



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD  
DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA CARRERA DE  
BIOTECNOLOGÍA**



---

Caracterización de *Rhizobium spp.* a partir de trébol violeta (*Trifolium pratense*) en  
cuatro localidades del cantón Ambato-Tungurahua

---

Informe final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** José Carlos Buestán Morales

**Tutor:** Dra. Helena De la Torre Olvera

**Ambato – Ecuador**

**Marzo 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dra. Helena De la Torre Olvera

### **CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 13 de Febrero de 2023

Dra. Helena De la Torre Olvera

CI 130965199-8

TUTORA

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, José Carlos Buestan Morales, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

José Carlos Buestan Morales

C.I. 185019189-9

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

---

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 180357158-5

Ambato, 3 de Marzo de 2023

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

José Carlos Buestan Morales

C.I. 185019189-9

**AUTOR**

## DEDICATORIA

“El éxito ocurre cuando tus sueños son más grandes que tus excusas”

A Dios por haberme dado la vida, acompañado a lo largo de mi carrera y ser una luz en mi camino.

Dedico con todo mi amor a mi madre Mariana por ser, estar, vivir y creer en mi capacidad. Por haberme forjado como la persona que soy, enseñarme que un ser humano con valores, respeto y honestidad vale más que cualquier cosa en el mundo. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien.

A mis hermanos César y Rafael quienes me han apoyado incondicionalmente y me han dado su ejemplo de cómo ser un caballero de bien.

A mi padre Marco y mi abuelita Gladys que me han apoyado a la distancia contribuyendo a la consecución de este logro con el mayor de sus esfuerzos.

A mis amigos y compañeros que vivieron cada minuto a mi lado en el proceso de creación de este trabajo.

José Carlos Buestán Morales.

## AGRADECIMIENTOS

“Paz en el alma, gratitud por la vida y fe en el camino”

Han pasado cinco años desde que empezó un capítulo nuevo en mi vida, el epígrafe denominado “Biotecnología” cuyo comienzo surgió por una curiosidad en clase de colegio, ha llegado al final de la primera parte. En el transcurso de estos años he tenido momentos buenos y malos, los cuales me han enseñado a forjarme convirtiéndome en la persona que soy hoy en día.

A lo largo de esta investigación he contado con la ayuda de muchas personas, a las que debo mi gratitud y mucho más. En primer lugar, agradezco a mis tutoras Helena y Ruth por guiarme durante el desarrollo de este trabajo compartiendo sus conocimientos. A Alejandra S. quien observó mi potencial, creyó en mí y abrió puertas dándome una oportunidad de demostrar lo que soy capaz. A Giovanni F. por brindarme todos sus recursos disponibles a pesar de no ser su obligación.

Agradezco infinitamente a mis amigos Patricio, Erick, Rosita, Liss, Washo, Mishu y Cami, por todos los momentos compartidos, por las risas, anécdotas, por su lealtad, confianza, paciencia, por acompañarme y aconsejarme en la vida, por estar en los momentos malos y por hacer que la época de universidad sea algo que lo volviera a revivir. Gracias a todos por ser parte de esta increíble historia. Este logro es tan suyo como mío y lo llevaré siempre con orgullo.

Así mismo a Grace y Jennifer M. por regalarme su tiempo y apoyo cuando más necesité.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis seres queridos por su amor y apoyo incondicional durante todo este proceso. Su presencia en mi vida ha sido la luz que me ha guiado en los momentos difíciles y me ha hecho sentir querido y valorado.

Con cariño,

José Carlos Buestán Morales

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DERECHOS DE AUTOR .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I .....	1
MARCO TEÓRICO .....	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Uso excesivo de fertilizantes químicos en la agricultura .....	1
1.1.2. Importancia del nitrógeno en los suelos .....	3
1.1.3. Fijación Biológica del nitrógeno .....	3
1.1.4. <i>Fabaceae</i> (Leguminosae) .....	4
1.1.5. El microsimbionte: <i>rhizobium</i> .....	6
1.1.6. Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ) .....	7
1.1.7. Familia <i>Rhizobiaceae</i> .....	9
1.1.8. Proceso de Nodulación .....	10
1.1.8.1. El nódulo .....	10
1.1.9. Metabolismo del nódulo .....	12
1.1.10. Identificación de bacterias .....	13
1.2. Objetivos.....	14
1.2.1. Objetivo General .....	14
1.2.2. Objetivos Específicos.....	14
CAPÍTULO II .....	15
METODOLOGÍA .....	15
2.1. Materiales .....	16

2.2. Métodos .....	20
2.2.1. Localización del área de estudio.....	20
2.2.2. Criterios de inclusión.....	21
2.2.3. Criterios de Exclusión .....	21
2.2.4. Prospección de la búsqueda de nódulos. ....	22
2.2.5. Procesamiento de nódulos en laboratorio.....	22
2.2.6. Aislamiento primario de <i>Rhizobium spp</i> .....	23
2.2.7. Aislamiento secundario y purificación de cultivo de cepas de <i>Rhizobium spp</i> .....	24
2.2.8. Caracterización microscópica de <i>Rhizobium spp.</i> ....	24
2.2.9. Caracterización macroscópica de <i>Rhizobium spp.</i> .....	24
2.2.10. Tinción de Gram.....	24
2.2.11. Pruebas Bioquímicas para identificación del género <i>Rhizobium spp.</i> ....	25
2.2.12. Prueba rojo de metilo.....	25
2.2.13. Voges Proskauer .....	25
2.2.14. Prueba de catalasa.....	26
2.2.15. Prueba hidrolisis de almidón .....	26
2.2.16. Sulfuro de hidrógeno .....	26
2.2.17. Prueba Triple azúcar hierro .....	27
2.2.18. Prueba utilización de Citrato .....	27
2.2.19. Prueba YMA + púrpura de bromocresol .....	27
2.2 Aislamiento de ADN y BOX-PCR.....	27
2.2.20. Desarrollo de PCR y electroforesis para la comprobación del género <i>Rhizobium spp</i> .....	28
2.2.21 Análisis de los patrones electroforéticos .....	29
CAPÍTULO III.....	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30

3.1.1	Asilamiento de <i>Rhizobium spp.</i> a partir de nódulos pertenecientes en <i>T. pratense</i> .....	30
3.1.2	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Rhizobium spp</i> .....	35
3.1.3	Análisis UPGMA de <i>Rhizobium spp</i> .....	53
3.2	Verificación de la hipótesis.....	59
CAPÍTULO IV .....		60
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		60
4.1.	Conclusiones.....	60
4.2.	Recomendaciones .....	61
MATERIAL DE REFERENCIA .....		62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i> .....	7
<b>Tabla 2</b>	Clasificación taxonómica del trébol. ....	9
<b>Tabla 3</b>	Equipos de Laboratorio.....	16
<b>Tabla 4</b>	Materiales de laboratorio .....	16
<b>Tabla 5</b>	Reactivos de Laboratorio .....	18
<b>Tabla 6</b>	Insumos y materiales de escritorio.....	19
<b>Tabla 7</b>	Coordenadas de ubicación geográfica de la toma de muestras.....	21
<b>Tabla 8</b>	Primer y condiciones PCR.....	28
<b>Tabla 9</b>	Parámetros de los nódulos radiculares de <i>T. pratense</i> .....	30
<b>Tabla 10</b>	Resumen de parámetros de los nódulos radiculares de <i>T. pratense</i> .....	32
<b>Tabla 11</b>	Morfología del Aislado de <i>Rhizobium spp</i> por localidad. ....	35
<b>Tabla 12</b>	Resultados pruebas bioquímicas de identificación de <i>Rhizobium spp</i> .....	38
<b>Tabla 13</b>	Resumen de los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación de <i>Rhizobium spp</i> .....	45

<b>Tabla 14</b> Morfología de <i>Rhizobium spp.</i> en agar levadura manitol suplementado con púrpura de bromocresol .....	51
<b>Tabla 16</b> Agrupación de rizobios de trébol violeta por similitud molecular .....	55
<b>Tabla 17</b> Conglomerados del subgrupo A de rizobios de trébol violeta por similitud molecular .....	57
<b>Tabla 18</b> Conglomerados del subgrupo B de rizobios de trébol violeta por similitud molecular .....	58

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1:</b> Estructura de una leguminosa.....	5
<b>Figura N°2:</b> Nódulos formados en leguminosas.....	6
<b>Figura N°3:</b> Morfología de <i>T. pratense</i> .....	8
<b>Figura N°4:</b> Endosimbiosis <i>Rhizobium</i> con planta hospedera.....	11
<b>Figura N°6</b> Ubicación de las zonas de recolección del cultivo.....	20
<b>Figura N°7</b> Porcentaje de crecimiento por localidad en YMA + púrpura de bromocresol .....	51
<b>Figura 8:</b> Patrones electroforéticos de rizobacterias de nódulos de <i>T. pratense</i> , obtenidos por PCR fingerprinting con primer BOXA1R. Marcador de PM 1 Kb en carril 1 y 16.....	53
<b>Figura 10.</b> Dendograma de agrupamiento por similitud molecular Grupo I subgrupo A asociados a los nódulos de trébol violeta ( <i>T. Pratense</i> ). .....	56
<b>Figura 11.</b> Dendograma de agrupamiento por similitud molecular Grupo I subgrupo B asociados a los nódulos de trébol violeta ( <i>T. Pratense</i> ). .....	58

### ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Características Fisiológicas de las localidades del norte y sur del cantón Ambato .....	73
--	----

### ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1:</b> Ecuación general de la fijación biológica de nitrógeno.....	4
--	---

## RESUMEN

El nitrógeno es el nutriente más importante para el crecimiento de plantas, los cultivos de leguminosas dependen en gran medida del nitrógeno fijado por bacterias del rizoplano fijadoras de nitrógeno. La identificación y caracterización de los rizobios autóctonos de una zona en particular es la base de la formulación de inoculantes para la producción sostenible de leguminosas frente al cambio climático. Se aisló *Rhizobium spp* de 4 localidades del cantón Ambato. Las bacterias aisladas se cultivaron en medio Agar extracto de levadura y manitol YMA con rojo Congo. Las colonias se observaron después de 36-48 horas de incubación a 37 grados centígrados, placas control presentaron crecimiento de diferentes microorganismos, mientras que las placas de aislamiento no presento contaminación. Se obtuvo un total de 88 aislamientos, se caracterizó tener una forma de bastón, aeróbica, no formadora de esporas y móvil. Los aislados mostraron un color rosado lechoso, arrojaron positivo las pruebas rojo de metilo, Voges-Proskauer, catalasa, hidrólisis de almidón y movilidad en agar SIM. Arrojaron resultados negativos para test de hierro triple azúcar, y negativo para la producción de ácido sulfúrico y prueba de indol en SIM, mientras que la prueba citrato de Simmons arrojó un resultado negativo para 3 cepas. Los polimorfismos evaluados por UPGMA permitieron establecer que la diversidad de rizobios contó con un 76 por ciento de similitud, agrupando rizobios de crecimiento lento en la zona norte y crecimiento rápido en la zona sur del cantón Ambato.

### **Palabras clave:**

PCR fingerprinting, nódulos, *Rhizobium spp*, *Trifolium pratense*, UPGMA, crecimiento poblacional.

## **ABSTRACT**

Nitrogen is the most important nutrient for plant growth, legume crops are highly dependent on nitrogen fixed by nitrogen-fixing rhizobial bacteria. The identification and characterization of rhizobia indigenous to a particular area is the basis for the formulation of inoculants for sustainable legume production in the face of climate change. *Rhizobium* spp. were isolated from 4 localities of Ambato canton. The isolated bacteria were grown on Yeast Extract Agar medium and YMA mannitol with Congo red. The colonies were observed after 36-48 hours of incubation at 37 degrees Celsius, control plates showed growth of different microorganisms, while the isolation plates did not show contamination. A total of 88 isolates were obtained, characterized as rod-shaped, aerobic, non-spore-forming and motile. The isolates showed a milky pink color, were positive for methyl red, Voges-Proskauer, catalase, starch hydrolysis and motility on SIM agar. They were negative for the triple sugar iron test, negative for sulfuric acid production and negative for the indole test on SIM, while the Simmons citrate test was negative for 3 strains. The polymorphisms evaluated by UPGMA allowed establishing that the diversity of rhizobia had 76 percent similarity, grouping slow-growing rhizobia in the northern zone and fast-growing rhizobia in the southern zone of Ambato.

### **Keywords:**

PCR fingerprinting, nodules, *Rhizobium* spp, *Trifolium pratense*, UPGMA, population growth.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Uso excesivo de fertilizantes químicos en la agricultura

Actualmente el crecimiento de la población mundial sigue aumentando y se estima que alrededor de 2050 se alcanzará aproximadamente los 9.700 millones de personas que viven en el mundo (**WPS & WHO, 2022**). Debido a la expansión de la población mundial, la agricultura aumentó el rendimiento por unidad de superficie en la producción de cultivos; mediante el informe reciente del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) en cooperación con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS); indica que el uso de pesticidas y fertilizantes se han expandido de manera exuberante, por lo que el código internacional de conducta para el uso y la gestión sostenible de los fertilizantes no ha cumplido el estándar de gestión sostenible a lo largo de la cadena de suministro agrícola (**WPS & WHO, 2022**).

En Ecuador, en el año 2020 se reportó que el 56,8% de la superficie con cultivos permanentes se aplicaron insumos de síntesis química, mientras que en cultivos transitorios fue el 79% de la superficie (**INEC & ESPAC, 2021**). El alto uso de estos insumos químicos representa un potencial peligro para la salud pública, así como para el sector agrícola (**Behera et al., 2022**).

El empleo de fertilizantes químicos aumenta la productividad de los cultivos y altera las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, lo que conlleva a

la pérdida de la calidad del suelo agrícola (**Pahalvi et al., 2021**). Los fertilizantes químicos (nitrogenados, fosfatos, potasas) pueden provocar la acidificación del suelo, la formación de costras, reduciendo así el contenido de materia orgánica, el contenido de humus, los organismos beneficiosos, el retraso en el crecimiento de las plantas, cambio en el pH del suelo, aumento de plagas e incluso puede contribuir a la liberación de gases de efecto invernadero (**Behera et al., 2022; Pahalvi et al., 2021**).

La acidez del suelo disminuye la ingesta de fosfato por parte de los cultivos lo que aumenta la concentración de iones tóxicos en el suelo y de esta manera se inhibe el crecimiento de los cultivos. El agotamiento del humus del suelo reduce la capacidad de almacenar nutrientes provocando un follaje decolorado o malformado, mientras que los gases de efecto invernadero derivados del exceso de fertilizantes nitrogenados perjudican el clima ya que estos al entrar al contacto con la atmosfera se convierten en óxido nitroso un gas perjudicial en el ambiente (**Soumare et al., 2020**). Además, el nitrógeno aplicado a los campos en grandes cantidades destruye el equilibrio entre los tres macronutrientes, nitrógeno, fósforo y potasio, lo que provocaría la falta de micronutrientes; lo que también daña la capa superficial del suelo, provocando una reducción del rendimiento de los cultivos (**Mendoza-Suárez et al., 2020**).

Dentro de este contexto las Organizaciones no Gubernamentales como GREENPEACE junto con GRAIN y el Instituto de Agricultura y Política Comercial IATP comenzaron su labor en conjunto para la erradicación de esta problemática y el uso excesivo de fertilizantes sintéticos, a través de sus programas individuales de gestión en el cambio climático, se han implementado: directrices voluntarias para la gestión sostenible del suelo, aplicación de controles, legislación internacionales y la educación de los agricultores, mediante el cual se aborde el problema a nivel local, regional y mundial, de esta manera se espera lograr una disminución optima dentro de los estándares de gestión sostenible (**Behera et al., 2022**).

### **1.1.2. Importancia del nitrógeno en los suelos**

El nitrógeno es uno de los elementos más esenciales que necesitan todos los tipos de organismos porque es un componente importante de las proteínas, aminoácidos, los ácidos nucleicos y otras biomoléculas. De igual manera es necesario para producir clorofila en las plantas, que se utiliza en la fotosíntesis para fabricar su alimento. La cantidad de nitrógeno presente en las plantas es del 1,5 al 2% de la materia seca y el 16% de la proteína total (**Anas et al., 2020; Schulte et al., 2021**).

El nitrógeno mineral y orgánico, el amonio y los nitratos son las principales fuentes de nitrógeno disponibles en los suelos. El nitrato se produce a partir de la descomposición bacteriana de los residuos vegetales juntamente con la materia orgánica, esta es la fuente de nitrógeno más importante para la mayoría de las plantas, ya que las permiten crecer, desarrollarse y producir semillas (**Mendoza-Suárez et al., 2020**).

### **1.1.3. Fijación Biológica del nitrógeno**

La especie vegetal capaz de realizar esta actividad son conocidas como plantas leguminosas (**Balows et al., 1992**). La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el proceso biológico en el cual el gas nitrógeno ( $N_2$ ) de la atmósfera se incorpora en forma de amoniaco al tejido de ciertas plantas, esto se debe a cepas bacterianas como *Rhizobium*, *Beijernickia*, *Rhodospirillum*, *Azotobacter* y cianobacterias, las cuales sólo infectan a un grupo selecto de plantas y se encargan de producirlo a través de procesos biológicos y fisicoquímicos. La vía de reducción asimilatoria de nitrato es un proceso de varios pasos que implica la captación de nitrato y su reducción a amonio por dos enzimas altamente reguladas, el nitrato reductasa citosólica (NR) y el nitrito reductasa plastidial (NiR) (**Soumare et al., 2020**).

El proceso de fijación biológica del nitrógeno implica una serie de reacciones bioquímicas, sin embargo, se puede resumir en la Ecuación 1:

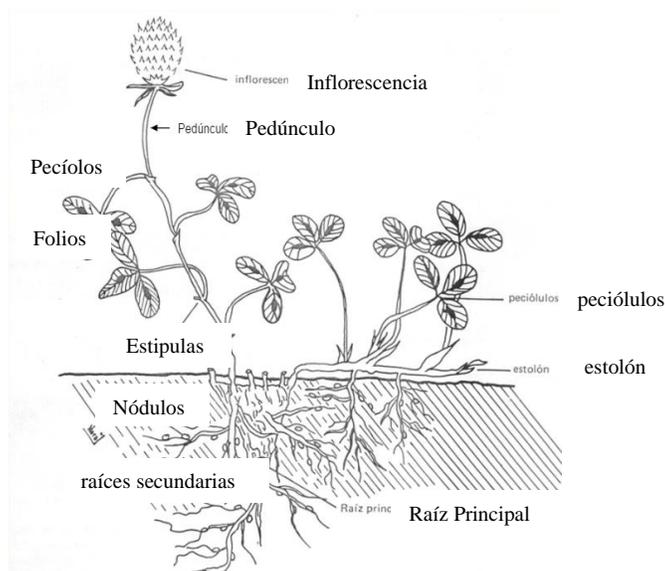


***Ecuación 1:** Ecuación general de la fijación biológica de nitrógeno.*

La ecuación indica que una molécula de gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) se combina con ocho iones de hidrógeno ( $8\text{H}^+$ ) para formar dos moléculas de amoníaco ( $2\text{NH}_3$ ) y dos moléculas de gas hidrógeno ( $2\text{H}_2$ ). Esta reacción bioquímica es mediada por la enzima nitrogenasa de los nódulos radiculares de la especie infectada. Finalmente, las 16 moléculas de ATP (adenosín trifosfato) representan la energía necesaria para que se produzca la reacción del FNB (**Schulte et al., 2021**).

#### **1.1.4. Fabaceae (Leguminosae)**

La Tierra cuenta con 400.000 especies de plantas, de los cuales cerca del 5% de las especies son miembros de la familia de plantas (Leguminosae). La familia *Fabaceae* cuenta con 770 géneros y cerca de 20.000 especies distribuidas por todo el mundo (**Ibáñez et al., 2017**). Las fabáceas evolucionaron para tener sistemas radiculares que permiten establecer relaciones simbióticas con diversas especies de bacterias del suelo capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, proporcionando así una fuente biológica básica de compuestos nitrogenados como las proteínas y sus derivados (**Mirza Hasanuzzaman et al., 2020**).



**Figura N°1: Estructura de una leguminosa**

**Fuente: (Elpel, 2000; Y. M. Liang et al., 2018)**

Las especies de leguminosas son muy diversas, las mismas están adaptadas a casi todos los ecosistemas terrestres en forma de árboles, arbustos y hierbas, estas forman relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios), la mayoría de las cuales pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium* en el grupo de las alfaproteobacterias (Balows et al., 1992; Tak et al., 2017) y en los géneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia* en las Betaproteobacterias (Boone et al., 2017; Tak et al., 2017)

La infección de las raíces por los rizobios resulta en la formación de órganos llamados nódulos en los que tiene lugar el proceso de fijación biológica de nitrógeno (J. Liang et al., 2019). El proceso de nodulación en las leguminosas comienza por la infección de las raíces por cepas de rizobios compatibles y eficientes de acuerdo con la planta huésped, ya que las mismas cuentan con diferentes tipos y formas de nodulación. La infección de la raíz causa el rizado de los pelos de la raíz que atrapan a los rizobios y forman hilos a través de estas estructuras, las bacterias entran en las células de la raíz para comenzar su proceso de fijación de nitrógeno (Sprent et al., 2017).



*Figura N°2: Nódulos formados en leguminosas*

**Fuente:**(George M. Briggs, 2022)

#### **1.1.5. El microsimbionte: *rhizobium***

*Rhizobium* es un género de bacterias Gram-negativas presentes en la rizosfera que fijan el nitrógeno atmosférico, estas tienen la capacidad única de formar nódulos en las raíces de las leguminosas y de esta manera producir nitrogenasa (**El-Harty et al., 2021**). Las mismas cuentan con un plásmido que codifica información vital para la infección y nodulación de la planta hospedera la cual mediante la secreción natural de lectina atrae a los microorganismos para la iniciar el proceso de infección. Actualmente la taxonomía está basada en el '*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*' y en el National Center for Biotechnology Information, mientras que su filogenia está basada en el 16S rRNA-based LTP 16S por '*The All-Species Living Tree Project*' (**Yarza et al., 2010**).

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Rhizobium*

---

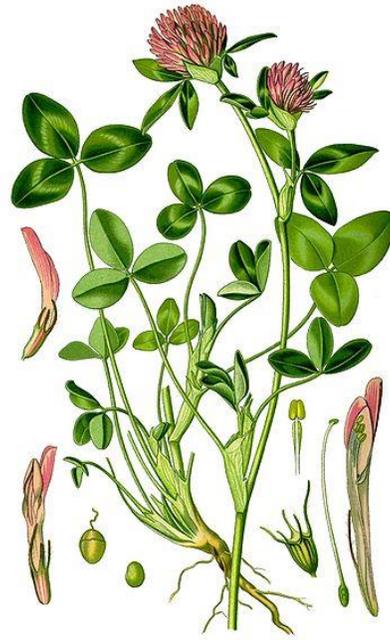
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Alphaproteobacteria
Orden:	Rhizobiales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	<i>Rhizobium</i>

---

Fuente: **(J. Liang et al., 2019; Mirza Hasanuzzaman et al., 2020)**

**1.1.6. Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

El trébol rojo es una planta herbácea perenne nativa de Europa introducida en el Ecuador en la época colonial, mide entre 8 y 15 cm de altura, cuentan con hojas compuestas alternas, inferiores y superiores. La morfología de su tallo es extendida, las hojas compuestas alternas son trifoliadas mientras que las hojas compuestas inferiores tienen pecíolos largos y vellosos, sus hojas superiores tienen pecíolos cortos **(Balows et al., 1992; Herbert et al., 2018)**.



**Figura N°3:** *Morfología de T. pratense*

Fuente: (Thomé & Migula, 2000)

Su período de floración ocurre desde finales de primavera hasta mediados de verano y con un tiempo aproximado de 1 a 2 meses, sin embargo, algunas plantas pueden florecer más tarde en el verano o el otoño. Esta planta agrega nitrógeno al suelo al formar nódulos de raíces que albergan bacterias rizobianas (**McKenna et al., 2018**).

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica del trébol.*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Papilionoideae
Genero	Trifolium
Nombre científico	<i>Trifolium pratense</i>

Fuente: **(Lim, 2014)**

Se cultiva extensamente como pasto, heno y abono verde, y se considera un excelente alimento para el ganado y los potreros. En comparación con la alfalfa, el trébol rojo tiene aproximadamente dos tercios de proteínas digeribles, aportando más nutrientes digeribles totales y un valor energético neto superior **(Jones et al., 2020; Lim, 2014)**. En la ganadería esta planta es altamente útil para cumplir con el forraje por la carga animal por hectárea conservando el máximo nivel de producción sostenible **(Lim, 2014)**.

#### **1.1.7. Familia *Rhizobiaceae***

El manual de Bergey de Bacteriología sistemática establece que la familia *Rhizobiaceae* tiene 18 géneros destacando los primeros en descubrirse: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium* **(J. Liang et al., 2019)**. El género *Rhizobium* presenta cinco especies las cuales fueron promotoras para el avance de desarrollo de bioproductos e identificación de nodulación en especies específicas de plantas, estas se caracterizan por formar

biovariedades presentándose mayormente en las leguminosas (**Sprent et al., 2017**).

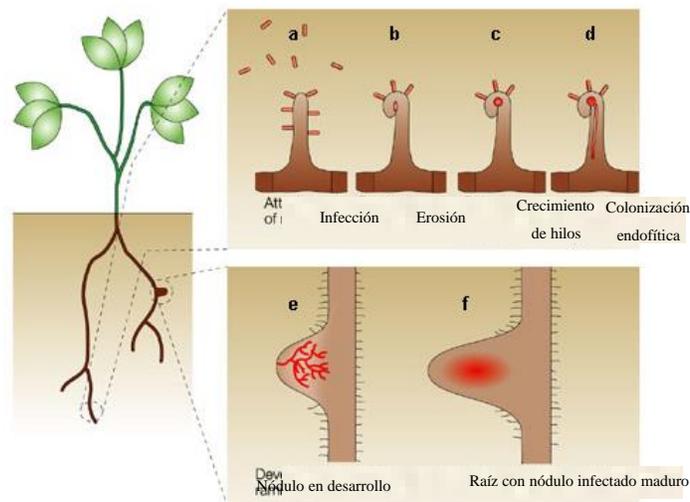
- a) *Rhizobium leguminosarum*: sus funciones simbióticas están codificadas en un plásmido cuya cepa puede nodular tres leguminosas dependiendo de la especificidad del plásmido la cual es determinada por la biovariedad del huésped. Aquí destacan tres grupos de huéspedes:
  - *Trifolium* para la biovariedad *trifolii*
  - *Phaseolus* para la biovariedad *phaseoli*
  - *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia* y *Lens* para la biovariedad *viceae* (**Tang & Capela, 2020**).
- b) *Rhizobium meliloti* esta nodula a especies del género *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella* (**Sánchez-Cañizares et al., 2018**).
- c) *Rhizobium loti* tiene la capacidad de agrupar a microorganismos capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre los cuales se destacan *Lotus*, *Cicer*, *Robinia pseudoacacia*, *Mimosa*, *Lupinus*, *Onobrychis* y *Leacaena*.
- d) *Rhizobium galegae* esta infecta a especies del género *Galega*.
- e) *Rhizobium kuakuii* infecta a especies del género *Astragalus* una leguminosa presente en la época de invierno (**Mirza Hasanuzzaman et al., 2020**).

### **1.1.8. Proceso de Nodulación**

#### **1.1.8.1. El nódulo**

Los rizobios infectan las células corticales de las raíces de las leguminosas dependiendo de diferentes factores como: la especificidad, infección, formación del nódulo y efectividad o funcionamiento del nódulo. La especificidad será dependiente de la especie de *Rhizobium* de infección, el proceso comienza en la zona pilífera mediante la formación de hilos en donde la bacteria es llamada por la secreción de la glicoproteína lectina, este proceso de infección continua con la elongación del cordón de infección y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del córtex radical (**De et al., 2018; El-Harty et al., 2021**). Aquí

el exudado juntamente con los flavonoides y los compuestos bioquímicos naturales de la especie de planta inducen específicamente la transcripción de los genes de nodulación (Nod) de los rizobios, de esta manera estimula la formación del nódulo (**Pahalvi et al., 2021; Soumare et al., 2020**). El proceso de infección comienza con su colonización epifítica del rizoplasma (especialmente en los cuellos que rodean la base de las raíces laterales y en las uniones entre las células epidérmicas), luego por la erosión de las paredes celulares de las raíces mediada por las celulasas unidas a las células de *Rhizobium*, estas ingresan en espacios o grietas de la raíz las cuales son formadas por heridas naturales en el desarrollo de raíces laterales y fisuras entre células epidérmicas, finalmente se da la colonización endofítica de células corticales en el interior de la raíz. Durante el proceso de infección es necesario tener en cuenta que la producción de fitoalexinas, flavonoides y los compuestos bioquímicos serán dependientes de la edad, pH, humedad, presión, altura y temperatura del huésped (**Sánchez-Cañizares et al., 2018**).

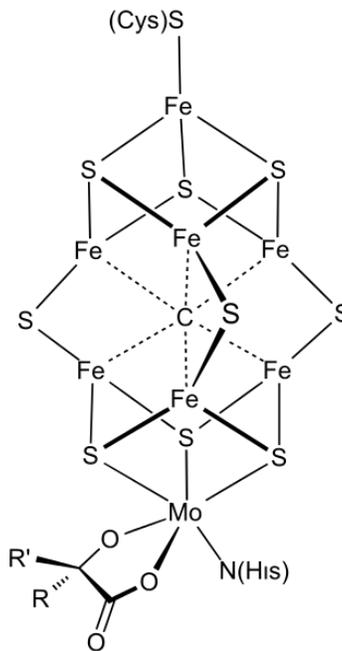


**Figura N°4:** Endosimbiosis *Rhizobium* con planta hospedera

Fuente: (**Tang & Capela, 2020**)

### 1.1.9. Metabolismo del nódulo

La capacidad de fijar nitrógeno tiene lugar en los bacteroides gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa, este complejo enzimático cuenta con dos componentes: una molibdoferroproteína (nitrogenasa) y una ferroproteína denominada nitrogenasa reductasa, su centro activo es un cofactor con hierro y molibdeno denominado *FeMoco* (Buszewski et al., 2019). En la simplificación de la FBN ecuación 1 la actividad es determinada por los ATP que donan los electrones para la actuación de la enzima sobre los flavodoxina los cuales proporcionan los equivalentes de reducción para reducir el nitrógeno, este proceso requiere de 960 kJ de energía por mol de nitrógeno fijado, por esta razón se requiere 16 ATP hidrolizadas por los 8 electrones transportados a través del complejo nitrogenasa (Stephen C. Wagner, 2018; Yuan et al., 2022).



**Figura N°5:** Estructura del cofactor *FeMoco*

Fuente: (Pérez-González et al., 2012)

### **1.1.10. Identificación de bacterias**

La identificación de microorganismos es de gran importancia para la colección de nuevos cultivos bacterianos y, a su vez, permite direccionar la búsqueda de diferentes aplicaciones a estos (**Borkar, 2019**). Existen muchas pruebas para identificar bacterias, dependiendo del tipo de bacteria que se esté investigando y de los recursos disponibles en el laboratorio (**American Society of Microbiology, 2016**). Algunas de las pruebas más comunes son:

**Tinción Gram:** La tinción de Gram es una de las pruebas más comunes y simples para identificar bacterias. Esta prueba determina si la pared celular de la bacteria es gruesa o delgada, lo que permite clasificar a las bacterias en dos categorías principales: Gramnegativas y Grampositivas (**Borkar, 2019**).

**Pruebas de cultivo:** Las pruebas de cultivo se utilizan para cultivar y aislar bacterias en un medio de cultivo específico. La morfología y las características de crecimiento de las colonias de bacteria pueden ayudar a identificar a la bacteria.

**Pruebas bioquímicas:** Estas pruebas evalúan las características bioquímicas de las bacterias las cuales tienden a realizar ciertos procesos metabólicos y utilizar determinados nutrientes, las más comunes son:

**Pruebas de oxidación-fermentación:** se utilizan para determinar si las bacterias son capaces de oxidar o fermentar diferentes sustratos.

**Pruebas de hidrólisis:** se utilizan para determinar si las bacterias son capaces de hidrolizar diferentes sustancias, como proteínas, lípidos o polisacáridos.

**Pruebas de utilización de sustratos:** se utilizan para determinar la capacidad de las bacterias para utilizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (**Shoib et al., 2020**).

**Pruebas moleculares:** Son técnicas como la secuenciación del ADN y la hibridación in situ, que permiten identificar a las bacterias basadas en su secuencia de ADN o ARN (**Shoib et al., 2020**).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

- Caracterizar *Rhizobium spp.* a partir de trébol violeta (*Trifolium pratense*) en cuatro localidades del cantón Ambato.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Aislar cepas de *Rhizobium spp.* que nodulan en la especie *T. pratense* mediante técnicas microbiológicas basada en cultivo.
- Identificar a los aislados por medio de pruebas bioquímicas.
- Evaluar la distancia genética entre los aislamientos por medio de PCR-DNA fingerprinting.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

El proyecto de investigación es de **tipo cualitativa**, ya que se pretende realizar pruebas bioquímicas, PCR y una electroforesis, experimentos que fueron necesarios para caracterizar la presencia de *Rhizobium spp* en los nódulos extraídos de *T. pratense*.

Las hipótesis para probar en la investigación son:

- **Hipótesis nula**

Los nódulos pertenecientes a la leguminosa *T. pratense* no representan reservorios de aislamientos de *Rhizobium spp*.

- **Hipótesis alternativa**

Los nódulos pertenecientes a la leguminosa *T. pratense* representan reservorios de aislamientos de *Rhizobium spp*.

## 2.1. Materiales

**Tabla 3**

*Equipos de Laboratorio*

<b>EQUIPOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Bio-Rad	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2	1
Cámara de electroforesis	1
Congelador (-20°C)	1
Fuente de poder	1
Incubadora	1
Microcentrífuga	1
Microscopio óptico	1
Nanodrop Thermo Fisher Scientific	1
Nevera (4°C)	1
Plancha de calentamiento	1
Termociclador	1
Transiluminador UV	1
Ultra congelador (-80°C)	1
Vórtex	1

**Tabla 4**

*Materiales de laboratorio*

<b>MATERIALES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Aguja de inoculación	2
Asa de inoculación	4

---

Asa de siembra Drigalski	2
Bisturí	4
Cajas mono Petri plásticas	100
Cubreobjetos	1 caja
Espátula	2
Gradilla	3
Juego de micropipetas	2
Matraz de 100 ml	3
Mechero de alcohol	2
Pipetas x 10 ml	5
Portaobjetos	1 caja
Puntas de micropipeta 10 $\mu$ l	100
Puntas de micropipeta 20 $\mu$ l	100
Puntas de micropipeta 200 $\mu$ l	100
Tiras medidoras de pH	1 caja
Tubos 0.2 mL para-PCR	100
Tubos de ensayo	40
Tubos de ensayo con tapa	40
Tubos para microcentrífuga	100
Varilla de vidrio	1
Vasos de precipitación 100 ml	5

---

**Tabla 5***Reactivos de Laboratorio*

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
Agar Citrato de Simmons	15 g
Agar levadura manitol YMA	500 g
Agar SIM	15 g
Agar TSI	15 g
Agarosa	500 mg
Agua bidestilada	3 L
Agua destilada	5 L
Agua oxigenada 30%	150 ml
Agua ultrapura estéril	500 ml
Alcohol cetona	10 ml
Buffer TAE	275 ml
Cristal Violeta	10 ml
Dreamtaq Green PCR máster MIX 200 RX Thermo Scientific	1 u
Escalera molecular	1 u
Etanol 70%	1 L
Etanol 95%	1 L
Genejet Genomic DNA purification kit. 50 RX. Thermo Scientific	1 u
Glicerol 20%	500 ml
Hipoclorito de sodio	1 L
KOH	25 ml
Lugol	10 ml
Manitol	100 g
Medio Agar almidón	15 g
Medio PCA	500 g
Rojo Congo	500 g

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
Rojo de metilo	10 ml
Safranina	10 ml
Sybr Safe DNA Gel Stain	1 u
$\alpha$ - naftol	10 g

**Tabla 6**

*Insumos y materiales de escritorio*

<b>INSUMOS Y MATERIALES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Alcohol antiséptico	1 litro
Algodón	2 fundas
Azadón	2 u
Cámara fotográfica	1 u
Cloro	1 galón
Cofias	caja x 100 unidades
Computadora	2 u
Etiqueta	20 u
Fundas de papel	32 u
Gasas	30 u
Gel antibacterial	1 litro
Guantes de examinación	2 cajas x 50 pares
Jabón líquido	1 litro
Mascarillas	caja x 100 unidades
Palas	2 u
Rotulador	2 u
Tijeras	2 u

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Localización del área de estudio

Para el muestreo de *T. pratense* se escogieron 4 zonas pertenecientes a las parroquias del cantón Ambato-Tungurahua (Montalvo 1, Quisapincha 2, Santa Rosa 3 y Huachi Grande 4) (Figura 6) en donde se identificó la presencia del cultivo de *T. pratense*. Mediante la ayuda de Google Earth se definió las zonas exactas donde el muestreo se llevó a cabo.

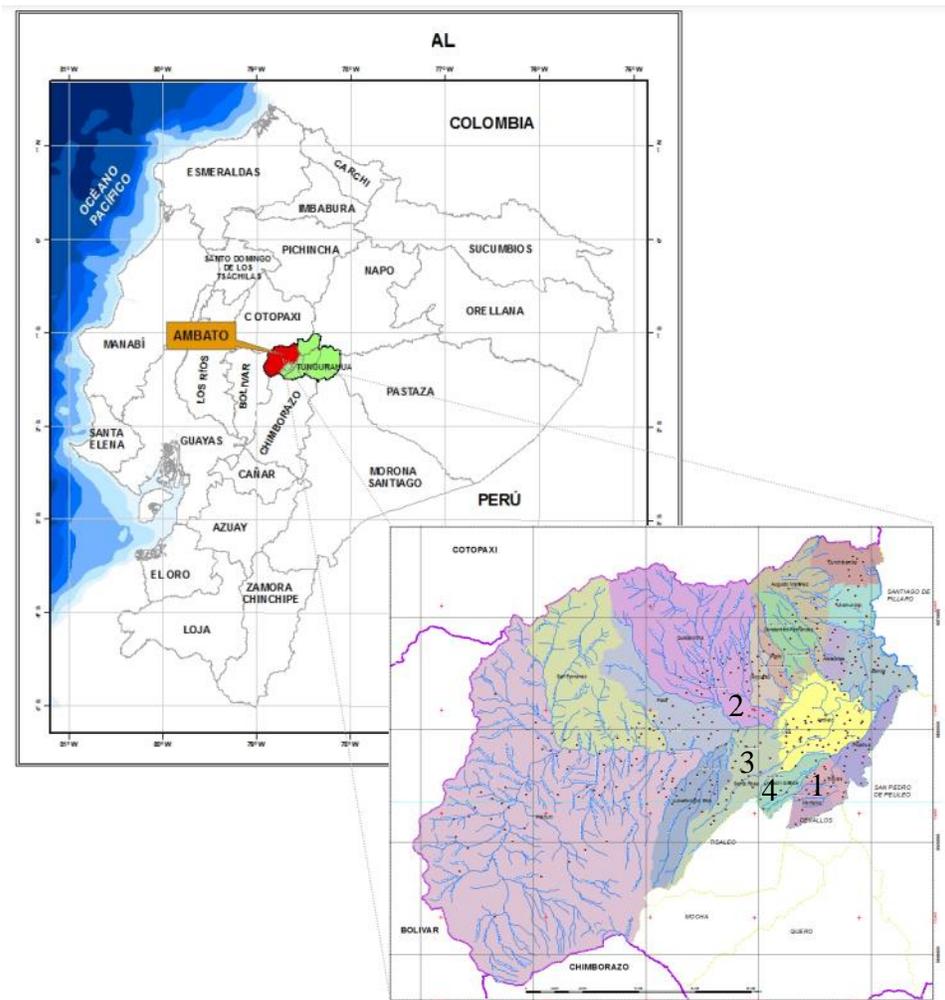


Figura 6. Ubicación de las zonas de recolección del cultivo

Fuente: (INEC, 2022)

**Tabla 7**

*Coordenadas de ubicación geográfica de la toma de muestras*

LOCALIDAD	MONTALVO	QUISAPINCHA	SANTA ROSA	HUACHI GRANDE
	COORDENADAS			
LATITUD	-1,3264623	-1,2544732	-1,3072987	-1,3241324
LONGITUD	-78,6314404	-78,6755412	-78,6727202	-78,6441687

*Nota: La recolección de las muestras fue en época de cría de ganado, por lo cual, este se presentó en gran cantidad ya que se utiliza como alimento.*

Los criterios para la selección de muestras en la investigación fueron:

### **2.2.2. Criterios de inclusión**

Las muestras cumplieron con los criterios correspondientes:

- a. Las plantas se encontraron en etapa fenológica de floración.
- b. Las muestras provenientes de *T. pratense* contaron con presencia de nódulos.
- c. Las muestras fueron tomadas en cuatro localidades diferentes (parroquias) del cantón Ambato, y se tuvo en cuenta diversas condiciones climáticas.

### **2.2.3. Criterios de Exclusión**

- a) Plantas débiles con presencia de plagas y no que se encontraron en etapa fenológica de floración.
- b) Muestras de *T. pratense* que no contenían presencia de nódulos.

#### **2.2.4. Prospección de la búsqueda de nódulos.**

Se seleccionaron 4 localidades para la recolección de nódulos de la raíz de *T. pratense*. La primera localidad fue de un cultivo de la parroquia Montalvo, la segunda de un cultivo ubicado en Quisapincha, la tercera se recolectó en la parroquia Santa Rosa y la última muestra se tomó en Huachi Grande. Posteriormente se seleccionaron ocho plantas para el estudio, con un total de 32 plantas de *T. pratense*, se escogieron plantas jóvenes y vigorosas en floración (**Jones et al., 2020**). Estas se recolectaron a base de un muestreo aleatorio simple en X o Zigzag de cada lote identificado. El muestreo se realizó en forma estratificada, con divisiones de la población en ocho puntos tomando una planta/punto. El proceso de toma de muestra inició con la limpieza de las zonas cercanas a la planta, la misma se extrajo con ayuda de palas lo que evitó daños en el sistema radicular donde se encontraron los nódulos, de igual manera se consideró que cada planta debía contar con un mínimo de cinco nódulos (**Pérez Salinas, 2021**).

Posteriormente se recogió toda la planta y se guardó en fundas de papel, la raíz fue cubierta con una porción de la misma tierra en donde se encontró la planta, ya que el género *Rhizobium spp* tiene alta susceptibilidad al oxígeno lo que evitó que pierda su viabilidad hasta la recepción en el laboratorio (**Rutten et al., 2021**). Se colocó una etiqueta de identificación en cada funda de cada punto de muestreo para identificar su ubicación geográfica; de esta manera se evitará confusiones entre muestras.

#### **2.2.5. Procesamiento de nódulos en laboratorio**

Una vez que las muestras en el laboratorio se retiró la tierra adherida a las raíces y se realizó un lavado con agua destilada por seis veces (**Evdoxia Efstathiadou et al., 2021**). Una vez que se culminó el proceso de limpieza de la raíz se procedió a cortar los nódulos usando un bisturí esterilizado tanto de la raíz principal como de

la secundaria, seguidamente se pesó con una balanza analítica y se obtuvo el peso fresco de los nódulos lo que fue un indicador de la capacidad de fijación de nitrógeno (**Vasileva & Kosev, 2018**).

Se seleccionaron tres nódulos con características morfológicas de vigor, es decir, nódulos grandes, con coloración roja intensa, lo que indicaba que los nódulos estaban activos, fijando nitrógeno y correspondían a cepas **eficientes (Westhoek et al., 2021)**. Los nódulos se desinfectaron por inmersión sucesiva superficialmente en etanol al 70 % durante un tiempo de 60 s, seguidamente se lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 3 – 5 % (v/v) durante cuatro min y se lavó seis veces con agua ultrapura estéril (ddH<sub>2</sub>O) (**Evdoxia Efstathiadou et al., 2021**).

#### **2.2.6. Aislamiento primario de *Rhizobium spp***

Para corroborar que no existía contaminación cruzada se realizó dos controles:

- a) Se tomó una alícuota del último lavado en el proceso de desinfección y se cultivó en placas YMA.
- b) Para determinar ausencia de contaminación en la superficie del nódulo desinfectado, se deslizó el nódulo sobre una placa que contenía medio YMA

Los controles se incubaron a 28 °C durante cinco días.

Los nódulos estériles fueron macerados con 1 gota de agua estéril, el jugo resultante fue estriado en una placa con medio YMA e inoculado bajo las mismas condiciones que las placas control (**Evdoxia Efstathiadou et al., 2021; Morote & Palomino, 2019**).

### **2.2.7. Aislamiento secundario y purificación de cultivo de cepas de *rhizobium spp***

Las colonias individuales las cuales se obtuvieron del aislamiento primario fueron purificadas mediante estrías repetidas en medio YMA suplementado con 25 mg/100ml de rojo Congo. Finalmente se procedió a un estriado por agotamiento (Efstathiadou et al., 2021).

### **2.2.8. Caracterización microscópica de *rhizobium spp*.**

El género *Rhizobium spp* al ser observado luego haber realizado la tinción de Gram en el microscopio presentaron características de bacilos Gram negativos, su tamaño apropiadamente es de 0.5 a 0.9 micras x 1.2 – 3.0 micras. Por otro lado, al comienzo de su crecimiento (24h) fueron bacilos alargados y delgados, a las 48h medianos a cortos y a las 72 h cortos y redondos (Morote & Palomino, 2019).

### **2.2.9. Caracterización macroscópica de *rhizobium spp***

Su colonia presentó una forma convexa de tamaño de 5 mm y forma redonda. La coloración fue de blanco claro al primer día de incubación, del segundo al cuarto día fue lechoso con una coloración rosa palo, y al quinto día gomoso translucido con textura grumosa rojiza (Morote & Palomino, 2019).

### **2.2.10. Tinción de gram**

Se colocó una gota de agua destilada y con un asa de siembra se tomó una colonia y se extendió en un portaobjetos realizando un frotis, con la ayuda de un mechero la muestra se fijó al fuego, se añadió una gota de cristal violeta sobre la muestra durante 1 min, el exceso se retiró con agua destilada, se añadió una gota de Lugol durante 1 min retirando el exceso con agua destilada, se añadió una gota de alcohol-cetona durante 30 s para decolorar y se retiró el exceso con agua destilada,

finalmente, se añadió una gota de safranina durante 1 min y se lavó con agua destilada (**Blasquez & Sato, 2019**).

#### **2.2.11. Pruebas Bioquímicas para identificación del género *Rhizobium spp***

Los cultivos puros fueron aislados en medios de cultivos específicos para cada una de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Rhizobium spp*, entre las que se encontraban pruebas de rojo de metilo, prueba de Voges Proskauer, prueba de catalasa, hidrolisis de almidón, producción de sulfuro de hidrogeno y prueba de triple azúcar (**Parsi Muñoz & Gallardo Vela, 2021; Soundarya et al., 2022**).

#### **2.2.12. Prueba rojo de metilo**

Para la realización de esta prueba se empleó un caldo de cultivo R.M.V.P (polipeptona 7 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g y agua destilada 1000 ml; pH 6,9). Para la preparación de la solución indicadora de rojo de metilo se disolvió 1 g de rojo de metilo en 20 mL de etanol al 95% y se aforó en un bato de 100 mL agua destilada.

Se transfirió cinco mL del cultivo a un tubo de ensayo y se inoculó con el asa de siembra una colonia de cultivo a 35 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación se añadió cinco gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo (**Parsi Muñoz & Gallardo Vela, 2021; Soundarya et al., 2022**).

#### **2.2.13. Voges Proskauer**

Para la realización de esta prueba se empleó un caldo de cultivo R.M.V.P (polipeptona 7 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g y agua destilada 1000 ml; en un pH de 6.9). Se inoculó una colonia de un cultivo puro utilizando el asa, se incubó a 35 °C por 48 h.

Después del tiempo de incubación indicado se añadió 12 gotas ( $\pm 0,6$  mL) de  $\alpha$ -naftol al 5% y cuatro gotas ( $\pm 0,2$  mL) de KOH al 40% finalmente se agitó y se dejó reposar por diez minutos. (Pacsi Muñoz & Gallardo Vela, 2021; Soundarya et al., 2022).

#### **2.2.14. Prueba de catalasa**

Para la realización de esta prueba, se utilizó una colonia de cultivo puro de *Rhizobium spp* la cual se cultivó en medio PCA (Agar Plate Count), con un pH de 7 y se incubó durante tres días a una temperatura de 37 ° C. Se colocó en un portaobjetos dos gotas de agua oxigenada al 30% y se puso en contacto una colonia de *Rhizobium spp* (Soundarya et al., 2022; Wekesa et al., 2021).

#### **2.2.15. Prueba hidrolisis de almidón**

Se inculó una colonia de cultivo puro en medio agar almidón a un pH entre (6.8 – 7.2) y se incubó a 37 °C por 48 h, posteriormente al tiempo de incubación indicado se añadió una gota de Lugol, (Soundarya et al., 2022; Wekesa et al., 2021).

#### **2.2.16. Sulfuro de hidrógeno**

En esta prueba se utilizó medio SIM (triptona, peptona, sulfato amónico ferroso, tiosulfato sódico y agar - agar) en la cual se inculó una colonia pura en un tubo de ensayo y se incubó a 37 °C durante 48 h (Morote & Palomino, 2019b; Soundarya et al., 2022).

### **2.2.17. Prueba Triple azúcar hierro**

Se preparó medio TSI (Triple sugar Iron Agar) y se colocó en 1 tubo de ensayo de 10 mL 3.7 mL de medio el cual se dejó solidificar en pico de flauta profundo. Se tomó una colonia de cultivo puro empleando una aguja de inoculación picando el fondo y extendiendo sobre la superficie de este, seguido se incubó en aerobiosis, a 33-37 °C durante 24 horas **(Prasad et al., 2022)**.

### **2.2.18. Prueba utilización de Citrato**

Se tomó una muestra de cultivo de *Rhizobium spp* y se realizó un estriado en la caja de medio de citrato de Simmons, se incubó por un período de 24 h a 37 °C **(Prasad et al., 2022)**..

### **2.2.19. Prueba YMA + púrpura de bromocresol**

Se tomó una muestra de cultivo de *Rhizobium spp* y se realizó un estriado en la caja de medio YMA+ púrpura de bromocresol como indicador, y se incubó por un período de 24 h a 144 h a 37 °C con controles diarios **(Dekak et al., 2018)**.

### **2.2.20 Aislamiento de ADN y BOX-PCR**

El ADN se extrajo de cada aislado puro utilizando el kit de purificación de ADN genómico Genejet Thermo Scientific, de acuerdo con las instrucciones realizadas por el fabricante. El análisis BOX-PCR fingerprinting se realizó empleando el cebador BOX A1R (*Tabla 8*).**(Evdoxia Efstathiadou et al., 2021)**.

**Tabla 8**

*Primer y condiciones PCR*

Oligonucleótido	Secuencia (5' to 3')	Condiciones	Referencia
PCR-BOX  (Tamaño variable)	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Desnaturalización inicial de 94 °C durante 7 minutos, seguidamente se realizó 30 ciclos: (Desnaturalización a 94 °C por 1 min, se hibridó a 50 °C por 1 min y extensión de 65 °C por 8 min) finalmente realizó una extensión final a 65°C por 8 minutos.	<b>(Maciej Serda et al., 1994)</b>

**2.2.21. Desarrollo de PCR y electroforesis para la comprobación del género *rhizobium spp***

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el Dreamtaq Green PCR Máster mix. 200 RX (50 µL) Thermo Scientific en un volumen final de 25 µL que contenía 1µL de ADN molde genómico, tampón de reacción 1X (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, Tween 20 al 0,01 %, MgCl 2 mM), **(Evdoxia Efstathiadou et al., 2021)** y 1µL de cebador.

El protocolo de amplificación del cebador (*Tabla 8*) consistió en desnaturalizar inicialmente a 94 °C por 7 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, se hibridó a 50 °C por 1 min y extensión de 65 °C por 8 min. Las reacciones de PCR terminaron con una extensión final a 65 °C durante 16 min, la PCR fue corrida en un

termociclador y los fragmentos fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % a 60 V durante 1 h lo que verificó que existía una amplificación resultante de la PCR, una vez que se comprobó la amplificación se realizó una segunda electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % a 60 V durante 3 h, a la izquierda se incluyó un marcador molecular de escalera de ADN de 1kb (**Evdoxia Efstathiadou et al., 2021**). El control positivo con el acceso GenBank MT271224.1 fue adquirido a la empresa BioSin-Biociencias.

#### **2.2.22 Análisis de los patrones electroforéticos**

Los patrones de amplificación, PCR fingerprinting mediante el primer BOXA1R se analizaron mediante el software GelAnalyzer. Los patrones de electroforesis se evaluaron mediante un análisis de clusters con el método UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic mean” o método aritmético usando promedio no ponderado de pares de agrupamientos), en base a una matriz de similitud basada en el coeficiente de similitud simple. La matriz binaria generada por UPGMA y el coeficiente se usaron para realizar un dendograma en el software bioestadístico NTSYS-pc (“Numerical Taxonomy System for Personal Computer”) versión 2.02 (**F. J. Rohlf, 1998**)

### CAPÍTULO III

#### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 3.1.1 Asilamiento de *Rhizobium spp.* a partir de nódulos pertenecientes en *T. pratense*.

**Tabla 9**

*Parámetros de los nódulos radiculares de T. pratense*

Muestra	pH suelo	Número total de nódulos de la raíz	Peso total de los nódulos (g)	Nódulos sembrados	Porcentaje de recuperación
<b>MONTALVO</b>					
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,1	247	0,6129	3	66.67%
M <sub>2</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	215	0,5785	3	100%
M <sub>3</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	190	0,3247	3	66.67%
M <sub>4</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	197	0,5156	3	66.67%
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,1	236	0,3888	3	100%
M <sub>6</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	184	0,3202	3	100%
M <sub>7</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	130	0,2471	3	66.67%
M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,4	165	0,4270	3	100%
<b>QUISAPINCHA</b>					
M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	96	0,1180	3	100%
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7	124	0,1610	3	100%
M <sub>3</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	6,9	137	0,1818	3	100%

M <sub>4</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	6,8	158	0,2446	3	100%
M <sub>5</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	45	0,0879	3	100%
M <sub>6</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7,2	142	0,2076	3	100%
M <sub>7</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7	149	0,2184	3	100%
M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	6,9	157	0,2327	3	100%

---

**SANTA ROSA**

M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,3	110	0,2784	3	100%
M <sub>2</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,2	125	0,3182	3	100%
M <sub>3</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7	139	0,3444	3	66.67%
M <sub>4</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	113	0,2801	3	100%
M <sub>5</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,2	130	0,3256	3	66.67%
M <sub>6</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,3	148	0,3662	3	100%
M <sub>7</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	135	0,3379	3	100%
M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	6,8	171	0,4239	3	100%

---

**HUACHI GRANDE**

M <sub>1</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7	152	0,3780	3	66.67%
M <sub>2</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	6,8	156	0,3835	3	100%
M <sub>3</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7	64	0,1731	3	100%
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	6,7	101	0,2589	3	100%
M <sub>5</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	84	0,2182	3	66.67%
M <sub>6</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7,2	79	0,2125	3	100%
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	55	0,1454	3	100%

M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	7	46	0,1260	3	100%
--	---	----	--------	---	------

*Nota:* Se presentó un total de 4380 nódulos de las 4 localidades, M<sub>1</sub> corresponde al número de muestra, L<sub>1</sub> es el orden de la localidad en donde se recolectó, C<sub>1-3</sub> comprende los controles de siembra. El porcentaje de recuperación se da en base a los nódulos sembrados sobre el total de aislamientos finales.

**Tabla 10**

*Resumen de parámetros de los nódulos radiculares de T. pratense.*

Muestra	pH promedio suelo	Número de nódulos	Porcentaje promedio del total de nódulos	Promedio número total de nódulos de la raíz	Promedio peso total de los nódulos (g)	Nódulos utilizados	Porcentaje de recuperación
<b>Montalvo</b>							
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub> a M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1-3</sub>	6,2	1564	35.7%	195	0,426	24	83.33%
<b>Quisapincha</b>							
M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub> a M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1-3</sub>	7	1008	24.45%	126	0,181	24	100%
<b>Santa Rosa</b>							
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub> a M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1-3</sub>	7,1	1071	23.02%	134	0,334	24	91.66%
<b>Huachi Grande</b>							
M <sub>1</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub> a M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1-3</sub>	6,9	737	16.83%	92	0,23	24	91.66%

*Nota:* se presentó un pH ligeramente ácido en las zonas sur de la ciudad, la localidad de huachi grande contaba con plantas sumamente jóvenes y en desarrollo, las tres localidades restantes ya contaban con cultivos por época de cría de ganado.

La mayor cantidad de nódulos recolectados se encontró en la parroquia Montalvo (35.7%), Quisapincha (24.45%), Santa Rosa (23.02%) y por último Huachi Grande (16.83%). (Morote & Palomino, 2019a; Wekesa et al., 2021) informa que esto podría deberse a la alta actividad agrícola y sobrecarga de metales pesados por fertilizantes químicos a los suelos en cada parroquia generando un crecimiento anormal en las plantas. Del total de 4380 nódulos recuperados solamente en 10.5 % presentaron coloración roja intensa lo que

indicaba que se encontraban activos por la presencia de leghemoglobina lo que indicó una fijación eficiente de nitrógeno (**Eylenbosch et al., 2018**). Mientras que 80.5% tenían una coloración verde grisácea lo que indicaba que se encontraban inactivos o en fase de muerte, eso según **Pagare (2019)** esto se debe a una degeneración de la leghemoglobina por envejecimiento de los tejidos bacterianos, es decir, una disminución en la fijación de nitrógeno. Por otro lado, el 9% de nódulos presentaron una coloración negra lo que indico que los rizobios se encontraban muertos (**Khan et al., 2018**). De la colección de 96 asilamientos 8 no presentaron crecimiento 4 pertenecientes a los controles M<sub>1</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>L<sub>1</sub>C<sub>1</sub> y M<sub>7</sub>L<sub>1</sub>C<sub>2</sub> de la localidad de Montalvo, 2 pertenecientes a los controles M<sub>1</sub>L<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, M<sub>5</sub>L<sub>4</sub>C<sub>3</sub> de Huachi Grande y 2 pertenecientes a los controles M<sub>3</sub>L<sub>3</sub>C<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>L<sub>3</sub>C<sub>3</sub> de Santa Rosa. **Evdoxia Efstathiadou et al., (2021)** indica que la implementación de hipoclorito de sodio para la esterilización de los nódulos los cuales presenten una herida durante el manejo o extracción de estos puede causar la muerte de los rizobios evitando su proliferación dentro del medio.

Para la selección de nódulos en su mayoría se encontraron en la raíz pivotante y en alta nodulación en la raíz secundaria, sin embargo, en muestras de la localidad de Montalvo se encontraron en mediana nodulación en la raíz principal. **Mens et al., (2021)** detalla que esto se debería a los mecanismos de autorregulación y concentración de nitratos en el suelo, por tal razón se asume que en la zona de Huachi Grande existió una baja concentración de nitratos y escasa nodulación.

**Pan et al., (2018)** indican que la proliferación de los nódulos será directamente proporcional al tamaño, tipo de raíz y necesidad de fijación de nitrógeno. Usualmente los nódulos en el trébol son pequeños, dispersos a lo largo de la raíz y de gran abundancia, mientras que los nódulos grandes son escasos, además, **Khaitov, (2018)** detalla que la escases de magnesio en los suelos causaría en efecto adverso en la multiplicación nodular, lo que se detalla en la Tabla N#10. Por otro lado, estudios realizados por **Nguyen et al., (2020)** indica que la fertilidad del suelo juntamente con los nutrientes minerales (N, Ca, K, P) determinan un factor decisivo en el establecimiento de los rizobios en las leguminosas estimulando o disminuyendo la simbiosis nodular y posteriormente el porcentaje de fijación de nitrógeno. Además, **Razakatiana et al., (2020)** afirman que la

localización de los nódulos en el sistema radicular depende del genotipo de la especie hospedante juntamente con las condiciones ambientales, lo que concuerda a lo observado en las raíces recolectadas del estudio (Nguyen et al., 2020).

Durante el proceso de infección **Pavlovskaya & Gagarina, (2017)** indican que la secreción de lectina y la proliferación de células epidermales al contacto con los rizobios los cuales no tienen capacidad de nodular al huésped, tienden a formar pseudonodulos los cuales carecen de la bacteria formando una estructura semejante. De igual manera detallan que bacterias del género *Agrobacterium* tienen la capacidad de formar nódulos en la zona radicular los cuales pueden ser identificados por el color interno o tienden a ser pálidos en la superficie, estos fueron evidenciados en un 2% del total de nódulos de la zona de Montalvo.

### 3.1.2 Pruebas bioquímicas para la identificación de *rhizobium spp*

**Tabla 11**

*Morfología del Aislado de Rhizobium spp por localidad.*

Características de la Cepa	Montalvo	Quisapincha	Santa Rosa	Huachi Grande
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Tamaño	2-6 mm	2-5 mm	2-5 mm	2-8 mm
Color	Rosado lechoso	Rojo lechoso	Rojo lechoso	Rosado lechoso
Opacidad	Translucido	Semi Translucido	Semi Translucido	Opaco



**Nota:** posterior a las 36 h de inoculación se procedió al análisis morfológico de las colonias considerando que el indicador rojo Congo no haya sido absorbido por la bacteria en el rango de 48 h ya que seria un indicador de contaminación.

Posteriormente a la recolección y caracterización de los nódulos se procedió al aislamiento y purificación de las cepas, durante el proceso de caracterización morfológica un elemento esencial fue la verificación de la absorción del indicador rojo Congo del medio YMA ya que **Triwahyuningsih & Kusmiyarti, (2018)** indica que la absorción de este puede ser debido a la presencia de contaminación por parte de otros microorganismos, sin embargo, **Amel et al, (2018)** señala que a pesar de que esta sea una característica intrínseca de rizobios no es estable, es decir, la concentración del rojo Congo, la edad de la planta y la exposición de las placas a la luz generan que las colonias presenten una coloración de rojo intenso en el centro, hecho que se evidenció en las localidades de Santa Rosa y Quisapincha (Tabla 11).

Se observó que los aislados eran de crecimiento transitorio, ya que las colonias se hacían visibles después de 24 h de la inoculación, la observación microscópica general de los aislados identificó que se trataba de células cilíndricas alargadas y gramnegativas (Tabla 11). Dentro de los cultivos de Santa rosa, Quisapincha, Montalvo y Huachi Grande se encontraron cepas con características del género *Rhizobium*. **Koskey et al., (2018); Odori et al., (2020)** determinan que las especies que pertenecen a este género, comúnmente las colonias presentan una morfología redonda, lisa, elevación convexa, elevada, en ocasiones se presenta plana, con textura elástica, cremosa o acuosa, presentan una apariencia opaca, semitranslúcida o translúcida (dependiendo de la cantidad de lipopolisacáridos que produzca la cepa), permanecen blancas o rosadas, y el tamaño de la colonia oscila de 2-8 mm entre un periodo de dos y siete días de incubación; estas características coincidieron en la morfología de los rizobios de las cuatro localidades de la investigación.

**Koskey et al., (2018)** indica que las colonias que presentan una apariencia translúcida se deben a la concentración de lipopolisacáridos (lípidos A, núcleo sacáridos y antígeno O) que produce el rizobio en la pared celular la cual se proyecta hacia el exterior generando una coloración transparente y una consistencia mucosa o acuosa y gumosa por la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, esta concentración va a depender de la

especie de rizobio Algunos de los aislamientos tienden a producir menos cantidad de lipopolisacáridos que otros, generando de esta manera una apariencia y coloración distinta, hecho que se evidencio en la morfología entre las localidades de Huachi Grande, Montalvo y Santa rosa con Quisapincha (Tabla 11). Además, **Dubois et al., (2019)** indica que esta proyección del de lipopolisacáridos se debe a la presencia de manitol en el medio de cultivo.

**Tabla 12**

*Resultados pruebas bioquímicas de identificación de Rhizobium spp.*

<b>Resultados pruebas bioquímicas y tinción de GRAM para <i>Rhizobium spp.</i></b>										
<b>Aislado</b>	<b>Rojo de metilo</b>	<b>Voges Proskauer</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Hidrolisis de almidón</b>	<b>Sulfuro de hidrogeno (SIM)</b>			<b>Triple sugar Iron agar (TSI)</b>	<b>Utilización de Citrato</b>	<b>Tinción de GRAM</b>
					<b>Producción H<sub>2</sub>S</b>	<b>Prueba de Indol</b>	<b>Movilidad</b>			
<b>MONTALVO</b>										
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>4</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
<b>QUISAPINCHA</b>										
M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>6</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
<b>SANTA ROSA</b>										
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>3</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
<b>HUACHI GRANDE</b>										
M <sub>1</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>1</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>2</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>3</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

M <sub>6</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo

*Nota: Rojo de Metilo: positivo, indicador de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de glucosa; Voges Proskauer: positivo para la presencia de acetoína, producto de la fermentación de glucosa; Catalasa: positivo para la presencia de la enzima; Hidrolisis de almidón: positivo presencia de halos transparentes; Sulfuro de hidrogeno: positivo para enturbiamiento del medio (no se produjo H<sub>2</sub>S ni las bacterias contenían la enzima triptófanasas que permitía convertir el aminoácido triptófano en indol); Triple sugar Iron: negativo descarte que la bacteria en estudio pertenezca a la familia de Enterobacterias; Utilización de Citrato: positivo y negativo en la utilización de citrato como única fuente de carbono y energía.*

**Tabla 13**  
Resumen de los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación de *Rhizobium spp.*

<b>Resultados pruebas bioquímicas y tinción de GRAM para <i>Rhizobium spp.</i></b>										
Aislado	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Sulfuro de hidrogeno (SIM)			Triple sugar Iron agar (TSI)	Utilización de Citrato	Tinción de GRAM
					Producción H <sub>2</sub> S	Prueba de Indol	Movilidad			
<b>Montalvo</b>										
M <sub>1-8</sub> L <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
<b>Quisapincha</b>										
M <sub>1-8</sub> L <sub>2</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
<b>Santa Rosa</b>										
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
<b>Huachi Grande</b>										
M <sub>1-8</sub> L <sub>1</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	+	Bacilos de color rojo
M <sub>6</sub> L <sub>4</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub>	+	+	+	+	H <sub>2</sub> S-	Ind -	Mov+	N/N--	-	Bacilos de color rojo

**Nota:** existe una homogeneidad bioquímica en los resultados de las pruebas bioquímicas

**Tabla 14***Morfología de Rhizobium spp. en agar levadura manitol suplementado con púrpura de bromocresol*

<b>Aislamiento</b>	<b>Morfología de la colonia en YMA-Bromotimol</b>	<b>Prueba YMA + púrpura de bromocresol</b>
<b>Montalvo</b>		
M <sub>1</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>2</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>3</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>4</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
M <sub>5</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>6</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>7</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>8</sub> L <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
<b>Quisapincha</b>		
M <sub>1</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
M <sub>3</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido

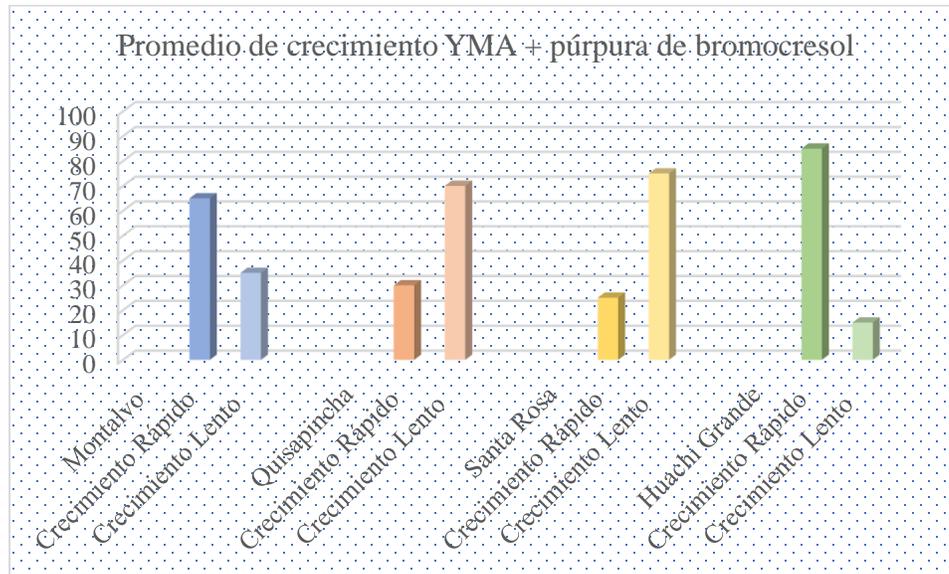
M <sub>4</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>5</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>6</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>7</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>8</sub> L <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
<b>Santa Rosa</b>		
M <sub>1</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>2</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>3</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>4</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>5</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>6</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>7</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>8</sub> L <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
<b>Huachi</b>		

---

M <sub>1</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>2</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
M <sub>3</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>4</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Amarillo, redondo, no se extiende	Crecimiento rápido
M <sub>5</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
M <sub>6</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco pálido y abultado	Crecimiento lento
M <sub>7</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento
M <sub>8</sub> L <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Blanco hueso, irregular, no se extiende, liso, plano, opaco	Crecimiento lento

---

*Nota: la implementación de esta prueba bioquímica enfoca los resultados a posibles especies que tienen la característica de contar un con crecimiento rápido o lento*



**Figura N°7** Porcentaje de crecimiento por localidad en YMA + púrpura de bromocresol

La caracterización bioquímica de los aislamientos ayudó a comprobar las capacidades metabólicas y resistencia a condiciones adversas de crecimiento, mostrando una heterogeneidad en la población de rizobios de las cuatro localidades de Tungurahua. **American Society of Microbiology, (2016)** asegura que los resultados de estas pruebas generan un banco de información para seleccionar diferentes propiedades que las cepas ofrecen y manipular genes simbióticos.

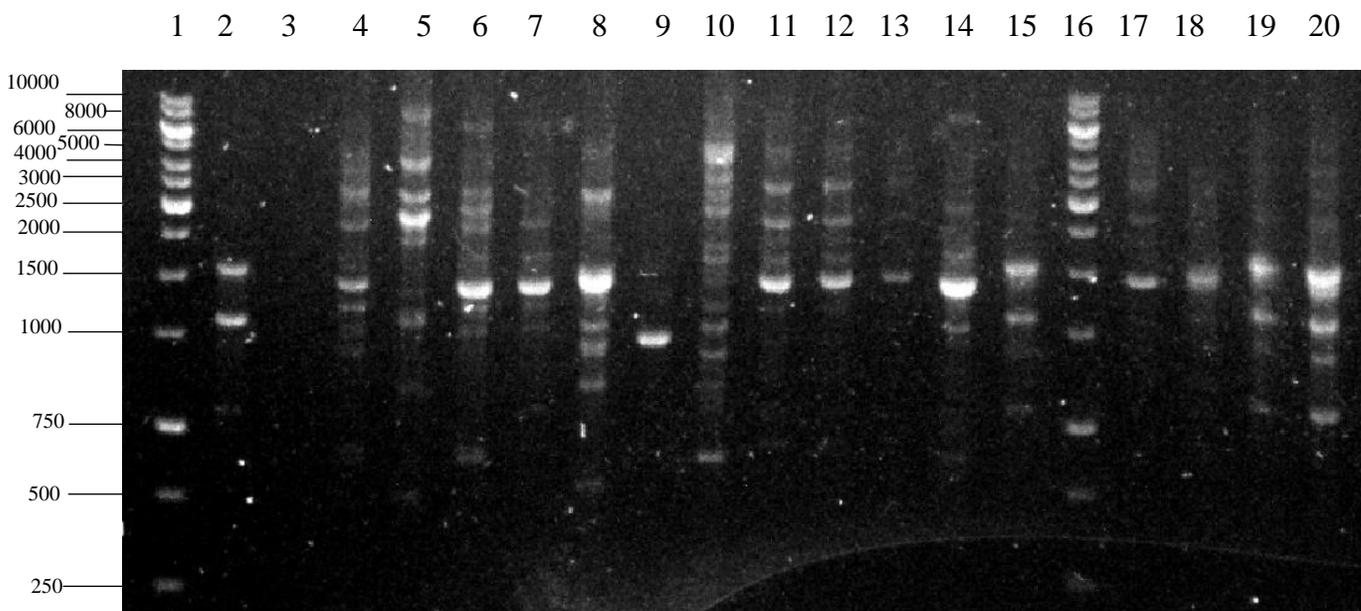
En las pruebas rojo de metilo y voges proskaguer el resultado fue positivo lo que indico que el microorganismo fermentaba glucosa por la vía butanodiolica, además era capaz de acidificar el medio gracias a los ácidos provenientes por la fermentación de la glucosa. **El-Harty et al., (2021)** indica que la bacteria no tiene la capacidad de reaccionar dentro de este medio, sin embargo, **Hawkins & Oresnik, (2022)** detalla que las raíces de las plantas al momento de ser colonizadas por rizobacterias no solo pueden estimular el crecimiento de las plantas sino también aumentar la tolerancia al estrés de metales pesados mediante la producción de

compuestos orgánicos volátiles. De esta manera se puede deducir que el contenido de metales pesados por el uso agresivo de abonos químicos pudo alterar las condiciones de desarrollo endosimbiótico en los cuales existió una producción de compuestos capaces de producir actividad antioxidante al estrés por estos metales, generando además reacciones bioquímicas capaces de reaccionar en el medio R.M.V.P. por lo que las cepas pudieron ya tener esta capacidad al momento de ser aisladas.

Al realizar la prueba de catalasa se observó la presencia de burbujas en las muestras bacterianas, esta reacción se dio gracias a la enzima catalasa la cual es producida por la bacteria dentro de un regulón que compone los factores de función extracitoplasmática en respuesta al estrés generado por la presencia del peróxido de hidrogeno la cual genera hidrolisis lo que provoca que se libere agua y oxígeno de manera instantánea (**Goyal et al., 1986; Kajić et al., 2020**). Por otro lado, se obtuvieron resultados positivos en el ensayo de hidrólisis del almidón, al someter las placas inoculadas a la prueba del yodo se observaron zonas claras alrededor de las colonias y las colonias adquirieron un aspecto amarillo, mientras que el color azul aparece en las zonas sin crecimiento, esto indicó que los aislados tuvieron capacidad de hidrolizar el almidón del medio resultados que concuerdan con investigaciones realizadas por **Mir et al., (2020)**. Existieron resultados negativos para la presencia de la enzima triptofanasa al no metabolizar las peptonas y triptófano componentes principales del agar SIM por lo cual al utilizar el reactivo de Ehrlich no existió reacción, de igual manera la bacteria no tenía la capacidad de generar ácido sulfúrico arrojando un resultado negativo H<sub>2</sub>S-, por otro lado, existió un enturbiamiento del medio indicando un resultado positivo a la movilidad. **Bergey & Boone, (2001)** indica que el género *Rhizobium* no tiene la capacidad de reaccionar a esta prueba, sin embargo, estudios realizados por **Tambalo et al., (2010)** detalla que estas bacterias pertenecientes a la especie *R. leguminosarum*. generan una resistencia a antibióticos por lo cual el resultado a la movilidad en esta prueba sería positivo concordando con el resultado de la investigación. Además, se obtuvieron resultados negativos en el ensayo Triple Sugar Iron **Bergey & Boone, (2001)** indica que la bacteria no tiene reacción en el medio lo que indicó que las cepas pertenecen al orden *Rhizobiales* de esta manera se descartó que existió un contaminante en la purificación de las cepas.

Existieron diferencias entre cepas de la misma localidad al realizar las pruebas bioquímicas. **Borkar, (2019)** asegura que la capacidad que tienen los microorganismos para crecer en condiciones diferentes puede variar significativamente, sin embargo, existen características específicas que a pesar de tener condiciones extremas se puede diferenciar entre géneros o categorías. De esta manera los resultados obtenidos en la investigación concuerdan con **Talabani et al., (2019)** en donde encontraron que la utilización de citrato como única fuente de carbono era positiva en *R. phaseoli* y *R. trifolii* comprobando que a pesar de no conocer a que especie pertenece las cepas aisladas el resultado está dentro del género *Rhizobium*, por otro lado, tres muestras de la colección de 88 dieron resultado negativo a la prueba lo que posiblemente pueda pertenecer a la especie *R. leguminosarum*.

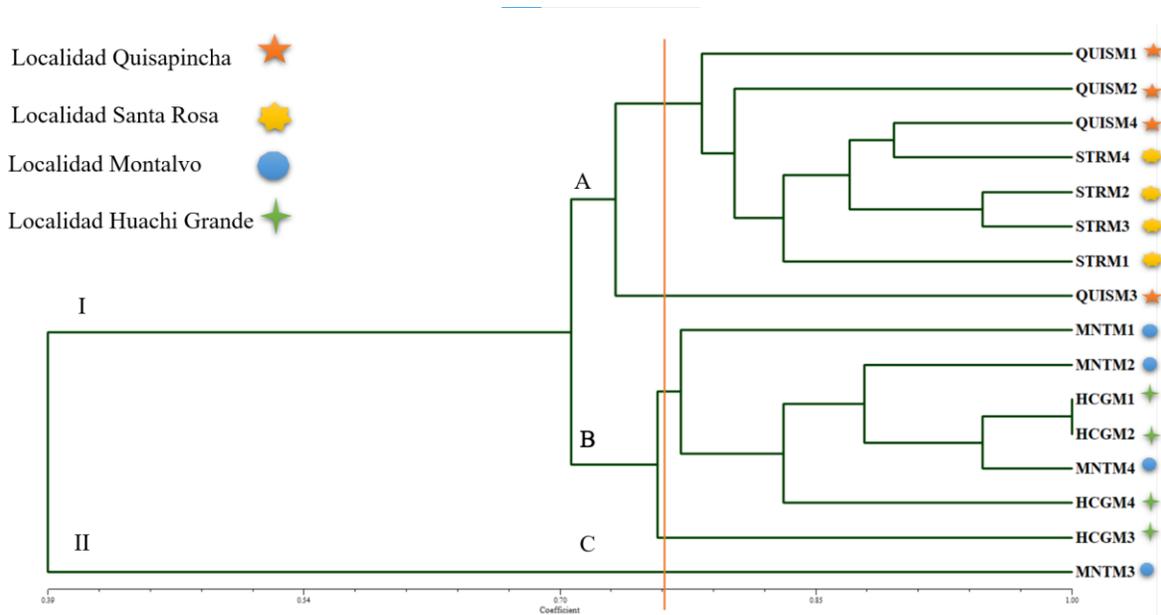
### 3.1.3 Análisis UPGMA de *Rhizobium spp*



**Figura 8:** Patrones electroforéticos de rizobacterias de nódulos de *T. pratense*, obtenidos por PCR fingerprinting con primer BOXA1R. Marcador de PM 1 Kb en carril 1 y 16

La técnica de identificación por PCR fingerprinting se basa en el uso de cebadores (oligonucleótidos), que corresponden a patrones conservados en elementos de ADN repetitivos intercalados de origen natural, estos se utilizan para la evaluación de la diversidad genómica de rizobios aislados de nódulos radiculares de diferentes especies de leguminosa (Odori et al., 2020).

En la Figura 9 se presenta el dendograma obtenido por la colección de aislamientos, según el sitio de procedencia se observa una significativa diversidad que puede agruparse en clusters de mayor o menor tamaño de acuerdo con el porcentaje de similitud que se escoja para trazar la línea de corte. Si bien los grupos y subgrupos son en cierto modo arbitrarias, en todos los casos se tomaron líneas de corte con porcentajes de similitud inferiores a la similitud necesaria para considerar que los aislamientos pertenecen a una cepa en común (Chibeba et al., 2020; Efstathiadou et al., 2020).



**Figura 9.** Dendograma de agrupamiento por similitud molecular realizada a las 16 cepas de rizobios asociados a los nódulos de trébol violeta (*T. Pratense*)

**Tabla 16**

*Agrupación de rizobios de trébol violeta por similitud molecular*

<b>Agrupamiento</b>	<b>Numero de cepas</b>	<b>Coefficiente de Similitud</b>
I	15	71%
II	1	39%

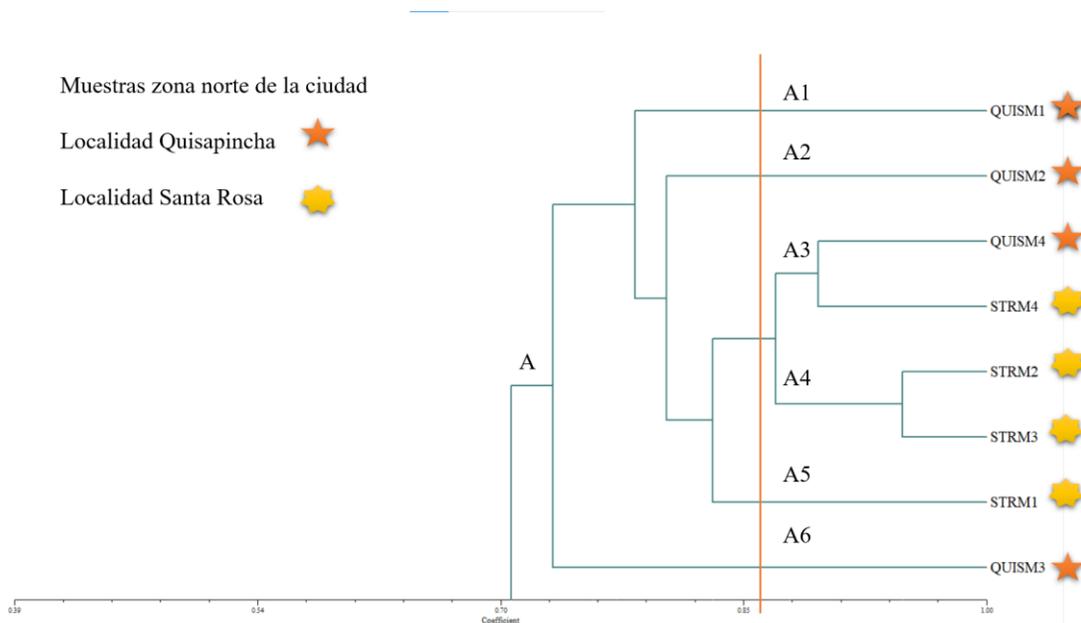
*Nota: 15 cepas formaron un subgrupo con mayor similitud, se asume mediante el resultado de pruebas bioquímicas que la cepa mas alejada puede pertenecer al género Sinorhizobium o Bradyrhizobium.*

La Figura 9 indica el dendograma obtenido del agrupamiento por similitud molecular con un coeficiente de similitud de un 71%; Con el objeto de observar la relación genotípica de los aislamientos, el resultado del agrupamiento obtenido dio la formación del grupo I y grupo II. El grupo I formó el subgrupo A y B, donde se observaron quince aislamientos provenientes del sector Huachi, Montalvo, Santa Rosa y Quisapincha, mientras que el grupo II formó el subgrupo C en donde solamente destacó una muestra proveniente de Montalvo siendo la más alejada con un coeficiente de similitud del 39%.

En base al dendograma que se muestra en la Figura 10 se relaciona la ubicación geográfica en donde se encuentra la muestra con sus condiciones climáticas y la medida de alcalinidad o acidez del suelo en la locación. Como se puede observar, el subgrupo A destaca muestras provenientes de la región norte del cantón (Santa Rosa y Quisapincha) conformando un total de 6 subdivisiones de las cuales tienen un coeficiente de similitud de un 73%, mientras que el subgrupo B destaca muestras provenientes de la región sur del cantón (Montalvo y Huachi Grande) conformando un total de 5 subdivisiones con un coeficiente de similitud del 76%. **Roper et al., (2020)** indica que las zonas agroclimáticas constituyen un reservorio de genes de fijación de nitrógeno de gran importancia ya que la alta capacidad de adaptabilidad de *Rhizobium* a suelos agrícolas ha permitido la formación de nódulos en diferentes especies de leguminosas. Además, indican que el proceso de adaptabilidad al hospedero depende del estado de crecimiento de la planta, por lo tanto, se evidencia que el coeficiente de similitud es

directamente proporcional al desarrollo y al proceso endosimbiótico ya que se contrasta en el tamaño y longitud de las especies pertenecientes al Norte las cuales presentaron una medida menor a las especies de la zona sur (Anexo 1).

El trébol violeta al ser una especie de forraje su rotación en los suelos es muy alta, **según Sfook et al., (2019)** el rizobio simbiote se ha ido adaptando de acuerdo con el hospedero de esta manera existe una especie característica para cada leguminosa, sin embargo, factores externos como estrés hídrico, salino, mecánico, ausencia o exceso de nutrientes, etc., han generado cambios en el desarrollo y adaptabilidad de la planta, por lo que se puede indicar que posiblemente *R. leguminosarum* *bv. Trifolii* sea la especie simbiote en el trébol violeta, de esta manera se conforma el grupo I y no obstante los factores de estrés pudieron causar alteraciones en los factores de nodulación y transcripción de la bacteria en la planta ante respuesta a los mismos subdividiendo molecularmente la especie en base a las necesidad de supervivencia.



**Figura 10.** Dendrograma de agrupamiento por similitud molecular Grupo I subgrupo A asociados a los nódulos de trébol violeta (*T. Pratense*).

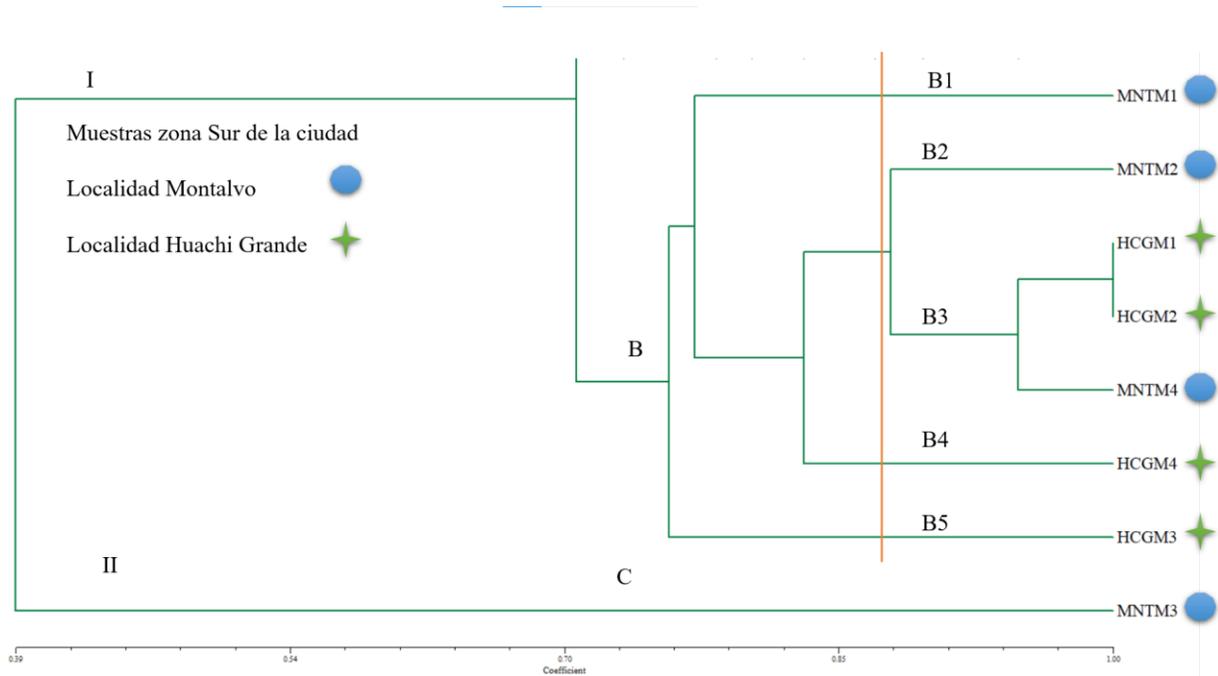
**Tabla 17**

*Conglomerados del subgrupo A de rizobios de trébol violeta por similitud molecular*

<b>Conglomerado</b>	<b>Numero de cepas</b>	<b>Coefficiente de Similitud</b>
A1	1	77%
A2	1	81%
A3	2	87%
A4	2	92%
A5	1	83%
A6	1	74%

*Nota: se evidencio un conglomerado de 8 cepas pertenecientes a la zona norte del cantón.*

**Efstathiadou et al., (2020)** aseguran que las características morfofisiologías muestran una alta diversidad entre poblaciones de rizobios y que esta diversidad tiende a estar relacionadas con estudios bioquímicos y moleculares. Los subgrupos A2, A3, A4 y A5 son los que presentan un coeficiente de similitud mayor al 80%. Como se puede evidenciar en la tabla 15 el crecimiento poblacional de los rizobios dentro de la zona norte destacó por ser de crecimiento lento en un promedio de 72.5% de las de cepas aisladas, de las cuales la locación de Santa rosa presentó la particularidad de tener la población de rizobios más lenta, lo que se evidencia en el Clúster conformado por los subgrupos A3, A4 y A5. Por otro lado, el pH del desarrollo de las plántulas en la zona norte fue neutro (7) y ligeramente alcalino (7.1) de igual manera las localidades presentaron una media de temperatura de 18°C lo que destaca en la homología del clúster del subgrupo A3 donde se encuentran muestras de ambas localidades.



**Figura 11.** Dendrograma de agrupamiento por similitud molecular Grupo I subgrupo B asociados a los nódulos de trébol violeta (*T. Pratense*).

**Tabla 18**

*Conglomerados del subgrupo B de rizobios de trébol violeta por similitud molecular*

<b>Conglomerado</b>	<b>Numero de cepas</b>	<b>Coefficiente de Similitud</b>
B1	1	77%
B2	1	80%
B3	3	87%
B4	1	82%
B5	1	75%

**Nota:** se evidencio un conglomerado de 7 cepas con una homología del 100% en un cluster de la misma localidad.

De los aislados de rizobios en la Figura 11 se destaca la homología molecular de las muestras HCGM1 y HCGM2, sin embargo, en la realización de la prueba con purpura de bromocresol estas exhibieron características diferentes ya que una era de crecimiento rápido y la otra de crecimiento lento, estudios realizados por **Efstathiadou et al., (2020)**; **Kajić et al., (2020)**; **Koskey et al., (2018)** detallan que esta similitud pudo darse por el tipo de muestreo, el primer BOX-A1R el cual es un estándar en la amplificación de bacterias en la familia *Rhizobiaceae*, el tipo de aislamiento de la bacteria y la proliferación de la plántula en la zona de cultivo. De igual manera, el desarrollo de las plántulas se dio a una temperatura promedio de 11°C en un suelo ligeramente ácido (pH 6.2 - 6.9). Así mismo el crecimiento poblacional de los rizobios dentro de la zona sur destacó por ser de crecimiento rápido en un promedio de 75% de las cepas aisladas.

Los hallazgos de este estudio son consistentes con algunas investigaciones en regiones tropicales realizadas por varios autores, quienes encontraron una diversidad de especies de rizobios formando nódulos en varias plantas leguminosas en diferentes lugares. **Mir et al., (2020)**; **Roper et al., (2020)** señalaron que los trópicos son un importante reservorio de genes de fijación de nitrógeno. Finalmente, se aislaron cepas que exhibieron la capacidad de crecer en condiciones consideradas diferentes y exhibieron mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Estas podrían ser considerados para evaluación en invernadero y ensayos de campo para confirmar las respuestas obtenidas en laboratorio, lo que los convierte en buenos candidatos para el diseño y elaboración de biofertilizantes que respondan a Tungurahua y otras características ambientales y de cultivo del área de estudio en la provincia.

### **3.2 Verificación de la hipótesis.**

Hipótesis nula rechazada. Los nódulos pertenecientes a la leguminosa *T. pratense* representan reservorios de aislamientos de *Rhizobium spp.* Del total de 96 nódulos sembrados, 88 (91.66%) mostraron simbiosis con rizobios.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

- Se aisló 88 cepas pertenecientes al género *Rhizobium* de parcelas agrícolas establecidos en nódulos de *T. pratense* de cuatro localidades del cantón Ambato-Tungurahua.
- Se identificó una homogeneidad bioquímica en los resultados de las pruebas bioquímicas de cepas de rizobios del cantón Ambato; estas pruebas no son concluyentes para identificar géneros y especies de estas bacterias, sin embargo, podrían pertenecer a la especie *Rhizobium phaseoli* y *leguminosarum* *bv. Trifolii*,
- El análisis de conglomerados con el método del vecino más cercano utilizando como entrada el análisis binario del gel de agarosa indica la formación de dos grupos de cepas de rizobios asociados a localidades en el Norte (51,25% cepas son de crecimiento rápido) y Sur (49,75% cepas de crecimiento lento) del cantón Ambato.
- Existe una mediana diversidad morfológica y molecular de los rizobios recolectados en los suelos del cantón Ambato, con características particulares de gran interés para el desarrollo de nuevos estudios y elaboración de bioproductos.

## **4.2. Recomendaciones**

- Caracterizar molecularmente a nivel de especie a los rizobios nativos del cantón Ambato en otras localidades
- Evaluar el uso de nuevas metodologías en la caracterización bioquímica implementando pruebas en base al Manual de Bergey's
- Realizar un estudio de suelos de las localidades de recolección, con el fin de evaluar si existen factores externos que generen estrés o resistencia a las cepas recolectadas.
- Realizar un protocolo de estandarización de aislamiento de rizobios manejando diferentes estándares en la composición de medios de cultivo.

## MATERIAL DE REFERENCIA

- Amel, B., Sihem, T., Faiza, O., & Mohamed, O. S. (2018). Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria. *Legume Research*, *41*(4), 624–628. <https://doi.org/10.18805/LR-399>
- American Society of Microbiology. (2016). Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. <https://doi.org/10.1128/9781555818814.CH3.17.1>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z. L., Li, Q., Zeng, X. P., Liu, Y., & Li, Y. R. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. *Biological Research 2020 53:1*, *53*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S40659-020-00312-4>
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., & Schleifer, K.-H. (1992). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1>
- Behera, L., Datta, D., Kumar, S., Kumar, S., Sravani, B., & Chandra, R. (2022). Role of microbial consortia in remediation of soil, water and environmental pollution caused by indiscriminate use of chemicals in agriculture: Opportunities and challenges. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Sustainable Agriculture: Advances in Microbe-Based Biostimulants*, 399–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85577-8.00019-6>
- Bergey, D. H., & Boone, D. R. (2001). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part 3. In *FEMS Immunology Medical Microbiology*.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (2017). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part .1 In *FEMS Immunology Medical Microbiology* .

- Borkar, S. G. (2019). Biochemical Tests Used in Identification of Bacteria. *Laboratory Techniques in Plant Bacteriology*. <https://doi.org/10.1201/9781315206882-17>
- Buszewski, B., Rafińska, K., Cvetanović, A., Walczak, J., Krakowska, A., Rudnicka, J., & Zeković, Z. (2019). Phytochemical analysis and biological activity of *Lupinus luteus* seeds extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Phytochemistry Letters*, *30*, 338–348. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2019.02.014>
- Chibeba, A. M., Pereira, C. S., Antunes, J. E. L., Ribeiro, R. A., de Almeida Lopes, A. C., Gomes, R. L. F., Hungria, M., & Araujo, A. S. F. (2020). Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. *Symbiosis*, *80*(3), 279–292. <https://doi.org/10.1007/S13199-020-00672-1>
- De, J., López-Alcocer, J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2018). Morphological and biochemical characterization of rhizobium strains collected from wild and domesticated common bean. *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex*, *40*(1), 73–81.
- Dekak, A., Chabi, R., Menasria, T., & Benhizia, Y. (2018). Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of Advanced Research*, *14*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2018.06.001>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (2019). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/AC60111A017>
- Efstathiadou, E., Savvas, D., & Tampakaki, A. P. (2020). Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba L.*) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(6). <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2020.126149>

- El-Harty, E. H., Ghazy, A., Alateeq, T. K., Al-Faifi, S. A., Khan, M. A., Afzal, M., Alghamdi, S. S., & Migdadi, H. M. (2021). Morphological and Molecular Characterization of Quinoa Genotypes. *Agriculture* 2021, Vol. 11, Page 286, 11(4), 286. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11040286>
- Elpel, T. J. (2000). *Botany in a Day: Herbal Field Guide to Plant Families* 4ta ed., Vol. 1. HOPS Press. [https://books.google.com/books/about/Botany\\_in\\_a\\_Day.html?hl=es&id=PS7kPgAACAAJ](https://books.google.com/books/about/Botany_in_a_Day.html?hl=es&id=PS7kPgAACAAJ)
- Evdoxia Efstathiadou, Georgia Ntatsi, Dimitrios Savvas, & Anastasia P.Tampakaki. (2021). *Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating Phaseolus vulgaris in Greece*. *Sci Rep* 11, 8674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>
- Eylenbosch, D., Dumont, B., Baeten, V., Bodson, B., Delaplace, P., & Pierna, J. (2018). Quantification of leghaemoglobin content in pea nodules based on near infrared hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics. *Journal of Spectral Imaging*, undefined-undefined. <https://doi.org/10.1255/JSI.2018.A9>
- F. J. Rohlf. (1998). *NTSYS-pc Version. 2.02i Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software . Scientific Research Publishing. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=408228](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=408228)
- George M. Briggs. (2022). *Rhizobio- bacterias fijadoras de nitrógeno* . [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/Vida\\_inanimada\\_\(Briggs\)/02%3A\\_A\\_Organismos/2.42%3A\\_Rhizobio-\\_bacterias\\_fijadoras\\_de\\_nitr%C3%B3geno](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/Vida_inanimada_(Briggs)/02%3A_A_Organismos/2.42%3A_Rhizobio-_bacterias_fijadoras_de_nitr%C3%B3geno)
- Goyal, V., Chetal, S., & Nainawatee, H. S. (1986). Alterations in *Rhizobium trifolii* catalase under water stress. *Folia Microbiologica*, 31(2), 164–166. <https://doi.org/10.1007/BF02926835>

- Hawkins, J. P., & Oresnik, I. J. (2022). The Rhizobium-Legume Symbiosis: Co-opting Successful Stress Management. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.796045/PDF>
- Herbert, D. B., Ekschmitt, K., Wissemann, V., & Becker, A. (2018). Cutting reduces variation in biomass production of forage crops and allows low-performers to catch up: A case study of *Trifolium pratense* L. (red clover). *Plant Biology*, 20(3), 465–473. <https://doi.org/10.1111/PLB.12695>
- Ibáñez, F., Wall, L., & Fabra, A. (2017). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1905–1918. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERW387>
- INEC. (2022). *INEC-Censo de Población y Vivienda 2010*. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Geografia\\_Estadistica/Micrositio\\_geoportal/marco-geoestadistico-2022.html](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Geografia_Estadistica/Micrositio_geoportal/marco-geoestadistico-2022.html)
- INEC, & ESPAC. (2021, August). *Módulo de Información Ambiental y Tecnificación Agropecuaria*. Prácticas Que Los Agricultores Realizan Con El Objetivo de Fortalecer La Producción y Mejorar La Competitividad Del Sector Agropecuario Del País. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/Modulo\\_Ambiental\\_ESPAC\\_2020/PRINC\\_RESUL\\_MOD\\_AGROTEC\\_2020\\_08\\_4.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Modulo_Ambiental_ESPAC_2020/PRINC_RESUL_MOD_AGROTEC_2020_08_4.pdf)
- Jones, C., de Vega, J., Lloyd, D., Hegarty, M., Ayling, S., Powell, W., & Skøt, L. (2020). Population structure and genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-64989-Z>
- Kajić, S., Krznarić, D., Rajnović, I., & Sikora, S. (2020). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 21(1), 151–158. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.1.2525>

- Khaitov, B. (2018). Effects of Rhizobium inoculation and magnesium application on growth and nodulation of soybean (*Glycine max L.*). *Journal of Plant Nutrition*, 41(16), 2057–2068. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1485164>
- Khan, M. R., Mohiddin, F. A., & Ahamad, F. (2018). Inoculant rhizobia suppressed root-knot disease, and enhanced plant productivity and nutrient uptake of some field-grown food legumes. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 68(2), 166–174. <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1374448>
- Koskey, G., Mburu, S. W., Kimiti, J. M., Ombori, O., Maingi, J. M., & Njeru, E. M. (2018). Genetic characterization and diversity of Rhizobium isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). [https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00968/FMICB\\_09\\_00968\\_PDF.PDF](https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00968/FMICB_09_00968_PDF.PDF)
- Liang, J., Klingl, A., Lin, Y. Y., Boul, E., Thomas-Oates, J., & Marín, M. (2019). A subcompatible rhizobium strain reveals infection duality in Lotus. *Journal of Experimental Botany*, 70(6), 1903–1913. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ057>
- Liang, Y. M., Su, Y. R., He, X. Y., & Chen, X. B. (2018). Structure Analysis of Arbuscular Mycorrhizal in Roots from Different Shrubs in Karst Regions. *Huanjing Kexue/Environmental Science*, 39(12), 5657–5664. <https://doi.org/10.13227/J.HJKX.201804117>
- Lim, T. K. (2014). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 7, flowers. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers*, 7, 1–1102. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7395-0/COVER>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvvhg, L. v فاطمی, ح. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25–40. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>

- McKenna, P., Cannon, N., Conway, J., Dooley, J., & Davies, W. P. (2018). Red clover (*Trifolium pratense*) in conservation agriculture: a compelling case for increased adoption. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 16(4–5), 342–366. <https://doi.org/10.1080/14735903.2018.1498442>
- Mendoza-Suárez, M. A., Geddes, B. A., Sánchez-Cañizares, C., Ramírez-González, R. H., Kirchhelle, C., Jorin, B., & Poole, P. S. (2020). Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N<sub>2</sub> fixation in nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(18), 9822–9831. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1921225117/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Mens, C., Hastwell, A. H., Su, H., Gresshoff, P. M., Mathesius, U., & Ferguson, B. J. (2021). Characterisation of *Medicago truncatula* CLE34 and CLE35 in nitrate and rhizobia regulation of nodulation. *New Phytologist*, 229(5), 2525–2534. <https://doi.org/10.1111/NPH.17010>
- Mir, M. I., Nagabhusanam, B., Quadriya, H., Kiran Kumar, B., & Hameeda, B. (2020). Morphological, biochemical and intrinsic antibiotic resistance of rhizobia isolated from root and stem nodules of various leguminous plants. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(71–72).
- Mirza Hasanuzzaman, Susana Araújo, & Sarvajeet Singh Gill. (2020). The Plant Family Fabaceae, Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses. *The Plant Family Fabaceae*. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2>
- Morote, C. G.-B., & Palomino, M. S. (2019). Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes. *Investigación*, 27(1), 175 – 195. <https://doi.org/10.51440/UNSCH.REVISTAINVESTIGACION.2019.1.119>
- Nguyen, T. D., Andrews, M., Ley, T. W. S., Dash, D., Petterson, M., Weir, B. S., Morton, J. D., Black, A. D., & Lucas, R. J. (2020). Caucasian clover (*Trifolium ambiguum*) specific rhizobia persist in low and high fertility soils in the South Island of New Zealand. *New*

- Zealand Journal of Agricultural Research*, 63(3), 332–340.  
<https://doi.org/10.1080/00288233.2019.1589538>
- Odori, C., Ngaira, J., Kinyua, J., & Nyaboga, E. N. (2020). Morphological, genetic diversity and symbiotic functioning of rhizobia isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) in soils of Western Kenya and their tolerance to abiotic stress. *Cogent Food and Agriculture*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1853009>
- Pacsi Muñoz, K. E., & Gallardo Vela, C. (2021). Identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en pollos de engorde suplementados con diferentes aditivos comerciales. *Repositorio Institucional – UCS*. <https://hdl.handle.net/20.500.12805/2053>
- Pagare, K. A., Navale, A. M., Naik, R. M., & Durgude, A. G. (2019). Effect Of Inoculation Of Salt Tolerant *Rhizobium* On Nodulation And Leghaemoglobin Content Of Soybean. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 12(2), 377–383. <https://doi.org/10.21786/BBRC/12.2/21>
- Pahalvi, H. N., Rafiya, L., Rashid, S., Nisar, B., & Kamili, A. N. (2021). Chemical Fertilizers and Their Impact on Soil Health. *Microbiota and Biofertilizers*, Vol 2, 1–20. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_1)
- Pan, H., Stonoha-Arther, C., & Wang, D. (2018). Medicago plants control nodulation by regulating proteolysis of the receptor-like kinase DMI2. *Plant Physiology*, 177(2), 792–802. <https://doi.org/10.1104/PP.17.01542>
- Pavlovskaya, N. E., & Gagarina, I. N. (2017). The physiological properties of plant lectins as a prerequisite for their application in biotechnology. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 1, 21–35. <https://doi.org/10.14258/JCPRM.2017011298>
- Pérez Salinas, R. N. (2021). Aislamiento caracterización y efecto de dos cepas de *Rhizobium* sobre el crecimiento en *Lupinus mutabilis* bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes. <http://dspace.utpl.edu.ec/jspui/handle/20.500.11962/29348>

- Pérez-González, A., Gómez-Peralta, J. I., Garza-Ortiz, A., & Barba-Behrens, N. (2012). The relevance of molybdenum in biological systems and its role in the mononuclear enzymes with the Moco cofactor. *Educacion Quimica*, 23(1), 24–33. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(17\)30094-0](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(17)30094-0)
- Razakatiana, A. T. E., Trap, J., Baohanta, R. H., Raherimandimby, M., le Roux, C., Duponnois, R., Ramanankierana, H., & Becquer, T. (2020). Benefits of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on *Phaseolus vulgaris* planted in a low-fertility tropical soil. *Pedobiologia*, 83. <https://doi.org/10.1016/J.PEDOBI.2020.150685>
- Roper, W. R., Duckworth, O. W., Grossman, J. M., & Israel, D. W. (2020). Rhizobium leguminosarum strain combination effects on nodulation and biological nitrogen fixation with *Vicia villosa*. *Applied Soil Ecology*, 156. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2020.103703>
- Rutten, P. J., Steel, H., Hood, G. A., Ramachandran, V. K., McMurtry, L., Geddes, B., Papachristodoulou, A., & Poole, P. S. (2021). Multiple sensors provide spatiotemporal oxygen regulation of gene expression in a *Rhizobium*-legume symbiosis. *PLOS Genetics*, 17(2), e1009099. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009099>
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Durán, D., Nadendla, S., Albareda, M., Rubio-Sanz, L., Lanza, M., González-Guerrero, M., Prieto, R. I., Brito, B., Giglio, M. G., Rey, L., Ruiz-Argüeso, T., Palacios, J. M., & Imperial, J. (2018). Genomic Diversity in the Endosymbiotic Bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Genes* 2018, Vol. 9, Page 60, 9(2), 60. <https://doi.org/10.3390/GENES9020060>
- Schulte, C. C. M., Borah, K., Wheatley, R. M., Terpolilli, J. J., Saalbach, G., Crang, N., de Groot, D. H., Ratcliffe, R. G., Kruger, N. J., Papachristodoulou, A., & Poole, P. S. (2021). Metabolic control of nitrogen fixation in *rhizobium*-legume symbioses. *Science Advances*, 7(31). [https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABH2433/SUPPL\\_FILE/SCIADV.ABH2433\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABH2433/SUPPL_FILE/SCIADV.ABH2433_SM.PDF)

- Sfook, A. A., Negamish, R. G., & Ali, M. S. (2019). Survey and distribution of symbiotic bacteria nodules *rhizobium spp* and determine its effectiveness in nitrogen fixation. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 28(20), 174–182.
- Shoaib, M., Muzammil, I., Hammad, M., Bhutta, Z. A., & Yaseen, I. (2020). A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. *International Journal of Research Publications*, 54(1), undefined-undefined. <https://doi.org/10.471119/IJRP100541620201224>
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. *Plants 2020*, Vol. 9, Page 1011, 9(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9081011>
- Soundarya, K. R., Bhavana, D., Harsha, T. S., & Prasad, N. (2022). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Rhizobium spp.* from *Mimosa pudica* . *International Journal Peer Reviewed Journal Refereed Journal Indexed Journal Impact Factor SJIF*. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/AJBX2>
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40–56. <https://doi.org/10.1111/NPH.14474>
- Stephen C. Wagner. (2018). *Biological Nitrogen Fixation | Learn Science at Scitable*. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>
- Tak, A., Gehlot, P., Pathak, R., & Singh, S. K. (2017). *Species Diversity of Rhizobia*. 215–245. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5_11)
- Talabani, S. K., Fattah, O. A., & Khider, A. K. (2019). Classical and molecular approaches for identification of *rhizobium leguminosarium*, *azotobacter chroococcvm* and *bacillus*

- megaterium. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(5), 12491–12506.  
[https://doi.org/10.15666/AEER/1705\\_1249112506](https://doi.org/10.15666/AEER/1705_1249112506)
- Tambalo, D. D., Yost, C. K., & Hynes, M. F. (2010). Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiology Letters*, 307(2), 165–174.  
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2010.01982.X>
- Tang, M., & Capela, D. (2020). Rhizobium diversity in the light of evolution. *Advances in Botanical Research*, 94, 251–288. <https://doi.org/10.1016/BS.ABR.2019.09.006>
- Thomé, O. W., & Migula, W. (2000). Flora of Germany, Austria and Switzerland. In *Prof. dr. Thomé's Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, in wort und bild, für schule und haus ... mit ...* <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5360>
- Triwahyuningsih, N., & Kusmiyarti, T. B. (2018). Isolation, characterization and inoculum formulation of nodule forming bacteria of kudzu (*pueraria phaseoloides* (roxb.)Benth.) For coastal sandy land conservation . *International Journal of Biosciences and Biotechnology*, 6(1), 10. <https://doi.org/10.24843/IJBB.2018.V06.I01.P02>
- Vasileva, V., & Kosev, V. I. (2018). *Evaluation of white lupin (Lupinus albus L.) for production characteristics and symbiotic nitrogen-fixation potential.* [https://doi.org/10.30848/PJB2021-1\(16\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-1(16))
- Wekesa, C. S., Furch, A. C. U., & Oelmüller, R. (2021). Isolation and Characterization of High-Efficiency Rhizobia From Western Kenya Nodulating With Common Bean. *Frontiers in Microbiology*, 12, 2548. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.697567/BIBTEX>
- Westhoek, A., Clark, L. J., Culbert, M., Dalchau, N., Griffiths, M., Jorin, B., Karunakaran, R., Ledermann, R., Tkacz, A., Webb, I., James, E. K., Poole, P. S., & Turnbull, L. A. (2021). Conditional sanctioning in a legume-*Rhizobium* mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2025760118>

- WPS, & WHO. (2022). *The Revision of World Population Prospects*. World Population Prospects Cita Tomada El 10 de Noviembre 2022. <https://population.un.org/wpp/>
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., & Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 291–299. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2010.08.001>
- Yuan, M., Ceja-Navarro, J. A., Monroy-Guerrero, M., Memenza-Zegarra, M., Taco, N., Mostacero, E., Ogata-Gutiérrez, K., Huaranga-Joaquín, A., Camarena, F., & Zúñiga-Dávila, D. (2022). Co-Inoculation of *Bradyrhizobium spp.* and *Bacillus sp.* on Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) in the High Andean Region of Peru. *Agronomy 2022*, Vol. 12, Page 2132, 12(9), 2132. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12092132>

## ANEXOS

### *Anexo 1*

#### *Características Fisiológicas de las localidades del norte y sur del cantón Ambato*

---

#### **Características Fisiológicas de las localidades del norte del cantón**

---

##### **Longitud de la planta**

10-12 cm

##### **Flor**

Corola zigomorfa, cinco pétalos de color rosado, sépalos, unidos. Un solo carpelo. Diez estambres con filamentos unidos.

##### **Hojas**

Pecioladas, trifoliado, de color verde intenso, de 1 cm de largo, con una mancha blancuzca en el centro.

##### **Hábitat y condiciones observados**

Borde de acera como forraje para el alimento de ganado y cerdos, baja contaminación por parte de agroquímicos



---

## Características Fisiológicas de las localidades del sur del cantón

---

### Longitud de la planta

30-42 cm

### Flor

Corola zigomorfa, seis pétalos de color rosado, sépalos, unidos. Un solo carpelo. Diez de los cuales nueve se encontraban con filamentos unidos.



### Hojas

Pecioladas, trifoliado, de color verde intenso, de 4 cm de largo, con una mancha blancuzca en el centro.



### Hábitat y condiciones observadas

Campo tipo bosque forraje para venta al público, alta contaminación por parte de agroquímicos

