



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Caracterización de *Rhizobium* spp. a partir de chocho (*Lupinus* spp.) en cuatro localidades del cantón Latacunga.

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

AUTOR: Jenifer Odalys Tovar Roman

TUTOR: Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

Ambato – Ecuador

Marzo 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

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 del 2023.

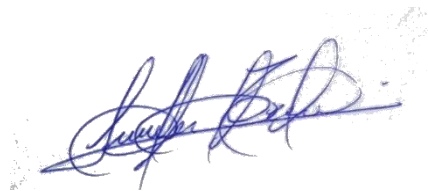
Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 180272662-8

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENCIDAD

Yo, Jenifer Odalys Tovar Roman, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Jenifer Odalys Tovar Roman

C.I. 050400617-2

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

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 180357158-5

Mg. María Eugenia García Pazmiño

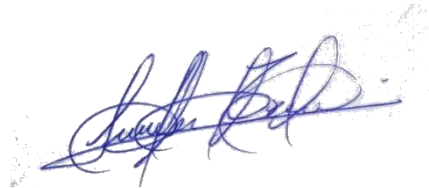
C.I. 210024850-5

Ambato, 07 de marzo del 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.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo 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.



Jenifer Odalys Tovar Roman

C.I. 050400617-2

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido conseguir esta meta en mi vida, a mis padres que me han apoyado a lo largo de mis años de estudio y me han guiado con sus buenos consejos, no hubiera sido posible llegar a este punto sin ustedes.

Jenifer Tovar

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermano por ser un pilar fundamental en mi vida y por apoyarme en este sueño, por ser mi inspiración y creer en mí a pesar de las adversidades.

A mi tutora, Mg. Ruth Pérez por compartir sus conocimientos y sobre todo por su tiempo, paciencia y la ayuda que me ha brindado al realizar este proyecto.

A la Dra. Helena de la Torre y a la Mg. Alejandra Sánchez por su ayuda, apoyo, consejos y motivación para la culminación de este trabajo.

Mi eterna gratitud con la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia en Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por haberme permitido adquirir conocimientos de grandes profesionales.

A mis compañeros y amigos, especialmente a Belén, Samantha, Jeni Lozada, Jhommy, Elvis, y Tefa Silva, quienes me han apoyado durante mi etapa universitaria y quienes con sus consejos me han motivado a cumplir este logro personal.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENCIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Fertilizantes nitrogenados sintéticos	1
1.1.1.1. Demanda de fertilizantes nitrogenados sintéticos	1
1.1.1.2. Efectos de los fertilizantes nitrogenados sintéticos	2
1.1.1.3. Los ODS y los fertilizantes nitrogenados sintéticos.....	2
1.1.2. Leguminosas	3
1.1.2.1. Origen de las leguminosas.....	3
1.1.2.2. Uso de leguminosas en el mundo	3
1.1.2.3. Las leguminosas en la actualidad	4
1.1.2.4. Uso de leguminosas en Ecuador.....	4

1.1.3.	<i>Lupinus</i> spp.	4
1.1.3.1.	Características morfológicas	5
1.1.3.2.	Raíz y tallo.....	5
1.1.3.3.	Hojas, inflorescencia y flores	6
1.1.3.4.	Etapas del cultivo de <i>Lupinus</i> spp.	6
1.1.3.5.	Taxonomía de <i>Lupinus</i> spp.....	7
1.1.4.	Beneficios de la fijación biológica de nitrógeno.....	7
1.1.4.1.	Interacción entre microorganismos - plantas.....	7
1.1.4.2.	Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	8
1.1.4.3.	Bacterias fijadoras de nitrógeno	8
1.1.4.4.	Proceso de reducción de Nitrógeno.....	9
1.1.5.	Rizobios	9
1.1.5.1.	<i>Rhizobium</i> spp.	9
1.1.5.2.	Taxonomía.....	10
1.1.5.3.	Capacidad de nodulación por <i>Rhizobium</i> spp.....	10
1.1.5.4.	Características de los nódulos	11
1.1.5.5.	Simbiosis de <i>Rhizobium</i> spp. con <i>Lupinus</i> spp.....	11
1.1.6.	Caracterización bioquímica y variabilidad genética	12
1.2.	Objetivos.....	13
1.2.1.	Objetivo general	13
1.2.2.	Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		14

2.1. Materiales	15
2.1.1. Equipos de laboratorio	15
2.1.2. Materiales de laboratorio.....	16
2.1.3. Reactivos de Laboratorio	17
2.1.4. Insumos y materiales de escritorio.....	18
2.2. Metodología.....	19
2.2.1. Localización geográfica	19
2.2.2. Recolección de las muestras	21
2.2.3. Prospección de la búsqueda de nódulos	21
2.2.4. Procesamiento de nódulos en el laboratorio.....	22
2.2.5. Aislamiento primario	24
2.2.6. Aislamiento secundario.....	25
2.2.7. Caracterización macroscópica.....	26
2.2.8. Tinción de Gram	26
2.2.8.1. Caracterización microscópica.....	27
2.3. Pruebas bioquímicas	27
2.3.1. Prueba rojo de metilo	27
2.3.2. Prueba voges proskauer.....	28
2.3.3. Prueba de catalasa	28
2.3.4. Prueba de hidrólisis de almidón	28
2.3.5. Prueba de sulfuro de hidrógeno.....	29
2.3.5.1. Prueba de motilidad.....	29

2.3.5.2.	Prueba de indol	29
2.3.6.	Prueba triple azúcar hierro	29
2.3.7.	Prueba de citrato.....	30
2.3.8.	Prueba de autenticación	30
2.4.	Aislamiento de ADN y BOX-PCR fingerprinting.....	31
2.4.1.	Desarrollo de PCR y electroforesis	34
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
3.1.	Caracterización de la leguminosa	36
3.1.1.	Aislamiento primario	41
3.1.2.	Aislamiento secundario.....	42
3.1.3.	Pruebas bioquímicas.....	42
3.1.4.	Prueba de identificación.....	57
3.1.5.	Distancia genética de los aislados	61
3.2.	Verificación de la hipótesis.....	64
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		65
4.1.	Conclusiones.....	65
4.2.	Recomendaciones	66
MATERIAL DE REFERENCIA		67
	Referencias Bibliográficas.....	67
	Anexos.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebador para utilizar en la PCR.....	33
Tabla 2. Condiciones de la PCR.....	35
Tabla 3. Promedio de las características de las plantas de <i>Lupinus</i> spp.....	36
Tabla 4. Características fenotípicas de <i>Rhizobium</i> spp. perteneciente a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	38
Tabla 5. Características bioquímicas de <i>Rhizobium</i> spp. pertenecientes a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	43
Tabla 6. Prueba de autenticación de <i>Rhizobium</i> spp. pertenecientes a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de simbiosis de <i>Rhizobium</i> spp. con <i>Lupinus</i> spp.	11
Figura 2 Zona de muestreo.....	20
Figura 3 Muestreo y transporte de la muestra.....	22
Figura 4 Tratamiento de la raíz.	23
Figura 5 Tratamiento de nódulos.	24
Figura 6. Aislamiento primario	25
Figura 7. Aislamiento secundario	25
Figura 8. Tinción de Gram	26
Figura 9. Pruebas bioquímicas	31
Figura 10. Proceso de extracción de ADN bacteriano	32
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de patrones fingerprinting de ADN de los aislados.....	62
Figura 12. Dendrograma que muestra la relación genética de los aislados de <i>Rhizobium</i> spp. provenientes de <i>Lupinus</i> spp.	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos 1. Componentes de los medios de cultivo.....	81
Anexos 2. Características de las raíces de plantas de <i>Lupinus</i> spp.....	82
Anexos 3. Características de los nódulos seleccionados para el aislamiento de cepas.	84
Anexos 4. Características fenotípicas de <i>Rhizobium</i> spp. pertenecientes a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	88
Anexos 5. Características bioquímicas de <i>Rhizobium</i> spp. pertenecientes a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	89
Anexos 6. Prueba de autenticación de <i>Rhizobium</i> spp. pertenecientes a nódulos de <i>Lupinus</i> spp.	90
Anexos 7. Análisis del gel mediante el programa GelAnalyzer.	91
Anexos 8. Permiso del Ministerio del Ambiente para trabajar con una especie vegetal comercial.	92

RESUMEN

La contaminación por fertilizantes nitrogenados sintéticos se ha convertido en una problemática que afecta al ecosistema a nivel mundial por la utilización desmedida. La búsqueda de alternativas biotecnológicas como el estudio de microorganismos que contribuyan a la fijación de nitrógeno ha cobrado mayor relevancia. *Rhizobium* spp. es responsable de la fijación de nitrógeno en leguminosas, como *Lupinus* spp., la bioprospección de esta bacteria resulta fundamental para aplacar la contaminación por fertilizantes sintéticos. Este estudio se enfocó en caracterizar *Rhizobium* spp. a partir de chocho (*Lupinus* spp.) en cuatro localidades del cantón Latacunga. De las localidades se recolectaron 32 muestras y fueron aisladas 64 cepas, de acuerdo con la caracterización fenotípica y las pruebas bioquímicas entre las que se encuentran catalasa, rojo de metilo, citrato, entre otras y una prueba de autenticación (YMA más PB) donde se determinó que el 100 por ciento de los aislamientos corresponden a dicho género. Se demostró su variabilidad genética mediante PCR Fingerprinting a partir de 32 aislados en muestras compuestas (16), donde 13 aislados presentan una variabilidad genética del 55 por ciento con heterogeneidad, pertenecientes a las 4 localidades, 2 grupos presentan similitud genética del 93 por ciento con homogeneidad correspondientes a las localidades Mulalo y Poalo y un aislado único procedente de la localidad Ignacio Flores. Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que los aislados pueden pertenecer al género *Rhizobium* spp. con elevada variación genética.

Palabras clave:

Lupinus spp., *Rhizobium* spp., Latacunga, variabilidad genética, biotecnología vegetal.

ABSTRACT

The contamination from synthetic nitrogen fertilizers has become a problem affecting the ecosystem worldwide due to excessive use. The search for biotechnological alternatives such as the study of microorganisms that contribute to nitrogen fixation has become more relevant. *Rhizobium* spp. is responsible for nitrogen fixation in legumes, such as *Lupinus* spp., bioprospection of this bacterium is fundamental to alleviate the pollution from synthetic fertilizers. This study focused on characterizing *Rhizobium* spp. from chocho (*Lupinus* spp.) in four locations in the Latacunga canton. 32 samples were collected from the locations and 64 strains were isolated, according to phenotypic characterization and biochemical tests including catalase, methyl red, citrate, among others, and an authentication test (YMA + PB) where it was determined that 100 percent of the isolates correspond to said genus. Its genetic variability was demonstrated by PCR Fingerprinting in which 32 of the isolates in composite samples (16) were analyzed, where 13 isolates present a genetic variability of 55 percent with heterogeneity, belonging to the 4 locations, 2 present a genetic similarity of 93 percent with homogeneity corresponding to locations 2 and 4 (Mulalo and Poalo), and a unique isolate from the Ignacio Flores location. Based on the results obtained, it can be said that the isolates can belong to the genus *Rhizobium* spp. with high genetic variation.

Keywords:

Lupinus spp., *Rhizobium* spp., Latacunga, genetic variability, Vegetal biotechnology.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Fertilizantes nitrogenados sintéticos

Las diversas aplicaciones de fertilizantes nitrogenados sintéticos son responsables de la acidificación del suelo, así como reducir los cationes de algunos metales básicos que son esenciales para los ecosistemas terrestres (**Qureshi, 2021**). A su vez, el exceso de nitrógeno que las plantas no logran absorber tiende a esparcirse en los sistemas contiguos, lo que ocasiona varios problemas ambientales (**Qiao et al., 2018**). La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) evidenció que el uso a nivel mundial de fertilizantes nitrogenados en el 2018 fue de aproximadamente 120 millones de toneladas métricas y se encuentra en aumento a una tasa anual de crecimiento de casi el 1.4 % (**FAO, 2016; Raghuram & Sharma, 2019**).

1.1.1.1. Demanda de fertilizantes nitrogenados sintéticos

La demanda de nitrógeno que se requiere o es necesaria para aumentar la producción de cultivos ha ido incrementando desde mediados del XX, se pronostica que esta cifra se duplique para 2050 esto se debe a que con el aumento de la población, haciendo que cada vez es más difícil lograr tanto satisfacer como mejorar la producción de los cultivos alimentarios considerados como principales entre los que se encuentran el trigo, arroz y maíz que es el pilar de la dieta básica de la mayor parte de la población a nivel mundial, así como el resto de los cultivos que no tienen tanta relevancia en la dieta (**Ladha et al., 2022**).

1.1.1.2. Efectos de los fertilizantes nitrogenados sintéticos

Agregando información a lo antes expuesto, la utilización de este tipo de fertilizantes ha cruzado los límites establecidos, donde la estimación que se tiene sobre la acumulación de nitrógeno es de diez años aproximadamente, lo que ocasiona cambios en tanto en el uso como en la cobertura del suelo, esto se encuentra ligado a otros factores como deforestación, urbanización y la agricultura lo que dado como resultado la degradación del mismo y un incremento en el CO₂ (**Lombo & Mancipe, 2021**). Actualmente, solo el 20 – 30 % de los fertilizantes sintéticos que se han aplicado a los campos son asimilados por los cultivos, mientras que el restante se queda en el suelo y baja hasta los cuerpos de agua, generando contaminación, lo que no solo está calentando al planeta, sino que contribuye a la destrucción de la capa de ozono (**Wang et al., 2018**).

1.1.1.3. Los ODS y los fertilizantes nitrogenados sintéticos

En el objetivo 13 Acción por el Clima, por otro lado, manifiesta que el manejo de los diversos nutrientes, así como el control de plagas en la agricultura, puede tener un papel fundamental en la mitigación del clima (**Naciones Unidas, 2020**). Al realizar una estimación de la síntesis de fertilizantes nitrogenados equivale a un 10 % de las emisiones agrícolas globales directas y presenta el 1 % de las emisiones provocadas por el hombre, estas emisiones pueden ser reducidas con la agricultura orgánica (**Naciones Unidas, 2018**). Como es el caso del cultivo de leguminosas, que puede beneficiar al suelo sin causar daño al clima, ni a los ecosistemas, ya que son conocidas como abono verde (**Smýkal et al., 2020**).

1.1.2. Leguminosas

1.1.2.1. Origen de las leguminosas

La aparición de las leguminosas en el planeta data del Cretácico – Paleógeno, debido a que fue un momento que dio lugar a la biota moderna, gracias a la repoblación del planeta manteniéndose abundantes y diversos desde el Cenozoico hasta la actualidad (**Koenen et al., 2019**). El fósil más antiguo de esta especie fue encontrado hace 65,35 Ma, descubriendo que fue uno de los más abundantes y diversas en el planeta a finales del Paleoceno (**Koenen et al., 2021**). Los registros fósiles y estudios filogenéticos realizados manifiestan que los miembros de la familia de leguminosas se originan del periodo Terciario temprano en regiones que eran áridas o semiáridas (**Ambika et al., 2022**).

1.1.2.2. Uso de leguminosas en el mundo

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en los últimos 10 años la producción a nivel mundial de legumbres ha incrementado en un 20 %, sin embargo, su consumo ha tenido un descenso lento y continuo. El mismo que puede estar relacionado con el cambio en la dieta de diversos países, así como la incapacidad de cumplir las demandas que requiere la población (**Rodríguez, 2016**). Los cereales que provienen de las legumbres contribuyen un tercio de las proteínas de la dieta diaria y contribuyen en un tercio del aceite vegetal que tiene como destino el consumo humano (**de La Rosa et al., 2020**). A nivel mundial, las leguminosas alimenticias se cultivan en 93.18 Mha con una productividad anual de 89.82 millones de toneladas y una productividad promedio de 963.9 kg/ha (**Abobatta et al., 2021**).

1.1.2.3. Las leguminosas en la actualidad

Actualmente, las leguminosas cuentan con 20.000 especies, considerada como la tercera familia de *Angiospermae* más rica en diferentes aspectos, entre los que se encuentran especies, radiación evolutiva y ecológica (**Jeromela et al., 2017**). Se encuentra extendida a nivel mundial, exceptuando la Antártida, ejercen un dominio ecológico a nivel mundial, específicamente en zonas de selvas tropicales, en las Sabanas, así como en bosques secos de América, África y Australia (**Koenen et al., 2021**).

1.1.2.4. Uso de leguminosas en Ecuador

Las legumbres en Ecuador son de vital importancia tanto para el comercio internacional como para el comercio nacional, para el propio abastecimiento de la población, esto se debe a que un porcentaje significativo, cercano a la mitad, es exportado y el restante, siendo una cantidad mayor, es de importación (**Giller et al., 2021**). Las leguminosas también presentan gran utilidad debido a que contribuyen en la producción sostenible en la ganadería (**Villacis, 2019**). El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) también contribuye para que los agricultores puedan cultivar leguminosas, proporcionando semillas y abono que son necesarios para producir las legumbres que se distribuyen y comercializan (**MAG, 2018**).

1.1.3. *Lupinus* spp.

Es una de las plantas perteneciente al grupo de leguminosas y es una de las más antiguas, esto se debe a que es conocida desde la época egipcia, por su capacidad de completar su desarrollo en suelos áridos y con poca cantidad de nutrientes, también se lo conoce por actuar como un fertilizante, lo que favorece el cultivo posterior de diversas hortalizas principalmente cereales entre los que se encuentran el trigo y el maíz (**Masi et al., 2020**). Dentro del género *Lupinus* spp. se encuentran alrededor de 300 especies (**Gulisano et al., 2019**), es descrito como un cultivo proteico de elevada

calidad y su tolerancia a los suelos que presentan muy poca fertilidad (**Simioniuc et al., 2021**).

1.1.3.1. Características morfológicas

Como ya se mencionó con anterioridad el género *Lupinus* spp., es una planta dicotiledónea anual y cuenta con diversas especies, algunas de ellas son anuales, algunas son arbustos y su gran mayoría son plantas herbáceas perennes. La altura de algunas variedades pertenecientes a esta especie se encuentra entre los 0.2 y 1.5 metros, mientras que los arbustos pueden llegar a alcanzar los 2.5 metros (**Aguero, 2018**). En sus inicios todas las especies de *Lupinus* spp. eran amargas por el alcaloide que poseían, pero mediante mejoras genéticas se logró la obtención de *Lupinus* spp. más dulce, actualmente los que aún presentan amargura contienen entre 1 a 2 % de alcaloide (**Pereira et al., 2022**).

1.1.3.2. Raíz y tallo

Las raíces de los *Lupinus* spp. van a variar dependiendo de la especie y puede ir desde una raíz pivotante, la misma que es dominante, con pequeñas raíces laterales hasta un sistema de raíces laterales que se encuentran bien desarrolladas, las especies que cuentan con un sistema de raíz principal llegan a tener una profundidad de 1 a 2 metros, para mejorar la fijación de nitrógeno las raíces especialmente la principal presentan nódulos (**Arnéz Juan et al., 2021**). Generalmente leñoso que puede presentar diversos colores entre los que se encuentran verde claro, oscuro y castaños. Suele presentar un eje principal con varias ramificaciones tanto secundarias como terciarias, el alto de la planta se encuentra definido por el eje central que varía entre 0.5 a 2.0 metros (**Rivas, 2021**).

1.1.3.3. Hojas, inflorescencia y flores

En la mayoría de las especies se encuentra compuesta por 8 folíolos que pueden variar entre ovalados o lanceolados, en la base del pecíolo se pueden observar pequeñas hojas estipulares en la mayoría de los casos rudimentaria (**Confortin et al., 2018**). Presenta una forma que es característica de las *Papilionoideae*, la inflorescencia se caracteriza por un racimo con flores verticiladas, se pueden encontrar hasta 60 flores y en una sola planta pueden encontrarse aproximadamente 1 000 flores. Presentan diversas coloraciones, entre las que se encuentran comúnmente azules, violetas, mientras que las blancas, crema, rosadas o amarillas son las menos comunes (**Barda et al., 2021**).

1.1.3.4. Etapas del cultivo de *Lupinus* spp.

Inicia con el proceso de germinación, contabilizado al momento de la siembra, cuando se dispone de las condiciones necesarias tanto en temperatura como en humedad, seguidamente, comienza el paso de emergencia o desarrollo, es considerado a partir de que los cotiledones emergen del suelo, el siguiente paso es la formación de cotiledones, donde los cotiledones comienzan a separarse de manera horizontal hacia ambos lados y empiezan a aparecer los primeros folios que se encuentran enrollados en el eje central (**Gulisano et al., 2023**).

Presenta dos desarrollos, el primero se destaca por la presencia de las hojas reales juntamente con la presencia de inflorescencia con una longitud aproximada de 2 cm, el segundo desarrollo se presenta desde la aparición de hojas de mayor tamaño a folíolos hasta que se observe inflorescencia, se puede apreciar el desarrollo de ramas, el siguiente paso es la prefloración, aparece cuando en la inflorescencia central o de segundo orden comienza a aparecer los primeros botones florales y finalmente la floración que inicia con la apertura de flores (**Gulisano et al., 2023**).

1.1.3.5. Taxonomía de *Lupinus* spp.

- Reino: Vegetal
- División: Fanerógama
- Clase: Dicotiledónea
- Orden: Fabales
- Familia: Fabáceas
- Subfamilia: Faboideae
- Género: *Lupinus*

(Zirena, 2014).

1.1.4. Beneficios de la fijación biológica de nitrógeno

La capacidad de fijar nitrógeno por las plantas puede ser considerado como una ventaja o una desventaja competitiva hacia las plantas que presentan simbiosis, denominadas como plantas fijadoras de nitrógeno, esto se debe a la disponibilidad de nitrógeno que puede ser encontrada en el suelo y la energía requerida para la fijación del mismo (Taylor & Menge, 2021). Contribuyendo al crecimiento de la planta, incrementando su tamaño mucho más rápido en comparación a otras plantas, aumenta su contenido de proteínas y enzimas, gracias a que las células se dividen con mayor rapidez, contribuye en la producción de clorofila (Fukami et al., 2018).

1.1.4.1. Interacción entre microorganismos - plantas

Las plantas suelen interactuar con una gran variedad de microorganismos, esto se debe a la capacidad que desarrollaron las primeras especies de plantas que aparecieron, las plantas con las que se establecieron relaciones simbióticas con hongos terrestres, siendo un paso fundamental para la aparición de los ecosistemas que se encuentran en la actualidad (Guzmán & Montero, 2021). Las bacterias, por otro lado, en la gran mayoría de casos promueven el crecimiento y brindan protección a las plantas contra diversos factores ambientales que generan estrés abiótico, entre los que se pueden

encontrar la contaminación, el frío, el calor o sequía, así como de patógenos y de depredadores herbívoros (**Papik et al., 2020**). A su vez, según **Coleman – Derr et al. (2016)**, manifiesta que aún se desconoce el potencial que pueden llegar a aportar las poblaciones bacterianas que son capaces de vivir en condiciones de estrés como ocurre en los climas desérticos o áridos y que son simbioses con sus hospederos en este caso las plantas sobrevivientes. Cabe destacar que este es un proceso que consume gran cantidad energía, que se encuentra principalmente promovido por la fotosíntesis (**Coleman-Derr et al., 2016; Pankievicz et al., 2019**).

1.1.4.2. Microorganismos fijadores de nitrógeno

Los microorganismos encargados de fijar nitrógeno requieren de 16 moles de ATP (adenosín trifosfato) para reducir cada mol que se tenga de nitrógeno. Estos organismos van a obtener esta cantidad de energía oxidando moléculas orgánicas, mientras que los microorganismos que no realizan fotosíntesis deben obtener este tipo de moléculas de con base en otros organismos, mientras que los que si realizan fotosíntesis emplean azúcares que se generan en la fotosíntesis. Los microorganismos que se encargan de fijar nitrógeno ya sean asociativos o simbióticos, van a conseguir dichos compuestos de la rizosfera de las plantas que actúan como hospedantes (**Chen et al., 2019**).

1.1.4.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de codificar la enzima nitrogenasa, permitiéndoles utilizar el nitrógeno atmosférico a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno, convirtiendo el N_2 en compuestos inorgánicos que van a contener nitrógeno, como es el caso del amoníaco, lo que contribuye en la mejora tanto en el crecimiento como rendimiento de diversas plantas (**Zhang et al., 2022**). Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser encontradas en una vida libre pueden ser aerobias, anaerobias obligadas y fotosintéticas, mientras que las que forman asociaciones según su relación con el oxígeno y pueden ser aerobias, anaerobias facultativas, microaerófilos y anaerobios estrictos, cabe destacar que tanto las

anaerobias facultativas como estrictas tienen un comportamiento anaerobio cuando no se encuentran fijando nitrógeno (Silva & Zuñiga, 2017).

1.1.4.4. Proceso de reducción de Nitrógeno

La reducción de nitrógeno atmosférico es un proceso sumamente complejo, esto se debe a que requiere un aporte significativo de energía para que se pueda llevar a cabo. Como bien se sabe, la molécula de nitrógeno se encuentra constituida por dos átomos de nitrógeno unidos entre sí por un enlace covalente triple, provocando que esta molécula cuente con alta reactividad. Con la ayuda de la enzima nitrogenasa se rompen dichos enlaces y se adicionan tres átomos de hidrógeno por cada átomo de Nitrógeno (Li et al., 2020).

1.1.5. Rizobios

Son bacterias del suelo, Gram negativos, su forma morfológica es bacilar y no tiende a formar esporas. Su movimiento se debe a la presencia de un flagelo principal, el mismo que puede ser polar o subpolar y de dos a seis flagelos peritricos. La gran mayoría de estas bacterias exhiben un metabolismo aerobio heterótrofo y se caracterizan por emplear diversos azúcares como fuente carbono, las colonias generalmente presentan un aspecto mucilaginoso (Garabato, 2018). Los rizobios van a colonizar la rizosfera del suelo, lo que les permite infectar las raíces de las leguminosas, lo que les permite la fijación biológica de nitrógeno (Simon et al., 2018).

1.1.5.1. *Rhizobium* spp.

Los *Rhizobium* spp. son consideradas como una de las especies bacterianas con mayores beneficios del suelo, son consideradas como fertilizantes biológicos, lo que lo hace uno de los géneros más representativos y estudiados por la capacidad que presenta para fijar nitrógeno mediante simbiosis *Rhizobium* spp. - leguminosa, así como generar sustancias que promuevan el crecimiento de las plantas (Saghafi et al., 2018). Esta especie bacteriana presenta dos modalidades en la que puede desarrollarse,

la primera es como simbiote y la segunda permaneciendo en el suelo, viviendo como saprófito o como bacterias endofíticas lo que le permite colonizar plantas que no son leguminosas promoviendo de esta forma con su crecimiento **(Blanco et al., 2020)**.

El nitrógeno del aire que *Rhizobium* spp. puede fijar se debe a la formación de nódulos do en donde va a convertir el nitrógeno en amonio, por lo que, si la actividad de la bacteria es elevada, producirá mayor cantidad de N₂ necesario para el crecimiento de la planta **(Purwaningsih et al., 2020)**. *Rhizobium* spp. también es capaz de aportar al crecimiento y desarrollo de plantas que no son leguminosas **(Munir et al., 2022)**.

1.1.5.2. Taxonomía

El género *Rhizobium* spp. proviene del latín que significa “raíz viva” fue descubierto por Frank en 1889, actualmente se conocen 49 especies rizobianas y presenta la siguiente taxonomía:

- Clase: Alphaproteobacteria
- Orden: Rhizobiales
- Familia *Rhizobiaceae*
- Género: *Rhizobium*

(Weir, 2016).

1.1.5.3. Capacidad de nodulación por *Rhizobium* spp.

Los nódulos que se encuentran presentes en las leguminosas son resultados de un programa de desarrollo que es activado en las raíces por diversas señales que transmiten los *Rhizobium* spp. en la superficie de la raíz, uno de los aspectos fundamentales de estas señales que se reciben son los factores de nodulación o conocidos por sus siglas Nod que provienen de polisacáridos, los mismos que se van a unir a quinasas receptoras de las plantas que son específicas de la membrana plasmática y van a desencadenar la vía de señalización de Ca²⁺, encargados de la activación en la transcripción de genes que están en el nódulo **(Agtuca et al., 2020)**.

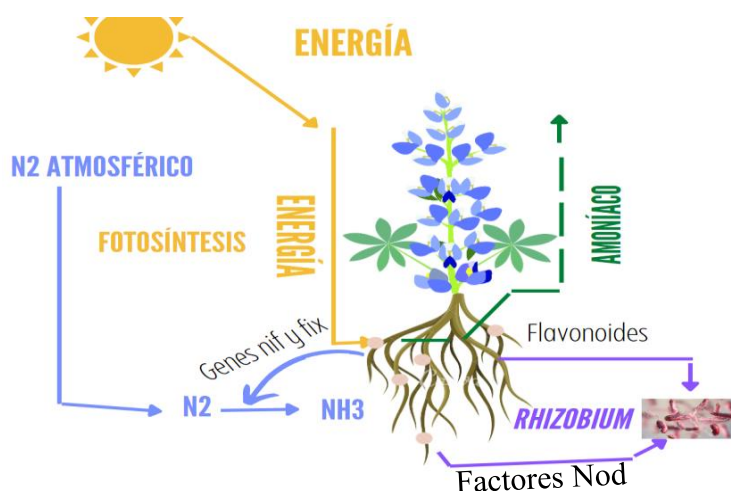
1.1.5.4. Características de los nódulos

Las señales del factor de Nod son responsables tanto de la desdiferenciación como de la división de las células corticales que se encuentran en la raíz y se dividen en dos grupos, el primero son los indeterminados que se originan de la división de células antes mencionadas, como resultado los nódulos van a presentar una forma alargada o ramificada, generando una gradiente de desarrollo que va desde el ápice hasta la base del nódulo, que pueden dividirse en diversas zonas nodulares (Schwember et al., 2019). Mientras, que los nódulos determinados tienen forma esférica y son originarios de la división de células de la corteza media/externa de la raíz y no presentan un meristemo persistente, la división de este tipo de células terminan en las primeras etapas del desarrollo y el nódulo maduro continuará su proceso de desarrollo mediante el agrandamiento celular (Wang et al., 2018).

1.1.5.5. Simbiosis de *Rhizobium* spp. con *Lupinus* spp.

Figura 1.

Proceso de simbiosis de *Rhizobium* spp. con *Lupinus* spp.



Nota: se puede evidenciar como *Rhizobium* spp. nodula a las diferentes plantas, en este caso *Lupinus* spp.

Fuente: Adaptado de (Lindström & Mousavi, 2020).

El proceso de nodulación (*figura 1*) inicia con la producción de una serie de sustancias, mayormente flavonoides, responsables de inducir la síntesis de proteínas NodD de *Rhizobium* spp. Las diferentes leguminosas, en este caso *Lupinus* spp. producen diferentes mezclas, que permiten que la proteína NodD active la transcripción de otros genes (*nif* y *fix*) y factores Nod que se encuentran implicados en la nodulación, donde las moléculas que actúan como señalizadores que son producidas por *Rhizobium* spp. son reconocidas por la planta, induciendo la organogénesis de los nódulos (**Yang et al., 2022**).

La interacción para que se dé el proceso de fijación de nitrógeno simbiótica, ocurre como una simbiosis mutua, en esta simbiosis, el *Rhizobium* spp. es alojado por *Lupinus* spp. y suministrado de su fuente de carbono gracias al proceso de fotosíntesis. como resultado *Lupinus* spp. recibe el nitrógeno en forma asimilable, es decir, en amoníaco esencial para su crecimiento (**Lindström & Mousavi, 2020**).

1.1.6. Caracterización bioquímica y variabilidad genética

Anteriormente, la diversidad de rizobios se estudiaba basándose en pruebas bioquímicas, permitiendo la caracterización de la bacteria a estudiar en este caso *Rhizobium* spp., basándose en su metabolismo probando la capacidad y actividad que presenta en diferentes medios (**Nakei et al., 2022**). Sin embargo, la biotecnología ha permitido que se empleen nuevas técnicas como PCR fingerprinting, revelando la variabilidad genética de *Rhizobium* spp. presente en las raíces de leguminosas como lo es *Lupinus* spp. (**Singha et al., 2018**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar *Rhizobium* spp. a partir de chocho (*Lupinus* spp.) en cuatro localidades del cantón Latacunga.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Aislar cepas de *Rhizobium* spp. que nodulen la especie *Lupinus* spp. mediante técnicas microbiológicas basado en cultivo.
2. Identificar a los aislados por medio de pruebas bioquímicas.
3. Evaluar la distancia genética entre los aislamientos por medio de PCR fingerprinting.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

La investigación realizada corresponde al tipo cualitativo, esto se debe a que se quiere recopilar y analizar información procedente de los resultados obtenidos, donde la variable independiente del estudio fueron las plantas de chocho (*Lupinus* spp.) divididos en 8 muestras procedentes de las diferentes localidades (*Anexo 2*); mientras que la variable dependiente fueron el aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp.

Las hipótesis probadas en la presente investigación fueron:

- **Hipótesis nula**

Los aislamientos procedentes de nódulos de *Lupinus* spp. presentan características morfológicas, bioquímicas y diversidad genética que no pertenecen al género *Rhizobium* spp.

- **Hipótesis alternativa**

Los aislamientos procedentes de nódulos de *Lupinus* spp. presentan características morfológicas, bioquímicas y diversidad genética pertenecen al género *Rhizobium* spp.

2.1. Materiales

2.1.1. Equipos de laboratorio

Autoclave Raipa

Balanza analítica Scientech

Termociclador Kalstein

Transiluminador UV Slimline

Cámara de electroforesis Kalstein

Fuente de poder Hes

Nevera (4 °C) Mabe

Congelador (-20 °C)

Ultra congelador (-80 °C) Labomersa

Cabina de flujo laminar Opti-Mair

Microcentrífuga Myfuge

Vórtex Intllab

Microscopio óptico Olympus

Incubadora Memmert

Nanodrop Thermo Fisher Scientific

Plancha de calentamiento IKA°C-MAG – HS7

Bio-Rad Scientific Support, Inc

2.1.2. Materiales de laboratorio

Espátula

Mechero de alcohol

Tubos de ensayo

Tubos de ensayo con tapa

Vasos de precipitación 100 ml

Varilla de vidrio

Asa de inoculación

Asa de siembra Drigalski

Matraz de 100 ml

Cajas mono Petri plásticas

Pipetas x 10 ml

Gradilla

Aguja de inoculación

Portaobjetos

Cubreobjetos

Juego de micropipetas

Tubos para microcentrífuga

Tubos 0.2 mL para PCR

Bisturí

Puntas de micropipeta 200 μ l

Puntas de micropipeta 20 μ l

Puntas de micropipeta 10 μ l

2.1.3. Reactivos de Laboratorio

Medio PCA TM MEDIA

Cristal Violeta al 2% MERK

Rojo Congo al 5 % Fagalab

Manitol Baxter

Agar levadura manitol YMA TM MEDIA

Glicerol al 20%

Safranina al 1% BMI

Alcohol cetona al 1% Cirumedics

Agua destilada La casa del químico

Agua ultrapura estéril La casa del químico

Etanol 95% Laturi

Etanol 70% Weir

Peróxido de hidrogeno al 30 % Weir

Medio agar TSI TM MEDIA

Medio agar SIM TM MEDIA

Hipoclorito de sodio al 3 % Clorox

Medio Agar almidón TM MEDIA

Rojo de metilo al 1 % AnalaR

α - naftol al 5 % AnalaR

KOH al 40% Emsure

Lugol al 1% Reagent

GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT. 50 RX. THERMO SCIENTIFIC

DREAMTAQ GREEN PCR MASTER MIX 200 RX THERMO SCIENTIFIC

Buffer TAE

GENERULER 1kb DNA LADDER, READY TO USE. 50 µg THERMO SCIENTIFIC

Agarosa

Sybr Safe DNA Gel Stain

2.1.4. Insumos y materiales de escritorio

Cofias

Mascarillas

Guantes de nitrilo

Tijeras

Etiqueta

Rotulador

Palas

Azadón

Fundas de papel

Alcohol antiséptico

Papel film

Computadora

2.2. Metodología

El aislamiento de cepas de *Rhizobium* que nodulan la especie *Lupinus* spp. mediante técnicas microbiológicas basado en cultivo se desarrolló con base en la siguiente metodología:

2.2.1. Localización geográfica

Según el **Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP)** (2014), manifiesta que en la provincia de Cotopaxi el cantón Latacunga es el mayor productor y comercializador de chocho, por sus características nutricionales, su alta adaptabilidad a suelos secos y su aporte económico al cantón (**MAGAP, 2014**). Según el último Censo Nacional Agropecuario (2000), en el cantón Latacunga la superficie plantada de chocho es de 517 Hm², con una superficie cosechada de 346 por hectárea con una producción de 46 TM (**Sánchez, 2016**). Para el muestreo de nódulos de *Lupinus* spp. se seleccionaron 4 zonas pertenecientes a diferentes parroquias del cantón Latacunga (Toacaso, Mulalo, Ignacio Flores, y Poalo) como se muestra en la figura 2. A continuación se describe las coordenadas geográficas que se obtuvieron mediante la aplicación de Google Earth.

Figura 2

Zona de muestreo



Nota: las zonas para el muestreo tuvieron su base en aquellas parroquias que producen mayor cantidad de chocho (*Lupinus spp.*). Color celeste: Toacaso, localidad 1, Color verde: Mulalo, localidad 2, Color morado: Poalo, localidad 3 y Color rojo: Ignacio Flores, localidad 4.

Toacaso (L): 0°45'12"S 78°41'24"W

Mulalo (U): 0°42'39"S 78°35'41"W

Poalo (P): 0°48'30.6"S 78°39'18.4"W

Ignacio Flores (I): 0°57'54.7"S 78°36'04.1"W.

2.2.2. Recolección de las muestras

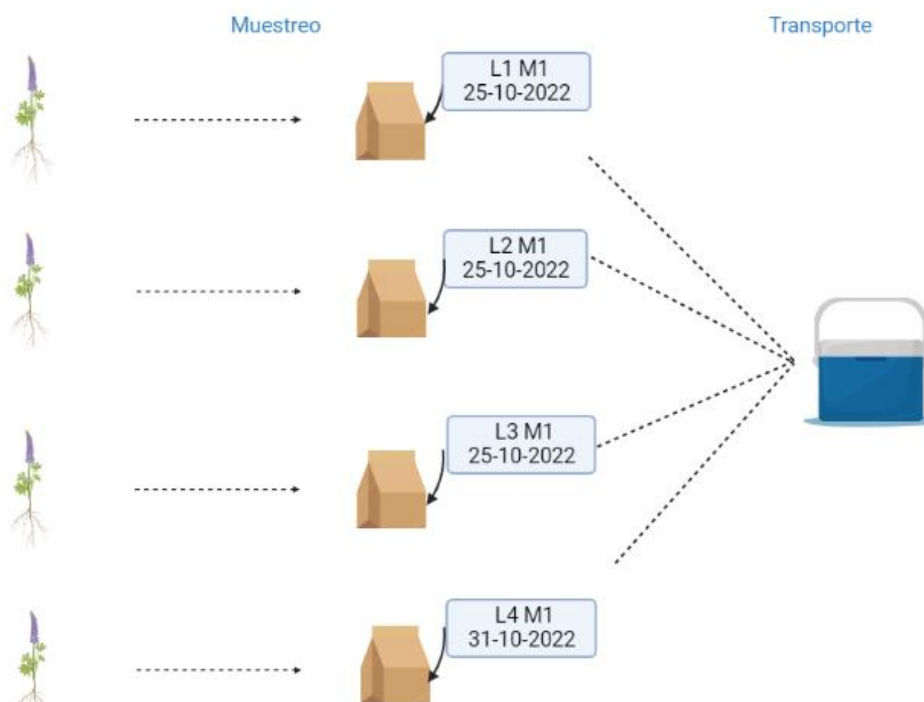
Las muestras fueron adquiridas tomando en consideración la disposición que presento el agricultor, debido a que el chocho se trata de una especie comercial como lo establece el **Anexo 8**.

2.2.3. Prospección de la búsqueda de nódulos

Una vez que se ubicaron las localidades se procedió a seleccionar 32 plantas jóvenes y vigorosas en floración con base en un muestreo aleatorio simple se tomaron 8 plantas de *Lupinus* spp. por cada punto de muestreo. Al ser los terrenos planos se llevó a cabo un muestreo en zig-zag (**Pérez, 2021**). Lo primero que se realizó fue una limpieza de la zona que se encontraba cerca de la planta, para después con ayuda de palas y azadones retirar la tierra para poder extraer la planta con todo y raíz, evitando que se produzcan daños en la misma. Las plantas de *Lupinus* spp. (*figura 3*) fueron transportadas al laboratorio en bolsas de papel, con una pequeña cantidad de tierra con la finalidad de evitar que *Rhizobium* spp. se inactive por su alta susceptibilidad al oxígeno (**García-Blasquez et al., 2019**). Se colocó una etiqueta en la bolsa de papel, identificando el número muestra, la ubicación geográfica; con la finalidad de evitar confusiones entre muestras (**Pérez, 2021**).

Figura 3

Muestreo y transporte de la muestra.

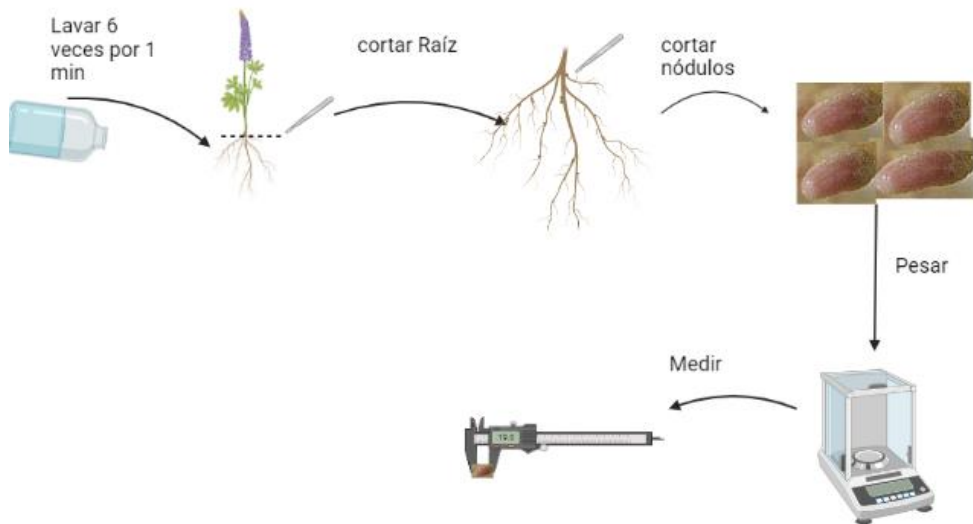


2.2.4. Procesamiento de nódulos en el laboratorio

Una vez que las muestras estuvieron en el laboratorio (*figura 4*) se procedió con la limpieza de las raíces para eliminar la tierra, se realizaron 6 lavados con agua destilada, cada lavado fue de un 1 min, una vez que se eliminó toda la tierra se separó las raíces del tallo con un bisturí que se fue previamente esterilizado, seguidamente con la ayuda de otro bisturí esterilizado se cortaron todos los nódulos de las raíces (principal y secundaria), para luego ser pesados con la ayuda de una balanza analítica y se midió su tamaño con ayuda de un calibrador vernier (Coelho, 2021; García-Blasquez et al., 2019).

Figura 4

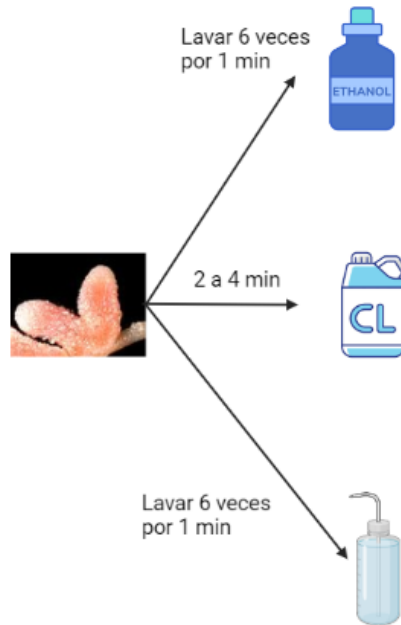
Tratamiento de la raíz.



De cada planta se escogieron dos nódulos (*Figura 5*) que presentaron una coloración roja o rosada, y un mayor tamaño (**García-Blasquez et al., 2019**). Para poder dar inicio al proceso de desinfección, se lavaron ambos nódulos seis veces por inmersión sucesiva con etanol al 70 % durante 60 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 4 min, finalmente se lavaron 6 veces con agua ultrapura estéril (ddH_2O) durante 1 min (**Efstathiadou et al., 2021**).

Figura 5

Tratamiento de nódulos

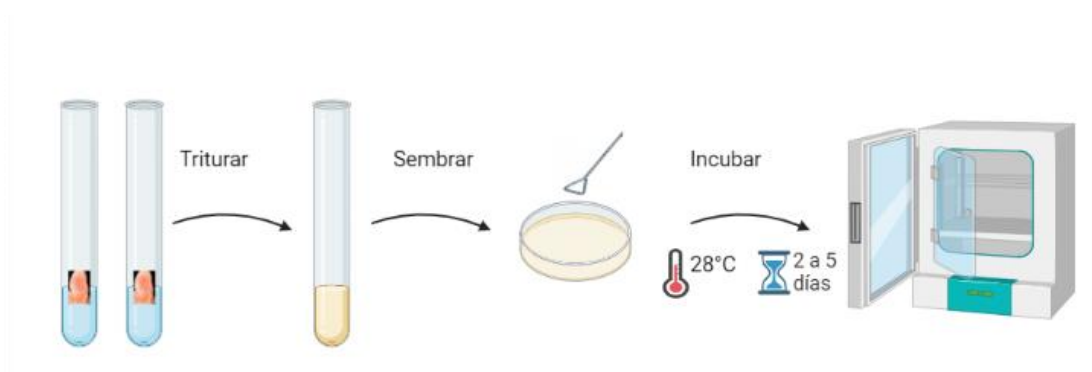


2.2.5. Aislamiento primario

Cuando los nódulos ya se encontraban estériles fueron colocados dentro de la cámara de flujo laminar previamente desinfectada para evitar cualquier tipo de contaminación, en la misma que contenía un mechero de alcohol encendido esterilizando la zona y materiales a utilizarse en el proceso. Cada nódulo fue depositado dentro de un tubo de ensayo (*Figura 6*) y con la ayuda de una varilla de vidrio se comenzó a triturarlos hasta conseguir una secreción lechosa, la misma que fue vertida en cajas Petri que contenían 25 mL de agar levadura manitol (YMA, *Anexo 1*), para poder esparcirlo con un asa de Drigalsky, una vez que se sembró se cubrieron las cajas Petri con papel film para evitar contaminación y se incubaron a 28 °C durante 2 días (**Efstathiadou et al., 2021**).

Figura 6.

Aislamiento primario

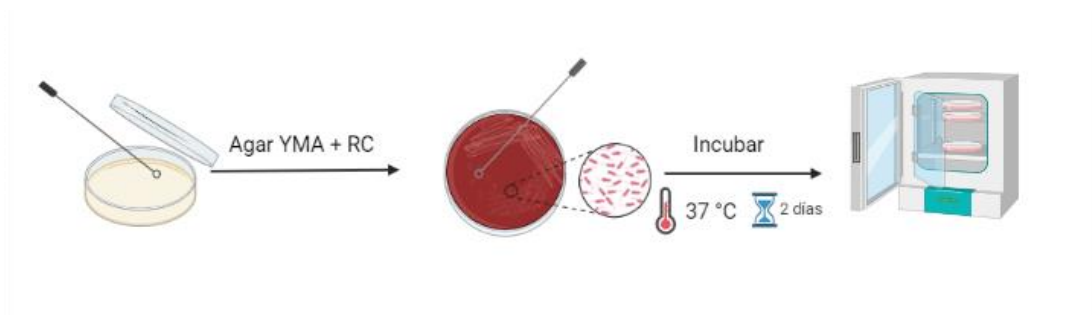


2.2.6. Aislamiento secundario

Una vez que se obtuvieron colonias individuales (*Figura 7*) se procedió a realizar una purificación mediante estrías repetidas en medio YMA (*Anexo 1*), suplementado 10 mL/L con rojo Congo hasta que se logró conseguir cultivos puros de los aislados. Para poder preservar los aislamientos obtenidos, se tomó una colonia perteneciente a cada uno de los aislados y se sembraron en tubos eppendorf que contenían 700 μ L de caldo YMA y se los dejó incubar por 24 h, luego se le adicionó 300 μ L de glicerol al 20 % y se las guardó en el $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Efstathiadou et al., 2021**). Cabe mencionar que toda la metodología de aislamiento fue realizada por triplicado.

Figura 7.

Aislamiento secundario



2.2.7. Caracterización macroscópica

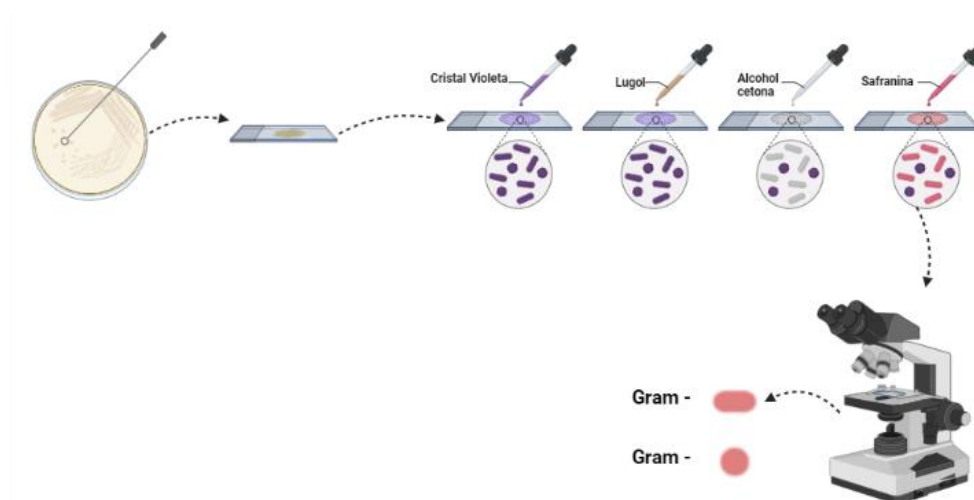
Se observaron todas las placas para analizar las colonias en donde presentaron un tamaño de 4 a 5 mm aproximadamente, las colonias fueron redondas, en otras alargadas y en otras se propagaron por toda la caja Petri, la coloración que presentaron fue blanco claro, lechosas, gomosas y mucilaginosas (**García-Blasquez et al., 2019**). Mientras que en el medio YMA suplementado con rojo Congo fue rojiza.

2.2.8. Tinción de Gram

Para realizar la tinción de Gram (*Figura 8*) se tomó una colonia de cada aislado puro en un portaobjeto que contenía una gota de agua destilada, preparando el frotis y con la ayuda de un mechero de alcohol se fijó la muestra, seguidamente se le agregó una gota de cristal violeta sobre la muestra durante 1 min, se retiró el exceso del reactivo con agua destilada, se le añadió una gota de lugol, dejándola actuar durante 1 min y se lavó con agua destilada, seguidamente se añadió una gota de alcohol-cetona durante 30 s y se retiró el exceso con agua destilada, finalmente se añadió una gota de safranina, se dejó actuar 1 min y se lavó con agua destilada, para poder observar la muestra en el microscopio (**García-Blasquez et al., 2019**).

Figura 8.

Tinción de Gram



2.2.8.1. Caracterización microscópica

Cuando la muestra se encontraba en el microscopio se logró observar bacilos Gram negativos, delgados, alargados a las 24 h y cortos a las 72 h (**García-Blasquez et al., 2019**).

Para la identificación de los aislados por medio de pruebas bioquímicas se siguió la siguiente metodología:

2.3. Pruebas bioquímicas

Se tomó una colonia en cada aislado y se sembraron en medios específicos para cada prueba bioquímica que se realizó, las mismas que fueron utilizadas para la identificación de *Rhizobium* spp. son rojo de metilo (RM), prueba de Voges Proskauer (VP), prueba de catalasa, prueba de citrato (C), hidrólisis de almidón (HA), producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), prueba de indol (I), prueba de motilidad (M), prueba de triple azúcar (TSI) (**Díez, 2019**), y una prueba de autenticación.

2.3.1. Prueba rojo de metilo

Se preparó 320 mL de caldo de cultivo R.M.V.P (*Anexo 1*) y se depositó 5 mL en tubos de ensayo, se sembró una colonia proveniente de los aislamientos puros (*Figura 9*) y se dejó incubar a 37 °C por 48 h, mientras se estaba incubando se preparó la solución indicadora de rojo de metilo disolviendo 0,1 g de rojo de metilo en 300 mL de etanol al 95 % y se aforo con agua destilada hasta los 500 mL. Una vez, que se incubaron las muestras se transfirió 5 mL del cultivo a un tubo de ensayo y se añadió 5 gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo (**Pacsi, 2021**).

2.3.2. Prueba voges proskauer

Se preparó 320 mL de caldo de cultivo R.M.V.P (*Anexo 1*), y transfirió 5 mL en tubos de ensayo, se inoculó una colonia de cultivo puro (*Figura 9*) y se dejó incubar a 37 °C por 48 h, mientras se preparaba el α - naftol al 5% para ello se pesó 5 gr de α - naftol y se lo diluyó en 100 mL de alcohol al 95 %, también se preparó el KOH al 40 % disolviendo 60 g de KOH en 40 mL de agua destilada, una vez culminada la incubación se añadió en cada tubo de ensayo 12 gotas del α - naftol al 5% y 4 gotas de KOH al 40 % se agitó y se dejó reposar por 10 minutos, observando una coloración rosada (**Pacsi, 2021**).

2.3.3. Prueba de catalasa

Se preparó 1 600 L de medio Plate Count Agar (PCA), se colocó 25 mL en las cajas Petri y se cultivó una colonia pura (*Figura 9*), las cajas Petri fueron incubadas durante 2 días a 37 °C, seguidamente se tomó una colonia de cada aislamiento y se colocó en un portaobjetos y se colocó dos gotas de peróxido de hidrógeno (10 vol. al 30 %), para que el resultado fuera positivo se debía formar burbujas (**Wekesa et al, 2021**).

2.3.4. Prueba de hidrólisis de almidón

Se preparó 1 600 L de medio agar almidón (*Anexo 1*) y se inoculó una colonia (*Figura 9*) y se dejó incubar 37 °C por 48 h, transcurrido ese tiempo se agregó una gota de lugol, donde el yodo (yodato – yoduro) va a generar una coloración azul o café, donde si la prueba era positiva se iban a observar halos transparentes brillantes rodeando las bacterias (**Wekesa et al, 2021**).

2.3.5. Prueba de sulfuro de hidrógeno

Se preparó 320 mL de medio SIM (*Anexo 1*), se colocó 5 mL en cada tubo de ensayo, se sembró una colonia proveniente de cada uno los aislamientos puros (*Figura 9*), se incubó a 37 °C durante 48 h, el resultado debía ser positivo si se observaba un ennegrecimiento del medio (**Bou et al., 2018**).

2.3.5.1. Prueba de motilidad

Se preparó 320 mL de medio SIM (*Anexo 1*), se colocó 5 mL en cada tubo de ensayo, sembró una colonia proveniente de cada uno los aislamientos puros (*Figura 9*), se incubó a 37 °C durante 48 h, el resultado debía ser positivo si se observaba turbidez o crecimiento a lo largo de la línea de siembra (**Bou et al., 2018**).

2.3.5.2. Prueba de indol

Se preparó 320 mL de medio SIM (*Anexo 1*), se colocó 5 mL en cada tubo de ensayo, se sembró una colonia proveniente de cada uno los aislamientos puros (*Figura 9*), se incubó a 37 °C durante 48 h, luego de eso se añadió el reactivo indol, el resultado debía ser positivo si se observaba la formación de un anillo rosado (**Bou et al., 2018**).

2.3.6. Prueba triple azúcar hierro

Se preparó 320 mL del medio TSI (triple azúcar hierro), se calentó mediante agitación constante en una plancha de calentamiento hasta su disolución total, se vertió 5 mL en los tubos de ensayo, llenado la tercera parte, se cubrieron con papel aluminio y se llevó al autoclave para esterilizar el medio durante 15 min a 121 °C, se dejó enfriar hasta

que se solidifique el agar en pico de flauta profundo, se inoculó una colonia proveniente de cada aislamiento puro (*Figura 9*) y con la ayuda de una aguja de inoculación esterilizada se picó el fondo y se extendió a la superficie del mismo haciendo una estría simple y se incubó a 37 °C durante 48 h (**Bou et al., 2018**).

Para la interpretación de los resultados si el microorganismo no es fermentador de azúcar se espera observar un pico rojo y fondo rojo; en el caso que el microorganismo fermenta solo glucosa se espera observar un pico rojo y fondo amarillo; si el microorganismo fermenta los tres azúcares presentará un pico amarillo y fondo amarillo; si el microorganismo produce ácido sulfúrico se presentará ennegrecimiento del medio y en el caso que el microorganismo produzca gas se presentará rupturas o burbujas (**Wekesa et al, 2021**).

2.3.7. Prueba de citrato

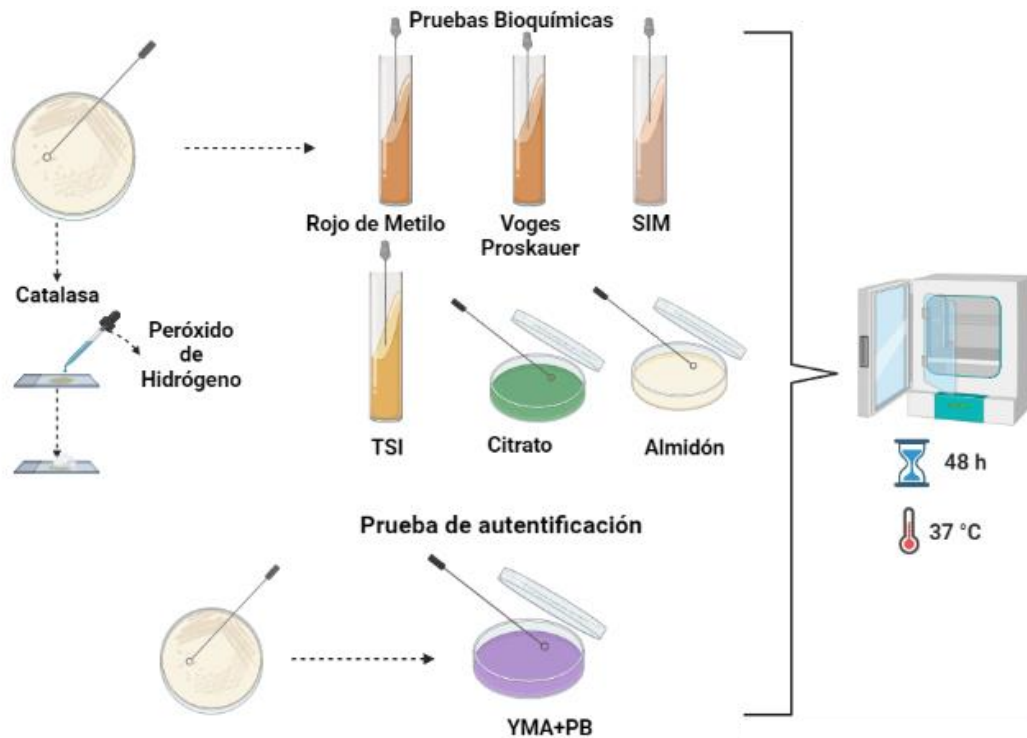
Se preparó 1 600 L de medio de medio citrato de Simmons, se sembró una colonia proveniente de cada aislamiento puro (*Figura 9*) y se dejó incubar durante 48 h a 37 °C, para la interpretación de los resultados si el pH cambio se presentará un cambio en la coloración del medio pasando de verde a azul (**Oryakhil & Irfan, 2020**).

2.3.8. Prueba de autenticación

Se preparó 1 600 L de medio YMA (*Anexo 1*), suplementado con 10 mL/L de púrpura de bromocresol y se inoculó una colonia proveniente de los aislamientos puros (*Figura 9*) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C, para la interpretación de los resultados si el pH experimento un cambio el medio se volvió amarillo, azul o morado dependiendo de la especie de *Rhizobium* spp. (**Mekonnen & Debebe, 2021**).

Figura 9.

Pruebas bioquímicas



Para la evaluación de la distancia genética entre los aislamientos por medio de PCR fingerprinting se llevó a cabo la siguiente metodología:

2.4. Aislamiento de ADN y BOX-PCR fingerprinting

El ADN molde se extrajo de 32 aislados utilizando el kit de purificación de ADN genómico GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT. 50 RX. THERMO SCIENTIFIC, de acuerdo con las instrucciones realizadas por el fabricante (figura 10). El análisis BOX-PCR fingerprinting se realizó empelando el cebador BOX A1R

(Tabla 1) (Efstathiadou et al., 2021). Cabe destacar que el procedimiento se llevó a cabo por triplicado para consolidar los resultados experimentales.

Figura 10.

Proceso de extracción de ADN bacteriano

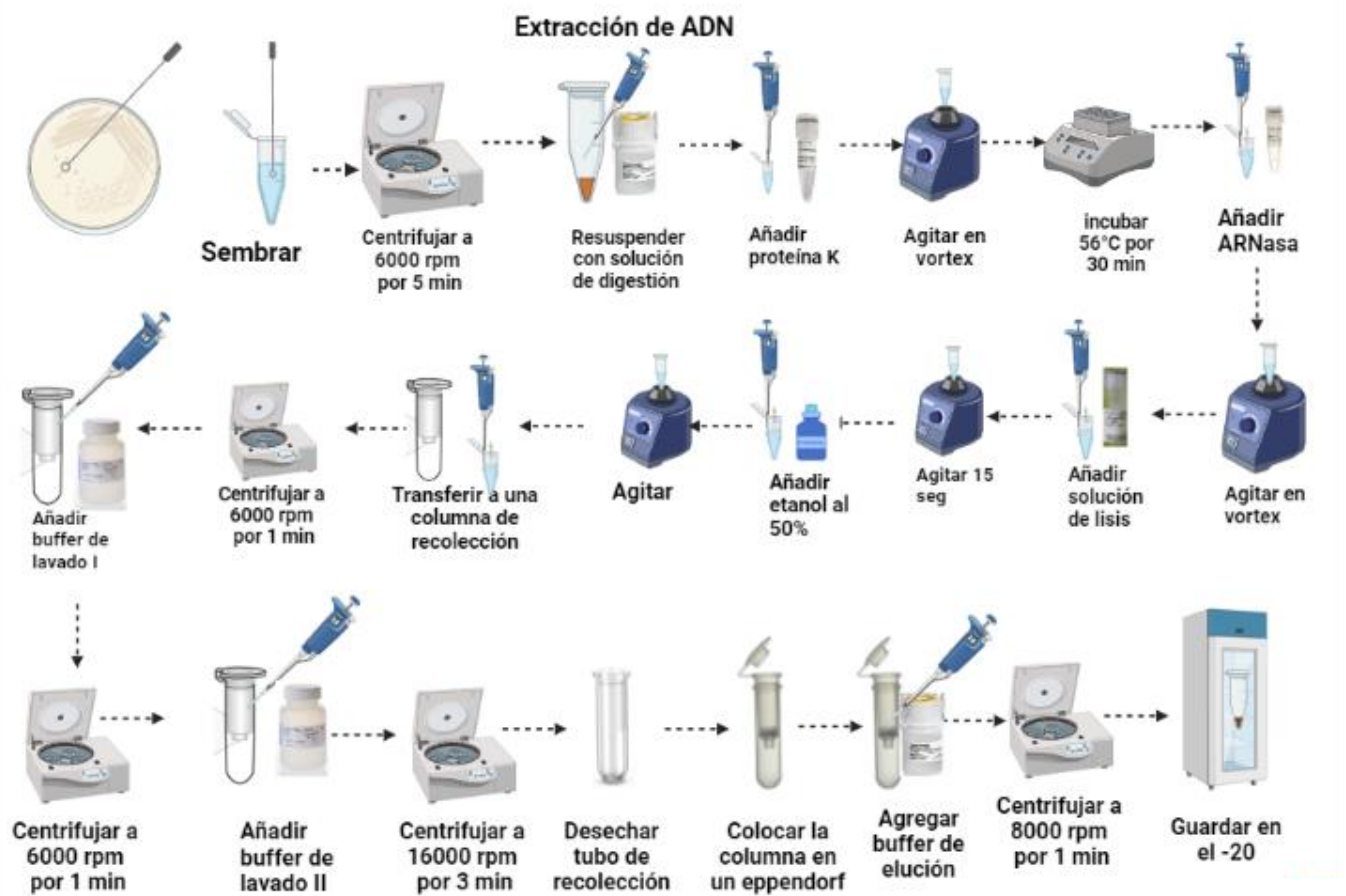


Tabla 1.*Cebador para utilizar en la PCR.*

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Gen/Secuencia	Tamaño de la amplificación (bp)	Condiciones de PCR
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTG ACG	BOX – sequence s	Tamaños variables	Para la desnaturalización se requiere de una temperatura de 94 °C durante 7 minutos, seguidamente se realizarán 30 ciclos a una temperatura de 94 °C durante 1 minuto, a 50 °C durante 1 minuto y a una temperatura de 65 °C durante 8 minutos y la extensión final se realizará a 65 °C durante 16 minutos.

Fuente: (Versalovic, 1994; Efstathiadou et al., 2021).

Cabe destacar que el tamaño de amplificación del cebador fue variado debido a las diferentes especies de *Rhizobium spp.*, por lo que el cebador buscará regiones continuas y dependiendo de la especie algunas coincidieron y otras no (**Versalovic, 1994**).

2.4.1. Desarrollo de PCR y electroforesis

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un kit DREAMTAQ GREEN PCR MASTER MIX 200 RX (50 µL) THERMO SCIENTIFIC empleando un volumen final de 50 µL que va a contener 100 ng de ADN molde genómico, tampón de reacción 1X (DreamTaq, DNA polymerase, 2X DreamTaq Green buffer, dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.4 mM each, and 4 mM MgCl₂, DreamTaq Green buffer) es una formulación patentada optimizada para un rendimiento sólido en PCR (**Efstathiadou et al., 2021**).

El proceso de amplificación del cebador (*Tabla 1*) consistió en 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 7 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridar a 50 °C por 1 min y extensión de 65 °C por 8 min, las reacciones de PCR terminarán con una extensión final a 65 °C durante 16 min (*Tabla 2*). 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 para verificar que el exista una amplificación resultante de la PCR, una vez comprobada la amplificación se realizó una segunda electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % a 60 V durante 3 h, a la izquierda se incluyó un marcador molecular de escalera de ADN denominada GENERULER 1kb DNA LADDER, READY TO USE. 50 µg THERMO SCIENTIFIC (**Efstathiadou et al., 2021**). El control positivo fue donado por la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). Finalmente, los geles se escanearon con el sistema GelDoc (Bio-Rad) de la facultad.

Tabla 2.

Condiciones de la PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	7 min
30 ciclos de desnaturalización	94 °C	1 min
Hibridación	50 °C	1 min
Extensión	65 °C	8 min
Extensión Final	65 °C	16 min

Fuente: (Efstathiadou et al., 2021).

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de la leguminosa

En esta investigación se recopiló información sobre la variación genética y morfológica de *Rhizobium* spp. que pueden nodular *Lupinus* spp. proveniente de diversas muestras de plantas en 4 localidades del cantón Latacunga como se indica en la tabla 3.

Tabla 3.

Promedio de las características de los nódulos de Lupinus spp.

Localidad	Número de nódulos	Peso de los nódulos (g)	Tamaño de los nódulos (mm)	coloración
L	15,625	5,038	0,975	Rojiza
U	13,75	5,498	1,51875	Rojiza
P	14,0000	6,318	1,49375	Rojiza
I	17,125	12,566	1,825	Rojiza

Nota: se realizó un promedio de la cantidad de raíces, nódulos y el peso de todas muestras que presentaron cada una de las localidades, así como el tamaño correspondiente a los dos nódulos seleccionados, los valores utilizados para obtener el promedio pueden ser visualizados en los anexos 2 y 3.

En lo que refiere a la cantidad de nódulos las plantas de la localidad Ignacio flores presentan el valor más alto con 17,125, el peso 12,566 gramos y el mayor tamaño con 1,825 mm (*Tabla 3*), debido a que la temperatura en la que se encontraban al momento de recolectar fue de 17 °C. A diferencia de las plantas de la localidad de Mulalo que presento un número de nódulos con un valor de 13,750, esto se debe a las bajas temperaturas del sector, presentando el día de la recolección 6 °C. **Pate et al., (2020)**, menciona que *Rhizobium* spp. al ser una bacteria mesófila es capaz de incrementar la formación de nódulos cuando se encuentra a una temperatura que oscilan entre 15 °C a 30 °C.

Las plantas de Toacaso, por otro lado, presentaron el menor peso de nódulos siendo este 5,038 g y un tamaño 0,975 mm (*Tabla 3*). Según **Li et al. (2018)**, menciona que tanto el número de nódulos, como el peso de los mismos, es un factor que se encuentra asociado al incremento en el tamaño de los nódulos. **Smytkiewicz et al. (2021)**, manifiesta que tanto la capacidad de fijar nitrógeno como con su rendimiento, va a depender de la especie de *Rhizobium* spp. que se encuentre nodulando la leguminosa incrementando de esta forma el peso del nódulo.

El tamaño de los nódulos también se encuentra relacionado con el proceso de replicación de *Rhizobium* spp. aumentando la capacidad de fijar nitrógeno beneficiando a *Lupinus* spp. (**Forrester & Ashman, 2020**). Considerándolo como un índice rápido y medible de la fijación de nitrógeno, controlada a través de la coloración que presenta el nódulo, cuando infecta *Rhizobium* spp. (**Moura et al., 2022**).

Según **Flynn & Idowu, (2019)**, manifiesta que todos aquellos nódulos que presentan una coloración rozada o rojiza, es un indicativo de que las bacterias se encuentran desempeñando eficientemente la fijación de nitrógeno y esta coloración es provocada por la leghemoglobina que controlar el flujo de oxígeno hacia las bacterias, indicando que están vivas y fijando nitrógeno. Los nódulos seleccionados presentaron esta característica como se indica en la tabla 3.

Tabla 4.

Características fenotípicas de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.

Código de criopreservación	Número de aislado	Color de la colonia		Apariencia	Tinción de Gram	Forma	Tipo
		Medio YMA	Medio YMA + RC				
RL1M1-C1	R1	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M1-C2	R2	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M2-C1	R3	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M2-C2	R4	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RL1M3-C1	R5	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M3-C2	R6	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M4-C1	R7	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RL1M4-C2	R8	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M5-C1	R9	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M5-C2	R10	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M6-C1	R11	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M6-C2	R12	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RL1M7-C1	R13	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M7-C2	R14	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RL1M8-C1	R15	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RL1M8-C2	R16	B	B	C	-	Alargada	Bacilos

Código de criopreservación	Número de aislado	Color de la colonia		Apariencia	Tinción de Gram	Forma	Tipo
		Medio YMA	Medio YMA + RC				
RU1M1-C1	R17	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU1M1-C2	R18	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU2M1-C1	R19	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU2M1-C2	R20	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU3M1-C1	R21	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU3M1-C2	R22	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU4M1-C1	R23	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU4M1-C2	R24	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RU5M1-C1	R25	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU5M1-C2	R26	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU6M1-C1	R27	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU6M1-C2	R28	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RU7M1-C1	R29	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU7M1-C2	R30	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RU8M1-C1	R31	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RU8M1-C2	R32	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP1M1-C1	R33	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP1M1-C2	R34	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP2M1-C1	R35	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RP2M1-C2	R36	B	B	C	-	Alargada	Bacilos

Código de criopreservación	Número de aislado	Color de la colonia		Apariencia	Tinción de Gram	Forma	Tipo
		Medio YMA	Medio YMA + RC				
RP3M1-C1	R37	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP3M1-C2	R38	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP4M1-C1	R39	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP4M1-C2	R40	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP5M1-C1	R41	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP5M1-C2	R42	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP6M1-C1	R43	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP6M1-C2	R44	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RP7M1-C1	R45	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP7M1-C2	R46	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RP8M1-C1	R47	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RP8M1-C2	R48	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI1M1-C1	R49	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI1M1-C2	R50	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI2M1-C1	R51	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI2M1-C2	R52	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI3M1-C1	R53	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI3M1-C2	R54	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI4M1-C1	R55	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI4M1-C2	R56	B	B	C	-	Alargada	Bacilos

Código de criopreservación	Número de aislado	Color de la colonia		Apariencia	Tinción de Gram	Forma	Tipo
		Medio YMA	Medio YMA + RC				
RI5M1-C1	R57	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI5M1-C2	R58	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI6M1-C1	R59	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI6M1-C2	R60	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RI7M1-C1	R61	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI7M1-C2	R62	B	B	C	-	Alargada	Bacilos
RI8M1-C1	R63	B	B	C	-	Cortos	Bacilos
RI8M1-C2	R64	B	B	C	-	Alargada	Bacilos

Nota: el resultado de la colonia en medio YMA es blanco debido a la composición de dicho medio, y mantuvo la coloración blanca a las 12 h, la tinción de Gram dio como resultado bacilos Gram negativos con formas alargadas, esto se debe a que la caracterización microscópica se llevó a cabo dentro las 24 h, mientras que los de forma corta fueron observados pasadas las 72 h. Los colores y apariencia de las colonias fueron reportadas como B: blanco, C: cremoso.

3.1.1. Aislamiento primario

Los nódulos fueron sembrados en placas que contenían medio Agar Levadura Manitol (YMA) debido a que este medio le proporciona las condiciones necesarias para el crecimiento de *Rhizobium* spp, presentando una apariencia blanquecina cremosa a los 2 días de incubación (*Anexos 3A*). Los resultados son similares a los obtenidos por **Garcha et al., (2019)**, en donde menciona que las cepas de *Rhizobium* spp. aparecieron

a los 2 o 3 días. Esta información estuvo corroborada por **Soares et al. (2020)**, en donde los aislados aparecieron a los 2 días. Se empleó este medio debido a que va a proveer de una fuente de nitrógeno (extracto de levadura) y de carbohidratos como es el manitol, lo que contribuye a que *Rhizobium* spp. tenga un crecimiento eficiente (**Jiménez et al., 2018; Garcha et al., 2019**).

3.1.2. Aislamiento secundario

Al realizar el aislamiento secundario se empleó medio YMA + Rojo Congo (RC) (*tabla 4*) permite identificar bacterias de *Rhizobium* spp. de otras especies bacterianas, esto se debe a que algunos *Rhizobium* spp. no son capaces de absorber el RC del medio, presentando una coloración blanca a las 12 h (**Niste et al., 2015**). Los aislados presentaron esta coloración como se muestra en el *Anexo 3B*. Sin embargo, la coloración que se fue cambiando conforme transcurría el tiempo a las 24 h fue rosa blanquecino (*Anexo 3C*), y pasado las 72 h fue rojo intenso (*Anexo 3D*). Según **Menéndez et al., (2019)**, la absorción del RC está relacionada con el contenido de celulosa que se encuentra en el cultivo bacteriano, algunas especies que pertenecen a la familia Rhizobiaceae presentan la capacidad de sintetizar celulosa o sales sódicas (**Astuti et al., 2021**). **Paudyal et al., (2021)** indica que, al transcurrir 24 horas dicha bacteria puede ser capaz de absorber el RC del medio. Las colonias de *Rhizobium* spp. se caracterizan por tener colonias circulares o alargadas, cremosas, elevadas y mucoides (**Ibny et al., 2019**), lo que se evidenció en los resultados obtenidos (*Anexo 3D*).

La tinción de Gram (*Tabla 4*) dio como resultado bacilos Gram negativos (*Anexo 4F*) con una forma corta y alargada, siendo confirmado por **Zafar et al., (2017)**, en donde al realizar la caracterización microscópica de *Rhizobium* spp. fue bacilos Gram negativos con forma de bastón alargada a las 24 h. Pasado ese tiempo comienzan a acortarse (*Anexo 4E*), obteniendo una forma de bastón corto (**Dahal et al., 2022**).

3.1.3. Pruebas bioquímicas

Tabla 5.*Características bioquímicas de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.*

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	Nº de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
Toacaso	L1	R1	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R2	B	2	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L2	R3	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R4	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L3	R5	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R6	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L4	R7	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R8	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L5	R9	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R10	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L6	R11	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R12	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L7	R13	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R14	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	L8	R15	A	1	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R16	B	2	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
Mulalo	U1	R17	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R18	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U2	R19	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R20	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U3	R21	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R22	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U4	R23	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R24	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U5	R25	A	1	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R26	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U6	R27	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R28	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U7	R29	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R30	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	U8	R31	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R32	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P1	R33	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
Poalo		R34	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P2	R35	A	1	+	+	+	-	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R36	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P3	R37	A	1	+	+	+	-	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R38	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P4	R39	A	1	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R40	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P5	R41	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R42	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P6	R43	A	1	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R44	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P7	R45	A	1	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R46	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	P8	R47	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R48	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I1	R49	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R50	B	2	+	+	+	-	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
Ignacio Flores	I2	R51	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R52	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I3	R53	A	1	+	+	+	-	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R54	B	2	+	-	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I4	R55	A	1	+	+	+	-	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R56	B	2	+	+	+	+	+	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I5	R57	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R58	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I6	R59	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Muestra				Pruebas bioquímicas							
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	RM	VP	Catalasa	Hidrolisis de almidón	Citrato de Simmons	Medio SIM	TSI
		R60	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I7	R61	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R62	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
	I8	R63	A	1	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N
		R64	B	2	+	+	+	+	-	M +, I +, H ₂ S -	N/N

Nota: +: positivo, -: negativo, **Rojo de metilo:** positivo para la producción de ácidos que se obtiene como resultado de la fermentación de glucosa. **Voges Proskauer:** presencia de acetoína debido a que la bacteria es capaz de fermentar glucosa. **Catalasa:** indica la presencia de la enzima catalasa. **Hidrolisis de almidón:** se utiliza para obtener glucosa mediante la ruptura de las moléculas de almidón con la ayuda de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa. **Citrato de Simmons:** indica si las bacterias son capaces de desarrollarse en citrato

como única fuente de carbono y como fuente de nitrógeno sales amónicas inorgánicas dando como resultado una alcalinización del medio. **Medio SIM:** liberación enzimática de ácido sulfhídrico a partir de los aminoácidos azufrados para producir sulfuro de hierro, para la movilidad se observa turbidez o desplazamiento en el medio, para la producción de indol capacidad del microorganismo para oxidar al triptófano y producir indol. **TSI:** N/N (Muestra un crecimiento sin fermentación de los tres azúcares, ni producción de sulfuro de hidrógeno).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la comprobación del género *Rhizobium* spp. fueron catalasa, indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato, fermentación de azúcares (TSI), producción de H₂S, se evidencian en la tabla 5. Para el resultado de la prueba rojo de metilo se obtuvo un resultado positivo en todos los aislamientos (100 %) (*Anexo 5A*), como lo indica **Soundarya et al. (2022)**, en su investigación, esto se debe a que *Rhizobium* spp. es capaz de consumir la glucosa presente en el medio de cultivo.

La prueba de Voges Proskauer (*Anexo 5B*), dio un resultado positivo en las muestras (98 %), exceptuando I4R54. Según **Hossain et al., (2019)**, también presentó un resultado positivo, ya que es capaz de fermentar glucosa dando como resultado una coloración rojiza. La prueba de catalasa (*Anexo 5C*), presentó un resultado positivo en todos los aislados (100 %), siendo confirmado con los resultados de **Pandey & Chakraborty (2019)**, debido a la formación de burbujas, haciendo que esta prueba sea positiva, lo que significa que *Rhizobium* spp. es aeróbica.

La prueba de hidrólisis de almidón (*Anexo 5G*) dio un resultado positivo en la mayoría de los aislados, con excepción en P2R35, P3R37, I1R50, I3R53 e I4R55 (92 %). Según **Nushair et al., (2018)**, el resultado es positivo, pero todo va a depender de la capacidad de crecimiento de las cepas, ya que si presentan un crecimiento lento serán incapaces de utilizar el almidón, por lo que su resultado dará negativo. La prueba de citrato (*Anexo 5D*) dio negativo para los aislados, excepto L1R2, L8R15, L8R16, U5R25, P4R39, P6R43, P7R45, I3R54 e I4R56 (86 %), corroborado por **Shahzad et al. (2019)**, presentando en su investigación un resultado negativo. Sin embargo, manifiesta que algunos aislados de *Rhizobium* spp. son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, pero en su gran mayoría están restringidos para esta especie bacteriana.

La prueba de motilidad (*Anexo 5F*) en donde se dio un resultado positivo (100%), confirmado por **Pérez-Pérez et al. (2019)**, quien menciona que, al producir bajos niveles de ácidos, se puede observar mayor motilidad presentando un cambio de enturbiamiento del medio y crecimiento a lo largo de la línea de siembra. La prueba

de indol (*Anexo 5F*) fue positiva (100 %), siendo confirmada por **Verma et al. (2022)**, siendo positivo en sus resultados, esto se debe a que *Rhizobium* spp. es capaz de oxidar el triptófano produciendo un anillo de color rosado correspondiente al indol. La prueba de sulfuro de hidrógeno (*Anexo 5F*) fue negativa (0 %), porque no se presentó un ennegrecimiento del medio. Según **Zou et al., (2019)**, manifiesta que todos los aislados fueron incapaces de producir H₂S en su investigación, esto se debe algunas especies de *Rhizobium* spp. no son capaces de producir ácido sulfhídrico.

La prueba de triple azúcar hierro (TSI) (*Anexo 5E*) dio un resultado N/N (0 %), corroborado por **Sahoo et al. (2022)**, en su investigación el resultado fue negativo para esta prueba, debido a que se presentó una interferencia, ya que se tomó una colonia de un medio que contenía un indicador y fue corroborado por **Yadav et al., (2021)**, quien en sus resultados la mitad de sus aislados dio negativo para esta prueba, esto se debe a su limitada capacidad metabólica, así como a que se especializa en fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas y suele utilizarse mayormente para la identificación de otros géneros bacterianos lo cual es una limitación. Sin embargo, en otras investigaciones se obtiene resultados K/A y algunos producen gas, ya que *Rhizobium* spp. presenta la capacidad de asimilar glucosa y producir gas en este medio, pero no son capaces de fermentar lactosa (**Jumaah et al., 2022**).

3.1.4. Prueba de identificación

Tabla 6.

Prueba de autenticación de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.

Muestra				Medio YMA	
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	+
					Púrpura de bromocresol
Toacaso	L1	R1	A	1	C
		R2	B	2	C
	L2	R3	A	1	C
		R4	B	2	C
	L3	R5	A	1	A
		R6	B	2	A
	L4	R7	A	1	A
		R8	B	2	A
	L5	R9	A	1	A
		R10	B	2	A
	L6	R11	A	1	A
		R12	B	2	A
	L7	R13	A	1	C
		R14	B	2	C
	L8	R15	A	1	M

Muestra				Medio YMA	
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	+
					Púrpura de bromocresol
		R16	B	2	M
	U1	R17	A	1	A
		R18	B	2	A
	U2	R19	A	1	A
		R20	B	2	A
	U3	R21	A	1	M
		R22	B	2	M
	U4	R23	A	1	C
		R24	B	2	C
Mulalo	U5	R25	A	1	A
		R26	B	2	A
	U6	R27	A	1	A
		R28	B	2	A
	U7	R29	A	1	A
		R30	B	2	A
	U8	R31	A	1	M
		R32	B	2	M
	P1	R33	A	1	A
Poalo		R34	B	2	A

Muestra				Medio YMA	
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	+
					Púrpura de bromocresol
	P2	R35	A	1	M
		R36	B	2	M
	P3	R37	A	1	A
		R38	B	2	A
	P4	R39	A	1	M
		R40	B	2	M
	P5	R41	A	1	A
		R42	B	2	A
	P6	R43	A	1	A
		R44	B	2	A
	P7	R45	A	1	A
		R46	B	2	A
	P8	R47	A	1	M
		R48	B	2	M
	I1	R49	A	1	A
		R50	B	2	A
Ignacio Flores	I2	R51	A	1	C
		R52	B	2	C
	I3	R53	A	1	A

Muestra				Medio YMA	
Localidad	Planta	N° de aislado	Placa	Colonias	+ Púrpura de bromocresol
		R54	B	2	A
	I4	R55	A	1	M
		R56	B	2	M
	I5	R57	A	1	A
		R58	B	2	A
	I6	R59	A	1	A
		R60	B	2	A
	I7	R61	A	1	C
		R62	B	2	C
	I8	R63	A	1	C
		R64	B	2	C

Nota: *coloración Morada:* crecimiento neutro, *color celeste:* crecimiento lento y el *color amarillo:* crecimiento rápido de *Rhizobium* spp. Los colores del medio serán reportados de la siguiente forma: C: celeste, M: morado y A: amarillo.

Una de las pruebas de identificación para el género *Rhizobium* spp. es utilizar un colocar al medio YMA púrpura de bromocresol (tabla 6) o azul de bromotimol que actúa como un indicador de pH (Gunnabo et al., 2021). Si el aislado de *Rhizobium* spp. que se encuentra en el medio es de crecimiento rápido, el color del medio se vuelve de color amarillo por la producción de ácido en el medio (Anexo 6D, E, F), confirmado por Guamán et al. (2018), en donde manifiesta que la coloración amarilla es mayormente asociada con el género Rhizobiaceae. Mientras que la coloración

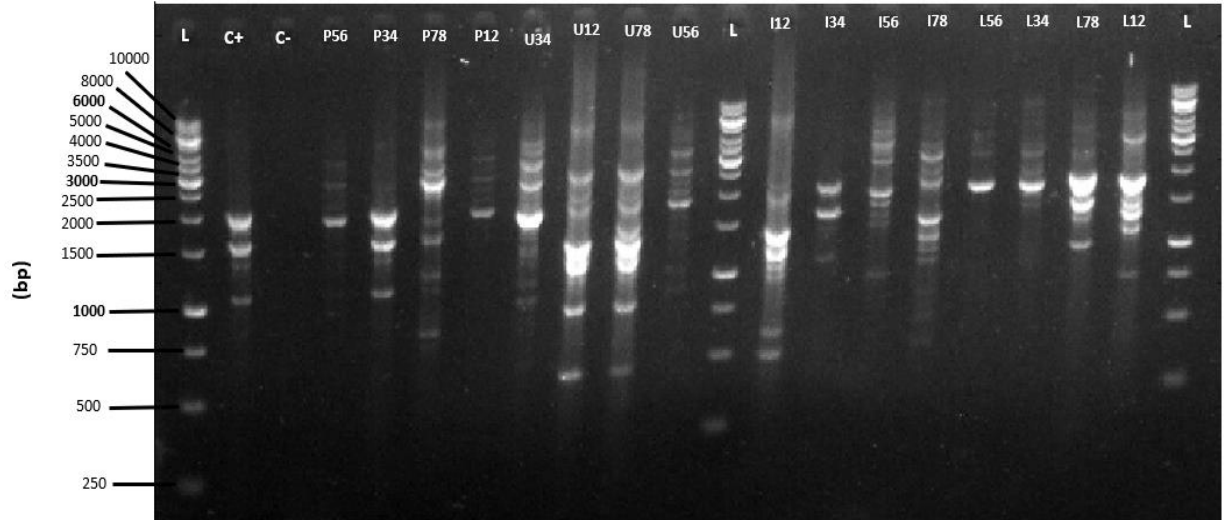
celeste se debe a un crecimiento un aislado de *Rhizobium* spp. de crecimiento lento (*Anexo 6B, C*), y la coloración morada (*Anexo 6A, B*), es de un crecimiento neutro. Según **Carpio (2017)**, consiguió resultados similares, esto se debe a que los aislados de *Rhizobium* spp. de crecimiento lento van a alcalinizar el medio provocando el cambio de color a celeste con una fijación media de nitrógeno y mantuvo la coloración debido a que tuvo una fijación baja de nitrógeno siendo incapaz de cambiar pH del medio.

3.1.5. Distancia genética de los aislados

Los aislados procedentes de las cepas obtenidas presentaron características mediante fingerprinting con bandas distintivas que oscilaban entre 635 y 9352 pb. A su vez, el número de bandas de los aislamientos fue de 3 a 13 bandas (*figura 11*), analizado mediante el programa GelAnalyzer (*Anexo 7*). El dendograma de similitud que se generó con base en los resultados obtenidos de la BOX-PCR en los aislamientos de *Rhizobium* spp. en dos grupos principales, el grupo A y el grupo B (*figura 12*). En el grupo A se encontraron 15 aislados (P56, U34, P12, I34, L56, L78, 634, I56, L12, P34, I78, U12, U78, P78, U56) obtenidos de las muestras recolectadas procedentes de las 4 localidades 1: Toacaso (L), 2: Mulalo (U), 3: Poalo (P) y 4: Ignacio Flores (I), mientras que el grupo B contiene un aislamiento (I12) de la cuarta localidad (Ignacio Flores).

Figura 11.

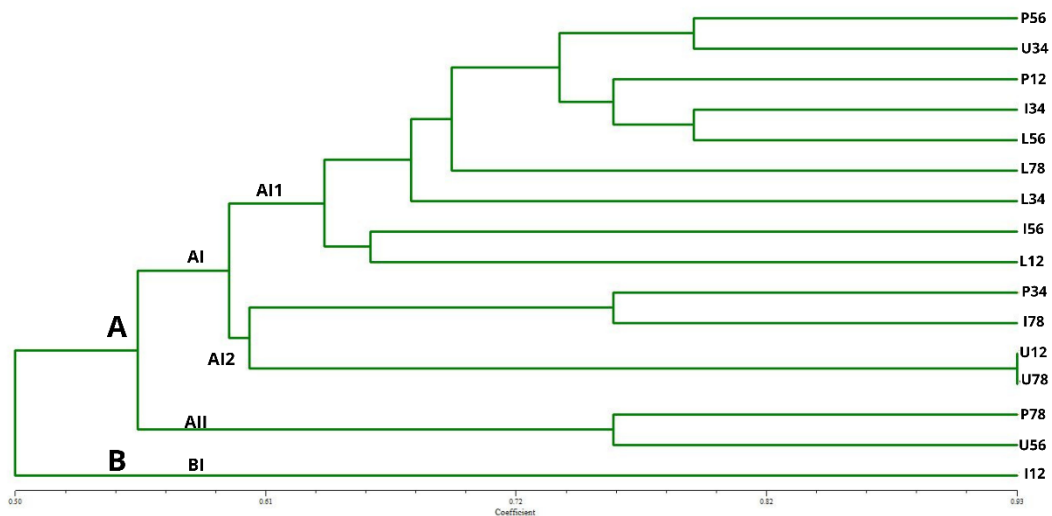
Electroforesis en gel de agarosa de patrones fingerprinting de ADN de los aislados.



Nota: *electroforesis de 16 muestras provenientes de los aislados de Rhizobium spp., 2 controles el positivo (C+), negativo (C-) y 3 escaleras moleculares o Ladder (L).*

Figura 12.

Dendrograma que muestra la relación genética de los aislados de Rhizobium spp. provenientes de Lupinus spp.



Nota: *obtenido después del análisis de productos BOX-PCR utilizando el método UPGMA y el coeficiente de similitud de Nei72, mediante el programa NTSYSnp.*

La figura 12 muestra el dendograma de la unificación de los resultados basados en los resultados de la BOX – Fingerprinting realizadas a los aislados de *Lupinus* spp. A partir de una similitud 50 %, dando origen a dos grupos que se pueden identificar claramente A y B.

Al considerar una similitud 55 % el grupo A dio origen a dos subgrupos AI y AII. El subgrupo AI, con base a un coeficiente de 59 %. El subgrupo AI se subdivide en los grupos AI1 con una similitud de 64 % que agrupa 9 aislados procedente de las 4 localidades, mientras que el grupo AI2 tiene un 60 % de similitud y agrupa 4 aislados de las localidades Poalo, Ignacio Flores y Mulalo. El subgrupo AII presentaron una similitud genética del 76 % agrupando a 2 aislados de las localidades Mulalo e Ignacio Flores. El grupo B presenta un aislamiento único I12 con una similitud del 50 % proveniente a la localidad Ignacio Flores.

En esta investigación, el análisis de BOX-PCR reflejo la variabilidad en las secuencias de ADN entre los aislados empleados. La mayor parte de los aislamientos dieron como resultado un patrón de bandas único, excepto U12, U78 que presentaron bandas similares y puede ser confirmado en el dendograma. Esto evidencia la variabilidad genética que muestran las *Rhizobium* spp. asiladas de diferentes suelos agrícolas del cantón Latacunga. Esta información es corroborada con la información proporcionada en diversas partes del mundo, en las que se puede evidenciar gran cantidad de *Rhizobium* spp. en cultivos de leguminosas, así como los beneficios de la simbiosis rizobio-leguminosa (Torres et al., 2021). Sin embargo, el aislado de BI no ha evolucionado en el tiempo, debido a que las condiciones en las que se ha desarrollado son constantes hasta la actualidad.

La alta diversidad de *Rhizobium* spp. se debe a la necesidad que tienen las plantas para fijar nitrógeno, lo incrementa la formación de nódulos en la raíz, dando como resultado una gran diversidad de rizobios (Moura et al., 2020). Tanto los resultados obtenidos como en la investigación de Salmi et al. (2021), presentan una alta diversidad de las especies de *Rhizobium* spp. en aislados de *Lupinus* spp. utilizando la metodología de BOX-PCR fingerprinting.

3.2. Verificación de la hipótesis

Hipótesis nula rechazada

Los aislamientos procedentes de nódulos de *Lupinus* spp. presentan características morfológicas, bioquímicas y variabilidad genética pertenecen al género *Rhizobium* spp. De las 64 cepas aisladas, el 100 % pertenecen al género *Rhizobium* spp.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se aislaron 64 cepas de *Rhizobium* spp. donde 32 aislamientos correspondieron al original y 32 cepas que corresponden a los clones provenientes de dos nódulos de raíz de chocho (*Lupinus* spp.), el primer aislamiento se llevó a cabo en medio agar levadura manitol o YMA, en el que presentó una apariencia cremosa y sus colonias fueron de color blanco, el segundo aislamiento se realizó en medio YMA suplementado con rojo Congo las colonias mantuvieron su apariencia cremosa, las colonias aisladas fueron blancas a las 12 h, rosadas a las 24 h y a las 72 h fueron rojizas.

Se identificó que los aislados pertenecen al género *Rhizobium* spp, mediante la realización de pruebas se obtuvo resultados positivos con un porcentaje del 98 para Voges Proskauer, 100 % para Rojo de Metilo, Catalasa 100 %, Hidrólisis de Almidón 92 %, Motilidad 100 %, Indol 100 %. Fueron negativos con un porcentaje de 86 % citrato, para H₂S 0 %, TSI N/N 0 % y una prueba de autenticación en la que se utilizó medio YMA + púrpura de bromocresol identificando a los aislados donde 36 presentaron un crecimiento rápido, 14 presentaron un crecimiento lento y 14 presentaron un crecimiento neutro.

Se evaluó la distancia genética de 32 aislados agrupados en muestras compuestas con un total de 16 aislamientos y se analizaron mediante PCR fingerprinting que tiene su fundamentación en BOX-PCR para ello se empleó el primer BOX-A1R, con la ayuda de un dendograma se observó que los 16 aislados, 3 presentaron diversidad genética y heterogeneidad (P12, L78, L34), mientras que 12 fueron genéticamente similares y presentaron homogeneidad (P56, U34, I34, L56, I56, L12, P34, I78, U12, U78, P78 y U56) y un aislado único (I12).

Se caracterizó *Rhizobium* spp. a partir de chocho proveniente de cuatro localidades del cantón Latacunga, donde los nódulos que fueron extraídos presentaron coloración rojiza, juntamente con el peso y el número de nódulos presente en las raíces tanto principal como secundaria siendo este un indicador de la fijación de nitrógeno por parte de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* spp., para su aislamiento se empleó un medio selectivo que permitió su caracterización fenotípica y morfológica donde las colonias en su mayoría presentaron una forma plana, coloración blanca, algunas fueron brillantes, otras lechosas y opacas, fueron bacilos Gram negativos cortos y alargados, el género fue comprobado tanto por pruebas bioquímicas como de autenticidad y a partir de la PCR fingerprinting se logró comprender la elevada diversidad genética que pueden presentar los aislamientos de *Rhizobium* spp. en las cuatro localidades del cantón Latacunga. Mediante el uso de la biotecnología estas bacterias pueden ser utilizadas para contribuir en la disminución del cambio climático.

4.2. Recomendaciones

Dejar más tiempo al momento de realizar la desinfección de los nódulos debido algunos microorganismos lograron sobrevivir causando la contaminación del aislamiento.

Realizar mayor cantidad de pruebas bioquímicas específicas para este género bacteriano con la finalidad de evitar confusiones a la hora de interpretar los resultados.

Se puede comprobar la diversidad genética de los perfiles obtenidos mediante la PCR fingerprinting mediante una prueba molecular más específica.

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abobatta, W., el - Hashash EF, Y Hegab, R. (2021). Challenges and opportunities for the global cultivation and adaption of legumes. *J Appl Biotechnol Bioeng.*, 8(5), 160–172. <https://doi.org/10.15406/jabb.2021.08.00270>
- Agtuca, B., Stopka, S., Evans, S., Samarah, L., Liu, Y., Xu, D., Stacey, M., Koppenaar, D., Paša-Tolić, L., Anderton, C., Vertes, A., Y Stacey, G. (2020). Metabolomic profiling of wild-type and mutant soybean root nodules using laser-ablation electrospray ionization mass spectrometry reveals altered metabolism. *The Plant Journal*, 103(5), 1937–1958. <https://doi.org/10.1111/TPJ.14815>
- Aguero, S. (2018). *Sistemas de producción de Lupinus mutabilis Sweet ‘chocho’ en terrazas y laderas con fertilización fosfatada en Cajamarca* [Universidad Nacional Agraria La Molina]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3090/aguero-aguilar-silvia-doris.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Ambika M., Gayacharan, Hamwiah, A., Talukdar, A., Kumar Gupta, S., Sharma, B. B., Joshi, R., Upadhyaya, H. D., Singh, K., Y Kumar, R. (2022). Unraveling Origin, History, Genetics, and Strategies for Accelerated Domestication and Diversification of Food Legumes. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.932430>
- Arnéz J, Rojas P., Nina J., Julio, G.-O., Meneces, A., el Paso Quillacollo, Z., Estado Plurinacional de Bolivia, C., & Vallejo J. (2021). Adaptabilidad de dos especies de *Lupinus* en diferentes ambientes de los valles interandinos de Bolivia. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 9(2), 69–80. <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2021.090200069>
- Astuti, A., Mulyono, Y Fauzi, R. (2021). Characterization of *Rhizobium* Indigenous Isolates and Their Compatibility with Edamame Soybean. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 752(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/752/1/012001>

- Barda, M., Chatzigeorgiou, T., Papadopoulos, G, Y Bebeli, P. (2021). Agro-Morphological Evaluation of *Lupinus mutabilis* in Two Locations in Greece and Association with Insect Pollinators. *Agriculture* 2021, Vol. 11, Page 236, 11(3), 236. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11030236>
- Blanco, E., Castro, Y., Olivo, A., Skwierinski, R., Y Barrios, F. (2020). Germination and initial growth of bell pepper and lettuce inoculated with rhizobia and molecular identification of the strains. *Bioagro*, 30(3), 207–218. <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2719>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2018). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Carpíó, M. J. (2017). *Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rizobios asociados a cultivos de arveja (Pisum sativum L.), chocho (Lupinus mutabilis S.), frejol (Phaseolus vulgaris L.), haba (Vicia faba L.) y vicia (Vicia sp.) en suelos de la Provincia de Imbabura y obtención de un banco de cepas* [Universidad de las Fuerzas Armadas -ESPE]. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/82>
- Chen, J., Shen, W., Xu, H., Li, Y., Y Luo, T. (2019). The composition of nitrogen-fixing microorganisms correlates with soil nitrogen content during reforestation: A comparison between legume and non-legume plantations. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 508. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00508/>
- Coelho, L. (2021). *Inoculação e coinoculação suplementar tardia com Rhizobium tropici e Azospirillum brasilense como estratégias para aumento da nodulação e produtividade do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.)* [Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/42618>
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L., & Tringe, S. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *The New Phytologist*, 209(2), 798–811. <https://doi.org/10.1111/NPH.13697>

- Confortin, T., Toderó, I., Luft, L., Soares, J., Mazutti, M., Zobot, G., Y Tres, M. (2018). Importance of *Lupinus albus* in agricultural and food-related areas: A review. *3 Biotech*, 8(10), 448. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1474-X>
- Dahal, R., Chaudhary, D., Kim, J., Kim, D., Y Kim, J. (2022). Genome Insight and Description of Previously Uncultured N₂-Fixing Bacterium *Rhizobium terricola* sp. nov., Isolated from Forest Rhizospheric Soil by Using Modified Culture Method. *Diversity*, 14(9), 733. <https://doi.org/10.3390/D14090733/S1>
- de La Rosa, C., Lozano, L., Castillo-Ramírez, S., Covarrubias, A., Y Reyes, J. (2020). Origin and Evolutionary Dynamics of the miR2119 and ADH1 Regulatory Module in Legumes. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2355–2369. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVAA205>
- Díez, A. (2019). *Análisis genómico y funcional de Rhizobium cellulosilyticum ALA10B2T como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón celABC en la biosíntesis de celulosa bacteriana*. https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/140394/DMG_D%C3%ADezM%C3%A9ndezA_RhizobiumCellulosilyticumALA10B2T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Efstathiadou, E., Ntatsi, G., Savvas, D., & Tampakaki, A. P. (2021). Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016, October 18). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura; FAO. <https://doi.org/10.4060/CC2323EN>
- Flynn, R., Y Idowu, J. (2019). *Nitrogen Fixation by Legumes*. New Mexico State University - BE BOLD. Shape the Future. https://pubs.nmsu.edu/_a/A129/
- Forrester, N., Y Ashman, T. (2020). Autopolyploidy alters nodule-level interactions in the legume–rhizobium mutualism. *American Journal of Botany*, 107(2), 179–185. <https://doi.org/10.1002/AJB2.1375>

- Fukami, J., Cerezini, P., Y Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13568-018-0608-1>
- Garabato, B. (2018). *Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas*. [Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21379/1/uy24-19135.pdf>
- García-Blasquez, C., Morote, C., Y Sato, M. (2019). Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes. *Rev. Inv. UNSCH*, 1(27). <https://doi.org/https://doi.org/10.51440/unsch.revistainvestigacion.2019.1.119>
- Giller, K., Delaune, T., Silva, J., Descheemaeker, K., van de Ven, G., Schut, A., van Wijk, M., Hammond, J., Hochman, Z., Taulya, G., Chikowo, R., Narayanan, S., Kishore, A., Bresciani, F., Teixeira, H., Andersson, J., Y van Ittersum, M. (2021). The future of farming: Who will produce our food? *Food Security*, 13(5), 1073–1099. <https://doi.org/10.1007/S12571-021-01184-6/>
- Guamán, F., Torres, R., Y Nópoles, M. (2018). Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. en el sur de Ecuador. *Redalyc*, 37(1), 40–47. <https://www.redalyc.org/journal/1932/193245041006/html/>
- Gulisano, A., Alves, S., Martins, J., Y Trindade, L. (2019). Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1385. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01385/>
- Gulisano, A., Dechesne, A., Paulo, M., Y Trindade, L. (2023). Investigating the potential of Andean lupin as a lignocellulosic feedstock for Europe: First genome-wide association study on *Lupinus mutabilis* biomass quality. *GCB Bioenergy*, 15(1), 38–57. <https://doi.org/10.1111/GCBB.13006>
- Gulisano, A., Lippolis, A., van Loo, E., Paulo, M., Y Trindade, L. (2023). A genome wide association study to dissect the genetic architecture of agronomic traits in Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1099293>

- Gunnabo, A., Geurts, R., Wolde-Meskel, E., Degefu, T., Giller, K., Y van Heerwaarden, J. (2021). Phylogeographic distribution of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(4), 46. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAB046>
- Guzmán, D., Y Montero, J. (2021). Interaction of bacteria and plants in nitrogen fixation. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 2518–6868. <https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Hossain, A., Gunri, S., Barman, M., Sabagh, A., Y Teixeira Da Silva, J. (2019). Isolation, characterization and purification of *Rhizobium* strain to enrich the productivity of groundnut (*Arachis hypogaea* L). *Open Agriculture*, 4(1), 400–409. <https://doi.org/10.1515/OPAG-2019-0040/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Ibny, F., Jaiswal, S., Mohammed, M., Y Dakora, F. (2019). Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48944-1>
- Jeromela, A., Mikić, A., Vujić, S., Čupina, B., Krstić, Đ., Dimitrijević, A., Vasiljević, S., Mihailović, V., Cvejić, S., Y Miladinović, D. (2017). Potential of legume–brassica intercrops for forage production and green manure: Encouragements from a temperate southeast european environment. *Frontiers in Plant Science*, 8(12), 325. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00312/>
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J., García-Fraile, P., Mateos, P., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports 2017 8:1*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z>
- Jumaah, O., Sultan, R., Y Assafi, M. S. (2022). Antimicrobial Activity of Local Rhizobial Isolates Against Some fungi . *Journal of Education and Science*, 31(02), 141–149. <https://doi.org/10.33899/edusj.2022.133511.1230>
- Koenen, E., Ojeda, D., Bakker, F., Wieringa, J., Kidner, C., Hardy, O., Pennington, R., Herendeen, P., Bruneau, A., Y Hughes, C. (2021). The Origin of the Legumes is a Complex Paleopolyploid Phylogenomic Tangle Closely Associated with the

- Cretaceous–Paleogene (K–Pg) Mass Extinction Event. *Systematic Biology*, 70(3), 508–526. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYAA041>
- Koenen, E., Ojeda, D., Steeves, R., Migliore, J., Bakker, F., Wieringa, J., Kidner, C., Hardy, O., Pennington, R., Herendeen, P., Bruneau, A., Y Hughes, C. (2019). The Origin and Early Evolution of the Legumes are a Complex Paleopolyploid Phylogenomic Tangle closely associated with the Cretaceous-Paleogene (K-Pg) Boundary. *BioRxiv*, 577957. <https://doi.org/10.1101/577957>
- Ladha, J., Peoples, M., Reddy, P., Biswas, J., Bennett, A., Jat, M., Y Krupnik, T. (2022). Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Research*, 283, 108541. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2022.108541>
- Li, X., Sardans, J., Gargallo-Garriga, A., Asensio, D., Vallicrosa, H., Y Peñuelas, J. (2020). Nitrogen reduction processes in paddy soils across climatic gradients: Key controlling factors and environmental implications. *Geoderma*, 368. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114275>
- Li, X., Zheng, J., Yang, Y., Y Liao, H. (2018). INCREASING NODULE SIZE1 Expression Is Required for Normal Rhizobial Symbiosis and Nodule Development. *Plant Physiology*, 178(3), 1233–1248. <https://doi.org/10.1104/PP.18.01018>
- Lindström, K., Y Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Lombo, L., Y Mancipe, D. (2021). *Análisis de los impactos ambientales ocasionados por el uso de los fertilizantes nitrogenados, en el cultivo de papa en el Municipio de Zipaquirá* [Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/27721/LomboCelisLadyJohanna2021.PDF.docx.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). *Productores con apoyo del MAG cultivan leguminosas y granos andinos – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. <https://www.agricultura.gob.ec/productores-con-apoyo-del-mag-cultivan-leguminosas-y-granos-andinos/>

- Masi, M., Nocera, P., Boari, A., Zonno, M., Pescitelli, G., Sarrocco, S., Baroncelli, R., Vannacci, G., Vurro, M., Y Evidente, A. (2020). Secondary metabolites produced by *Colletotrichum lupini*, the causal agent of anthracnose of lupin (*Lupinus* spp.). *Micología*, 112(3), 533–542. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1732148>
- Mekonnen, A., Y Debebe, A. (2021). Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium* Strains from Fababean (*Vicia faba* L) Nodule from Arsi Zone of Ethiopia. *Sch J Agric Vet Sci*, 8(9), 82–86. <https://doi.org/10.36347/sjavs.2021.v08i09.001>
- Menéndez, E., Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J., Velázquez, E., Rivas, R., Murray, J., Y Mateos, P. (2019). Legumes display common and host-specific responses to the rhizobial cellulase CelC₂ during primary symbiotic infection. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50337-3>
- Moura, E., Carvalho, C., Bucher, C., Souza, J., Aguiar, A., Ferraz, A., Bucher, C., Y Coelho, K. P. (2020). Diversity of Rhizobia and Importance of Their Interactions with Legume Trees for Feasibility and Sustainability of the Tropical Agrosystems. *Diversity* 2020, Vol. 12, Page 206, 12(5), 206. <https://doi.org/10.3390/D12050206>
- Moura, F., Ribeiro, R., Helene, L., Nogueira, M., Y Hungria, M. (2022). So many rhizobial partners, so little nitrogen fixed: The intriguing symbiotic promiscuity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Symbiosis*, 86(2), 169–185. <https://doi.org/10.1007/S13199-022-00831-6/>
- Munir, N., Hanif, M., Abideen, Z., Sohail, M., El-Keblawy, A., Radicetti, E., Mancinelli, R., Y Haider, G. (2022). Mechanisms and Strategies of Plant Microbiome Interactions to Mitigate Abiotic Stresses. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 2069, 12(9), 2069. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12092069>
- Naciones Unidas. (2018). *Objetivo 13: Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático*. Objetivos de Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/climate-change-2/>
- Naciones Unidas. (2020). *Biodiversity And The 2030 AGENDA For Sustainable Development*. <https://www.cbd.int/development/doc/biodiversity-2030-agenda-technical-note-en.pdf>

- Nakei, M., Venkataramana, P., Y Ndakidemi, P. (2022). Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 135. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.824444/>
- Niste, M., Vidican, R., Puia, C., Rotar, I., Y Pop, R. (2015). Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* using API 20 NE and API 20 E. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 72(1). <https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-AGR:11178>
- Nushair, A., Saha, A., Mandal, A., Rahman, M., Mohanta, M., Hasan, M., Y Haque, M. (2018). *Rhizobium* sp. CCNWYC119: A single strain highly effective as biofertilizer for three different peas (pigeon pea, sweet pea and chick pea). *Legume Research*, 41(5), 771–777. <https://doi.org/10.18805/LR-389>
- Oryakhil, Q., Y Irfan, M. A. (2020). *Morphological Biochemical And Plant Growth Promoting Characterization Of Rhizobia Isolated From Root Nodule Of Cicer Arietinum*. 1(2), 59–63. <https://doi.org/10.26480/taec.02.2020.59.63>
- Pacsi, E. (2021). *Identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae en pollos de engorde suplementados con diferentes aditivos comerciales* [Universidad Científica]. <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/2053>
- Pandey, S., Y Chakraborty, D. (2019). Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. from a collar rot tolerant groundnut (*Arachis hypogaea* L.) variety. *Plant Science Today*, 6(sp1), 631–634. <https://doi.org/10.14719/PST.2019.6.SP1.693>
- Pankievicz, V., Irving, T., Maia, L., Y Ané, J. (2019). Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. *BMC Biology* 2019 17:1, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12915-019-0710-0>
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., Y Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*, 44, 107614. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107614>

- Patel, A., Banjare, U., Kumari, A., Singh, R., Y Pandey, K. (2020). temperature tolerant rhizobium leguminosarum bv. viciae strains with plant growth promotion traits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(4), 2603–2609. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.4.36>
- Paudyal, S., Kunwar, B., Paudel, N., Y Das, B. (2021). Isolation and characterization of rhizobia from the root nodule of some cultivated legume crops. *European Journal of Biological Research*, 11(3), 367–380. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4906255>
- Pereira, A., Ramos, F., Y Sanches, A. (2022). Lupin (*Lupinus albus* L.) Seeds: Balancing the Good and the Bad and Addressing Future Challenges. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 8557, 27(23), 8557. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238557>
- Pérez, R. (2021). Aislamiento caracterización y efecto de dos cepas de *Rhizobium* sobre el crecimiento en *Lupinus mutabilis* bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes. [Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/jspui/handle/20.500.11962/29348>
- Pérez-Pérez, R., Oudot, M., Serrano, L., Hernández, I., Nápoles, M., Sosa, D., Pérez-Martínez, S., Pérez-Pérez, R., Oudot, M., Serrano, L., Hernández, I., Nápoles, M., Sosa, D., Y Pérez-Martínez, S. (2019). Rhizospheric rhizobia identification in maize (*Zea mays* L.) plants. *Agronomía Colombiana*, 37(3), 255–262. <https://doi.org/10.15446/AGRON.COLOMB.V37N3.80189>
- Pommeresche, R., Y Hansen, S. (2017). Examining root nodule activity on legumes. In *FertilCrop Technical Note*. https://orgprints.org/id/eprint/31344/1/tn-wp5-root-nodules_final_2017.pdf
- Purwaningsih, S., Agustiyani, D., Y Antonius, S. (2020). Characterization and symbiotic evaluation of rhizobium bacteria from various plants on soybean (*Glycine Max* L) plants in green house. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 572(1), 012011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/572/1/012011>
- Qiao, C., Xu, B., Han, Y., Wang, J., Wang, X., Liu, L., Liu, W., Wan, S., Tan, H., Liu, Y., Y Zhao, X. (2018). Synthetic nitrogen fertilizers alter the soil chemistry, production and quality of tea. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13593-017-0485-Z/>

- Qureshi, A. (2021). *Según la FAO y el PNUMA, el empeoramiento de la contaminación del suelo es una amenaza para la producción de alimentos y los ecosistemas en el futuro - World / ReliefWeb*. News and Press Release. <https://reliefweb.int/report/world/seg-n-la-fao-y-el-pnuma-el-empeoramiento-de-la-contaminaci-n-del-suelo-es-una-amenaza>
- Raghuram, N., Y Sharma, N. (2019). Improving Crop Nitrogen Use Efficiency. *Comprehensive Biotechnology*, 211–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00222-6>
- Rivas, R. (2021). *Descripción de las fases fenológicas iniciales del cultivo de Lupino (Lupinus mutabilis, Sweet), de las variedades INIAP-451 (Guaranguito), INIAP-450 (Andino) y su tiempo fisiológico. Salache – Cotopaxi 2021*. [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/8070/1/PC-002105.pdf>
- Rodríguez, L. (2016). *Las legumbres en el mundo - iDescubre*. Fundación Descubre. <https://idescubre.fundaciondescubre.es/revista/las-legumbres-en-el-mundo/>
- Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Lajayer, B., Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Y Lajayer, B. (2018). Efficiency of *Rhizobium* strains as plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological properties of *Brassica napus* L. under salinity stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(1), 253–268. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162018005000903>
- Sahoo, H., Kisku, K., Varadwaj, K., Acharya, P., Y Chandra Naik, U. (2022). Mechanism of Cr (VI) reduction by an indigenous *Rhizobium* pusense CR02 isolated from chromite mining quarry water (CMQW) at Sukinda valley, India. *Research Article*, 1(5), 251–269. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1317477/v1>
- Salmi, A., Y Boulila, F. (2021). Heavy metals multi-tolerant *Bradyrhizobium* isolated from mercury mining region in Algeria. *Journal of Environmental Management*, 289, 112547. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112547>
- Sánchez, P. (2016). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de Latacunga 2016-2028*. PDyOT. https://www.latacunga.gob.ec/images/pdf/PDyOT/PDyOT_Latacunga_2016-2028.pdf

- Schwember, A., Schulze, J., del Pozo, A., & Cabeza, R. (2019). Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules. *Plants 2019*, Vol. 8, Page 333, 8(9), 333. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8090333>
- Shahzad, F., Taj, M., Abbas, F., Shafee, M., Essote, S., Taj, I., Y Achakzai, A. (2019). Microbiological studies on *Rhizobium leguminosarum* isolated from pea (*Pisum sativum* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 48(4), 1223–1229. <https://doi.org/10.3329/BJB.V48I4.49079>
- Silva, L., Y Zuñiga, G. (2017). *Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Facultad De Ciencias Biológicas Departamento Académico De Microbiología y Parasitología* [Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/2449/BC-TES-TMP-1320.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Simioniuc, D., Simioniuc, V., Topa, D., van den Berg, M., Prins, U., Bebeli, P., Y Gabur, I. (2021). Assessment of Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) Genotypes for Improved Frost Tolerance. *Agriculture 2021*, Vol. 11, Page 155, 11(2), 155. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11020155>
- Simon, Z., Mtei, K., Gessesse, A., Y Ndakidemi, P. (2018). Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Rhizobia from Cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences*, 05(26), 4050–4067. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2014.526423>
- Singha, B., Mazumder, P., Y Pandey, P. (2018). Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobia from Root Nodule of Two Legume Species Cultivated in Assam, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 88(3), 1007–1016. <https://doi.org/10.1007/S40011-016-0836-6/TABLES/5>
- Smýkal, P., von Wettberg, E., Y McPhee, K. (2020). Legume Genetics and Biology: From Mendel's Pea to Legume Genomics. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 3336, 21(9), 3336. <https://doi.org/10.3390/IJMS21093336>
- Smytkiewicz, K., Podleśny, J., Wielbo, J., Y Podleśna, A. (2021). The Effect of a Preparation Containing Rhizobial Nod Factors on Pea Morphological Traits and

- Physiology. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 1457, 11(8), 1457. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11081457>
- Soares, R., Trejo, J., Lorite, M., Figueira, E., Sanjuán, J., Y E Castro, I. (2020). Diversity, Phylogeny and Plant Growth Promotion Traits of Nodule Associated Bacteria Isolated from *Lotus parviflorus*. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 499, 8(4), 499. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8040499>
- Soundarya K., Bhavana, D., Harsha T., Y Nagalambika, P. (2022). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Rhizobium spp.* from *Mimosa pudica* . *International Journal Peer Reviewed Journal Refereed Journal Indexed Journal Impact Factor SJIF*, 8(05), 4–9. www.wwjmr.com
- Taylor, B., Y Menge, D. (2021). Light, nitrogen supply, and neighboring plants dictate costs and benefits of nitrogen fixation for seedlings of a tropical nitrogen-fixing tree. *New Phytologist*, 231(5), 1758–1769. <https://doi.org/10.1111/NPH.17508>
- Torres-Gutiérrez, R., Klever, I., Granda-Mora, K., del Rocío, B., Saltos, Á., Y Robles-Carrión, R. (2021). *Rhizobium* Diversity Is the Key to Efficient Interplay with *Phaseolus vulgaris*. *Case of Study of Southern Ecuador*. 521–548. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7_19
- Verma, H., Patra, R., Sethi, D., Y Pattanayak, S. (2022). Isolation and characterization of native *Rhizobium* from root nodules of raikia french bean growing area of Odisha. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (IJBB)*, 59(9), 918–926. <https://doi.org/10.56042/IJBB.V59I9.61519>
- Versalovic, J. (1994). Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *Article in Journal of Clinical Microbiology*, 43(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199-207.2005>
- Villacis, J. (2019). *Utilización de gramíneas y leguminosas para la producción del ganado bovino sostenible en el litoral ecuatoriano*. [Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/6878/E-UTB-FACIAG-MVZ-000019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, J., Liu, Q., Hou, Y., Qin, W., Lesschen, J. P., Zhang, F., Y Oenema, O. (2018). International trade of animal feed: its relationships with livestock density and N and P

- balances at country level. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(1), 197–211. <https://doi.org/10.1007/S10705-017-9885-3>
- Wang, Q., Liu, J., Y Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 313. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00313/>
- Weir, B. S. (2016). *The current taxonomy of rhizobia / NZ Rhizobia*. NZ Rhizobia Website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Wekesa, C., Furch, A., Y Oelmüller, R. (2021). Isolation and Characterization of High-Efficiency *Rhizobia* From Western Kenya Nodulating With Common Bean. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.697567>
- Yadav, S., Raverkar, K., Yadav, S., Y Raverkar, K. (2021). Characterization of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* from French Bean Rhizosphere and Their Effect on French Bean Productivity. *Agricultural Development in Asia - Potential Use of Nano-Materials and Nano-Technology*, 4(3), 150–250. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.100592>
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., Y Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244–267. <https://doi.org/10.1111/JIPB.13207>
- Zafar, M., Ahmed, N., Mustafa, G., Zahir, Z., Y Simms, E. (2017). Molecular and biochemical characterization of rhizobia from chickpea (*Cicer arietinum*). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2), 373–381. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.5874>
- Zhang, X., Tong, J., Dong, M., Akhtar, K., Y He, B. (2022). Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12677/SUPP-9>
- Zirena, D. (2014). *Evaluación Del Efecto Escabicida Del Extracto de Lupinus mutabilis sweet (Tarwi), para el tratamiento de la escabiosis, “Sarna Humana”, EN pacientes del “Hospital Regional Honorio Delgado”* [Universidad Católica De Santa María]. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3432/65.1513.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Zou, H., Zhang, N., Pan, Q., Zhang, J. H., Chen, J., Y Wei, G. (2019). Hydrogen sulfide promotes nodulation and nitrogen fixation in soybean–rhizobia symbiotic system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(8), 972–985. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0003-R/>

Anexos

Anexos 1.

Componentes de los medios de cultivo.

Nombre del medio	Reactivos	Cantidad
Medio R. M. V. P	Polipeptona	7 g
	Glucosa	5 g
	Fosfato dipotásico	5 g
	Agua destilada	1000 mL
Medio YMA	Manitol	10 g
	Extracto de levadura	0.3 g
	K ₂ HPO ₄	0.2 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
	NaCl	0.05 g
	Agar	20 g
	Agua destilada	1000 mL
Medio SIM	Tripteína	20 g
	Peptona	6.1 g
	Sulfato amónico ferroso	0.2 g
	Tiosulfato sódico	0.2 g
	Agar – agar	3.5 g
	Agua destilada	1000 mL
Medio agar almidón	Agar - agar	12 g
	Almidón	2 g

Nombre del medio	Reactivos	Cantidad
	Extracto de carne	3 g
	NaCl	6 g
	Agua destilada	1000 mL

Nota: *son los reactivos necesarios para la elaboración de cada uno de los medios.*

Anexos 2.

Características de las raíces de plantas de Lupinus spp.

Localidad	Muestra	Número de raíces secundarias	Número de Nódulos	Peso de los Nódulos (g)
Toacaso	M1	9	30	0.9795
	M2	3	10	1.0665
	M3	3	6	0.9203
	M4	6	17	0.6751
	M5	10	15	0.9590
	M6	4	22	0.4793
	M7	8	10	1.0802
	M8	5	15	1.4825
Mulalo	M1	3	13	0.7371
	M2	6	11	0.8155
	M3	8	16	1.1319
	M4	4	17	1.2042
	M5	7	11	0.6168

	M6	3	15	0.9203
	M7	6	10	0.2166
	M8	8	17	1.7317
	M1	11	19	1.0049
	M2	11	26	1.5214
	M3	3	6	0.4975
	M4	12	12	1.1455
Poalo	M5	3	7	0.2679
	M6	3	17	0.7018
	M7	13	10	1.1845
	M8	3	15	0.5144
Ignacio	M1	5	15	1.5618
Flores	M2	10	17	2.9978
	M3	8	10	1.3627
	M4	6	8	0.6043
	M5	6	12	0.8752
	M6	5	8	0.7751
	M7	15	41	2.1945
	M8	10	26	1.7107

Nota: M: corresponde a la designación de cada muestra. Los nódulos obtenidos provenían de raíces secundarias por la carencia de oxígeno que se puede encontrar en la parte inferior, mientras que el peso de los nódulos es un indicador de que los nódulos se encuentran activos fijando oxígeno (Pommeresche & Hansen, 2017).

Anexos 3.

Características de los nódulos seleccionados para el aislamiento de cepas.

Localidad	Muestra	Coloración del nódulo	Tamaño del nódulo (mm)	Número de aislado
L1	M1	R	0.5	R1
		R	0.6	R2
	M2	R	1.5	R3
		R	2.0	R4
	M3	R	0.4	R5
		R	0.7	R6
	M4	R	0.2	R7
		R	0.3	R8
	M5	R	0.8	R9
		R	0.7	R10
	M6	R	0.1	R11
		R	0.3	R12
	M7	R	2.5	R13
		R	1.0	R14
	M8	R	2.0	R15
		R	2.0	R16
L2	M1	R	1.5	R17
		R	1.3	R18
	M2	R	1.2	R19

Localidad	Muestra	Coloración del nódulo	Tamaño del nódulo (mm)	Número de aislado
		R	1.4	R20
	M3	R	2.2	R21
		R	2.0	R22
	M4	R	2.4	R23
		R	2.1	R24
	M5	R	0.5	R25
		R	0.8	R26
	M6	R	1.4	R27
		R	1.3	R28
	M7	R	0.7	R29
		R	0.6	R30
	M8	R	2.6	R31
		R	2.3	R32
	M1	R	2.0	R33
		R	2.3	R34
	M2	R	2.5	R35
L3		R	2.1	R36
	M3	R	0.7	R37
		R	0.6	R38
	M4	R	2.0	R39

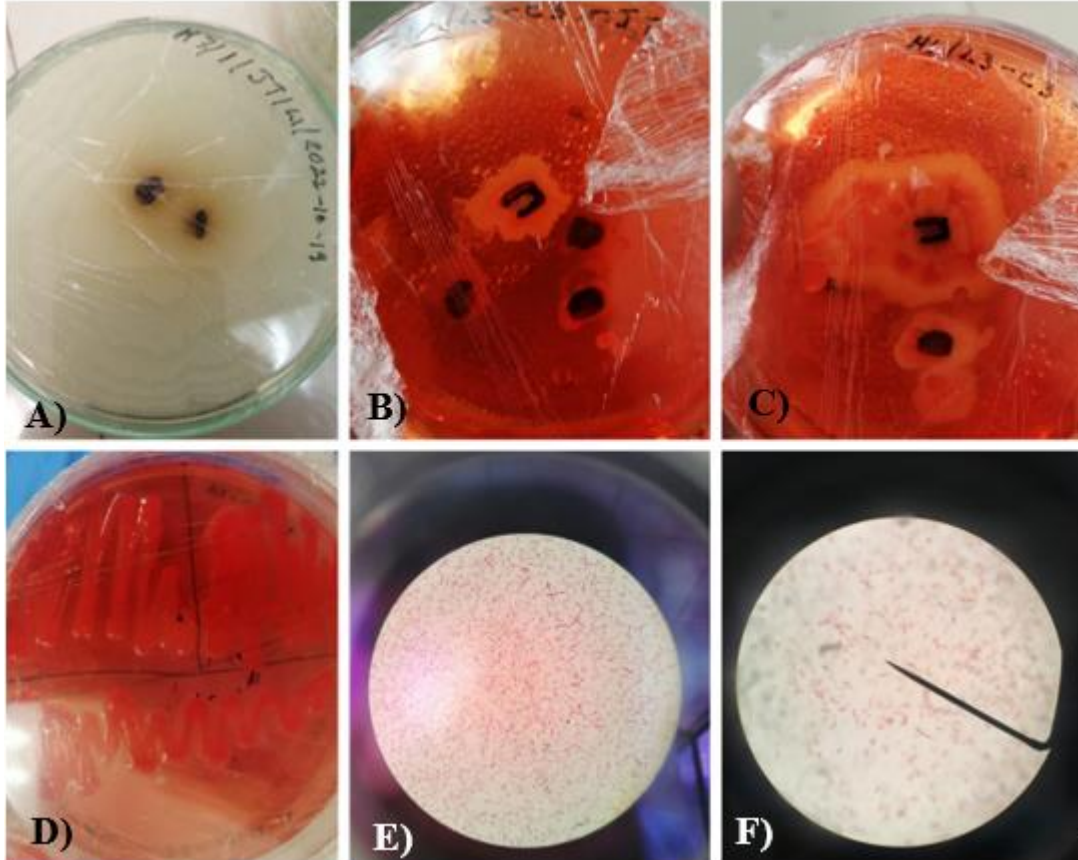
Localidad	Muestra	Coloración del nódulo	Tamaño del nódulo (mm)	Número de aislado
		R	2.7	R40
	M5	R	0.3	R41
		R	0.4	R42
	M6	R	1.5	R43
		R	1.3	R44
	M7	R	2.1	R45
		R	2.3	R46
	M8	R	0.5	R47
		R	0.6	R48
	M1	R	2.0	R49
		R	2.1	R50
	M2	R	2.7	R51
		R	2.3	R52
	M3	R	2.2	R53
		R	2.0	R54
L4	M4	R	0.7	R55
		R	0.5	R56
	M5	R	1.4	R57
		R	1.6	R58
	M6	R	1.5	R59
		R	1.3	R60

Localidad	Muestra	Coloración del nódulo	Tamaño del nódulo (mm)	Número de aislado
	M7	R	2.5	R61
		R	2.1	R62
	M8	R	2.3	R63
		R	2.0	R64

***Nota:** La coloración rojiza que presentan los nódulos es un indicador de la fijación de nitrógeno, mientras que mayor sea el tamaño su actividad de fijar nitrógeno, también aumenta (Flynn & Idowu, 2019). La coloración del nódulo fue reportada con la letra R: rosada.*

Anexos 4.

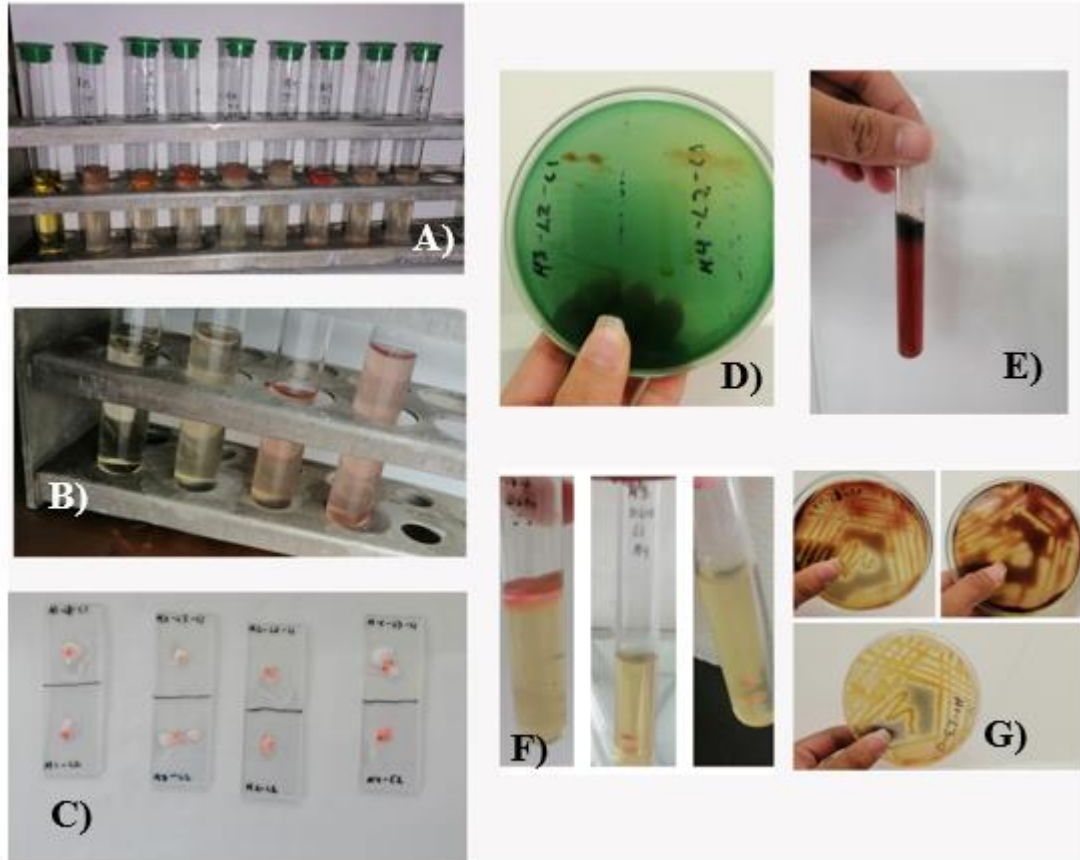
Características fenotípicas de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.



Nota: A) aislamiento de *Rhizobium* spp. en medio YMA. B) aislamiento de *Rhizobium* spp. en medio YMA + RC a las 12 h, C) aislamiento de *Rhizobium* spp. en medio YMA + RC a las 24 h. D) *Rhizobium* spp. en medio YMA + RC a las 72 h y apariencia de la colonia. E) tinción de Gram y tipo. F) forma.

Anexos 5.

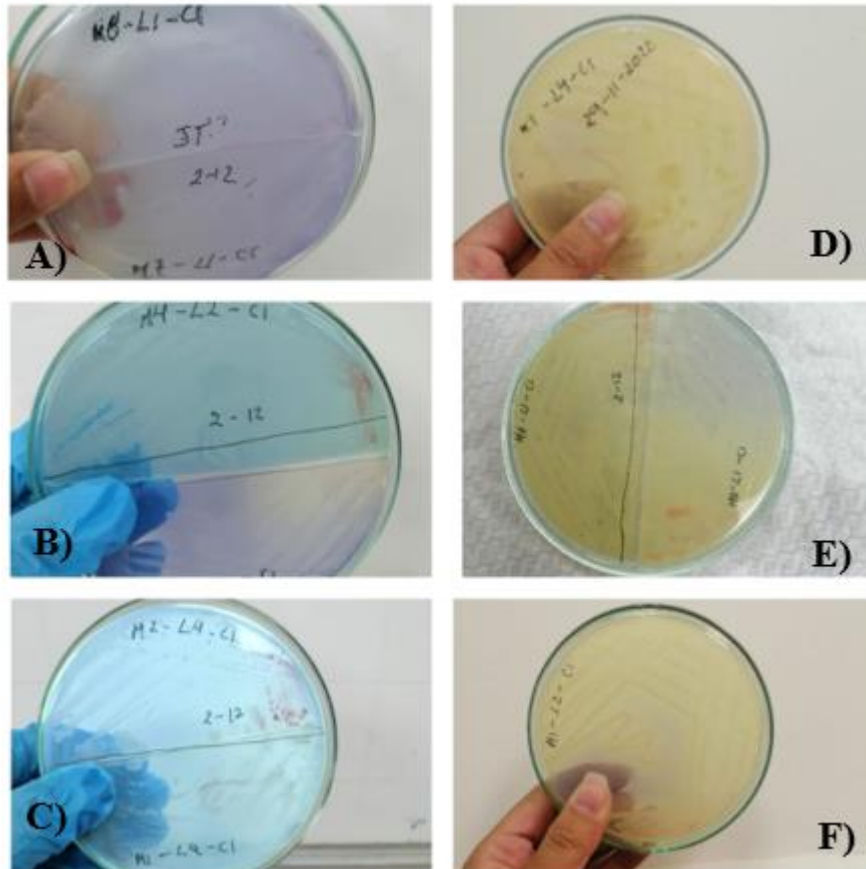
Características bioquímicas de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.



Nota: A) prueba Rojo de Metilo, B) prueba Voges Proskauer, C) prueba de catalasa, D) prueba de citrato, E) prueba TSI, F) Prueba SIM, G) prueba Hidrólisis de almidón.

Anexos 6.

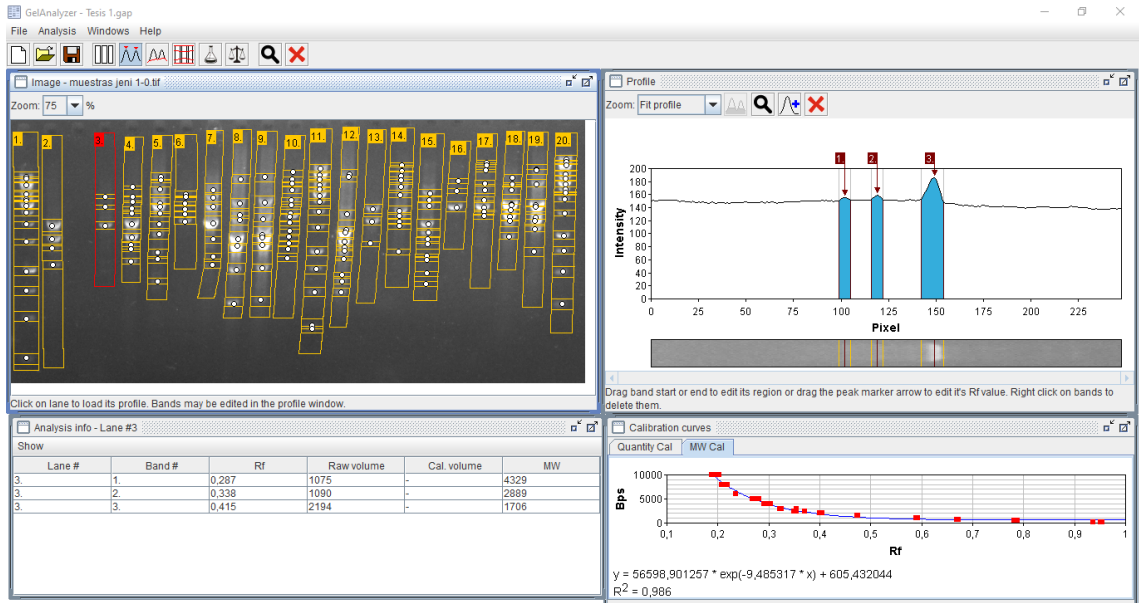
Prueba de autenticación de Rhizobium spp. pertenecientes a nódulos de Lupinus spp.



Nota: *A y B) crecimiento neutro de Rhizobium spp., B y C) crecimiento lento de Rhizobium spp., y D, E y F) crecimiento rápido de Rhizobium spp.*

Anexos 7.

Análisis del gel mediante el programa GelAnalyzer.



Nota: Análisis del gel de agarosa proveniente de los aislados de *Rhizobium* spp. obtenidos por BOX- PCR Fingerprinting con un R^2 de 0.986

Anexos 8.

Permiso del Ministerio del Ambiente para trabajar con una especie vegetal comercial.



Oficio Nro. MAATE-OTLA-DZ3-2022-0147-O

Latacunga, 14 de diciembre de 2022

Asunto: RESPUESTA A SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE RECOLECCIÓN DE ESPECIES DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA

Jenifer Odalys Tovar Roman
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al Oficio S/N emitido por la Srta. Jenifer Odalys Tovar Roman, con fecha 13 de diciembre de 2022, donde manifiesta lo siguiente: *“me dirijo a usted para solicitarle de la manera más comedida se me extienda la certificación correspondiente a la autorización de recolección de especies de la diversidad biológica, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología con el tema “Caracterización de Rhizobium spp a partir de chocho, en cuatro localidades del cantón Latacunga”. Cabe indicar que al ser el chocho una especie comercial no silvestre, la recolección no afectará a la flora y fauna de las localidades en estudio..”*

Al respecto me permito comunicar que no es procedente la emisión de dicha autorización de recolección solicitada, en virtud que no es competencia de esta Cartera de Estado, ya que sólo se emite permiso de investigación para flora y fauna silvestre; y el chocho se considera una especie leguminosa de origen americano, que es cultivada para el consumo de humanos por sus nutrientes.

Es importante recalcar que este documento no le autoriza el ingreso a las propiedades privadas o del sector público donde se va a realizar el muestreo, para ello deberá solicitar el permiso correspondiente a los propietarios de los predios.

Finalmente, en caso de requerir autorización para realizar recolección de flora y fauna silvestre, se lo deberá realizar a través de la plataforma Sistema Único de Información Ambiental (SUIA).

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Ing. Mario Gustavo Estrella Saltos
RESPONSABLE OFICINA TÉCNICA LATACUNGA

Copia:
Señorita Médico
Diana Maribel Córdor Tapia
Especialista de Vida Silvestre Provincial



Firmado electrónicamente por:
**MARIO GUSTAVO
ESTRELLA SALTOS**

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica
Dirección: Av. Márquez de Maenza entre calle Quito y Sánchez de Orellana Centro de Atención Ciudadana
Código Postal: 050102 / Latacunga - Ecuador • Teléfono: (593 3) 373-0616/ 373-0620
www.ambiente.gob.ec



* Documento firmado electrónicamente por Quiquix

1/1