



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: CARPIO ESPINOSA, MARÍA JOSÉ

**TEMA: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS
DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.),
CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*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.**

DIRECTORA: MSc. KOCH KAISER, ALMA ROSEL

CODIRECTOR: ING. TAIPE BOLAÑOS, MARCO VINICIO

SANGOLQUÍ, FEBRERO 2014.

CERTIFICACIÓN DE TUTORÍA

Certifico que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*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” realizado en su totalidad por la Srta. María José Carpio Espinosa ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas en el reglamento de estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP y financiado por la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación - SENESCYT en el Proyecto PIC 12 INIAP 009 “Manejo adecuado de abonos verdes y microorganismos fijadores de nitrógeno dentro de sistemas de producción agroecológicos”, código: 2153902800021703, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a la Srta. María José Carpio Espinosa que lo entregue a la MSc. María Augusta Chávez, en su calidad de directora de la carrera.

Sangolquí, 28 de Febrero del 2014.

Alma Koch, MSc.
DIRECTORA

Ing. Agr. Marco Taipe
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Declaro que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*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”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de otros autores, conforme las citas que constan, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 28 de Febrero del 2014.

María José Carpio Espinosa

AUTORIZACIÓN

Yo, María José Carpio Espinosa, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, del trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*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”, cuyo contenido, ideas y criterio son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 28 de Febrero del 2014.

María José Carpio Espinosa

DEDICATORIA

“Detrás de cada sueño siempre hay personas que creen en nosotros”.

Dedico este proyecto de tesis a mis padres, Laura y Diego,
quienes han sido mi apoyo en todo momento.

Es por ellos que soy lo que soy ahora.

Los amo con mi vida.

María José C.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP, al Departamento de Manejo de Suelos y Aguas - DMSA, y a todas las personas que lo conforman, quienes me brindaron su amistad, colaboración desinteresada, conocimientos, y experiencias técnicas para realizar este trabajo.

De manera muy especial quiero agradecer a la Dra. Soraya Alvarado e Ing. Betty Paucar, por las facilidades prestadas para el desarrollo de esta investigación, por sus valiosos aportes científicos, por dedicarme su preciado tiempo, y por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas. Muchas gracias.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida, Facultad de Ingeniería en Biotecnología, a todas sus autoridades y personal docente quienes fueron los comprometidos en mi formación académica profesional.

En particular, quiero agradecer a MSc. Alma Koch e Ing. Marco Taipe, quienes me apoyaron en la realización de esta tesis con su dirección y codirección, brindándome su ayuda y conocimientos técnicos en este proceso de formación. Gracias por su valioso tiempo.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación - SENESCYT, por haber financiado este proyecto.

A mi mami, te agradezco por ser la mejor mamá del mundo, por todo tu amor, esfuerzo, apoyo incondicional y la confianza que depositaste en mí. Gracias por estar junto a mí en los momentos más difíciles y ser tan paciente. Te amo mamá.

A mi papi, este es un logro que quiero compartir contigo, gracias por creer en mí. Quiero que sepas que ocupas un lugar especial.

A mi hermana Anita Carolina “gordita bebé”, por estar siempre a mi lado y ser motivo de felicidad en mi vida. Te quiero ñañita.

A mi amor Ricardo, por ser mi apoyo incondicional. Te amo.

A mi sobrinito, Gabriel Espinosa, porque su presencia me ha regalado muchas alegrías.

A toda mi familia, abuelito Mario, tíos, primos y demás familiares que de una u otra forma creyeron en mí. Los quiero mucho.

A Byron y Jairo quienes me ayudaron en el desarrollo de mi tesis. Muchísimas gracias.

A todos mis amigos “LG”, Lloratan, Pool, Chocho, Wonka, Daniel, Katy, Diana, Ricardo, César, Chato; y mis amigos Anita y Víctor. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Parte introductoria

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN DE TUTORÍA	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTADO DE TABLAS.....	xiv
LISTADO DE CUADROS	xvii
LISTADO DE FIGURAS	xviii
LISTADO DE ANEXOS	xxi
RESUMEN.....	xxiv
ABSTRACT	xxv

Cuerpo de la tesis

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivos de la investigación	7
1.3.1. Objetivo general	7
1.3.2. Objetivos específicos	7
1.4. Marco teórico	8
1.4.1. Coberturas vegetales o abonos verdes.....	8
1.4.2. Leguminosas	9
1.4.2.1. Arveja (<i>Pisum sativum</i> L.)	11
1.4.2.2. Chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.).....	13
1.4.2.3. Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	14
1.4.2.4. Haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	16
1.4.2.5. Vicia (<i>Vicia</i> sp.)	18

1.4.3.	Fijación de nitrógeno.....	19
1.4.3.1.	Fijación no biológica de nitrógeno.....	20
1.4.3.2.	Fijación biológica de nitrógeno.....	21
1.4.3.2.1.	Fijación biológica de nitrógeno no simbiótica	23
1.4.3.2.2.	Fijación biológica de nitrógeno simbiótica	24
1.4.4.	Asociación simbiótica leguminosa - rizobio	25
1.4.4.1.	Proceso de simbiosis leguminosa - rizobio	27
1.4.4.1.1.	Mecanismos fisiológicos	27
1.4.4.1.2.	Mecanismos moleculares.....	29
1.4.4.2.	Promiscuidad hospedero - rizobio.....	31
1.4.4.3.	Especificidad hospedero - rizobio.....	32
1.4.5.	Bacterias fijadoras de nitrógeno rizobios.....	33
1.4.5.1.	Morfología.....	33
1.4.5.2.	Forma de vida.....	35
1.4.5.3.	Taxonomía.....	37
1.4.6.	Nódulos	41
1.4.6.1.	Tipos de nódulos	41
1.4.6.2.	Morfología de nódulos	42
1.5.	Sistema de hipótesis	43
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....		44
2.1.	Participantes	44
2.1.1.	Instituciones	44
2.1.2.	Responsable del proyecto.....	44
2.1.3.	Colaboradores científicos.....	44
2.2.	Zona de estudio	45
2.2.1.	Campo	45
2.2.2.	Laboratorio.....	45
2.3.	Período de investigación	45
2.4.	Estadística	46
2.4.1.	Caracterización morfológica	46
2.4.2.	Caracterización bioquímica.....	46

2.5.	Procedimiento	47
2.5.1.	Áreas de muestreo	47
2.5.2.	Recolección de nódulos.....	47
2.5.3.	Hidratación y desinfección de nódulos	50
2.5.4.	Aislamiento de rizobios recolectados en la provincia de Imbabura.....	50
2.5.5.	Reactivación y purificación de cepas liofilizadas del banco de rizobiología del laboratorio de Microbiología del DMSA del INIAP	51
2.5.6.	Refrescamiento y purificación de cepas de rizobios del banco de rizobiología del PRONALEG del INIAP.....	52
2.5.7.	Pruebas de autenticación de rizobios.....	53
2.5.7.1.	Cultivo en medio levadura manitol agar + azul de bromotimol.....	53
2.5.7.2.	Cultivo en medio levadura manitol agar + púrpura de bromocresol....	53
2.5.7.3.	Cultivo en medio glucosa peptona agar + púrpura de bromocresol....	53
2.5.7.4.	Cultivo en medio levadura lactosa agar + reactivo de Benedict.....	54
2.5.7.5.	Tinción de Gram	54
2.5.8.	Conservación de las bacterias	55
2.5.9.	Caracterización morfológica.....	56
2.5.9.1.	Textura	56
2.5.9.2.	Cantidad de goma.....	56
2.5.9.3.	Apariencia	56
2.5.9.4.	Tamaño.....	56
2.5.9.5.	Elevación.....	56
2.5.9.6.	Margen	57
2.5.9.7.	Forma	57
2.5.9.8.	Color.....	57
2.5.10.	Tiempo de crecimiento.....	58
2.5.11.	Crecimiento.....	58
2.5.12.	Caracterización bioquímica.....	59
2.5.12.1.	Crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno.....	59
2.5.12.2.	Resistencia a antibióticos	59
2.5.12.3.	Tolerancia a metales pesados	60

2.5.12.4.	Tolerancia a pH ácido y alcalino.....	60
2.5.12.5.	Tolerancia a cloruro de sodio.....	60
2.5.12.6.	Tolerancia a urea.....	60
2.5.13.	Identificación taxonómica.....	61
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		62
3.1.	Áreas de muestreo.....	62
3.2.	Recolección de nódulos.....	63
3.3.	Aislamiento de rizobios recolectados en la provincia de Imbabura.....	64
3.4.	Reactivación y purificación de cepas liofilizadas del banco de rizobiología del laboratorio de Microbiología del DMSA del INIAP.....	65
3.5.	Refrescamiento y purificación de cepas de rizobios del banco de rizobiología del PRONALEG del INIAP.....	65
3.6.	Crecimiento de las bacterias.....	66
3.7.	Pruebas de autenticación de rizobios.....	66
3.7.1.	Cultivo en medio levadura manitol agar + azul de bromotimol.....	66
3.7.2.	Cultivo en medio levadura manitol agar + púrpura de bromocresol.....	67
3.7.3.	Cultivo en medio glucosa peptona agar + púrpura de bromocresol.....	68
3.7.4.	Cultivo en medio levadura lactosa agar + reactivo de Benedict.....	69
3.7.5.	Tinción de Gram.....	70
3.8.	Conservación de las bacterias.....	71
3.9.	Identificación taxonómica: Caracterización morfológica de rizobios.....	72
3.9.1.	Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.).....	72
3.9.2.	Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.).....	74
3.9.3.	Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	76
3.9.4.	Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	78
3.9.5.	Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (<i>Vicia</i> sp.).....	80

3.10	Identificación taxonómica: Caracterización bioquímica de rizobios	82
3.10.1	Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.).....	82
3.10.2	Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.).....	85
3.10.3	Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	87
3.10.4	Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	89
3.10.5	Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (<i>Vicia</i> sp.)	91
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN		93
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....		111
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....		113
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA		114
ANEXOS.....		139

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1. Cantones, parroquias y localidades donde se recolectaron los nódulos asociados a plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), haba (<i>Vicia faba</i> L.) y vicia (<i>Vicia</i> sp.) en suelos de la provincia de Imbabura, con sus códigos y número de muestras recolectadas por sitio.	63
Tabla 3.2. Fecha de recolección y número de muestras colectadas de nódulos asociados a plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), haba (<i>Vicia faba</i> L.) y vicia (<i>Vicia</i> sp.) en suelos de la provincia de Imbabura.	64
Tabla 3.3. Número de muestras viables de cepas de rizobios aisladas de nódulos asociados a plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), haba (<i>Vicia faba</i> L.) y vicia (<i>Vicia</i> sp.) en suelos de la provincia de Imbabura.	65
Tabla 3.4. Número de cepas de rizobios reactivadas y refrescadas del banco de rizobiología del INIAP.	66
Tabla 3.5. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).	73
Tabla 3.6. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.) y su coeficiente de similitud (CS).	75
Tabla 3.7. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).	77
Tabla 3.8. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de haba (<i>Vicia faba</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).	79
Tabla 3.9. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de vicia (<i>Vicia</i> sp.) y su coeficiente de similitud (CS).	81

Tabla 3.10. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	83
Tabla 3.11. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	83
Tabla 3.12. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	84
Tabla 3.13. Conglomerados del subgrupo D formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	84
Tabla 3.14. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.) y su coeficiente de similitud (CS).....	86
Tabla 3.15. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.) y su coeficiente de similitud (CS).....	86
Tabla 3.16. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	88
Tabla 3.17. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> S.) y su coeficiente de similitud (CS).....	88
Tabla 3.18. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de haba (<i>Vicia faba</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	90
Tabla 3.19. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de haba (<i>Vicia faba</i> L.) y su coeficiente de similitud (CS).....	90

Tabla 3.20. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de vicia (<i>Vicia</i> sp.) y su coeficiente de similitud (CS).....	92
Tabla 3.21. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de vicia (<i>Vicia</i> sp.) y su coeficiente de similitud (CS).	92

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1. Escala de nodulación aplicada a las leguminosas	49
Cuadro 2.2. Escala para calificar el diámetro de nódulos por planta	49
Cuadro 2.3. Escala para calificar la abundancia de nódulos por planta	49

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta de <i>Pisum sativum</i> L.....	11
Figura 1.2. Planta de <i>Lupinus mutabilis</i> S.....	13
Figura 1.3. Planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	14
Figura 1.4. Planta de <i>Vicia faba</i> L.....	16
Figura 1.5. Planta de <i>Vicia</i> sp.....	18
Figura 1.6. Esquema de la fijación de nitrógeno.....	20
Figura 2.1. Procedimiento para la recolección de nódulos: A. Selección de la mejor planta en floración B. Excavación de raíces y verificación del color interno del nódulo C. Nódulos guardados en tubos con sílica-gel e identificados.....	48
Figura 2.2. Procedimiento de hidratación y desinfección de nódulos: A. Hidratación de nódulos en agua estéril B. Nódulos en etanol al 95% e hipoclorito de sodio al 3% C. Lavado de nódulos en agua estéril.....	50
Figura 2.3. Procedimiento para aislamiento de rizobios: A. Aislamiento con palillos a partir de nódulos B. Purificación por agotamiento C. Multiplicación de una colonia pura.....	51
Figura 2.4. Reactivación y purificación de cepas liofilizadas: A. Cepa liofilizada B. Siembra de cepa mezclada con solución de peptona al 0.1% en medio LMA+RC con triángulo de vidrio estéril C. Crecimiento bacteriano D. Purificación por agotamiento.....	52
Figura 2.5. Procedimiento para liofilización de cepas: A. Mezcla peptona (10%) y sucrosa (20%) B. Tubos eppendorf con la solución de la cepa y la mezcla C. Liofilización.....	55
Figura 2.6. Criterios morfológicos para describir la elevación de las colonias: A. pulvinada B. convexa C. elevada D. plana.....	57
Figura 2.7. Criterios morfológicos para describir el margen de las colonias: A. entero B. ondulado C. erosionado.....	57
Figura 2.8. Criterios morfológicos para describir la forma de las colonias: A. circular B. fusiforme C. irregular.....	57
Figura 2.9. Escala del rosado para describir el color de las colonias: A. rosado intenso B. rosado coral C. rosado pálido.....	57

Figura 2.10. Crecimiento de rizobios en medio líquido LM: A. Escala de McFarland B. Suspensiones bacterianas C. Relación entre McF [4] y suspensión bacteriana.....	58
Figura 3.1. Mapa de la provincia de Imbabura y cantones donde se realizó la recolección de nódulos para el aislamiento de las cepas de rizobios.	62
Figura 3.2. Pruebas de autenticación de la cepa UMR 1278 (<i>Rhizobium etli</i>): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).....	67
Figura 3.3. Pruebas de autenticación de la cepa C8 B. (<i>Bradyrhizobium</i> sp.): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción alcalina (púrpura) D. LMA+ABT: reacción alcalina (azul).	67
Figura 3.4. Pruebas de autenticación en medio GPA+PBC de la cepa FR 1063: A. acidificación del medio (amarillo) a los dos días de incubación B. retorno parcial a la coloración original del medio a los tres y cuatro días C. retorno total a la coloración del medio original a los cinco días.....	68
Figura 3.5. Pruebas de autenticación de la cepa R-FR-PE-2b (<i>Agrobacterium</i>): A. GPA+PBC: presencia de crecimiento (amarillo) B. LLA+RB: cambio de coloración (amarillo) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).....	69
Figura 3.6. Pruebas de autenticación de la cepa UMR 1899 (<i>Rhizobium tropici</i>): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).....	69
Figura 3.7. Pruebas de autenticación de la cepa TAL 1236 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: cambio parcial de coloración (azul-verdoso) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).....	70
Figura 3.8. Tinción de Gram de cepas de rizobios vistas al microscopio en 100x: bacilos Gram negativos cortos no esporulados A. cepa UMR 1899 (<i>Rhizobium tropici</i>) B. cepa UMR 1278 (<i>Rhizobium etli</i>) C. cepa TAL 1236 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>)...	70

Figura 3.9. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las veintiocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.).....	72
Figura 3.10. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las doce cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.).....	74
Figura 3.11. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las veintiséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	76
Figura 3.12. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las dieciocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	78
Figura 3.13. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las dieciséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (<i>Vicia</i> sp.).....	80
Figura 3.14. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las veintiocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.).....	82
Figura 3.15. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las doce cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.).....	85
Figura 3.16. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las veintiséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	87
Figura 3.17. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las dieciocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	89
Figura 3.18. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las dieciséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (<i>Vicia</i> sp.).....	91

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Especies descritas dentro de los rizobios clásicos y su hospedador de origen.....	139
A1. Especies descritas dentro del género <i>Azorhizobium</i> y su hospedador de origen.....	139
A2. Especies descritas dentro del género <i>Bradyrhizobium</i> y su hospedador de origen.....	139
A3. Especies descritas dentro del género <i>Mesorhizobium</i> y su hospedador de origen.....	140
A4. Especies descritas dentro del género <i>Rhizobium</i> y su hospedador de origen.....	141
A5. Especies descritas dentro del género <i>Rhizobium</i> en las que no se ha comprobado la capacidad para nodular leguminosas.....	142
A6. Especies descritas dentro del género <i>Sinorhizobium</i> y su hospedador de origen.....	143
Anexo B. Especies que nodulan leguminosas pero no pertenecen a rizobios clásicos y su hospedador de origen.....	144
Anexo C. Hoja de información de recolección de nódulos.....	145
Anexo D. Medios de cultivo	146
D1. Medio levadura manitol agar (LMA).....	146
D2. Solución de azul de bromotimol (ABT), púrpura de bromocresol (PBC) y rojo congo (RC) en medio LMA.....	146
D3. Medio glucosa peptona agar (GPA).....	147
D4. Solución de púrpura de bromocresol (PBC) en medio GPA.....	147
D5. Medio levadura lactosa agar (LLA)	147
D6. Reactivo de Benedict en medio LLA.....	148
D7. Medio basal para fuentes de carbono (MB-FC).....	149
D8. Medio basal para fuentes de nitrógeno (MB-FN)	149
D9. Medio triptona levadura agar (TLA).....	150
D10. Antibióticos en medio TLA	150

D11. Metales pesados en medio TLA.....	150
Anexo E. Sitio de referencia, origen, planta hospedera, código, género y especie de las cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S.), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y haba (<i>Vicia faba</i> L.) reactivadas y refrescadas del banco de rizobiología del INIAP.....	151
Anexo F. Resultados de las cinco pruebas de autenticación realizadas a las cepas de rizobios asociadas a plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), haba (<i>Vicia faba</i> L.) y vicia (<i>Vicia</i> sp.).....	151
Anexo G. Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a plantas de arveja (<i>Pisum sativum</i> L.), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> S), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), haba (<i>Vicia faba</i> L.) y vicia (<i>Vicia</i> sp.).....	153
G1. Caracterización morfológica de la cepa de arveja ECUA-I1 (<i>Rhizobium</i>): colonias con apariencia brillante, textura elástica, elevadas, con abundante goma, color rosado coral, tamaño mediano, forma circular, margen entero.....	153
G2. Caracterización morfológica de la cepa de chocho R-CH-IM-10 (<i>Ochrobactrum</i>): colonias con apariencia opaca, textura elástica, elevación pulvinada, con abundante goma, color rosado coral, tamaño mediano, forma circular, margen entero.....	153
G3. Caracterización morfológica de la cepa de chocho C8 B (<i>Bradyrhizobium</i> sp.): colonias con apariencia opaca, textura gomosa, elevación pulvinada, con abundante goma, color rosado coral, tamaño pequeño, forma circular, margen entero.....	154
G4. Caracterización morfológica de la cepa de fréjol UMR 1899 (<i>Rhizobium tropici</i>): colonias con apariencia translúcida, textura acuosa, sin goma, forma circular, margen entero, elevación convexa, color rosado pálido, tamaño mediano.....	154
G5. Caracterización morfológica de la cepa de fréjol UMR 1478 (<i>Rhizobium etli</i>): colonias con apariencia opaca, textura elástica, forma circular, margen entero, elevación convexa, abundante goma, color rosado coral, tamaño mediano.....	154

G6. Caracterización morfológica de la cepa de haba R-HA-CA-6 (<i>Rhizobium</i>): colonias con apariencia opaca, textura elástica, forma circular, margen entero, elevadas, con escasa goma, color rosado coral, tamaño mediano.....	155
G7. Caracterización morfológica de la cepa de vicia R-VI-SA-17b (<i>Rhizobium</i>): colonias con apariencia opaca, textura elástica, forma circular, margen entero, elevación pulvinada, con abundante goma, color rosado coral, tamaño mediano.	155
Anexo H. Caracterización bioquímica de la cepa de chocho R-CH-MO-78b (<i>Ochrobactrum</i>), su asimilación a las diferentes fuentes nutricionales, y tolerancia a las condiciones de estrés.....	156
H1. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en fuentes de carbono: A. xylosa B. fructosa C. glucosa D. galactosa E. maltosa F. sacarosa G. eritritol H. dulcitol I. tartrato J. lactato K. sorbosa M. citrato.....	156
H2. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en fuentes de nitrógeno: A. triptófano B. tirosina C. glicina.	156
H3. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en antibióticos: A. ácido nalidíxico B. cloranfenicol C. kanamicina D. estreptomycin.....	157
H4. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en metales pesados: A. zinc B. plomo C. cobre D. aluminio	157
H5. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en niveles de pH: A. 4.5 B. 5 C. 8.5.	157
H6. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en NaCl: A. 0.5% B. 1% y ausencia de crecimiento en C. 2%.	158
H7. Presencia de crecimiento de la cepa R-CH-MO-78b en urea: A. 20ppm B. 50ppm C. 100ppm D. 500ppm.....	158

RESUMEN

Se aislaron cepas de rizobios a partir de nódulos de raíces de cinco plantas leguminosas, arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) de suelos de la provincia de Imbabura, Ecuador. Además, cepas de rizobios pertenecientes al banco de rizobiología del INIAP, se reactivaron de su estado de liofilización, y otras se refrescaron de su estado de vejez; con el propósito de caracterizarlas morfológica y bioquímicamente, para identificar el género y formar un cepario de rizobios. Los nódulos recolectados fueron evaluados según sus características, encontrándose desde formas redondas hasta pleomórficas, tamaños y cantidades variadas, y amplia distribución en raíces secundarias principalmente. Una vez aislados los rizobios de los nódulos, se sembraron y purificaron en medio levadura manitol agar (LMA) + rojo congo (RC). Se realizaron pruebas de autenticación y pureza, observándose bacilos cortos Gram negativos, con reacción ácida y una sola cepa con reacción alcalina en los medios LMA + púrpura de bromocresol (PCB) y LMA + azul de bromotimol (ABT), y sin cambio de coloración en los medios glucosa peptona agar (GPA) + PBC y levadura lactosa agar (LLA) + reactivo de Benedict (RB), excepto por dos cepas de *Agrobacterium*. El análisis de conglomerados de la caracterización morfológica y bioquímica clasificó a las cepas de rizobios asociados a los cultivos de arveja en siete y once grupos, de chocho en seis grupos, de fréjol en seis y trece grupos, de haba en cinco y once grupos, y de vicia en cuatro y ocho grupos, respectivamente. Para la morfología, se tuvo en cuenta la textura, cantidad de goma, elevación, apariencia, margen, color, tamaño y forma de las colonias; y para la bioquímica, la asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, y tolerancia a varios niveles de pH, antibióticos, metales pesados, concentraciones de salinidad y de urea. Los resultados señalaron que los rizobios asociados a los cultivos de fréjol, arveja, haba y vicia pertenecen al género *Rhizobium*, los rizobios asociados a los cultivos de chocho pertenecen al género *Ochrobactrum* y uno al género *Bradyrhizobium*. Se identificaron catorce cepas de rizobios capaces de crecer mejor en ambientes hostiles, las cuales tienen un uso potencial como bioinoculantes. Esto afianza la posibilidad de establecer estudios que permitan evaluar en una etapa de invernadero y campo el potencial de fijación de nitrógeno de las cepas caracterizadas.

Palabras clave: leguminosas, nodulación, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.

ABSTRACT

Rhizobia strains were isolated from root nodules of five legumes plants, pea (*Pisum sativum* L.), lupine (*Lupinus mutabilis* S.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), broad bean (*Vicia faba* L.) and vetch (*Vicia* sp.) from Imbabura province soils, Ecuador. Also, rhizobia strains belonging to INIAP rhizobiology bank, were reactivated from its lyophilization state and other strains were refreshed from its old age. Rhizobia were characterized morphologically and biochemically in order to identify the genera to establish a rhizobia strain collection. Nodules collected were evaluated according to their characteristics, from round to pleomorphic forms, varying sizes and amounts, and wide distribution in secondary roots mainly. Once rhizobia strains were isolated from the nodules, they were cultured and purified in yeast mannitol agar medium (YMA) + congo red (CR). Authentication and purity tests were performed, short Gram negative bacilli were observed. It was observed acid reactions and a single strain with alkaline reaction in YMA + bromocresol purple (BCP) and YMA + bromothymol blue (BTB) mediums, and no color change in glucose peptone agar (GPA) + BCP and yeast lactose agar (YLA) + Benedict reagent (BR) mediums, except for two *Agrobacterium* strains. The morphological and biochemical characterization cluster analysis classified rhizobia strains associated with pea crops in seven and eleven clusters, with lupine crops in six clusters, with bean crops in six and thirteen clusters, with broad bean crops in five and eleven clusters and with vetch crops in four and eight clusters, respectively. For morphology, it was taken into account texture, gum amount, elevation, appearance, margin, color, size and shape of colonies; and for biochemistry, absorption of carbon and nitrogen sources, and tolerance to various pH levels, antibiotics, heavy metals, salinity and urea concentrations. The results indicated that rhizobia strains associated with pea, bean, broad bean and vetch crops belong to the *Rhizobium* genus. The rhizobia strains associated with lupine crops belong to the *Ochrobactrum* genus and one strain to *Bradyrhizobium* genus. Fourteen strains were identified as able to grow better in hostile environments; they have potential use as bioinoculants. This strengthens the possibility to establish studies that allow evaluating in a greenhouse and field stage the potential nitrogen fixation of the characterized strains.

Key words: legumes, nodulation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*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.

1.1. Formulación del problema

En el Ecuador, las leguminosas son componentes de los sistemas de producción, principalmente en la región Sierra, ya que son cultivadas en asociación, intercaladas, en monocultivos o en rotación con otros cultivos (Bernal, 2006). Dentro de las leguminosas que manejan los agricultores en el país se encuentran los granos andinos, que tienen un gran potencial nutricional y económico, entre ellos: arveja, chocho, fréjol y haba, cuyo uso principal radica en el consumo directo del grano o semilla y de la legumbre o vaina. Además tienen una utilidad secundaria como abonos verdes y de fijación de nitrógeno (INIAP-PRONALEG, 2008; Peralta *et al.* 2010); y leguminosas forrajeras como vicia, la cual se encuentra incluida en los agroecosistemas, permitiendo controlar las malezas y mejorar la calidad química y biológica de los suelos si son cortadas en la época de floración e incorporadas al suelo (Suquilanda, 1996, citado por Romero, 2010).

Los rendimientos de las leguminosas y de los cultivos en general en el Ecuador son bajos, debido principalmente a factores bióticos (plagas y enfermedades), abióticos (erosión y suelos pobres en nutrientes), y al mal manejo de los suelos; afectando de esta manera, la economía y competitividad de los agricultores (INIAP-DMSA, 1994; Bernal, 2012).

La degradación de los suelos es considerada entre los problemas ambientales más serios del país. La fragilidad a la erosión en la Sierra se debe a que los suelos de ladera presentan fuertes pendientes y son susceptibles a niveles de erosión hídrica que en las partes altas son de magnitud considerable (Bernal *et al.*, 2004). Los suelos del trópico ecuatoriano presentan también problemas nutricionales, debido a las constantes lluvias en determinada época del año, que son la causa principal de la deficiencia de elementos que son lavados o lixiviados (Bernal, 2012). Las leguminosas son sembradas en suelos bajos en contenido de nutrientes, especialmente nitrógeno (elemento limitante en el rendimiento de las plantas), y micro-nutrientes como zinc y hierro en el caso de algunos suelos de la Sierra (INIAP-DMSA, 1994).

Por otra parte, los suelos ecuatorianos están bajo un manejo agronómico inapropiado caracterizado por sistemas de labranza convencionales, alto uso de agroquímicos, uso inadecuado de la maquinaria agrícola y de los residuos, y un manejo no integrado de fertilidad de suelos. Muchos agricultores llevan a cabo prácticas que no son apropiadas, y que contribuyen también con los bajos rendimientos, como son la selección inadecuada de los fertilizantes, la cantidad a veces mayor o menor a la recomendada, el sitio inadecuado y la época inoportuna de aplicación (Bruulsema *et al.*, 2008). Todos estos factores han contribuido para acelerar la degradación de los suelos en esta región; y consecuentemente, para la pérdida considerable de fertilidad de los mismos (García y Correa, 2010), lo que ha generado un desequilibrio no solamente del componente nutricional sino también, de los otros componentes agronómicos de los sistemas de cultivos, encareciendo su productividad y rentabilidad (Bruulsema *et al.*, 2008).

Para suplir la deficiencia de nitrógeno, incrementar los rendimientos de las leguminosas y mejorar la calidad de los suelos, a través de las mejores prácticas de fertilización, existen dos maneras de hacerlo: 1) alternativa química, manejando apropiadamente el uso de fertilizantes, en especial los nitrogenados, y 2) alternativa biológica, aprovechando la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las leguminosas al asociarse simbióticamente con las bacterias del suelo fijadoras de

nitrógeno comúnmente llamados “rizobios”, en los nódulos radiculares (órganos especiales de las raíces), en los que tiene lugar este proceso (Graham, 2004).

La fertilización química causa el deterioro del suelo y del agua, debido a que provoca acidificación, salinización, aumento de la toxicidad por liberación de elementos químicos, contaminando la calidad y el uso de estos recursos. Además, la planta solo utiliza entre el 30 y el 50% del fertilizante nitrogenado inorgánico aplicado, el resto se pierde por volatilización, desnitrificación o percolación de nitratos que pasan al agua subterránea (Danso y Eskew, s.f); costos elevados y requerimientos altos de energía para su elaboración que limitan el uso en la producción agrícola tanto en la Sierra como en la Costa Ecuatoriana (Bernal *et al.*, 2004; Bernal, 2012).

La fijación biológica de nitrógeno es considerada como una de las alternativas más viables para recuperar este elemento en los ecosistemas. Los rizobios son responsables del 80% de esta fijación (Graham, 2004). Las cantidades de nitrógeno atmosférico fijado por los rizobios son, sin duda, de gran importancia económica; las experiencias demuestran que la fijación asciende a cifras considerables (más de 400 kg de N ha/año), posibilitando, por ende, la disminución del uso de fertilizantes sintéticos como la urea, lo que contribuye al equilibrio ecológico de los suelos (Cayo y Rojas, 2006; Bernal, 2012).

Sin embargo, la cantidad de nitrógeno fijado por las leguminosas durante su período vegetativo está en función de la capacidad del rizobio para fijar nitrógeno, de la especie de leguminosa, y de las condiciones de suelo y clima. El aprovechamiento de nitrógeno por las plantas varía aproximadamente entre 12 y 25% en el caso de suelos arenosos y de 25 a 50% en suelos arcillosos (Calegari *et al.*, 1992). Por lo tanto, para una inoculación exitosa, hay que realizar una selección de cepas específicas, eficientes y de una alta competitividad con rizobios nativos para que sirvan como inoculantes en sitios donde se encuentren condiciones ambientales adversas (Brockwell & Bottomley, 1995).

El propósito de esta investigación consistió en aislar cepas nativas de rizobios a partir de nódulos recolectados de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, en suelos de la provincia de Imbabura, para caracterizarlos morfológica y bioquímicamente, identificar los géneros rizobiales asociados a estas leguminosas, establecer las cepas capaces de crecer mejor en ambientes hostiles, y obtener un banco de cepas como fuente de bioinóculos en la fertilización de los suelos ecuatorianos.

1.2. Justificación

En el país, las investigaciones relacionadas con la identificación de cepas de rizobios, el uso de leguminosas como abonos verdes, y la inoculación de microorganismos eficientes en la fijación biológica de nitrógeno, no han sido abordadas a profundidad ya que no se ha considerado aspectos integrales que permitan desarrollar un programa continuo de selección de cepas genéticamente estables y adaptadas a condiciones de campo (Bernal, 2012).

Cabe resaltar que las cepas promotoras de crecimiento (inoculantes a base de turba) disponibles en el mercado del Ecuador actualmente proceden en su mayoría de otros países (cepas foráneas), y son ineficientes bajo condiciones locales, con consecuencias ambientales aún desconocidas (Bernal, 2006); es importante por lo tanto, encontrar cepas nativas de las regiones ecuatorianas donde se siembre el cultivo de interés (Bernal, 2012).

En este contexto, el INIAP ha realizado varios estudios con rizobios en leguminosas, encontrando cepas promisorias para producir inoculante comercial, sin embargo, no ha logrado su comercialización. Además, el último estudio de rizobiología realizado en el INIAP fue en el 2004 (INIAP-DF, 1982-1989; INIAP-DNPV, 1992-1994; INIAP-DPNV, 2001-2004); y desde entonces no ha sido factible ningún tipo de refrescamiento de las cepas aisladas hasta la presente fecha, sin mencionar que no todas se encuentran en el banco del laboratorio de Microbiología del DMSA.

Hay que indicar también que las cepas de rizobios fueron evaluadas en ensayos del INIAP con variedades que al momento ya no se cultivan en las zonas productoras de la provincia de Imbabura debido a que muchas de ellas perdieron resistencia a enfermedades y por otras causas varias. El Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (INIAP-PRONALEG, 2008) ha liberado nuevas variedades de los diferentes cultivos que son utilizadas en los actuales sistemas de producción y para las cuales aún no se han identificado las cepas de rizobios.

En el Ecuador se ha realizado investigación sobre rizobios en algunos cultivos (fréjol, arveja, alfalfa, trébol, soya y maní), pero sólo se cuenta con caracterización fenotípica y genotípica del rizobio de fréjol y maní, habiéndose evidenciado una alta heterogeneidad en los suelos ecuatorianos (Bernal *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2004). Con respecto a los rizobios asociados al cultivo de haba, chocho y vicia, no se han realizado estudios; y en lo referente a arveja hay poca información.

El aislamiento, así como la caracterización bioquímica y morfológica de los rizobios constituye el primer paso para una serie de investigaciones que pueden involucrar no solo estudios taxonómicos, sino también moleculares en beneficio de la región y otras zonas del país. Además, para estudiar y explotar las potencialidades de estas bacterias, es necesario resguardarlas en bancos, conservando sus características fenotípicas, genotípicas, así como su viabilidad. La preservación bacteriana es fundamental no solo para el resguardo de una cepa con potencial biotecnológico, sino también para el estudio en la búsqueda de nuevas funciones de los genes de una bacteria de interés (Morales-García *et al.*, 2010).

Por estas razones se realizó la presente investigación, que permitió retomar los estudios de rizobiología con el objeto de: (1) caracterizar fenotípicamente a los aislamientos nativos de rizobios asociados a las leguminosas mencionadas para conocer el género taxonómico de la bacteria y (2) obtener un banco de cepas de los rizobios.

Los resultados serán utilizados para la posterior evaluación de la eficiencia de fijación de nitrógeno de las cepas caracterizadas en ensayos de invernadero y campo. Adicionalmente, se podría pensar en un estudio más detallado que permita llegar a la tecnología de producción de cepas como inoculantes para el mercado nacional, lo cual permitirá que los suelos sean más productivos y que las cosechas tengan un rendimiento mayor a los actualmente alcanzados, además de reducir el costo de producción y el impacto ambiental de una fertilización inorgánica nitrogenada muchas veces mal manejada.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Recolectar y caracterizar morfológica y bioquímicamente cepas de rizobios asociados a cultivos de arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) en suelos de la provincia de Imbabura, y obtener un banco de cepas.

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Recolectar cepas de rizobios a partir de nódulos de raíces de cultivos de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia de suelos de la provincia de Imbabura.
- ✓ Caracterizar morfológica y bioquímicamente las cepas de rizobios.
- ✓ Formar un cepario de rizobios a partir de las cepas existentes en INIAP y las recolectadas.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Coberturas vegetales o abonos verdes

Son cultivos que se siembran para ser cortados e incorporados al suelo en el mismo lugar en el que se han producido. Su ciclo termina cuando las plantas están verdes o llegan a la floración, que coincide con el momento en que la planta es más rica en elementos nutritivos (Flórez-Serrano, 2009). El rastrojo, es decir su sistema radicular y sus residuos (hojas y tallos), es inicialmente desmenuzado por la macro y mesofauna (insectos, lombrices, artrópodos, etc.) del suelo, para posteriormente ser descompuestos por bacterias, hongos y actinomicetos, contribuyendo con la formación de humus del suelo y mejorando la estructura y en general las propiedades del suelo (Bernal, 2006); los cultivos de cobertura suelen utilizarse en asociación con un cultivo principal o como cultivo intercalar entre dos cultivos principales (Flórez-Serrano, 2009).

Su uso tiene una serie de ventajas: limitan la invasión de malas hierbas al mantener al suelo ocupado, aumentan la fertilidad de los agrosistemas al aportar materia orgánica y activar la vida de los microorganismos en el suelo, evitan el lavado de los elementos nutritivos que son fijados por las plantas, mejoran la estructura del suelo por sus raíces y la circulación del agua y del aire, protegen al suelo de la erosión, reducen las necesidades de herbicidas y pesticidas, ayudan a controlar las malezas, plagas y enfermedades, y favorecen la nutrición de las plantas del cultivo siguiente. Estas ventajas varían en función de las características geográfico climáticas de la región, del sistema de laboreo empleado y de los siguientes cultivos en la rotación (Flórez-Serrano, 2009).

Las plantas leguminosas son las de mayor uso como abono verde en campos destinados a la ganadería y agricultura, ya que su incorporación al suelo permite la restitución tanto de materia orgánica como de nitrógeno (Constante-Olivero, 1993). La cantidad de nitrógeno fijada por una leguminosa no depende solamente de la genética de

las bacterias o de la planta huésped (cantidad de follaje), sino también del medio ambiente y las prácticas agrícolas (Danso y Eskew, s.f.).

1.4.2. Leguminosas

Las leguminosas constituyen la segunda familia de plantas con flores más numerosas, y de importancia económica, después de las gramíneas (Allen & Allen, 1981). Están distribuidas mundialmente, a excepción de las regiones árticas y antárticas, y de algunas islas, como Nueva Zelanda, donde son muy escasas (Burkat, 1952, citado por López, 2002). Díaz (2010) indica que las principales leguminosas producidas en el mundo son el fréjol (*Phaseolus vulgaris*), la arveja (*Pisum sativum*), el haba (*Vicia faba*), la soya (*Glycine max*), el maní (*Arachis hypogaea*) y la lenteja (*Lens culinaris*).

Su nombre deriva del latín *legumen* (semillas con vaina). Esta familia se incluye en la división Magnoliofita, clase Magnoliopsidae, y orden Fabales (Cronquist, 1988, citado por Díaz, 2010). Actualmente se acepta que todas las leguminosas pertenecen a una familia denominada Fabaceae con tres subfamilias: *Mimosoideae* (*Mimosa*, *Acacia*), *Cesalpinoideae* (*Ceratonia*, *Cercis*, *Gleditsia*) y *Papilionoideae* (*Lupinus*, *Cicer*, *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Arachis*, *Trifolium*, *Medicago*), basándose fundamentalmente en diferencias florales (Lewis, 2005, citado por Díaz, 2010).

Existen 700 géneros y cerca de 18 000 especies (Coyne, 2000), de las cuales se usan aproximadamente sólo 100 leguminosas importantes para la agricultura (Allen & Allen, 1981). Están distribuidos con 152 géneros y 2 800 especies en *Caesalpinioideae*, la misma cantidad en *Mimosoideae*, y 480 géneros con 12 000 especies en *Papilionoideae* (Somasegaran & Hoben, 1994).

Las leguminosas son componentes importantes de los sistemas de producción, ya que son cultivadas en asociación, intercaladas, en monocultivos o en rotación con otros cultivos. Son esenciales para el manejo y conservación de los suelos, y tienen la

capacidad de asociarse simbióticamente con las bacterias rizobios, que se alojan en nódulos formados en raíces o tallos, y que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Bernal, 2006). Sin embargo, esta asociación se origina preferencialmente si existe en el suelo un déficit del elemento. Si hay suelos ricos en nitrógeno, las leguminosas prefieren utilizarlo independientemente de la presencia de las bacterias, por el contrario, si la bacteria está presente y los niveles de nitrógeno en el suelo son bajos, la planta estimula el ingreso de los rizobios a la raíz para que lleven a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Wang *et al.*, 2002).

La habilidad para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios es estricta de las leguminosas, con una excepción, el género *Parasponia* (planta no leguminosa) de la familia *Ulmaceae*. Las plantas leguminosas son muy diversas en morfología, hábitat y ecología. Debido al gran número de leguminosas que son noduladas por rizobios, la simbiosis con estas bacterias no es aparentemente una adaptación a un nicho ecológico especializado sino que depende de alguna peculiaridad genética de las leguminosas, una que es tan compleja que raramente ha envuelto a cualquier otra planta del reino (Cook *et al.*, 2005, citado por Rojas, 2008). Sin embargo, cabe mencionar que no todas las especies de leguminosas están facultadas para formar nódulos y tampoco se sabe cuántas pueden establecer simbiosis (Ernst, 2004).

En las tres subfamilias, el porcentaje de especies noduladas es diferente. Las observaciones realizadas en trabajos de investigación estiman que el 90% de las subfamilias avanzadas *Papilionoideae* y *Mimosoideae* pueden formar nódulos, pero solo el 30% de las especies de la subfamilia menos especializada *Cesalpinoideae* los poseen (Allen & Allen, 1981; Ernst, 2004). La subfamilia *Papilionoideae*, contiene a las especies más promiscuas de leguminosas, con respecto a su microsimbionte, dentro de la tribu *Phaseolae* (Michiels *et al.*, 1998, Hernández-Lucas, 1995, citados por Lloret y Martínez, 2005).

Las leguminosas más conocidas por asociarse con bacterias simbióticas y fijar nitrógeno atmosférico son las que tienen valor agropecuario y alimenticio para el ser

humano o para el ganado, como fréjol, arveja, haba, chocho, soya, vicia y alfalfa (Ernst, 2004). Las leguminosas de grano fijan menos nitrógeno que las usadas como forraje, puesto que son cultivadas durante períodos más cortos y desarrollan menos raíces en las que formarse los nódulos (Allen & Allen, 1981).

1.4.2.1. Arveja (*Pisum sativum* L.)



Figura 1.1. Planta de *Pisum sativum* L.

El cultivo de arveja (figura 1.1) tiene su centro de origen en el Oriente, extendiéndose hacia Europa y Asia (Vaca-Patiño, 2011). Constituye un cultivo de alta importancia en los sistemas de producción de las provincias de la Sierra Ecuatoriana (Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Azuay, Loja), y de gran demanda en el mercado nacional e internacional (Peralta *et al.*, 2010; Vaca-Patiño, 2011). En promedio se cosechan alrededor de 22 000 ha/año, en los más diversos agroecosistemas, en áreas de clima lluvioso o seco con riego (Subía, 2001). Constituye actualmente el 0.93% del total de la superficie arable en el Ecuador, el rendimiento promedio es de 0.32 TM/ha de arveja seca mientras que en grano verde los rendimientos alcanzan 0.98 TM/ha (SICA, 2002, Peralta, 2007, citados por Vaca-Patiño, 2011).

Las variedades de arveja cultivadas son de ciclo corto, sembrándose desde principios de julio hasta mediados de agosto como fecha límite. La arveja es muy

sensible a las bajas temperaturas en la etapa de germinación, por lo que es recomendable de alguna manera evitar sembrar con pronóstico cercano de lluvias y excesivo frío (Prieto, 2012).

Los mayores limitantes en la producción de arveja se ven reflejados en el incremento de costos de producción. Este cultivo requiere de altas dosis de fertilizantes que suplan las necesidades nutricionales de las plantas, por la baja productividad de los suelos en que se establecen generalmente estos cultivos, con escasos contenidos de nitrógeno disponible, baja mineralización de la materia orgánica y altas tasas de pérdida de nitrógeno por lixiviación o volatilización. El nitrógeno es uno de los macronutrientes más importantes seguido del fósforo y potasio. Se estima que una cosecha de dos toneladas de grano de arveja por hectárea, extrae alrededor de 125 kg de nitrógeno (Moreno, 2010).

La arveja es una buena opción dentro de un plan de rotación de cultivos ya sea a campo abierto o bajo invernadero, debido a su gran capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, llegando a fijar hasta 185 kg/ha, sin mencionar, que en suelos sin historia de arveja se obtienen datos superiores (Rennie y Dubetz, 1986, citados por Prieto, 2012). Generalmente la siembran junto con el maíz, o luego de su cosecha, lo que hace posible cultivarla hasta dos veces al año, y es recomendada como antecesor en cultivos de soja o maíz, ya que deja más agua disponible en el perfil para el siguiente cultivo y mejora la fertilidad del suelo (Vaca-Patiño, 2011; Prieto, 2012).

Se ha descrito la nodulación de arveja por bacterias del género *Rhizobium*, identificándose la especie *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Subía, 2001).

1.4.2.2. Chocho (*Lupinus mutabilis* S.)



Figura 1.2. Planta de *Lupinus mutabilis* S.

El cultivo de chocho (figura 1.2) tiene su centro de origen en la zona andina de Sudamérica. Es la única especie americana del género *Lupinus* domesticada y cultivada como una leguminosa (Blanco, 1982, citado por Jacobsen y Sherwood, 2002). Su distribución comprende desde Colombia hasta el norte de Argentina, aunque actualmente es de importancia sólo en Ecuador, Perú y Bolivia. El chocho seguido de cereales y otros cultivos es el sistema más importante en Chimborazo, Cotopaxi y Pichincha; mientras Imbabura tiene chocho seguido de maíz, cereales (cebada, trigo), leguminosas (vicia, lenteja, fréjol) y papa. La superficie cultivada en Ecuador supera las 70 000 ha/año, de las cuales cerca del 90% están ubicadas en la región Sierra (Jacobsen y Sherwood 2002).

Las mejores épocas de siembra se han definido, en la Sierra norte (Carchi, Imbabura y Pichincha) de noviembre a febrero, y en la Sierra central (Cotopaxi y Chimborazo) de diciembre a marzo (Peralta y Caicedo, 2001).

El cultivo de chocho en el país se caracteriza por ser altamente eficiente en la fijación biológica de nitrógeno, ya que sus cepas nativas se han adaptado a las condiciones del suelo en que se cultiva, por lo cual prácticamente no es necesario aplicar

fertilizantes nitrogenados, contribuyendo al manejo y conservación de los suelos andinos (Peralta y Caicedo, 2001).

El cultivo de esta leguminosa constituye un abono verde excelente, capaz de fijar 400 a 900 kg N/ha. Mejora la fertilidad del suelo, su estructura, retención de humedad, evita el establecimiento de malezas y sirve como una alternativa de rotación con otros cultivos como cereales y tubérculos (Peralta y Caicedo, 2001); además, se adapta a condiciones edafoclimáticas desfavorables de varios sistemas de producción (INIAP-PRONALEG, 2008). Finalmente, el chocho puede contribuir al manejo de plagas en el sistema de cultivo andino, actuando como una barrera contra el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), la plaga de papa que más demanda el empleo de plaguicidas en la Sierra de Ecuador (Alcázar y Cisneros, 2001, González y Franco, 2001, citados por Jacobsen y Sherwood 2002).

Se ha descrito la nodulación de algunas especies de *Lupinus* por bacterias de la familia Bradyrhizobiaceae, identificándose las especies *Bradyrhizobium canariense* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*); de la familia Brucellaceae, *Ochrobactrum lupini*; y de la familia Phyllobacteriaceae, *Phyllobacterium trifolii* (Sucojaya *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2005; Sprent, 2001, Sprent, 2007, citados por Peralta y González, 2009). Las cepas rizobianas de chocho tienen gran eficacia e infectividad, y su presencia está altamente correlacionada con plantas más vigorosas y productivas. Cada planta puede llegar a producir hasta 50 g de nódulos (Peralta y Caicedo, 2001).

1.4.2.3. Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Figura 1.3. Planta de *Phaseolus vulgaris* L.

El cultivo de fréjol (figura 1.3) tiene su centro de origen en el sur del Ecuador, norte del Perú, y en Mesoamérica (Bernal, 2012). Es uno de los principales cultivos de importancia económica en los valles de las provincias de Carchi, Imbabura y Loja (Peralta, 1995). La superficie cultivada en Ecuador supera las 120 000 ha/año, de las cuales cerca del 90% están ubicadas en la región Sierra (INEC, 2002). El fréjol común es la leguminosa de consumo humano directo más importante del mundo (CICO, 2009). La producción mundial excede las 23 millones de TM/ha de las cuales, cerca de 5.5 millones (23.9%) son producidas en Latinoamérica (INIAP-PRONALEG, 2008).

Su época de siembra es en los meses de febrero a abril y de septiembre a noviembre en los valles, mientras que en las estribaciones se realiza en los meses de mayo a junio, por lo que de manera general se puede consumir fréjol durante casi todo el año (Viteri, 2010).

Es una leguminosa bastante promisoría para utilizar como abono verde debido a que cumple con las condiciones requeridas por un cultivo para poder ser utilizado con este propósito como son: buena adaptabilidad, bajo costo en la implementación, período vegetativo corto, alto potencial de competencia con otras plantas, resistente a condiciones adversas de manejo y buen aporte de biomasa (Quirós *et al.*, 1998).

En el cultivo de fréjol se ha encontrado que, de acuerdo con el genotipo y tipo de hábito, la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico es diferente (ASERCA, 2000). En general, el fréjol es un débil fijador de nitrógeno, llegando a fijar máximo 60 kg N/ha, sin embargo esto ocurre sólo cuando el cultivo está floreciendo y el suelo naturalmente está pobre en nitrógeno (Quirós *et al.*, 1998).

El género *Phaseolus* incluye algunas de las leguminosas más promiscuas en lo que se refiere al elevado número de rizobios con los que son capaces de establecer simbiosis efectivas (Díaz, 2010). Se ha descrito la nodulación de algunas especies de *Phaseolus* en América por microorganismos del género *Bradyrhizobium*, pero los que lo nodulan de un modo eficiente se incluyen dentro de la familia Rhizobiaceae en los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2006).

Se han identificado varias especies de rizobios asociados simbióticamente con el fréjol, *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. giardinii* y *R. lusitanum*. Sin embargo *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* es el predominante en los nódulos del fréjol (Vinuesa, 1998; Silva *et al.*, 2003; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Díaz, 2010). En cuanto al género *Sinorhizobium* contiene dos especies capaces de formar nódulos, *S. meliloti* y *S. fredii*. En ambos casos contienen una biovariedad denominada *mediterraneanse* (Mhamdi *et al.*, 2002; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000, Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009, citados por Díaz, 2010).

1.4.2.4. Haba (*Vicia faba* L.)



Figura 1.4. Planta de *Vicia faba* L.

El cultivo de haba (figura 1.4) tiene su centro de origen en la región del mediterráneo, especialmente Italia e Irán. Su cultivo se distribuye a lo largo del Callejón Interandino, asociado con maíz, quinua y fréjol; debido a sus características también se desarrolla en las partes altas de la cordillera en las zonas de los páramos. Su consumo es popular en todo el país y en América del Sur. En Ecuador el cultivo de habas se encuentra en las provincias de la Sierra: en la zona Norte (Carchi e Imbabura), en la zona Central (Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua), y en la zona Sur (Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja). Existe aproximadamente 26 000 hectáreas cultivadas con esta leguminosa, encontrándose la mayor producción en la provincia de Azuay (Peralta, 1995; Ortega, 2006).

Su época de siembra es de febrero a octubre y, en las partes bajas donde se asocia las habas al cultivo del maíz, desde los primeros días del mes de octubre. Sin embargo, en principio si se dispone de riego, se puede sembrar durante todo el año, aunque es mejor esperar el fin del verano o principios de las lluvias (Peralta, 1995).

Constituye un excelente abono verde, ya que genera un gran volumen de biomasa, y al incorporarse al suelo aporta materia orgánica, esta actividad se puede hacer de dos formas: estableciendo el cultivo como abono verde e incorporando en la etapa de floración, cuando la actividad de fijación de nitrógeno es mayor, o cuando el cultivo se

destina para producir vaina fresca, al final de la cosecha se puede incorporar al suelo (ASERCA, 2000).

La planta de haba tiene una gran capacidad de fijación de nitrógeno en un rango que varía de 150 a 500 kg N/ha; pero hay varios factores que se deben considerar para poder entender este rango tan amplio que se reporta, y entre los cuales están los edáficos, genotípicos y agronómicos. La acidez del suelo es fundamental para que se dé una adecuada nodulación y fijación, desde la multiplicación del rizobio en el suelo, la infección y formación del nódulo, hasta la fijación de nitrógeno (ASERCA, 2000).

Se ha descrito la nodulación de haba por bacterias del género *Rhizobium*. Esta leguminosa es específica (no promiscua) en relación con su microsimbionte. Se ha identificado la especie *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Ritsema *et al.*, 1996 citados por Lloret y Martínez, 2005), y recientemente la especie *Rhizobium fabae* sp. nov (Tian *et al.*, 2008).

1.4.2.5. Vicia (*Vicia* sp.)



Figura 1.5. Planta de *Vicia* sp.

El cultivo de vicia (figura 1.5) tiene su centro de origen en Europa, el norte de África y el oeste de Asia. Se la emplea para heno, pastoreo, cobertura de suelo y eventualmente para la producción de semillas (Renzi, 2009); los cultivos de vicia para cosecha de semilla generalmente entregan un suelo de mayor fertilidad que los destinados a la producción de forraje, debido a que las plantas tienen oportunidad de producir el máximo desarrollo radical, de nódulos y de follaje (Qamar *et al.*, 1999, Agamennoni y Vanzolini, 2006, citados por Renzi y Cantamutto, 2007).

Su época de siembra comienza desde fines de verano hasta mediados de invierno, desde fines de febrero hasta junio y en los meses de septiembre a octubre. La época de siembra es uno de los factores que determina el potencial productivo de la vicia (Lorenzatti *et al.*, s.f.; Renzi, 2009).

La planta de vicia tiene una capacidad de fijación de nitrógeno en un rango que varía de 75 a 125 kg N/ha (Ebelhar *et al.*, 1984, Blevins *et al.*, 1990, Singh, 2001, citados por Lorenzatti *et al.*, s.f.). Sin embargo, estudios realizados en el sudeste de Córdoba y sur de Santa Fe, Argentina, reportaron una capacidad de fijación de nitrógeno total de 200 a 300 kg/ha, contenido en los residuos de la vicia (Lorenzatti *et al.*, s.f.).

Se trata de un cultivo que produce gran cantidad de materia seca y que, además, se adapta a condiciones ambientales severas, especialmente a períodos de sequía y de frío. El manejo de la biomasa aérea de esta leguminosa determina la capacidad de aportar nutrientes al suelo. Una de las características de la vicia es que posee el 85-90% del nitrógeno de esa biomasa, por lo tanto el remanente que se conserve como residuo será determinante en su efecto mejorador (Renzi, 2009). Su valor como cultivo de cobertura para mantener la fertilidad del suelo depende de la producción razonable de toneladas de materia orgánica. La vicia puede producir 40 toneladas de abono vegetal por acre, mientras que otras leguminosas producen entre 12 a 13 toneladas. Anualmente hay ganancias netas de nitrógeno por encima de las 150 libras por acre (Altieri, 1999).

Es muy utilizada en rotaciones con cultivo de maíz, con el fin de generar biomasa favoreciendo el aporte de carbono y la cobertura del suelo, mejorar las propiedades del suelo, y principalmente fijar nitrógeno atmosférico e incorporarlo al suelo vía descomposición de residuos aéreos y subterráneos, como se ha mencionado anteriormente (Romagnoli, 2010). Además, se ha demostrado que la asociación de vicia más avena es una excelente combinación como abono verde debido a que la avena potencializa el crecimiento de la vicia obteniendo mayor cantidad de cobertura vegetal (Muslera, 1983, citado por Chasi-Caisaguano y Muso-Defaz, 2009).

Se ha descrito la nodulación de vicia por bacterias del género *Rhizobium*, identificándose la especie *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Chasi-Caisaguano y Muso-Defaz, 2009).

1.4.3. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno molecular (N_2) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (79%), y representa junto con el agua, el principal factor limitante de la producción agrícola mundial, debido a que las plantas sólo son capaces de asimilar el nitrógeno combinado, siendo necesaria una conversión previa de nitrógeno gaseoso a amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-), como se aprecia en la figura 1.6 (Taiz & Zeiger, 1991).

Es considerado como un elemento fundamental en el desarrollo de las plantas por ser componente principal de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas, clorofila, ATP, algunos lípidos y otros componentes celulares, afectando directamente en la estructura y el metabolismo celular (Sylvia *et al.*, 2005). De acuerdo a la fuente de energía requerida para fijar nitrógeno, se distinguen dos formas de fijación: biológica y no biológica (figura 1.6).

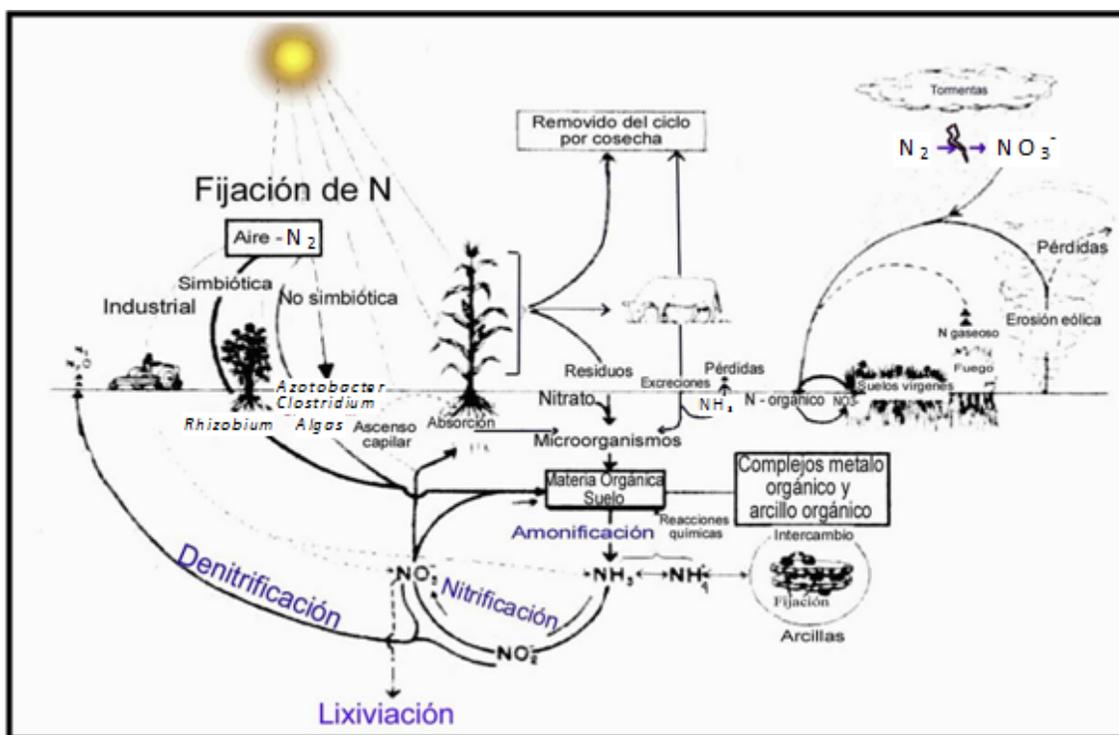


Figura 1.6. Esquema de la fijación de nitrógeno (Olivares, 2004).

1.4.3.1. Fijación no biológica de nitrógeno

Fijación natural, debido a la emisión de energía, producto de la actividad natural de descargas eléctricas y combustiones (incendios, automóviles y fábricas), en la cual la enorme cantidad de luz ioniza las moléculas en la atmósfera, mezclándose oxígeno con nitrógeno atmosférico y formando óxidos de nitrógeno, los cuales se disuelven en la lluvia y forman nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) que son llevados a la tierra (figura 1.6); se estima que este proceso puede fijar alrededor de 10 millones de toneladas métricas de N/año (Vinuesa, 1998; Brill, 1977, citado por Guamán y Yaguana 2007), es decir, probablemente contribuye con el 10% del total de nitrógeno anual fijado (Newton & Fisher, 2002).

Fijación industrial, realizada para la producción de fertilizantes nitrogenados, consiste en la transformación del nitrógeno atmosférico en amoníaco, bajo condiciones de temperatura y presión elevada a base de energía de los combustibles fósiles (figura

1.6); con lo cual se introducen en el suelo aproximadamente 70 millones de toneladas de N/año (Martínez-Toledo, 1992, citado por Romero-Rojas, 2009). Esta fijación tiene algunas limitaciones, requiere de instalaciones sofisticadas (500°C y 300 atm), uso de combustibles perecibles (85 litros de gas más dos litros de petróleo se necesitan para obtener un kilogramo de nitrógeno) y usa catalizadores inorgánicos, involucrando altos costos de producción; su aplicación propicia contaminación del medio ambiente y una acción degastadora del suelo. Los fertilizantes nitrogenados son muy solubles, del 100% que se coloca en el suelo, solo el 50% es aprovechado por las plantas, el resto se percola contaminando las aguas (eutrofización), mientras que en las personas ocurre la formación de nitrosaminas (aminas secundarias catalogadas como agentes cancerígenos) según Brill (1977), citado por Guamán y Yaguana (2007). Esta forma de fijación contribuye aproximadamente con el 25% del total de nitrógeno fijado anualmente (Newton & Fisher, 2002).

1.4.3.2. Fijación biológica de nitrógeno

Las plantas toman el nitrógeno directamente desde el suelo en forma de nitratos (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), algo que no pueden hacer los animales, que precisan tomarlo en forma de compuestos orgánicos. La fuente más importante de nitrógeno fijado deriva de la actividad de ciertos microorganismos procarióticos, denominados diazótrofos, los cuales convierten mediante un proceso de reducción, el nitrógeno molecular de la atmósfera terrestre en amonio (figura 1.6), es decir, en nitrógeno asimilable por otros seres vivos, según la siguiente ecuación (Valverde-Portal, 2003; Díaz, 2010):



La reacción está catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que consta de dos componentes: el componente I, o nitrogenasa, posee un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo/molibdoferroproteína) que forma parte del centro activo, y está codificada por los genes *nifD* y *nifK*; y el componente II, o nitrogenasa reductasa,

posee átomos de hierro acomplejados con el azufre de determinadas cisteínas (ferroproteína), y está codificada por el gen *nifH* (Valverde-Portal, 2003).

El proceso de transformación del nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable comienza cuando los electrones para la reducción, llegan al complejo nitrogenasa por medio de una ferredoxina, que los transfiere al componente II. El complejo queda entonces reducido al tiempo que por cada dos electrones transferidos se hidroliza una molécula de ATP; la nitrogenasa-reductasa reducida, componente II, se asocia entonces con la nitrogenasa, componente I, y le transfiere los electrones. Una vez reducida la molibdoferroproteína, ésta transfiere los electrones, y los protones, al N_2 , hasta convertirlo en dos moléculas de amonio (Valverde-Portal, 2003).

El complejo nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, por lo que queda rápida e irreversiblemente inactivado por este gas. Por una parte, los bacteroides deben mantener la concentración de oxígeno a un nivel que no perjudique a la nitrogenasa, y por otra, la concentración de dicho gas debe ser la apropiada para que se pueda llevar a cabo la fosforilación oxidativa, encargada de suministrar el ATP a la nitrogenasa (Valverde-Portal, 2003). En vista de este problema, la simbiosis rizobio-leguminosa ha desarrollado una protección de la nitrogenasa frente al oxígeno mediante dos mecanismos: a través de la barrera de difusión del nódulo, formada por una capa de células con pocos espacios intercelulares y que limita el córtex interno; y a través de la leghemoglobina, ferroproteína asociada a la membrana que rodea al bacteroide, que al interconvertirse entre su forma oxidada y reducida regula el suministro de oxígeno al bacteroide proporcionándole una concentración adecuada (Bergensen, 1997).

Al final del proceso, el amonio producido se asimila mediante la formación de glutamato y glutamina, aminoácidos precursores de proteínas, que además intervienen en otro tipo de reacciones, como la transferencia de grupos amino y amido a todos los otros precursores nitrogenados de macromoléculas orgánicas (Patriarca *et al.*, 2002).

La obtención de nitrógeno asimilable directamente desde ésta vía es muy importante para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, del que forman parte las bacterias fijadoras de nitrógeno (aerobias, anaerobias, o fotosintéticas), junto con otros grupos de bacterias que llevan a cabo procesos intermedios de transformación de compuestos nitrogenados y de desnitrificación, que devuelve finalmente el nitrógeno a la atmósfera. La existencia de un equilibrio en el ciclo de este elemento es esencial para la vida en la tierra y conlleva el mantenimiento de los ecosistemas microbianos presentes en los medios terrestres y acuáticos (Díaz, 2010).

El influjo anual de nitrógeno a la biosfera correspondiente a la FBN es de aproximadamente 175 millones de toneladas por año, lo cual representa más del doble del nitrógeno aportado por los fertilizantes nitrogenados (Vinuesa, 1998). Los procesos biológicos contribuyen con alrededor del 65% de la producción total anual de nitrógeno fijado (Newton & Fisher, 2002).

Dentro de los diazótrofos hay microorganismos que llevan a cabo la fijación de nitrógeno en vida libre, mientras que otros lo hacen mediante asociaciones simbióticas con plantas (De Felipe, 2006). La fijación biológica de nitrógeno puede ser no simbiótica y simbiótica.

1.4.3.2.1. Fijación biológica de nitrógeno no simbiótica

La fijación no simbiótica se realiza por acción de las bacterias de vida libre que se alimentan de materia orgánica muerta en el suelo: bacterias anaerobias Gram positivas como *Frankia* y *Clostridium*, protobacterias aerobias como *Acetobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia*, enterobacterias anaerobias facultativas como *Klebsiella*, arqueobacterias como *Methanococcus*, y varias más (De Felipe, 2006).

Algunas bacterias fijadoras de vida libre son endofíticas de plantas, y colonizan los espacios intercelulares radiculares de la planta hospedadora. Se ha demostrado, en algunas de estas asociaciones, la incorporación de nitrógeno fijado a la planta, como en

el caso de *Azoarcus*, *Azospirillum* y *Burkholderia*, que son endófitos del arroz y penetran a sus raíces aumentando la presencia de compuestos nitrogenados, o como en el caso de *Gluconacetobacter*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, que son endófitos de caña de azúcar, y contribuyen a su fertilización nitrogenada (Berg *et al.*, 1980, Reinhold-Hurek & Hurek 1998, Kao *et al.*, 2003, Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003, Vargas *et al.*, 2003, Govindarajan *et al.*, 2007, citados por Díaz 2010).

Las bacterias de vida libre que fijan nitrógeno deben generar su propia energía para realizar esta actividad. La eficiencia de la fijación es baja, debido a que el nitrógeno fijado es luego metabolizado, y eliminado por desnitrificación y lavado. La fijación en vida libre aporta al suelo unos cientos de gramos de nitrógeno por hectárea y año que, si bien son suficientes en condiciones naturales, no satisfacen las necesidades de los cultivos (Olivares, 2004).

1.4.3.2.2. Fijación biológica de nitrógeno simbiótica

Varios grupos de procariotas son capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con las raíces de plantas superiores. Las plantas suplen a la bacteria con la energía para crecer con productos de la fotosíntesis, mientras que la bacteria suple a la planta con nitrógeno fijado (Newton & Fisher, 2002). Algunos ejemplos son, la simbiosis entre *Frankia* y plantas actinorrizas, de gran importancia para los sistemas forestales, la simbiosis entre cianobacterias del género *Anabaena* y el helecho *Azolla*, de gran valor para los cultivos de arroz, la simbiosis entre enterobacterias como *Citrobacter* y termitas, y la de más relevancia, la simbiosis entre las bacterias rizobios con las leguminosas (Peters, 1977, Benson & Silvester, 1993, Velázquez *et al.*, 2010, citados por Díaz 2010).

La simbiosis con leguminosas no es exclusiva de los rizobios, sino que hay otros microorganismos que también pueden llevarla a cabo. Así, la proteobacteria *Devosia* ha sido aislada de nódulos de la leguminosa acuática *Neptunia natans*, *Methylobacterium nodulans* aislada de *Crotalaria spp.*, hierbas y arbustos muy extendidos en África, de

gran interés agronómico por su utilización en la mejora de la fertilidad de los suelos y en el control de las poblaciones de nematodos en suelos infectados, *Burkholderia* aislada de *Aspalatus carnosus*, *Cupriavidus taiwanensis* aislada de nódulos de *Acacia spp.* (Moulin *et al.*, 2001; Becker & Johnson, 1999, Abdoulaye *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2001, Rivas *et al.*, 2002, citados por Díaz, 2010).

1.4.4. Asociación simbiótica leguminosa - rizobio

La simbiosis de rizobios y leguminosas ha sido la asociación mutualista más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a nivel mundial. Ambos partícipes pueden vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción caracterizada por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz, o en casos especiales, en los tallos (Gibson *et al.*, 2008). La asociación simbiótica leguminosa rizobio es responsable del 40% de nitrógeno fijado por medios biológicos y prácticamente, de todo el nitrógeno fijado por las plantas cultivadas (Romero-Rojas, 2009).

La fijación en simbiosis es mucho más eficiente que la fijación no simbiótica, calculándose que sólo la asociación rizobio-leguminosa puede llegar a aportar más de 300 kilogramos por hectárea y año, y abastecer en algunos casos hasta 90% de las necesidades de las plantas (Urzúa, 2005).

Son muchas las ventajas de esta asociación simbiótica: la planta puede autoabastecerse de nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas, puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas, puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos o el abono verde y se mineralice el nitrógeno. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo, los cuales se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e

inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, seres humanos (Urzúa, 2000).

A pesar de las ventajas mencionadas, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o, si se encuentran presentes, la mayoría de veces son de baja efectividad. Introducir estos microorganismos en el suelo a través de la inoculación, es una alternativa para favorecer la simbiosis. Además, cabe destacar que inocular las semillas de leguminosas tiene un bajo costo para el productor, con un valor promedio estimado de 5% sobre el costo de la semilla (Urzúa, 2000).

La efectividad fijadora es el resultado de interacciones bioquímicas y genóticas entre hospederos y rizobios, en base a la cual un determinado tipo de simbiote que actúa sobre diferentes tipos de hospederos puede presentar diferentes grados de eficiencia (Pankhurst, 1979, citado por González-Vargas, 2001). La cantidad de nitrógeno realmente fijada por una leguminosa no depende solamente de la genética de las bacterias o de la planta huésped, sino también del medio ambiente y las prácticas agrícolas. Al respecto cabe decir que muchas de las plantas que no nodulan en su ambiente natural quizás pudieran hacerlo si las condiciones fueran otras. Entre las prácticas agrícolas comunes, la fertilización con fósforo y nitrógeno influye en forma importante sobre la fijación del nitrógeno. En Kenya, la fertilización de *Phaseolus* con 150 kg/ha de fósforo resultó en un aumento del 62% en el rendimiento de este cultivo y de un promedio de 8 kg/ha a 60 kg/ha en la fijación de nitrógeno (Danso y Eskew, s.f.).

1.4.4.1. Proceso de simbiosis leguminosa - rizobio

En el establecimiento de la simbiosis se pueden diferenciar dos procesos complejos, una infección controlada, y la aparición de un nuevo órgano en la planta, el nódulo, en el cual se desarrolla la fijación del nitrógeno atmosférico (Mylona *et al.*, 1995, Schultze & Kondorosi, 1998, citados por Valverde-Portal 2003).

Los rizobios son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos (Ferrera *et al.*, 2001, citado por Franco-Ramírez, 2004) que pueden infectar al huésped a través de tres vías alternativas: pelo radical, heridas y células epidérmicas. La naturaleza química y física de la pared celular del pelo radical es posiblemente un factor crítico para determinar la vía de infección (Pueppke, 1986, Sequeira, 1986, Faria *et al.*, 1988, Hirsch, 1992, Boogerd & Van-Rossum, 1997, citados por Valverde-Portal 2003).

La penetración intercelular (crack-in) entre células epidermales y corticales ocurre, por ejemplo, en la nodulación del cacahuete (*Arachis hypogea*) por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Bhuvaneswari *et al.*, 1981, Booger & Van-Rossum, 1997, De Lajudie *et al.*, 1998, citados por Díaz, 2010); mientras que la infección de las células del pelo radicular sucede en la mayoría de las plantas. En el caso de *Phaseolus* la entrada de los rizobios es mixta, por pelos radicales y por crack-in (Díaz, 2010).

1.4.4.1.1. Mecanismos fisiológicos

En las leguminosas en las que la infección se produce a través de pelos radicales, que son células de la superficie de la raíz especializadas en la absorción, se produce una deformación de los mismos que origina un cambio en la dirección del crecimiento, provocando en el extremo apical la morfología típica denominada “cayado de pastor”, de modo que algunas de las bacterias quedan recluidas en el interior de la curvatura mediante la formación de hilos de infección u otras vías de acceso (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008).

Los rizobios inducen una degradación local de la pared celular de la planta, la membrana plasmática se invagina y entran en su interior (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, las células corticales son activadas mitóticamente formando el primordio nodular. Una vez que el rizobio llega al primordio, éste es liberado al citoplasma de sus células envuelto por una membrana peribacteroide de origen vegetal, que constituye el orgánulo denominado simbiosoma. El primordio

nodular se desarrolla hasta la formación de un nódulo maduro y la bacteria se diferencia a bacteroide (Haukka, 1997). Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. La planta aporta esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, los bacteroides son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en amonio (en forma de aminoácidos), los productos abandonan el nódulo a través del xilema y son luego utilizados por la planta (Coyne, 2000; Wang *et al.*, 2002; Lodwig & Poole, 2003).

Para que tenga lugar la reducción de N_2 , el ambiente del simbiosoma debe ser microaerobio, puesto que la nitrogenasa es muy sensible a la oxidación por O_2 . La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno la lleva a cabo la leghemoglobina, proteína monomérica cuya función es aportar oxígeno, y controlar los niveles del mismo, se acumula entre los bacteroides y la membrana periobacteroide proporcionando un color rojizo cuando los nódulos son cortados. Esta membrana presenta una elevada afinidad con el oxígeno, disminuyendo su concentración en los nódulos lo suficiente como para permitir que la respiración y la fijación del nitrógeno se realicen simultáneamente (Coyne, 2000; Valverde-Portal, 2003; Díaz, 2010).

La fijación del nitrógeno absorbe gran cantidad de energía y suele estar limitada por el aporte de carbono, en teoría son necesarios hasta 22 moles de glucosa por cada mol de nitrógeno fijado, de tal manera que una parte sustancial de la producción fotosintética de la planta (7 al 12%) está destinada en gran medida a los nódulos (Paul & Kucey, 1981, citados por Romero-Rojas 2009).

1.4.4.1.2. Mecanismos moleculares

La comunicación molecular entre la bacteria y la planta leguminosa es necesaria para el reconocimiento mutuo de las partes simbióticas compatibles. Estas señales moleculares son liberadas desde la raíz y/o semilla durante la germinación (López,

2002). Las moléculas que están implicadas en la comunicación leguminosa-rizobio son: las derivadas de la planta, que incluyen flavonoides (chalconas, flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas, isoflavonoides), no flavonoides (betaínas, estachidrina, trigonellina), ácidos aldónicos (ácido eritrónico, ácido tetrónico) y glicoproteínas (lectinas); y las de origen bacteriano, constituyentes específicos de la pared del rizobio necesarios para la iniciación y elongación del hilo de infección, así como en la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células infectadas, incluyen poliolsacáridos (exopolisacáridos-EPS, lipopolisacáridos-LPS, polisacáridos capsulares-CPS y KPS, beta glucanos cíclicos) y lipoquitooligosacáridos (LCOs) o denominados factores de nodulación (factores nod); además los rizobios secretan proteínas que son simbióticamente activas (Spaink *et al.*, 1998; López, 2002; Van Rhijn & Venderleyden, 1995, citados por Jerez, 2004).

El proceso comienza cuando los rizobios son atraídos a la superficie de la raíz de la planta con propiedades inductoras presentes en los exudados radiculares (característicos para cada leguminosa), donde proliferan y se adhieren a sus células por mecanismos específicos que involucran la interacción de macromoléculas complementarias, proteínas llamadas lectinas, presentes en las raíces de las leguminosas (Paul & Clark, 1989, citados por Campaña-Cruz, 2003). Las raíces secretan compuestos flavonoides específicos que activan los genes nodD del rizobio, presente en el plásmido simbiótico o en la región cromosomal simbiótica de la bacteria, los mismos que producen un activador de transcripción para la expresión de otros genes nod (López, 2002).

Estos genes son los responsables por la síntesis de los llamados factores nod, que funcionan como moléculas indicadoras que accionan el inicio de la nodulación en la planta huésped induciendo una serie de cambios en la raíz de la leguminosa que comprenden la deformación del pelo radicular, la formación del hilo de infección y la estimulación de la actividad mitótica en las células corticales, procesos que están marcados por la expresión de genes específicos de nodulación que codifican proteínas llamadas nodulinas. Los genes de nodulina que son expresados antes del inicio de la fijación de nitrógeno, es decir durante el proceso de infección y de la morfogénesis

nodular, son los llamados genes tempranos de nodulina que comprenden los genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*) y determinan las estructuras superficiales de los rizobios (genes *exo*, EPS, LPS y glucanos cíclicos); y los genes que son expresados inmediatamente después o al mismo tiempo que la fijación de nitrógeno, son los llamados genes tardíos de nodulina (genes de fijación *nif* y *fix*) (Martínez, 1990, Van-Kammen, 1994, citados por Jerez, 2004).

Una vez desarrollado el nódulo, los rizobios se diferencian en el interior del citoplasma de las células vegetales como bacteroides y es allí donde se activa el proceso de fijación de nitrógeno. El conjunto de bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidea se le denomina simbiosoma. El proceso de fijación está mediado por la inducción micro-aeróbica de los genes de fijación (*nif/fix*) vía la hemoproteína FixL que es oxígeno sensible. Conjuntamente se activan las nodulinas tardías que codifican para una proteína transportadora de oxígeno (leghemoglobina) y proteínas involucradas en la asimilación de carbono y nitrógeno (López, 2002).

Por su parte, en el proceso de infección a través de heridas “crack entry” o de las células epidérmicas, el microorganismo invade las células basales de los pelos radicales ocupando, al penetrar, el espacio existente entre la pared del pelo radical y las células epidérmicas y corticales adyacentes. Las células basales invadidas se dividen repetidamente llegando a hacerse más pequeñas e incorporándose al tejido del nódulo. Las células adyacentes se separan hasta la lámina media y el espacio resultante se llena de bacterias formando zonas de infección intercelulares. El retículo endoplasmático y las mitocondrias también aumentan cerca del sitio de infección, lo que indica un incremento de actividad de las células cercanas a las bacterias. Las bacterias invasoras se hallan dentro de una matriz densa a los electrones, pero no están rodeados de una envuelta de celulosa. Después de la liberación dentro de la célula de las bacterias, ésta se divide rápidamente y al final cada bacteria se encuentra rodeada de una membrana. El espacio que rodea a la bacteria es inicialmente grande, pero disminuye mucho al diferenciarse la célula bacteriana en bacteroides grandes y esféricos. En los nódulos maduros aparecen muchas zonas con bacteroides maduros separados por filas de células no infectadas. Los

haces vasculares de las raíces laterales y del nódulo tienen el mismo origen, naciendo en el lugar donde el haz vascular de la raíz se engrosa y divide (Chandler, 1978, Boogerd & Van-Rossum, 1997, citados por Valverde-Portal, 2003).

1.4.4.2. Promiscuidad hospedero - rizobio

La capacidad de los hospedadores para entrar en simbiosis con diferentes rizobios varía enormemente. La promiscuidad en la simbiosis está ampliamente difundida en la naturaleza. No está asociada con un grupo taxonómico de plantas o bacterias en particular, y no se correlaciona con el hábito de crecimiento de la leguminosa. Quizás el único rasgo que es común a bacterias y plantas promiscuas es que la mayoría se encuentran en climas templados o tropicales. La promiscuidad simbiótica es probablemente anterior a la posesión de un rango hospedador restringido (Perret *et al.*, 2000). La mayoría de leguminosas presentan un grado de promiscuidad bastante elevado, es decir, que pueden ser infectadas por un amplio rango de cepas de bacterias originalmente adaptados a otras especies (Freire, 1996). Sin embargo la principal excepción a esta regla la constituyen los rizobios asociados con las tribus *Cicereae*, *Trifolieae* y *Viceae*, los cuales tienen un rango de hospedador más restringido (Perret *et al.*, 2000). Ejemplos de leguminosas no promiscuas son *Galega officinalis* y *G. orientalis*, noduladas solamente por *Rhizobium galegae*, *Vicia faba* por *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Medicago* sp. por *Sinorhizobium meliloti* (Lindström, 1989, Ritsema *et al.*, 1996, citados por Lloret y Martínez, 2005).

Es de destacar que muchos de los hospedadores con una gran promiscuidad pertenecen a la tribu *Phaseoleae*. Esta capacidad de ser noduladas por una elevada variedad de bacterias se ha relacionado con el espectro de inductores de genes de nodulación que secretan, considerándose *Phaseolus vulgaris* como una de las leguminosas que libera mayor cantidad y variedad de flavonoides, exudados tanto por la raíz como por la semilla (Morón *et al.*, 2006, citado por Lloret y Martínez, 2005). Se ha comprobado que determinadas cepas de *Rhizobium etli* y *R. tropici*, aisladas de *P.*

vulgaris, son capaces de nodular, respectivamente, 17 y 18 géneros de leguminosas (Hernández-Lucas *et al.*, 1995, citado por Valverde-Portal, 2003).

1.4.4.3. Especificidad hospedero - rizobio

Algunas leguminosas son infectadas por diferentes géneros de rizobios y otras especies vegetales son altamente restrictivas y aceptan pocas cepas de estos simbioses. Muchas bacterias pueden iniciar la formación del nódulo, sin embargo, sólo algunas combinaciones dan lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La especificidad entre el rizobio y la leguminosa minimiza la probabilidad de infección por agentes patógenos y la formación de asociaciones infectivas que van en agravio de ambos simbioses (López, 2002).

Cada leguminosa se encuentra asociada a una especie distinta de rizobio. Así, por ejemplo, la bacteria que forma nódulos en la soya, no puede infectar la alfalfa y viceversa. En 1974, se descubrió que el elemento del mecanismo de reconocimiento responsable de esta especificidad es una proteína que se encuentra en la superficie de los pelos radiculares de la planta huésped y que se enlaza con un polisacárido de la superficie del rizobio específico, actuando como un puente entre la bacteria y la planta. Esta unión constituye la zona inicial de infección (Bohlool & Schmidt, 1973, Cardoso, 1985, citados por González-Vargas, 2001). La composición de los exudados radiculares y la estructura de los factores Nod confieren especificidad al hospedero hacia la interacción simbiótica (Perret *et al.*, 2000).

Se ha visto que los microsimbioses de las tribus *Cicereae*, *Vicieae* y *Trifolieae* secretan factores Nod poco modificados, lo cual parece estar relacionado con un estrecho rango hospedador, que podría ser una especialización desarrollada por ciertas plantas que se hallan presentes en un nicho ecológico restringido (Perret *et al.*, 2000). Leguminosas como la soya, trébol y alfalfa son extremadamente exigentes o específicas respecto a su rizobio (Freire, 1996). La coevolución de los rizobios y las leguminosas ha llevado a la especialización de los factores Nod que han generado una amplia gama de

decoraciones para adecuarse a su hospedero en algunos casos con alta especificidad como el caso de *Azorhizobium caulinodans* que sólo nodula a *Sesbania rostrata*, y en el extremo opuesto se encuentra la cepa con la mayor promiscuidad reportada, *Sinorhizobium* sp. NGR234 que abarca un amplio rango de hospederos, nodula a 232 (51%) de 452 leguminosas probadas (Dreyfus *et al.*, 1988, Pueppke *et al.*, 1999, citados por Lloret y Martínez, 2005).

1.4.5. Bacterias fijadoras de nitrógeno rizobios

1.4.5.1. Morfología

Las cepas de rizobios pueden describirse de acuerdo a su crecimiento tanto en medio líquido como en medio sólido. El tamaño, forma, color, textura de las colonias y la habilidad de alterar el pH del medio son características generalmente estables y útiles para definir cepas o aislamientos (Cunachi, 2006).

Los rizobios son bacilos aeróbicos móviles Gram negativos, con forma de bastón, generalmente de 0.5-0.9 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo, carecen totalmente de formas especiales de resistencia, como esporas o quistes, y pueden tener un flagelo polar único o de dos a seis flagelos peritricos, con presencia de gránulos de ácido poli-beta-hidroxibutírico (PHBA) y, en algunos casos, gránulos metacromáticos de polifosfatos (Stainer *et al.*, 1996). Al principio se mueven por medio de estos flagelos peritricos, pero más tarde pierden la motilidad, se hipertrofian y se convierten en células asociadas e irregulares denominadas bacteroides, forma infectante que produce nodulación y carece de flagelos (Somasegaran & Hoben, 1985; Sylvester, 1984, citado por González-Vargas, 2001).

En los medios de cultivo, las colonias bacterianas cambian con el tiempo de almacenamiento, las condiciones de incubación y edad del cultivo. Se desarrollan mejor a temperaturas entre 25° y 30°C, con una buena aireación y un pH que oscila entre 6.5 y 7.5 (Somasegaran & Hoben, 1985). Pueden utilizar distintos carbohidratos como fuente

de carbono; en los medios de cultivo que contienen carbohidratos, el crecimiento se caracteriza por la producción de gran cantidad de exopolisacáridos (Jordan, 1984, citado por Valverde-Portal, 2003).

Las especies de *Azorhizobium* miden 0.5-0.6 μm de ancho y 1.5-2.5 μm de largo, se mueven en medio sólido gracias a flagelos peritricales y en medio líquido con un flagelo lateral. Las colonias son circulares, translúcidas, gomosas y tienen un color cremoso. Las colonias miden más de 2 mm de diámetro después de dos días de incubación. Crece tan rápido como *Rhizobium* pero produce alcalinidad como *Bradyrhizobium* en LMA. Crece mejor con ácidos orgánicos como fuente de carbono que usando carbohidratos (excepto la glucosa) y puede asimilar alcoholes como el 1,2-propanodiol y 2,3-butanodiol. Fija nitrógeno en condiciones microaeróbicas y crece bien con vitaminas en un medio libre de este elemento. En condiciones de microaerobiosis se requiere ácido nicotínico para la fijación de nitrógeno (Wang *et al.*, 2002; Bécquer, 2004).

Las especies de *Bradyrhizobium* miden 0.5-0.9 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo, se mueven con un flagelo polar o subpolar, la división celular ocurre de seis a siete horas y tardan cinco a diez días en aparecer colonias por lo que se les denomina de crecimiento lento, son productoras de álcali (metabolismo alcalino), y poseen dimorfismo cuando sus colonias son acuosas o gelatinosas, y raramente translúcidas, mientras que si son secas, son opacas; además sus colonias son convexas y con tendencia a tener textura granulosa. El tamaño de la colonia varía de 1 mm para rizobios de crecimiento lento (Wang *et al.*, 2002, CIAT, 1988).

Las especies de *Mesorhizobium* miden 0.4-0.9 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo, algunas tienen flagelación polar o subpolar mientras que otros presentan flagelos peritricos. Son generalmente pleomórficas en condiciones adversas de crecimiento, tales como alta concentración de sales. Las colonias son de crecimiento lento o moderado; son circulares, convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas; miden de 2-4 mm de diámetro después de cinco días de incubación a 28°C para algunas especies o menos de 1 mm después de siete días para otras. Son bacterias quimio-organotróficas que utilizan

una gran variedad de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de energía. No utilizan ni celulosa ni almidón. Todas las cepas producen ácido en LMA (Wang *et al.*, 2002).

Las especies de *Rhizobium* son bacilos que miden 0.5-1.0 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo, se mueven por flagelos peritricos, la división celular ocurre de dos a cuatro horas y las colonias se observan a los tres a cinco días de incubación, por lo que se les denomina de crecimiento rápido, sus colonias son redondas, elásticas, mucilaginosas, brillantes, semitranslúcidas u opacas, permanecen blancas. El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida (metabolismo ácido) y abundante cantidad de polisacárido extracelular; son quimio-organotróficas, pues utilizan una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía; algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Pronunciada turbidez se desarrolla de dos a tres días en caldo aireado o agitado. El tamaño de la colonia varía de 2-5 mm para rizobios de crecimiento rápido (Wang *et al.*, 2002; Kuykendall *et al.*, 2005).

Las especies de *Sinorhizobium* son bacilos que miden 0.5-1.0 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo, presentan un crecimiento rápido de uno a tres días, contienen gránulos de poli- β -hidroxibutiratos y producen ácido en el medio de cultivo LMA con contenido de sales minerales y carbohidratos (Wang *et al.*, 2002; Moreno, 2010).

1.4.5.2. Forma de vida

Los rizobios generalmente subsisten en el suelo como heterótrofos, también pueden comportarse como saprófitos al desarrollarse en ausencia de la planta hospedante, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio, sin embargo, su existencia libre continuada en los suelos, depende de la presencia de una raíz “hospedante” que estimule su proliferación (Coyne, 2000; Spaink, 2000). Al establecer una asociación simbiótica y formar nódulos con las raíces de las leguminosas, tiene lugar la reducción del nitrógeno atmosférico en amonio, el cual es transportado a la

planta y convertido en biomoléculas esenciales; o bien pueden comportarse como endófitos en raíces de diferentes especies vegetales, donde ejercen efectos promotores del crecimiento (Wang *et al.*, 2002).

En su estado libre en el suelo, estas bacterias se encuentran rodeadas por una cápsula compuesta por exopolisacáridos, que evita su desecación. Dicha cápsula permite que la bacteria se adhiera a los pelos de las raíces durante una de las etapas de su ciclo de vida. Se mueven por medio de flagelos peritricos, y se encuentran en aquellos lugares donde existen leguminosas hospederas, aunque pueden sobrevivir por muchos años en ausencia de ellas (Freire, 1996).

Los rizobios no se encuentran sólo en la rizósfera o zona de raíces de las leguminosas, sino también como habitantes naturales del suelo, representando del 0.1 al 8% del total de las bacterias en el mismo y hasta un 0.14% de su biomasa (Sadowsky & Graham, 1998). Puede haber entre 10 y 10^6 rizobios por gramo de suelo dependiendo de la estación, historial de cultivos y prácticas de tratamiento agrícola (Freire, 1996). La mayor parte de los rizobios están en la capa de suelo de cero a una pulgada y sólo algunos están presente en la capa de una a cuatro pulgadas y en los horizontes más profundos (Spaink *et al.*, 1998; Arrese-Igor, *et al.*, 1999).

En el suelo además de sobrevivir, la bacteria necesita multiplicarse, competir con la microflora nativa, colonizar la rizósfera, poseer habilidad de formar nódulos y principalmente ser eficiente en la fijación de nitrógeno (Acuña, 1991, citado por González-Vargas, 2001). Según los rizobios se encuentren cercanos o aislados a la rizósfera van a existir diferencias en la forma de reproducirse. Las raíces de las leguminosas secretan sustancias que estimulan la reproducción de los rizobios. Además no solo las leguminosas son capaces de secretar estas sustancias estimulantes, otras plantas también pueden hacerlo, pero en menor intensidad, constituyendo un factor que determina la sobrevivencia del rizobio en ausencia del huésped (Freire, 1996).

Se encuentran también con más abundancia en terrenos cultivados que en terrenos vírgenes, quizás, como consecuencia de la aireación y aumento de la actividad microbiana (Cubero y Moreno, 1983, citados por Chasi-Caisaguano y Muso-Defaz, 2009). Viven mejor en suelos cercanos a la neutralidad, siendo muy variable su resistencia a la acidez o alcalinidad según la especie de rizobio (Llerena, 2004, citado por Chasi-Caisaguano y Muso-Defaz, 2009).

1.4.5.3. Taxonomía

En la actualidad, para clasificar una cepa aislada a partir de nódulos de leguminosas deben estudiarse una serie de caracteres fenotípicos, genotípicos y simbióticos, que permitan determinar su relación con los taxones establecidos (Graham *et al.*, 1991, Amarger, 2001, citados por Díaz, 2010).

La caracterización fenotípica de los rizobios debe incluir la descripción morfológica, fisiológica y bioquímica, de las células y colonias. Los datos se evalúan por un análisis de agrupamiento (taxonomía numérica). Sin embargo, este tipo de clasificación está poco desarrollada en el caso de los rizobios puesto que no se han estudiado este tipo de características de manera uniforme en todas las cepas por lo que su utilidad está prácticamente limitada, por el momento, a la descripción de nuevas especies (Díaz, 2010).

Por el contrario, la clasificación filogenética constituye actualmente la principal herramienta para la taxonomía de los rizobios. Las secuencias de los genes que codifican para el ARN ribosómico y, especialmente, las del gen ribosómico 16S, han sido ampliamente aceptadas para la descripción de nuevas especies o taxones más elevados como géneros, familias y órdenes, por su constante funcionalidad y su composición altamente conservada en todos los dominios (Kuykendall *et al.*, 2005). Se considera que las cepas cuyas secuencias del gen 16S son similares en un 97% o más, pertenecen a la misma especie. Sin embargo, cuando las secuencias 16S son muy parecidas, no se distingue las especies cercanamente relacionadas, lo que ocurre debido a que este gen

está altamente conservado entre todos los organismos vivos; razón por la cual otros métodos, tales como la hibridación DNA-DNA han sido incluidos para definir especies dentro de cada género en la taxonomía de los rizobios (Perret *et al.*, 2000).

Algunos autores consideran rizobios a todas aquellas bacterias capaces de nodular, otros distinguen entre los verdaderos rizobios (anexo A), pertenecientes a la clase α -Proteobacteria, orden Rhizobiales e incluidos en la actualidad en cinco géneros: *Azorhizobium* (anexo A1), *Bradyrhizobium* (anexo A2), *Mesorhizobium* (anexo A3), *Rhizobium* (anexos A4, A5) y *Sinorhizobium* (anexo A6); y las bacterias no-rizobios capaces de nodular (anexo B), constituidas por cepas de algunos géneros pertenecientes a la clase α -Proteobacteria como *Shinella*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* (Díaz, 2010) y de otros géneros pertenecientes a la clase β -Proteobacteria como *Cupriavidus*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* (Moulin *et al.*, 2001).

Debido a que por un lado las especies de *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Allorhizobium* se entremezclan, y por otro lado no se distinguen por características fenotípicas, se ha propuesto combinar los tres géneros en uno solo, lo cual ha sido causa de controversia (Young *et al.*, 2001). El género *Rhizobium* junto con el género *Sinorhizobium* que ha pasado a denominarse *Ensifer* (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008, citado por Díaz, 2010) y con el nuevo género *Shinella* (An *et al.*, 2006, citados por Díaz, 2010) se incluyen en la familia Rhizobiaceae (todavía en revisión). El género *Mesorhizobium* junto con el género *Phyllobacterium* se ha incluido en una nueva familia denominada Phyllobacteriaceae (Mergaert & Swings, 2005, citados por Díaz, 2010). El género *Azorhizobium* que forma nódulos en tallos de *Sesbania* junto con el género *Devosia* se incluye en la familia Hyphomicrobiaceae. Finalmente, el género *Bradyrhizobium* y el género *Blastobacter* se incluyen en la familia Bradyrhizobiaceae (Kuykendall *et al.*, 2005).

La taxonomía de las bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas se encuentra en un estado de actualización y transición continuamente. Los estudios filogenéticos moleculares han establecido que los rizobios son un grupo polifilético, que significa que no existiría una rama en el árbol evolutivo que los agrupe exclusivamente (Young *et al.*, 2001).

Azorhizobium.- Hay una sola especie descrita en este género, *A. caulinodans*. La cepa tipo de esta especie es ORS 571. La habilidad de nodular los tallos de *Sesbania* y de fijar nitrógeno tanto en vida libre como en condiciones simbióticas son características únicas de esta especie. También puede formar nódulos en la raíz de la planta huésped. Esta bacteria invade las raíces de *Sesbania* entrando por grietas de las raíces laterales, fisuras epidérmicas normales que se forman alrededor de raíces laterales emergentes. Esta ruta de invasión es diferente a las de las otras bacterias que entran a las raíces a través de procesos de infección altamente especializados que involucra la presencia de hilos de infección. La especie *A. caulinodans* tiene muchas características que la diferencian de otros grupos rizobiales. En el árbol filogenético de los rizobios forma una rama distantemente relacionada con los otros rizobios. No se conocen plásmidos simbióticos para este género y se estima que los genes simbióticos están localizados en el cromosoma (Wang *et al.*, 2002).

Bradyrhizobium.- La especie tipo es *B. japonicum*, la cual tiene una amplia gama de plantas huéspedes. *B. elkanii* se distingue de *B. japonicum* por diferencias en sus secuencias de ADN, en patrones de enzimas metabólicas y de resistencia a antibióticos. Las dos especies tienen una relación filogenética a *Blastobacter denitrificans*. Las cepas de *B. liaoningense* se distinguen principalmente por su crecimiento extra lento (tiempo de generación entre 16-39 horas) de *B. japonicum* y *B. elkanii*. Actualmente hay muchas cepas que pertenecen claramente al género pero no nodulan soja. De las especies identificadas, ninguna tiene plásmido simbiótico y los genes simbióticos están localizados en el cromosoma. Se ha reportado que existe sólo un operón del gen ribosomal en este género, el cual se ubica como el linaje más antiguo que ha conservado

la capacidad de fotosintetizar y fijar nitrógeno en condiciones de vida libre y en simbiosis (Wang *et al.*, 2002).

Mesorhizobium.- La especie tipo es *M. loti*, y fue transferida del género *Rhizobium*. *M. amorphae* y *M. huakuii* tienen plásmidos simbióticos y el resto tiene los genes simbióticos en sus cromosomas. En *M. loti*, se ha descubierto un fragmento de ADN transferible entre bacterias que contiene genes simbióticos al que se ha dado el nombre de isla simbiótica. Entre estas especies es común la existencia de dos operones ribosomales. También hay bacterias no simbióticas cercanamente relacionadas con *Mesorhizobium* como *Phyllobacterium* (Wang *et al.*, 2002).

Rhizobium.- La especie tipo es *R. leguminosarum*. Las especies forman un grupo polifilético en el árbol filogenético. *R. giardinii* es una rama distantemente relacionada con las otras especies. *R. galegae* y *R. huautlense* tienen una relación más cercana con las especies de *Agrobacterium* que con las otras especies de *Rhizobium*. Tienen tres copias de los genes ribosomales y los plásmidos simbióticos son comunes en estas especies. También se han aislado cepas de *R. etli* que carecen de genes simbióticos, son importantes en México, en particular, y en América Latina, en general, ya que predomina en los nódulos del fréjol común (Wang *et al.*, 2002).

Sinorhizobium.- La especie tipo es *S. meliloti*. Se separó este género de *Rhizobium* debido a las diferencias en las secuencias de genes 16S rRNA, sin embargo no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan a ambos. Se han identificado tres copias del gen ribosomal en *S. meliloti*. Plásmidos grandes e incluso megaplásmidos son comunes en estas especies. Se ha secuenciado el plásmido simbiótico de una cepa de *Sinorhizobium* con un amplio espectro de huéspedes, NGR234. Además, recientemente se han descrito dos especies no simbióticas, *S. morelense* y *S. adhaerens* (Wang *et al.*, 2002).

Recientemente se han encontrado otras bacterias que forman nódulos fijadores de nitrógeno con leguminosas. La transferencia de genes simbióticos a bacterias no

simbióticas de la rizósfera, puede dar origen a nuevas cepas capaces de nodular (Ochman & Morán, 2001), lo cual podría explicar la gran diversidad en el fondo genético de las especies capaces de nodular leguminosas y el hecho de que bacterias próximas a aquellas que nodulan no tengan esta capacidad (Brom *et al.*, 2000). Se ha descrito la existencia de cepas formadoras de nódulos dentro de los géneros *Blastobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum*, de la clase α -Proteobacteria, además de los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* pertenecientes a la clase β -Proteobacteria (Díaz, 2010).

1.4.6. Nódulos

1.4.6.1. Tipos de nódulos

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas, nódulos determinados e indeterminados, los cuales se diferencian por su morfología, estructura, desarrollo del cordón de infección (Rae *et al.*, 1992, citados por Valverde-Portal, 2003), presencia o no de meristemo apical y por el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent *et al.*, 1989, citados por Valverde-Portal 2003).

Los nódulos determinados se caracterizan por su forma esférica (globosos), por desarrollarse a partir de un meristemo apical hemisférico no persistente determinado, por tener un sistema vascular cerrado que se dicotomiza y es continuo por el nódulo, por producir ureidos como productos mayoritarios de traslado a la planta del nitrógeno fijado, y por bacteroides en grupos de dos o más que se hallan entremezclados con células intersticiales no infectadas con un canal de infección estrecho que apenas interviene en la distribución de las bacterias. La división celular en los nódulos determinados termina en el inicio de su desarrollo por lo que su forma final resulta del agrandamiento y no de la división de las células. Entre las plantas que los forman se encuentran las leguminosas de zonas subtropicales y tropicales como la soya, fréjol y maní (Valverde-Portal, 2003).

Los nódulos indeterminados se caracterizan por su forma alargada y cilíndrica (pleomórficos), por desarrollarse mediante un crecimiento distal (Haukka, 1997) desde un meristemo apical persistente indeterminado, por tener un sistema vascular abierto que conecta el sistema vascular de la raíz con el meristemo nodular, por producir asparagina y glutamina como productos mayoritarios de traslado a la planta del nitrógeno fijado, y por bacteroides de gran tamaño individuales con un canal ancho de infección. Todos los estadios del desarrollo de los nódulos indeterminados están representados en uno mismo, desde el meristema distal al punto proximal de unión a la raíz, ya que todas las etapas ocurren simultáneamente. Entre las plantas que los forman están las leguminosas de zonas templadas como son el trébol, alfalfa, haba y arveja (Hirsh, 2001; Valverde-Portal, 2003).

1.4.6.2. Morfología de nódulos

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en su forma, pueden ser esféricos, alargados o ramificados, y en su tamaño, pueden ser de 0.5 a 5.0 mm de diámetro; además se destacan fácilmente de las raíces. El color interno de un nódulo vivo y activo varía de rosado, o rojo claro a rojo oscuro, su consistencia es firme, y al abrirlo, sus tejidos liberan una sabia de color rojo. Hay que tomar en cuenta que no siempre los nódulos con esta coloración son activos, pero si tienen mayor probabilidad de serlo; los nódulos vivos que tienen una coloración interna blanca o verde son inactivos; mientras que los nódulos muertos tienen una coloración interna oscura o negra, y consistencia esponjosa (CIAT, 1988).

1.5. Sistema de hipótesis

H1: Existen diferencias morfológicas y/o bioquímicas dentro y entre las cepas de rizobios aisladas de los nódulos de plantas de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia de suelos de la provincia de Imbabura.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones

La institución auspiciante y participante de esta investigación es el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC).

La institución que financia esta investigación es la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) como parte del Proyecto PIC 12 INIAP 009 “Manejo adecuado de abonos verdes y microorganismos fijadores de nitrógeno dentro de sistemas de producción agroecológicos”, código: 2153902800021703.

2.1.2. Responsable del proyecto

María José Carpio Espinosa.

2.1.3. Colaboradores científicos

Soraya Alvarado, Ph.D	Responsable del DMSA del INIAP.
Ing. Agr. Betty Paucar	Responsable del Laboratorio de Microbiología del DMSA.
Alma Koch, MSc.	Directora de tesis.
Ing. Agr. Marco Taipe	Codirector de tesis.

2.2. Zona de estudio

2.2.1. Campo

El muestreo de los rizobios se realizó en la localidad de Peribuela con dirección: parroquia Imantag, cantón Cotacachi en la provincia de Imbabura, Ecuador, y cuyas coordenadas son: latitud $00^{\circ}22'00''$ (Norte), longitud $78^{\circ}15'00''$ (Oeste) y altitud 2 460 m.s.n.m; y en la localidad de San Juan de Ilumán con dirección: parroquia Ilumán, cantón Otavalo en la provincia de Imbabura, Ecuador, y cuyas coordenadas son: latitud $00^{\circ}16'00''$ (Norte), longitud $78^{\circ}14'00''$ (Este) y altitud 2 600 m.s.n.m; y sus alrededores.

2.2.2. Laboratorio

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), con dirección: parroquia Cutuglagua, cantón Mejía en la provincia de Pichincha, Ecuador, y cuyas coordenadas son: latitud $00^{\circ}22'00''$ (Sur), longitud $79^{\circ}32'00''$ (Oeste) y altitud 3 058 m.s.n.m.

2.3. Período de investigación

La presente investigación se desarrolló en un período de doce meses, desde Septiembre del 2012 a Agosto del 2013.

2.4. Estadística

2.4.1. Caracterización morfológica

Para la identificación microbiológica de las cepas de rizobios de cada cultivo de leguminosa se aplicaron ocho características fenotípicas diferentes con el objeto de dar a conocer la morfología de las cepas bacterianas. Se utilizó un análisis multivariado de conglomerados para determinar el grado de relación de los aislamientos de rizobios. Se elaboró matrices de datos con las ocho variables en el programa NTEDIT del software bioestadístico NTSYS-pc (“Numerical Taxonomy System for Personal Computer”) versión 2.02 (Applied Biostatistics Inc, 1998; Rohlf, 1998). El primer parámetro de cada característica morfológica se consideró como valor uno, el segundo como dos, el tercero como tres, y el cuarto (en caso de haberlo) como cuatro. El programa permitió la obtención de una matriz de similitud mediante el coeficiente de apareamiento simple, SM (Kumar *et al.*, 2008). A partir de la matriz de similitud se construyó una de agrupamiento con el programa SAHN de NTSYS-pc. Se realizó el análisis de agrupamiento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) mediante la opción SAHN CLUSTERING del paquete NTSYS-pc (Sneath & Sokal, 1973), que es el más usado y el que produce menor distorsión al compararse con la matriz original de similitud (Rohlf, 1998; Henríquez, 2003). Finalmente, mediante la opción TREE DISPLAY, se visualizaron los agrupamientos o relaciones entre cepas, lo cual permitió generar dendogramas mostrando la relación fenotípica o parentesco entre las diferentes cepas aisladas de cada cultivo de leguminosa (Henríquez, 2003).

2.4.2. Caracterización bioquímica

Para la identificación bioquímica de las cepas de rizobios de cada cultivo de leguminosa se aplicaron treinta y cuatro pruebas bioquímicas diferentes con el objeto de dar a conocer el metabolismo de las cepas bacterianas. Se utilizó un análisis multivariado de conglomerados para determinar el grado de relación de los aislamientos de rizobios. Se elaboró matrices de datos binarios con las treinta y cuatro variables en el

programa NTEDIT del software bioestadístico NTSYS-pc (“Numerical Taxonomy System for Personal Computer”) versión 2.02 (Applied Biostatistics Inc, 1998; Rohlf, 1998). El crecimiento positivo de las cepas en cada prueba se consideró como valor uno y la ausencia de crecimiento como cero. El programa permitió la obtención de una matriz de similitud mediante el coeficiente de apareamiento simple, SM (Kumar *et al.*, 2008). A partir de la matriz de similitud se construyó una de agrupamiento con el programa SAHN de NTSYS-pc. Se realizó el análisis de agrupamiento UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) mediante la opción SAHN CLUSTERING del paquete NTSYS-pc (Sneath & Sokal, 1973). Finalmente, mediante la opción TREE DISPLAY, se visualizaron los agrupamientos o relaciones entre cepas, lo cual permitió generar dendogramas mostrando la relación fenotípica o parentesco entre las diferentes cepas aisladas de cada cultivo de leguminosa (Henríquez, 2003).

2.5. Procedimiento

2.5.1. Áreas de muestreo

El muestreo de los rizobios se realizó en la provincia de Imbabura, para lo cual se utilizó un muestreo por caso fortuito, el mismo que dependió de la existencia de los cultivos de las cinco leguminosas (arveja, chocho, fréjol, haba y vicia) en las zonas antes mencionadas y de la disposición del agricultor en permitir el muestreo.

2.5.2. Recolección de nódulos

Para la toma de nódulos, se seleccionaron en el campo las plantas en estado de floración con las mejores características (robustas, verdes y sanas). A continuación, se limpió un área de 15 cm alrededor de la planta y con la ayuda de una pala se excavó hasta exponer las raíces de las leguminosas (CIAT, 1988).

Se determinó la ubicación de los nódulos (raíz primaria, secundaria o terciaria). Para obtener una buena muestra, se seleccionaron de diez a veinte nódulos vivos e intactos de la misma planta y se los recogió con 1 cm de raíz hacia los lados, se colocaron en tubos con sílica-gel y una capa de algodón, se taparon e identificaron (figura 2.1) y finalmente se almacenaron en un termo a 4°C para su transporte al laboratorio (CIAT, 1988). La identificación se realizó con la letra R de rizobio, las letras iniciales de los cultivos y de los lugares de donde provienen, con una numeración progresiva.



Figura 2.1. Procedimiento para la recolección de nódulos: A. Selección de la mejor planta en floración B. Excavación de raíces y verificación del color interno del nódulo C. Nódulos guardados en tubos con sílica-gel e identificados.

Paralelamente a la recolección, se recopiló información sobre la nodulación (anexo C), el color interno del nódulo, el tamaño y la abundancia de los nódulos (cuadros 2.1, 2.2, 2.3).

Cuadro 2.1. Escala de nodulación aplicada a las leguminosas

Escala	Descripción
0	Ningún nódulo.
1	Pocos nódulos de sección no rosa y de pequeño tamaño.
2	Pocos nódulos de sección no rosa y de gran tamaño.
3	Algunos nódulos de sección no rosa y de pequeño tamaño.
4	Algunos nódulos de sección no rosa y de gran tamaño.
5	Muchos nódulos de sección no rosa y de pequeño tamaño.
6	Muchos nódulos de sección no rosa y de gran tamaño.
7	Pocos nódulos de sección rosa y de pequeño tamaño.
8	Pocos nódulos de sección rosa y de gran tamaño.
9	Algunos nódulos de sección rosa y de pequeño tamaño.
10	Algunos nódulos de sección rosa y de gran tamaño.
11	Muchos nódulos de sección rosa y de pequeño tamaño.
12	Muchos nódulos de sección rosa y de gran tamaño.

Fuente: modificado por mi persona de Guamán y Yaguana (2007).

Cuadro 2.2. Escala para calificar el diámetro de nódulos por planta

Diámetro de nódulos	Calificación
>5 mm	Grande
<5 mm	Pequeño

Fuente: CIAT (1988).

Cuadro 2.3. Escala para calificar la abundancia de nódulos por planta

Número de nódulos	Calificación
>50	Abundante (muchos)
10-50	Mediana (algunos)
1-10	Escaso (pocos)
0	No hay

Fuente: CIAT (1988).

2.5.3. Hidratación y desinfección de nódulos

Se colocaron los nódulos en agua destilada por 30 min para hidratarlos y lavarlos, luego se los sumergió en etanol (95%) durante 1 min para esterilizarlos superficialmente, después se los transfirió a una solución de hipoclorito de sodio (3%) durante 3 min, y finalmente se lavaron los nódulos por cinco veces en agua destilada estéril (figura 2.2). Esta labor se la realizó en la cámara de flujo laminar para garantizar las condiciones asépticas (CIAT, 1988).



Figura 2.2. Procedimiento de hidratación y desinfección de nódulos: A. Hidratación de nódulos en agua estéril B. Nódulos en etanol al 95% e hipoclorito de sodio al 3% C. Lavado de nódulos en agua estéril.

2.5.4. Aislamiento de rizobios recolectados en la provincia de Imbabura

Previo al aislamiento de los rizobios, se preparó medio LMA (anexo D1) con el indicador de contaminantes rojo congo (RC), anexo D2, a pH 6.8 y de coloración roja, se dispensó en cajas Petri para que se solidificara. En este medio, el crecimiento para el caso de rizobios presenta tendencia a no absorber el rojo congo y permanecer rosa. Este colorante tiene propiedades anti fúngicas evitando el crecimiento de hongos contaminantes sobre el medio de cultivo (CIAT, 1988).

Para aislar los rizobios, se dividió al nódulo con un bisturí estéril y con un extremo del palillo se recogió las bacterias del interior para sembrarlas por estriado simple en el

medio de cultivo (figura 2.3), luego se selló con parafilm la caja Petri y se la identificó (CIAT, 1988). Esta labor se la realizó en la cámara de flujo laminar para garantizar las condiciones asépticas. Se colocaron las cajas Petri invertidas (para evitar condensación) y se incubaron a 28°C hasta la obtención de colonias (CIAT, 1988). Luego se procedió a purificarlas tres veces por agotamiento y multiplicarlas a partir de una colonia pura (figura 2.3) para liofilizarlas y realizar las pruebas respectivas.

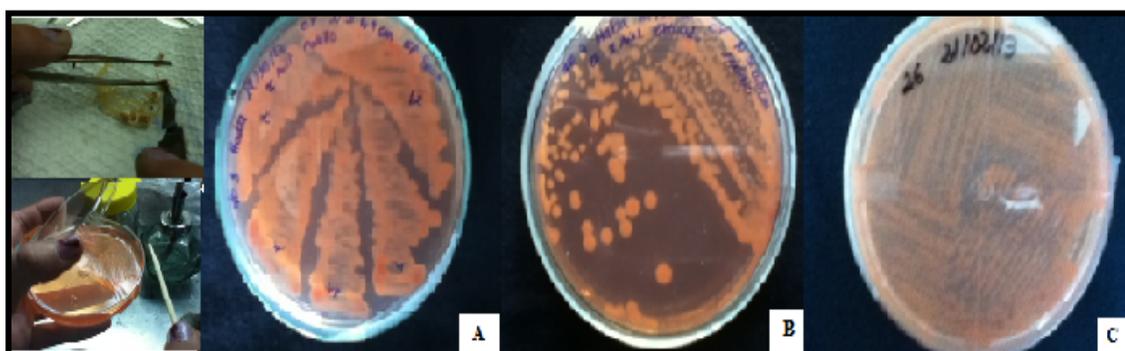


Figura 2.3. Procedimiento de aislamiento de rizobios: A. Aislamiento con palillos a partir de nódulos B. Purificación por agotamiento C. Multiplicación de una colonia pura.

2.5.5. Reactivación y purificación de cepas liofilizadas del banco de rizobiología del laboratorio de Microbiología del DMSA del INIAP

Las cepas en estado de liofilización entregadas para la caracterización consistieron en ocho ejemplares rizobianos aislados de suelos de Ecuador, y de suelos extranjeros (anexo E).

El método de reactivación se realizó colocando 1 mL de solución peptona estéril al 0.1% en cada tubo eppendorf conteniendo la cepa liofilizada y se lo agitó con ayuda de un vortex para homogenizar la suspensión. Se tomó 50 μ L de la suspensión y se colocó en la superficie del medio LMA+RC (anexos D1, D2) contenido en cajas Petri. Se extendió la suspensión con un triángulo de vidrio esterilizado y se incubó la caja a 28°C durante siete días (CIAT, 1988).

Se purificó el crecimiento bacteriano obtenido tomando una mínima porción de colonia con un asa de platino, y se sembró con la técnica de agotamiento (figura 2.4). Se incubó el cultivo a 28°C durante tres días (CIAT, 1988). Este proceso de purificación se repitió una vez más para cada aislado bacteriano.

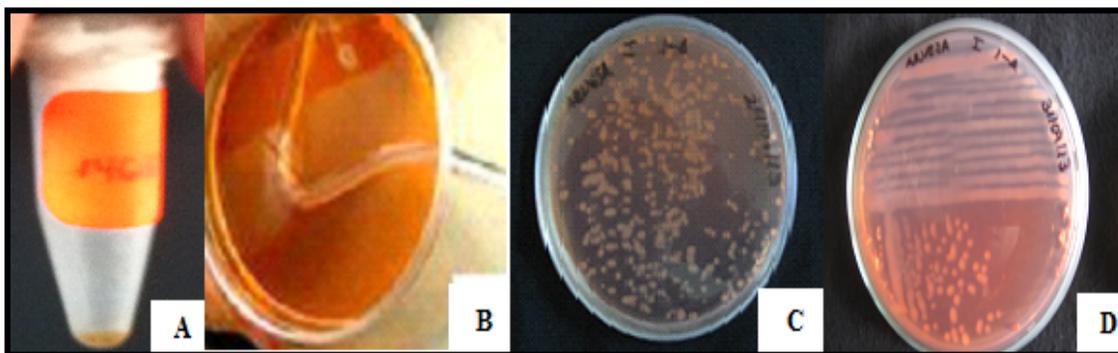


Figura 2.4. Reactivación y purificación de cepas liofilizadas: A. Cepa liofilizada B. Siembra de cepa mezclada con solución de peptona al 0.1% en medio LMA+RC con triángulo de vidrio estéril C. Crecimiento bacteriano D. Purificación por agotamiento.

2.5.6. Refrescamiento y purificación de cepas de rizobios del banco de rizobiología del PRONALEG del INIAP

Las cepas entregadas para la caracterización consistieron, igualmente, en ocho ejemplares rizobianos aislados de suelos de Ecuador, y de suelos extranjeros (anexo E).

Se preparó medio LMA+RC (anexos D1, D2) y se le añadió, una vez esterilizado, dos fungicidas, nistatina (0.05 g/L) y PCNB (0.1 g/L), por filtración. Se mezcló y se dispensó en cajas Petri. Luego se realizó el cultivo mediante estriado simple a partir de las bacterias (en estado de vejez) que se encontraban en cajas Petri con medio LMA. Se selló e identificó la caja y se incubó a 28°C durante siete días (CIAT, 1988). Se procedió a la purificación por agotamiento. Este proceso se repitió cinco veces más para cada aislado bacteriano, debido a la presencia de contaminación de hongos en las cajas Petri originales.

2.5.7. Pruebas de autenticación de rizobios

2.5.7.1. Cultivo en medio levadura manitol agar + azul de bromotimol

Se preparó medio LMA+ABT a pH 6.8 (anexos D1, D2), de coloración verde, y se dispensó en cajas Petri esterilizadas para que se solidificara. Luego se realizó el cultivo de las bacterias provenientes de colonias puras, se sellaron e identificaron las cajas y se incubó a 28° C durante siete días (CIAT, 1988).

Para el caso de rizobios de crecimiento rápido, el medio acidifica (amarillo), mientras que para rizobios de crecimiento lento, el medio alcaliniza (azul), según el CIAT (1988).

2.5.7.2. Cultivo en medio levadura manitol agar + púrpura de bromocresol

Se preparó el medio LMA+PBC a pH 5.5 (anexos D1, D2), de coloración habano, y se dispensó en cajas Petri esterilizadas para que se solidificara. Luego se realizó el cultivo de las bacterias provenientes de colonias puras, se sellaron e identificaron las cajas y se incubó a 28° C durante siete días (CIAT, 1988).

Para rizobios de crecimiento rápido, el medio acidifica tornándose amarillo, y para rizobios de crecimiento lento, el medio alcaliniza volviéndose púrpura (CIAT, 1988).

2.5.7.3. Cultivo en medio glucosa peptona agar + púrpura de bromocresol

Se preparó medio GPA+PBC a pH 6.8 (anexos D3, D4), de coloración púrpura, y se dispensó en cajas Petri esterilizadas para que se solidificara. Luego se realizó el cultivo de las bacterias provenientes de colonias puras, se sellaron e identificaron las cajas y se incubó a 28° C durante siete días (CIAT, 1988).

En este medio los rizobios no se desarrollan bien, por tanto, un crecimiento notorio acompañado de un cambio de pH, probablemente es efecto de la presencia de un contaminante, descartándose que sean rizobios. Caso contrario, si los resultados son de crecimiento escaso o nulo, y no alteran el color del medio, se dice que se trata de rizobios (CIAT, 1988).

2.5.7.4. Cultivo en medio levadura lactosa agar + reactivo de Benedict

Se preparó medio LLA+RB a pH 6.8 (anexo D5), de coloración blanco, y se dispuso en cajas Petri esterilizadas para que se solidificara. Se realizó el cultivo de las bacterias provenientes de colonias puras, se sellaron e identificaron las cajas y se incubó a 28°C durante siete días. Luego se cubrieron las cajas con 15 mL de reactivo de Benedict (anexo D6) por diez minutos para observar cambio o no de coloración (CIAT, 1988).

Este medio permite distinguir entre colonias de rizobios y *Agrobacterium*, pues las dos poseen características similares y es fácil confundirlas. Para ello, se añade el reactivo de Benedict y si el color resultante es azul, se puede presumir que el cultivo es de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*; si el color es amarillo significa que el cultivo es *Agrobacterium* que degrada la lactosa del medio e impide la fijación del reactivo de Benedict, dando una coloración diferente (CIAT, 1988).

2.5.7.5. Tinción de Gram

Se colocó en un portaobjetos una gota de agua destilada, con una muestra del cultivo puro, se dispersó y se dejó reposar hasta que se seque el agua, luego se flameó en el mechero para fijarlo y se agregó los siguientes reactivos: cristal violeta por un minuto y se lavó con agua destilada estéril, lugol por dos minutos y se enjuagó retirando el exceso de colorante, alcohol yodado por cinco minutos y se lavó, finalmente se aplicó safranina por cinco minutos y se lavó. Se colocó una gota de aceite de inmersión y se examinó directamente al microscopio en 100x (CIAT, 1988).

Los microorganismos Gram positivos retienen la coloración cristal violeta después de lavarse con alcohol y presentan coloración violeta oscuro después de la tinción; los rizobios son Gram negativos, es decir, pierden la primera coloración después de lavarse con alcohol, pero retienen la coloración roja de la safranina (CIAT, 1988).

2.5.8. Conservación de las bacterias

Se preparó una solución de peptona al 10% y otra de sacarosa al 20%. Estas soluciones se esterilizaron por separado durante 15 min a 121°C. Se mezclaron y se dispensó en cajas Petri conteniendo la bacteria, se frotó la superficie del medio con un triángulo de vidrio estéril, hasta formar una suspensión bacteriana homogénea. A continuación, se colocó alícuotas de 200 μ L de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf (1.5 mL de capacidad) previamente esterilizados y sellados con algodón estéril. Los tubos se llevaron a un liofilizador y permanecieron 24 h a -54°C (figura 2.5), luego de lo cual, se sellaron con parafilm y se almacenaron en refrigeración a 4°C (CIAT, 1988; Jerez, 2004).

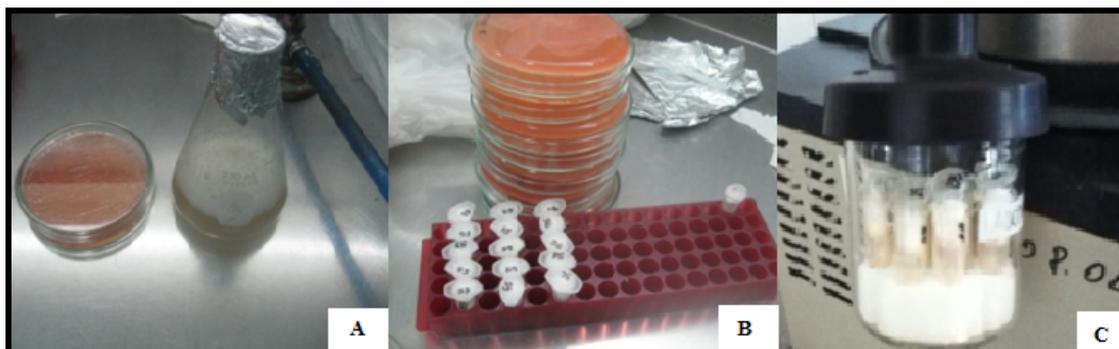


Figura 2.5. Procedimiento para liofilización de cepas: A. Mezcla peptona (10%) y sucrosa (20%) B. Tubos eppendorf con la solución de la cepa y la mezcla C.

Liofilización.

2.5.9. Caracterización morfológica

Luego de las pruebas de autenticación en las cuales se verificó si son o no rizobios, se procedió a la caracterización morfológica. Los aislamientos se sembraron en medio LMA+RC (anexos D1, D2). Las cajas se incubaron a 28°C hasta la aparición de las colonias y después de siete días se determinó la morfología de las colonias (Somasegaran & Hoben, 1994) según ocho características, cada una de ellas con sus particularidades (CIAT, 1988; Guamán y Yaguana, 2007; Marquina *et al.*, 2011) descritas a continuación:

2.5.9.1. Textura

Se determinó la textura de una colonia tocándola con un asa. Se tomaron en cuenta cuatro parámetros: elástica, cremosa, acuosa, gomosa.

2.5.9.2. Cantidad de goma

Se definió la gomosidad de una colonia tocándola con un asa. Cuatro parámetros fueron considerados: abundante, mediana, escasa, nula.

2.5.9.3. Apariencia

Tres parámetros fueron tomados en cuenta: opaca, brillante, translúcida.

2.5.9.4. Tamaño

Se incluyeron tres parámetros: pequeño (<2mm), mediano (2-5 mm), grande (>5 mm).

2.5.9.5. Elevación

Se consideraron cuatro parámetros: pulvinada, convexa, elevada, plana (figura 2.6).

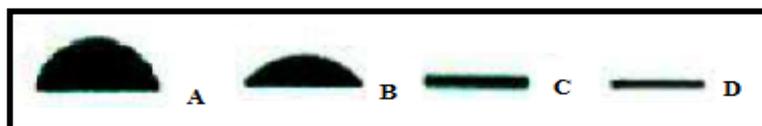


Figura 2.6. Criterios morfológicos para describir la elevación de las colonias: A. pulvinada B. convexa C. elevada D. plana (Prescott, 2004).

2.5.9.6. Margen

Se tomaron en cuenta tres parámetros: entero, ondulado, erosionado (figura 2.7).

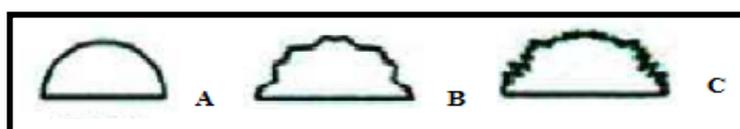


Figura 2.7. Criterios morfológicos para describir el margen de las colonias: A. entero B. ondulado C. erosionado (Prescott, 2004).

2.5.9.7. Forma

Tres parámetros fueron considerados: circular, fusiforme, irregular (figura 2.8).



Figura 2.8. Criterios morfológicos para describir la forma de las colonias: A. circular B. fusiforme C. irregular (Prescott, 2004).

2.5.9.8. Color

Se incluyeron tres parámetros: rosado intenso, rosado coral, rosado pálido (figura 2.9).



Figura 2.9. Escala del rosado para describir el color de las colonias: A. rosado intenso B. rosado coral C. rosado pálido (Gallego y Sanz, 2001).

2.5.10. Tiempo de crecimiento

Los aislamientos se sembraron en medio LMA+RC (anexos D1, D2). Las cajas se incubaron a 28°C y las lecturas se ejecutaron a los tres, cinco y siete días. Se determinó dos rangos de crecimiento: tres días para rizobios de crecimiento rápido y siete días para rizobios de crecimiento lento (CIAT, 1988; Somasegaran & Hoben, 1994).

2.5.11. Crecimiento

Previo a la caracterización bioquímica, se procedió a la multiplicación de las distintas cepas de bacterias en medio líquido levadura manitol (LM). Se tomó una colonia aislada y se transfirió al medio LM, se incubó a 28°C en agitación continua por aproximadamente cuatro días, hasta que el caldo alcanzó una concentración de 10^9 cel/mL, que fue determinado por la metodología de McFarland y por espectrofotometría (Somasegaran & Hoben, 1994; Bernal & Graham, 2001).

En la escala de McFarland se observó visualmente la densidad celular, estableciendo una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. De los diez estándares de la escala, la McFarland 4 indicó que la suspensión estaba en 10^9 cel/mL (figura 2.10).



Figura 2.10. Crecimiento de rizobios en medio líquido LM: A. Escala de McFarland B. Suspensiones bacterianas C. Relación entre McF [4] y suspensión bacteriana.

En el espectrofotómetro se midió la densidad celular, para lo cual con una pipeta estéril se tomó 10 mL de cada propagación bacteriana y se vertió en tubos de tapa rosca utilizados para el espectrofotómetro. La muestra se sometió a 540 nm y se obtuvo un valor de uno, el cual indicó que contenía aproximadamente 10^9 cel/mL (Bashan, 1997).

Una vez determinada la densidad celular de 10^9 cel/mL, se llevó la muestra a una concentración final de 10^5 cel/mL por dilución en agua estéril. A partir de las suspensiones bacterianas (10^5 cel/mL), se tomó una alícuota de 50 μ L y se depositó en las cajas bi-Petri conteniendo el medio de cultivo con la prueba bioquímica. Con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril, se dispensó la suspensión bacteriana a través de toda la superficie del medio (Somasegaran & Hoben, 1994; Bernal & Graham, 2001).

2.5.12. Caracterización bioquímica

2.5.12.1. Crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno

Se utilizaron trece fuentes de carbono: sorbosa, citrato, tartrato, D-glucorónico, eritritol, dulcitol, lactato, glucosa, galactosa, xylosa, fructosa, maltosa y sacarosa, cada una usada en una concentración final de 1 g/L en un medio basal (anexo D7); y tres fuentes de nitrógeno: glicina, triptófano y tirosina, cada una usada en una concentración final de 0.5 g/L en un medio basal (anexo D8). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

2.5.12.2. Resistencia a antibióticos

Se probó la resistencia a cuatro antibióticos: estreptomina, kanamicina, ácido nalidíxico y cloranfenicol contenidos en medio TLA (anexos D9, D10). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

2.5.12.3. Tolerancia a metales pesados

Se probó la tolerancia a cuatro metales pesados: aluminio, plomo, cobre y zinc, contenidos en medio TLA (anexos D9, D10). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

Las fuentes de carbono y nitrógeno, así como los antibióticos y metales pesados se esterilizaron por filtración utilizando filtros Acrodisc de 0.2 µm, para ser añadidos a los distintos medios estériles a 55°C (Bernal & Graham, 2001).

2.5.12.4. Tolerancia a pH ácido y alcalino

Se probó la resistencia a tres niveles de pH: 4.5, 5 y 8.5 en medio TLA (anexo D9). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

2.5.12.5. Tolerancia a cloruro de sodio

Se probó la tolerancia a tres concentraciones de NaCl: 0.5%; 1% y 2% en medio TLA (anexo D9). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

2.5.12.6. Tolerancia a urea

Se probó la resistencia a cuatro concentraciones: 20, 50, 100 y 500 µg/mL de nitrógeno (a partir de urea) en una dilución de 1 g/L, contenidos en medio LMA (anexo D1). Las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos de rizobios (Bernal & Graham, 2001).

2.5.13. Identificación taxonómica

Se realizó matrices de datos que se sometieron a un análisis de conglomerados, a partir de estas matrices se construyó un árbol filogenético en el programa estadístico NTSYS-pc, y mediante el método de agrupamiento UPGMA se generaron dendogramas que mostraron el parentesco y la relación fenotípica entre las cepas aisladas (Bernal & Graham, 2001).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Áreas de muestreo

El muestreo de los nódulos asociados a los cultivos de las plantas leguminosas de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, se realizó en veintiún localidades pertenecientes a cinco parroquias de tres cantones de la provincia de Imbabura (figura 3.1, tabla 3.1).

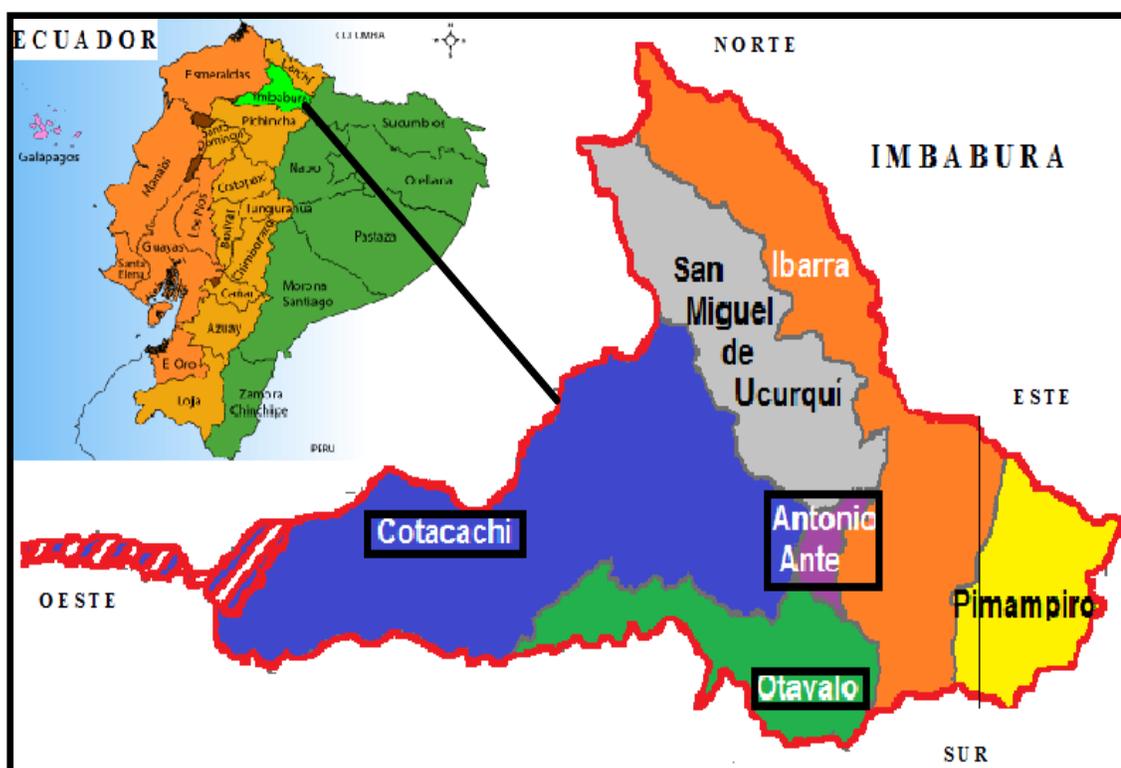


Figura 3.1. Mapa de la provincia de Imbabura y cantones donde se realizó la recolección de nódulos para el aislamiento de las cepas de rizobios (<http://www.zonu.com/America-del-Sur/Ecuador/Imbabura/Politicos.html>).

Tabla 3.1. Cantones, parroquias y localidades donde se recolectaron los nódulos asociados a plantas de arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) en suelos de la provincia de Imbabura, con sus códigos y número de muestras recolectadas por sitio.

Cantón	Parroquia	Localidad	Código	Nº de muestras por localidad	Nº de muestras por cantón	
Cotacachi	El Sagrario	Tunibamba	TU	1		
		Imantag	AG	2		
		Quitumba San Isidro	QSI	2		
		El Morlán	MO	4	50	
		Rabanal	RA	4		
		Quitumba Grande	QG	11		
		Peribuela	PE	26		
Antonio	San Roque	Chamanal	CHA	1		
Ante		Pucará	PU	2		
		El Cerotal	CE	3	18	
		Hatun Rumi	HR	3		
		Santa Rosa	SR	4		
		San Agustín	SA	5		
Otavalo	Miguel	Imbaquí	IM	2		
	Egas	Peguche	PEG	2		
		Cabezas	Quinchuquí	QUI	7	37
	Ilumán		Carabuela	CA	2	
			Rumilarca	RU	3	
			San Luis de Agualongo	SLA	5	
			San Juan de Ilumán	SJI	16	

3.2. Recolección de nódulos

Se realizaron cuatro recolecciones (tabla 3.2), dos en el mes de Octubre del 2012, una en el mes de Febrero del 2013 y una en el mes de Abril del 2013. Se recolectaron en total ciento cinco muestras entre las cinco leguminosas.

Tabla 3.2. Fecha de recolección y número de muestras colectadas de nódulos asociados a plantas de arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) en suelos de la provincia de Imbabura.

Recolección	Fecha de recolección	Número de muestras
1	09/10/2012	10
2	17/10/2012	14
3	23,24/02/2013	45
4	04/04/2013	32
TOTAL		105

Se observó que la nodulación de las raíces de fréjol fue mediana y abundante, y en algunos casos escasa, los nódulos presentaron tamaño pequeño (<5mm), con formas redondas, superficies lisas, y la mayoría ubicados principalmente en la raíz secundaria. La nodulación de las raíces de arveja, haba y vicia fue mediana y abundante en su mayoría, los nódulos presentaron tamaño pequeño (<5mm) y tamaño grande (>5mm), con formas alargadas e irregulares (pleomórficas), superficies lisas y rugosas, y ubicados tanto en la raíz secundaria como en la raíz primaria. La nodulación de las raíces de chocho fue escasa en su mayoría, y mediana en muy pocos casos, los nódulos presentaron gran tamaño (>5mm), de formas irregulares (pleomórficas), superficies rugosas, y ubicados principalmente en la raíz primaria.

3.3. Aislamiento de rizobios recolectados en la provincia de Imbabura

Se aislaron ciento cinco cepas de rizobios a partir de los nódulos recolectados, en el medio de cultivo LMA+RC, sin embargo, diecinueve muestras no fueron viables (dos de arveja, cuatro de chocho, cinco de fréjol, cuatro de haba y cuatro de vicia), debido a nódulos con rizobios inactivos y muertos, o problemas en el proceso de desinfección, razones por las cuales la colección de aislamientos viables de rizobios fue de ochenta y seis en total (tabla 3.3).

Tabla 3.3. Número de muestras viables de cepas de rizobios aisladas de nódulos asociados a plantas de arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) en suelos de la provincia de Imbabura.

Tipo de leguminosa	Número de muestras viables
Arveja	21
Chocho	11
Fréjol	21
Haba	17
Vicia	16
TOTAL	86

Se observó que el crecimiento de las cepas en el medio presentó tendencia a no absorber el rojo congo y permanecer rosa, con características morfológicas de rizobios. Los microorganismos contaminantes presentaron color rojo oscuro. Este es el caso de las cepas R-FR-PE-2b de fréjol y R-HA-PE-3 de haba que presentaron colonias ligeramente rojas.

3.4. Reactivación y purificación de cepas liofilizadas del banco de rizobiología del laboratorio de Microbiología del DMSA del INIAP

Las ocho cepas bacterianas (anexo E) se reactivaron del estado de liofilización en el que se encontraban almacenadas. Todas ellas presentaron cultivos puros después de reactivarlas y sembrarlas en el medio LMA+RC.

3.5. Refrescamiento y purificación de cepas de rizobios del banco de rizobiología del PRONALEG del INIAP

Las ocho cepas bacterianas (anexo E) se refrescaron en el medio LMA+RC del estado de contaminación y vejez en el que se encontraban cultivadas en el medio LMA. En total se purificaron 16 cepas provenientes del banco del INIAP (tabla 3.4).

Tabla 3.4. Número de cepas de rizobios reactivadas y refrescadas del banco de rizobiología del INIAP.

Tipo de leguminosa	Número de muestras viables
Arveja	7
Chocho	1
Fréjol	6
Haba	2
TOTAL	16

El número total de cepas de rizobios recolectadas de la provincia de Imbabura y reactivadas del banco del INIAP con las que se trabajó en la investigación, fue de ciento dos.

3.6. Crecimiento de las bacterias

Las cepas de rizobios asociadas a los cinco cultivos de leguminosas, presentaron crecimiento rápido, con un tiempo promedio de aparición de tres días, tanto en medio de cultivo sólido (LMA) como en medio de cultivo líquido (LM). La cepa C8 B de chocho, fue la excepción, ya que mostró un crecimiento lento con un tiempo promedio de aparición de siete días.

3.7. Pruebas de autenticación de rizobios

Los resultados de las cinco pruebas de autenticación realizadas a las cepas de rizobios asociadas a los cultivos de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, se resumen en el anexo F.

3.7.1. Cultivo en medio levadura manitol agar + azul de bromotimol

Se observó que para el caso de rizobios de crecimiento rápido, el medio se acidificó cambiando su color a amarillo (figuras 3.2, 3.6, 3.7), mientras que para el caso del único

rizobio de crecimiento lento (C8 B) el medio alcalinizó, cambiando su color a azul (figura 3.3). Estos resultados indicaron que se trataba de rizobios, posiblemente *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

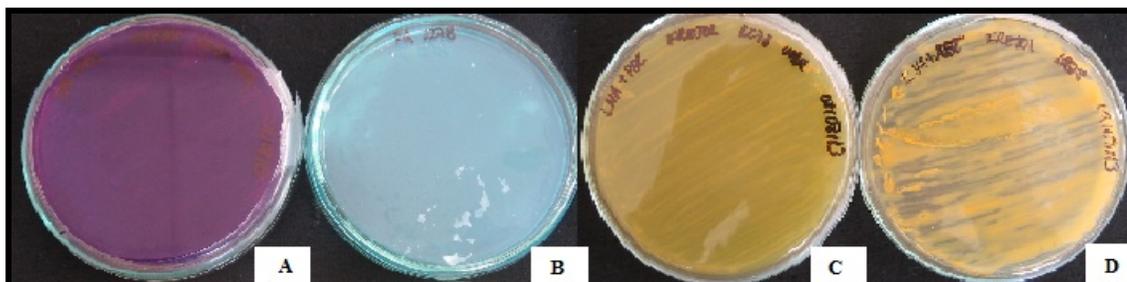


Figura 3.2. Pruebas de autenticación de la cepa UMR 1278 (*Rhizobium etli*):
 A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).

3.7.2. Cultivo en medio levadura manitol agar + púrpura de bromocresol

Los rizobios de crecimiento rápido acidificaron el medio de cultivo, cambiando su color a amarillo (figuras 3.2, 3.6, 3.7), a diferencia del rizobio de crecimiento lento (C8 B) el cual alcalinizó el medio tornándolo a púrpura (figura 3.3). Posiblemente tratándose de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

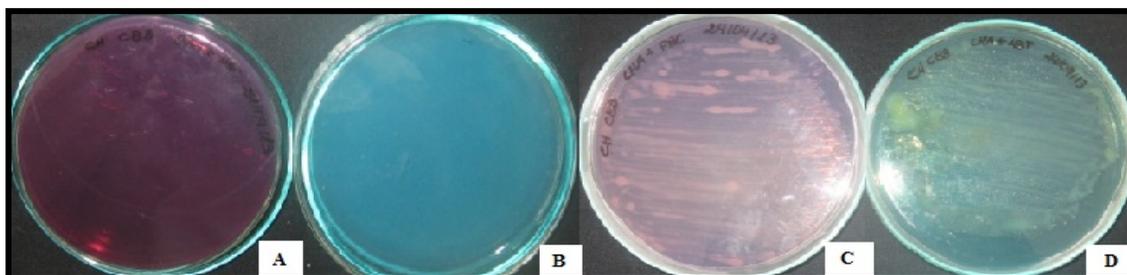


Figura 3.3. Pruebas de autenticación de la cepa C8 B. (*Bradyrhizobium* sp.):
 A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción alcalina (púrpura) D. LMA+ABT: reacción alcalina (azul).

3.7.3. Cultivo en medio glucosa peptona agar + púrpura de bromocresol

Se observó que la mayoría de rizobios no crecieron en el medio ni lo alteraron de color (figuras 3.2, 3.3, 3.6, 3.7), sugiriendo la presencia de rizobios.

Sin embargo, las cepas FR 1063 de fréjol, FB 481 de haba y TAL 1236 de arveja, mostraron presencia escasa de crecimiento y alteraron el pH del medio, volviéndolo color amarillo a los dos días de incubación, pero conforme pasó el tiempo (cinco días) el medio retornó al color púrpura original (figura 3.4).

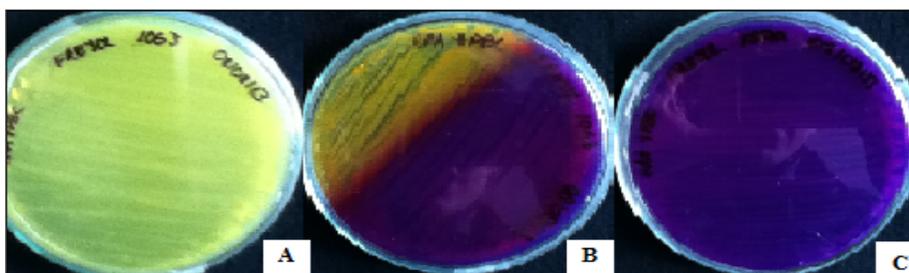


Figura 3.4. Pruebas de autenticación en medio GPA+PBC de la cepa FR 1063: A. acidificación del medio (amarillo) a los dos días de incubación B. retorno parcial a la coloración original del medio a los tres y cuatro días C. retorno total a la coloración del medio original a los cinco días.

Las cepas R-FR-PE-2b de fréjol y R-HA-PE-3 de haba, presentaron crecimiento abundante y alteración del pH del medio, cambiando su color a amarillo, y demostrando que no eran rizobios (figura 3.5).

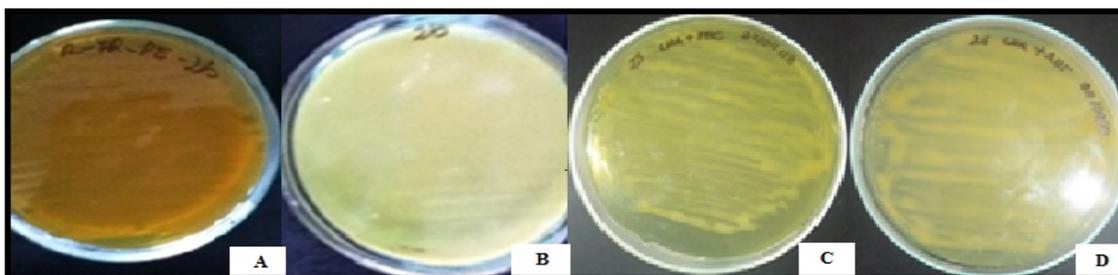


Figura 3.5. Pruebas de autenticación de la cepa R-FR-PE-2b (*Agrobacterium*):
 A. GPA+PBC: presencia de crecimiento (amarillo) B. LLA+RB: cambio de coloración (amarillo) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).

3.7.4. Cultivo en medio levadura lactosa agar + reactivo de Benedict

Se observó que la mayoría de rizobios no cambió la coloración del medio de cultivo al añadir el reactivo de Benedict, permaneciendo de color azul (figuras 3.2, 3.3, 3.6). Estos resultados indicaron que se trataba de rizobios.

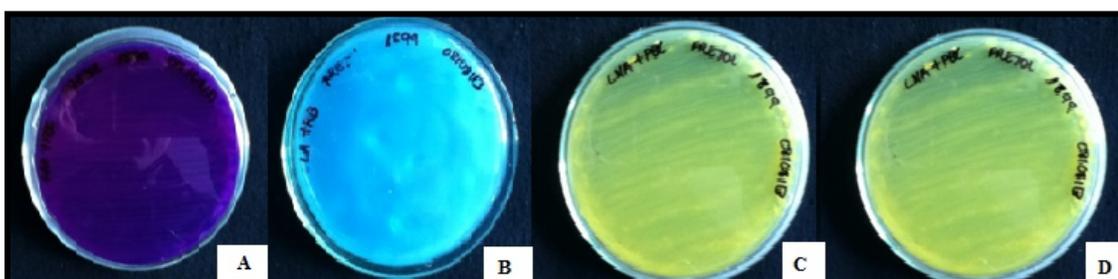


Figura 3.6. Pruebas de autenticación de la cepa UMR 1899 (*Rhizobium tropici*): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).

No obstante, las cepas FR 1063 de fréjol, FB 481 de haba y TAL 1236 de arveja presentaron un cambio parcial de color (azul-verdoso) al añadir el reactivo pero no se tornó completamente a amarillo (figura 3.7).

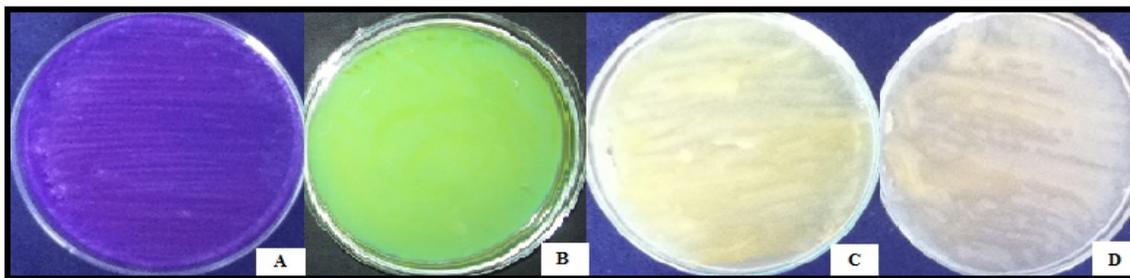


Figura 3.7. Pruebas de autenticación de la cepa TAL 1236 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: cambio parcial de coloración (azul-verdoso) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).

Las cepas R-FR-PE-2b de fréjol y R-HA-PE-3 de haba, por lo contrario, mostraron cambio de coloración en el medio, de azul a color amarillo a los diez minutos de añadir el reactivo de Benedict, confirmando la presencia de *Agrobacterium* en ambas muestras (figura 3.5).

3.7.5. Tinción de Gram

Se observó al microscopio (100x) que todas las cepas retuvieron la coloración roja de la safranina, indicando que se trataba de bacterias Gram negativas (anexo F). Se observaron bacilos cortos móviles no esporulados (figura 3.8).

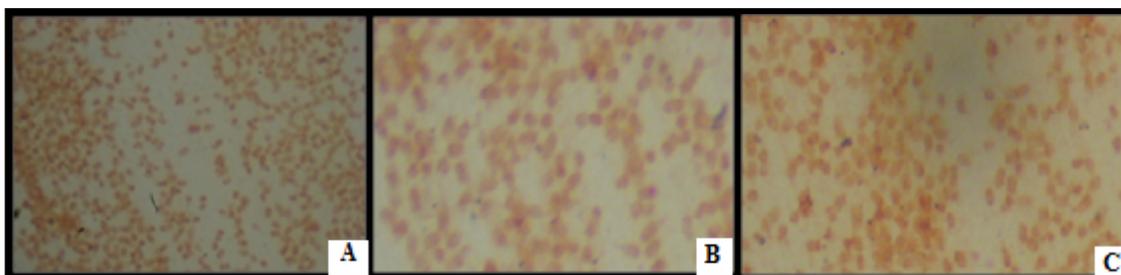


Figura 3.8. Tinción de Gram de cepas de rizobios vistas al microscopio en 100x: bacilos Gram negativos cortos no esporulados A. cepa UMR 1899 (*Rhizobium tropici*) B. cepa UMR 1278 (*Rhizobium etli*) C. cepa TAL 1236 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*).

3.8. Conservación de las bacterias

Los cien aislamientos autenticados como rizobios fueron liofilizados, y se mantienen almacenados en el laboratorio de Microbiología del DMSA a 4°C en refrigeración, formando el banco de rizobios.

3.9. Identificación taxonómica: Caracterización morfológica de rizobios

3.9.1. Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.)

La figura 3.9 indica el dendograma obtenido de la unificación de los resultados de las características morfológicas realizadas a las cepas de arveja, con el objeto de observar la relación fenotípica de los aislamientos. A partir de un coeficiente de similitud de 49%, se dio la formación de dos grupos claramente identificables: grupo I y grupo II.

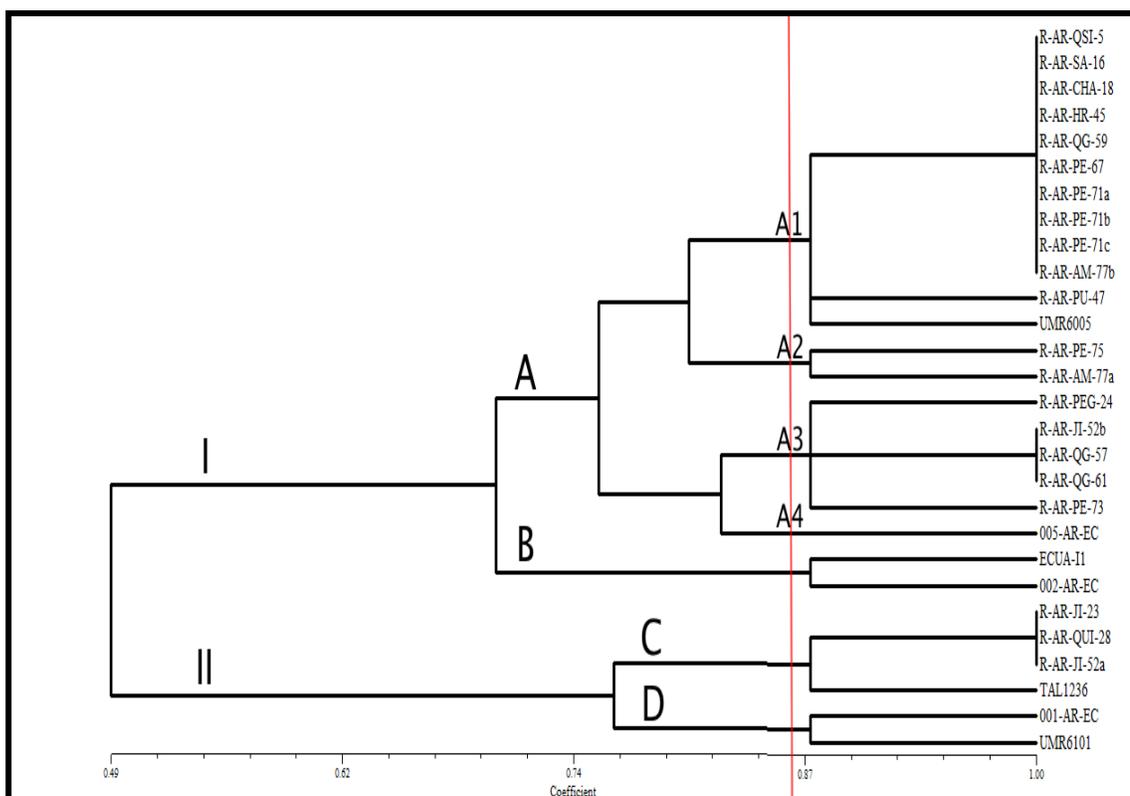


Figura 3.9. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las veintiocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.).

Al considerar una similitud del 70%, el grupo I formó dos subgrupos: A y B. El subgrupo A, en base a un coeficiente de 86%, asoció los conglomerados: A1, A2, A3 y A4, con veinte aislamientos provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Imantag, San Roque, Ilumán y Miguel Egas Cabezas de la provincia de Imbabura (tabla 3.5).

Tabla 3.5. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica con las cepas de arveja (*Pisum sativum* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	12	88%
A2	2	88%
A3	5	88%
A4	1	82%

El subgrupo B lo constituyeron dos cepas procedentes del banco del INIAP, cuyo coeficiente de similitud fue de 88%; se diferenciaron en la cantidad de goma de sus colonias.

El grupo II, a partir de un coeficiente de 76%, lo conformaron los subgrupos: C y D. El subgrupo C estuvo formado por cuatro cepas provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Ilumán y Miguel Egas Cabezas de la provincia de Imbabura; una de ellas varió en la apariencia de sus colonias, mostrando un coeficiente de similitud de 88%. El subgrupo D relacionó dos cepas procedentes del banco del INIAP, que presentaron un coeficiente de 88%; la diferencia radicó en la apariencia de sus colonias.

Se puede constatar en el dendograma (figura 3.9) que el subgrupo A presentó el mayor número de muestras con similitud entre ellas. Los resultados de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de arveja, señalaron que pertenecen al género *Rhizobium* (anexo G1).

3.9.2 Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis* S.)

El dendograma representado en la figura 3.10, muestra el parentesco de los aislamientos de rizobios asociados al cultivo de chocho. El resultado del agrupamiento obtenido a partir de las características morfológicas de las cepas definió, en base a un coeficiente de similitud de 49%, la formación del grupo I y del grupo II.

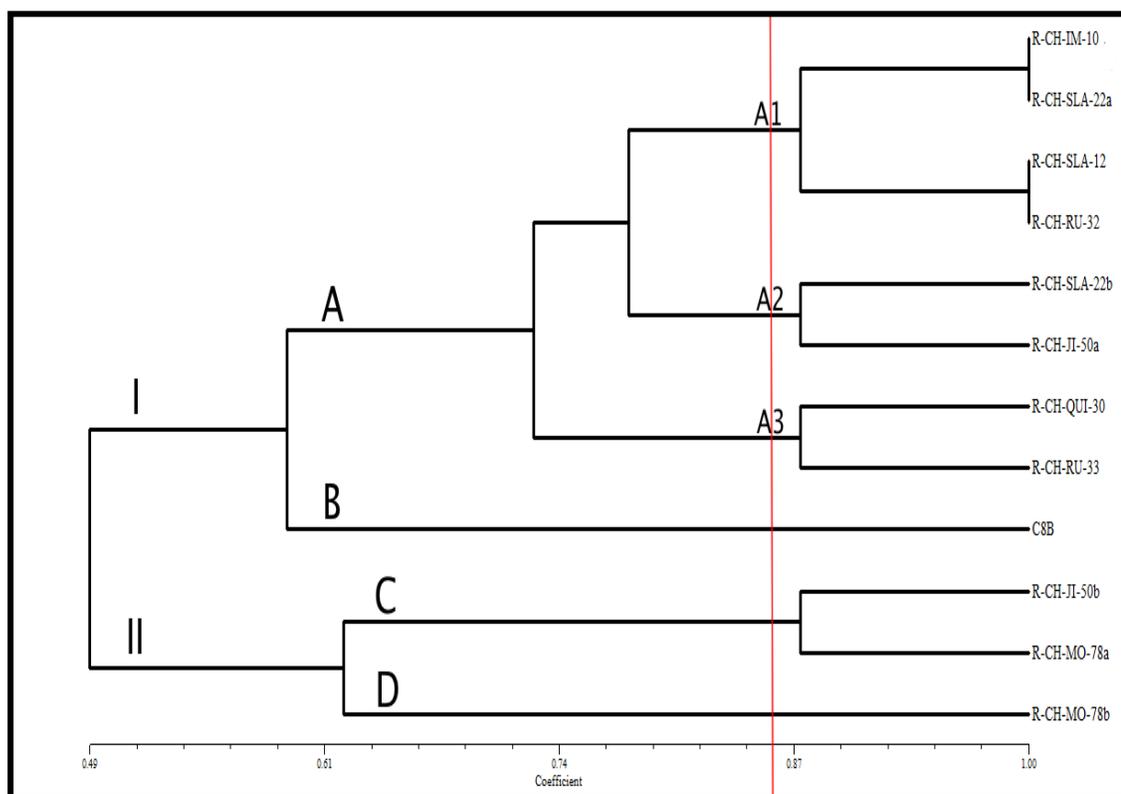


Figura 3.10. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las doce cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis* S.).

El grupo I, a partir de un coeficiente de similitud de 59%, formó los subgrupos: A y B. Los conglomerados A1, A2 y A3 se relacionaron en el subgrupo A, donde se observaron ocho aislamientos provenientes de las parroquias Ilumán y Miguel Egas Cabezas de la provincia de Imbabura (tabla 3.6).

Tabla 3.6. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica con las cepas de chocho (*Lupinus mutabilis* S.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	4	87%
A2	2	87%
A3	2	87%

Una sola cepa, procedente del banco del INIAP, conformó el subgrupo B.

A un valor de similitud de 62%, el grupo II estuvo formado por dos subgrupos: C y D. El subgrupo C consistió por dos cepas provenientes de las parroquias Ilumán e Imantag de la provincia de Imbabura, mostró un coeficiente de similitud de 87%; variaron en la apariencia de sus colonias. El subgrupo D lo conformó una cepa procedente de la parroquia Imantag.

La mayoría de cepas con similitud entre ellas se encontraron en el subgrupo A, tal como se observa en el dendograma (figura 3.10). La caracterización morfológica de los rizobios de chocho, indicó que pertenecen al género *Ochrobactrum* (anexo G2), y una cepa (C8 B) al género *Bradyrhizobium* (anexo G3).

3.9.3 Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El resultado del agrupamiento obtenido a partir de la matriz de datos de las características morfológicas realizadas a las cepas de fréjol, se muestra en el dendograma de la figura 3.11. Se definió la formación de dos grupos principales: I y II, a partir de un coeficiente de similitud de 53%.

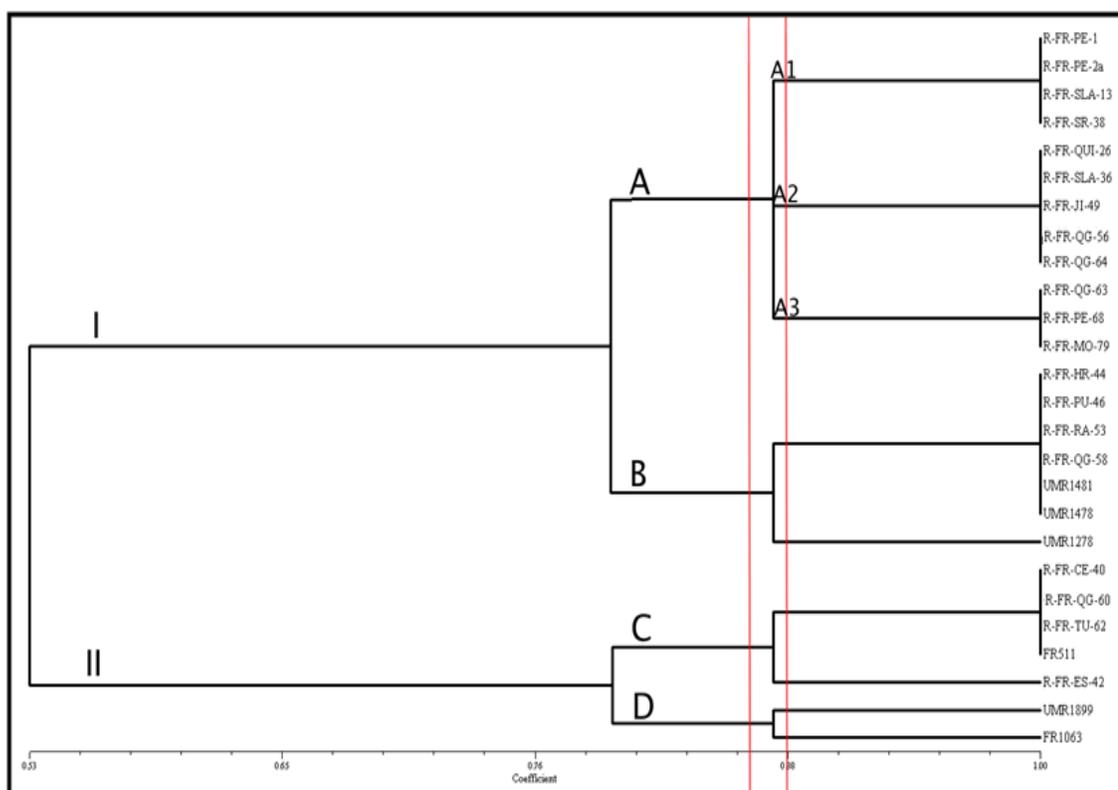


Figura 3.11. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las veintiséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Considerando una similitud de 79%, el grupo I formó los subgrupos: A y B. Los conglomerados A1, A2 y A3 se asociaron en el subgrupo A, en base a un coeficiente de 88%; se observaron doce aislamientos provenientes de las parroquias Imantag, Ilumán, San Roque y Miguel Egas Cabezas de la provincia de Imbabura (tabla 3.7).

Tabla 3.7. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	4	100%
A2	5	87%
A3	3	100%

El subgrupo B lo conformaron siete cepas procedentes del banco del INIAP, y de las parroquias Imantag y San Roque; una de ellas se diferenció en la cantidad de goma de sus colonias; mostrando un coeficiente de similitud de 87%.

El grupo II relacionó los subgrupos: C y D, a un valor de similitud del 79%. Cinco cepas provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Imantag, El Sagrario y San Roque de la provincia de Imbabura conformaron el subgrupo C; de las cuales una varió en la elevación de sus colonias, visualizándose una similitud de 87%. El subgrupo D formado por dos cepas procedentes del banco del INIAP; mostró un coeficiente de 87%; la diferencia radicó en la elevación de sus colonias.

La figura 3.11 muestra que el subgrupo A reunió la mayoría de cepas con similitud entre ellas. Los resultados de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de fréjol, señalaron que pertenecen al género *Rhizobium* (anexos G4, G5).

3.9.4 Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (*Vicia faba* L.)

Se realizó el agrupamiento de los resultados de las características morfológicas realizadas a las muestras de haba. El dendograma generado con estos datos se ilustra en la figura 3.12. Se observó que al considerar un coeficiente de similitud de 57%, se formó la primera ramificación dando lugar a dos grupos: I y II.

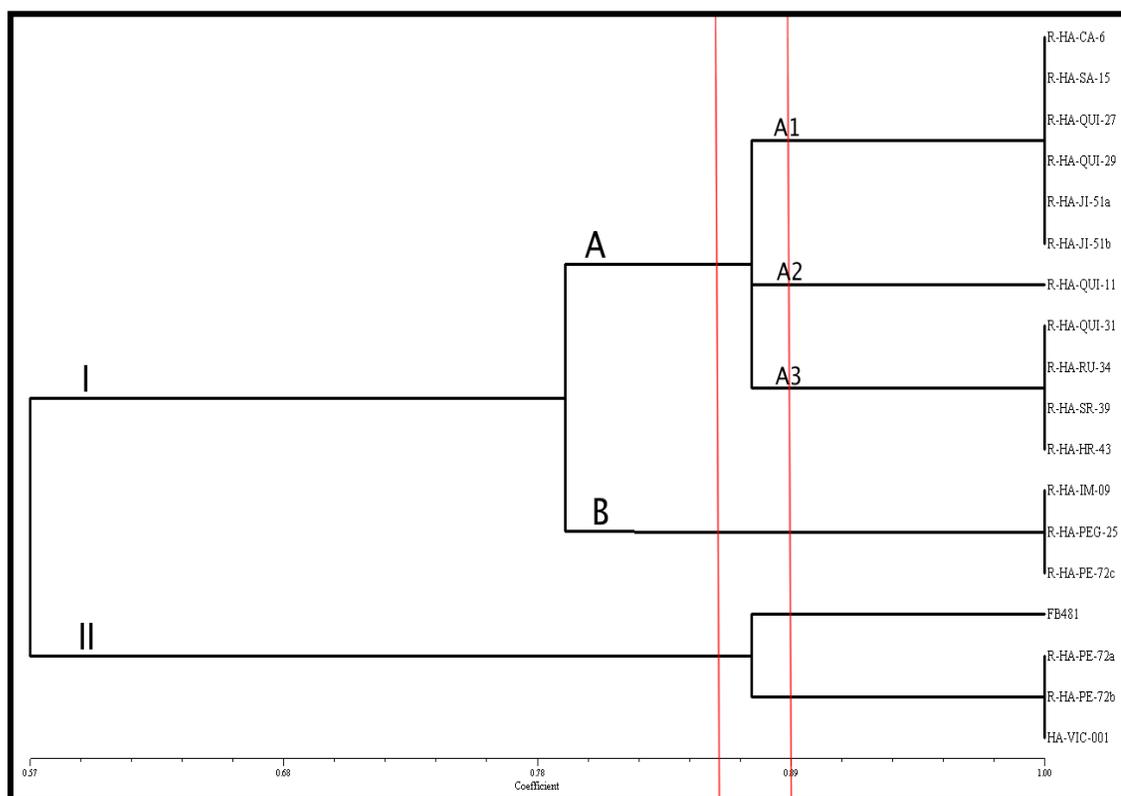


Figura 3.12. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las dieciocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (*Vicia faba* L.).

El grupo I se encontró conformado por los subgrupos: A y B, con un coeficiente de similitud de 79%. El subgrupo A, en base a un coeficiente de 89%, asoció los conglomerados: A1, A2 y A3, con once cepas provenientes de las parroquias Miguel Egas Cabezas, San Roque e Ilumán de la provincia de Imbabura (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de haba (*Vicia faba* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	6	100%
A2	1	87%
A3	4	100%

El subgrupo B relacionó tres aislamientos procedentes de las parroquias Miguel Egas Cabezas e Imantag, cuyo coeficiente de similitud fue de 100%, indicando que las características morfológicas fueron iguales para estas muestras.

El grupo II lo constituyeron cuatro cepas de las parroquias Imantag de la provincia de Imbabura, y del banco del INIAP; una de ellas se diferenció en la apariencia de sus colonias, visualizándose una similitud del 88%.

Se puede constatar en el dendograma (figura 3.12) que el subgrupo A abarcó el mayor número de aislamientos con similitud entre ellos. La caracterización morfológica de los rizobios de haba, indicó que pertenecen al género *Rhizobium* (anexo G6).

3.9.5 Caracterización morfológica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (*Vicia* sp.)

El dendograma que se indica en la figura 3.13, logró identificar dos grupos principales: I y II, a una similitud del 51%; mostrando la relación fenotípica de los aislamientos de rizobios asociados a vicia. Las muestras se agruparon por la similitud en sus resultados.

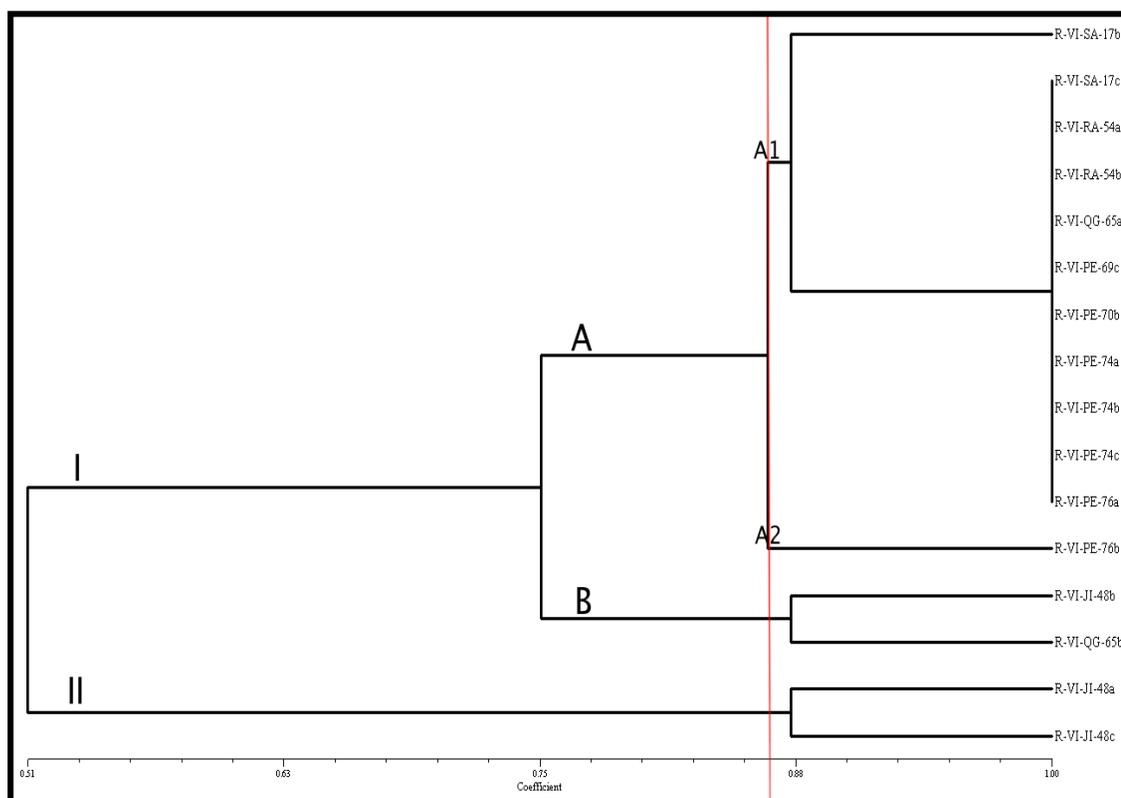


Figura 3.13. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las dieciséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (*Vicia* sp.).

El grupo I, en base a un coeficiente de similitud de 75%, estuvo formado por dos subgrupos: A y B. El subgrupo A relacionó los conglomerados: A1 y A2, a partir de un coeficiente de 86%; se observaron doce cepas provenientes de las parroquias San Roque e Imantag de la provincia de Imbabura (tabla 3.9).

Tabla 3.9. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de vicia (*Vicia* sp.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	11	88%
A2	1	86%

Dos cepas procedentes de las parroquias Ilumán e Imantag formaron el subgrupo B, visualizando una similitud del 88% entre ellas; la diferencia radicó en la cantidad de goma de sus colonias.

El grupo II lo conformaron dos cepas provenientes de la parroquia Ilumán de la provincia de Imbabura, cuyo coeficiente de similitud fue de 88%, variaron en la elevación de sus colonias.

Se puede observar en el dendograma (figura 3.13) que el mayor número de cepas con similitud entre ellas se encontró en el subgrupo A. Los resultados de la caracterización morfológica de las cepas de rizobios de vicia, señalaron que pertenecen al género *Rhizobium* (anexo G7).

3.10 Identificación taxonómica: Caracterización bioquímica de rizobios

3.10.1 Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.)

La figura 3.14 señala el dendograma obtenido de la unificación de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de arveja, con el objeto de observar la relación fenotípica de los aislamientos. Las muestras se agruparon por la similitud en sus resultados. Se observó que a partir de un coeficiente de similitud de 40%, se dio la formación de dos grupos claramente identificables: grupo I y grupo II.

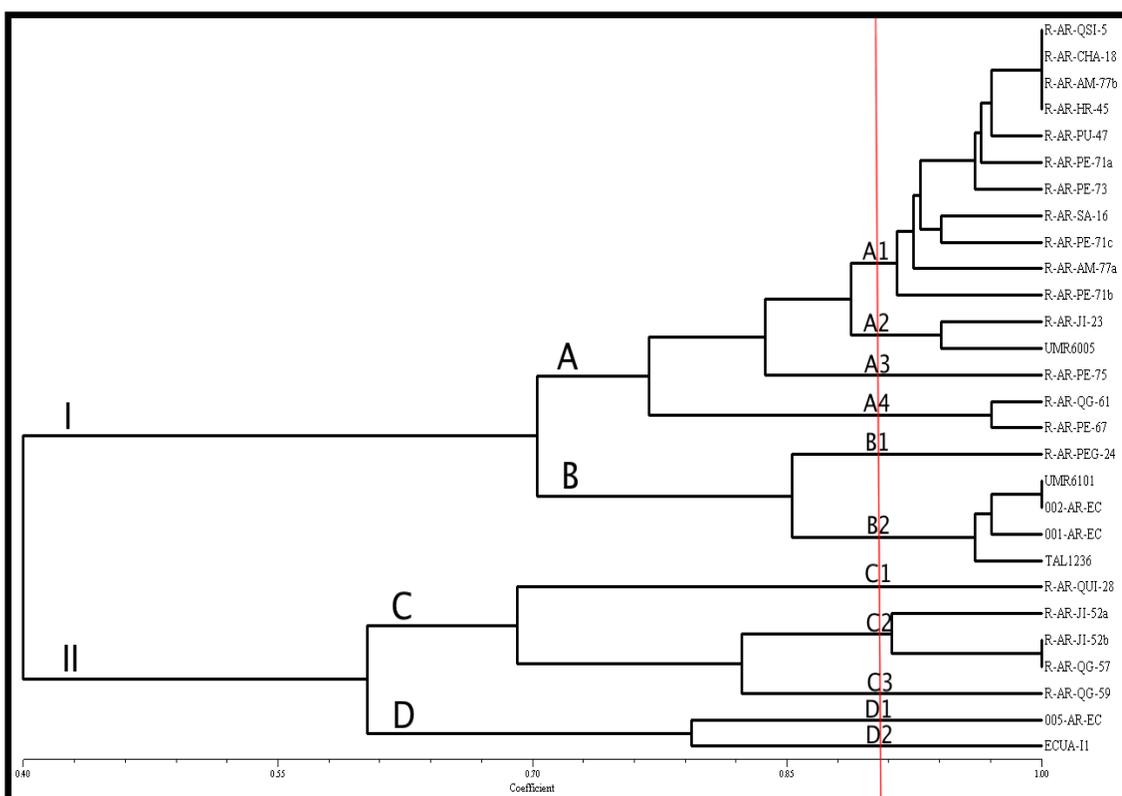


Figura 3.14. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las veintiocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.).

El grupo I, lo conformaron dos subgrupos: A y B, con un coeficiente de similitud de 70%. El subgrupo A, en base a un coeficiente de 89%, asoció los conglomerados: A1, A2, A3 y A4, con dieciséis aislamientos provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Imantag, San Roque e Ilumán de la provincia de Imbabura (tabla 3.10).

Tabla 3.10. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica con las cepas de rizobios de arveja (*Pisum sativum* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	11	91%
A2	2	94%
A3	1	84%
A4	2	84%

El subgrupo B estuvo formado por cinco cepas procedentes de la parroquia Miguel Egas Cabezas y del banco del INIAP, relacionando los conglomerados: B1 y B2 (tabla 3.11).

Tabla 3.11. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (*Pisum sativum* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
B1	1	85%
B2	4	96%

Al considerar una similitud del 60%, el grupo II formó los subgrupos: C y D. El subgrupo C lo constituyeron los conglomerados: C1, C2, C3 y C4, a partir de un coeficiente de 89%; se observaron cinco aislamientos provenientes de las parroquias Miguel Egas Cabezas, Ilumán e Imantag de la provincia de Imbabura (tabla 3.12).

Tabla 3.12. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (*Pisum sativum* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
C1	1	69%
C2	3	91%
C3	1	83%

Los conglomerados D1 y D2 se relacionaron en el subgrupo D, con dos cepas procedentes del banco del INIAP (tabla 3.13).

Tabla 3.13. Conglomerados del subgrupo D formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja (*Pisum sativum* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
D1	1	80%
D2	1	80%

Se puede observar en el dendograma (figura 3.14) que el subgrupo A presentó el mayor número de cepas con similitud entre ellas. Los resultados de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de arveja, indicaron que son moderadamente resistentes a las condiciones hostiles, y que existe una alta biodiversidad genética de estas bacterias en los suelos de Imbabura.

3.10.2 Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis* S.)

El dendograma representado en la figura 3.15, muestra el parentesco de los aislamientos de rizobios asociados al cultivo de chocho. El resultado del agrupamiento obtenido a partir de las características bioquímicas de las cepas definió, en base a un coeficiente de similitud de 57%, la formación del grupo I y del grupo II.

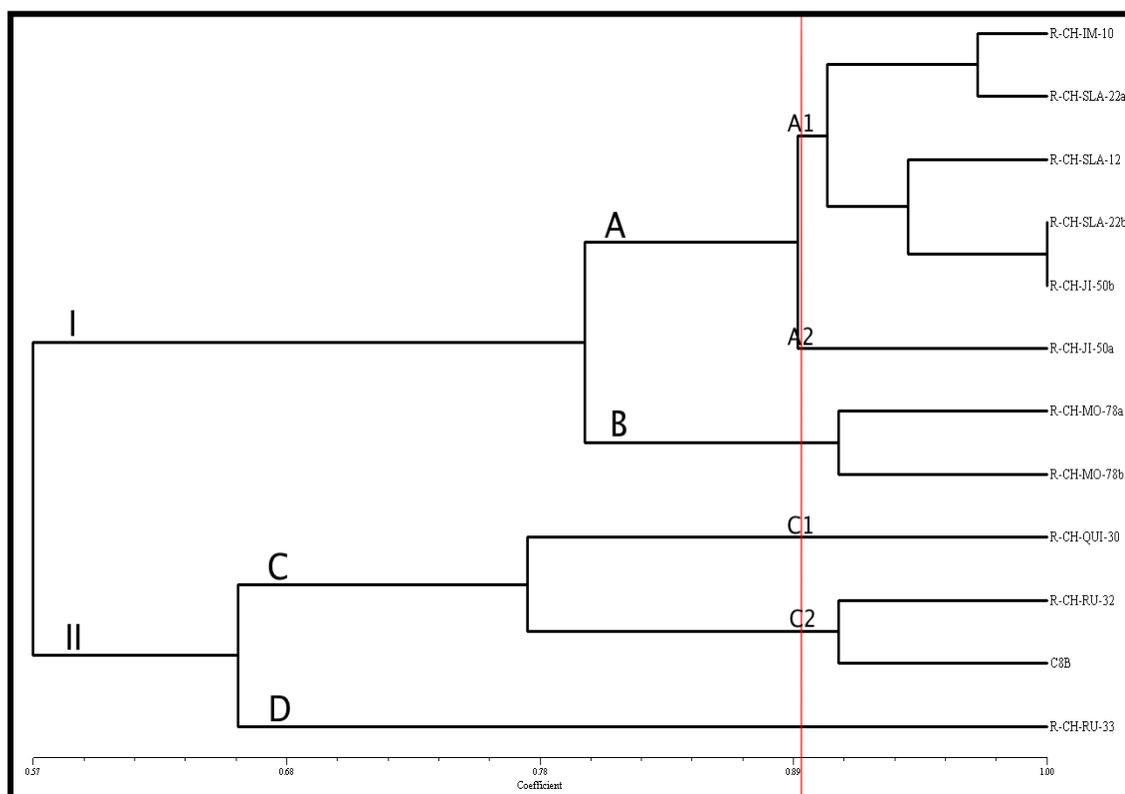


Figura 3.15. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las doce cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis* S.).

Considerando un coeficiente de similitud de 80%, el grupo I formó los subgrupos: A y B. Los conglomerados A1 y A2 conformaron el subgrupo A, en base a una similitud de 89%; se observaron seis aislamientos provenientes de las parroquias Ilumán y Miguel Egas Cabezas de la provincia de Imbabura (tabla 3.14).

Tabla 3.14. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios chocho (*Lupinus mutabilis* S.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	5	91%
A2	1	89%

Dos cepas procedentes de la parroquia Imantag constituyeron el subgrupo B, visualizándose una similitud de 91% entre ellas; se diferenciaron por tres resultados (pH 8.5, kanamicina, estreptomicina).

El grupo II estuvo formado por dos subgrupos: C y D, A un valor de similitud de 65%. Los conglomerados C1 y C2 conformaron el subgrupo C, a un coeficiente de 89%; con tres cepas provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Ilumán y Miguel Egas Cabezas (tabla 3.15).

Tabla 3.15. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de chocho (*Lupinus mutabilis* S.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
C1	1	78%
C2	2	91%

El subgrupo D lo conformó una sola cepa procedente de Ilumán.

La mayoría de cepas con similitud entre ellas se encontraron en el subgrupo A, tal como se observa en el dendograma (figura 3.15). Los resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de rizobios de chocho, indicaron que los aislamientos de crecimiento rápido son muy resistentes a las condiciones hostiles (anexos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7), mientras que el único aislamiento de crecimiento lento (C8 B) es muy sensible.

3.10.3 Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El resultado del agrupamiento obtenido a partir de la matriz de datos de las características bioquímicas realizadas a las cepas de fréjol, está representado en el dendograma de la figura 3.16. Se dio la formación de dos grupos principales: I y II, a partir de un coeficiente de similitud de 45%.

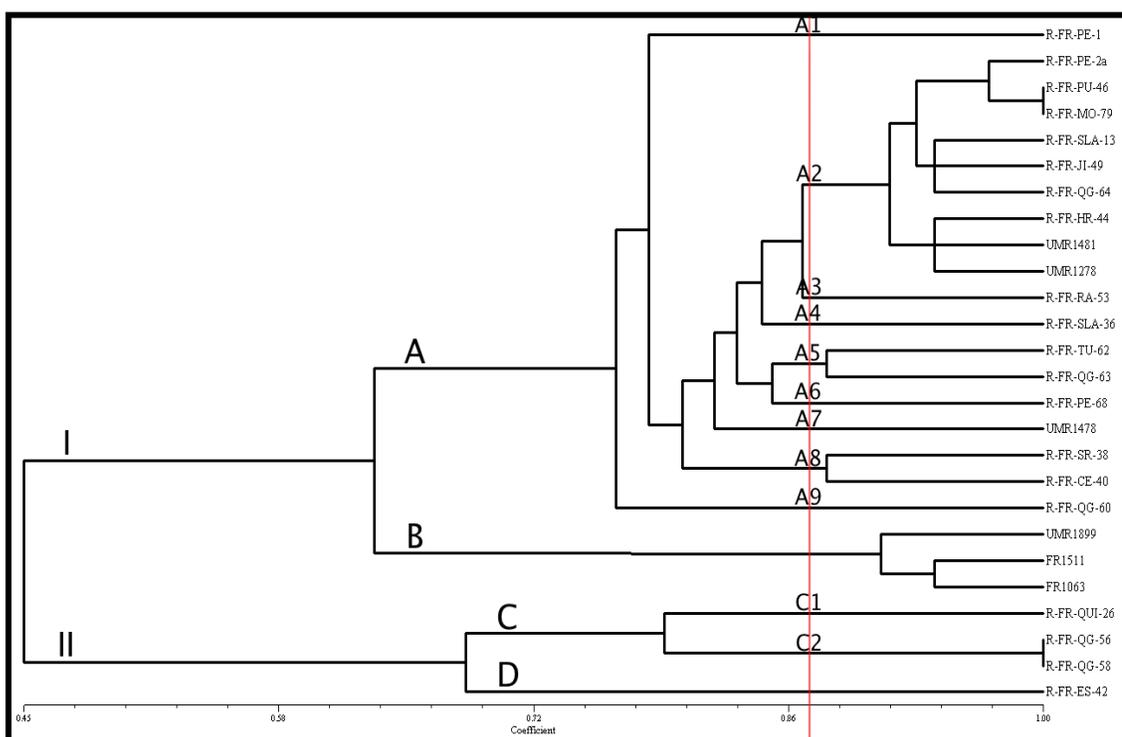


Figura 3.16. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las veintiséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Considerando un coeficiente de 63%, el grupo I formó los subgrupos: A y B. El subgrupo A, en base a un coeficiente de 86%, relacionó los conglomerados: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, y A9, con diecinueve aislamientos provenientes del banco del INIAP, y de las parroquias Imantag, El Sagrario, Ilumán, y San Roque de la provincia de Imbabura (tabla 3.16). El subgrupo B lo conformaron tres cepas procedentes del banco del INIAP, visualizándose una similitud de 91%.

Tabla 3.16. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	1	79%
A2	9	91%
A3	1	87%
A4	1	84%
A5	2	88%
A6	1	85%
A7	1	82%
A8	2	88%
A9	1	76%

El grupo II asoció los subgrupos: C y D, a una similitud de 68%. Los conglomerados C1 y C2, con tres cepas provenientes de las parroquias Imantag y Miguel Egas Cabezas, se relacionaron en el subgrupo C, en base a un coeficiente de 86% (tabla 3.17). El subgrupo D estuvo formado por una cepa procedente de la parroquia san Roque.

Tabla 3.17. Conglomerados del subgrupo C formados del análisis de la caracterización bioquímica de las cepas de rizobios de fréjol (*Phaseolus vulgaris* S.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
C1	1	79%
C2	2	100%

La figura 3.16 muestra que el subgrupo A reunió la mayoría de cepas con similitud entre ellas. La caracterización bioquímica de los rizobios de fréjol señaló que son ligeramente resistentes a condiciones hostiles, hallándose una alta biodiversidad genética en los suelos de Imbabura.

3.10.4 Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (*Vicia faba* L.)

Se realizó el agrupamiento de los resultados de las características bioquímicas realizadas a las muestras de haba. El dendograma generado con estos datos se ilustra en la figura 3.17. Se observó que al considerar un coeficiente de similitud de 37%, se formó la primera ramificación dando lugar a dos grupos: I y II.

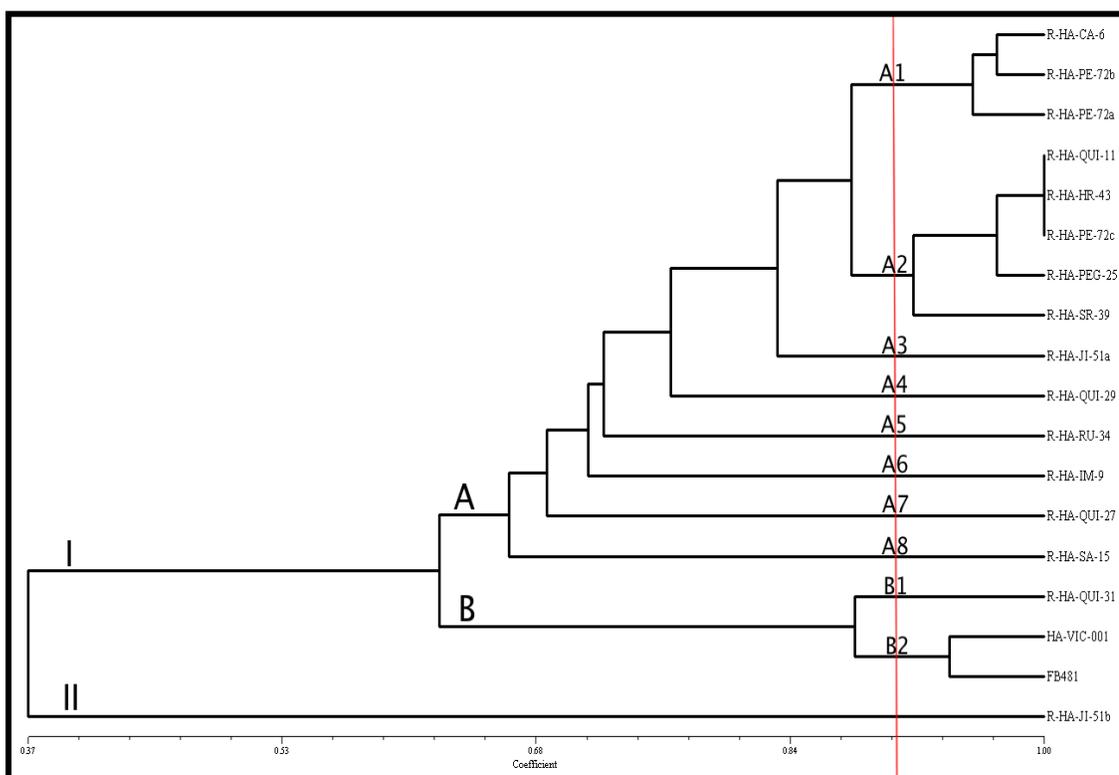


Figura 3.17. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las dieciocho cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de haba (*Vicia faba* L.).

El grupo I lo conformaron los subgrupos: A y B, con un coeficiente de similitud de 57%. Se observó la formación de los conglomerados: A1, A2, A3, A4, A5, A5, A6, A7 y A8 en el subgrupo A, considerando un coeficiente de 89%; catorce cepas provenientes de las parroquias Imantag, San Roque, Miguel Egas Cabezas e Ilumán de la provincia de Imbabura constituyeron el subgrupo (tabla 3.18).

Tabla 3.18. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica con las cepas de rizobios de haba (*Vicia faba* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	3	95%
A2	5	91%
A3	1	83%
A4	1	77%
A5	1	88%
A6	1	85%
A7	1	82%
A8	1	88%

Los conglomerados: B1 y B2 se relacionaron en el subgrupo B, observándose tres aislamientos procedentes del banco del INIAP, y de la parroquia Miguel Egas Cabezas (tabla 3.19).

Tabla 3.19. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica con las cepas de rizobios de haba (*Vicia faba* L.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
C1	1	88%
C2	2	94%

El grupo II lo constituyó una cepa proveniente de la parroquia Ilumán.

Se puede constatar en el dendograma (figura E4) que el subgrupo A abarcó el mayor número de aislamientos con similitud entre ellos. Los resultados indicaron que las cepas de haba son resistentes a las condiciones de estrés, y que hay una alta biodiversidad genética de estos rizobios en los suelos de Imbabura.

3.10.5 Caracterización bioquímica de cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (*Vicia* sp.)

El dendograma que se indica en la figura 3.18, logró identificar dos grupos principales: I y II, a una similitud del 67%, mostrando la relación fenotípica de los aislamientos de rizobios asociados a vicia. Las muestras se agruparon por la similitud en sus resultados.

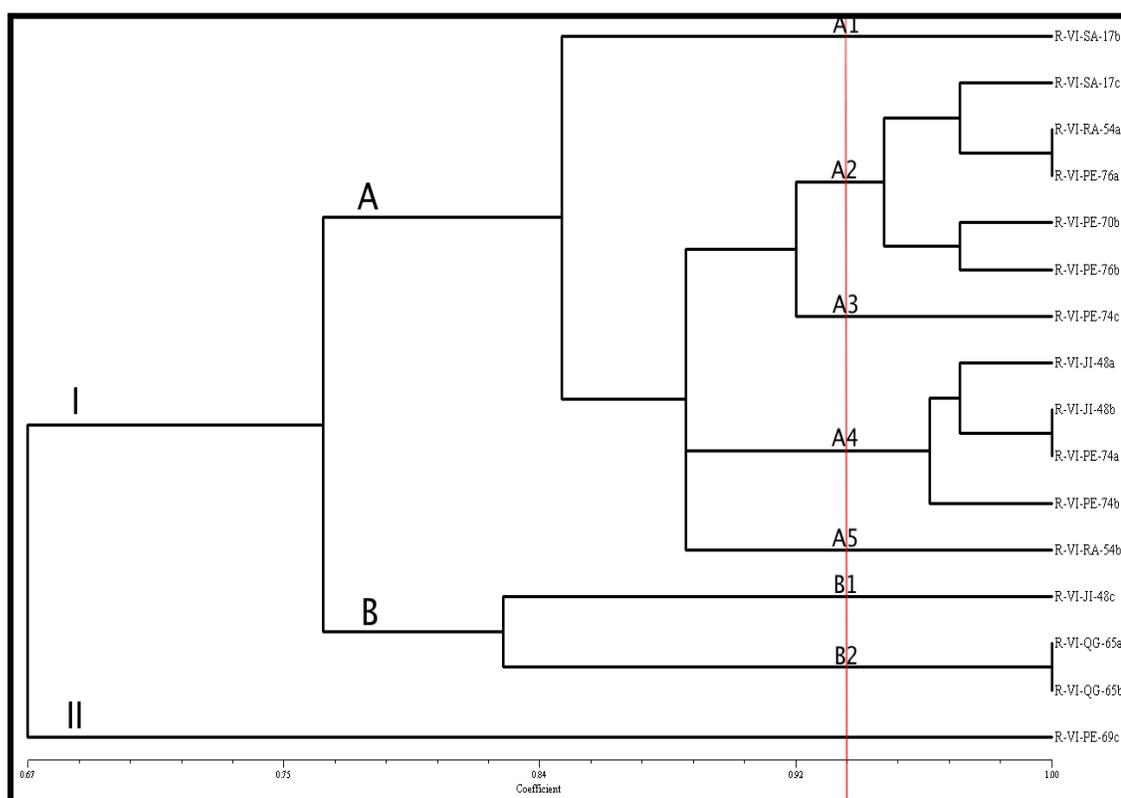


Figura 3.18. Dendograma de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las dieciséis cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de vicia (*Vicia* sp.).

A una similitud de 76%, los subgrupos: A y B conformaron el grupo I. El subgrupo A relacionó los conglomerados: A1, A2, A3, A4 y A5, a partir de un coeficiente de 92%; se observaron doce cepas provenientes de las parroquias San Roque, Imantag e Ilumán de la provincia de Imbabura (tabla 3.20).

Tabla 3.20. Conglomerados del subgrupo A formados del análisis de la caracterización bioquímica con las cepas de rizobios de vicia (*Vicia* sp.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
A1	1	85%
A2	5	94%
A3	1	92%
A4	4	96%
A5	1	88%

El subgrupo B constituido por tres cepas procedentes de las parroquias Ilumán e Imantag, asoció dos conglomerados: B1 y B2 (tabla 3.21).

Tabla 3.21. Conglomerados del subgrupo B formados del análisis de la caracterización bioquímica con las cepas de rizobios de vicia (*Vicia* sp.) y su coeficiente de similitud (CS).

Conglomerados	Número de cepas	CS
B1	1	82%
B2	2	100%

Una sola cepa proveniente de la parroquia de Imantag conformó el grupo II.

Se puede observar en el dendograma (figura 3.18) que el mayor número de cepas con similitud entre ellas se encontró en el subgrupo A. La caracterización bioquímica de los rizobios de vicia indicó que son tolerantes a las condiciones hostiles, encontrándose biodiversidad genética de estas bacterias en los suelos de Imbabura.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Nódulos asociados a cultivos de cinco plantas leguminosas de suelos de la provincia de Imbabura, fueron seleccionados y colectados para el aislamiento de rizobios, con el fin de identificarlos morfológica y bioquímicamente y, a futuro, desarrollar un biofertilizante. Las cepas de rizobios de arveja, fréjol, haba y vicia fueron identificadas como pertenecientes al género *Rhizobium*, y los rizobios de chocho, al género *Ochrobactrum*.

Además, dieciséis cepas de rizobios, pertenecientes al banco de rizobiología del INIAP, fueron reactivadas, refrescadas y purificadas; algunas de estas, en base a estudios moleculares anteriores, se identificaron como *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Las ocho cepas restantes fueron identificadas como pertenecientes al género *Rhizobium*, y una sola cepa, al género *Bradyrhizobium*.

Recolección de nódulos.- El mayor porcentaje de nódulos recolectados se encontró en el cantón de Cotacachi (47%), seguido de Otavalo (35%) y por último Antonio Ante (18%). Esta frecuencia, describe Cuadrado *et al.* (2009), podría deberse a la mayor actividad de siembra de leguminosas en un determinado cantón comparado con los otros cantones objeto de muestreo, y por la ausencia de iones de aluminio (INIAP-DMSA, 2013), metal perjudicial para el normal crecimiento de las plantas.

La mayoría de nódulos recolectados presentaron coloración interna roja, lo cual se explica por la presencia de leghemoglobina (Matos-Cuzcano y Zuñiga-Dávila, 2002) e indica una fijación eficiente de nitrógeno, característica que se asocia a una abundancia de cationes divalentes en el suelo (Mayea *et al.*, 1981, citados por Contreras-Solar *et al.*, 2007). En algunos de los nódulos analizados se observó una coloración externa e interna verde oscuro o blanquecina, que según Grisales y Fuentes (2005), se debe a una degeneración de la leghemoglobina, como respuesta al envejecimiento de los tejidos

bacterianos, que se traduce en una disminución notable de la fijación de nitrógeno.

En otros nódulos se observó una coloración interna oscura o negra, indicando que los rizobios están muertos (CIAT, 1988). Ferrera y Alarcón (2007) citados por Hernández-Mulford *et al.* (2012), afirman que algunos factores ambientales como la temperatura, pH, estrés salino y la presencia de compuestos fenólicos en extractos de raíces, pueden causar la muerte de los rizobios. Carranza (2004), señala que la utilización del hipoclorito, desinfectante fuerte que se utiliza para esterilizar la parte externa de los nódulos, puede penetrar en nódulos con alguna herida en el proceso de manejo y causar la muerte de los rizobios.

Quispel (s.f.), citado por Carranza (2004), indica que la proliferación de células corticales y epidermales, que entran en contacto con los rizobios incapaces de nodular al huésped específico, ocasionan pseudonódulos con ausencia de bacteria; y menciona además, que existen otros microorganismos que pueden formar estructuras semejantes a los nódulos como las bacterias del género *Agrobacterium*, las cuales se diferencian únicamente por el color interno del mismo y por ser más pálidos en su superficie, tal como se observó en los nódulos de donde se aislaron las muestras R-FR-PE-2b y R-HA-PE-3.

Diecinueve cepas, correspondientes al 18% del total de muestras recolectadas y aisladas de la provincia de Imbabura, fueron no viables, ya que una o más de las características típicas de rizobios no fueron cumplidas.

Al momento de seleccionar los nódulos empleados en la investigación se encontraron, en su mayoría, raíces secundarias con alta y mediana nodulación en plantas de arveja, fréjol, haba y vicia, contrario a lo que se observó en las plantas de chocho, las cuales presentaron raíces primarias con poca nodulación. Estudios realizados por Nutman (1956) y Caba *et al.* (2001), citados por Pérez (2011) señalan que el número de nódulos en las plantas es controlado por mecanismos de autorregulación y por factores externos como la presencia de nitratos en el suelo. La escasa nodulación de las raíces de

algunos cultivos pudo deberse básicamente a un exceso de nitratos en los suelos, con un porcentaje de nitrógeno medio que inhiba la nodulación. El INIAP-DMSA (2013) reportó un nivel medio de nitrógeno (53.7 ppm) en los suelos de los cantones de Antonio Ante, Cotacachi y Otavalo de la provincia de Imbabura.

Sherman *et al.* (1991) afirman que los grandes nódulos son casi siempre escasos y los pequeños generalmente abundantes y ampliamente dispersos en la raíz, lo que concuerda a lo observado en las raíces recolectadas del estudio. Los mismos autores consideran también, que los altos niveles de fósforo tienden a incrementar la absorción de manganeso, el cual causa un descenso en el número de los nódulos. Sin embargo Coyne (2000), asegura que el número de nódulos depende de la fertilidad del suelo, es decir, de la cantidad de nutrientes minerales (P, K, Mg, Ca) presentes en él, por ejemplo en algunos de los suelos el elevado nivel de fósforo juega un papel decisivo en el desarrollo y establecimiento del rizobio en la leguminosa, ya que aumenta el peso seco de los nódulos, estimula su cantidad y porcentaje de fijación de nitrógeno. El análisis de suelos de los tres cantones mencionados de Imbabura reportaron niveles altos de estos cuatro elementos (INIAP-DMSA, 2013): fósforo (49.3 ppm), potasio (0.67 ppm), magnesio (2.5 ppm) y calcio (8.82 ppm), lo que justifica la alta y mediana nodulación en las raíces de arveja, fréjol, haba y vicia.

En cuanto a la localización de los nódulos en el sistema radical, este depende del genotipo, de la especie hospedante, y de las condiciones ambientales (CIAT, 1988). Acero-Duarte y Rodríguez-Montenegro (1987), señalan que en la mayoría de las leguminosas de uso agronómico, como arveja, fréjol, haba, los nódulos se encuentran en las raíces laterales (secundarias), y que raras veces se ubican superficialmente y en raíces de primer orden (primarias), como en el caso de *Lupinus*. Esto coincidió con lo reportado en el estudio.

Los mismos autores describen además, que al parecer la forma, la estructura y el tamaño de los nódulos no son constantes en las plantas fijadoras de nitrógeno. La forma más común es la redondeada (nódulos determinados), como en los nódulos de fréjol

recolectados; aunque, los puede haber ovoides, irregulares y hasta aplanado filamentosos (nódulos indeterminados), lo cual se observó en los nódulos de arveja, haba, vicia y chocho; mientras que la peridermis del nódulo puede ser lisa o granulada rugosa. Por último, en relación al tamaño del nódulo, Lange & Parker (1960), citados por Rodríguez (2009), observaron que los nódulos de chocho pueden alcanzar un diámetro hasta de 3 cm (nódulos grandes).

Aislamiento de rizobios.- Una vez recolectados y caracterizados los nódulos, se procedió al aislamiento y purificación de las cepas viables. Para la selección de las colonias, un elemento esencial fue la falta de absorción del colorante rojo congo en el medio LMA. Kuykendall *et al.* (2005), indican que la absorción de este colorante es característico del género *Agrobacterium* y bacterias contaminantes presentes en el medio de cultivo (Kneen & Laure, 1983, citados por Moreno, 2010). Las colonias de dos cepas (R-FR-PE-2b y R-HA-PE-3), absorbieron ligeramente este colorante, mientras que las demás cepas no lo hicieron, permaneciendo rosadas. Date (1982), citado por Areadne-Sosa *et al.* (2004), señala que esta es una característica distintiva de los rizobios, sin embargo, no es estable y puede variar con la concentración de rojo congo, la edad del cultivo y la exposición de las placas a la luz, tomando una coloración rojo intenso el centro de las colonias luego de aproximadamente ocho días de incubación, evento que se registró al realizar las caracterizaciones morfológicas.

Producción de acidez o alcalinidad.- En el presente estudio, todos los aislamientos fueron de crecimiento rápido y acidificaron los medios LMA+ABT y LMA+PBC, a excepción de una cepa de crecimiento lento (C8 B) que alcalinizó los medios de cultivo mencionados. Hay algunas características distintivas entre los géneros de rizobios. Díaz (2010) y Wang *et al.* (2002) señalan que el género *Rhizobium* y *Sinorhizobium* presentan crecimiento rápido (tres a cinco días) y producción de metabolitos ácidos; el género *Bradyrhizobium* presenta crecimiento lento (cinco a siete días) y producción de metabolitos alcalinos; el género *Mesorhizobium* presenta crecimiento moderado y producción de ácido; y el género *Azorhizobium* crece tan rápido como *Rhizobium* y produce alcalinidad como *Bradyrhizobium*. Por lo tanto, los resultados de esta

investigación proponen que las cien cepas del presente estudio podrían pertenecer a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, y que ninguna correspondería a los géneros *Mesorhizobium* o *Azorhizobium*. Según Lancheros (2001), citado por Ramírez (2004), la característica de acidificar el medio de cultivo está relacionada con la capacidad de estos microorganismos de producir diferentes tipos de exopolisacáridos mucilaginosos extracelulares de carácter ácido o neutro en medio LMA, compuestos por carbohidratos, que son secretados al medio a través de la pared celular.

Fermentación de glucosa.- La mayoría de aislamientos no se desarrolló en este medio, tal como plantea Matos-Cuzcano *et al.* (2007), quienes dicen que la fermentación de la glucosa en un medio mínimo carente de minerales no es típica para los rizobios. Por lo contrario, dos cepas (R-FR-PE-2b y R-HA-PE-3), crecieron muy bien en este medio y cambiaron el pH del mismo, indicando que no se trataban de rizobios. Además, tres cepas (FR 1063, FB 481, TAL 1236) acidificaron el medio al principio, y después lo retornaron a su color púrpura original; se puede decir que la cepa TAL 1236 es un rizobio, ya que está caracterizada molecularmente como *Rhizobium leguminosarum*. Para las otras dos cepas es necesario hacer un análisis molecular y confirmar si se tratan de esta especie en particular. Norris (1965), citado por Moreno (2010), encontró que cepas aisladas de suelos alcalinos excretan sustancias que acidifican el medio, lo cual parece ser un mecanismo de adaptación a condiciones adversas, siendo este comportamiento mediado por el tipo de suelo, cantidad y calidad de los nutrientes disponibles.

Degradación de cetolactosa.- Los resultados en el medio LLA se valoraron de acuerdo a la producción de cetolactosa. Areadne-Sosa *et al.* (2004), señalan que el género *Agrobacterium* es capaz de degradar la lactosa, por esto cuando se añade el reactivo de Benedict, el medio cambia de color y como los rizobios no utilizan la lactosa, la reacción no tiene lugar. En el caso de la mayoría de cepas del estudio, el reactivo de Benedict no cambió de color, rectificando la presencia de rizobios; mientras que en dos cepas (R-FR-PE-2b y R-HA-PE-3) se confirmó la presencia definitiva de *Agrobacterium*. Otra observación a tomar en cuenta, fue igualmente la reacción de las

tres cepas (FR 1063, TAL 1236 y FB 481) al añadir el reactivo de Benedict, el cual se tornó azul-verdoso. Entonces es necesario el análisis molecular.

Tinción de Gram.- Todos los aislamientos del estudio fueron bacilos Gram negativos. Kuykendall *et al.* (2005), describen a las bacterias rizobios como bacilos Gram negativos no formadores de esporas. Areadne-Sosa *et al.* (2004), explican que esta prueba nunca es definitiva, ya que hay un gran número de microorganismos Gram negativos. Sin embargo, es un medio para comprobar que el microorganismo aislado cumple con las características morfológicas y tintoriales de los rizobios.

Caracterización morfológica.- Una vez realizadas todas las pruebas de autenticación, se procedió a la caracterización morfológica de los rizobios. Dentro de los cultivos de arveja, fréjol, haba y vicia se encontraron cepas con características del género *Rhizobium*. El CIAT (1988) y Kuykendall *et al.* (2005), afirman que en las especies de este género, usualmente las colonias son redondas, lisas, con elevación convexa, elevada, a veces plana, con textura elástica, cremosa o acuosa, tienen una apariencia opaca, semitranslúcida o translúcida, permanecen blancas o rosadas, producen goma o acumulación de poli- β -hidroxibutirato, y el tamaño de la colonia varía de 2-5 mm entre los tres y cinco días de incubación; características que coincidieron con las observadas en la morfología de las colonias de los rizobios caracterizados en esta investigación.

Spaink *et al.* (1998), explican que las colonias con apariencia translúcida se observan así debido a la monocapa de lipopolisacáridos (lípidos A, núcleo sacáridos y antígeno O) que produce el rizobio, la cual se proyecta al exterior y le da una coloración transparente y una consistencia mucosa, mucilaginoso o acuosa. Vargas (1969), citado por Pérez (2011), indica que esto se produce más abundantemente si el medio contiene manitol el cual estimula su producción. Algunos de los aislamientos producen menos cantidad de lipopolisacáridos que otros, dando una apariencia y coloración distinta, hecho que se observó en la morfología de las cien cepas purificadas, donde la apariencia de las colonias varió desde opaca hasta brillante y translúcida; y la coloración desde

rosado coral a rosado pálido.

En los rizobios de los cultivos de chocho se encontraron cepas con características del género *Ochrobactrum* y una cepa (C8 B) con características del género *Bradyrhizobium*. Se descartó *Rhizobium* ya que no se ha descrito nodulación por parte de este género en *Lupinus* (Sucojayo *et al.*, 1998, Trujillo *et al.*, 2005). Martínez (2007), citado por Moreno (2010), describe a las especies de *Bradyrhizobium*, por lo general secas, opacas, y gomosas, raramente translúcidas, con forma circular, elevación convexa o pulvinada, con tendencia a tener textura granulosa, y el tamaño de las colonias de 1 mm a los siete días de incubación; características que coincidieron con las observadas en la morfología de la cepa C8 B. Por otra parte, Trujillo *et al.* (2005), observaron que las especies del género *Ochrobactrum*, son mucoides, con bordes enteros y un diámetro promedio de 2-3 mm a los tres días de incubación.

Caracterización bioquímica.- La caracterización bioquímica de los aislamientos permitió revelar que desde el punto de vista de las capacidades metabólicas y de resistencia a condiciones adversas de crecimiento, existe cierta heterogeneidad en las poblaciones de rizobios nodulantes de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia. Al respecto, Buendía-Clavería *et al.* (1991) indican que estas propiedades servirían para seleccionar cepas y de aquí manipular genes simbióticos. Matos-Cuzcano y Zuñiga-Dávila (2002), aseguran que las cepas que no ofrecen resultados en experimentos de laboratorio resultarían inadecuadas en el campo, por lo que es muy importante realizar ensayos de selección previos a su liberación como inoculantes.

Se observaron diferencias entre cepas de un mismo género, así como de especie (cepas de referencia del banco del INIAP), al realizar las pruebas bioquímicas. Amarger (2001) y Graham & Parker (1964), citados por Díaz (2010) afirman que la capacidad de los microorganismos para crecer en diferentes condiciones de cultivo puede variar ampliamente incluso entre cepas de la misma especie, sin embargo hay algunas características que pueden ser típicas de especie e incluso, cuando las condiciones son extremas, pueden diferenciar entre géneros o categorías superiores.

Crecimiento en fuentes de carbono y de nitrógeno.- La mayoría de cepas aisladas de los cinco cultivos de leguminosas fueron capaces de utilizar casi todas las fuentes de carbono de tipo glucídico, tanto azúcares como polialcoholes, y los ácidos orgánicos. Amarger (2001), indica que los rizobios son quimiorganótrofos, es decir, utilizan una gran variedad de compuestos como fuente de carbono y de nitrógeno para crecer. Sin embargo, explica, el espectro de componentes que pueden ser metabolizados parece ser dependiente de la cepa y puede reflejar diferencias de adaptación a la rizósfera de la leguminosa o a los componentes orgánicos del suelo, teniendo esta variación entre los aislados implicaciones ecológicas.

La fuente de carbono metabolizada por la mayoría de cepas fue el ácido orgánico D-glucorónico (89%), seguido de galactosa (88%), sorbosa (87%), lactato, tartrato y glucosa (86%), xilosa (81%), fructosa y maltosa (80%). Fue más variable la asimilación del polialcohol dulcitol (79%), eritritol (77%), y el azúcar sacarosa (75%). En cuanto a los ácidos orgánicos, el menos utilizado como fuente de carbono fue el citrato, con apenas el 29% de asimilación. Estos resultados son similares a los reportados por Díaz (2010), donde cepas de *Rhizobium* empleadas para la inoculación de leguminosas asimilaron casi todas las fuentes de carbono de tipo glucídico en los diferentes medios donde fueron cultivadas, y en cuanto a los ácidos orgánicos, prácticamente ninguno de los incluidos en el estudio fueron utilizados como fuente de carbono. Este comportamiento de las cepas, explica el autor, puede ser debido probablemente a algún mecanismo de adaptación.

La asimilación de fuentes de carbono de tipo glucídico como el eritritol, los ácidos orgánicos como el citrato y algunos aminoácidos como la L-serina han mostrado su utilidad para diferenciar especies del género *Rhizobium* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados de este trabajo, ninguna de las fuentes de carbono y nitrógeno analizadas en la investigación mostró diferencias claras entre los diferentes grupos de rizobios, lo cual según Díaz (2010), es muy habitual en cepas que se han aislado de ecosistemas bastante próximos, como en este caso en el que las cepas se aislaron de una misma provincia.

Se evidenció que tanto las cepas de crecimiento rápido, como la cepa de crecimiento lento asimilaron la mayoría de fuentes de carbono. Este resultado discrepa con estudios previos obtenidos por Elkan & Bunn (1991) citado por Taurián *et al.* (2002), que proponen que las cepas del género *Bradyrhizobium* no utilizan los disacáridos (maltosa, lactosa, sacarosa), por carecer de un sistema de incorporación de disacáridos y disacaridasas. Por otro lado, coinciden con los obtenidos por Van-Rossum *et al.* (1995), citado por Jerez (2004), y por Taurián *et al.* (2002), quienes encontraron, respectivamente, que cepas nodulantes de *Arachis hypogaea* y cepas nodulantes de maní en suelos argentinos, metabolizaron disacáridos como fuentes de carbono.

En cuanto a los aminoácidos y compuestos derivados, fueron utilizadas por casi todas las cepas como fuentes de nitrógeno la L-tirosina (90%) y en menor proporción el L-triptófano (69%). La mayoría de rizobios de las cinco leguminosas fueron incapaces de asimilar la glicina (21%). Según Jerez (2004), pudo deberse a que esta fuente de nitrógeno ensayada no sea la adecuada para los rizobios.

Resistencia a antibióticos.- Dentro de las características fenotípicas, el espectro de resistencia natural a antibióticos es uno de los aspectos más importantes en la fisiología de la célula bacteriana ya que dependiendo de su nivel de tolerancia, el microorganismo es capaz de sobrevivir cuando existe una interacción antagonista con otras especies bajo condiciones naturales (Ramírez, 1995). Además, Cuadrado *et al.* (2009) afirman que es útil por su fiabilidad a bajos niveles de antibiótico, estabilidad y reproducibilidad durante un largo período. Sin embargo, varios autores explican que tiene bajo valor taxonómico porque muchas veces la resistencia natural a antibióticos es codificada en plásmidos y se transfiere fácilmente de unas cepas a otras (Amarger, 2001; Graham, 1963, Cole & Elkan, 1979, Hagedorn, 1979, citados por Díaz 2010).

Las cepas de los cinco cultivos de leguminosas presentaron resistencia, en su mayoría, al ácido nalidíxico (74%), seguido de la estreptomina (46%), la kanamicina (20%), y por último, el antibiótico menos tolerado fue el cloranfenicol (9%). Las cepas de rápido crecimiento, demostraron tener un amplio espectro de tolerancia, en

comparación a la cepa de crecimiento lento (C8 B), la cual no resistió ninguno de los cuatro antibióticos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Odee *et al.* (1997) y Cuadrado *et al.* (2009), pero contrarios a lo que señala Jordán (1984), citado por Marquina *et al.* (2011), quien describe que la mayor susceptibilidad es característica del género *Rhizobium* a diferencia de las cepas de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium* en cuanto al número y concentraciones de antibióticos ensayadas. Hartman (1989), citado por Jerez (2004), describe que el espectro de resistencia intrínseca a antibióticos pone de manifiesto la diversidad genética en las poblaciones de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

La mayoría de cepas no toleraron a los antibióticos kanamicina y cloranfenicol, lo cual muestra sensibilidad ante estos dos agentes antimicrobianos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chen *et al.* (1997), donde 55 aislamientos de *Rhizobium* sembrados en LMA con discos de kanamicina (5 µg/mL) y cloranfenicol (10 µg/mL), no crecieron en el medio de cultivo lo cual indicó sensibilidad de las cepas ante estos antibióticos, cabe mencionar, que utilizaron concentraciones más bajas que las usadas en este estudio; y por Xavier *et al.* (1998) donde rizobios nodulantes de fréjol aislados en zonas tropicales del noreste brasileño fueron sensibles a cloranfenicol. Sucojayo *et al.* (1998) señala que principalmente los actinomicetos del género *Streptomyces* son productores de una amplia gama de antibióticos en diferentes concentraciones como mecanismo de supervivencia, tales como el cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*), kanamicina (*Streptomyces kanamyceticus*), estreptomina (*Streptomyces griseus*), entre otros, los cuales son desfavorables para los rizobios afectando el desarrollo y por lo tanto su biodiversidad. Posiblemente, la sensibilidad a cloranfenicol y kanamicina podría deberse a la presencia de estos microorganismos en los suelos de Imbabura (dato no comprobado).

Se observó que los aislamientos presentaron resistencia a los antibióticos ácido nalidíxico y estreptomina. Esto podría estar relacionado con el hecho de que los cantones Cotacachi, Otavalo, y Antonio Ante son tradicionalmente agrícolas, sometidos desde hace años a un manejo intensivo de cultivos, especialmente fréjol y arveja, con el

uso de agroquímicos y altos insumos, a los cuales las cepas y microorganismos del suelo en general, pudieron haberse adaptado a las condiciones adversas, seleccionando a determinados productos químicos (Romero-Rojas, 2009). Además, Romero y Bernal (2008) aseguran que en los suelos del trópico se pueden encontrar poblaciones altas de actinomicetos, y al contrario de lo mencionado anteriormente por Sucojaya *et al.* (1998), indican que los rizobios podrían vivir sinérgicamente con este grupo de microorganismos generando mecanismos enzimáticos que confieran tolerancia o resistencia a los diversos antibióticos o sustancias antimicrobianas producidos por ellos, presentes en el suelo.

Los resultados de este estudio son comparables a los observados por Beynon & Josey (1980), citados por Jerez (2004), en poblaciones de *Rhizobium phaseoli* donde cada cepa tuvo un patrón de resistencia a antibióticos muy particular, observando 56 tipos de patrones de resistencia de 259 cepas estudiadas. Milicic *et al.* (2006) indican que la resistencia a antibióticos puede estar mediada por la cantidad de goma, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares, que interfieren en el paso de compuestos hacia dentro de las células bacterianas evitando lisis celular o inhibición de síntesis de proteínas.

Tolerancia a metales pesados.- La mayoría de las cepas presentaron resistencia a aluminio (87%), seguido de cobre (83%), plomo (60%), y por último, el menos tolerado fue el zinc (21%). El análisis de los suelos de los cantones Antonio Ante, Cotacachi y Otavalo, de la provincia de Imbabura (INIAP-DMSA, 2013) reportó un nivel medio de zinc (2.9 ppm), un nivel alto de cobre (6.9 ppm), y reveló que no existe presencia de aluminio en estos suelos; claramente los resultados obtenidos no se correlacionan con el componente químico de los suelos de Imbabura.

Cuadrado *et al.* (2009) explican que la tolerancia al aluminio es una característica realmente deseable para la selección de un bioinóculo, principalmente en suelos ácidos, donde éste suele acumularse, ya que es un metal tóxico, que actúa inhibiendo el alargamiento, la división celular, e incluso la nodulación de las raíces, afectando la

sobrevivencia de los rizobios (Hirsch *et al.*, 1993). Yelton *et al.* (1983), encontraron cepas de *Rhizobium* resistentes a Al^{+2} y a bajos niveles de pH (5), similar a lo observado en este estudio.

Brooks *et al.* (1994) observaron que la fijación biológica de nitrógeno se ve afectada por el zinc, influyendo negativamente en la población de rizobios en el suelo. La sensibilidad de las cepas al zinc, pudo deberse a la concentración ensayada de este metal en el medio de cultivo. Cubillas-Ramírez (2008), señaló que la presencia de 0.4 mM de zinc en el medio de cultivo tiene un efecto inhibitorio sobre cepas de *Rhizobium*, debido a la ausencia de alguno de los plásmidos (p24c, p42c y p42f) que están involucrados con la resistencia a zinc.

Tong & Sadowsky (1994), y Somasegaran & Hoben (1994), observaron que las cepas del género *Bradyrhizobium* son tolerantes a la presencia de 4 mg/L de zinc. Los mismos autores encontraron que ninguna de las seis especies de *Rhizobium* ensayadas pudo crecer en presencia del metal, dato que es contrario a lo observado en este estudio, donde la cepa de crecimiento lento (C8 B) no resistió ningún metal pesado.

Niveles de pH.- Para observar el crecimiento de las cepas en estudio en condiciones a las cuales pudieran encontrarse en su ambiente natural, se efectuaron pruebas de resistencia a diferentes valores de pH. Se demostró que del total de las cepas, el 58% toleraron pH 5, seguido de pH 8.5 (15%), y por último, el menos tolerado fue pH 4.5 (12%). Varias cepas mostraron un crecimiento débil en los diferentes niveles de pH evaluados. García (2008) explica que estos resultados son comunes en los rizobios aunque algunas veces se ha encontrado una cierta correlación entre el pH del suelo del que se aíslan las cepas y la tolerancia al pH en medio de cultivo. El análisis de suelos de los tres cantones objeto de muestreo de la provincia de Imbabura (INIAP-DMSA, 2013) demostraron que algunas de las cepas que crecieron a pH 5 fueron aisladas de suelos con pH próximos a este valor (suelo ácidos), y la mayoría fueron aisladas de suelos ligeramente ácidos (pH 6.3), por lo que se podría correlacionar el pH del suelo y tolerancia al pH in vitro (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

Se observó que las cepas de crecimiento rápido son más tolerantes a la acidez, y algunas a la alcalinidad, que la cepa de crecimiento lento (C8 B), la cual fue sensible a los tres niveles de pH ensayados, resultados contrarios a los obtenidos por Van-Rossum *et al.* (1994) que indican que miembros del género *Bradyrhizobium* son más tolerantes a la acidez que los del género *Rhizobium*; pero similares a los obtenidos por Prévost *et al.* (1994), citados por Matos-Cuzcano y Zúñiga-Dávila (2002), quienes plantearon que de 17 cepas de *Bradyrhizobium* sp. evaluadas en su tolerancia a pH 8.5, ninguna presentó crecimiento, y por Jordan (1984), Hamdi (1985) y Matos *et al.* (2001) citados por Cuadrado *et al.* (2009), quienes señalan, que usualmente las cepas del género *Bradyrhizobium* no crecen a pH extremos y son los menos tolerantes a la alcalinidad.

Solo algunas de las cepas aisladas de Imbabura pudieron crecer a pH 8.5, lo cual concuerda con lo establecido por Fernández y Novo (1988), quienes afirman que no es común encontrar un buen desarrollo de los rizobios a un pH igual o mayor de 8.0, sin embargo Prévost *et al.* (1998) citado por Bécquer (2004) encontraron crecimiento de cepas rizobiales de *Centrosema virginianum* y *Neonotonia wightii* en pH 10.0, lo cual puede estar vinculado a las exigencias del microorganismo a adaptarse a condiciones adversas de su microhábitat, tipo de suelo y planta hospedante.

Cabe destacar que en esta investigación, muy pocas cepas toleraron un nivel de pH 4.5. Antipchuck (1994), citado por Contreras-Solar *et al.* (2007) indica que la ausencia de crecimiento a niveles bajos de pH puede obedecer al hecho de que en esas condiciones los rizobios se debilitan, disminuye notablemente su metabolismo y cesa la actividad de la enzima nitrogenasa. Además, Philippus *et al.* (2008), Hassan-Moawad (2004) y Vriezen *et al.* (2007) señalan que el efecto del pH bajo tiene gran influencia sobre la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo, generando deficiencias de fósforo disponible, lo que a su vez puede afectar la fijación de nitrógeno.

La cepa de referencia *R. tropici* creció en todos los niveles de pH, ácidos y alcalinos, mientras que las cepas de *R. etli* toleraron solo pH de 5. Resultados similares se registraron en un estudio con varias cepas de *R. etli* aisladas de suelos de Egipto (DNP,

2009, citado por Cuadrado *et al.*, 2009), en donde la mayoría eran capaces de sobrevivir a pH 4.7-5 y *R. tropici* CIAT 899 a pH 4. Igualmente, Shamseldin & Werner (2005) evidenciaron que especies de crecimiento rápido tales como *R. loti*, *R. leguminosarum* y *R. tropici* pueden crecer a pH 4.0.

Tolerancia a salinidad.- Con respecto a la tolerancia al NaCl, al igual que lo observado en condiciones de acidez, se encontró que los aislamientos de crecimiento rápido mostraron mayor tolerancia a la sal, que la cepa de crecimiento lento (C8 B), la cual no creció en ninguna concentración. Estos resultados son análogos con los informados para rizobios y bradyrizobios nodulantes de leguminosas arbóreas de Kenya (Odee *et al.*, 1997) y microsimbiontes de *Acacia maligna* (Taurián *et al.*, 2002), en los cuales los microsimbiontes rápidos mostraron mayor tolerancia frente a esta condición de estrés; y con los datos de Elsheikh & Wood (1995), Odee *et al.* (1997) y Mpeperekí *et al.* (1997) quienes no obtuvieron crecimiento en concentraciones mayores de 1% con cepas de *Bradyrhizobium* sp. Shamseldin & Werner (2005) afirman que la tolerancia a la salinidad es otra propiedad presente en las cepas de crecimiento rápido pertenecientes al género *Rhizobium* en relación a los simbioses de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium*.

Del total de las cepas rizobianas, tan solo el 29% resistieron concentraciones de NaCl 0.5%, seguido de NaCl 1% con el 11%, y por último, NaCl 2% con apenas 6%; en el caso de las dos últimas concentraciones (NaCl 1% y 2%) se observó que solo las cepas de referencia provenientes del banco de rizobiología del INIAP, y dos cepas de chocho recolectadas de Imbabura, crecieron a esas condiciones de salinidad. Estos resultados están dentro de la normalidad, ya que según Kuykendall *et al.* (2005) *Rhizobium* no tolera concentraciones altas de sal, y habitualmente no crecen en valores de NaCl 2% o superiores.

Las cepas de diferentes especies de rizobios muestran una marcada variabilidad en cuanto a la tolerancia a los suelos salinos (Hassan-Moawad, 2004; Vriezen *et al.*, 2007; Philippus *et al.*, 2008), tal como lo observado en esta investigación entre las cepas de

Rhizobium leguminsarum biovar *viciae* de arveja que toleraron la salinidad y las cepas de *Rhizobium etli* de fréjol que no lo hicieron. Zúñiga *et al.* (1996) explican que el estrés salino es permanente en el suelo, por lo que los organismos deben vivir y crecer en esas condiciones; y que la presencia de sal puede afectar la supervivencia del rizobio, disminuyendo la colonización de la raíz, el proceso de infección, el desarrollo del nódulo y la fijación de nitrógeno. Por tanto, Cuadrado *et al.* (2009) señalan que es conveniente estudiar los suelos de estas regiones con el fin de evaluar si la capacidad de resistencia al NaCl se relaciona directamente con un tipo de adaptación ya que las cepas con tolerancia a concentraciones altas de NaCl podrían tener un posible uso como bioinóculos.

Resistencia a urea.- La mayoría de las cepas (90%) toleraron a la urea bajo condiciones de laboratorio. Peticari (s.f.) explica que en el suelo, altas concentraciones de nitratos inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad nitrogenasa, disminuyendo la fijación biológica de nitrógeno. Los resultados de esta prueba bioquímica indican que los aislamientos son capaces de resistir la presencia de fertilizantes nitrogenados en el suelo.

Las cepas de rizobios aisladas de los suelos de Imbabura, en general, presentaron una baja tolerancia a cambios radicales de pH del medio (4.5 y 8.5), a altas concentraciones de sales (1% y 2%), a un metal pesado (zinc), a dos antibióticos (kanamicina, cloranfenicol) y una restringida utilización a una fuente de energía (citrato) y una de nitrógeno (glicina), lo que sugiere que el comportamiento de las poblaciones microbianas de rizobios presentes en los suelos de la provincia de Imbabura podrían estar siendo influenciadas por los factores bióticos y abióticos donde se encuentran estas bacterias (Romero-Rojas, 2009).

Las cepas de rizobios de fréjol, arveja, haba y vicia de la provincia de Imbabura son clasificados taxonómicamente dentro del género *Rhizobium*, ya que poseían las siguientes características: mediana y abundante nodulación en la raíz secundaria de las plantas, cepas de crecimiento rápido, productoras de ácido, bacilos Gram negativos

móviles, morfología colonial característica, capacidad media de resistencia a las condiciones de estrés y asimilación a las fuentes de carbono y nitrógeno.

Las cepas que se aislaron de nódulos de chocho pertenecen al género *Ochrobactrum*, ya que presentaron las siguientes características: escasa nodulación en la raíz primaria de la planta, cepas de crecimiento rápido, productoras de ácido, bacilos Gram negativos móviles, morfología colonial característica, gran capacidad de adaptación a condiciones de estrés y asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno.

La cepa C8 B es clasificada taxonómicamente dentro del género *Bradyrhizobium*, por haber mostrado las siguientes características: cepas de crecimiento lento, productoras de alcalinidad, bacilos Gram negativos móviles, morfología colonial característica, sensibilidad a condiciones de estrés y asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno.

Dentro de los aislados rizobianos de fréjol, cuatro cepas presentaron morfología idéntica a *Rhizobium etli*, con un coeficiente de similitud de 100%. Sin embargo, al realizar las pruebas bioquímicas, ocho cepas exhibieron características metabólicas similares a esta especie, con un coeficiente de 91%.

Por otra parte, las rizobios de fréjol pertenecientes al banco del INIAP, mostraron características morfológicas y metabólicas análogas a *Rhizobium tropici*, con un coeficiente de similitud de 91%. No obstante, se consideraron también sospechosas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, pues FR 1063, presentó un coeficiente de 100% con la cepa TAL 1236, indicando que la morfología, bioquímica, y las pruebas de autenticación fueron iguales para estas dos muestras; mientras que FR 1511, exhibió un coeficiente de similitud de 96%.

De las cepas de rizobios aisladas de arveja, cuatro visualizaron una similitud de 88% con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, en cuanto a la morfología. Pero solo dos

cepas, presentaron metabolismo similar a esta especie, con un coeficiente de 96%.

Tres cepas de rizobios de haba, presentaron morfología igual a *Rhizobium fabae* (Tian *et al.*, 2008), sin embargo, solo una cumplió con las características metabólicas de la misma.

Las dos cepas rizobianas de haba del banco del INIAP, se consideraron sospechosas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. La cepa FB 481 exhibió los mismos patrones morfológicos y metabólicos que TAL 1236, con un coeficiente de similitud de 100% (además las pruebas de autenticación fueron iguales); y la cepa HA-VIC-001 mostró un coeficiente de 96%.

Dentro de los aislados rizobianos de chocho seis cepas manifestaron características morfológicas similares a *Ochrobactrum lupini* (Trujillo *et al.*, 2005), más no coincidieron las características metabólicas.

Tres cepas de rizobios de vicia coincidieron morfológicamente (similitud del 100%) con la especie *R. leguminosarum* bv. *viciae*, pero ninguna presentó la bioquímica de la misma.

Para confirmar estos resultados es necesario hacer el análisis molecular de las muestras, que permita identificar a nivel de especie a los géneros rizobiales caracterizados en esta investigación.

Las cepas de rizobios, provenientes del banco del INIAP, poseen amplios límites de tolerancia a condiciones de estrés (pH ácidos y alcalinos, salinidad, metales pesados, urea, antibióticos) y gran capacidad de metabolizar diversas fuentes nutricionales. Así mismo, cabe destacar que en general, las cepas de chocho fueron los aislamientos más resistentes a las condiciones de estrés de los cinco cultivos de leguminosas.

Los resultados de este estudio concuerdan con algunas investigaciones realizados en regiones tropicales por varios autores (Contreras-Solar *et al.*, 2007, Cuadrado *et al.*, 2009, Marquina *et al.*, 2011), en el sentido de hallar una diversidad de especies rizobianas formadoras de nódulos en varias leguminosas, presentes en diferentes localidades. Lafay & Burdon (2007) han indicado que los trópicos constituyen un importante reservorio de genes de fijación de nitrógeno, ya que según Martínez-Romero (2003) *Rhizobium* puede adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas en climas tropicales, encontrándose en una diversidad de tipos de suelos. Además, se evidenció que existen bacterias formadoras de nódulos no relacionadas genéticamente a las cepas de referencia, y según Marquina *et al.* (2011), sugiere transferencia horizontal de los genes simbióticos que confieren esta propiedad.

Finalmente, se aislaron cepas que mostraron capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que plantean una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Pueden ser consideradas para su evaluación en ensayos de invernadero y campo, que permitan confirmar las respuestas obtenidas en laboratorio; lo cual las hace buenas candidatas para el diseño y elaboración de biofertilizantes que respondan a las características ambientales y de cultivo de las localidades en estudio en la provincia de Imbabura y demás provincias. El resto de las cepas no debe ser descartado, ya que Hernández-Flores (2011) asegura que con el seguimiento adecuado pueden llegar, igualmente, a ser útiles en el diseño de inoculantes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Las cepas de rizobios aisladas de nódulos de arveja, fréjol, haba y vicia de la provincia de Imbabura, pertenecen al género *Rhizobium*.

Las cepas de rizobios aisladas de nódulos de chocho de la provincia de Imbabura, pertenecen al género *Ochrobactrum*.

Las cepas de rizobios 001-AR-EC, 002-AR-EC, 005-AR-EC, ECUA-11, FR 1511, FR 1063, HA-VIC-001 y FB 481 del banco de rizobiología del INIAP, pertenecen al género *Rhizobium*.

La cepa de rizobio C8 B del banco de rizobiología del INIAP, pertenece al género *Bradyrhizobium*.

Las plantas de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, establecen simbiosis con rizobios de crecimiento rápido en los suelos de la provincia de Imbabura.

La planta de chocho es una leguminosa que se asocia con rizobios de crecimiento rápido y de crecimiento lento.

Las cepas de rizobios de crecimiento rápido exhibieron mejores cualidades de tolerancia a factores estresantes que la cepa de crecimiento lento C8 B.

Las cepas de rizobios asociadas a los nódulos de arveja R-AR-PEG-24, UMR 6101, 001-AR-EC, 002-AR-EC y TAL 1236, de chocho R-CH-MO-78b, de fréjol R-FR-QG-60, UMR 1899, FR 1511 y FR 1063, de haba R-HA-QUI-31, HA-VIC-001 y FB 481, y de vicia R-VI-SA-17b, son las más resistentes a las condiciones de estrés, y las que más asimilan las fuentes de carbono y nitrógeno ensayadas.

Las pruebas de crecimiento en diversas fuentes de carbono y nitrógeno, y de tolerancia a diferentes condiciones de estrés de pH, NaCl, antibióticos, metales pesados y urea, son útiles para esbozar la diversidad genética de los rizobios y estudiar su papel ecológico e interacción con el ecosistema; sin embargo, no son concluyentes para identificar géneros y especies de estas bacterias.

El análisis de conglomerados de la caracterización morfológica indica la formación de siete grupos de cepas de rizobios asociadas a arveja, seis a chocho, seis a fréjol, cinco a haba, y cuatro a vicia, lo cual expresa variabilidad morfológica entre las cepas aisladas.

El análisis de conglomerados de la caracterización bioquímica indica la formación de once grupos de cepas de rizobios asociadas a arveja, seis a chocho, trece a fréjol, once a haba, y ocho a vicia, lo cual expresa variabilidad metabólica entre las cepas aisladas.

Existe alta diversidad morfológica y bioquímica de los rizobios recolectados de suelos de la provincia de Imbabura, con características particulares de gran interés para el desarrollo de prácticas agrícolas en esta región.

El banco germoplásmico de microsimbiontes nodulantes de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, servirá como una colección de referencia para posteriores investigaciones en asociación con su hospedero.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

Caracterizar molecularmente las cepas para identificar a nivel de especie a los rizobios nativos de la provincia de Imbabura.

Estudiar los suelos de las localidades donde se recolectaron los nódulos, con el fin de evaluar si la capacidad de resistencia de las cepas nativas a las condiciones de estrés y la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno se relaciona directamente con un tipo de adaptación.

Evaluar a nivel de invernadero y campo el potencial fijador de nitrógeno de las cepas caracterizadas y su efecto en la promoción del crecimiento de las plantas.

Desarrollar pruebas de biofertilización con los rizobios más resistentes a las condiciones de estrés como alternativa para mejorar las condiciones físico-químicas de los suelos de Imbabura, en beneficio de la productividad agrícola de la provincia y demás regiones con características edafoclimáticas similares.

Llevar a cabo un estudio que permita identificar al mejor sustrato como portador de la bacteria, para fines prácticos, en el sentido de producir inoculantes.

Recolectar nódulos de las leguminosas estudiadas en otras regiones del país, complementando conocimientos adquiridos con la investigación realizada acerca de la biodiversidad de los rizobios en Ecuador.

Sincronizar la fecha de recolección de los nódulos con la época de crecimiento vegetativo de las leguminosas cuando haya adecuada disponibilidad de agua en el suelo, ya que en ese período los nódulos son más abundantes y activos.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Acero-Duarte, L.E. y Rodríguez-Montenegro, L. (1987). Algunas leguminosas de utilidad potencial en el sector agropecuario en tres regiones de Colombia. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF). 11: 1-60.
- Aguilar, M., Riva, O. & Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(37): 13548-13553.
- Allen, O.N. & Allen, E.K. (1981). The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Wisconsin, USA. pp. 750.
- Altieri, M.A. (1999). Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable (en línea). 4 ed. Editorial Nordan–Comunidad. Montevideo, UR. pp. 58. Extraído el 25 de marzo, 2013, de: <http://www.agroeco.org/socla/pdfs/Agroecologia.pdf>
- Amarger, N. (2001). Rhizobia in the field. En Advances in Agronomy. London, UK. Academic Press. 73: 109-168.
- Applied Biostatistics Inc. (1998). NTSYS-pc manual. Exeter Software, Satauket. New York, USA. pp. 206.
- Areadne-Sosa, A., Elías, O.A. y García, M.S. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 38(2): 197-201.

- Arrese-Igor, C., González, E.M., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Gálvez, L., Royuela, M., Cabrerizo, P.M. & Aparicio-Tejo, P.M. (1999). Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis*. 27: 189–212
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, ME). (2000). El haba y su carácter multifuncional en la agricultura: Usos alternativos del cultivo de haba (en línea). Gobierno de México. Extraído el 25 de marzo, 2013, de: http://qacontent.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/haba/groups/public/documents/edomex_archivo/icamex_arc_revhaba.pdf
- Bashan, Y. (1997). Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundimarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. pp. 1-3.
- Bécquer, C.J. (2004). Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología*. 18(1): 9-29.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M.A., Christen, R., Heulin, T. & Achouak, W. (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 367-372.
- Bergensen, F.J. (1997). Regulation of nitrogen fixation in infected cells of leguminous root nodules in relation to O₂ supply. *Plant Soil*. 191: 189-203.
- Bernal, G. & Graham, P. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*. 47(6): 526-534.

- Bernal, G., Suárez, A., Campaña, D., Jerez, M., Salvador, C., Graham, P. y Aguilar, M. (2004). Selección de cepas de *Rhizobium* adaptadas a condiciones de campo, y su uso como inoculantes de leguminosas de la Sierra y Costa Ecuatoriana. Ed. G Bernal. Quito, EC. pp. 80.
- Bernal, G. (2006). La fijación biológica del nitrógeno: componente clave de la fertilidad de los suelos y el rendimiento de cultivos en Ecuador. 1 ed. Fundación GAIA/INIAP. Quito, EC. pp. 145.
- Bernal, G. (2012). Selección de cepas de *Rhizobium* asociadas a leguminosas en el Ecuador: Casos INIAP y ANCUPA. IX Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Cuenca, EC. pp. 9.
- Brockwell, J. & Bottomley, P. (1995). Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*. 27(4/5): 683-697.
- Brooks, D.S., González, C.F., Appel, D.N. & Filer, T.H. (1994). Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biology Conservation*. 4: 373-381.
- Brom, S., García de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. & Romero, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid*. 44: 34-43.
- Bruulsema, T.W., Witt, C., García, F., Li, S., Rao, T.N., Chen, F. & Ivanova, S. (2008). A Global Framework for Fertilizer BMPs. *Better Crops With Plant Food*. 92(2): 13-15.
- Buendía-Clavería A.M., Moussaid, A., Gil-Serrano A.M., Moreno J. Ollero, F. y Ruiz-Sainz, J.E. (1991). Efecto pleiotrópico de una mutación en el plásmido

simbiótico de *Sinorhizobium fredii* HH103E. En: Perspectivas de la Fijación Biológica del Nitrógeno en el Umbral del siglo XXI. (1998). Eds. C. Arrese, M. Royuela, P.M. Aparicio-Tejo. Universidad Pública de Navarra, ES. pp. 106-110.

Calegari, A., Mondardo, A., Bulisani, E., Do Prado, L., Da Costa, B., Bardanil, P., Miyasaka, S. y Amado, T. (1992). Caracterizacáo das principais espécies de adubo verde. In. Adubacáo verde no sul do Brasil. Coordenacáo: Ríó de Janeiro, BRA. pp. 347.

Campaña-Cruz, D.F. (2003). Evaluación de tres cepas de *Rhizobium etli* bajo condiciones de campo y de ocho soportes de la bacteria para la producción de inoculantes en dos variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis. Ing. Agr. Quito, EC. UCE, Facultad de Ciencias Agrícolas. pp. 117.

Carranza, C. (2004). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los Departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Tesis Quím. Biól. Guatemala, GU. USAC. Facultad de Ciencias y Farmacia. pp. 59.

Cayo, P. y Rojas, F. (2006). Efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* sp. en relación a la nodulación del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) abonado con humus de lombriz en la zona media del valle de Ica. Tesis Ing. Agr. Ica. PE. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Facultad de Ciencias Agropecuarias. pp. 91.

Chasi-Caisaguano, A.L. y Muso-Defaz, M.H. (2009). Evaluación del efecto de la incorporación de cinco especies de leguminosas como abono verde en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en tres localidades de la provincia de Cotopaxi. Tesis Ing. Agr. Cotopaxi, EC. UTC. Facultad Ciencias Agrícolas. pp. 128.

- Chen, W., Tan, Z., Gao, J., Li, Y. & Wang, T. (1997). *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Journal of Systematic Bacteriology*. 47(3): 870-873.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). (1988). Simbiosis leguminosa-rizobio: manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales y del Programa de Frijol (comps.). pp. 178.
- CICO (Centro de Información e Inteligencia Comercial, EC). (2009). Perfil de fréjol (en línea). CORPEI. Extraído el 27 de enero, 2013, de: www.pucesi.edu.ec/pdf/frejol.pdf
- Constante-Olivero, D. (1993). Influencia de cuatro portadores en la eficiencia y competitividad de *Rhizobium meliloti* en campo. Tesis. Ing. Agr. Quito, EC. UCE. Facultad Ciencias Agrícolas. pp. 74.
- Contreras-Solar, C.X., Iriarte-Martínez, J.L. y Muñoz-Acosta, A.P. (2007). Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués, Departamento de Sucre. Tesis Biol. Sincelejo, CO. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. pp. 153.
- Coyne, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. International Thomson Publishing. Paraninfo. Madrid, ES. pp. 450.
- Cuadrado, B., Rubio, G. y Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de

- fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 38(1): 78-104.
- Cubillas-Ramírez, C.A. (2008). Participación de los plásmidos de *Rhizobium etli* CFN42 en la resistencia a zinc y cobalto. Tesis Lic. Biol. Veracruz, ME. UV. pp. 50.
- Cunachi, A. (2006). Autenticación y eficiencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovariedad *desviceae* y *trifolli* y de *Rhizobium melitoli*. Tesis. Ing. Agr. Riobamba, EC. ESPOCH. Facultad de Recursos Naturales. pp. 46.
- Danso, S.K. y Eskew, D.L. (s.f.). Aumento de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno (en línea). Agricultura y Alimentación. OIEA Boletín. 26(2): 29-33. Extraído el 30 de agosto, 2013, de: http://www.iaea.org/Publications/Magazines/Bulletin/Bull262/Spanish/26206882933_es.pdf
- De Felipe, M. (2006). Fijación biológica de nitrógeno atmosférico en vida libre: Fundamentos y Aplicaciones. Eds. E. Bedmar, J. Gonzálo, C. Lluch y B. Rodelas. Granada, ES. Sociedad Española de Microbiología (SEFIN). pp. 16
- Díaz, C. (2010). Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis Doctoral. León, ES. Universidad de León. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. pp. 121.
- Elsheikh, E.A.E. & Wood, M. (1995). Nodulation and N₂ fixation by soy bean inoculated with sal-tolerant rhizobia o salt-sensitive Bradyrhizobia in saline. Soil Biology and Biochemistry. 27: 656-661.

- Ernst, O. (2004). Leguminosas como cultivo de cobertura. *Informaciones agronómicas del Cono Sur*. 2: 1-9.
- Fernández, C. y Novo, R. (1988). *Vida microbiana en el suelo*. Universidad de La Habana, CU. pp. 525.
- Flórez-Serrano, J. (2009). *Agricultura ecológica: Manual y guía didáctica* (en línea). Madrid, ES. Mundi-Prensa Libros. Extraído el 5 de enero, 2013, de: http://books.google.com.ec/booksid=GxYfKYV_9awC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false
- Franco-Ramírez, J.F. (2004). *Producción de biopolímeros vía fermentativa utilizando cepas de *Rhizobium leguminosarum**. Tesis Ing. Quím. Bogotá, CO. UNAL. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Departamento de Ingeniería Química. pp 67.
- Freire, J. (1996). *For the *Rhizobium*-legume symbiosis. Biological nitrogen fixation; ecology, technology and physiology*. New York, US. Plenum Press. pp. 72.
- Gallego, R. y Sanz, J.C. (2001). *Diccionario Akal del color*. Ediciones Akal. 29: 1042.
- García, A. y Correa, D. (2010). *Uso de indicadores de calidad del suelo como estrategia para prevenir su degradación*. Publicado en *Memorias del XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*. Santo Domingo, EC. 1 disco compacto, 8 mm (CD-Rom).
- García, J. (2008). *Identificación y caracterización de cepas que nodulan *Phaseolus* en diferentes regiones de España*. Tesis Doctoral. Salamanca, ES. Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales. pp. 143.

- Gibson, K.E., Kobayashi, H. & Walker, G.C. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics*. 42: 413-441.
- González-Vargas, P. (2001). Fijación de nitrógeno en trébol blanco (*Trifolium repens*) por la población local de *Rhizobium* de un suelo franco arenoso del Cadet. Tesis. Ing. Agr. Quito, EC. UCE, Facultad de Ciencias Agrícolas. pp. 102.
- Graham, P. (2004). *Rhizobium* Research Laboratory (RRL) (en línea). University of Minnesota, US. Extraído el 8 de septiembre, 2012, de: <http://www.rhizobium.umn.edu/research/publications.php>
- Grisales, T.V. y Fuentes, J.E. (2005). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a a la leguminosa *Teramnus volúbilis* sw. en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento de Sucre. Universidad de Sucre, CO. 122 pp.
- Guamán, F. y Yaguana, M. (2007). Caracterización morfo-fisiológica de bacterias fijadoras de N₂ en leguminosas herbáceas nativas de centro Loja y Valle de Casanga. Loja, EC. pp. 28.
- Hassan-Moawad, A.A. (2004). Application of microbial biotechnology for sustainable legume production in desert conditions. International Conference on Water Resources and Arid Environment. pp.10.
- Haukka, F. (1997). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Dissertations Biocentr Viikki Universttatis Helsingiensis. Tesis doctoral. pp. 74.
- Henríquez, M.A. (2003). Análisis de diversidad genética de patógenos con énfasis en *Phaeoisario psisgriseola* agente causal de la mancha angular (en línea).

Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, CO. Extraído el 1 de octubre, 2012, de: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Art14.pdf>

Hernández-Flores, L. (2011). Aislamiento y evaluación del potencial biofertilizante de bacterias aplicables en el desarrollo agrícola sostenible en Chihuahua. Tesis Doctoral. Puebla, ME. Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. pp. 171.

Hernández Mulford, J.L, Cubillos Hinojosa, J.G. y Milian Mindiola, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp. asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. 2: 51-62.

Hirsh, A., Luk, M.R. & Downie, J.A. (2001). What makes Rhizobia-Legume Symbiosis special. Plant physiology. 127: 1484-1492.

Hirsch, P., Jones, M., McGrath, S. & Giller, K. (1993). Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. Soil Biology and Biochemistry. 25: 1485-1490.

INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC). (2002). III Censo Nacional Agropecuario. Resultados Nacionales y Provinciales. Quito, EC. 1: 37-38; 117; 231.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1982). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 134.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC).

(1983). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 96.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1984). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 65.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1985). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 78.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1986). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 121.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1987). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 25.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1988). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 30.

INIAP-DF (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1989). Informe Anual del Departamento de Fitopatología (DF). Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 40.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1992). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. C Estévez. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP).

pp. 54.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1993). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. C Estévez. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 54.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1994). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. C Estévez. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 72.

INIAP-DMSA (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1994). Informe Anual del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA). Ed. J Córdova. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 65.

INIAP-DMSA (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (2013). Reporte del análisis químico de suelos de la provincia de Imbabura. Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA). Ed Soraya Alvarado. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). Base de datos (correo electrónico).

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (2001). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. G Bernal. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 27.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC).

(2002). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. G Bernal. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 30.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (2003). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. G Bernal. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 52.

INIAP-DNPV (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (2004). Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Ed. G Bernal. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 48.

INIAP-PRONALEG (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (2008). Informe Anual del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG). Ed. E Peralta. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 161.

Jacobsen, S.E. y Sherwood, S. (2002). Cultivo de Granos Andinos en Ecuador: Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Centro Internacional de la Papa (CIP), Catholic Relief Services (CRS). Quito, EC. pp. 91.

Jerez, M. (2004). Evaluación de Biotipos de *Bradyrhizobium* spp. en el cultivo del maní (*Arachis hypogaea* L.) en las provincias de Manabí y Loja. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. UCE, Facultad de Ciencias Agrícolas. pp. 127.

Kumar, S., Parthiban, T. & Rao, G. (2008). Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers.

Molecular Biology Reports. 36: 1951-1956.

Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). *Rhizobium*. (Frank 1889). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA. pp. 325-340.

Lafay, B. & Burdon, J.J. (2007). Molecular Diversity of Legume Root-Nodule Bacteria in Kakadu National Park, Northern Territory, Australia. PLOS ONE. 2(3): e277.

Lin, D.X., Chen, W.F., Wang, F.Q., Hu, D., Wang, E.T., Sui, X.H. & Chen, W.X. (2009). *Rhizobium mesosinicum* sp. nov. isolated from root nodules of three different legumes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 1919-1923.

Lodwig, E. & Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. Critical Reviews in Plant Sciences. 22: 37-38.

López, M. (2002). El uso de marcadores moleculares de ADN en el estudio de la biodiversidad de rizobios nodulantes de leguminosas silvestres del Noroeste Argentino. Tesis doctoral. La Plata, AR. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas. pp. 287.

Lorenzatti, S.N., Romagnoli, J.C. y Folguera, J.A. (s.f.). Utilización de vicia como cultivo de cobertura y su aporte de nitrógeno al cultivo de maíz posterior en siembra directa. Grupo Romagnoli y Aapresid. Extraído el 5 de enero, 2013, de: <http://www.gruporomagnoli.com.ar/images/assets/microsoft%20word%20-%20utilizaci%C3%B3n%20de%20vicia.pdf>

Lloret, L. y Martínez, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Programa de Ecología Genómica. Revista

Latinoamericana de Microbiología. 47(1/2): 43-60.

Mantelin, S., Fischer-Le Saux, M., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P. & Cleyet-Marel, J.C. (2006). Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 827-839.

Marquina, M., González, N. y Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Revista de Biología Tropical. 59(3): 1017-1036.

Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. Plant Soil. 252: 11-23.

Mateos, P.F., Baker, D.L., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J.I., Martínez-Molina, E., Squartini, A., Orgambige, G., Hubbell, D.H. & Dazzo, F.B. (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Canadian Journal of Microbiology. 47: 475-487.

Matos-Cuzcano, G. y Zuñiga-Dávila, D. (2002). Comportamiento de cepas nativas de rizobios aisladas de la Costa del Perú en dos cultivares de Pallar (*Phaseolus lunatus* L.). Ecología Aplicada. 1(1): 19-24.

Matos-Cuzcano, G., Ormeño-Orrillo, E. y Zúñiga-Dávila, D. (2007). Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en la costa central del Perú. Congreso Peruano de Ecología. Lima, PE. pp. 46.

- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M. & Amarger, N. (2002). Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology and Ecology*. 41: 77-84.
- Milicic, D., Delic, D., Kuzmanovic, D., Stajkovic, O. & Josic, D. (2006). Intrinsic antibiotic resistance of different *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium galegae* strains. *Roumanian Biotechnological letters*. 11(3): 2723-2731.
- Mpeperekhi, S., Makonese, F. & Wollum, A.G. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobial nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*. 22: 275-292.
- Morales-García, Y.E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R.D., Pérez-Terrón, R. y Muñoz-Rojas. J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Biotecnología*. 14(2): 11-29.
- Moreno, L. (2010). Caracterización de las cepas ICA L9 e ICA J196, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya. Tesis Máster. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. pp. 143.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Protoeobacteria. *Nature*. 411: 948-950.
- Newton, W. & Fisher, K. (2002). Nitrogen Fixation: A General Overview in Nitrogen Fixation at the Millenium. Ed G Jeffery Leigh . Elsevier Publications. pp. 34.

- Ochman, H. & Morán, N.A. (2001). Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*. 292: 1096-1099.
- Olivares, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno (en línea). Granada, ES. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Extraído el 15 de septiembre, 2012, de: <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>
- Odee, D.W, Sutherland, J.M., Makatiani, E.T, McInroy, S.G. & Sprent, J.I. (1997). Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil*. 188: 65–75.
- Ormeño-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zúñiga-Dávila, D. & Martínez-Romero, E. (2006). Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematic and Applied Microbiology*. 29: 253-262.
- Ortega, C. (2006). Proyecto de factibilidad para la producción y exportación de haba seca al mercado estadounidense 2006 - 2015. Tesis. Ing. Com. Ext. Quito, EC. UTE, Facultad de Ciencias Económicas y Negocios. pp. 206.
- Patriarca, E. J., Tatè, R. & Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66:203-222.
- Peralta, E. (1995). Manual agrícola de leguminosas. Cultivos y costos de producción. Quito, EC. Programa Nacional de Leguminosas, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (PRONALEG-INIAP). pp. 3-7.
- Peralta, E. y Caicedo, C. (2001). El cultivo de chocho *Lupinus mutabilis* Sweet: fitonutrición, plagas, y enfermedades en el Ecuador. Quito, EC. Programa

Nacional de Leguminosas, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (PRONALEG-INIAP). 103: 47.

Peralta, J. y González, E. (2009). Leguminosas de Navarra. Navarra, ES. UPNA, Departamento de Ciencias del Medio Natural. Extraído el 10 de septiembre, 2012, de: http://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/Lupinus_L.htm

Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., Monar, Carlos., Pinzón, J. y Rivera, M. (2010). Manual agrícola de fréjol y otras leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción. Publicación miscelánea No. 135. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (PRONALEG-INIAP). pp. 78

Pérez, C.A., Grisales, O.T. y Fuentes, B.J. (2011). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* sw. en fincas ganaderas del Municipio de Tolú en el Departamento de Sucre. Revista Colombiana de Ciencias Animales. 3(1): 62-89.

Perret, X., Stahelin, C. & Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 64: 180-201.

Perticari, A. (s.f.). Impacto de la fijación biológica de nitrógeno en la producción de soja (en línea). Extraído el 15 de junio, 2013, de: <http://www.fertilizando.com/articulos/Impacto%20Fijacion%20Biologica%20Nitrogeno%20en%20Produccion%20de%20Soja.asp>

Philippus, D.R., Kiddle, G., Pellny, T.K., Mokwala, P.W., Jordan, A., Strauss, A.J., De Beer, M., Schlüter, U., Kunert K.J. & Foyer, C.H. (2008). Regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean protect symbiotic

nitrogen fixation from chilling-induced inhibition and shoots from premature senescence. *Plant Physiology* 148:316-327.

Prieto, G.M. (2012). Pautas para el manejo del cultivo de arveja. AER INTA Arroyo Seco. Extraído el 10 de marzo, 2013, de: <http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=21606>.

Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (2004). *Microbiología*. Traducida de la 5ta edición en inglés. MacGraw Hill-Interamericana de España, S.A. pp. 1240.

Quirós, E., Meneses, D., Cervantes, C. y Urbina, L. (1998). Abonos Verdes: una alternativa para mejorar la fertilidad del suelo. PRIAG (Programa Regional de Reforzamiento a la Investigación Agronómica sobre los Granos en Centroamérica). pp. 36.

Ramírez, M. (1995). Caracterización de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* utilizando la resistencia intrínseca a antibióticos. *Revista Suelos Ecuatorianos*. 25: 127-135.

Ramírez, J. (2004). Producción de biopolímeros vía fermentativa utilizando cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Tesis Ing. Quím. Bogotá, CO. UNAL. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Departamento de Ingeniería Química. pp. 67.

Ramírez-Bahena, H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (5NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58:

2484–2490.

- Renzi, J. (2009). La vicia, un forraje para los tiempos que corren (en línea). Bahía Blanca, AR. Extraído el 10 de septiembre, 2012, de: http://www.lanueva.com/edicion_impresa/nota/12/09/2009/99c012.html
- Renzi, J. y Cantamutto, M. (2007). Efecto de la estructura del cultivo sobre el rendimiento de semillas de *Vicia sativa* L. y *Vicia villosa* Roth (en línea). APPA - ALPA. Cusco, PE. Extraído el 10 de septiembre, 2012, de: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/101-Renzi-Vicia.pdf
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Ramírez-Bahena, M.H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J.M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E. & Mateos, P.F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 7064-7069.
- Rodríguez, A. (2009). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis Bioq. Riobamba, EC. ESPOCH. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 83.
- Rohlf, F.J. (1998). NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versión 2.0. User Guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, USA. Extraído el 28 de septiembre, 2012, de: <http://www.exetersoftware.com/downloads/ntsysguide.pdf>

- Rojas, D. (2008). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Tesis Pregrado Microbiol. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. pp. 122.
- Romagnoli, J. (2010). La vicia se vuelve vicio (en línea). Ed. S Lorenzatti. Agricultura de punta. Buenos Aires, AR. Extraído el 10 de septiembre, 2012, de: http://www.clarin.com/rural/vicia-vuelve-vicio_0_350365005.html
- Romero-Rojas, G.D. y Bernal, G. (2008). Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de “*Rhizobium*”, asociadas a pueraria (*Pueraria phaseoloides* (roxb) benth), como cultivo cobertura de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* jacq)”. Publicado en Memorias del X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Santo Domingo, EC. pp. 13.
- Romero-Rojas, G.D. (2009). Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de “*Rhizobium*”, asociadas a pueraria (*Pueraria phaseoloides* (roxb) benth), como cultivo cobertura de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* jacq). Tesis. Ing. Agrop. Quito, EC. ESPE, IASA II. pp. 112.
- Romero, M. (2010). Rehabilitación de suelos cangahuosos mediante la incorporación de abonos verdes. Tesis Ing. Agr. Riobamba. EC. ESPOCH. Facultad de Recursos Naturales. pp. 126.
- Sadowsky, M.J. & Graham, P.H. (1998). Soil Biology of the Rhizobiaceae. The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academia Publishers. 8: 155-172.
- Shamseldin, A. & Werner, D. (2005). High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. Current Microbiology. 50: 11-6.

- Sherman, P., Cameron, D. y Riveros, F. (1991). Leguminosas Forrajeras Tropicales. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y alimentación (FAO). Colección FAO; Producción y Protección Vegetal N° 2. Roma, IT. pp. 126.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. & Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 884-893.
- Sneath, H.F. & Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Eds. W.H. Freeman; D. Kennedy. San Francisco, USA. pp. 573
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. (1985). Methods in legume *Rhizobium* Technology: Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legume. University of Hawai, NifTAL. Department of Agronomy and Soil Science. College of Tropical Agriculture and Human Resources. Hawai, USA. pp. 510.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer Laboratory. New York, USA. pp. 450.
- Spaink, H. (2000). Root Nodulation and Infections Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Microbiology*. 54: 257-288.
- Spaink, H., Kondorosi, A. & Hooykaas, P. (1998). The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academia Publishers. Norwell, US. pp. 566.

- Stainer, R., Ingraham, J., Wheelis, M. & Painter, P. (1996). *Microbiología*. 2 ed. Barcelona, ES. Editorial Reverté S.A. pp. 768.
- Subía, C.R. (2001). Evaluación de tres cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* en cuatro variedades de arveja *Pisum sativum* L. para la zona interandina. Tesis. Ing. Agrop. Sangolquí, EC. ESPE, IASA I. pp. 151.
- Sylvia, D., Hartel, P., Fuhmann, J. & Zubere, D. (2005). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. 2 ed. New Jersey, USA. Prentice Hall. pp. 644.
- Sucojayo, L., Espinoza, G. y Chincheros, J. (1998). Determinación de la capacidad infectiva de cepas de *Bradyrhizobium lupini* resistentes a estreptomycin en plantas de Tarwi (*Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus*) mediante pruebas de autenticación en solitario. *Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*. 6: 49-55.
- Taiz, Z. & Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. pp. 559.
- Taurian, T., Aguilar, O.M. & Fabra, A. (2002). Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis*. 33: 59-72.
- Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G. & Chen, W.X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 2871-2875.
- Tong, Z. & Sadowsky, M. (1994). A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 581-586.

- Trujillo, M.A, Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P.F., Martínez Molina, E. & Velazquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology. 71(3): 1318-1327.
- Urzúa, H. (2000). Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una Agricultura Sustentable. XX Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Arequipa, PE. pp. 211-227.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. Ciencia e Investigación Agraria. 32: 133-150.
- Vaca-Patiño, R.E. (2011). Evaluación de tres bioestimulantes con tres dosis en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) en Santa Martha de Cuba - Carchi. Tesis. Ing. Agrop. Ibarra, EC. UTN. pp. 104.
- Valverde-Portal, A. (2003). Taxonomía Polifásica de Poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Tesis Doctoral. Salamanca, ES. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética. pp. 132.
- Van-Rossum, D., Muyotcha, A., De Hope, B.M., Van-Verseveld, H.W., Stouthamer, A. H. & Boogerd, F.C. (1994). Soil acidity in relation to groundnut-*Bradyrhizobium* symbiotic performance. Plant Soil 163:165–175.
- Vinuesa, P. (1998). Genetic and phenotypic analysis of *Rhizobium etli* and *R. tropici* mutants defective in typing methods. Tesis Doctoral. Marburg, AL. pp. 132.
- Viteri, J. (2010). Perfil de fréjol en Ecuador (en línea). Quito, EC. Extraído el 5 de septiembre, 2012, de: <http://www.docstoc.com/docs/46829485/Perfil-del-frejol-en-Ecuador>

- Vriezen, J.A., De Bruijn, F. J. & Nusslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(11):3451-3459.
- Wang, T., Martínez, J. y López, I. (2002). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las plantas. Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero. Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, ME pp.10.
- Xavier, G., Martins, L., Neves, M. & Rumjanek, N. (1998). Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 386-392.
- Yelton, M.M., Yang, S.S., Edie, S.A. & Lim, S.T. (1983). Characterization of an effective salt-tolerant fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Genetics and Microbiology*. 129:1537.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.*, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* & *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 89-103.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Yi, H.S., Oh, T.K. & Ryu, C.M. (2010). *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(6): 1387-1393.
- Zúñiga, D., Pliego, L., Sanjuán, J. y Lluch, C. (1996). Avances en la investigación sobre fijación biológica de nitrógeno. Ed. Chordi y Martínez. Salamanca, ES. pp. 279-

281.

Zhang, R.J., Hou, B.C., Wang, E.T., Li-Jr., Y., Zhang, X.X. & Chen, W.X. (2011).
Rhizobium tubonense sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61:512-517

