores similares al tratamiento control (T1) (goma arábica + carbonato de calcio), iguales o superiores a 8, hasta los 15 días post peleteado
3. El mejor adherente y material de recubrimiento para reemplazar la goma arábica y carbonato de calcio es la mezcla de maicena + roca fosfórica (T2) y maicena + harina de trigo (T3) ya que son los tratamientos con los que se han obtenido la mayor sobrevivencia del *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, tanto en condiciones de laboratorio como en invernadero.

RECOMENDACIONES

De acuerdo de los resultados y conclusiones obtenidos en el presente trabajo de investigación se plantea las siguientes recomendaciones:

1. Utilizar para la peletización de semilla de trébol rojo la mezcla de maicena + roca fosfórica y maicena + harina de trigo.
2. Seguir realizando trabajos de investigación semejantes donde se puede utilizar semillas de diversas leguminosas, que tenga simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, además utilizar otro tipo de materiales de recubrimiento y adherentes.
3. Evaluar los tratamientos de la presente investigación a nivel de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, J. (2008). Generación de una mutateca en *Rhizobium leguminosarum* para el análisis de proteínas de exportación Tat-dependientes. Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 63 pp.
- Alcaraz M.M., Pastor M.D. y Balatti A.P. (1994). Cinética de Sobrevivencia de *Rhizobium meliloti* B-36 sobre semilla preinoculada con diferentes adhesivos y coberturas. Rev. Facultad de Agronomía, 14(2): 167- 171
- Amaya M. y Portillo C. (2013). Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. Universidad de el Salvador. San Salvador - Centro América.
- Anyaipoma K. (2014). Peletización de semillas de trébol con *Pseudomonas* sp aisladas de la rizósfera de maca, y evaluación de su efecto en la emergencia de semillas. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Aquino Solano, J. N., & Vara Arosemena, O. R. (2016). Influencia de la sustitución parcial de harinas de trigos (*Triticum aestivum* L.) importados por la harina de trigo nacional variedad "Gavilán" en pan francés.
- Bashan Y, de-Bashan L., Prabhu S. R., Hernández J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. Plant Soil, 378:1–33
- Bennett G. y Lloyd (2015). Inoculación de semillas, revestimiento y granulación de precisión: tecnología científica y aplicaciones prácticas. CRC Press Taylor & Francis Group. Original Edition. Pag. 09-14.
- Bojórquez, C; Rojas, J; Ordóñez, H. (2015). Pastos cultivados en el valle del Mantaro. Fondo Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos. CEPREDIM-UNMSM. Lima, Perú. 147 p.
- Canals R.M. (2002). El cultivo de praderas y forrajes: Especies sembradas y sus características. Documento inédito. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. Disponible en:
<http://www.nuevoabcrural.com.ar/2013/vertext.php?id=928>
- Carpio R. Figueroa T. (2017). Efecto de la adición de goma arábiga y maltodextrina en el

- contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Chipana. (2016). Efecto de la concentración de biofertilizante *Rhizobium* sp. En el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* (vainita) en condiciones de campo. Universidad Nacional Jorge Basadre Graman. Tacna – Perú.
- Coyne M. (2000). Microbiología del suelo. Un enfoque exploratorio. Madrid. España. 416 pp.
- Departamento Técnico Barenbrug-Palaversich. (2008). Por qué inocular leguminosas. 1/10/2020, de engormix Sitio web:[https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/inoculacion-de-leguminosas-forrajas-](https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/inoculacion-de-leguminosas-forrajas)
- Departamento Técnico Barenbrug-Palaversich. (2013). Peleteo BARPOWER en leguminosas forrajas. Sitio web:
<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/peleteo-barpower-leguminosas-forrajas-t30563.htm>
- Durand, F. G. (2008). Fenología de Diez Especies de Pastos Naturales de los Pastizales Altoandinos de la Comunidad de Ccarhuaccpampa - Ayacucho. Tesis Ing. Agrónomo. Fenología de Diez Especies de Pastos Naturales de los Pastizales Altoandinos de la Comunidad de Ccarhuaccpampa Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho-Perú. pp 12.
- Durand, M. J. (2014). Comportamiento productivo de alfalfa (*Medicago Sativa*) en cultivo puro y asociado con gramíneas forrajas en el CIP – Camacani. Tesis para obtener el Título profesional de Ingeniero Agrónomo. Puno – Perú 2014
- FAO (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Roma. Italia, 19 p
- Flores E. (2010). Evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento en la capacidad aglutinante de dos tipos de almidones para la formulación de comprimidos orales. Universidad de San Carlos de Guatemala - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., & Zapata, F. (2003). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2), 207-214.
- Guevara L. (2020). Influencia de la inoculación con *Sinorhizobium meliloti* (Rhizobiaceae) y la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de la “alfalfa” “*Medicago sativa* L,

- (Fabaceae) en las parcelas del Seminario Mayor San Carlos San Marcelo, Moche-Trujillo: Perú. Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Trujillo – Perú 2020.
- <http://www.perulactea.com/2019/03/01/conozca-los-pastos-mas-utilizados-en-el-peru-para-la-ganaderia-bovina/?cv=1>
- Jerlin R. Ponnuswamy, K Prabakar, M. Srinivasan. (2008). Peletización de semillas que mejora el vigor de las semillas y la capacidad de almacenamiento de los chiles. Cv. K. Madras Agric. J. 95, 486-490.
- Lodeiro A. (2015). Interrogantes en la Tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. Rev Argent Microbiol; 47(3):261---273.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. (2015). Brok. Biología de los microorganismos. 14ª edición. Pearson Educación S.A. España. 1131 p.
- Martínez, F. (2020). Ficha técnica del trebol rojo (*Trifolium pratense*). Recuperado 15 de octubre de 2020, de Info pastos y forrajes.com website:
https://infopastosyforrajes.com/leguminosas-de-clima-frio/ficha-tecnica-de-trebol-rojo/#Origen_y_Descripcion_de_Trebol_rojo
- Mays, F. J. (2004). Fijación biológica del nitrógeno. Revista UDO Agrícola, 4(1): 1-20.
- Miñon D., Gallego J., y Barabarossa R. (2013). Producción de forrajes de especies y cultivares de leguminosas en valles regados norpatagonicos. EEA Valle Inferior – Convenio Provincia de Rio Negro – INTA. Argentina.
- Newton, W., Fisher, K., & Leigh, G. F. (Ed.). (2002). Fijación de nitrógeno. Resumen general de la fijación de nitrógeno en el milenio. Brighton. Publicaciones Elsevier.
- Pacotaype H. (2018). Dinámica poblacional de *Sinorhizobium meliloti* en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) peletizadas con diferentes materiales, Ayacucho 2018. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf> [Fecha de consulta: 03/12/2020.]
- Peñuelas J. (2002). Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. Experiencias de Aplicación de Semillado Directo en la Restauración Forestal de Andalucía. Sevilla, España. p. 135-144.

- Perticari A. S/F. Pasturas de Alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. INTA Castelar. Argentina.
- Racca R., Collino D., Dardanelli J., Basigalup D., Gonzáles N., Brenzoni E., Hein N. y Balzarini M. (2001). Contribución de la Fijación Biológica de Nitrógeno a la Nutrición Nitrogenada de la Alfalfa en la Región Pampeana. Editorial INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Reeve W., O'Hara G., Chain P., Ardley J., Bräu L., Nandesena K., Tiwari R., Copeland A., Nolan M., Han C., et al. (2010). Secuencia completa del genoma de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* cepa WSM1325, un microsimbionte eficaz de tréboles mediterráneos anuales. *Stand Genomic Sci.* 2 (3): 347–356. doi: 10.4056 / sigs.852027
- Ríos W. y Velásquez M. (2016). Obtención de Carbonato de calcio a partir de valvas de residuales de caracol (*Thais chocolata*). Arequipa – Perú. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa - Perú
- Rodríguez C. (2011). La fijación de nitrógeno atmosférico una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiológicos. Temas de divulgación. España 2011.
- Salas E. (2015). La simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* – alfalfa: Aproximaciones ómicas aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rizobio asociados a la colonización temprana de la raíz de alfalfa (*Medicago sativa*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Saldaña J. y Zapata E. (2018). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de suelo de Marín, Nuevo León. Congreso Internacional de Investigación e Innovación 2018. Guanajato – México.
- Santillana, N. (1998). Evaluación de estirpes de rizobio para la producción de inoculantes para trebol rojo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, V.22, N.2, 1998 p.231-238
- SNAVM. (2010). Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. *Trifolium pratense*. Recuperado de:
<https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/trifolium-pratense>
- Solid OPD. (2010). Tecnología productiva de lácteos. Producción de pastos y forrajes. Ayacucho, Perú.
- Sueiro G., Rodríguez P., y Cruz M., (2011). El uso de biofertilizantes en el cultivo de frijol:

- una alternativa para la agricultura sostenible en Sagua Grande. En Observatorio de la Economía Latinoamericana N° 159. Disponible en <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/cu/2011/>
- Terpolilli J., Rui T., Yates R., Howieson J., Poole Ph., Munk Ch., Tapia R., Han Cl., Markowitz V., Tatiparthi R. et al. (2014). Secuencia del genoma de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* cepa WSM1689, el microsimbionte del trébol de flores *Trifolium uniflorum*. *Standards in Genomic Sciences*, 9:527-539
- Valles B., Cadish G., y Aluja A. (2003). Comparación de metodologías de isótopos para evaluar fijación de N atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia*. Vol 37. Texcoco – México.
- Vergani-Boza I. y Zúñiga-Dávila D. (2018). Efecto de la inoculación y peletización en la germinación y crecimiento de plantas de maca (*Lepidium meyenii* W.) a nivel in vitro e invernadero. *Revista peruana de biología* 25(3): 329 – 334. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i3.14035>
- Zapata F. y Roy R. (2007). Utilización de las Rocas Fosfóricas para una Agricultura Sostenible. Boletín FAO No. 13. OIEA-FAO. Roma, Italia. 94 p
- Zapata H.I. (2015). Acumulación de materia seca y fijación biológica de nitrógeno en diferentes especies del género *Lupinus* cultivadas en suelos de Zapopan, Jalisco. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara. México

ANEXOS

Anexo 1. Evaluaciones de resultados a los 0 días

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-

Anexo 2. Evaluaciones de resultados a los 7 días

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	-	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	+	-	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	-	+	-

Anexo 3. Evaluaciones de resultados a los 12 días

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-

Anexo 4. Evaluaciones de resultados a los 18 días

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	-	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	-	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	-	-
	III	+	+	+	+	-	+	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	-	-	-	-	-
	II	+	+	-	+	-	-	-	-
	III	+	+	-	-	-	-	-	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	-	-	-	-	-	-
	II	+	+	-	-	-	-	-	-
	III	+	+	-	-	-	-	-	-
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	-	-
	III	+	+	+	+	+	-	-	-

Anexo 5. Evaluaciones de resultados a los 24 días

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	-	-	-	-	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	-	+	-	-	-	-
	II	+	+	-	+	-	-	-	-
	III	+	+	+	-	-	-	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	-	-	-	-	-
	II	+	+	-	-	+	-	-	-
	III	+	+	-	+	-	-	-	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	-	-	-	-	-	-	-
	II	+	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	+	-	-	-	-	-	-
T5 Melaza de caña + harina	I	+	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 6. Datos ordenados de la población de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*

Tratamiento	Repetición	Muestras (N° de rizobios/semilla)				
		0 días	7 días	12 días	18 días	24 días
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	35000	34500	3450	900	85
	II	35000	35000	3450	900	85
	II	35000	35000	3450	900	85
	Promedio	35000	34833	3450	900	85
T2 Maicena + roca fosfórica	I	35000	34500	3500	295	29
	II	35000	34500	3500	295	29
	III	34500	34500	3450	295	29
	Promedio	34833	34500	3483	295	29
T3 Maicena + harina de trigo	I	34500	34500	3450	29	29
	II	34500	34500	3500	29	29
	III	34500	34500	3450	8.5	29
	Promedio	34500	34500	3467	22	29
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	34500	9000	3450	8.5	2.9
	II	34500	9000	3450	8.5	2.9
	III	34500	9000	3450	8.5	2.9
	Promedio	34500	9000	3450	9	3
T5 Melaza de caña + harina	I	9000	9000	900	85	2.9
	II	9000	9000	900	85	0
	III	9000	9000	900	85	0
	Promedio	9000	9000	900	85	1

*Cantidad por 50 g de semilla

Anexo 7. Índice de nodulación a los 0 días

Tratamiento	Repetición	N° plantas/ maceta	N° Nódulos/ planta	Características del nódulo			Índice de nodulación(AxBxC)	Calificación
				Grosor (A)	Color (B)	Cantidad (C)		
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	8	20	3	3	3	27	ALTO
	II	10	24	3	3	3	27	ALTO
	III	10	26	3	3	3	27	ALTO
	IV	8	16	3	3	3	27	ALTO
T2 Maicena + roca fosfórica	I	10	10	3	2	3	18	ALTO
	II	4	8	3	2	3	18	ALTO
	III	9	9	3	3	3	27	ALTO
	IV	6	11	3	2	3	18	ALTO
T3 Maicena + harina de trigo	I	8	6	3	2	2	12	MEDIO
	II	6	5	3	3	2	18	ALTO
	III	9	6	2	2	2	8	MEDIO
	IV	7	7	3	1	3	9	MEDIO
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	7	12	3	2	3	18	ALTO
	II	9	10	2	2	3	12	MEDIO
	III	6	10	2	2	3	12	MEDIO
	IV	7	11	3	2	3	18	ALTO
T5 Melaza de caña + harina	I	3	5	2	2	2	8	MEDIO
	II	10	6	2	1	2	4	BAJO
	III	9	6	3	2	2	12	MEDIO
	IV	7	5	3	2	2	12	MEDIO
Testigo Semilla sin peletizar	I	4	0	0	0	0	0	-
	II	4	0	0	0	0	0	-
	III	2	0	0	0	0	0	-
	IV	3	0	0	0	0	0	-

Anexo 8. Índice de nodulación a los 7 días

Tratamiento	Repetición	N° plantas/ maceta	N° Nódulos/ planta	Características del nódulo			Índice de nodulación(AxBxC)	Calificación
				Grosor (A)	Color (B)	Cantidad (C)		
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	8	22	3	3	3	27	ALTO
	II	10	25	3	3	3	27	ALTO
	III	10	20	3	3	3	27	ALTO
	IV	8	21	3	3	3	27	ALTO
T2 Maicena + roca fosfórica	I	10	11	3	2	3	18	ALTO
	II	4	12	2	3	3	18	ALTO
	III	9	13	3	2	3	18	ALTO
	IV	6	13	3	3	3	27	ALTO
T3 Maicena + harina de trigo	I	8	7	2	3	3	18	ALTO
	II	6	6	2	2	2	8	MEDIO
	III	9	12	2	2	3	12	MEDIO
	IV	7	8	2	2	3	12	MEDIO
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	7	4	2	2	2	8	MEDIO
	II	9	3	1	1	2	2	BAJO
	III	6	4	2	2	2	8	MEDIO
	IV	7	3	1	1	2	2	BAJO
T5 Melaza de caña + harina	I	3	3	2	2	2	8	MEDIO
	II	10	2	1	1	2	2	BAJO
	III	9	3	1	2	2	4	BAJO
	IV	7	2	1	1	2	2	BAJO
Testigo Semilla sin peletizar	I	4	0	0	0	0	0	-
	II	4	0	0	0	0	0	-
	III	2	0	0	0	0	0	-
	IV	3	0	0	0	0	0	-

Anexo 9. Índice de nodulación a los 12 días

Tratamiento	Repetición	N° plantas/ maceta	N° Nódulos/ planta	Características del nódulo			Índice de nodulación (AxBxC)	Calificación
				Grosor (A)	Color (B)	Cantidad (C)		
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	8	17	3	3	3	27	ALTO
	II	10	16	3	2	3	18	ALTO
	III	10	15	3	2	3	18	ALTO
	IV	8	16	3	3	3	27	ALTO
T2 Maicena + roca fosfórica	I	10	6	3	2	2	12	MEDIO
	II	4	4	2	3	2	12	MEDIO
	III	9	5	3	3	2	18	ALTO
	IV	6	5	3	2	2	12	MEDIO
T3 Maicena + harina de trigo	I	8	3	2	2	2	8	MEDIO
	II	6	4	3	2	2	12	MEDIO
	III	9	4	3	2	2	12	MEDIO
	IV	7	3	3	2	2	12	BAJO
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	7	2	2	1	2	4	BAJO
	II	9	2	2	2	2	8	MEDIO
	III	6	2	1	2	2	4	BAJO
	IV	7	2	2	1	2	4	BAJO
T5 Melaza de caña + harina	I	3	3	2	2	2	8	MEDIO
	II	10	2	2	1	2	4	BAJO
	III	9	1	1	1	2	2	BAJO
	IV	7	2	1	1	2	2	BAJO
Testigo Semilla sin peletizar	I	4	0	0	0	0	0	-
	II	4	0	0	0	0	0	-
	III	2	0	0	0	0	0	-
	IV	3	0	0	0	0	0	-

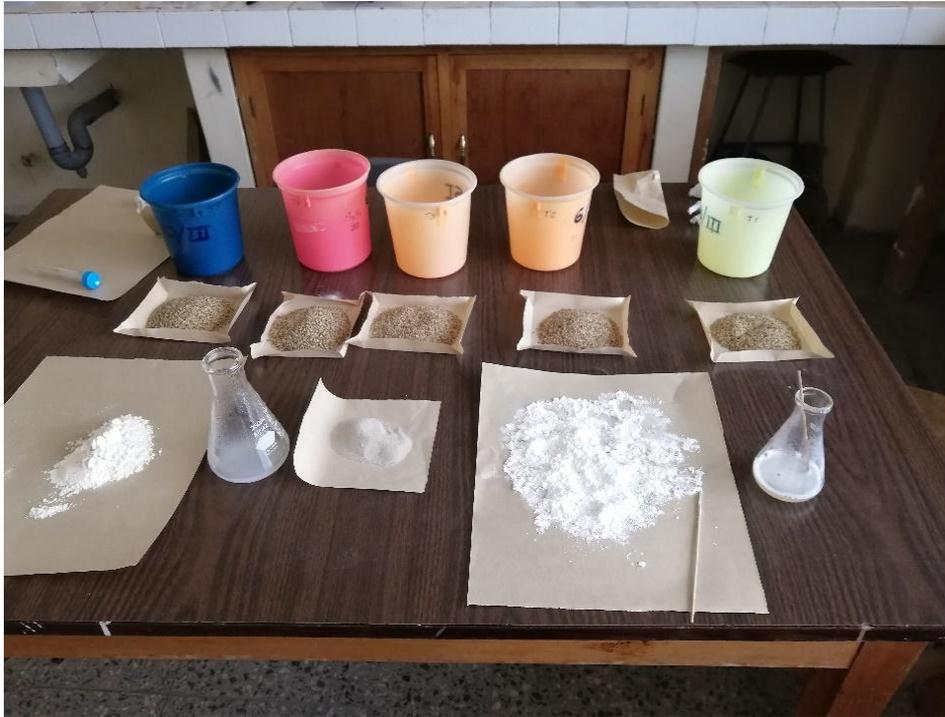
Anexo 10. Índice de nodulación a los 18 días

Tratamiento	Repetición	N° plantas/ maceta	N° Nódulos/ planta	Características del nódulo			Índice de nodulación (AxBxC)	Calificación
				Grosor (A)	Color (B)	Cantidad (C)		
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	8	15	3	2	3	18	ALTO
	II	10	12	3	2	3	18	ALTO
	III	10	13	3	2	3	18	ALTO
	IV	8	33	3	2	2	12	MEDIO
T2 Maicena + roca fosfórica	I	10	4	2	2	2	8	MEDIO
	II	4	5	3	1	2	6	BAJO
	III	9	4	2	1	2	4	MEDIO
	IV	6	5	3	1	2	6	BAJO
T3 Maicena + harina de trigo	I	8	3	2	2	2	8	MEDIO
	II	6	3	2	1	2	4	BAJO
	III	9	2	1	2	2	4	BAJO
	IV	7	3	2	1	2	4	BAJO
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	7	3	2	1	2	4	BAJO
	II	9	4	1	1	2	2	BAJO
	III	6	3	2	1	2	4	BAJO
	IV	7	3	1	1	2	2	BAJO
T5 Melaza de caña + harina	I	3	1	1	1	2	2	BAJO
	II	10	1	1	1	2	2	BAJO
	III	9	2	1	1	2	2	BAJO
	IV	7	1	1	1	2	2	BAJO
Testigo Semilla sin peletizar	I	4	0	0	0	0	0	-
	II	4	0	0	0	0	0	-
	III	2	0	0	0	0	0	-
	IV	3	0	0	0	0	0	-

Anexo 11. Índice de nodulación a los 24 días

Tratamiento	Repetición	N° plantas/ maceta	N° Nódulos/ planta	Características del nódulo			Índice de nodulación (AxBxC)	Calificación
				Grosor (A)	Color (B)	Cantidad (C)		
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	8	18	2	2	1	4	MEDIO
	II	10	16	2	1	2	4	MEDIO
	III	10	17	2	2	1	4	MEDIO
	IV	8	18	2	1	2	4	MEDIO
T2 Maicena + roca fosfórica	I	10	4	2	1	1	2	BAJO
	II	4	3	1	1	2	2	BAJO
	III	9	4	1	1	2	2	BAJO
	IV	6	3	1	1	2	2	BAJO
T3 Maicena + harina de trigo	I	8	3	1	1	2	2	BAJO
	II	6	3	1	1	2	2	BAJO
	III	9	3	1	1	2	2	BAJO
	IV	7	3	1	1	2	2	BAJO
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	7	0	0	0	0	0	BAJO
	II	9	0	0	0	0	0	BAJO
	III	6	1	1	1	1	1	BAJO
	IV	7	0	0	0	0	0	BAJO
T5 Melaza de caña + harina	I	3	2	1	1	2	2	BAJO
	II	10	1	1	1	2	2	BAJO
	III	9	0	0	0	0	0	BAJO
	IV	7	0	0	0	0	0	BAJO
Testigo Semilla sin peletizar	I	4	0	0	0	0	0	-
	II	4	0	0	0	0	0	-
	III	2	0	0	0	0	0	-
	IV	3	0	0	0	0	0	-

Anexo 12. Panel fotográfico



Fotografía 1. Preparación de los materiales para realizar la peletización.



Fotografía 2. Mezclado de las semillas con el inoculante (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*) + el adherente + el material de recubrimiento.



Tratamiento 01



Tratamiento 02



Tratamiento 03



Tratamiento 04



Tratamiento 05

Fotografía 3. Tratamientos peletizados



Fotografía 4. Almacenamiento de las semillas peletizadas en bolsas plásticas y en envase de tecnopor para evitar que se sequen.



Fotografía 5. Preparación del medio Jensen, que se utilizaría para la siembra del trébol rojo en los tubos de ensayo.



Fotografía 6. Distribución del medio Jensen en tubos de 25x150mm a razón de 20 ml por tubo.



Fotografía 7. Colocación de los tubos con medio Jensen en latas de metal para su esterilización en la autoclave.



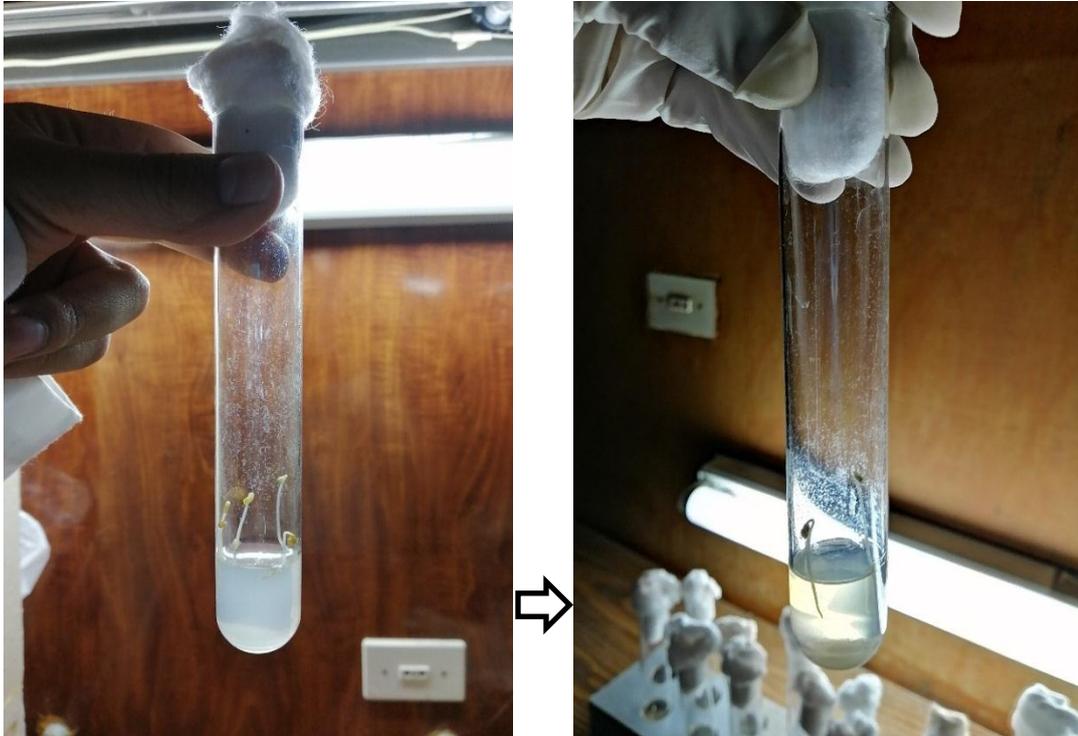
Fotografía 8. Izquierda: Preparación de la solución salina. Derecha: Esterilización de la solución salinas y otros materiales que se usará.



Fotografía 9. Desinfección de las semillas de trébol rojo.



Fotografía 10. Sembrado de semillas en los tubos con medio Jensen.



Fotografía 11. Extracción de plántulas no germinadas y poco vigorosas después de la germinación para que queden 2 plantas por tubo.



Fotografía 12. Toma de muestra (100 semillas peletizadas) de cada tratamiento para la inoculación



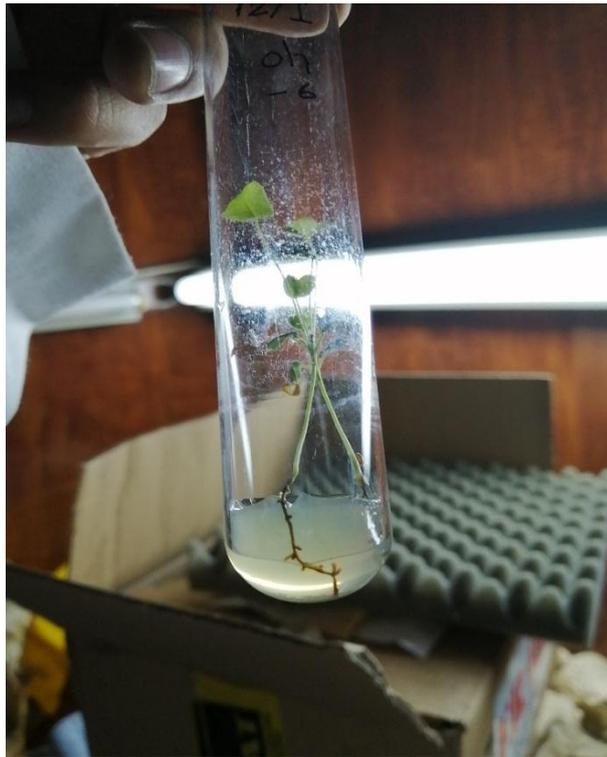
Fotografía 13. Toma de 100 μl de dilución 10^{-3} a los tubos EPENDORF (900 μl) dilución 10^{-4} , agitación e inoculación de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifoli* en plantas de trébol rojo.



Fotografía 14. Acondicionamiento del solarío y colocación de los tratamientos inoculados.



Fotografía 15. Vista de todos los tratamientos inoculados.



Fotografía 16. Plantas de trébol rojo con nódulos



Fotografía 16. Plantas de trébol rojo sin nódulos.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
 PROGRAMA DE INVESTIGACION EN PASTOS Y GANADERIA
LABORATORIO DE SUELOS Y ANALISIS FOLIAR
 Jr. Abraham Valdelomar N° 249 - Telf. 315936 966942996
 Ayacucho - Perú
 "Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"

Región : Ayacucho HR. 0143
 Provincia : Huamanga - Cangallo
 Distrito : Chiara - Pampa Cangallo
 Localidad : 01: Minascucho 02: Cusibamba
 Proyecto : "Tesis"
 Solicitante : Sr. Carlos Núñez Ccallocunto

ANALISIS DE CARACTERIZACION

Muestra	Análisis mecánico (%)			Clase Textural	pH (H ₂ O)	C. E. (dS/m)	CaCO ₃ (%)	M.O. (%)	Nt (%)	Elementos Disp. (ppm)		Cationes cambiabiles (Ca ⁺⁺ +Mg ⁺⁺)						C. I. C. (Ca ⁺⁺ +Mg ⁺⁺)
	Arena	Limo	Arcilla							P	K	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H ⁺	
01	44.5	27.3	28.2	Fr-Ar	4.83	0.193	0.0	4.18	0.21	33.6	88.7	1.36	0.72	0.45	0.36	3.7	0.2	14.9
02	42.5	31.3	26.2	Fr	5.07	0.133	0.0	4.02	0.20	41.5	92.6	0.80	1.12	0.47	0.44	3.2	0.4	14.6

Ayacucho, 28 de Mayo del 2019.

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS
 PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES
 RESPONSABLE

 Juan BY Giron Molina
 C.I.F. 77120

Ao: Arenoso, AoFr: Arena franca, FrAo: Franco arenosos, Fr: Franco, FrL: Franco limoso, L: Limoso, FrArAo: Franco arcillo arenoso, FrAr: Franco arcilloso, FrAr: Franco arcillosos, FrArL: Franco arcillo limoso, ArAo: Arcillo arenoso, ArL: Arcillo limoso, Ar: Arcilloso

Fotografía 17. Análisis del suelo para la siembra en el invernadero.



Fotografía 18. Pesado de suelo 200 grs. por macetero.



Fotografía 19. Siembra de semillas peletizadas, 10 semillas por tratamiento.



Fotografía 20. Tratamiento 05 después de los 24 días del peletizadas.



Fotografía 21. Distribución de todos los tratamientos sembrados.



Fotografía 22. Plantas de trébol rojo sembrados en macetero con nódulos



Fotografía 23. Plantas de trébol rojo sembrados en macetero sin nódulos.



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El presidente de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

“Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de *Trifolium pratense* peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero, Ayacucho 2019”

Autor : Enrique Hinostroza Ccenta
Asesor : Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva

Ha sido sometido al análisis del sistema antiplagio TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de 10% de similitud.

Por lo que, de acuerdo al porcentaje establecido en el Artículo 13 del Reglamento de originalidad de trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, es procedente otorgar la Constancia de Originalidad.

Ayacucho, 20 de mayo de 2021

Ing. WALTER AUGUSTO MATEU MATEO
Presidente de comisión

Viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en semillas de *Trifolium pratense* peletizadas con diferentes materiales en condiciones de laboratorio e invernadero, Ayacucho 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	5%
2	1library.co Fuente de Internet	1%
3	docplayer.es Fuente de Internet	1%
4	vandyckgdl.com Fuente de Internet	<1%
5	scielo.sld.cu Fuente de Internet	<1%
6	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	<1%

10 Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga <1 %
Trabajo del estudiante

11 repositorio.uta.edu.ec <1 %
Fuente de Internet

12 Submitted to Universidad Cooperativa de Colombia <1 %
Trabajo del estudiante

13 es.scribd.com <1 %
Fuente de Internet

14 repositorio.unap.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

15 www.repositorio.usac.edu.gt <1 %
Fuente de Internet

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 30 words