



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA,
MENCIÓN PRODUCCIÓN
VEGETAL**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Aislamiento, caracterización y efecto de dos cepas de *Rhizobium* sobre el crecimiento en *Lupinus mutabilis*, bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes

Autora: Pérez Salinas, Ruth Narcisa
Director: Loján Armijos, Paúl Diego

LOJA - ECUADOR
2021



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2021

Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 26, de octubre, de 2021

Ph.D.

Lucía Guzmán Ordoñez

Coordinadora de programa de posgrado

Ciudad.-

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: "Aislamiento, caracterización y efecto de dos cepas de Rhizobium sobre el crecimiento en Lupinus mutabilis, bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes", realizado por Ruth Narcisa Pérez Salinas, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho trabajo de titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Paul Diego Loján Armijos, Ph.D.

C.I: 1103885396

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Ruth Narcisa Pérez Salinas, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autora del Trabajo de Titulación denominado: Aislamiento, caracterización y efecto de dos cepas de *Rhizobium* sobre el crecimiento en *Lupinus mutabilis*, bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes, del Programa de posgrados Biotecnología Agropecuaria, mención Producción Vegetal, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo 1. Introducción, Capítulo 2. Distribución, clasificación, morfología e importancia del *Lupinus mutabilis*, Capítulo 3. Metodología de la investigación Capítulo 4. Resultados y discusión.,Capítulo 5.Conclusiones y Recomendaciones, siendo , Dr. Paul Diego Loján Armijos director del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Autor: Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I.: 1802726628

Dedicatoria

A Dios por la vida

A la memoria de mi padre Jaime

Al motor que impulsa mi vida, mi hija Sarahi

A mi madre, hermanos y sobrinas por todo el apoyo brindado

Ruth Narcisa Pérez Salinas

Agradecimiento

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por la oportunidad de fortalecer mis conocimientos, a toda la planta docente que fueron parte de este gran proyecto de maestría, por los conocimientos compartidos, de manera especial al Dr. Paul Diego Loján Armijos Director de Trabajo de Titulación por su valioso aporte y apoyo en el proceso de investigación.

Ruth Narcisa Pérez Salinas

Indice de Contenido

Carátula	I
Aprobación del director del trabajo de titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno	6
Marco Teórico.....	6
1.1 Distribución y centros de diversidad del género <i>Lupinus</i>	6
1.2 Clasificación taxonómica	9
1.3 Morfología del lupino andino.....	10
1.3.1 Raíz.....	10
1.3.2 Tallo.....	11
1.3.3 Hojas	11
1.3.4 La flor	11
1.3.5 El fruto	12
1.4 Importancia de lupino andino como cultivo	13
1.5 Procesos de fijación de nitrógeno.....	15
1.6 La simbiosis <i>Rhizobium</i> - <i>Lupinus</i>	16
1.7 Caracterización molecular de <i>Rhizobium lupini</i>	19
1.7.1 Amplificación de elementos Box	20
1.7.2 Secuenciamiento del gen ribosómico 16S	21
Capítulo dos.....	22
Diseño metodológico	22
2.1 Localización del estudio.....	22
2.2 Selección de nódulos radiculares y aislamiento de <i>Rhizobium</i>	23
2.2.1 Prospección de la búsqueda de nódulos.....	23
2.2.2 Procesamiento de los nódulos en laboratorio.	24
2.2.3 Aislamiento primario de <i>Rhizobium</i> spp.	24
2.2.4 Aislamiento secundario para la obtención de cepas puras.....	25
2.2.5 Identificación de las cepas de <i>Rhizobium</i> sp.....	25
2.2.6 Tolerancia de las cepas a factores abióticos.....	26
2.2.7 Pruebas de resistencia de las cepas a antibióticos.	26
2.2.8 Conservación de las cepas de <i>Rhizobium</i> sp.....	26
2.3 Identificación molecular de los aislados	26
2.3.1 Extracción de ADN	26

2.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa	27
2.4	Identificación de aislado de rhizobium sp. por secuenciación del gen 16s RRNA	27
2.4.1	Multiplicación de cepas de Rhizobium sp.....	28
2.4.2	Técnicas de inoculación.....	28
2.5	Evaluación en campo de la inoculación con cepas de Rhizobium sp.....	28
2.5.1	Factores en estudio	29
2.5.2	Diseño experimental y análisis estadístico.....	30
2.5.3	Variables evaluadas	30
	Capítulo tres	33
	Resultados y discusión	33
3.1	Aislamiento e identificación molecular de cepas de Rhizobium de nódulos de raíz de Lupinus Mutabilis	33
3.1.1	Aislamiento primario de Rhizobium.....	33
3.1.2	Aislamiento secundario o auxiliar.....	33
3.1.3	Identificación molecular de Rhizobium.....	34
3.2	Variables de desarrollo vegetativo	36
3.2.1	Días a la emergencia	36
3.2.2	Desarrollo vegetativo	38
3.2.3	Número de módulos por planta.....	47
	Conclusiones	50
	Recomendaciones	51
	Referencias.....	52
	Apéndice.....	58

Índice de Tablas

Tabla 1	Factores experimentales del estudio	29
Tabla 2	Estructura de los Tratamientos Evaluados en el Estudio	29
Tabla 3	Descripción morfológica de las colonias y bacterias aisladas.....	34
Tabla 4	Identificación molecular de bacteroides.....	35
Tabla 5	Análisis de Varianza para Días a la Emergencia	36
Tabla 6	Análisis de Varianza para Desarrollo vegetativo a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (dds).....	38
Tabla 7	Análisis de Varianza para número de nódulos por planta (NNP) a los 45 días después de la siembra (dds).....	47

Indice de Figuras

Figura 1 Regiones aproximadas de distribución de las especies de lupinus del nuevo mundo, incluyendo a <i>L. mutabilis</i>	7
Figura 2 Morfología de la raíz de <i>L. mutabilis</i>	10
Figura 3 Detalle del tallo, hojas y flores de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	12
Figura 4 Formas del grano de tarwi, <i>Lupinus mutabilis</i>	13
Figura 5 Localización geográfica del sitio del estudio.....	22
Figura 6 Planta tipo para la recolección de nódulos radiculares.....	23
Figura 7 Medición de la altura de tallo.....	31
Figura 8 Toma de diámetro de tallo con calibrador Vernier	32
Figura 9 Bacteroides de <i>Rhizobium</i> viables, vistas al microscopio óptico (1000x)	33
Figura 10 Electroforesis horizontal de los productos de PCR convencional	35
Figura 11 Prueba de al 5% para tratamientos en la variable días a la emergencia	37
Figura 12 Desarrollo vegetativo de lupino después de la siembra.....	39
Figura 13 Prueba de Túkey al 5% para sustrato en la variable número de nódulos por planta	48

Resumen

Se realizó el aislamiento y caracterización de dos cepas de *Rhizobium* colectadas de plantaciones de lupino (*Lupinus mutabilis*) de localidades de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, Ecuador. Las cepas obtenidas se prepararon en una suspensión y se encapsularon en alginato de sodio para luego ser inoculadas en semillas de lupino. Se evaluó el efecto de las cepas, método de inoculación y sustratos sobre el desarrollo vegetativo de las plantas, bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes en la provincia de Tungurahua. Para la identificación molecular, se realizó la extracción de ADN, amplificación de la región 16S con primers específicos, purificación y secuenciación. El desarrollo vegetativo estuvo influenciado principalmente por el sustrato utilizado para la germinación de semillas inoculadas. Las características hidrológicas del sustrato suelo negro andino permitieron la migración de los bacteroides hacia las raíces aprovechando el agua capilar retenida en el sustrato. El sustrato suelo franco arcilloso determinó el menor desarrollo vegetativo de la planta, ya que fue más susceptible a la deshidratación en las condiciones bajo cubierta en las que se llevó a cabo la investigación. El origen de la cepa también influyó en el desarrollo vegetativo, aunque no fue evidente en la nodulación. La cepa originada en Tungurahua produjo plantas más vigorosas, especialmente en interacción con el sustrato suelo negro andino. La nodulación fue influenciada significativamente por los sustratos arena (S1) y suelo negro andino (S2), resultando en un número de nódulos.

Palabras clave: Aislamiento, inoculación, suelos.

Abstract

The isolation and characterization of two strains of *Rhizobium* collected from lupine plantations (*Lupinus mutabilis*) located in the provinces of Tungurahua and Cotopaxi, Ecuador, was carried out. The strains obtained were prepared in a suspension and encapsulated in sodium alginate and then inoculated in lupine seeds. It was evaluated the effect of the strains, inoculation method and substrates on the vegetative development of the plants, under semicontrolled conditions in rugged soils in the province of Tungurahua. For molecular identification, DNA extraction, amplification of the 16S region with specific primers, purification and sequencing were performed. Vegetative development was mainly influenced by the substrate used for germination of inoculated seeds. The hydrological characteristics of the Andean black soil substrate allowed the migration of the bacteroides towards the roots taking advantage of the capillary water retained in the substrate. The loamy loam soil substrate determined the lower vegetative development of the plant, as it was more susceptible to dehydration in the conditions under cover in which the research was carried out. The origin of the strain also influenced vegetative development, although it was not evident in nodulation. The strain originated in Tungurahua produced more vigorous plants, especially in interaction with the Andean black soil substrate. Nodulation was significantly influenced by the substrates sand (S1) and Andean black soil (S2), resulting in a higher number of nodules.

Keywords: isolation, inoculation, soils.

Introducción

Los lupinos (*Lupinus mutabilis*), comúnmente llamados altramuces en Europa, lupino andino o chocho en América del Sur, son un género de leguminosas que pertenece a la tribu Genisteae de la subfamilia Faboideae y abarca más de 280 especies de hierbas anuales y arbustos herbáceos y leñosos perennes distribuidos principalmente en el sur y oeste de América del Norte, los Andes, las regiones mediterráneas y África (Durán Wendt et al., 2013). Los lupinos se adaptan a suelos ácidos y pobres, además son altamente resistentes a las bajas temperaturas con algunas especies capaces de resistir hasta -9 ° C. También son tolerantes a la salinidad en diferentes grados dependiendo de la especie (Atchison et al., 2016). La presencia de alcaloides en sus semillas permite que se utilice como un control de plagas. Los lupinos también se pueden utilizar para remediar suelos contaminados por métodos de fitorremediación y fitoextracción (Nigussie, 2012).

El impacto positivo de los lupinos en la fertilidad del suelo hace que sea más importante como planta de cultivo. Dado que el lupino andino tiene la capacidad de crecer en tierras pobres, su cultivo es de gran importancia para la producción en suelos marginales de la serranía ecuatoriana, aportando con una fuente de proteína de bajo costo a la seguridad alimentaria de los campesinos (Atchison et al., 2016).

Los miembros del género *Lupinus* tienen la capacidad de establecer una asociación simbiótica con los rizobios y fijar eficazmente el nitrógeno atmosférico en los nódulos radiculares. Estas bacterias del suelo pertenecen a los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Los lupinos son principalmente nodulados por bacterias del suelo clasificadas en el género *Bradyrhizobium*, aunque también se han identificado algunas otras cepas de rápido crecimiento (Beligala, 2015).

Rhizobium lupini se incluyó en las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos de Skerman. Se considera un rizobio de crecimiento lento, pueden nodular miembros del género *Lupinus*. Cuando los rizobios de crecimiento lento fueron reclasificados en un género diferente, *Bradyrhizobium*, la especie *R. lupini* no se incluyó en este género ya que la principal diferencia con respecto a la nueva y única especie reconocida en ese momento,

Bradyrhizobium japonicum, era un alto grado de afinidad de nodulación por miembros de los géneros *Lupinus* y *Ornithopus*. Sin embargo, como esta especie no fue rechazada específicamente en la publicación original o en trabajos posteriores, se ha mantenido con el nombre original de *Rhizobium lupini* en la lista de nombres procarióticos válidamente publicados. Ahora se considera a *Rhizobium lupini* como un basónimo de la reclasificación propuesta como *Bradyrhizobium lupini* comb. Nov (Peix et al., 2015). Para efectos de concordancia con los estudios revisados y las técnicas de identificación, en la presente investigación se referirá al bacteroide en estudio como *Rhizobium lupini*.

Las bacterias simbióticas dentro de los nódulos radiculares reducen el dinitrógeno presente en la atmósfera a amonio, que se aporta a la planta a cambio de un compuesto de carbono y una fuente de energía. El proceso de nodulación en los lupinos difiere de muchas otras legumbres en que las bacterias acceden a la raíz del huésped a través de los espacios intercelulares en la raíz e ingresan en las células de la corteza radicular sin formar un hilo de infección (Ferchichi et al., 2020).

A pesar de las marcadas ventajas de la asociación de lupinos y rizobios, la población de rizobios nativa es generalmente insuficiente para alcanzar una relación benéfica con la leguminosa (Cabrera Romero et al., 2017). Es importante la utilización de un *Rhizobium* infectivo (capacidad de nodular) y efectivo (eficiente para la fijación de N₂), en la leguminosa, lo que implica determinar la necesidad de inoculación y utilización de cepas de diferente origen (Fernández-Pascual et al., 2007). La inoculación de raíces de lupino con diferentes cepas de *Rhizobium* mejora los niveles y disponibilidad de nitrógeno y carbono de los suelos y por ende el desarrollo vegetativo de la planta (Taco & Zuñiga, 2017). Las herramientas biotecnológicas prestan alternativas en el manejo sostenible de los cultivos de lupino (Felipe, 2009). El crecimiento en masa y peso en *Lupinus mutabilis* se incrementa hasta en un 50 % en condiciones semicontroladas con la inoculación de *Rhizobium spp.* aislado y caracterizado (Taco & Zuñiga, 2017).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de dos cepas *Rhizobium spp.* aislado y caracterizado, sobre el desarrollo vegetativo de lupino andino

Lupinus mutabilis en condiciones semicontroladas. Para ello, se aislaron cepas de *Rhizobium* de nódulos de raíz de *Lupinus mutabilis* cultivados en suelos agrestes de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi. Se evaluó la capacidad de nodulación de las cepas de *Rhizobium* spp. aisladas y caracterizadas y se determinó el efecto de la inoculación sobre el crecimiento en *Lupinus mutabilis* bajo condiciones semicontroladas.

La hipótesis planteada trata de demostrar si la inoculación de cepas de *Rhizobium sp.* aislado y caracterizado influye significativamente en el crecimiento de lupino andino *Lupinus mutabilis*, bajo condiciones semicontroladas.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 Distribución y centros de diversidad del género *Lupinus*

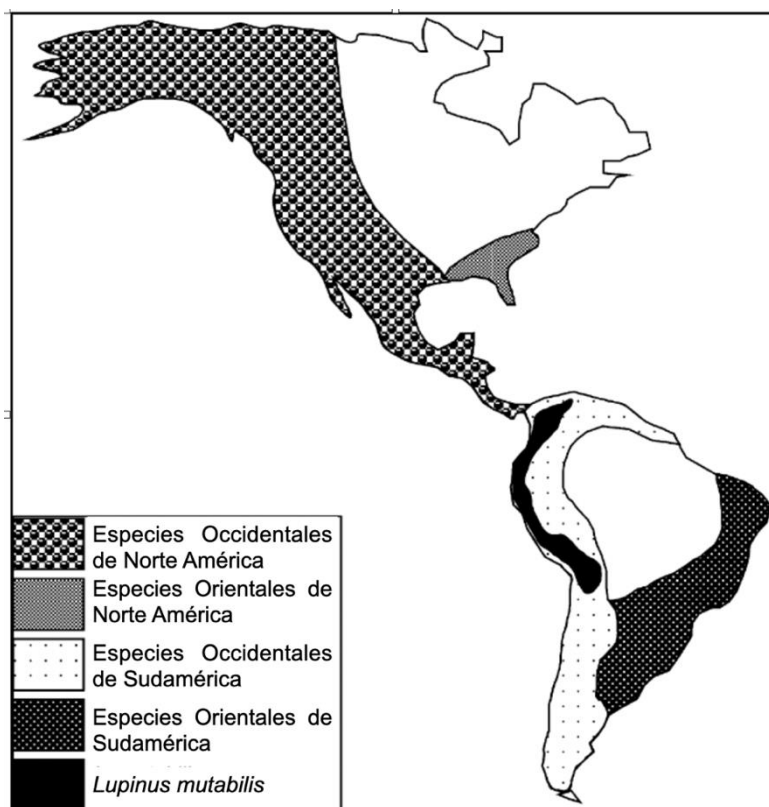
Lupinus es un género relativamente grande, siendo uno de los más extendidos geográficamente con una rica diversidad de especies dividida en dos grupos principales: las especies mediterráneas del norte y este de África o del "Viejo Mundo", y el grupo del "Nuevo Mundo", el cual incluyen a América del Norte y América del Sur, conformado por el mayor número de especies. Los lupinos silvestres y variedades nativas se distribuyen entre los rangos climáticos de las regiones subárticas (Alaska), el Mediterráneo, además de climas semidesérticos; las regiones montañosas de África oriental, México, las Andes y las Altas Rocosas; los climas templados cálidos del sureste de EE.UU. hasta las regiones subtropicales del este de América del Sur (Atchison et al., 2016). Incluyen tipos de plantas de hojas simples y compuestas, herbáceas anuales y herbáceas a arbustivas perennes. El grupo del Viejo Mundo sólo tiene especies anuales. En general, los lupinos son plantas de hábitats abiertos y bien iluminados, que no toleran el sombreado (Carvajal-Larenas, 2013), y prefieren suelos bien drenados con pH de ácido a neutro con distribución limitada en el rango alcalino (las especies de semillas en bruto que muestran cierta tolerancia al pH neutro anterior). Una excepción reciente con respecto a la preferencia de pH de suelo es la recién descrita 13^{ra} especie del Viejo Mundo, *Lupinus mariae-josephae*, que prefiere suelos calcáreos (Laguna et al., 2009). En base a estudios que han evaluado las similitudes genéticas, los centros de diversidad de *Lupinus* son: (1) América del Norte y Central y América del Sur andina, (2) América del Sur atlántica, y (3) la región mediterránea y norte y este de África (Eastwood & Hughes, 2008).

En términos de distribución geográfica del género *Lupinus*, la región sudamericana se divide en la subregión atlántica (ATL) y subregión andina (AND). El grupo ATL consiste de un gran número de especies perennes, de hojas simples o compuestas, y un pequeño grupo de especies anuales variables. En estos grupos se incluye al complejo *L. gibertianus* C.P. Sm, y

L. linearis Desr. El grupo se distribuye por el este de Brasil, Uruguay, Paraguay, hasta el centro y este de Argentina. El grupo AND cubre la región geográfica desde las laderas de las montañas a ambos lados de los Andes, desde Venezuela a través de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y el noroeste de Argentina hasta las llanuras de la Patagonia en el sur, abarcando una diversa gama de topografía y microclimas que ha creado una gran diversidad ecológica de tipos de *Lupinus*. En el grupo se encuentran especies perennes y anuales de hojas compuestas (Wolko et al., 2011).

Figura 1

Regiones aproximadas de distribución de las especies de *lupinus* del nuevo mundo, incluyendo a *L. mutabilis*



Nota: Tomado de Wolko et al. (2011)

Dentro del grupo AND se encuentra *L. mutabilis* Sweet, la única especie cultivada en la región. Esta especie ha sido domesticada independientemente de los altramuces de los cultivos del Viejo Mundo en el Mediterráneo. Las poblaciones de *L. mutabilis* existen en forma semi-domesticada, con vainas no rompedoras, semillas grandes y permeables, pigmentación

reducida de la capa de semillas y un ciclo de vida más o menos anual. Los informes de su cultivo son desde tan al norte como Venezuela a través de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, hasta Chile y el norte de Argentina (Eastwood & Hughes, 2008). No se ha encontrado accesiones de *L. mutabilis* en vegetación natural, lo que sugiere que la especie sólo puede encontrarse en el cultivo con individuos ocasionales que persisten en los campos de barbecho y sus márgenes después del cultivo anterior. Basándose en datos de campo, herbario y secuencia de ADN, sugieren a *L. piurensis* C.P.Sm., como la especie con una morfología similar, pero con diferencias particularmente con frutos y semillas, como el progenitor silvestre más probable de *L. mutabilis* domesticado. Se distribuye en las laderas occidentales de los Andes entre 1.650 y 3.300 m en el norte de Perú y en los Andes ecuatorianos (Atchison et al., 2016).

Jacobsen et al. (2006), señala que en la región andina, el tarwi, lupino andino o chocho *Lupinus mutabilis*, Sweet, muestra una amplia diversidad genética con gran variabilidad en la arquitectura de la planta, adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud y periodo vegetativo. Así mismo, presenta variabilidad en precocidad, contenido en proteínas, aceites, alcaloides, rendimiento y tolerancia a plagas y enfermedades. El color del grano, planta y flor es muy variable. Su centro de origen está ubicado en la región andina de Bolivia, Ecuador y Perú, ya que en ellas se encuentra la mayor variabilidad genética. En esta región se han identificado 83 especies del género *Lupinus*.

La especie leguminosa *Lupinus mutabilis* (tarwi), se cultiva tradicionalmente en los Andes por encima de los 1.500 m, desde Venezuela hasta Chile y Argentina. Las semillas se utilizan para la alimentación, estando entre las más importantes a nivel mundial con respecto al contenido de proteínas y aceite. Sin embargo, las semillas necesitan un procesamiento antes de su consumo debido a las sustancias anti nutricionales que trabajan en la autodefensa química de las plantas contra los insectos. Las más importantes de estas sustancias son los alcaloides esparteína, lupinina y lupanidina, que en realidad se utilizan para controlar insectos y gusanos gastrointestinales en animales domésticos. Industrialmente, la harina de tarwi se añade con hasta un 15% a la elaboración del pan,

mejorando el valor energético y proteico, así como la conservación del pan debido a la retrogradación del almidón. Debido al alto contenido de aceite y proteínas, el cultivo se considera la soja de los Andes. A estas cualidades se suman la fácil preparación y el bajo coste. Un conjunto de recetas se dan para platos y bebidas que incluyen al lupino andino (Tapia, 2015).

1.2 Clasificación taxonómica

Lupinus mutabilis es una especie de lupino o chocho cultivada en los Andes, principalmente por su frijol comestible. Los nombres vernáculos incluyen tarwi (en quechua pronunciado tarhui), chocho, altramuz, altramuz andino, altramuz sudamericano, altramuz de campo peruano y altramuz perla. Sus semillas, altamente nutritivas, son ricas en proteínas, así como una buena fuente de aceite de cocina. Sin embargo, su sabor amargo ha hecho que *L. mutabilis* sea relativamente desconocido fuera de los Andes, aunque la tecnología moderna hace que sea más fácil eliminar los alcaloides amargos (Mercado & Davalos, 2018).

El tarwi incluye 2 descendientes, *Lupinus mutabilis* var. *Mutabilis* y *Lupinus mutabilis* var. *roseus* Vargas (Smithsonian Institution's National Museum of Natural History, 2014).

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Clase: Dicotiledónea

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Tribu: Genisteae

Género: *Lupinus*

Especie: *Lupinus mutabilis* Sweet

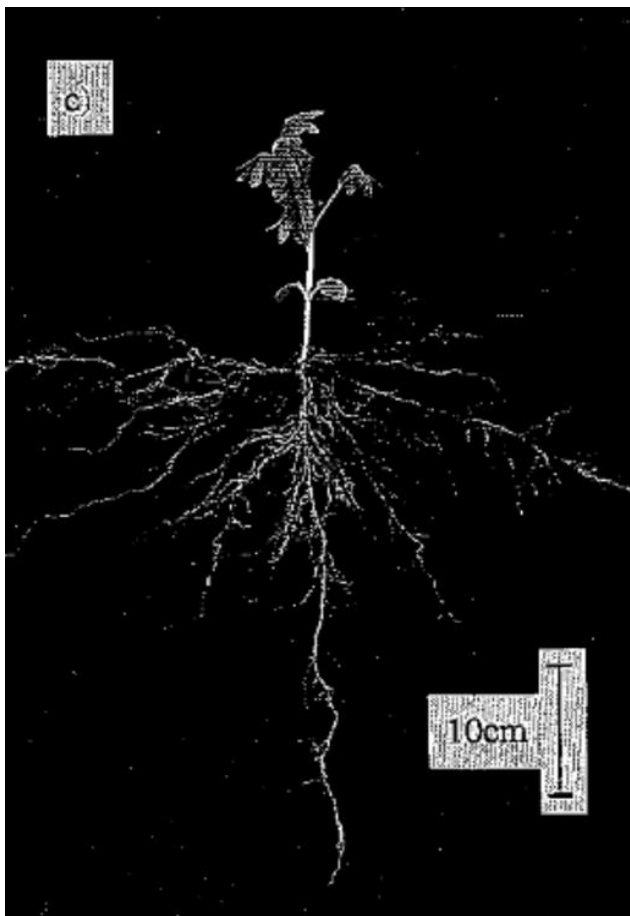
1.3 Morfología del lupino andino

1.3.1 Raíz

La raíz desempeña una función de soporte y conducción de la savia, orgánica o inorgánica, desde el suelo hasta los demás órganos. Se caracteriza por ser de bastante grosor y pivotante (Figura 2).

Figura 2

Morfología de la raíz de L. mutabilis



Nota: Tomado de Clements et al. (1993)

El aspecto más resaltante es la presencia de un gran número de nódulos nitrificantes que se considera que pueden llegar a pesar 50 g por planta, como resultado del proceso de simbiosis entre la raíz y las bacterias del género *Rhizobium*, con la especie *R. lupini*, puede fijar el elemento nitrógeno que sería un aporte para el próximo cultivo. Aunque no se tienen

datos precisos de la cantidad de nitrógeno que es aportado al suelo después de un año de cultivo, en suelos suficientemente profundos y con buena materia orgánica se calcula entre 60 a 80 kg / ha (Cowling et al., 1998).

1.3.2 Tallo

El tallo es único de forma cilíndrica a veces ligeramente aplanado. Existe una alta variación en cuanto a la estructura de la planta sea con un tallo principal prominente o no así como desde un tallo casi sin ramificación a uno con pocas ramas secundarias o con mucha ramificación (Tapia, 2015).

1.3.3 Hojas

Las hojas están constituidas por una lámina de tipo digitada con un número variable de folíolos de 5 a 12 de forma oblonga con pequeñas hojas estipulares en la base del pecíolo. Los folíolos pueden ser elípticos o ensanchados hacia el extremo y variar de glabras a tenuemente pubescentes.

1.3.4 La flor

La inflorescencia es un racimo terminal, con las flores dispuestas verticiladamente. Cada flor mide en promedio 1.2 cm de longitud y es típicamente con la forma de las papiloneadas. La corola presenta cinco pétalos, uno el estandarte dos quillas y dos alas. La quilla envuelve al pistilo y a los 10 estambres monodelfos (Figura 3). En una sola planta se puede llegar a contar más de mil flores, cuyos pétalos varían desde el blanco, crema, azul, hasta el púrpura (Cowling et al., 1998). Los pétalos son de 1 a 1.5 cm de longitud y los peciolos miden de 4 a 30 cm, acanalados, con un engrosamiento en la inserción en la rama y la presencia de un par de glándulas. La inflorescencia se presenta en forma de racimos, de 10 a 15 cm de longitud. El racimo está conformado por flores tubulares, delgadas, de corola violeta vistosa y caliz envolvente, de 2 a 5 cm de longitud.

Figura 3

Detalle del tallo, hojas y flores de Lupinus mutabilis Sweet



Nota. Tomado de Ilustraciones florales de las estaciones.

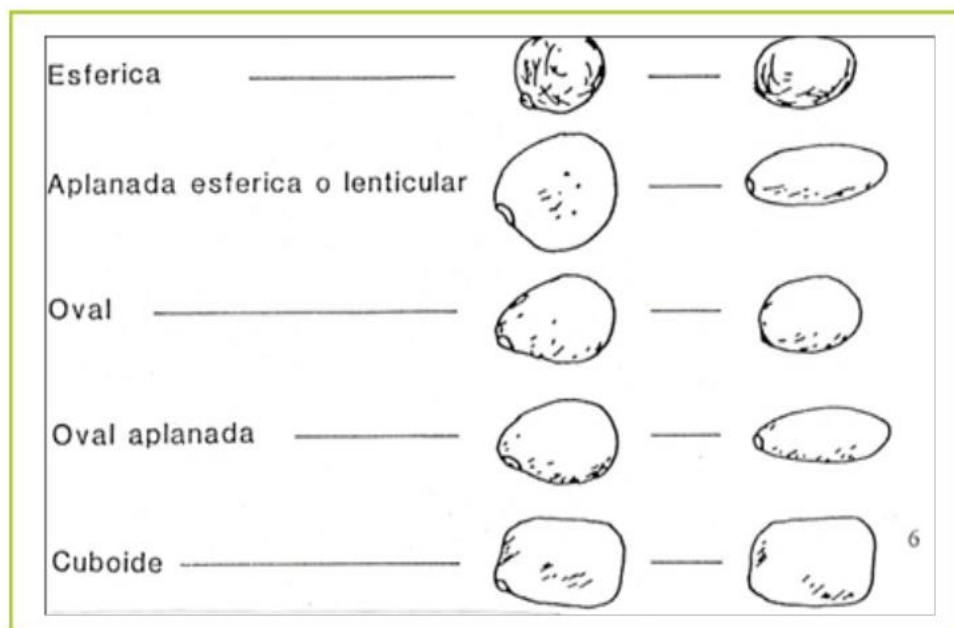
Havell, 1831 biodiversitylibrary.org/page/7436354

1.3.5 El fruto

El fruto está distribuido dentro de una vaina poco dehiscente. Las semillas presentan un tamaño que varía de 4 hasta 15 mm y se acomodan en la vaina en una hilera única. La forma de las semillas es elipsoidal, lenticular, algunas redondeadas y otras más bien con bordes más definidos y forma semi cuadrada (Figura 4). El color de las semillas es muy variable, entre blanca, gris, baya, marrón, negra e incluso de color marmoleado. Algunas semillas blancas tienen una pinta de color que puede estar distribuida como una ceja, bigote, creciente o media luna, hasta punteada e incluso marmoleada (Tapia, 2015).

Figura 4

Formas del grano de tarwi, Lupinus mutabilis.



Nota. Tomado de Tapia (2015).

1.4 Importancia de lupino andino como cultivo

La especie del Nuevo Mundo *L. mutabilis*, ha sido domesticada, pero aún no se ha utilizado a gran escala como una planta de cultivo. Esta especie sin embargo, posee atributos de adaptación, planta y calidad de semillas que hacen del género un recurso valioso para la práctica agrícola, la producción y el uso en las industrias establecidas de piensos y alimentos y salud. El papel del lupino en los sistemas agrícolas modernos comenzó en el siglo XX con la domesticación de las tres principales especies, particularmente a través del desarrollo de líneas de alcaloides bajas y menos dehiscentes. Si bien históricamente los lupinos han desempeñado un papel importante como piensos para animales, alimentos de subsistencia y enmiendas del suelo, el uso actual y futuro ha entrado en el ámbito de los alimentos saludables y los ingredientes funcionales, así como su papel continuo en la nutrición animal y los piensos para acuicultura. La producción mundial de lupinos alcanzó su punto máximo durante la última parte del período 1990, en gran medida como resultado de la expansión de su cultivo en Australia. En los últimos tiempos también se han producido rápidos aumentos en Chile y Alemania, mientras que en Polonia, Italia y el sur de África se han producido

descensos en el área cultivada. Una gran proporción de lupinos en Chile se dirigen a la acuicultura del salmón en el sur del país. En 2007, los principales países productores fueron Australia (a pesar de las disminuciones desde 1996-2000), Alemania, Chile y Polonia, seguidos de niveles más bajos sostenidos en Sudáfrica, Marruecos y Francia. Entre las razones de la reducción del área cultivada de altramuces en Europa figuran las enfermedades como antracnosis y la marchitez por *Fusarium* y la competencia con las importaciones de soja. La antigua URSS tenía grandes áreas (más de medio millón de ha en la década de 1950 como forraje y vegetación) de principalmente de *L. luteus*, pero esto disminuyó debido a la extensión de la marchitez por *Fusarium*. Una mejor resistencia a enfermedades se ha registrado en regiones como Ucrania y Belarus. En los Andes de América del Sur, *L. mutabilis* continúa siendo utilizado como cultivo tradicional, mientras que en Argentina, hay interés en expandir *L. albus* (Wolko et al., 2011).

Lupinus mutabilis todavía se cultiva bajo sistemas agrícolas tradicionales en parcelas muy pequeñas generalmente no mayores de 2000 m², especialmente en las zonas montañosas de los Altos Andes. Su valor en la rotación de cultivos ha sido conocido en la agricultura campesina durante miles de años. Por lo general se cultiva en monocultivo, pero a veces dos o tres hileras de chocho o tarwi se intercalan con maíz, y el tarwi se puede mezclar con quinua (*Chenopodium quinoa*). Es posible encontrar *L. mutabilis* amarga como cultivo fronterizo para proteger otros cultivos de los daños causados por el pastoreo de ganado. La tasa de siembra varía de 60 a 100 kg/ha según el tamaño de la semilla, la viabilidad de la semilla y las precipitaciones. La densidad media de las plantas puede ser de 200 000-300 000 plantas /ha, ya sea en condiciones secas o más húmedas. En las zonas con condiciones ecológicas menos favorables, se pueden cultivar 400 000 plantas en una hectárea (Cowling et al., 1998).

Las semillas de *Lupinus mutabilis* no necesitan ser inoculadas con rhizobium si se siembra en suelos donde se lo ha cultivado en los últimos 6 o 7 años. La nodulación inadecuada puede surgir de diversas causas, ya sea inóculo insuficiente en las semillas, condiciones secas después de la siembra con semillas inoculadas o baja viabilidad del

inóculo. Varios estudios encontraron que las plantas infectadas con rhizobium produjeron más materia seca, nitrógeno y contenido de proteínas en comparación con las plantas que no fueron inoculadas. Los valores medios de materia seca fueron cercanos al doble en las plantas inoculadas, en comparación con las plantas no inoculadas (Carvajal-Larenas, 2013).

1.5 Procesos de fijación de nitrógeno

La nutrición nitrogenada de los lupinos se produce tanto a través de la fijación de N_2 de manera similar en la que el nitrato o el amonio son asimilados por las raíces de las plantas. Dentro del nódulo radicular, las bacterias (bacteroides) reducen el dinitrógeno a amonio, que se secreta a la planta a cambio de una fuente de carbono y energía. Los lupinos transportan la mayor parte del nitrógeno en la planta en el xilema y floema principalmente en forma de asparagina y en cantidades más pequeñas, de glutamina y, por lo tanto, se consideran plantas de producción de amida ureida en temporada cálida. Esta reducción del N tiene lugar en las raíces y en el tallo inferior. Los lupinos tienen un requisito rizobial relativamente específico y están nodulados principalmente por *Bradyrhizobium sp.* Lupinus es de crecimiento lento, aunque se han identificado cepas de crecimiento rápido asociadas con este género (Carvajal-Larenas, 2013). Lupinus, sin embargo, es conocida por ser una leguminosa promiscua como anfitrión ya que es nodulada por rhizobia con una amplia gama de genotipos cromosómicos, que podrían incluso pertenecer a varias especies de *Bradyrhizobium*. La iniciación de la nodulación en el lupino difiere de muchas otras simbiosis en que las células bacterianas acceden a la raíz del huésped a través de espacios intercelulares en la raíz y la entrada en las células de la corteza radicular sin evidencia de un hilo de infección. Los nódulos son indeterminados y se describen como "lupinoides" porque difieren de otras morfologías de nódulos indeterminados (Beligala, 2015).

Se ha empleado una serie de prácticas para mejorar la eficacia de la nodulación en los cultivos de lupino, incluidos diversos recubrimientos de semillas, inoculantes a base de turba y arcilla, el uso de bacterias que aumentan los nódulos, la colocación de fertilizantes debajo de la semilla y el uso de cepas más tolerantes a los apósitos de semillas fungicidas. Los cultivos de lupino que dependen únicamente de N simbióticamente fijados con frecuencia

producen rendimientos que son similares a los cultivos fertilizados con alto N. En plantas de *L. angustifolius*, fertilizados adecuadamente con N mineral presentaron un mayor número de flores y un mayor crecimiento de ramas y biomasa en comparación con las plantas fijadoras de N₂, pero los rendimientos de conjuntos de vainas y semillas eran similares, las plantas alimentadas con N presentaron un índice de cosecha más bajo. El porcentaje de N en la semilla fue similar tanto en las plantas fijadoras de N como en las plantas a las que se les suministró nitrógeno, pero el porcentaje de N en los brotes fue 50% menor en las plantas fijadoras de N, en comparación con las plantas a las que se suministró N (Wolko et al., 2011). La fijación de N₂ está altamente correlacionada con la producción total de biomasa para las leguminosas de cultivo y pastoreo. Esto contribuye a un mayor contenido de proteína en la semilla de lupino, así como proporciona N residual para los cultivos posteriores, en particular los cereales y los cultivos de *Brassica* (Ferchichi et al., 2020).

1.6 La simbiosis *Rhizobium* - *Lupinus*

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es una de las interacciones beneficiosas más prominentes de microbios vegetales; por medio de esta asociación las plantas leguminosas obtienen nitrógeno directamente de la atmósfera y esta fijación de nitrógeno tiene un efecto positivo sobre la fertilidad del suelo. La fijación de nitrógeno se lleva a cabo en órganos altamente especializados llamados nódulos que se forman por la interacción entre las bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios) y la raíz de la leguminosa. La formación de nódulos en la planta huésped es un proceso complejo regulado tanto por la planta como por las bacterias. El establecimiento de simbiosis, la formación de nódulos y el desarrollo posterior requieren una serie de interacciones complejas entre dos organismos muy diferentes que implican cambios estructurales y bioquímicos. El micro simbionte rizobial crece activamente en la rizósfera debido a los exudados de las raíces de las leguminosas. La interacción para el reconocimiento de los socios simbióticos correctos comienza con un diálogo molecular representado por el intercambio de señales múltiples entre legumbres (flavonoides, hormonas) y rizobios (factores nod, exopolisacáridos y lipopolisacáridos). Los flavonoides secretados por las plantas huésped inducen los genes de cabeceo rizobiano en las bacterias

que codifican los factores de nodulación. Estas señales moleculares son esenciales para iniciar cambios morfogénicos y organogénicos de la raíz, llevando a la formación de nódulos (Beligala, 2015).

Además, los factores de nodulación inducen la formación de proteínas nódulos específicas o mejoradas por nódulos (nodulinas tempranas), que participan en la infección y organogénesis de nódulos. Las últimas nodulinas se expresan alrededor del inicio de la fijación de nitrógeno. La ruta de infección más común es a través de pelos de la raíz por la formación de hilos de infección. Después del reconocimiento, los rizobios se adhieren a la superficie de una célula epidérmica, generalmente un pelo de la raíz. La entrada de las bacterias es proporcionada por la hidrólisis enzimática de la pared celular (Durán Wendt et al., 2013). La planta reacciona contra la invasión desarrollando invaginaciones de la pared celular y el plasmalema que encierran los rizobios. Estas invaginaciones, ahora llamadas hilos de infección, crecen, forman ramas y atraviesan las células raíz adyacentes liberando bacterias (Fernández-Pascual et al., 2007).

Al mismo tiempo, los primordios de nódulos comienzan a formarse dentro de la raíz. Los rizobios se liberan de los hilos de infección en las células centrales de los primordios del nódulo y luego comienzan a dividirse, multiplicarse y diferenciarse para formar bacterioides. Estos están separados del citoplasma de las células de la planta huésped por una membrana peribacteroidea especializada, formando una estructura similar a un orgánulo denominada simbiote. La membrana peribacteroidal y las membranas bacteroidales están en estrecho contacto, lo que permite un intercambio de metabolitos entre los bacterioides y la célula de la planta huésped. Las células dentro del centro del nódulo se agrandan debido a la presencia de numerosos simbioses y se diferencian para formar una zona infectada donde la nitrogenasa se expresa dentro de los bacterioides y la leghemoglobina se expresa en el tejido de la célula huésped (Taco & Zuñiga, 2017). La enzima nitrogenasa requiere altas tasas de ATP de fosforilación oxidativa, un proceso que requiere oxígeno como receptor de electrones al final de la cadena respiratoria. Sin embargo, la nitrogenasa (componente II) es inactivada por un exceso de oxígeno, que acalla la expresión de la fijación de N, por lo que la expresión

de genes fijadores requiere de un ambiente microaerobio. Esto implica un control muy preciso del suministro de oxígeno a los bacterioides. Este control se establece en la corteza del nódulo por una barrera de difusión de oxígeno y en las células infectadas por la leghemoglobina que transporta oxígeno y la respiración de los bacterioides.

La barrera cortical de la difusión de oxígeno (ODB) es variable y capaz de equilibrar la entrada del oxígeno contra el consumo por la actividad metabólica. Permite el mantenimiento de niveles muy bajos del oxígeno en la zona infectada. La ODB está formada por capas de células donde los espacios intercelulares pueden ser llenados con agua o una matriz de glicoproteínas y los nódulos son capaces de modificar el espesor de la ODB dependiendo de las condiciones ambientales. En las células infectadas, la distribución del oxígeno se alcanza con la leghemoglobina que es la proteína más abundante de los nódulos (aproximadamente 25% de peso seco del nódulo). La leghemoglobina es una hemoproteína monomérica que está codificada por una familia multigénica. Se localiza en el citoplasma de las células infectadas y consiste en un grupo prostético hemo y solamente un polipéptido (globina) del kDa 16 (Martínez et al., 2005).

El género *Bradyrhizobium* está compuesto por bacterias en forma de varilla, que son móviles debido a flagelos polares o subpolares, no forman esporas, y por lo general contienen el compuesto de almacenamiento de carbono poli β -hidroxibutirato. *Bradyrhizobium* pertenece a la clase de α -Proteobacteria, al igual que muchos otros rizobios que nodulan leguminosas. Durante más de un siglo se consideró que la nodulación era una capacidad exclusiva de microorganismos pertenecientes a la clase α -Proteobacterias. Sin embargo, cuatro especies no rizobiales, pertenecientes a las clases α - y β -Proteobacteria, se han identificado recientemente como bacterias leguminosa-nodulantes. Los *Bradyrhizobium* que nodulan *Lupinus* no son reconocidos como una especie separada, pero, al igual que con algunos otros *Bradyrhizobium*, se les da el nombre del género seguido del nombre de la leguminosa huésped, en este caso *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*). Tiene la característica de crecimiento lento comparado con otras especies del género *Bradyrhizobium*, pero es diferente en ser tolerante al ácido y capaz de crecer en suelos con altos niveles de aluminio libre (Taco &

Zuñiga, 2017). La caracterización de las cepas bradyrizobiales ha demostrado que son fenotípicas y genotípicamente diversas, y los datos obtenidos de aislados de lupinus de México han indicado una relación muy estrecha con las cepas tipo *Bradyrhizobium japonicum*. Además, la diversidad genética en *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) se ha estudiado mediante la caracterización de grupos de genes hup (para la asimilación de hidrógeno) con el objetivo de definir el grado de diversidad en la composición y regulación del gen hup en bacterias endosimbióticas. Los hibridaciones genómicas de la DNA demostraron una diversidad de perfiles intraespecíficos del hup dentro de especies de *Bradyrhizobium* de lupino (Fernández-Pascual et al., 2007).

La división de las células externas de la corteza de la raíz del lupino puede ser detectada varios días después de la inoculación bradyrizobial. La célula inicialmente infectada se divide rápida y repetidamente y las células recién divididas (6-8) albergan pocas bacterias que se pueden observar dentro de la pared celular inicial. Las bacterias luego se dividen activamente dentro de sus células huésped, mientras que simultáneamente, las células corticales que rodean la célula infectada inicial también se dividen, para formar el origen de la corteza del nódulo. La división celular en capas más profundas de la raíz tiene lugar más tarde. En etapas posteriores del desarrollo del nódulo, la zona infectada central es rodeada parcialmente por el meristemo situado en regiones basolaterales, que ahora se denomina zona meristemática lateral (LMZ). Esta LMZ está compuesta por células no infectadas e infectadas (con bajo número de bacterias) que conservan su capacidad de dividirse durante varios ciclos. En cada ciclo celular, se puede observar la reorganización intracelular de los rizobios. Las bacterias parecen estar distribuidas igualmente entre las células de la raíz, y la dinámica de la conformación del citoesqueleto durante la división de las células infectadas aparece relativamente normal. Las células huésped pueden ahora reconocer el microsimbionte como sus propios orgánulos celulares (Felipe, 2009).

1.7 Caracterización molecular de *Rhizobium lupini*

La caracterización de microorganismos es de vital importancia para los estudios de ecología microbiana. La clasificación, identificación y diferenciación de microorganismos

tradicionalmente se ha basado en las características fenotípicas. Sin embargo, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena la polimerasa (PCR) se han convertido en las alternativas más rápidas, fiables y sencillas para caracterizar y diferenciar los microorganismos. Al tipificar el material biológico, el objetivo es revelar la diversidad dentro de los taxones. Los taxones o unidades taxonómicas son grupos dispuestos sobre la base de similitudes o relaciones definidas que los distinguen de otros organismos en un proceso llamado clasificación. La identificación se refiere a la asignación de aislados desconocidos a una unidad taxonómica distinta y nombrarla en consecuencia. La clasificación, la nomenclatura y la identificación conforman la taxonomía con la 'especie' como unidad taxonómica central. Como complemento de la taxonomía, la tipificación permite la diferenciación de aislados dentro de especies o subespecies, es decir, a nivel de cepa. Una variedad de métodos fenotípicos y genotípicos se emplean para la tipificación, identificación y clasificación microbiana (Huasasquiche, 2018). Cada método presenta sus ventajas y desventajas, en términos de facilidad de aplicación, reproducibilidad, necesidad de equipos sofisticados, modo de acción y nivel de resolución filogenética y taxonómica. La tipificación basada en DNA puede implicar la amplificación específica o inespecífica de la polimerización en cadena, la digestión de la enzima de restricción y el análisis de la longitud del fragmento. Los métodos de tipificación basados en PCR permiten la exploración de parte o de la totalidad de la estructura genómica del microorganismo. Los métodos de tipificación producen perfiles de bandas que son objeto de análisis asistidos por ordenador y de tipificación por bases de datos (Beligala, 2015).

1.7.1 Amplificación de elementos Box

Se han desarrollado varias técnicas moleculares basadas en PCR, las cuales mediante la generación de perfiles de ADN permiten agrupar, a la vez que establecen diferencias entre dos cepas cercanamente relacionadas. Los perfiles moleculares se obtienen por métodos como la rep-PCR, en la que se amplifican regiones repetitivas a lo largo de todo el genoma bacteriano. Dentro de esta técnica encontramos a tres tipos, los cuales aparecen en la bibliografía como REPPCR (PCR sobre elementos palindrómicos extragénicos

reiterativos), ERIC-PCR (PCR sobre elementos consenso intergénicos reiterativos de enterobacterias) y BOX-PCR (PCR sobre elementos box), dependiendo del tipo de cebador que se esté usando. Para el análisis cepas mediante sus perfiles BOX. Se describen en un inicio tres subunidades para los elementos box: boxA, boxB y boxC, sin embargo, sólo boxA se conserva muy bien en las bacterias (Ruben et al., 2013). La técnica de BOX-PCR ha sido utilizada en el estudio de poblaciones endófitas de tarwi.

1.7.2 Secuenciamiento del gen ribosómico 16S

El operón ADN_r, *rrn*, es una entidad genética de amplio interés por encontrarse tanto en organismos procariontas como eucariontas. La utilidad de la secuencia del ADN_r como herramienta taxonómica ha sido ampliamente demostrada en bacterias, pues se ha llegado a redefinir relaciones filogenéticas que anteriormente eran dependientes del metabolismo celular. Dentro de este operón, se encuentra el ADN_r 16S, quien además de tener regiones altamente conservadas para el estudio de las relaciones entre taxones distantes, contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies. Es por ello que la clasificación actual de las bacterias se basa en el gen ribosómico 16S (*rrs*), pues gracias a su análisis se ha podido agrupar a las bacterias en diferentes phyla, clases, órdenes, familias, géneros y especies (Rademaker et al., 2006).

Capítulo dos

Diseño metodológico

2.1 Localización del estudio

El estudio se realizó en la parroquia Huachi Chico, cantón Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador. La propiedad se encuentra ubicada en las coordenadas M17 762413.17 E, 985683.013 N (Figura 5).

Figura 5

Localización geográfica del sitio del estudio



Nota. Adaptado de Dirección de Planificación. GADP Tungurahua. Google Earth.

2.2 Selección de nódulos radiculares y aislamiento de *Rizhobium*

El proceso de aislamiento y determinación de nódulos en *Lupinus mutabilis*, se realizó bajo los lineamientos dados en el PROTOCOLO 882 PSL-RHIZOBIUM de PlantSphere Laboratories (Falconí, s.f.).

2.2.1 Prospección de la búsqueda de nódulos.

Se seleccionaron 2 localidades para la recolección de nódulos de la raíz de lupino. La primera localidad fue un cultivo de la provincia de Tungurahua (762289.59 E, 9856984.48N) y la segunda un cultivar de la provincia de Cotopaxi (17M 770397.45 E 9898067.25 S).

En cada localidad se recolectaron nódulos de 10 plantas de *Lupinus mutabilis*, var. Sweet, durante el período normal de siembra, asegurando que haya habido poca o ninguna aplicación de fertilizantes químicos, en especial fertilizantes minerales (Figura 6).

Figura 6

Planta tipo para la recolección de nódulos radiculares



Se seleccionaron plantas jóvenes y vigorosas en floración a base de un muestreo aleatorio simple en X, de cada lote cultivado . Se seleccionaron 2 plantas por cada punto de muestreo, con un total de 10 plantas por lote. El muestreo se realizó en forma estratificada, con divisiones de la población en 5 puntos con muestreo aleatorio simple en Zig-zag, tomando, 2 plantas/punto, para un total de 10 plantas. Se extrajeron las plantas con ayuda de palas evitando daños en el sistema radicular.

Se realizó el conteo de nódulos según la estructura, la abundancia, el tamaño, el color interno y la nodulación en la raíz principal. Los nódulos con las mejores características se transportaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y a temperatura ambiente hasta el Laboratorio para su procesamiento el mismo día.

Nota. Imagen capturada en el cultivo muestreado

2.2.2 Procesamiento de los nódulos en laboratorio.

Los nódulos se desinfectaron por inmersión sucesiva en alcohol al 70% por 60 segundos en hipoclorito de calcio al 2.5% por cuatro minutos y luego enjuague con agua destilada estéril. Se midió la viabilidad del bacteroide en el nódulo, tomando nódulos al azar, que luego se seccionaron con un bisturí, y posteriormente se realizó un extendido en fresco sobre placas porta objeto con tinción de Gram.

2.2.3 Aislamiento primario de *Rhizobium spp.*

Los nódulos se seccionaron con un bisturí estéril, luego ser transferidos a placas con medio de cultivo Levadura Manitol Agar con Azul de Bromotimol como indicador (YMA + AB), para luego incubarlos a 30°C, por 7 días hasta observar crecimiento abundante alrededor de los nódulos. Para el recuento de las colonias crecidas y para determinar el porcentaje de nódulos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{NNC}{TNS} \times 100$$

Donde:

%R = porcentaje de recuperación
 NNC = número de nódulos con crecimiento
 TNS = total de nódulos sembrados

2.2.4 Aislamiento secundario para la obtención de cepas puras.

Se realizó mediante siembra por agotamiento en cajas estériles con YMA + AB suplementado con con cycloheximida a partir de las colonias obtenidas en el aislamiento primario. Las cajas se incubaron a 30°C por 7 días. Se observó crecimiento típico de la morfología de las colonias, y de las células por tinción de Gram.

Las observaciones se realizaron cada 24 horas repicando las colonias típicas de *Rhizobium spp.* Las cepas que presentaron crecimiento en el segundo aislamiento fueron codificadas para hacer posible la diferenciación típica de *Rhizobium*.

2.2.5 Identificación de las cepas de *Rhizobium sp.*

Para este proceso, se tomaron colonias del aislamiento secundario. El criterio para esta selección se hizo en base a las características de colonias con reacción ácida en el medio de cultivo YMA + AB y morfología bacilar Gram negativa. Se sembró posteriormente por agotamiento en cajas con agar YMA sin Azul de Bromotimol e incubó a 30°C durante 7 días. Durante el periodo de incubación se verificaron las características de las colonias como forma, tamaño, color, textura y la tasa de crecimiento. Se verificó el diámetro de mínimo 10 colonias por placa, calculando las medias.

Para la evaluación en invernadero se seleccionaron los inóculos de acuerdo a las características planteadas. Además se evaluó el crecimiento de las cepas en diferentes medios para lograr la caracterización de las cepas. Se tomaron inóculos a partir de cada cepa y sembraron por agotamiento en cajas con PGA + PB (Peptona Glucosa Agar + Púrpura de Bromocresol). Luego se incubaron a 30°C. Los resultados se valoraron de acuerdo al crecimiento, como (+) o (-). Las cepas se evaluaron según la metodología aceptada, tomando inóculos y realizando siembra por agotamiento en medio YMA + RC (Levadura Manitol Agar + Rojo Congo), posteriormente las colonias se evaluaron en base a la absorción de rojo congo.

Posteriormente se sembraron las cepas en cajas con LLA (Levadura Lactosa Agar) e incubaron a 30°C durante 72 horas; luego fueron extendidas y se les añadió el reactivo de Benedict. Los resultados se evaluaron por la producción de cetolactosa, como (+) o (-).

Posteriormente se sembró inóculo por agotamiento en placas con agar XLD (Xilosa Lactosa Desoxicolato) y Hektoen, para determinar la especificidad de crecimiento de bacterias Gram negativas. Luego se realizaron pruebas de motilidad.

2.2.6 Tolerancia de las cepas a factores abióticos.

Las cepas seleccionadas fueron evaluadas en relación con la habilidad para crecer bajo diferentes niveles de pH (4.5; 6.8; 9.0 y 11), concentraciones de NaCl (0.01%; 1% y 2%) y además a diferentes temperaturas (4.5°C, 30°C, 37 y 44°C). Para la prueba de pH, se debe ajustar el medio YMA, con NaOH y HCl 1N. Para las concentraciones de NaCl, se prepararon tubos con caldo Levadura- Manitol, incubando a 30°C por 72 horas en ambos casos. Para la prueba de tolerancia a diferentes temperaturas, se realizaron siembras por agotamiento en cajas con YMA, luego se incubaron a diferentes temperaturas.

2.2.7 Pruebas de resistencia de las cepas a antibióticos.

Las cepas seleccionadas se sometieron a pruebas de resistencia frente a antibióticos como Tetraciclina (5,0 µg/ml) y Cloranfenicol (10,0 µg/ml). Los antibióticos se obtuvieron comercialmente y las soluciones se prepararon con agua destilada estéril. Posteriormente se adicionó el vial al medio de cultivo YMA y se realizó la siembra por agotamiento. Se incubaron las placas a 30°C durante 7 días, posteriormente se evaluaron la formación de colonias; tomando el criterio de resistencia como resistente (+), o no resistente (-).

2.2.8 Conservación de las cepas de *Rhizobium sp.*

Las cepas se cultivaron en YMA + AB en plano inclinado y en caldo Levadura Manitol. Se incubaron a 30°C por 120 horas. Luego fueron ubicadas en una nevera a 4 y 5°C. Se realizaron las pruebas de viabilidad cada 30 días, por medio de siembra por agotamiento en placas con YMA.

2.3 Identificación molecular de los aislados

2.3.1 Extracción de ADN

El ADN de cada cepa se extrajo por el método del fenol-cloroformo. Las cepas bacterianas cultivadas en caldo YEM se centrifugaron y el pellet se re suspendió en 400 µl de tampón TE, se añadieron 5 µl de 20 mg/ml de proteinasa K y 40 µl de SDS al 10% y se

incubaron a 560 C durante 45 min. Se añadieron 400 µl de fenol saturado con tris y se centrifugaron durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. A la mezcla se añadieron 200µl de fenol tris saturado y 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se tomó el sobrenadante después de la centrifugación y se añadió 0,1 volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto refrigerado y se incubó de nuevo durante 2 horas a 20C. Tras la centrifugación, el pellet se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Girija et al., 2020).

2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La secuencia parcial del gen 16S rRNA se amplificó utilizando los cebadores universales, 616V: 5´-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3´, 699R: 5´-RGG GTT GCG CTC GTT -3´. Las condiciones de amplificación consistieron en 94°C durante 90 s (desnaturalización), 55°C durante 40 s (recocido) y 72°C durante 90s (extensión). La PCR se llevó a cabo durante 34 ciclos, además de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las bandas de ADN separadas por electroforesis se observaron bajo iluminador UV. El producto de la PCR se purificó y se secuenció en Scigenom Pvt. Cochin (Girija et al., 2020).

Los cebadores indicados para la amplificación por PCR y secuenciación se eligieron mediante una cuidadosa inspección de las secuencias bacterianas del ARNr 16S publicadas y disponibles en la biblioteca de datos EMBL/GenBank Data Library. La región amplificada es una parte relativamente parte variable de la molécula y, por tanto, tiene una alta densidad de información, especialmente para las comparaciones de parientes cercanos (Huasasquiche, 2018).

2.4 Identificación de aislado de *rhizobium* sp. por secuenciación del gen 16s RRNA

La identidad de la secuencia del ARNr 16S se estableció realizando una búsqueda de similitud con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). El árbol filogenético se construyó con las secuencias existentes del gen 16S rRNA de eubacterias relacionadas obtenidas de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information NCBI, mediante el método de unión de vecinos utilizando el software MEGA 7.0 con 1000 réplicas bootstrap (Tamura et al., 2007).

2.4.1 Multiplicación de cepas de *Rhizobium* sp.

El aislado de *Rhizobium* a multiplicarse se tomó de un tubo de ensayo donde estaba conservado. Se procedió a incrementar la cantidad del aislado mediante sucesivos pasajes en frascos de volúmenes crecientes hasta alcanzar un número de *Rhizobium* de aproximadamente 10^6 bacterias/g de inoculante

2.4.2 Técnicas de inoculación

Se preparó una solución de alginato de sodio (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, USA) de 20 g L^{-1} por solubilización en agua desionizada a 60°C . La mezcla se mantuvo en constante agitación constante hasta la completa solubilización del alginato. A continuación, la solución se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C .

Un volumen de 100ml de los cultivos de las dos cepas de *Rhizobium* se concentraron por centrifugación a 3500 r.p.m durante 15min. Las células se resuspendieron en 100ml de la solución de alginato de sodio preparada previamente, la cual estuvo a temperatura ambiente.

La matriz de alginato con las bacterias en suspensión se polimerizó en una solución de CaCl_2 0,1 M. Para ello, la matriz de alginato se dejó caer gota a gota en la solución de CaCl_2 en agitación constante. El CaCl_2 se mantuvo bajo agitación constante durante 30 minutos. Las perlas se recuperaron finalmente en un tamiz y se enjuagaron con agua destilada esteril (121°C durante 15 minutos).

En el caso del método de inmersión, los cultivos de las dos cepas de *rhizobium* se añadieron a la suspensión semillas de lupino preseleccionadas y esterilizadas. Se recuperaron las semillas con la ayuda de un tamiz.

2.5 Evaluación en campo de la inoculación con cepas de *Rhizobium* sp.

La evaluación en campo de las dos cepas de *Rhizobium*, (A1 Tungurahua y A2 Cotopaxi) en el crecimiento de (*Lupinus mutabilis*) se realizó en la parroquia Huachi Chico ($17^\circ\text{M } 762413.17 \text{ E}$, 985683.013 N), cantón Ambato, provincia de Tungurahua. Se estableció un diseño factorial en el que se evaluaron 3 factores: proveniencia de los aislados, métodos de inoculación y tipo de sustrato (ver tabla 3).

La siembra se realizó en fundas plásticas para vivero, las cuales fueron previamente desinfectadas con amonio cuaternario de quinta generación al 10%. Los sustratos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Una vez colocado el sustrato en la fundas y etiquetadas de acuerdo a los tratamientos descritos en la tabla 4, se colocaron dos semillas de lupino andino por funda y se aplicó el tratamiento correspondiente. Estas semillas fueron seleccionadas en función de su tamaño, forma y color, que correspondieron a las características ideales de la especie (Caicedo et al., 2010). Las labores culturales fueron limitadas a deshierbas del sustrato expuesto y riego.

2.5.1 Factores en estudio

En el experimento se evaluaron tres factores, como se detalla en la *Tabla 1*:

Tabla 1

Factores experimentales del estudio

Factor	Niveles	Descripción de los niveles	
Proveniencia de los Aislados	2	Tungurahua.	(A1)
		Cotopaxi	(A2)
Método de inoculación	2	Método de inmersión	(I1)
		Método de encapsulamiento en alginato	(I2)
Tipo de sustrato	3	Arena	(S1)
		Suelo franco arcilloso	(S2)
		Suelo negro andino	(S3)

Los tratamientos Testigo consistieron en semillas sin inoculación de *Rhizobium*, en los 3 sustratos. La *Tabla 2* muestra los tratamientos aplicados en el ensayo.

Tabla 2

Estructura de los Tratamientos Evaluados en el Estudio

Tratamiento	Origen del Aislado	Método de Inoculación	Sustrato
-------------	--------------------	-----------------------	----------

A1I1S1	Tungurahua	Inmersión	Arena
A1I1S2	Tungurahua	Inmersión	Suelo franco arcilloso
A1I1S3	Tungurahua	Inmersión	Suelo negro andino
A1I2S1	Tungurahua	Encapsulamiento en alginato	Arena
A1I2S2	Tungurahua	Encapsulamiento en alginato	Suelo franco arcilloso
A1I2S3	Tungurahua	Encapsulamiento en alginato	Suelo negro andino
A2I1S1	Cotopaxi	Inmersión	Arena
A2I1S2	Cotopaxi	Inmersión	Suelo franco arcilloso
A2I1S3	Cotopaxi	Inmersión	Suelo negro andino
A2I2S1	Cotopaxi	Encapsulamiento en alginato	Arena
A2I2S2	Cotopaxi	Encapsulamiento en alginato	Suelo franco arcilloso
A2I2S3	Cotopaxi	Encapsulamiento en alginato	Suelo negro andino
T0S1			Arena
T0S2			Suelo franco arcilloso
T0S3			Suelo negro andino

2.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. En ellos se incluyeron las 12 interacciones correspondientes a los factores en estudio y se añadieron 3 tratamientos testigo a cada repetición. Los tratamientos totales por repetición fueron 15.

El análisis estadístico se realizó en el lenguaje estadístico R Studio (GitHub, 2020). Se calculó el análisis de varianza, en función del diseño experimental planteado y se aplicó la prueba de Tukey al 5%, para determinar similitudes estadísticas entre los promedios de todos los tratamientos evaluados, y para los promedios de las combinaciones de factores en estudio (Montgomery, 2013).

2.5.3 Variables evaluadas

Se recopilaron datos de las siguientes variables:

Días a la emergencia. Se contabilizaron los días transcurridos desde la siembra a la emergencia del 50% de semillas sembradas que presentaban las hojas cotiledonares

rompiendo la superficie del suelo. Se consideró como planta emergida, aquella cuyas hojas cotiledonares podían apreciarse en la superficie del sustrato.

Desarrollo vegetativo. El crecimiento de la planta se definió como el volumen de un cono, conformado como base por el radio del tallo, tomado sobre el cuello de la raíz, y la altura de tallo, tomada desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la planta. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$V = \frac{1}{3}\pi r^2 h$$

Donde:

V = Volumen del tallo

r = radio en la base del tallo

h = Altura del tallo

La altura del tallo se tomó con la ayuda de un flexómetro y se registró en cm. El registro se lo hizo a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (DAS). La medición se la realizó desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la planta (*Figura 7*).

Figura 7

Medición de la altura de tallo



El diámetro de tallo se determinó utilizando un calibrado Vernier, se registró el diámetro de tallo en cm (*Figura 8*). El registro se lo hizo a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (DAS). La medición se la realizó sobre el cuello de la raíz de la planta.

Figura 8

Toma de diámetro de tallo con calibrador Vernier



Número de nódulos por planta. Fueron contabilizados a los 45 días, en cada planta de la unidad experimental y reportado un promedio por tratamiento.

Capítulo tres

Resultados y discusión

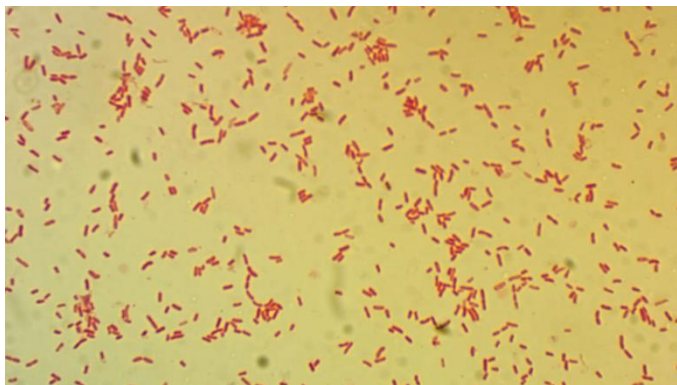
3.1 Aislamiento e identificación molecular de cepas de *Rhizobium* de nódulos de raíz de *Lupinus Mutabilis*

3.1.1 Aislamiento primario de *Rhizobium*

Las pruebas de viabilidad de los bacteroides presentes en los nódulos se realizaron con tinción Gram, observándose la presencia de rizobios viables Gram negativos (Figura 9).

Figura 9

Bacteroides de Rhizobium viables, vistas al microscopio óptico (1000x)



La transferencia de los bacteroides a placas con Agar Levadura Manitol con Azul de Bromotimol como indicador (YMA + AB), se realizó independientemente para cada muestra de acuerdo con el protocolo, encontrándose los crecimientos correspondientes.

3.1.2 Aislamiento secundario o auxiliar.

De los cultivos obtenidos de cada localidad se seleccionaron dos aislados, uno por cada localidad de acuerdo a las características morfológicas típicas para este género. Luego de realizada la siembra por agotamiento en cajas estériles con YMA + AB con cycloheximida a partir de las colonias obtenidas en el aislamiento primario, las cajas se incubaron a 30°C por 7 días. Se observó crecimiento típico de la morfología de las colonias, y de las células por tinción de Gram. Las observaciones se realizaron cada 24 horas repicando las colonias típicas

de *Rhizobium spp.* Las cepas que presentaron crecimiento en el segundo aislamiento fueron codificadas para hacer posible la diferenciación típica de *Rhizobium*. De Cotopaxi se obtuvieron siete aislamientos y de Tungurahua ocho. La morfología de las colonias bacterianas de cada sitio mostraron características consistentes y homogéneas por lo cual se decidió hacer un pool de los aislados por localidad. La descripción del morfotipo de los dos aislados se detalla en la Tabla 3

Tabla 3

Descripción morfológica de las colonias y bacterias aisladas

Características	Aislado A1 Tungurahua	Aislado A2 Cotopaxi
Colonias		
Diámetro (mm)	2 -2.5	1.8 -2.0
Color:	Translúcidas brillantes	Beige
Forma:	Redonda	Redonda
Borde:	Liso	Liso
Elevación:	Pulvinada	Pulvinada
Consistencia:	Mucilaginosa	Suave
Bacterias		
Forma:	Células bacilares alargadas	Células esferoidales
Largo:	2.0m-2.5 μ	0.9m-1.0 m
Ancho:	1.0 μ	0.9m-1.0 m
Determinación taxonómica:	Género: Rhizobium	Género: Rhizobium
Observaciones adicionales:	Células que presentan septos transversales teñidos positivamente con la tinción de Gram. Tiempo de incubación de 5 a 7 días.	Tiempo de incubación 6 días

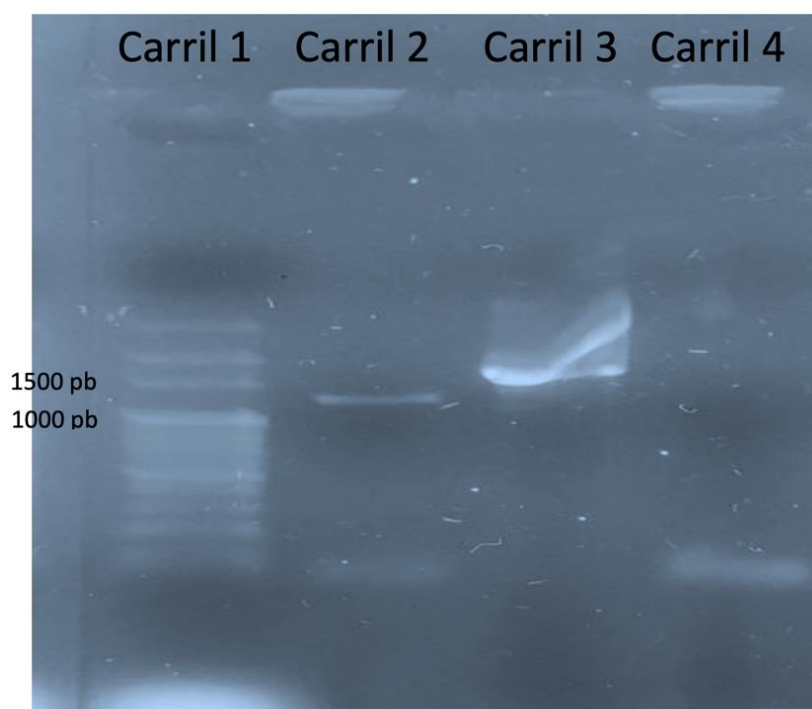
3.1.3 Identificación molecular de *Rhizobium*

Los aislamientos obtenidos mostraron características típicas del género *Rhizobium*, debido a las limitaciones de recursos se decidió hacer el análisis molecular únicamente del pool de cepas de Tungurahua.

La electroforesis horizontal muestra las bandas diferenciadas de fracciones de ADN, comprendida entre los 1000 y 1500 pares de bases (Figura 10). El fragmento de ADN de la muestra observa en el carril 2.

Figura 10

Electroforesis horizontal de los productos de PCR convencional



La secuenciación SANGER se realizó para las hebras de ADN molde y complementaria. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando los programas bioinformáticos FinchTV v1.5.0 y Geneious v11.1.5. A partir de una extracción satisfactoria de ADN se amplificó el barcode 16S de la muestra MB00 y se logró identificar molecularmente una especie del género *Rhizobium* (Tabla 4).

Tabla 4

Identificación molecular de bacteroides

Código BioSin	Long (pb)	Calidad (%)	Barcode	Organismo	Identidad (%)	No Acceso GenBank
MB00	1307	97.4	16S	<i>Rhizobium</i> sp.	99.77	MT271224.1

3.2 Variables de desarrollo vegetativo

3.2.1 Días a la emergencia

La Tabla 5, muestra el análisis de varianza de tres vías para la variable “días a la emergencia”, encontrándose diferencias altamente significativas para la fuente de variación tratamientos ($p=0.003$). Así mismo, se observa un efecto altamente significativo para el factor sustratos ($p=0.001$). Las interacciones entre los factores no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$).

Tabla 5

Análisis de Varianza para Días a la Emergencia

Fuente de Variación	P valor
Repeticiones	0.764
Tratamientos	0.003**
Aislado (A)	0.607
Inoculación (I)	0.757
Sustrato (S)	0.001**
A * I	0.263
A * S	0.594
I * S	0.547
A * I * S	0.464

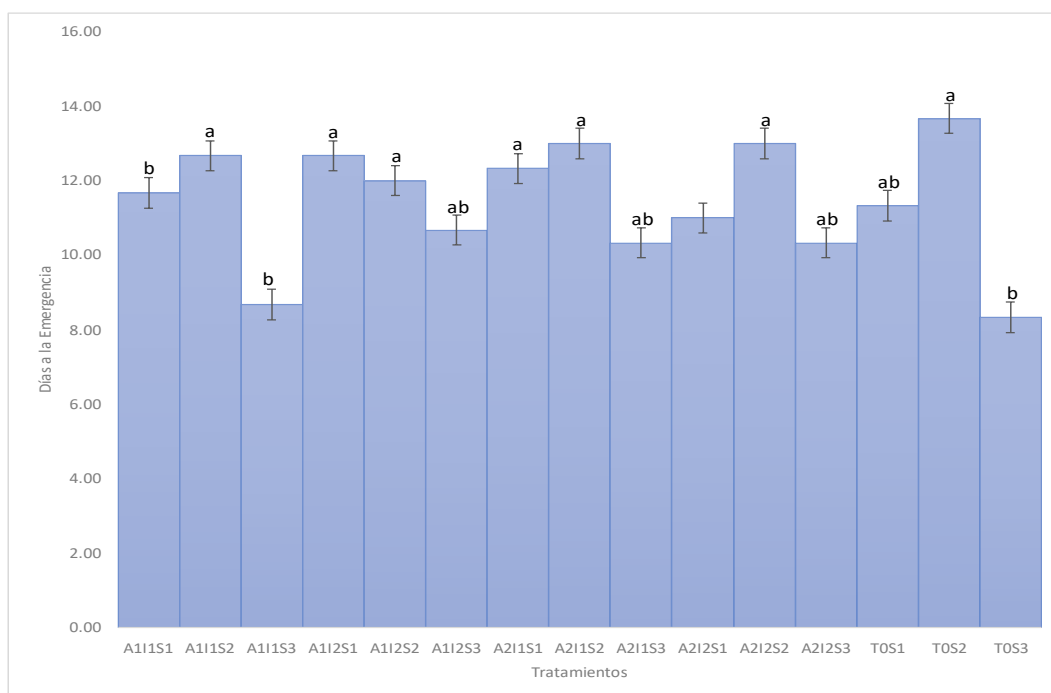
Nota. La tabla muestra el valor p para cada factor. Valores con ** muestran valor

** significativo al 1% y con * valor significativo al 5%.

La prueba de Tukey para tratamientos en la variable días a la emergencia, muestra que el testigo con suelo franco arcilloso como sustrato permitió una germinación más temprana. Así mismo, las interacciones que incorporan tanto arena (S1) como suelo franco arcilloso fueron significativamente más cortas de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%. El sustrato con sustrato franco arcilloso (S2) y todas las interacciones que incluyen este sustrato, muestran una demora significativa en la emergencia de las plántulas (Figura 11).

Figura 11

Prueba de al 5% para tratamientos en la variable días a la emergencia



Nota. Las barras muestran las medias de 12 repeticiones por tratamiento \pm SE (Error estandar).

La prueba de Tukey para tratamientos en la variable días a la emergencia, muestra que el testigo con suelo franco arcilloso como sustrato permitió una germinación más temprana. Así mismo, las interacciones que incorporan tanto arena (S1) como suelo franco arcilloso se ubican en el primer rango dado por la prueba de Tukey al 5%. El sustrato con suelo negro andino (S3) y todas las interacciones que incluyen este sustrato, muestran una demora significativa la emergencia de las plántulas. Estos resultados se pueden deber a que el lupino tiene una emergencia "epigea". Una plántula epigea se desarrolla con sus cotiledones sobre el suelo. Mientras todavía está bajo tierra, el ápice del hipocótilo se dobla para formar un gancho. Este gancho protege el meristemo (o punto de crecimiento) y facilita su paso por el suelo. A medida que el hipocótilo crece hacia la superficie del suelo, tira de los cotiledones con él, que están dirigidos hacia abajo y así protegidos. A menudo, la cubierta de la semillas también se arrastra a la superficie. La obstrucción del crecimiento de las plántulas (por ejemplo, mediante la formación de costras superficiales en el suelo) mantiene el gancho

cerrado y promueve la expansión lateral del tallo para fortalecer el brote emergente. El hipocótilo es la primera parte que emerge del suelo, seguida de los cotiledones. Mientras que la plántula está debajo de la superficie del suelo, permanece pálida o casi blanca y los cotiledones no se expanden (Walker et al., 2011). El sustrato con suelo negro andino (S3), debido a su alto contenido de materia orgánica, tiende a generar endurecimiento de la superficie, en condiciones de alta temperatura y baja humedad como es el caso de las condiciones experimentales bajo invernadero del presente estudio, retardando la emergencia de las plántulas.

3.2.2 Desarrollo vegetativo

La Tabla 6 muestra el análisis de varianza de tres vías con los tres factores evaluados sobre el desarrollo vegetativo de las plantas. Se observa un efecto significativo del factor “sustrato” (S) en todos los tiempos de evaluación. El factor “aislado” también muestra un efecto significativo a los 15 y 45 días de evaluación. También se observa que aquellas interacciones de los sustratos que incluyen suelo negro de páramo son significativas.

Tabla 6

Análisis de Varianza para Desarrollo vegetativo a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (dds)

Fuente de Variación	DV15dds	DV130dds	DV45dds
Repeticiones	0.066	0.648	0.942
Tratamientos	< .001**	< .001**	< .001**
Aislado (A)	0.022*	0.533	< .001**
Inoculación (I)	0.153	0.325	0.979
Sustrato (S)	< .001**	< .001**	< .001**
A * I	0.354	0.001**	< .001**
A * S	0.018*	0.387	< .001**
I * S	0.216	0.924	0.039*
A * I * S	0.082	0.073	< .001**

Nota. Se muestra el valor p para cada tiempo de evaluación de desarrollo vegetativo.

** significativo al 1%. * significativo al 5%.

DV15dds: Desarrollo vegetativo a los 15 días después de la siembra.

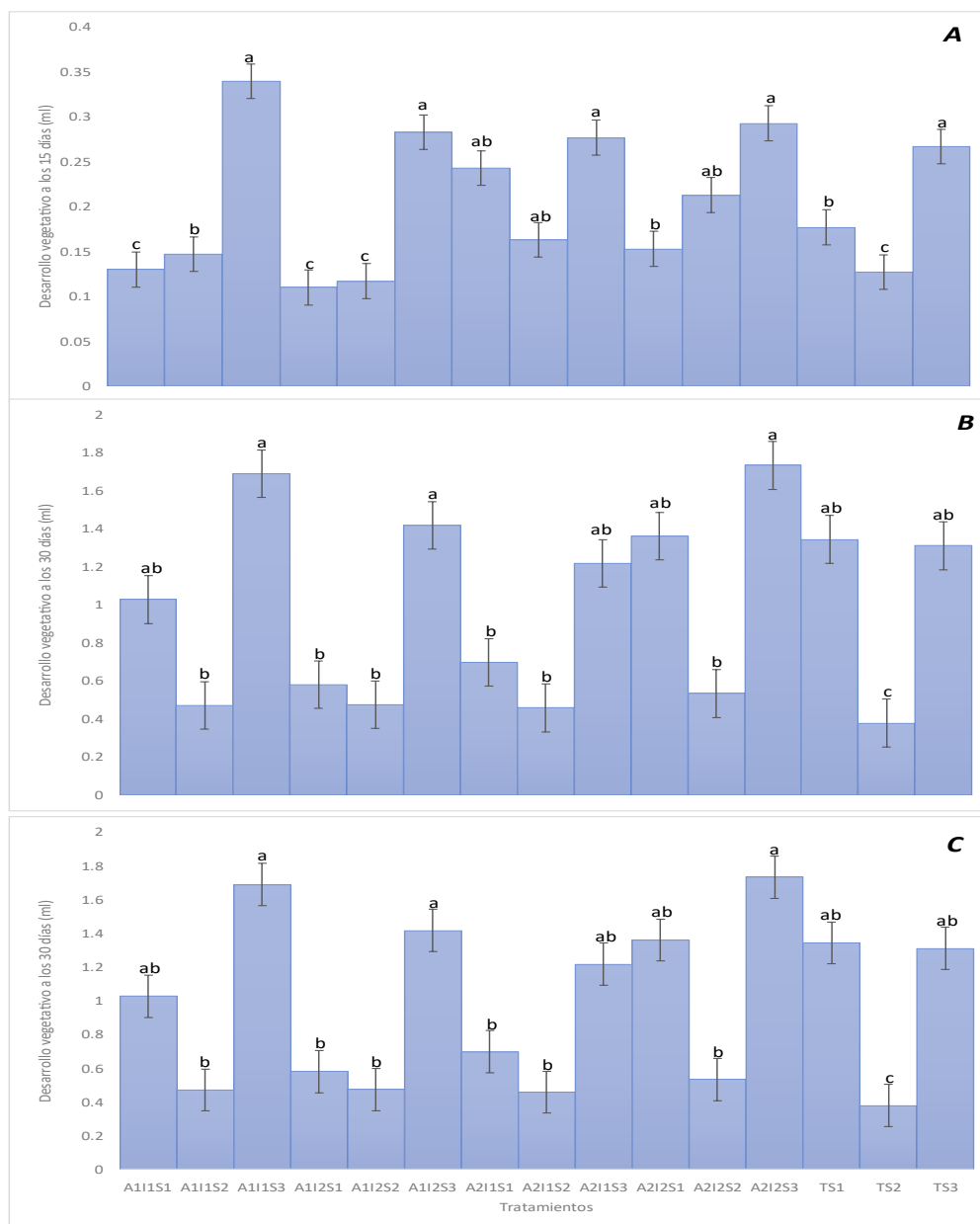
DV30dds: Desarrollo vegetativo a los 30 días después de la siembra.

DV45dds: Desarrollo vegetativo a los 45 días después de la siembra.

Al comparar el crecimiento de las plantas a los 15 días después de la siembra entre los diferentes tratamientos, se observa que las plantas de aquellos tratamientos que incluyen el sustrato suelo negro de páramo (S3) son significativamente más grandes (Tukey al 5%) Figura 12A. En general, los tratamientos con sustratos arena y suelo franco arcilloso resultaron en un desarrollo vegetativo estadísticamente menor.

Figura 12

Desarrollo vegetativo de lupino después de la siembra



Nota. Las barras muestran las medias de 12 repeticiones por tratamiento \pm SE (Error estandar).

Para el factor Aislado, el Aislado proveniente de Cotopaxi (A2), promovió un desarrollo vegetativo significativamente superior. Se conoce que cepas de rizobios aisladas de zonas áridas, al ser inoculadas en semillas de diferente variedad de la que fueron aisladas puede provocar en las plántulas una mejor reacción vegetativa y en general contribuye a mejorar su capacidad para responder a los factores estresantes ambientales considerando el desarrollo temprano de la planta (Herron et al., 2020).

A los 30 días de evaluación, las plantas de los tratamientos que incluyen suelo franco arcilloso mostraron un menor desarrollo (Figura 12B). De hecho, el testigo con este tipo de suelo demostró la menor altura de planta registrada hasta esta etapa de evaluación. La limitaciones del desarrollo inicial se vieron reflejadas hasta esta etapa, siendo consistentes con las condiciones de retención de humedad del sustrato. Al comparar los tratamientos testigo, se dedujo que el tipo de sustrato que menos favoreció el desarrollo de la planta es el suelo franco arcilloso. La tendencia a la compactación de la arcilla sumada a la preferencia de las plantas de chocho a un suelo mas bien franco arenoso, deterrminó este tipo de respuesta (Falconí, 2012).

Se conoce que la elongación del tallo principal de las plantas de lupino está controlada en gran medida por la temperatura acumulada (tiempo térmico). Los entrenudos se alargan de 0,1 a 0,2 mm por grado-día, dependiendo de su ubicación en el tallo. Todos los entrenudos del tallo comienzan y terminan su crecimiento en secuencia, desde la base del tallo hasta la parte superior de la planta (ápice). El sustrato suelo negro andino (S3) demostró tener una gran capacidad de retención de humedad, lo que incrementa la masa térmica y por tanto, la temperatura del sustrato que influencia directamente el desarrollo temprano de la planta (Wolko et al., 2011). Aunque el lupino o chocho se adapta a suelos pobres, la menor disponibilidad de agua en el sustrato arenoso puede ser la razón para el menor desarrollo inicial de la planta. A pesar de que el chocho es una especie que tolera la escasez de agua, es importante que exista humedad a la siembra para una buena germinación y emergencia de plántulas (Peralta et al., 2012). Estas respuestas se tratan de explicar considerando que los suelos son un componente clave del ciclo del carbono y los suelos negros andinos

representan el mayor sumidero de carbono orgánico. Los factores ambientales y biológicos son determinantes en el control de la dinámica de carbono en el suelo, antes que la estructura molecular del suelo o sus parámetros físicos. Este cambio en el paradigma enfatiza la necesidad de entender cómo las condiciones ambientales y los microorganismos interactúan para modificar la dinámica de Carbono, Nitrógeno y Fósforo en el suelo. Los microorganismos tienen un rol importante en los procesos biogeoquímicos en general y de los nutrientes en particular. Los hongos y bacterias del suelo representan una increíble diversidad de capacidades bioquímicas para desdoblar los compuestos orgánicos, lo que los transforma en componentes clave en el funcionamiento del agroecosistema. Microorganismos heterotróficos de vida libre así como mutualistas (micorrizas, bacterias fijadoras de N) guían la dinámica del carbono, la minería de nutrientes a partir de los minerales del suelo, transformación y mineralización de nutrientes (Camenzind et al., 2018).

Al analizar el desarrollo de las plantas a los 45 días después de la siembra, se observa una clara tendencia de las interacciones y testigo con Suelo negro andino a facilitar un mejor desarrollo vegetativo (Figura 12 C). El mayor aporte y retención de humedad de la materia orgánica en el suelo andino da mejores condiciones para el crecimiento de la planta así como para el mejor funcionamiento de los simbiontes nitrificantes. El desarrollo de la planta observado para los tratamientos con suelo negro andino durante las anteriores observaciones, resultaron en plantas más robustas al final del experimento. Hasta este estadio de desarrollo de planta, el factor sustrato el que mostró el efecto más evidente sobre el desarrollo de las plantas, de los tres sustratos evaluados, el sustrato suelo negro andino favoreció el desarrollo de la planta.

La difusión de los rizobios depende de los niveles de humedad del medio de crecimiento o sustrato. Los medios líquidos homogéneos y los porosos difieren en aspectos clave. En los medios líquidos homogéneos, la difusión de sustancias atrayentes o repelentes es rápida; sin embargo, los medios porosos tienen canales tortuosos que, según su diámetro y el contenido de humedad del medio, pueden contener agua o aire, con lo cual la difusión tanto de bacterias como de sustancias atrayentes o repelentes ocurre a una tasa mucho

menor (Fernández-Pascual et al., 2007). El suelo negro andino retiene mayores proporciones de agua capilar que determinan tanto la velocidad como el alcance de difusión del inóculo, además de proveer de agua suficiente para el desarrollo de la planta. La deficiencia de humedad del suelo tiene un efecto pronunciado en la fijación de N_2 porque la iniciación, el crecimiento y la actividad de los nódulos son más sensibles al estrés hídrico que el metabolismo general de las raíces y los brotes. La respuesta de la nodulación y la fijación de N_2 al estrés hídrico depende de la etapa de crecimiento de las plantas. Se encontró que el estrés hídrico impuesto durante el crecimiento vegetativo fue más perjudicial para la nodulación y la fijación de nitrógeno que el impuesto durante la etapa de reproducción. Hubo pocas posibilidades de recuperación del estrés hídrico en la etapa reproductiva. Las concentraciones de P del nódulo y la eficiencia del uso de P disminuyeron linealmente con el contenido de agua del suelo y la raíz durante el período de cosecha de la simbiosis leguminosa-*Bradyrhizobium*. Más recientemente, se ha reportado que el N derivado de la fijación de N_2 se redujo en aproximadamente un 26% como resultado de la deficiencia de agua (Fernández-Pascual et al., 2007).

Respecto a los dos aislamientos evaluados, el aislado proveniente de Cotopaxi, en interacción con el método de inoculación por encapsulamiento (A2I2), resultó en un desarrollo vegetativo estadísticamente superior, mientras que la combinación factorial Aislado de Cotopaxi e inoculación por inmersión (A2I1), presentó plantas de menor desarrollo hasta los 30 días de evaluación. Aparentemente las metodologías de inoculación determinaron el comportamiento del desarrollo de las plántulas. La inoculación por encapsulamiento provee de una mejor distribución de bacteroides en la zona radicular, y su migración activa en los capilares del sustrato. Una nodulación más efectiva determina la provisión de nitrógeno a la planta para su temprano desarrollo. La capacidad de las bacterias de colonizar tejidos internos de las plantas puede ser más probable al tener una distribución inicial en los capilares del suelo, en donde pueden migrar activamente por movimientos flagelados, en tanto que la migración de los bacteroides desde la superficie de la semilla hacia la rizósfera requiere más tiempo y se reduce la probabilidad de infección. Este efecto del método de inoculación se ha

reportado en varios estudios que utilizaron un aislamiento de colección, un aislamiento comercial y testigo sin inocular, obteniendo como resultado un efecto diferenciado por parte de los aislamientos, en la altura de planta hasta la etapa de floración (Huasasquiche, 2018). Esto indicaría que aun cuando las semillas se inoculen y se siembren enseguida, el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta que las semillas germinan permitiría que ocurra la adhesión irreversible. Sin embargo, el porcentaje de rizobios que llegan a adherirse de esta manera puede ser bajo. Se ha estimado que solo del 10 al 15 % de las células de un cultivo de *Rhizobium* son capaces de adherirse a las raíces, y de ellas, menos de una cuarta parte llegan a manifestar la adhesión irreversible. La mayor superficie de adherencia y la mejor distribución del inóculo en el proceso de encapsulamiento define el comportamiento observado, siendo más alto el potencial de nodulación y provisión temprana de nutrientes a la planta en desarrollo (Lodeiro, 2015).

Por otra parte, los rizobios provenientes de zonas áridas se muestran una mejor capacidad para infectar las raíces de las plántulas e iniciar la provisión de nitrógeno. La aparición de poblaciones rizobiales en suelos áridos y la nodulación efectiva de las leguminosas que crecen en ellos enfatizan el hecho de que los rizobios pueden existir en suelos con niveles de humedad limitantes; sin embargo, las densidades de población tienden a ser más bajas en las condiciones más desecadas y a aumentar a medida que se alivia el estrés por humedad. Es bien sabido que algunos rizobios de vida libre (saprófitos) son capaces de sobrevivir bajo estrés por sequía o bajo potencial de agua. Las cepas de rhizobia aislada del suelo del desierto pueden sobrevivir en el suelo del desierto durante 1 mes, mientras que una cepa comercial no puede sobrevivir en estas condiciones. Por ejemplo, la supervivencia de cepas de *Bradyrhizobium* en un suelo franco arenoso es muy pobre, cuando el contenido de humedad fue de aproximadamente 2.0 a 15.5%. La supervivencia y la actividad de los microorganismos pueden depender de su distribución entre los microhábitats y de los cambios en la humedad del suelo (Zahran, 1999).

El origen del aislado (A), también determinó un crecimiento de planta estadísticamente diferente. El aislado proveniente de Tungurahua (A1) favoreció el desarrollo vegetativo de las

plántulas de chocho hasta los 45 días, mientras que el proveniente de Cotopaxi (A2) presentó plantas con menor desarrollo. Se ha reportado una gran variabilidad en la capacidad de infección, proporción de fijación de N atmosférico y resistencia a condiciones particulares de suelo, en las cepas de *Rhizobium* de regiones contiguas, aún en diferentes secciones del mismo campo. En los rizobios, también se han propuesto su amplia distribución geográfica y los diferentes hospedadores y nichos vegetales que ocupan como casos de su diversificación. En la actualidad, se reconoce que los rizobios son acuáticos y endófitos además de ser bacterias del suelo. Parece que algunos ocupantes de nódulos pueden verse favorecidos por las condiciones ambientales o incluso por la profundidad de las raíces. La domesticación humana de las leguminosas puede haber seleccionado linajes rizobiales particulares que eran adecuados para su nodulación en condiciones locales de suelo (Sessitsch et al., 2002). Las cepas recuperadas en Cotopaxi provienen de zonas áridas, con regímenes de precipitación menores a los observados en el sitio de recolección de Tungurahua.

La utilización del sustrato con Suelo negro andino en la variable desarrollo vegetativo a los 45 días resultó en plantas de una altura significativamente mayor. La presencia de arcilla en el sustrato Suelo franco arcilloso limitó el desarrollo de la planta, con el menor crecimiento registrado. Los organismos del suelo (biota), incluyendo los microorganismos, usan los residuos de las plantas y los animales y los derivados de la materia orgánica como alimentos. A medida que descomponen los residuos y la materia orgánica, los nutrientes en exceso (nitrógeno, fósforo y azufre) son liberados dentro del suelo en formas que pueden ser usadas por las plantas. Los productos de deshecho producidos por los microorganismos contribuyen a la formación de la materia orgánica del suelo negro andino. Los materiales de desecho son más difíciles de descomponer que el material original de las plantas y los animales, pero pueden ser usados por un gran número de organismos. Mediante la descomposición de los residuos y el almacenamiento del carbono dentro de su propia biomasa o mediante la reconstrucción de nuevas estructuras de carbono, la biota del suelo tiene una función muy importante en los procesos de reciclaje de nutrientes y, por lo tanto, en la capacidad de un

suelo para proveer al cultivo con suficientes nutrientes para un buen desarrollo vegetativo y eventualmente la producción (Swanepoel et al., 2011) .

Probablemente los sustratos con menor contenido de materia orgánica como son la arena (S1) y el suelo franco arcilloso (S2), presentaron una menor retención de humedad, bajo las condiciones de invernadero en las que se llevó a cabo este experimento. Esto explicaría el menor desarrollo de la planta, considerando que la fijación simbiótica de N_2 de las leguminosas también es altamente sensible a la deficiencia de agua del suelo. Varias leguminosas templadas y tropicales exhiben una reducción en la fijación de nitrógeno cuando están sujetas a un déficit de humedad del suelo (Taco & Zuñiga, 2017).

La inoculación por inmersión del aislado de Tungurahua resultó en la mayor altura de planta. La mejor adaptabilidad de la cepa de *Rhizobium* es evidente y se ve potencializada por la mejor distribución y migración de los bacteroides, determinado por la inmersión de las semillas en la suspensión inoculante que tiene la potencialidad de formar una biopelícula. Por otro lado, si los rizobios deben moverse mediante sus flagelos, necesariamente van a encontrarse en estado planctónico, el cual es mucho más susceptible de ser afectado por predadores y sustancias antibacterianas que el estado de biopelícula. Eso reduciría el tamaño de la población móvil. Así, no hay certeza de que la población de rizobios inoculados podrá duplicarse antes de iniciar la infección de las raíces. Es necesario establecer la adhesión reversible y la supervivencia de los rizobios sobre las semillas, la liberación de los rizobios luego de la siembra y la dispersión, supervivencia y multiplicación de los rizobios en el suelo (Lodeiro, 2015). Se evidencia de esta manera que *Rhizobium sp* es robusta y adaptable en muchas condiciones del suelo, aunque en condiciones de alto carbono orgánico de suelo las cepas autóctonas pueden formar nódulos, pero aún pueden ser ineficaces para suministrar N a la planta. La materia orgánica del suelo es el contribuyente más importante a la salud del suelo, y los rizobios se consideran uno de los indicadores biológicos más importantes de un suelo sano. Sin embargo, la salud del suelo no puede estimarse únicamente mediante recuentos rizobiales, sino que otros indicadores deben evaluarse junto con estos indicadores rizobiales (Swanepoel et al., 2011).

Las interacciones con sustrato suelo negro andino (S3), mostraron promedios estadísticamente superiores para desarrollo vegetativo. Cuando se lo asocia con la cepa colectada en Tungurahua (A1), el crecimiento de la planta es significativamente superior. La cepa A1 proveniente de Tungurahua ha mostrado consistentemente un mejor respuesta en la evaluación de desarrollo vegetativo. El sustrato suelo negro andino, al presentar una mayor capilaridad por su alto contenido de materia orgánica, dio un adecuado ambiente microscópico y láminas de agua para que los bacteroides infecten eficientemente las raíces de las plantas en estudio. Esta tendencia se corrobora, al observar con el segundo más alto valor para la interacción aislado de Cotopaxi con sustrato suelo negro andino (A2S3). El sustrato menos adecuado para el desarrollo vegetativo es el suelo franco arcilloso. Este tipo de suelo presenta la menor disponibilidad de agua, debido a su alto contenido de arcilla. Este mineral no permite la disponibilidad de agua en condiciones, provocando condiciones de stress hídrico, al que son susceptibles los procesos de fijación de N y sobrevivencia de los bacteroides en general. Varias condiciones ambientales son factores limitantes para el crecimiento y la actividad de las plantas fijadoras de N₂ (Díaz-Franco & Mayek-Pérez, 2008).

Un principio de factores limitantes establece que "el nivel de producción de cultivos no puede ser superior al permitido por el factor limitante máximo". En la simbiosis Rhizobium-leguminosa, que es un sistema fijador de N₂, el proceso de fijación de N₂ está fuertemente relacionado con el estado fisiológico de la planta huésped. Por lo tanto, no se espera que una cepa rizobial competitiva y persistente exprese su plena capacidad de fijación de nitrógeno si los factores limitantes (por ejemplo, salinidad, pH desfavorable del suelo, deficiencia de nutrientes, toxicidad mineral, temperaturas extremas, humedad insuficiente o excesiva del suelo, fotosíntesis inadecuada, enfermedades de las plantas y pastoreo) imponen limitaciones al vigor de la leguminosa huésped (Zahran, 1999).

La interacción método de inoculación por sustrato (I*S), muestra que ambos métodos de inoculación responden en forma significativamente similar. La presencia de humedad suficiente en los capilares del sustrato determinó que los bacteroides puedan migrar e infectar las raicillas de las plántulas de chocho. El método de inoculación por encapsulamiento provee

una mejor distribución espacial de los bacteroides, promoviendo una interacción rhizobium lupino más efectiva. Se ha observado un significativo incremento en la tasa de sobrevivencia en comparación con células no encapsuladas, después de tres meses (Zahran, 1999). La adición de arcilla y leche descremada a las esferas aumenta significativamente la sobrevivencia bacteriana en comparación con esferas de alginato solamente. Estos estudios proporcionan clara evidencia de que las esferas de alginato son eficientes portadores para la inoculación de plantas, proporcionando un ambiente protector en el suelo (Felipe, 2009).

3.2.3 Número de nódulos por planta

La aplicación de tratamientos en la variable número de nódulos por planta, muestra significación al 5% para el factor sustrato en el número de nódulos por planta. Las restantes fuentes de variación no presentan un efecto significativo sobre la respuesta de la variable en estudio (Tabla 7).

Tabla 7

Análisis de Varianza para número de nódulos por planta (NNP) a los 45 días después de la siembra (dds)

Fuente de Variación	NNP
Repeticiones	< .001
Tratamientos	0.108
Aislado (A)	0.734
Inoculación (I)	0.158
Sustrato (S)	0.015 *
A * I	0.630
A * S	0.152
I * S	0.275
A * I * S	0.181

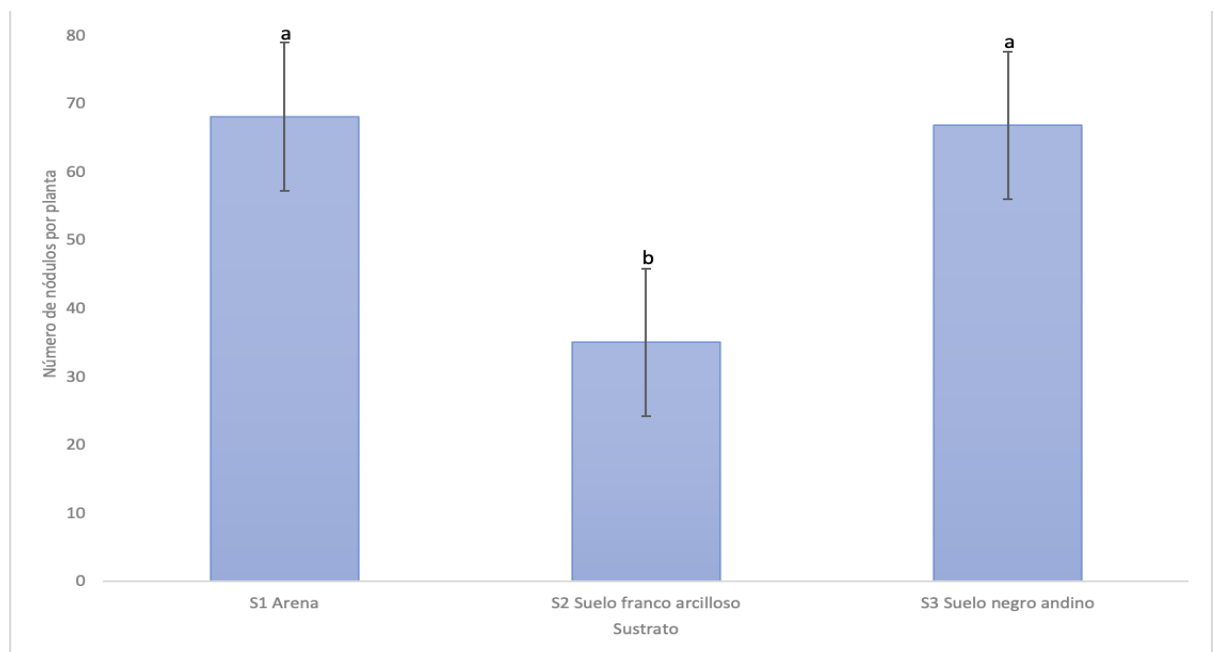
Nota. La tabla muestra el valor p para cada uno de los tiempos de evaluación del desarrollo vegetativo. Valores con ** muestran valor significativo al 1% y con * valor significativo al 5%.

NNP: número de nódulos por planta

Los sustratos arena (S1) y suelo negro andino (S2), permitieron un número de nódulos estadísticamente mayor (Figura 13). Una vez que los bacteroides se liberan de las cápsula de alginato o de la película creada por la inmersión, se mueven a infectar las raíces, donde se multiplican en las células del nódulo huésped en crecimiento a una cierta densidad celular, se adaptan al estilo de vida endosimbótico y a las condiciones microaeróbicas y maduran en bacteroides fijadores de nitrógeno. La forma y la fisiología de los bacteroides pueden ser, sin embargo, sorprendentemente diferentes en las diversas legumbres. Algunos tipos de bacteroides pueden volver a la forma de vida libre. En otras asociaciones, los bacteroides se transforman irreversiblemente en endosimbiontes poliploides, agrandados y no cultivables. Estos bacteroides diferenciados terminalmente pueden ser alargados e incluso ramificados y de 5 a 10 veces más largos que las células de vida libre o pueden ser esféricos de 8 a 20 veces el genoma amplificado dependiendo del huésped (Sessitsch et al., 2002).

Figura 13

Prueba de Túkey al 5% para sustrato en la variable número de nódulos por planta



La diferenciación terminal de los bacteroides está controlada por el huésped, evolucionada en múltiples ramas de la familia Leguminosae, lo que indica una ventaja del

huésped y un probable mayor rendimiento simbiótico. El mayor número de nódulos en el sustrato arena puede ser explicado por la respuesta de las plantas al nitrato del suelo tanto local como sistémico. Los transportadores de nitratos tienen un papel importante en la detección de nitratos y la señalización de la demanda de nitrógeno en leguminosas afecta la regulación dependiente de nitratos del crecimiento primario de la raíz a través de la señalización de ácido abscísico, lo que sugiere su papel como un nitratosensor (Chaulagain & Frugoli, 2021).

Conclusiones

Luego de realizados los procesos de purificación, aislamiento y extracción del material genético de *Rhizobium* recolectados, se realizó la electroforesis horizontal de los productos de PCR convencional de las muestras. A partir de una extracción satisfactoria de ADN se amplificó el barcode 16S de la muestra MBOMB00 y se logró identificar molecularmente una especie del género *Rhizobium*, asociada al cultivo de chocho, *Lupinus mutabilis*.

El desarrollo vegetativo estuvo influenciado principalmente por el sustrato utilizado para la germinación de semillas inoculadas. Las características hidrológicas del sustrato suelo negro andino permitieron la migración de los bacteroides hacia las raíces aprovechando el agua capilar retenida en el sustrato.

El sustrato suelo franco arcilloso determinó el menor desarrollo vegetativo de la planta, ya que fue más susceptible a la deshidratación en las condiciones de invernadero en las que se llevó a cabo la investigación.

El origen de la cepa también influyó en el desarrollo vegetativo, aunque no fue evidente en la nodulación. La cepa originada en Tungurahua produjo plantas más vigorosas, especialmente en interacción con el sustrato suelo negro andino.

La nodulación también fue influenciada por el sustrato utilizado, así, el mayor número nódulos se registró para el suelo negro andino.

Recomendaciones

Utilizar las técnicas PCR para la identificación y caracterización de cepas locales de Rhizobium de varias especies de leguminosas cultivadas en la región andina central del Ecuador.

Establecer protocolos para conservación de cepas de Rhizobium locales, con el fin de establecer programas de biofertilización en cultivos de alto valor de mercado.

Establecer la influencia de la inoculación de chocho con cepas de Rhizobium en las expresiones fenológicas del cultivo de chocho, llegando a determinar la productividad y los niveles de fertilización nitrogenada residual del cultivo.

Referencias

- Atchison, G., Nevado, B., Eastwood, R., Contreras-Ortiz, N., Reynel, C., Madriñán, S., Filatov, D., & Hughes, C. (2016). Lost crops of the Incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop tarwi, *Lupinus mutabilis*. *American journal of botany*, 103. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600171>
- Beligala, D. (2015). *IDENTIFICATION OF RHIZOBIAL SYMBIONTS ASSOCIATED WITH LUPINUS SPP.* [Master, Bowling Green State University]. https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=bgsu1435855654&disposition=inline
- Cabrera Romero, Y., Santana Baños, Y., & Iranda Izquierdo, E. (2017). Efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* (frijol) en condiciones semicontroladas. *Avances*, 19(1), 66–74. <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/226>
- Caicedo, C., Peralta, E., Murillo, A., Rivera, M., & Pinzón, J. (2010). *Iniap 450 Andino. Variedad de chocho para la sierra ecuatoriana*. INIAP Santa Catalina. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2584/1/iniapscpd169.pdf>
- Camenzind, T., Hättenschwiler, S., Treseder, K., Lehmann, A., & Rillig, M. (2018). Nutrient limitation of soil microbial processes in tropical forests. *Ecological Monographs*, 88(1), 4–21. <https://www.jstor.org/stable/26598519>
- Carvajal-Larenas, F. E. (2013). *Managing technological aspects of Lupinus mutabilis from a food sovereignty perspective in Ecuador* [Wageningen University]. https://www.researchgate.net/publication/283418498_Managing_technological_aspects_of_Lupinus_mutabilis_from_a_food_sovereignty_perspective_in_Ecuador
- Chaulagain, D., & Frugoli, J. (2021). The Regulation of Nodule Number in Legumes Is a Balance of Three Signal Transduction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1117. <https://doi.org/10.3390/ijms22031117>

- Clements, J., White, P., & Buirchell, B. (1993). The root morphology of *Lupinus angustifolius* in relation to other *Lupinus* species. *Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES*, 44. <https://doi.org/10.1071/AR9931367>
- Cowling, W., Buirchell, B., & Tapia, M. (1998). *Lupin. Lupinus spp. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 23.
- Díaz-Franco, A., & Mayek-Pérez, N. (2008). *LA BIOFERTILIZACIÓN COMOTECNOLOGÍA SOSTENIBLE* (1era ed.). Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
- Durán Wendt, D., Rey, L., Sanchez-Cañizares, C., Navarro, A., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. (2013). Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic and applied microbiology*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.008>
- Eastwood, R., & Hughes, C. (2008). Origins of Domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes. *International Lupin Association*, 0–86476. https://www.researchgate.net/publication/228644166_Origins_of_Domestication_of_Lupinus_mutabilis_in_the_Andes
- Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance* [Ph.D. Thesis, Wageningen University]. <https://edepot.wur.nl/210228>
- Falconí, C. (s.f.). *Protocolo 882 PSL-Rhizobium de aislamiento y determinacion de nodulos de fijacion nitrogenada*. PlantSphere Laboratories.
- Felipe, M. (2009). *Bioteecnologías limpias en agricultura: Fijación Biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis Rhizobium-Leguminosa*. Real Academia Nacional de Farmacia (España). <https://digital.csic.es/bitstream/10261/16457/1/de%20Felipe%202007.pdf>
- Ferchichi, N., Toukabri, W., Vrhovsek, U., Angeli, A., Masuero, D., Mhamdi, R., & Trabelsi, D. (2020). Inoculation of *Lupinus albus* with the nodule-endophyte *Paenibacillus glycanilyticus* LJ121 improves grain nutritional quality. *Archives of Microbiology*, 202. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01745-6>

- Fernández-Pascual, M., Pueyo, M. J., & Lucas, M. (2007). Singular Features of the Bradyrhizobium-Lupinus Symbiosis. *Dyn Soil Dyn Plant*, 1.
<https://digital.csic.es/bitstream/10261/12646/1/Fern%C3%A1ndez-Pascual%20DSDP%202007.pdf>
- Girija, P., Panchami, P., Praveena, J., Saeed, T., & Sneha, S. (2020). Isolation and characterization of native cowpea rhizobia from Wayanad India. *Legume Research*, 43(1), 126–133. <https://doi.org/10.18805/LR-3951>
- GitHub. (2020). *Introduction to Programming with R and RStudio* [Científica]. Data Harvesting for Agriculture. <https://carpentries-incubator.github.io/data-harvesting-for-agriculture/02-R-RStudio/index.html>
- Herron, S. A., Rubin, M. J., Ciotir, C., Crews, T. E., Van Tassel, D. L., & Miller, A. J. (2020). Comparative Analysis of Early Life Stage Traits in Annual and Perennial Phaseolus Crops and Their Wild Relatives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 34.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00034>
- Huwasquiche, L. (2018). *Aislamiento y Caracterización de la Microflora Asociada al Cultivo de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)* [Biólogo, UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3191/P34-H83-T.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Jacobsen, S., Jacobsen, S.-E., & Mujica, A. (2006). El Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 28, 458–482.
<https://beisa.au.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>
- Laguna, E., Fos, S., & Navarro, A. (2009). *Lupinus mariae-josephae H. Pascual* (pp. 52–53).
- Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con Bradyrhizobium spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 261–273.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006>
- Martínez, M., Castañeda, H., Moreno, J., Ruiz, M., & Alvarez, C. (2005). Aislamiento e identificación de Rhizobium en Lupinus silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *scientia-CUCBA*, 7(2), 175–181.

- Mercado, G., & Davalos, J. (2018, noviembre). *Memoria foro virtual: Los caminos del tarwi y la integración andina: Bolivia, Perú y Ecuador*.
https://www.researchgate.net/publication/329842526_Los_caminos_del_tarwi_y_la_integracion_andina_Bolivia_Peru_y_Ecuador
- Montgomery, D. (2013). *Design and analysis of experiments* (8a ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Mora, F. (1995). Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 6. <https://doi.org/10.15517/am.v6i0.24808>
- Nigussie, Z. (2012). Contribution of White Lupin (*Lupinus albus* L.) for Food Security in North-Western Ethiopia: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11, 200–205.
<https://doi.org/10.3923/ajps.2012.200.205>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M., Flores-Félix, J. D., Vega, P., Rivas, R., Mateos, P., Igual, J., Martínez-Molina, E., Trujillo, M., & Velazquez, E. (2015). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. Nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.000082>
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., & Monar, C. (2012). *Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción*. (3ra ed.). Estación Experimental Santa Catalina. INIAP.
https://balcon.mag.gob.ec/mag01/magapaldia/Quinoa/pdf%20publicaciones/27-MANUAL_AGRICOLA_GRANOS_ANDINOS_2012.pdf
- Rademaker, J., Aarts, H. J. M., & Vinuesa, P. (2006). Molecular typing of environmental isolates. En *Molecular microbial ecology* (pp. 97–134).
https://www.researchgate.net/publication/40117199_Molecular_typing_of_environmental_isolates

- Ruben, A., Linda, Y., Valencia, R., & Geomez, A. (2013). Caracterización molecular de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* J-01, J-96 y J-98, mediante protocolos rep-PCR. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13, 196.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num2_art:255
- Sessitsch, A., Howieson, J., Perret, X., Antoun, H., & Martínez-Romero, E. (2002). Advances in Rhizobium research. *Crit Rev Plant Sci. Critical Reviews in Plant Sciences - CRIT REV PLANT SCI*, 21, 323–378. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044278>
- Smithsonian Institution's National Museum of Natural History. (2014). *Encyclopedia of Life* [Global access to knowledge about life on Earth.]. Tarwi.
<https://eol.org/pages/703671>
- Swanepoel, P., Botha, P., Truter, W., & Surridge, A. (2011). The effect of soil carbon on symbiotic nitrogen fixation and symbiotic Rhizobium populations in soil with *Trifolium repens* as host plant. *African Journal of Range & Forage Science*, 28, 121–127.
<https://doi.org/10.2989/10220119.2011.642096>
- Taco, N., & Zuñiga, D. (2017). Efecto de la inoculación de plantas de Tarwi con cepas de *Bradyrhizobium* spp. Aisladas de un lupino silvestre, en condiciones de invernadero. *Revista Peruana de Biología*, 7(1). <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17577>
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24, 1596–1599.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tapia, M. (2015). *El tarwi, lupino andino*. Fondo Italo Peruano. <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>
- Walker, J., Hertel, K., Parker, P., & Edwards, J. (2011). *LUPIN Growth & Development*. NSW Department of Industry and Investment.
https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/516183/Procrop-lupin-growth-and-development.pdf

Wolko, B., Clements, J., Naganowska, B., Nelson, M., & Yang, H. (2011). Lupinus. En *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages* (pp. 153–206). https://doi.org/10.1007/978-3-642-14387-8_9

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 63(4), 968–989. PubMed. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999>

Apéndice

Apéndice 1. Datos de Campo para Días a la Emergencia

Repeticiones	Tratamiento	Dias a la Emergencia
1	A1I1S1	10
1	A1I1S2	13
1	A1I1S3	8
1	A1I2S1	12
1	A1I2S2	13
1	A1I2S3	8
1	A2I1S1	13
1	A2I1S2	12
1	A2I1S3	9
1	A2I2S1	11
1	A2I2S2	13
1	A2I2S3	13
1	T0S1	11
1	T0S2	12
1	T0S3	9
2	A1I1S1	11
2	A1I1S2	13
2	A1I1S3	9
2	A1I2S1	14
2	A1I2S2	11
2	A1I2S3	10
2	A2I1S1	12
2	A2I1S2	14
2	A2I1S3	13
2	A2I2S1	10
2	A2I2S2	14
2	A2I2S3	9
2	T0S1	12
2	T0S2	14
2	T0S3	8
3	A1I1S1	14
3	A1I1S2	12
3	A1I1S3	9
3	A1I2S1	12
3	A1I2S2	12
3	A1I2S3	14
3	A2I1S1	12
3	A2I1S2	13
3	A2I1S3	9
3	A2I2S1	12
3	A2I2S2	12
3	A2I2S3	9
3	T0S1	11
3	T0S2	15
3	T0S3	8

Apéndice 2. Datos de Campo para Altura de Planta (cm)

Repeticiones	Tratamiento	Altura planta 15	Altura planta 30	Altura planta 45
1	A1I1S1	5.41	17.28	27.74
1	A1I1S2	4.44	15.03	18.99
1	A1I1S3	9.68	29.61	40.82
1	A1I2S1	4.33	13.80	15.31
1	A1I2S2	4.50	13.43	17.68
1	A1I2S3	8.60	22.02	39.99
1	A2I1S1	5.17	14.76	17.04
1	A2I1S2	4.60	12.50	20.84
1	A2I1S3	8.11	21.09	24.44
1	A2I2S1	5.00	20.17	29.80
1	A2I2S2	5.30	13.34	16.38
1	A2I2S3	8.06	21.23	27.59
1	T0S1	6.79	12.99	20.91
1	T0S2	3.63	11.55	15.00
1	T0S3	8.00	18.28	30.91
2	A1I1S1	5.28	17.00	27.30
2	A1I1S2	4.08	13.23	17.03
2	A1I1S3	10.00	23.93	35.08
2	A1I2S1	5.00	12.81	14.31
2	A1I2S2	4.25	10.49	14.69
2	A1I2S3	9.20	19.54	34.09
2	A2I1S1	6.45	16.05	19.05
2	A2I1S2	4.64	11.11	19.21
2	A2I1S3	7.33	20.50	22.60
2	A2I2S1	5.56	15.76	20.36
2	A2I2S2	4.33	10.63	13.63
2	A2I2S3	8.25	21.18	27.48
2	T0S1	6.61	18.00	30.00
2	T0S2	3.47	11.02	14.22
2	T0S3	7.88	19.13	32.13
3	A1I1S1	6.13	18.76	28.96
3	A1I1S2	4.94	12.16	16.26
3	A1I1S3	9.74	23.76	34.56
3	A1I2S1	5.34	12.78	16.08
3	A1I2S2	5.51	10.72	17.19
3	A1I2S3	7.79	16.15	35.04
3	A2I1S1	5.97	13.16	19.05
3	A2I1S2	5.27	10.22	22.03
3	A2I1S3	8.13	18.87	21.52
3	A2I2S1	6.80	17.80	24.08
3	A2I2S2	5.35	13.41	16.01
3	A2I2S3	9.26	16.67	25.53
3	T0S1	6.38	17.76	23.46
3	T0S2	5.76	9.12	15.61
3	T0S3	7.44	21.24	30.52

Apéndice 3. Datos de Campo para Diámetro de tallo (cm)

Repeticiones	Tratamiento	Diámetro tallo 15	Diámetro tallo 30	Diámetro tallo 45
1	A111S1	0.27	0.38	0.53
1	A111S2	0.35	0.31	0.41
1	A111S3	0.38	0.51	0.69
1	A112S1	0.31	0.36	0.43
1	A112S2	0.28	0.44	0.39
1	A112S3	0.35	0.50	0.65
1	A211S1	0.35	0.41	0.41
1	A211S2	0.34	0.36	0.41
1	A211S3	0.35	0.40	0.49
1	A212S1	0.34	0.57	0.53
1	A212S2	0.34	0.41	0.41
1	A212S3	0.36	0.57	0.61
1	T0S1	0.29	0.51	0.51
1	T0S2	0.31	0.41	0.41
1	T0S3	0.35	0.51	0.59
2	A111S1	0.31	0.51	0.51
2	A111S2	0.34	0.39	0.41
2	A111S3	0.35	0.51	0.71
2	A112S1	0.28	0.48	0.41
2	A112S2	0.30	0.41	0.41
2	A112S3	0.31	0.61	0.61
2	A211S1	0.37	0.41	0.41
2	A211S2	0.35	0.41	0.41
2	A211S3	0.37	0.51	0.48
2	A212S1	0.30	0.59	0.54
2	A212S2	0.42	0.39	0.41
2	A212S3	0.34	0.59	0.61
2	T0S1	0.30	0.61	0.51
2	T0S2	0.32	0.31	0.41
2	T0S3	0.36	0.50	0.58
3	A111S1	0.32	0.51	0.54
3	A111S2	0.37	0.39	0.41
3	A111S3	0.36	0.48	0.68
3	A112S1	0.30	0.39	0.45
3	A112S2	0.33	0.31	0.38
3	A112S3	0.41	0.46	0.68
3	A211S1	0.46	0.46	0.41
3	A211S2	0.38	0.41	0.41
3	A211S3	0.38	0.53	0.48
3	A212S1	0.32	0.45	0.54
3	A212S2	0.44	0.41	0.41
3	A212S3	0.39	0.58	0.61
3	T0S1	0.36	0.55	0.51
3	T0S2	0.37	0.38	0.41
3	T0S3	0.37	0.51	0.58

Apéndice 4. Datos Calculados de Desarrollo Vegetativo (ml)

Repeticiones	Tratamiento	Desarrollo vegetativo 15 días	Desarrollo vegetativo 30 días	Desarrollo vegetativo 45 días
1	A1I1S1	0.10	0.64	2.04
1	A1I1S2	0.14	0.38	0.84
1	A1I1S3	0.37	2.02	5.11
1	A1I2S1	0.11	0.46	0.74
1	A1I2S2	0.09	0.69	0.70
1	A1I2S3	0.28	1.43	4.49
1	A2I1S1	0.17	0.65	0.76
1	A2I1S2	0.14	0.43	0.92
1	A2I1S3	0.26	0.87	1.55
1	A2I2S1	0.15	1.70	2.18
1	A2I2S2	0.16	0.58	0.71
1	A2I2S3	0.27	1.79	2.73
1	TOS1	0.15	0.89	1.43
1	TOS2	0.09	0.51	0.66
1	TOS3	0.26	1.24	2.85
2	A1I1S1	0.13	1.16	1.87
2	A1I1S2	0.12	0.54	0.76
2	A1I1S3	0.32	1.63	4.65
2	A1I2S1	0.10	0.76	0.63
2	A1I2S2	0.10	0.46	0.64
2	A1I2S3	0.23	1.92	3.36
2	A2I1S1	0.23	0.71	0.85
2	A2I1S2	0.15	0.49	0.85
2	A2I1S3	0.26	1.41	1.35
2	A2I2S1	0.13	1.45	1.56
2	A2I2S2	0.20	0.43	0.59
2	A2I2S3	0.25	1.96	2.72
2	TOS1	0.16	1.76	2.05
2	TOS2	0.09	0.28	0.63
2	TOS3	0.27	1.24	2.83
3	A1I1S1	0.16	1.28	2.24
3	A1I1S2	0.18	0.49	0.72
3	A1I1S3	0.33	1.42	4.17
3	A1I2S1	0.12	0.52	0.83
3	A1I2S2	0.16	0.27	0.63
3	A1I2S3	0.34	0.90	4.26
3	A2I1S1	0.33	0.73	0.85
3	A2I1S2	0.20	0.45	0.97
3	A2I1S3	0.31	1.37	1.29
3	A2I2S1	0.18	0.93	1.84
3	A2I2S2	0.28	0.59	0.70
3	A2I2S3	0.36	1.45	2.52
3	TOS1	0.22	1.38	1.61
3	TOS2	0.20	0.34	0.69
3	TOS3	0.27	1.45	2.68

Apéndice 5. Datos de campo para Número de Nódulos or planta

Repeticiones	Tratamiento	Número Nódulos
1	A1I1S1	70.00
1	A1I1S2	14.00
1	A1I1S3	64.50
1	A1I2S1	25.50
1	A1I2S2	19.50
1	A1I2S3	45.50
1	A2I1S1	52.00
1	A2I1S2	62.00
1	A2I1S3	43.50
1	A2I2S1	52.50
1	A2I2S2	17.50
1	A2I2S3	54.50
1	T0S1	69.50
1	T0S2	47.00
1	T0S3	44.50
2	A1I1S1	70.50
2	A1I1S2	15.50
2	A1I1S3	55.50
2	A1I2S1	55.00
2	A1I2S2	22.00
2	A1I2S3	50.50
2	A2I1S1	45.50
2	A2I1S2	53.50
2	A2I1S3	45.50
2	A2I2S1	30.00
2	A2I2S2	9.50
2	A2I2S3	46.50
2	T0S1	57.50
2	T0S2	39.00
2	T0S3	62.50
3	A1I1S1	134.00
3	A1I1S2	30.00
3	A1I1S3	83.00
3	A1I2S1	114.00
3	A1I2S2	27.00
3	A1I2S3	94.00
3	A2I1S1	106.00
3	A2I1S2	117.00
3	A2I1S3	84.00
3	A2I2S1	62.00
3	A2I2S2	33.00
3	A2I2S3	135.00
3	T0S1	129.00
3	T0S2	96.00
3	T0S3	121.00