

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“Estudio de la diversidad de cepas de *Rhizobium*  
provenientes de nódulos de tres variedades  
de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*)”**

**Presentado por:**

**Erika Yovana Gonzales Medina**

**Tesis para Optar el Título Profesional de:**

**BIÓLOGO**

**LIMA-PERÚ**

**2013**

## **DEDICATORIA**

A mi mami Rosaura, a mi papá Carlos y a mis hermanos Rosa y Carlos por su gran apoyo, consejos y palabras de ánimo para la realización de la tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al equipo de Investigación del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, en especial a Dra. Doris Zúñiga, por su constante apoyo, consejos y sugerencias durante la realización del trabajo de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio Katty Ogata Gutiérrez, Minoru Matsubara Bautista, Juan Mayo Hernández, Stefany Cépeda González, Natalia Kohashikahua Takaezu, con quienes compartíamos conocimientos y experiencias en las labores del laboratorio durante la realización de la tesis.

A las autoridades de mi centro de trabajo el Centro de Estudios Preuniversitarios de la Universidad Nacional La Molina (CEPUNALM), al Director el Ing. Huanca Velarde por su apoyo y consejos. Además a mi Jefe Académico, el Mg Sc. Víctor Caro-Sánchez Benites por su gran comprensión.

A todos mis compañeros de trabajo en especial al Prof. Santiago Ramirez Rivera, por su apoyo, comprensión, consejos, ánimos y palabras de aliento y al Ps. Inami Shimahukuro por sus recomendaciones y palabras motivadoras.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de mi proyecto de tesis y borrador de tesis. Por sus recomendaciones y sugerencias para la realización del trabajo de investigación.

Al Consejo Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por la oportunidad de apoyarme con el financiamiento de la tesis.

Al Programa de Leguminosas para la obtención de las plántulas muestreadas y la semillas de frijol.

## RESUMEN

En la presente investigación se aislaron 23 cepas bacterianas, catorce cepas pertenecientes al género *Rhizobium* y nueve a *Agrobacterium* y/u otros géneros. Las cepas fueron aisladas de nódulos de tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de suelos de La Molina. En la caracterización fenotípica, el 64.35 % de las cepas crecieron a 37°C; el 57.1% de las cepas toleraron pH4 y el 87% de las cepas fueron afectadas a concentraciones superiores a 0.5% de NaCl. En el ensayo en plantas de frijol, el 84.6% de las cepas, formaron nódulos efectivos e infectivos en la variedad 'Canario Centenario'. La cepa 17, no noduladora, incrementó el peso seco de parte aérea (PSPA) en 38.24 % con respecto al N-, siendo esta diferencia la mayor estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En el análisis de agrupamiento integrado, se obtuvieron cuatro grupos: los Grupos I y III cada uno conformado por una cepa, el Grupo II diez cepas y el Grupo IV dos cepas. En el Grupo III, la cepa 17 destacó porque contribuyó significativamente al crecimiento de las plántulas de frijol y en el Grupo IV, las cepas 4 y 5 fueron tolerantes hasta 2% de salinidad. Todas las cepas tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato, produjeron AIA y ninguna inhibió el crecimiento del hongo *Macrophomina phaseolicola*. Éstos resultados nos indican la diversidad de cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol, y permite seleccionar aquellas con mejor potencial PGPR para posterior aplicación como bioinoculantes, que aportan nitrógeno al cultivo y no contaminan los suelos.

**Palabras clave:** *Rhizobium*, Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), *Phaseolus vulgaris*

## ABSTRACT

In this investigation were isolated 23 bacterial strains, fourteen strains belonging to the genus *Rhizobium* and nine strains to *Agrobacterium* and / or other genres. The strains were isolated from nodules of three varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of La Molina. The phenotypic characterization, the 64.35% of strains grown at 37 ° C, 57.1% of the strains tolerated pH4 and 87% of the strains were affected at concentrations above 0.5% NaCl. In the test in bean plants, 84.6% of strains formed effective nodules and infective in the variety 'Canario Centenario'. Strain 17, not nodule, increased the dry weight of aerial part (PSPA) at 38.24% compared to the N-, the largest difference being statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the integrated cluster analysis, we obtained four groups: Groups I and III each consisting of one strain, ten strains of Group II and Group IV two strains. In Group III, strain 17 out because it contributed significantly to the growth of bean seedlings and Group IV, 4 and 5 strains were tolerant to 2% salinity. All strains were able to solubilize phosphate produced AIA and inhibited the growth of the fungus *Macrophomina phaseolicola*. These results indicate the diversity of strains of *Rhizobium* nodulating of beans, and to select those with the best potential for further application as PGPR bioinoculants that add nitrogen to the crop and not contaminate the soil.

**Keywords:** *Rhizobium*, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), *Phaseolus vulgaris*

## INDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>II.OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 EL CULTIVO DE FRIJOL</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 TAXONOMÍA.....	17
3.1.2 ORIGEN.....	17
3.1.3 VARIEDADES DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> .....	18
3.1.4 DISTRIBUCIÓN.....	18
3.1.5 EXIGENCIAS AMBIENTALES.....	18
3.1.6 PRODUCCIÓN.....	19
3.1.7 FERTILIZACIÓN DEL FRIJOL.....	19
<b>3.2. EL NITRÓGENO</b> .....	<b>20</b>
3.2.1 DEMANDA DEL NITRÓGENO, CONTAMINACIÓN Y EFECTOS TÓXICOS EN EL HOMBRE.....	20
3.2.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN).....	21
3.2.3 ASOCIACIONES SIMBIÓTICAS <i>RHIZOBIUM</i> LEGUMINOSAS Y NO LEGUMINOSAS.....	22
3.2.4 FUNCIONAMIENTO DEL NÓDULO.....	23
<b>3.3 TAXONOMÍA DE <i>RHIZOBIUM</i></b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 CARACTERÍSTICAS DE <i>RHIZOBIUM</i></b> .....	<b>29</b>
3.5.1 MÉTODOS CULTURALES.....	30
3.5.2 CRECIMIENTO DE <i>RHIZOBIUM</i> A DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES.....	31
<b>3.6 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)</b> .....	<b>34</b>
3.6.1 RIZOBIOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	34
3.6.2 FITOHORMONAS.....	36
3.6.3 AUXINAS.....	36
3.6.4 EL FÓSFORO.....	39
3.6.5 <i>RHIZOBIUM</i> COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE PATÓGENOS.....	42
<b>3.7 INVESTIGACIONES DE <i>RHIZOBIUM</i> REALIZADAS EN PERÚ</b> .....	<b>43</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1 LUGAR</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2 MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>44</b>
4.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	44
4.2.2 MICROORGANISMOS.....	45
<b>4.3 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO</b> .....	<b>45</b>
4.3.1 MEDIOS DE CULTIVO.....	45
4.3.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	46
4.3.3 MATERIALES.....	46
4.3.4 EQUIPOS DE LABORATORIO.....	46

<b>4.4 METODOLOGÍA.....</b>	<b>47</b>
4.4.1 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS .....	47
4.4.2. CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA.....	49
4.4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE <i>RHIZOBIUM</i> .....	49
4.4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR DE <i>RHIZOBIUM</i> .....	51
4.4.5 ENSAYO DE APLICACIÓN DE <i>RHIZOBIUM</i> EN PLÁNTULAS DE FRIJOL .....	52
<b>4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>54</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 MUESTREO Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE NÓDULOS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS .....</b>	<b>56</b>
5.2.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.....	56
5.2.2 PRUEBA DE PUREZA .....	59
<b>5.3 CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA .....</b>	<b>61</b>
5.4.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO .....	61
5.4.2 TOLERANCIA A LA ACIDEZ Y ALCALINIDAD .....	61
5.4.3 CRECIMIENTO A VARIOS NIVELES DE TEMPERATURA .....	62
5.4.4 CRECIMIENTO EN MEDIOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl .....	63
<b>5.5 CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDAD PGPR.....</b>	<b>64</b>
5.5.1 PRUEBA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO .....	64
5.5.2 PRODUCCIÓN DE ACIDO INDOLACÉTICO .....	65
5.5.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO .....	65
<b>5.6 ENSAYO EN PLÁNTULAS DE FRIJOL.....</b>	<b>66</b>
5.6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
<b>5.7. ANÁLISIS INTEGRADO DE LAS CEPAS .....</b>	<b>72</b>
5.7.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS (CRECIMIENTO A DISTINTAS CONDICIONES AMBIENTALES).....	72
5.7.2. PRUEBA DE SOLUBILIZACIÓN .....	73
5.7.3. ENSAYO EN PLÁNTULAS.....	74
5.7.4. INTEGRACIÓN DE LAS EVALUACIONES EN UN DENDOGRAMA .....	75
<b>VI. DISCUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>VII CONCLUSIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO 1: TABLAS .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO 2: ESTADÍSTICAS .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO 3: GRAFICOS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO 4: FOTOS.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO 5:MEDIOS Y SOLUCIONES .....</b>	<b>137</b>

## INDICE DE CUADROS

Pg.

<b>CUADRO 1.</b> Producción nacional de frijol grano seco.....	19
<b>CUADRO 2</b> Asociaciones de <i>Rhizobium</i> -plantas .....	23
<b>CUADRO 3.</b> Clasificación tradicional los géneros y especies rizobios.....	27
<i>Rhizobium</i>	
<b>CUADRO 4</b> Estudios de <i>Rhizobium</i> como promotor de crecimiento.....	35
vegetal.	
<b>CUADRO 5.</b> Un resumen de los principales ácidos orgánicos producidos por los microorganismos solubilizadores de fosfato.....	41
<b>CUADRO.6.</b> Distribución de grupos experimentales y de control en el ensayo en plántulas de frijol ‘Canario Centenario’.....	53
<b>CUADRO 7.</b> Características de las simbiosis de las tres variedades de frijol ( <i>P. vulgaris</i> ) en época de llenado de vainas (fase reproductiva).....	55
<b>CUADRO 8.</b> Resumen las cepas aisladas en función de la variedad analizada.....	57
<b>CUADRO 9.</b> Características de las cepas creciendo en el medio de cultivo Levadura-Manitol-Agar (LMA).....	58
<b>CUADRO 10.</b> Resultados de la prueba de pureza, medios de cultivo tanto en crecimiento(C) como en viraje (V).....	59
<b>CUADRO 11.</b> Resultados de la autenticación en frijol ( <i>P. vulgaris</i> variedad ‘Canario Centenario’ ).....	60
<b>CUADRO 12.</b> Escalas de los halos de solubilización.....	64

Pg.



<b>CUADRO 13.</b> Efecto de la inoculación de <i>Rhizobium</i> en el crecimiento de plántulas de frijol (‘Canario Centenario’)	67
<b>CUADRO 14.</b> Correlaciones entre todas las características evaluadas	69
<b>CUADRO 15.</b> Asociación entre los resultados de las pruebas realizadas, pruebas bioquímicas, solubilización y ensayo en plántulas	71
<b>CUADRO 16.</b> Agrupación de las cepas evaluadas en las pruebas bioquímicas	72
<b>CUADRO 17.</b> Agrupación de las cepas evaluadas en la prueba de solubilización de fosfato	73
<b>CUADRO 18.</b> Agrupación de las cepas evaluadas en el ensayo de las plántulas de frijol	74
<b>CUADRO 19.</b> Agrupación de las cepas evaluadas en base a la integración de los resultados de las pruebas	75
<b>CUADRO 20.</b> Resumen de los resultados de la caracterización fenotípica, capacidad PGPR y la capacidad simbiótica de las cepas de 48h	77

## INDICE DE FIGURAS

	<i>Pg.</i>
<b>FIGURA 1.</b> Muestreo de plantas de frijol de la variedad 'Canario Centenario' (a) campo de cultivo del programa de leguminosas, (b) plántula muestreada y (c) nódulos.....	55
<b>FIGURA 2.</b> Colonias de las cepas <i>Rhizobium</i> aislados de la variedad 'Canario Centenario', cepa ligosa, de 2mm, rosada, opaca, tiempo de aparición en LMA, 48h.....	56
<b>FIGURA 3.</b> Gráfico comparativo de las cepas aisladas según la variedad de frijol.....	57
<b>FIGURA 4.</b> Gráfico comparativo entre el crecimiento de <i>Rhizobium</i> a pH4 y pH7.....	61
<b>FIGURA 5.</b> Gráfico comparativo entre el crecimiento de <i>Rhizobium</i> a 37° C y 28 °C.....	62
<b>FIGURA 6.</b> Gráfico comparativo entre el crecimiento de <i>Rhizobium</i> a distintas concentraciones de NaCl.....	63
<b>FIGURA 7.</b> Comparación de la longitud del halo de solubilización en relación a las cepas.....	64
<b>FIGURA 8.</b> Comparación del peso seco de plántulas de frijol (variedad 'Canario Centenario') inoculadas con <i>Rhizobium</i> .....	67
<b>FIGURA 9.</b> Comparación del efecto de las cepas 16, 17, y 18 frente al control negativo N-(sin nitrógeno) y control positivo N+ (con nitrógeno) en el crecimiento de frijol (variedad 'Canario Centenario').....	68
<b>FIGURA 10.</b> Dendograma de las cepas evaluadas en las pruebas bioquímicas.....	72

	Pg.
<b>FIGURA 11.</b> Dendograma de las cepas <i>Rhizobium</i> evaluadas en la prueba de solubilización.....	73
<b>FIGURA 12.</b> Dendograma de las cepas <i>Rhizobium</i> considerando los siete parámetros evaluados en las plántulas de frijol.....	74
<b>FIGURA 13.</b> Dendograma de las cepas <i>Rhizobium</i> en base a la integración de los resultados de las pruebas .....	75

## INDICE DE ANEXOS

	Pg.
<b>ANEXO 1:</b> TABLAS.....	101
<b>ANEXO 2:</b> ESTADÍSTICAS.....	107
<b>ANEXO 3:</b> GRÁFICOS.....	118
<b>ANEXO 4:</b> FOTOS.....	126
<b>ANEXO 5:</b> MEDIOS Y SOLUCIONES.....	137

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Rhizobium* son ampliamente estudiadas por sus cualidades como fijador de nitrógeno, mejorador de la calidad y nutrientes del suelo en especial de las leguminosas. Además, es una de las bacterias más benéficas en las prácticas agrícolas que se aplica a los suelos como biofertilizante por ser amigable al medio ambiente, no es tóxico para humanos, plantas y animales (Karaca, 2012). Asimismo, su uso como inoculante reduce los costos de producción de cultivos de leguminosas, es particular de la soya, el frijol, el pallar (BIOFAG, 2007). Es una alternativa viable y sostenible en reemplazo de la fertilización nitrogenada, la cual contamina los ríos y acuíferos (Martínez-Romero, 2001).

Las investigaciones indican que se conoce simbioses noduladores sólo para el 1% de 19 000 especies de leguminosas que se conocen (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Estos estudios se han centrado en unas tres o cuatro especies; en cambio, existe un gran desconocimiento sobre la biodiversidad global de estas bacterias (Martínez-Romero, 2001).

Hasta 1994, el género *Rhizobium* comprendía sólo cinco especies *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galegae*, *R. huakuii*, especies sólo descritas en base a características fenotípicas (Holt *et al.*, 1994). En los últimos 20 años gracias a los avances en la aplicación de nuevas técnicas de la biología molecular, se han descrito muchas especies y géneros nuevos. Por medio del secuenciamiento del ARNr 16S se han descrito hasta 33 especies nuevas entre ellas, *R. tropici*, *R. etli*, *R. giardinii*, *R. gallicum*, que fueron aisladas del género *Phaseolus* (Marquina *et al* 2011; Shetta, 2011; Rivas *et al* 2009; Martínez-Romero *et al* ,2001).

En países como Brasil, Argentina, España y Venezuela y México hay un creciente interés en no sólo aplicarlo como bioinoculante en el campo; sino también en conocer la diversidad presente en los suelos de *Phaseolus vulgaris* y de otras leguminosas como, *Glycine* sp; *Medicago* sp; *Pisum sativum*, *Acacia* sp. y no leguminosas como *Oryza alta*. (*Poacea*) (BIOFAG, 2007).

Así mismo, hay un creciente interés en conocer sus capacidad como promotora de crecimiento vegetal en leguminosas y no leguminosas como cebada, trigo, arroz, algodón, aplicarlo en forma aislada o como inoculante mixto (Verma et al, 2010; Dash y Gupta, 2010 ; Antoun y Prevost, 2005).

En nuestro país se han realizado pocos estudios de diversidad de bacterias presente en los suelos, priorizando los estudios de diversidad de plantas (Brack y Mendiola, 2004). A nivel nacional, se han realizado estudios para evaluar los microorganismos presentes en la rizósfera de varias especies tales como rizobios en pallar (*Phaseolus lunatus*) (Matsubara, 2010); en papa (*Solanum tuberosum*), Calvo et al, (2008); Ogata (2008) estudió la diversidad de bacterias del suelo de *Caesalpinia spinosa* “tara” y Santillana (2005) encontró rizobios promotores de crecimiento del tomate (*Solanum esculentum*). Estos nuevos hallazgos nos permite seleccionar simbioses efectivos y del mismo modo conocer las variaciones a nivel más específico dentro de una especie o cepa bacteriana

Por otro lado, el frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los cultivos de mayor consumo en el Perú por su alto contenido de proteína, carbohidratos, fibra dietética, abundante en vitaminas del complejo B, como niacina, riboflavina, ácido fólico y tiamina y minerales como zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio (Camera et al, 2009) . En el año 2011, el departamento de mayor producción fue Cajamarca con 14, 586 t de frijol grano seco, seguido de Arequipa y Huánuco. (MINAG 2011). Sin embargo, entre las leguminosas es el de menor capacidad de nodulación. Según la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), la producción mundial de frijol es relativamente menor comparada con otros granos, debido a factores, entre ellos culturales (Camarena et al, 2009).

Considerando lo antes mencionado, en el presente estudio se realizó una evaluación de las diversidad de cepas nativas aisladas de nódulos de tres variedades locales de *Phaseolus vulgaris* “frijol común,” a través de la caracterización fenotípica. Además, se evaluó la capacidad como rizobacteria promotora de crecimiento vegetal o plant growth promoting rhizobacterias (PGPR) de *Rhizobium* a través de la producción de ácido indolacético, antagonismo y solubilización de fosfato.

## II. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar la diversidad de cepas del género *Rhizobium* a través de la caracterización fenotípica y promotor de crecimiento vegetal (PGPR).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar las variaciones fenotípicas de las cepas a través de pruebas bioquímicas
- Evaluar la capacidad simbiótica de las cepas en *Phaseolus vulgaris* var. Canario Centenario *in vitro*.
- Evaluar su capacidad promotora de crecimiento vegetal, mediante la prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA), halos en solubilización de fosfato y antagonismo contra un hongo fitopatógeno.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 EL CULTIVO DE FRIJOL

Su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L “frijol común”. Es una especie anual de la familia de las leguminosas herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas.

##### 3.1.1 Taxonomía

El frijol se encuentra clasificado en las siguientes categorías taxonómicas (Cronquist, 1981 citado por Vilcapoma y Flores, 2003).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

Nombre común: “frijol común”

##### 3.1.2 Origen

El género *Phaseolus* se ha originado en el continente americano y cuenta con alrededor de 50 especies de *Phaseolus*, de las cuales sólo cinco han sido domesticadas, *P. vulgaris*, *P. polyanthus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus* (Cubero, 2004) y de ellas la gran mayoría se encuentra en Mesoamérica. De las cinco especies domesticadas, *P. vulgaris* cuenta con más del 90 % del cultivo sembrado en el mundo (Camarena *et al*, 2009).

Los hallazgos arqueológicos, datos botánicos y tradiciones orales, han demostrado que el frijol silvestre se desarrolló en una gran variedad de ambientes, desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Debouck y Gepts, 1993). Formas cultivadas de frijol estuvieron presentes hace 7 000-8 000 años en los valles de Tehuacan y Oaxaca, en México, en América Central, Perú, Ecuador, Argentina y Chile (Araya, 2003; Debouck & Gepts, 1993).

### 3.1.3 Variedades de *Phaseolus vulgaris*

El Programa de Leguminosas de la UNALM, creada en 1957, viene realizando importantes ensayos en invernadero y campo para la obtención y selección de nuevas variedades de *P. vulgaris* (Camarena *et al*, 2009).

Entre las variedades mejoradas que destacan, se tienen: la variedad ‘Canario Centenario’, ‘Canario 2 000 INIAA’, ‘Canario Centinela INIA’, ‘Canario Chinchano’, ‘Canario Huaralino’, ‘Canario Molinero’, ‘Canario CIFAC 90105’. En relación a los frijoles blancos, ‘Blanco Molinero’, ‘Alubias’, ‘Caballero Peruano’, ‘Blanco Larán’, ‘Larán mejorado-INIAA’, UNAGEM1; blancos pardos como ‘Panamito Molinero’. Además frijoles negros: ‘Caraota Molinero’, UNAGEM2; frijoles rojos: ‘Rojo Molinero’. Asimismo, variedades de frijol que se cultivan en la región altoandina, conocidos como “reventones” nuña: ‘Qosqo Poroo INIA’, ‘Ñuñas UNALM’ y ‘Frijol molinero UG-1’ (Camarena *et al*, 2009).

### 3.1.4 Distribución

*Phaseolus vulgaris* se encuentra distribuido por todo el mundo en latitudes comprendidas entre los 52°N y 32°S, y desde el nivel del mar hasta más de 3 000 m de altitud en los Andes (Schoonhoven y Voysest, 1991).

Las formas silvestres se distribuyen desde el norte argentino hasta prácticamente el valle de México, con un notable paralelismo morfológico y genético con las razas locales cultivadas existentes en toda esa zona. En la costa peruana se distribuye principalmente en los departamentos de Cajamarca, Amazonas.

### 3.1.5 Exigencias ambientales

#### **Clima y Suelo**

Es una planta adaptada a lugares cálidos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 16-21 °C, crece a un máximo a 27 °C y un mínimo de 10 °C. Presenta amplia variedad genética para la temperatura óptima de crecimiento (Nadal y col., 2004). Requiere lugares con una precipitación de 300 mm, distribuida regularmente durante todo el ciclo del cultivo (Canchari, 2005).



Esta especie no soporta bien la falta o exceso de agua (White, 1989). El suelo idóneo para su cultivo es el franco arcilloso limoso, con pH comprendido entre 5.5-6.65. En suelos calizos es recomendable el aporte de Mg, Mn y Zn. Son plantas muy sensibles a la salinidad del suelo, sobre todo con cloruro de sodio. También son muy sensibles a altas concentraciones Al, B, Mn y Na (Nadal y col., 2004).

### 3.1.6 Producción

Según el Ministerio de Agricultura, en el año 2011, el frijol ocupó una extensión de 78, 918 hectáreas y logró una producción de 87, 9 mil toneladas de frijol grano seco, con un rendimiento de 1,113 t/ha. Los departamentos de mayor producción fueron Cajamarca, Arequipa y Huánuco como se aprecia en la Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Producción nacional de frijol grano seco

<i>Departamentos</i>	<i>Superficie</i> (ha)	<i>Producción</i> (t)	<i>Rendimiento</i> (Kg/ha)	<i>Producción</i> (%)
Cajamarca	17 180	14 586	849	16.60%
Arequipa	5 819	10 245	1 761	11.60%
Huánuco	5 697	8 134	1 428	9.26%
Total	78918	87853		

Fuente: Ministerio de Agricultura (2011)

### 3.1.7 Fertilización del frijol

Para obtener rendimientos de 2500 Kg/ha de frijol se aplica de 40 a 50 kg de nitrógeno amoniacal o nitratos por hectárea; fósforo a 50-100 kg (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha) y potasio entre 120-150 K<sub>2</sub>Og/ha. La relación entre el nitrógeno y el potasio será 3:1 (Nadal y col., 2004). Camarena et al (2009) recomiendan utilizar entre 40 a 60 Kg de nitrógeno/ha (dos sacos de úrea de 50Kg) y 40Kg de ácido fosfórico.

## 3.2. EL NITRÓGENO

El nitrógeno es el nutriente que limita la producción primaria sobre la tierra, a pesar que es el elemento más abundante en la atmósfera (80%), existiendo en la forma de  $N_2$ ; el enlace triple presente en su estructura lo hace un compuesto casi inerte. El nitrógeno forma parte del 1 al 4% del peso seco de los tejidos vegetales, donde se encuentra constituyendo la estructura básica de las proteínas, aminoácidos y moléculas esenciales como la clorofila. Su escasez produce un pobre desarrollo vegetal (Salisbury, 1992).

El nitrógeno puede ser convertido en formas utilizables por las plantas por tres procesos: a) conversión de nitrógeno atmosférico a óxido de nitrógeno en la atmósfera, b) fijación de nitrógeno industrial usando catálisis a altas temperaturas de 300 a 500 °C (Método Haber- Bosch) para convertir el nitrógeno a amonio, c) la fijación biológica de nitrógeno que involucra la conversión de nitrógeno atmosférico en amonio por microorganismos que usan la nitrogenasa (Kim y Rees, 1994).

### 3.2.1 Demanda del nitrógeno, contaminación y efectos tóxicos en el hombre

El Instituto Nacional de Estadística del Perú, en el año 2011, publicó *el Anuario de estadísticas ambientales*. En este documento indica que para el año 2009, la oferta de fertilizantes para la producción nacional (tipo guano de isla, abonado fosfatado y abono mixto granulado) fue de 799 084 t, una producción nacional de 21 835 t y 777 249 t de fertilizantes de importación. Además, indican que la urea y el fosfato de amonio son los dos principales productos importados, que son aplicados a los campos de cultivo.

Por otro lado, la Agencia Ambiental Europea (EEA) en 1999 sostiene que entre un 50 y 90% del contenido de nitrógeno en las aguas superficiales son originadas de las actividades agrarias. Los impactos de una carga excesiva de nutrientes pueden manifestarse de forma directa por contaminación del agua potable o como factor de eutrofización que elimina el oxígeno necesario para la supervivencia de los organismos acuáticos (Martínez y col, 2002).

En el año 2004, los investigadores del Centro de Estudios ambientales de Dinamarca indicaron que el uso de estiércol y fertilizantes químicos en la agricultura llevan a un incremento del nivel de nitratos en las aguas de bebida. Además, que las aguas de las lluvias pueden disolver los nitratos, que no sólo serán tomados por las plantas sino serán lixiviados a las aguas subterráneas o en algunos casos pueden llegar a las aguas superficiales de bebida por escorrentía.

Se han investigado los efectos tóxicos del nitrato en los tres estados. El efecto tóxico primario de la concentración de nitrato en agua de bebida con más de 50 mg NO<sub>3</sub> /L, se observa inflamación en el intestino, sistemas digestivo y urinario. En efecto tóxico secundario, la alta concentración de nitrato causa metahemoglobinemia, en infantes de seis meses. Finalmente, el efecto tóxico terciario, lleva a la muerte de la persona (Ryczel, 2006).

### **3.2.2 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)**

La fijación biológica es alrededor de 60% del nitrógeno disponible en la tierra y representa una alternativa económica benéfica y ambiental al uso de fertilizantes químicos. Se estima que la fijación es de 200 millones de toneladas al año, es decir, dos veces la producción de fertilizantes nitrogenados a partir de la síntesis industrial (Baca *et al*, 2000).

Entre los organismos que realizan la FBN se encuentran: bacterias, cianobacterias, actinomicetos, los cuales pueden fijar el nitrógeno libremente o formar asociaciones. Dentro de las bacterias fijadoras de nitrógeno que son de vida libre se encuentran: anaerobias obligadas o facultativas (Ejm: *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (ejemplo *Azotobacter* spp, *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas (Allan y Graham, 2002).

Los microorganismos más eficaces son aquellos que se asocian con las plantas por medio de estructuras llamadas “nódulos” localizados en la raíz de las leguminosas como los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* o de plantas actinorizas. En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos, desarrollando la verdadera simbiosis con la planta; esta simbiosis es un modelo biológico experimental muy interesante de estudio (Baca *et al*, 2000).

Para ser utilizado en el crecimiento vegetal, el nitrógeno debe ser reducido y luego fijado en la forma de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). A este proceso se le conoce como fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). El proceso puede ser llevado a cabo por organismos de vida libre o en simbiosis con la planta (Mayz-Figueroa, 2004).

La fijación de nitrógeno está mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$  bajo la ecuación general:



Esta requiere grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP) (Mayz-Figueroa, 2004).

### 3.2.3 Asociaciones simbióticas *Rhizobium* leguminosas y no leguminosas

Según el reporte de Van Rhijn y Vanderleyden (1995), cada especie corresponde con el género que hospeda y sugiere que la simbiosis es un proceso específico (Cuadro 2). Pero en realidad la situación es mucho más compleja, ya que hay especies (o cepas) de *Rhizobium* noduladores de un rango estrecho de plantas como *R. meliloti* y *R. leguminosarum* *bv.* *trifolii*; mientras, hay otros como *Rhizobium* NGR234 que nodula hasta 35 diferentes géneros de leguminosas, así como la no leguminosa *Parasponia*, que pertenece a la familia Ulmacea.

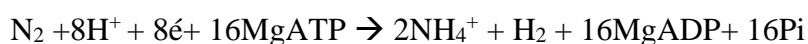
**Cuadro 2.-Asociaciones de *Rhizobium*-plantas**

<b><i>Rhizobium</i></b>	<b>Planta hospedante</b>
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus</i> y <i>Trigonella spp.</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus</i> y <i>Lens spp.</i>
<i>R. leg</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium spp.</i>
<i>R. leg</i> bv. <i>phaseoli</i>	<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>
<i>R. loti</i>	<i>Lotus spp.</i>
<i>R. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium sp. cepa</i> NGR234	Leguminosas tropicales y <i>Parasponia spp.</i>
<i>R. tropici</i>	<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium spp.</i>
<i>R. etli</i>	<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , otras leguminosas
<i>B. japonicum</i>	<i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , otras leguminosas
<i>B. elkanii</i>	<i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Parasponia spp.</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania spp.</i> (noduladora de tallo)

Fuente: Van Rhijn y Vanderleyden (1995)

### 3.2.4 Funcionamiento del nódulo

La fijación simbiótica del rizobio se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células de los nódulos. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste en dos componentes, la proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por *nifH* y la proteína tetramérica que contiene Fe y molibdeno que es codificada por los genes *nifD* y *nifK* (que participan en la fijación de nitrógeno) contenidos en el plásmido de *Rhizobium*. Esta enzima es similar a la enzima de los fijadores libres de nitrógeno, incluyendo la sensibilidad al O<sub>2</sub> y la capacidad de reducir el acetileno y N<sub>2</sub>. La formación de H<sub>2</sub> es parte del mecanismo de la nitrogenasa, pero representa una pérdida significativa de energía. Algunas especies tienen la capacidad de reciclar el H<sub>2</sub> mediante una hidrogenasa (codificada por los genes *hup*) (Báscones *et al.*, 2000). Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno.

Algunos intermediarios del ciclo de ácido cítrico como succinato, malato y fumarato son transportados al interior de la membrana peribacteroidal. Estos ácidos son empleados como donadores de electrones para la síntesis de ATP. El primer producto estable que se obtiene de fijación de N<sub>2</sub> es el amonio, y varias pruebas indican que la planta asimila el amonio para construir moléculas orgánicas. El amonio también se puede asimilar en los bacteroides y puede ser transferido a la planta en forma de alanina (López-Lara, 2000).

Durante la simbiosis la planta expresa proteínas específicas del nódulo a las que se llaman nodulina. Entre ellas, la leghemoglobina tiene la función de aportar oxígeno a los bacteroides y de controlar los niveles de O<sub>2</sub>. Este pigmento se localiza en el citosol de las células de la planta infectadas por bacteroides y es el pigmento que da el típico color rosado de los nódulos funcionales (López-Lara, 2000).

### **3.3 Taxonomía de *Rhizobium***

El género *Rhizobium* fue descrito por Frank en 1889, como bacterias gram negativas noduladoras de leguminosas y en *Parasponia*, no leguminosa. Su nombre enfatiza la peculiaridad que tiene de nodular las raíces (rhiza: raíz, bius: vida, *Rhizobium*: vida en las raíces). Según Aguirre *et al* (2009), las bacterias del género *Rhizobium* en simbiosis con las raíces de frijol fijan aproximadamente entre 25-71 Kg N/ha en España y según Mora (1995), la fijación simbiótica de nitrógeno por *Rhizobium* en frijol es de 25-125KgN/ha en Costa Rica.

El manual Bergey de bacteriología Sistemática establece que la familia Rhizobiaceae tiene cinco géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllorhizobium* y *Agrobacterium*. El género *Rhizobium* incluye a cinco especies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galegae*, *R. huakuii* (Holt *et al*, 1994).

Young (1996), afirma que el género *Rhizobium* es capaz de fijar nitrógeno para leguminosas y no leguminosas; pero, existe una docena de nombres válidos y el verdadero número de especies es enorme. También, indica que todos los rizobios descubiertos, de acuerdo a las secuencias del ARNr 16S, son miembros de la subdivisión alfa proteobacterias. En esta se incluye también bacterias que hacen

simbiosis con las raíces, en este grupo se han encontrado al menos 24 géneros diferentes. Sugiere, la división de los rizobios en cuatro géneros: llamados *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. etli*), *Sinorhizobium* (*S. fredii*, *S. meliloti*, *S. teranga*, *S. saheli*), *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. huakii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*) y *R. galegae* que pertenece al cuarto grupo. En el año (2004), el mismo autor, confirma que las especies *Rhizobium* están representadas discretamente por grupos que difieren en las secuencias de análisis del ADNr 16s de acuerdo a un estudio realizado en 70 secuencias que representaban a 20 especies de *Rhizobium* (incluyendo a *Agrobacterium*).

Según Orozco (1999), para clasificar taxonómicamente a *Rhizobium* se requieren pruebas más exigentes. Las pruebas fenotípicas y de respuesta a inoculación cruzada (exponer a un conjunto de especies de leguminosas con la finalidad de desarrollar nódulos, con las bacterias aisladas de nódulos de un miembro de las leguminosas) permitió agrupar géneros y especies. Sin embargo, hoy ya no son empleadas y son necesarias pruebas genéticas como: composición de G+C del ADN, hibridación ADN, RFLP, sondas específicas de genes *nif* y *nod*, perfiles plasmídicos, secuenciamiento del ARNr 16 entre otros.

En la segunda edición del manual de Bergey de Bacteriología Sistemática publicado en el 2005 las bacterias son agrupadas en diferentes grupos filogenéticos obtenidos luego del análisis del gen ARNr 16s. Los rizobios fueron incluidos en la clase alfa proteobacteria y distribuidos en varias familias dentro del nuevo orden rizobiales perteneciente a alfa proteobacteria (Rivas *et al.*, 2009).

Velazquez *et al* (2005), demostraron que la nodulación de *P. vulgaris* aplicando dos cepas patógenas que corresponden a especies de *Agrobacterium rhizogenes* (Actualmente *Rhizobium rizogenes*, incluida en la familia Rhizobiaceae). Los genes *nodD* (gen de nodulación) y *nifH* (gen de fijación) que se encontraron en estas cepas fueron cercanos a los encontrados en las cepas noduladoras de *P. vulgaris* y junto con el plásmido simbiótico se observó la presencia de una velluda raíz tumorogénica inducida por los plásmidos. Según Rivas *et al* (2009), el género *Agrobacterium* es considerado de familia Rhizobiaceae.

Según el Rivas *et al* (2009) en base al secuenciamiento del ARN16s las bacterias del género *Agrobacterium* son *Rhizobium*, las especies *A. rizogenes* y *A. radiobacter* ahora se les denomina *R. rizogenes* y *R. radiobacter* respectivamente, considerando a las; sin embargo, no es aceptado por muchos investigadores. Estos resultados se han verificado mediante el análisis de la similaridad y diferencias en el análisis realizado al árbol filogenético de los genes 16S de los géneros identificados como *Agrobacterium*. Sin embargo, *Agrobacterium* sigue siendo considerado un microorganismo patógeno por tener el gen de virulencia en el plásmido Ti.

La publicación más reciente acerca de la clasificación taxonómica de *Rhizobium* es de Rivas *et al.* (2009), válida actualmente, información generada en los últimos años en base a las secuencias del gen de 16S ARNr, se han encontrado al menos 33 especies. Según los investigadores la clasificación taxonómica es la siguiente:

Phylum: Proteobacteria

Clase I:  $\alpha$ -Proteobacteria,

Orden: Hyphomicrobiales

-Familia: Rhizobiaceae: *Rhizobium* y *Ensifer*,

-Familia: Phylobacteriaceae: *Mesorhizobium*

-Familia: Bradyrhizobiaceae: *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*

-Familia: Hyphomicrobiaceae: *Azorhizobium*, *Devosia*

-Familia: Brucelaceae: *Ochorobactrum*

- Familia: Methylobacteriaceae: *Methylobacterium*

La clase II,  $\beta$ -Proteobacteria, orden *Burkholderiales* incluyen dos géneros de bacteria, *Burkholderia* spp. y *Cupriavidus*, que forman nódulos con las leguminosas (Ver Cuadro 3).

El grado de diversidad de *Rhizobium* se ha incrementado en los últimos seis años según Willems (2006) estaría relacionado con la diversidad de leguminosas existentes que ahora son estudiadas, por su importancia en la alimentación y como pastos. Así como, por el mayor desarrollo de la investigación taxonómica, gracias al mejoramiento de las técnicas de análisis, el estudio del ADN y ARN en la caracterización y que logrando análisis polifásicos y filogenéticos.



**Cuadro 3.** Clasificación tradicional los géneros y especies rizobios noduladores y no *Rhizobium* noduladores (Rivas *et al.*, 2009)

<i>Class I. <math>\alpha</math>-Proteobacteria. Orden Hyphomicrobiales</i>			
Familia	Género	Especie	Huésped
Rizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	<i>R. alamii</i>	*
		<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>
		<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
		<i>R. galegae</i>	<i>Galegae</i>
		<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i>
		<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania</i>
		<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>
		<i>R. larrymooreii</i>	*
		<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. mesosinicum</i>	Chinese legumes
		<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
		<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. multihospitium</i>	Chinese legumes
		<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>
		<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. pisi</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. radiobacter</i>	*
		<i>R. rhizogenes</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. rubi</i>	*
		<i>R. selenitireducens</i>	*
		<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
		<i>R. tibeticum</i>	<i>Medicago</i>
			<i>archiduchis-nicolai</i>
			<i>Phaseolus</i>
			*
			*
			<i>Amphicarpaea</i>
			<i>Acacia</i>
			<i>Acacia</i>
			<i>Glycine</i>
			<i>Acacia</i>
			<i>Kummerowia</i>
			<i>Medicago</i>
			<i>Medicago</i>
			<i>Leucaena leucocephala</i>
	<i>Acacia</i>		
	<i>Acacia</i>		
	<i>Glycine max</i>		
	*		
	<i>E. americanus</i>		
	<i>E. arboris</i>		
	<i>E. fredii</i>		
	<i>E. kostiense</i>		
	<i>E. kummerowiae</i>		
	<i>E. meliloti</i>		
	<i>E. medicae</i>		
	<i>E. morelense</i>		
	<i>E. saheli</i>		
	<i>E. terangae</i>		
	<i>E. xinjiangense</i>		
	<i>E. adhaerens</i>		
	<i>Ensifer</i>		

Continúa.....

<b>Class I. <math>\alpha</math>-Proteobacteria. Order Hyphomicrobiales</b>				
Familia	Género	Especie	Huésped	
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	
		<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha</i>	
		<i>M. australianum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	
		<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	
		<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis</i>	
		<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer</i>	
		<i>M. gobiense</i>	<i>Chinese legumes</i>	
		<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>	
		<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>	
		<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer</i>	
		<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	
		<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	
		<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i>	
		<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus</i>	
		<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana spp.</i>	
		<i>M. tarimense</i>	<i>Chinese legumes</i>	
		<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus</i>	
		<i>M. thiogangeticum</i>	*	
		<i>M. tianshanense</i>	<i>Sophora</i>	
			<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i> <sup>2</sup>
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. betae</i>	*	
		<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i>	
		<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i>	
		<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>	
		<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
		<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i>	
		<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
		<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	
		<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i> <sup>2</sup>	<i>Aeschynomene</i>
		<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
		<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	
<i>Brucelaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. lupini</i> <sup>2</sup>	<i>Lupinus</i>	
		<i>O. cytisi</i> <sup>2</sup>	<i>Cytisus</i>	
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i> <sup>2</sup>	<i>Crotalaria</i>	
<b>Class II. <math>\beta</math>-Proteobacteria. Order Burkholderiales</b>				
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i> <sup>2</sup>	<i>Dalbergia spp.</i>	
		<i>B. mimosarum</i> <sup>2</sup>	<i>Mimosa ssp.</i>	
		<i>B. nodosa</i> <sup>2</sup>	<i>Mimosa bimucronata</i> ; <i>M. scabrella</i>	
		<i>B. phymatum</i> <sup>2</sup>	<i>Machaerium lunatum</i>	
		<i>B. sabiae</i> <sup>2</sup>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	
		<i>B. tuberum</i> <sup>2</sup>	<i>Aspalathus carnosa</i>	
		<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp.</i>

\*Especies que no son hábiles para nodular que están incluídas en el género *Rhizobium*

<sup>2</sup>Especies no *Rhizobium* hábiles para establecer simbiosis y formar nódulos en leguminosas

Actualmente los géneros de rizobios se definen con la base en la filogenia de los genes ARNr 16S; sin embargo, cada género tiene sus características peculiares. El género *Azorhizobium* contiene cepas que forman nódulos de tallos y raíces y fijan nitrógeno en condiciones de vida libre y simbiótica. Las cepas de *Bradyrhizobium* tienen crecimiento lento (las colonias de 1mm luego de 7 días de incubación) y producen álcalis. El género *Mesorhizobium* incluye cepas de crecimiento lento o moderado (colonias de 1-2 mm luego de 5 a 7 días de incubación) y producen ácido en LMA. Los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias que crecen (colonias > 2 mm después de 3 a 5 días de incubación) y producen ácido en medio YMA (Wang, 2002).

### **3.4 CARACTERÍSTICAS DE *Rhizobium***

Las células de *Rhizobium* son reconocidas por sus tiempos de generación de 2-4 horas en un medio LMA y producen colonias de 2 a 4 mm de diámetro luego de 3 a 5 días de incubación. Uno de los organismos que crece más lento es *Bradyrhizobium* con tiempos de generación de 6 a 10 horas, crece después de 5 a 7 días. (Graham *et al.*, 1991).

*Rhizobium* es una bacteria bacilar gram (-), de 0.5-1.0 x 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . Se mueven por medio de flagelos peritricales o subpolares, (dependiendo de la especie). Son bacterias quimiorganótrofas pues crecen en medio en una amplia fuentes de carbono (Wang, 2002). Su temperatura óptima de crecimiento es 30°C, pH óptimo neutro en LMA (Graham y Praker, 1964 citado por Cubero, 2004), su resistencia a valores extremos de pH varía según la especie. Además, nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales (Wang, 2002). El mismo autor reporta las características fenotípicas de 13 especies *Rhizobium*.

Los géneros de *Rhizobium* varían en cuanto a la utilización de fuentes de carbono. Las cepas de crecimiento rápido poseen actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa ligada a NADP que metabolizan una amplia cantidad de carbohidratos, que las cepas de *Azorhizobium*. A los *Bradyrhizobium* en cambio les falta esta enzima pero metabolizan un gran número de compuestos aromáticos (Graham *et al.*, 1991).

Los estudios de caracterización emplean dos tipos de métodos: Los métodos fenotípicos (características fisiológicas y bioquímicas) y genotípicos. La caracterización fenotípica clásica es el primer método empleado para clasificar cepas desconocidas. Por ejemplo, la capacidad de los aislados de utilizar distintas fuentes de carbono. Esta última técnica es utilizada para caracterizar y clasificar bacterias y comunidades bacterianas en un amplio rango de ambientes, incluyendo ambientes marinos, suelos para la agricultura y lodos (Shetta, 2011).

### 3.5.1 MÉTODOS CULTURALES

Éstos métodos evalúan la tasa de crecimiento y características de la colonia en un medio con sales minerales-manitol-extracto de levadura (LMA), presencia de una 6-fosfogluconato deshidrogenasa ligada a NADP, y la habilidad para utilizar glucosa, sucrosa, lactosa, fructuosa, arabinosa, succinato, o adipato como única fuente de carbono para su crecimiento (Graham *et al.*, 1991).

Vicent y Humphrey (1970) identificaron diferentes grupos taxonómicos a través de sus antígenos; reacciones de aglutinación, inmunodifusión en geles, inmunofluorescencia, y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas han sido empleados para definir rizobios particulares. Además, pueden ser emplearse métodos serológicos y el análisis de lipopolisacáridos o el bandeo de patrones de proteínas seguido del SDS-PAGE.

Los *Rhizobium* no son distinguibles en su capacidad para nodular un hospedero específico, infectividad y efectividad bajo el microscopio. Es por ello que Somasegarán y Hoben (1985), describen métodos para lograr la identificación de cepas aisladas de nódulos de leguminosas; entre estos métodos destacan los serológicos, de aglutinación, inmunofluorescencia, reacciones de precipitación, el empleo de marcadores de resistencia a antibióticos y el uso de bacteriófagos. Estos métodos además de diferenciar cepas permiten identificar y monitorear una cepa en particular, inoculada en campo.

### 3.5.2 CRECIMIENTO DE RHIZOBIUM A DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES

#### pH

En relación a su tolerancia a distintos valores de pH, los rizobios difieren en su habilidad para tolerar el estrés por acidez o alcalinidad. Se ha detectado que la homeostasis al pH en bacterias ácido-tolerantes está relacionada a altos niveles de potasio en el citoplasma, a la diferencia en la composición de exopolisacáridos y liposacáridos y solutos orgánicos compatibles como aminoácidos, azúcares y betaínas (Ricillo et al, 2000). Aarons y Graham en 1991, mencionan que *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli difería en su tolerancia a la acidez, por ello se determinó los niveles de potasio, calcio y proteínas identificadas como “proteínas del shock ácido”. Además, detectaron un eflujo de calcio de ambas, células tolerantes y sensibles, cepas que crecían de pH 4.6 a 4.7.

La acidez del suelo es el principal desbalance químico que afecta a millones de hectáreas de campos agrícolas. Se ha determinado que los factores que relacionados con la acidez (alto contenido de aluminio, bajo contenido de calcio y bajo fosfato) tienen un impacto directo en el crecimiento y persistencia del rizobio, en la iniciación de la nodulación y en la colonización, infección y actividad del nódulo, debido a la acidez del suelo (Kellman, 2008), fijación, limita la supervivencia y persistencia de *Rhizobium* en los suelos, reduciendo la nodulación (Zahran, 1999).

El pH es un factor crucial en la sobrevivencia del *Rhizobium*. En algunas situaciones los rizobios varían en su habilidad para infectar la planta hospedera. Se han realizado estudios con *Mesorhizobium cicer*, adaptados a condiciones ácidas para garbanzo. Sin embargo, cuando se incorporaba estas bacterias a un suelo fuertemente ácido; sólo el 5% de las cepas fueron adecuadas para la nodulación. Se ha encontrado además pocos *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en suelos ácidos (Kellman, 2008).

## **Salinidad**

Los distintas especies de rizobio muestran una marcada variación en su tolerancia a la sal (Santillana, 2007). Algunas cepas son inhibidas a 100 mM o 0.58% de NaCl, mientras que otras especies pueden tolerar hasta 500 mM o 2.9% de NaCl (Hungría *et al*, 2000, Zúñiga, 1997).

Los rizobios acumulan agentes osmoprotectores y solutos compatibles para sobrevivir durante un proceso de desecación. Bajo condiciones de estrés la mayoría de las bacterias acumulan agentes se encuentran las betaínas, carbohidratos como la trehalosa (disacárido formado por dos glucosas), en su citoplasma para prevenir la deshidratación osmótica y mantener una presión turgente. Los rizobios y bradyrizobium varían en su tolerancia a sal, generalmente los rizobios son más tolerantes que los bradyrizobios (Elsheikh & Wood, 1990).

## **Temperatura**

Los rizobios tienen una temperatura de crecimiento óptimo que lo caracteriza, temperaturas por debajo o por encima de 28 °C afecta su metabolismo. Si la temperatura se encuentra por debajo de 5 °C, se impide el adecuado transporte de nutrientes, así como la formación del gradiente protónico de los rizobios (Santillana, 2007).

*Phaseolus vulgaris* posee una temperatura entre 17 °C a 40 °C (Hungría y Vargas, 2000). La sobrevivencia y reproducción de la bacteria en el suelo es influenciado por la temperatura. Las temperaturas excesivas y muy bajas reducen el crecimiento bacteriano y la fijación de nitrógeno. En la zona radicular, cuando la temperatura está entre 17 y 25 °C, se reduce la cantidad de N fijado y el inicio de la fijación en soya.

En suelos tropicales el límite de crecimiento de *Rhizobium* está entre 32 °C y 47 °C, aunque varía entre especies y cepas. Kellman (2008), menciona que la temperatura disminuye en 6 °C a 5 cm de profundidad se reduce las poblaciones de *Bradyrhizobium*, noduladores de soya, por más de 10 000 células/ g suelo; reduciendo la sobrevivencia y establecimiento de las células en estos suelos tropicales. Es por este motivo que se recurre a repetir la inoculación en leguminosas de grano, requiriendo de elevadas tasas de inoculación.

El intercambio de señales entre la planta hospedera y el rizobio se ve alterada a altas temperaturas. A 39 °C se reduce la liberación de los factores activadores de los genes de nodulación (nod), de la soya y del frijol. También se afecta la nodulación, iniciación de la formación de nódulos, la liberación de los rizobios del hilo de infección, el desarrollo del bacteroide y acelera la senescencia del nódulo (Kellman, 2008).

### 3.5.3.6 Estudios previos de diversidad de *Rhizobium* en base al secuenciamiento

Herrera-Cervera *et al.* (1999), por medio del secuenciamiento del ARNr 16S, han reportado cinco especies de *Rhizobium* noduladores de raíces de *P. vulgaris*, *R. etli*, *Sinorhizobium fredii*, *R. gallicum*, *R. giardinii* y *R. leguminosarum*, en suelos de España. Se han identificado *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* y *R. tropici* en suelos de Europa y América; *R. gallicum* y *R. giardinii* en suelos de Francia. Martínez-Romero *et al* (2001), afirman que *R. etli* es el microsimbionte que seguramente co-evolucionó con el fríjol y el más eficiente en fijación de nitrógeno con las líneas Mesoamericanas de *P. vulgaris*. Rivas *et al* (2009), además incluye a *R. lusitanum* y *R. rizogenes* (Antes *Agrobacterium rhizogenes*) como noduladores de *Phaseolus*.

En Brasil la especie que predomina en sus suelos es *R. tropici*, especie altamente promiscua, de gran estabilidad genética, realiza simbiosis aún en condiciones de altas temperatura, acidez y salinidad (Hungria *et al*, 2000). Esta especie también se ha reportado en hospederos como *Leucaena sp.*, *Macroptilium sp.*, *Bolusanthus* y *Aspartium* en África. La predominancia de una u otra especie es también afectada por las condiciones climáticas. Por ejemplo en Kenia, *Rhizobium tropici* es la especie que predomina en suelos con pH 4.5, comparado con *R. etli* en suelos a pH 6.8 (Anyango *et al.*, 1995).

### **3.6 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)**

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) colonizan las raíces y generan una población tal que tienen un efecto benéfico en ellas. Los mecanismos exactos no se conocen pero existen varias hipótesis entre ellas : i) la habilidad para producir cambios en la concentración de ácido indolacético, giberelinas, citocininas y etileno (ii) fijación asimbiótica de nitrógeno, (iii) antagonismos frente a microorganismos fitopatógenos por producción de sideróforos, antibióticos y cianida, (iv) solubilización de fosfato y otros minerales ( Joseph *et al.*, 2007).

#### **3.6.1 Rizobios como promotores de crecimiento vegetal**

*Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son bien conocidos como microorganismos simbióticos de leguminosas, que forman nódulos que fijan nitrógeno. Sin embargo esta bacteria también comparte muchas características con otros PGPR. En realidad los rizobios pueden producir fitohormonas, sideróforos, HCN, solubilizar económicamente los fosfatos inorgánicos y orgánicos, y ellos pueden colonizar las raíces de muchas plantas no leguminosas bajo condiciones *in vitro* (Antoun y Prevost, 2005).

En condiciones de invernadero, se incrementó la materia seca del rábano por la inoculación de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*, *R. leguminosarum* *bv. trifolli*, *R. leguminosarum* *bv. viciae* y *Sinorhizobium meliloti* (Antoun y Prevost, 2005). En la Cuadro 4, se resume algunos estudios realizados de *Rhizobium* como promotor de crecimiento vegetal.

Por otro lado, en los últimos doce años se están realizando nuevas investigaciones sobre bioinoculantes mixtos, interacciones entre especies del género *Rhizobium* con otras bacterias con cualidades promotoras de crecimiento tales como, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus* para frijol, alfalfa, garbanzo, y pastos. En otro estudio se empleó *Rhizobium*, *Pseudomonas fluorescens*, *B. megaterium* y *A. chroococcum*, generando incrementos significativos de peso de nódulos, raíz y biomasa de brotes, total de nitrógeno de la planta debido a la coinoculación (Verma *et al* 2010).



**Cuadro 4.** Estudios de *Rhizobium* como promotor de crecimiento vegetal

<i>Bacteria</i>	<i>Cultivo(s)</i>	<i>Efecto estimuladorio</i>	<i>Año</i>	<i>Condiciones</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i> (R39)	Maíz Trigo Cebada	Mayor rendimiento de materia seca	1994	En campo
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>phaseoli</i> (bacteria Solub. de fosfato)	Maíz Lechuga	Estimulación del crecimiento del maíz y lechuga	1996	En campo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Soy213)	Rábano	60% superior con respecto al control	1998	En invernadero
<i>S. meliloti</i>	Lechuga	Estimulación del crecimiento de plantas micorrizadas	2000	-
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	Trigo	Incremento de 16% de materia seca de retoños 23 a 25% mayor rendimiento de granos respecto al control	2001	En recipientes
<i>Mesorhizobium</i> <i>mediterraneum</i> PECA 21	Cebada	Incremento de materia seca y contenido de N,K, Ca, y Mg	2001	En recipientes
<i>Rhizobium giardinii</i> y <i>S. meliloti</i>	Papa	Endófito	1995	-
<i>B. japonicum</i>	Algodón	Endófito	2002	-
<i>R. etli</i>	Maíz	Endófito	2001	-

Fuente: Antoun y Prevost (2005)

### 3.6.2 Fitohormonas

Uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento de la planta es la producción de fitohormonas reguladoras del crecimiento (Rajash, 2005). Frankenberger y Arshad (1995), discuten el rol de auxinas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (ABA) como promotores de crecimiento vegetal. La producción de fitohormonas por microorganismos se ha estudiado por más de 20 años (Rajash, 2005).

### 3.6.3 Auxinas

La producción de auxinas no está limitada a las plantas. Microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos pueden producirla. Rajash (2005), sostiene que los hongos *Rhizopus suinus* y *Absidia ramosa* son productores de auxinas. Varios autores han identificado la producción de ácido indol-3-acético por microorganismos en la presencia de un precursor triptófano o peptona (Rajash, 2005).

La respuesta de la planta a la auxina son las siguientes: a) división celular, b) enraizamiento inicial, c) inhibición del crecimiento de la raíz, d) incremento de la tasa de crecimiento, f) fototropismo, g) geotropismo, h) dominancia apical (Frankenberger y Arshad, 1995).

Existe un ochenta por ciento de los microorganismos aislados de la rizósfera de varios cultivos tienen la habilidad de producir auxina como metabolito secundario. Bacterias del género *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, y *Rhizobium*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* producen auxinas para estimular el crecimiento de las plantas (Patten y Glick, 1996).

#### 3.6.3.1 Rutas de producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Se conocen cinco rutas para la producción de Ácido Indol Acético (AIA): a) ruta indol-3-acetamida, b) ruta ácido indol 3-pirúvico, c) ruta de la cadena del triptófano, d) ruta de la triptamina y e) ruta del indol-3 acetonitrilo (Rajash, 2005).

*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *P. syringae* pv *savastoni* utilizan la ruta de indol acetamida. *E. cloacae*, aislados de la rizósfera del pepino, emplea la ruta del ácido indolpirúvico. *P. fluorescens* convierte directamente el L-triptófano en indol-3-acetaldehído. Las cepas como *B. ereus* y *A. brasilense* producen AIA por la ruta triptamina (Rajash, 2005). Spaepen (2007) sostiene que las especies del género *Rhizobium* utilizan la ruta del Ácido Indol-3-pirúvico (IPyA) o la ruta Indol-3 Acetonitrilo (PAN) para la producción de Ácido Inolacético (AIA), a partir del triptófano.

Glick *et al.* (1999), indican que la mayoría de cepas patógenas de bacterias sintetizan AIA vía la ruta de la Indol acetamida; mientras, las plantas usan la ruta indol piruvico. Así, la bacteria ayuda a evadir las señales de regulación y así se induce de crecimiento descontrolado de tejidos de las planta. Sin embargo, la ruta del ácido indol pirúvico y la secreción de AIA es la ruta preferida por bacterias benéficas como PGPR. El AIA producido está estrictamente regulado por las señales de la planta. Las diferencias de producción encontradas en las cepas bacterianas se deben a las varias rutas biosintéticas, la localización de los genes involucrados, secuencias regulatorias y la presencia de enzimas que convierten la forma libre de AIA activa en la forma conjugada y las condiciones ambientales.

### **3.6.3.2 Métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de AIA**

Gordon y Weber (1950), emplearon un método colorimétrico como método cualitativo de detección. Estos autores modifican el método propuesto por Tang y Bonner (1947). Recomiendan utilizar una alícuota de 1mL del caldo de cultivo con 2 mL de reactivo  $\text{FeCl}_3$ -  $\text{HClO}_4$  (Cloruro férrico- Ácido perclórico) (1.mL de 0.5M  $\text{FeCl}_3$  + 50mL al 35% de  $\text{HClO}_4$ ), luego de 25 minutos leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530  $\mu\text{m}$ .

El HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) es otro método utilizado para lograr separar los indoles y sus derivados (como el AIA), en estos sistemas utilizan sistemas de gradientes y mezclas de metanol, agua y ácido acético como fase móvil. También se han utilizado otros métodos cromatográficos como la Cromatografía en placa fina (TLC), cromatografía de Gases (GC) y sistemas cromatográficos acoplados a Espectrometría de Masas (GC-MS) (Castillo, 2005).

La producción de indoles y AIA de *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Flavobacterium*, *E.coli*, *Streptomyces*, *Pantoea agglomerans* y *Phyllobacterium* han sido identificados con métodos colorimétricos, TLC (Cromatografía de capa fina), HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), UV y bioensayos.

Frankenberger y Arshad (1995), sostienen que la producción de auxina se ve afectada por las condiciones del cultivo, estado de crecimiento, disponibilidad de él o los sustratos.

### **3.6.3.3 *Rhizobium* productores de AIA**

Sahasrabudhe (2011), en la India, realizó una selección de rizobios con capacidad de producir ácido indolacético (AIA) de *R. leguminosarum* de maní, *R. loti* de garbanzo, *R. meliloti* de trébol y *R. meliloti* de alfalfa. De estas cuatro especies de *Rhizobium*, *R. loti* fue el que produjo mayor cantidad de AIA, en un medio de cultivo con triptófano.

Por otro lado, se ha logrado identificar la producción de auxinas de *Rhizobium* mediante técnicas colorimétricas, la utilización de HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) o GC-MS (Cromatografía de gases-espectrometría de masas). El triptófano le sirve como precursor de AIA y otros productos. Además de la síntesis de AIA, los rizobios tienen la capacidad de degradar el AIA en productos que pueden o no tener una actividad como auxina. Los rizobios son capaces de sintetizar AIA en ausencia del precursor; sin embargo, en presencia del precursor incrementa hasta duplicar la producción. Los rizobios tienen preferencia por el L-triptófano, un isómero del triptófano. Cuando se le provee el D-triptófano es un compuesto tóxico y hace que rizobio pase por una larga fase lag (Frankenberger y Arshad, 1995).

### 3.6.4 EL FÓSFORO

El fósforo después de nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos. En el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en las formas inorgánicas como orgánicas. Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentran en muy baja concentración entre 5 a 30 mg kg<sup>-1</sup>. Estos bajos niveles se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, hierro, o el aluminio lo que provoca la precipitación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodríguez y Fraga, 1999).

Lo mismo ocurre con los fosfatos inorgánicos incorporados al suelo. Por lo tanto se considera, que la solubilización de las distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fosfato por los microorganismos es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (Illmer y Schinner, 1992).

#### 3.6.4.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato

Los microorganismos poseen la habilidad de solubilizar el fosfato y convertir las formas de fosfato fosfatídico en formas soluble. El rol de los microorganismos rizosféricos en la solubilización de fosfato se conoce desde 1903.

Desde entonces se han realizado estudios en la solubilización de fosfato mineral. Por ejemplo bacterias importantes incluyen *Bacillus* y *Pseudomonas* (Illmer y Schinner, 1992), hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* (Motsara *et al.*, 1995). También, se ha reportado casos de bacterias que se han aislado de distintos suelos bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Nahas, 1996; Kumar *et al.*, 2001).

En el suelo estas bacterias solubilizadoras constituyen del 1 al 50 % y hongos de 0.5 a 0.1% del total de poblaciones. La mayor concentración de microorganismos solubilizadores está en la rizósfera, y es más metabolitamente activa que aislados de otras fuentes.

#### **3.6.4.2 *Rhizobium* solubilizadores de fosfato**

En bacterias *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* la capacidad solubilizadora está asociada a la producción de ácido alfa cetoglucónico el cual es neutralizado con NaOH lo cual nos indica que la habilidad de *Rhizobium* se debe básicamente a la disminución del pH del medio de cultivo (Halder y Chakrabarty, 1993; Surange y Kumar, 1993). Sin embargo los detalles bioquímicos de solubilización de fosfato por bacterias simbióticas aún no se conocen.

Hay muchos géneros microbianos que tienen la capacidad de solubilizar el fosfato inorgánico, el interés particular es la de encontrar a microorganismos que tengan simultáneamente propiedades promotoras de crecimiento y sean fijadores de nitrógeno atmosférico.

#### **3.6.4.3 Mecanismos de la solubilización**

Muchas investigaciones se han realizado para conocer la habilidad de solubilizar fosfato en cultivos de medio líquido. Esta capacidad de solubilización en algunos casos se debe a la excreción de ácidos orgánicos. Entre ellos ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, etc. (Cuadro 5). En cultivos líquidos filtrados se ha determinado por cromatografía en capa fina o por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y ciertos métodos enzimáticos que permiten la identificación más precisa de ácidos desconocidos. Tales ácidos orgánicos pueden directamente disolver el fosfato mineral como resultado del intercambio del anión  $PO_4^{2-}$  por el anión ácido o por quelar ambos el hierro y aluminio asociados con fosfato. Sin embargo no hay una relación definida entre la producción de ácido producida por las bacterias solubilizadoras y la cantidad de fosfato solubilizado reportado (Khan *et al.*, 2006).

#### **3.6.4.4 Métodos para seleccionar microorganismos solubilizadores**

Una de las técnicas ampliamente utilizada es el crecimiento de las bacterias u hongos en medio NBRIP, en este medio de cultivo se forma un halo de solubilización alrededor de la cepa en crecimiento, esta técnica fue descrita por Nautiyal (1999). Sin embargo, se ha demostrado que la selección a partir de la formación del halo de solubilización no es un método infalible, tampoco lo es en cultivo líquido (Rodríguez y Fraga, 1999).

Gyaneshwar *et al* (1998), afirman que la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de organismos seleccionados in vitro, se demuestra mediante su aplicación y evaluación en invernadero y en campo de plantas de interés comercial. En un estudio realizado en potes de cebada se inoculó en potes cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico *Mesorhizobium*, esta bacteria incrementó significativamente el rendimiento de materia seca de la planta, el contenido K, Na, N y Mg (Antoun y Prevost, 2005).

**Cuadro 5.** Un resumen de los principales ácidos orgánicos producidos por los microorganismos solubilizadores de fosfato

<i>Organismos</i>	Ácidos predominantes
<b>Hongos y Actinomicetos</b>	
<i>Aspergillus sp.</i>	Oxálico, cítrico, succínico glucónico, tartárico.
<i>Penicillium sp</i>	Glucónico
<i>Scwaniomyces occidentalis</i>	Succínico, fumárico, cítrico, tartárico, $\alpha$ -cetobutírico
<i>Streptomyces sp.</i>	Láctico y 2 cetoglucónico
<b>Bacterias</b>	
<i>Enterobacter intermedium</i>	2 cetoglucónico
<i>Bacillus amyloliquefaciens, B. atrofaceus, Penibacillus macerans, Vibrio potreolyticus, Xanthobacter agilis, Enterobacter sp, Kluyvera cryocrescens, Pseudomonas aerogenes, Chryseomonas luteola</i>	Láctico, itánico, isovalérico, isobutírico, acético
<i>Pseudomonas sp</i>	Glucónico, 2 cetoglucónico, Malico, glioxálico, succínico., fumárico, tartárico , $\alpha$ -cetobutírico
<i>Bacillus sp</i>	Oxálico, cítrico ,2 cetoglucónico, succínico
<i>Arthrobacter sp.</i>	Oxálico, malonico
<i>Micrococcus spp.</i>	Oxálico

Fuente: Modificado de Khan *et al* (2006)

### 3.6.5 *Rhizobium* COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE PATÓGENOS

Por otro lado, en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*. L), las enfermedades en semillas ocasionadas por *Phytophthora ultimum* y *Rhizoctonia solani* son responsables de daños sustanciales en los cultivos. La pérdida ha sido estimada en más de 5 a 40% anual por un periodo de 10 años. Es por ello necesario utilizar nuevas alternativas diferentes a los fungicidas, para aplicarlo en semilla (Ahmadzadeh y Sharifi, 2009).

Los microorganismos que pueden crecer en la rizósfera son ideales para su uso como agentes biocontroladores, la rizósfera provee una línea de defensa para el ataque de las raíces por patógenos (Weller, 1998). Entre las bacterias que tienen potencial de aplicación como controladora de hongos fitopatógenos se encuentra *Pseudomonas*, Ahmadzadeh y Sharifi (2009), mencionan que este microorganismo es capaz de producir cianida, floriglucinol, pioluteorina. En el caso de *Pseudomonas fluorescens* produce 2,4 diacetilfloriglucinol (DAPG).

La mayoría de especies de *Rhizobium* promueven el crecimiento de plantas y también inhiben el crecimiento de ciertos patógenos fúngicos. Ehteshamul-Haque y Ghaffar (1993) y Ehteshamul-Haque (1994), sostienen que el género *Rhizobium* son agentes efectivos de biocontrol para la inhibición de ciertos patógenos contenidos en suelos de plantas; ellos demostraron que el género *Rhizobium* inhibe significativamente el crecimiento de hongos fitopatógenos de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Gold, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp., en plantas leguminosa como en no leguminosas.

Por otro lado, Sharif (2003) sostiene que los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum*, *Stachybotrys atray* en *Memnoniella ehinat* han mostrado prometedores resultados para el control de la infección de raíces por hongos, es por esta razón que fue elegido el hongo *Trichoderma* como control positivo en el ensayo de antagonismo.



Sharif (2003), reporta que la cepa de *Rhizobium* Thal-8 inhibió significativamente el crecimiento de patógenos de leguminosas como de no leguminosas. La inhibición de la cepa Thal-8 sobre el crecimiento de patógenos se debe a la producción de ácidos los cuales tienen un efecto antifúngico (Khokhar et al., 2001).

### 3.7 Investigaciones de *Rhizobium* realizadas en Perú

El Proyecto de Frijol del CIAT para la zona altoandina (PROFIZA) en alianza con el INIEA, realizó trabajos en la zona de sierra norte de Cajamarca, principalmente para la selección de cepas efectivas de *Rhizobium*, se probaron 6 cepas nativas y 6 cepas del CIAT con amplio rango de adaptación y con capacidad de competir con las cepas nativas. En 1991, luego de cuatro campañas en los campos de Cajamarca se logró seleccionar cuatro cepas, CIAT 701, Cusco 10, CIAT 2, Cajamarca 13. Se obtuvieron incrementos del 22% en la producción del frijol (Acuña, 2001).

Santillana (2007), se logró analizar la diversidad de *Rhizobium* noduladores de aislando once cepas de *Vicia faba*, procedentes de suelos de Ayacucho y Huancavelica y ocho cepas de *Pisum sativum* var. *Macrocarpum* procedentes de Cañete. Además, realizó la caracterización simbiótica de las cepas y encontró que algunas cepas tenían capacidad de promotora de crecimiento de no leguminosas como cebada, tomate. Además los rizobios aislados tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de *Alternaria Solani* y *Fusarium* sp en condiciones de laboratorio

Paima (2005), aisló la cepa P1N1R1 de campo y se aplicó en campo, esta cepa desarrolló gran cantidad de nódulos por planta. Además, sostiene que la aplicación de 31Kg de nitrógeno por hectárea empleando fosfatodiamónico, no disminuía significativamente la formación de nódulos. El efecto de la inoculación, en campo, fue estadísticamente igual que la fertilización nitrogenada con 80 unidades de nitrógeno por hectárea y la eficiencia de las cepas nativas fue estadísticamente igual a la eficiencia de las cepas inoculadas.

Por otro lado, en el Laboratorio de Ecología Microbiana Marino Tabusso de la Universidad Agraria la Molina, se vienen realizando trabajos de caracterización fenotípica y molecular de rizobios que infectan *Cicer arietinum*, *Phaseolus lunatus*, *P. vulgaris*, *Vicia faba*, *Pisum sativum* y otros cultivos (BIOFAG, 2007).

Ormeño-Orrillo y col. (2006), aislaron nueve cepas de bradyrizobios de crecimiento lento (5 días) a partir de nódulos de *P. lunatus* provenientes de campos de Perú, las cuales fueron clasificadas como *Bradyrhizobium yuanmingense*, y dos cepas de bradyrizobios de crecimiento extralento (7 días) propuestas como una nueva estirpe nunca antes descrita.

Por otro lado, también se ha estudiado la dinámica de las poblaciones rizobianas en las zonas alto andinas. Para los ensayos de efectividad también se cuenta con varios aislamientos de rizobios de crecimiento rápido (*Rhizobium*) y muchos de crecimiento lento de la zona de Barranca que siembra tradicionalmente cultivos de pallar (*P. lunatus*). La cepa de *Rhizobium* H8 aislada del arveja Holantao (*Pisum sativum* var. macrocarpum) del valle de Cañete ha resultado ser la más eficiente en comparación a otras cepas (BIOFAG 2007).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 LUGAR**

El aislamiento y caracterización fenotípica de las cepas se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Agraria la Molina.

### **4.2 MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **4.2.1 Material vegetal**

##### **Época de crecimiento**

Las variedades fueron muestreadas en el mes de julio y en fase reproductiva (llenado de vainas) en el campo experimental “El Guayabo 2” del Programa de Leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

## **Variedades.**

Se obtuvieron nódulos del cultivo de frijol, var. 'Canario Centenario', var. 'Blanco Molinero' y var. 'Alubia Argentina'. Se eligieron estas variedades debido a que, se adaptan bien a los valles de la costa (Camarena et al, 2009). Además, son variedades de mayor demanda comercial en la costa peruana, mayor producción y resistencia a hongos. En el ensayo de *Rhizobium* en frijol, se emplearon semillas de la variedad 'Canario Centenario', obtenidas del Programa de Leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, las características de la variedad se aprecian en el Anexo1 (Tabla 6)

### **4.2.2 Microorganismos**

#### **Bacterias**

Se empleó las siguientes cepas control para los ensayos de caracterización fenotípica, provenientes del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) y CFN42 (*Rhizobium etli*)

#### **Hongos**

Se utilizó como cepa control a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Fusarium sp* Proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) para la prueba de antagonismo de *Rhizobium* frente a estos hongos fitopatógenos.

## **4.3 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO**

### **4.3.1 Medios de Cultivo**

- Caldo de Cultivo Levadura Manitol (LMC)
- Caldo de Cultivo Levadura Manitol + Triptófano
- Medio de Cultivo Levadura Manitol Agar (LMA) (Mayo, 2002)
- Medios para realizar la bioquímica de *Rhizobium* (PG, LLA, LB)
- Medio NBRIP (Nautiyal,1999)
- Medio Papa-Dextrosa Agar (PDA)
- Solución Nutritiva de Boughton y Dillworth (SNBD) (Mayo, 2002)

#### **4.3.2 Soluciones y Reactivos**

- Alcohol al 70° y 96°
- Buffer pH 7 y 4
- Hipoclorito de sodio 2% y 3%
- Solución salina al 0.85%
- Solución NaOH 1N y HCl 1N
- Solución de Rojo Congo
- NaOH 0.05M y SDS 0.25%

#### **4.3.3 Materiales**

- Baguetas y espátulas de Driglasky
- Baño María
- Beakers de 125, 250 y 600 ml
- Botellas
- Eppendorff de 1.5 mL
- Frascos de Vidrio con tapa estériles
- Pinzas
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Perlas de polipropileno
- Placas Petri 15 x 100 mm
- Probetas graduadas de 100 ml y 1000ml
- Potenciómetro
- Tubos de Prueba 25 x 250 mm

#### **4.3.4 Equipos de Laboratorio**

- Autoclave
- Balanza Analítica y de platillo
- Congeladoras de -20 y -80 °C
- Estufa u Horno 60-180 °C
- Incubadora de 28 °C
- Incubadora de 37 °C
- Microondas
- Refrigeradoras
- Centrífuga

## **4.4 METODOLOGÍA**

### **4.4.1 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS**

#### **4.4.1.1 Muestreo de plantas, colecta y evaluación de nódulos**

Se realizó un muestreo al azar de las plantas. Se eligieron aquellas plantas que tenían un buen aspecto así como un buen número de nódulos. Con la ayuda de una lampa se sacó la planta con todo y raíz, tres plantas por cada variedad, provenientes de tres lotes del campo “El Guayabo 2” del programa de leguminosas. Las muestras fueron llevadas al laboratorio en bolsas de plástico con previa rotulación de las variedades.

#### **4.4.1.2 Aislamiento de *Rhizobium***

El procedimiento para el aislamiento se encuentra en el manual del CIAT (1987). (Anexo 3, gráfico 1). Los nódulos se colocaron en sobres de papel de filtro para hidratarse en agua destilada estéril durante 30 minutos. Luego se desinfectaron en alcohol al 70% por 1 minuto en un vaso de precipitación y en hipoclorito de sodio al 3% por espacio de 3min. Se enjuagaron con agua destilada estéril. Se sacaron los nódulos de sus sobres, con una pinza estéril y se colocaron en placas Petri estériles, agregándole una gota de agua destilada estéril por nódulo. Luego con la ayuda de una bageta, se aplastaron los nódulos y el macerado se sembró en placas Petri con LMA (Agar-levadura-Manitol) con rojo congo por estrías. Las placas fueron incubadas a 28 °C de 2 – 15 días. (Para identificar *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*). Después de este tiempo se procedió a elegir los posibles rizobios, para su posterior caracterización y ensayo en plantas de frijol.

#### **4.4.1.3 Evaluación de las colonias y conservación de cepas**

La evaluación de las colonias se hizo después de la incubación, determinándose el diámetro de las colonias, cantidad de goma (que puede ser abundante o escasa), textura de la colonia (elástica o cremosa), apariencia (traslúcida u opaca) y color según las recomendaciones del CIAT (1987). Las cepas aisladas se conservaron en tubos eppendorff con LMA a 10 °C y glicerol a -20 °C.

#### **4.4.1.4 Pruebas de Pureza**

Se realizó según las recomendaciones del manual del CIAT (1987). Se realiza para identificar posibles contaminantes. La metodología consiste en la siembra de las cepas en los medios de cultivo: agar levadura lactosa (LLA), Luria-Bertani (LB) y peptona glucosa (PG).

##### **Medio Luria-Bertani (LB)**

Se sembraron las cepas a analizar de un cultivo de 24 a 48h en LMA, se tomó un poco de cepa con la ayuda del asa de Colle y se sembraron por estría en el medio LB. Luego, se incubaron las placas a 28 °C por 2 a 15 días. Finalmente se anotó el crecimiento de la cepa. En este medio de cultivo *Rhizobium* tiene mucha dificultad de desarrollarse. Por lo tanto si se observa crecimiento de alguna colonia en este medio, no corresponde a *Rhizobium* (CIAT 1987).

##### **Medio Peptona- Glucosa (PG)**

Se sembraron las cepas por estría en los medios PG, desde un medio de *Rhizobium* creciendo en LMA, se llevaron a incubar a 28°C por 2 a 15 días. Finalmente se anotó el viraje y crecimiento de la cepa. Este un medio nutritivo que utiliza un indicador, el púrpura de bromo cresol, su rango de pH es de 5.2 a 6.8 (debajo de 5.2 vira a amarillo y sobre 6.8 vira a púrpura) (Palma, 2003). Si el medio vira de morado a amarillo, la colonia no corresponde a *Rhizobium*. Los rizobios se desarrollan bien en este medio de cultivo, pero no viran este medio de cultivo (CIAT 1987).

##### **Medio Levadura Lactosa Agar (LLA)**

El medio utilizado LLA, es el medio LMA con lactosa en lugar de manitol como fuente carbonada, con una concentración de lactosa en el medio de 10g/L. Tiene muchas características similares a los rizobios. Este medio permite la identificación de azúcares que son liberados al reaccionar a partir de la enzima cetolactasa con la lactosa. Esta enzima es propia de *Agrobacterium* y los rizobios carecen de esta enzima.

El procedimiento fue el siguiente: se sembraron las cepas en el medio de cultivo LLA, las placas se incubaron a 28°C por 3 días. Luego de la incubación, se agregó al medio 10 a 15 mL de reactivo de Benedict. El viraje amarillo después de 10 minutos indica la presencia de *Agrobacterium*.

#### **4.4.2. CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA**

La caracterización simbiótica consiste en visualizar la aparición de los nódulos en las plántulas. Para ello se seleccionaron algunas de las cepas aisladas y se realizó el ensayo de autenticación en plántulas de frijol (*P. vulgaris*) de la variedad 'Canario Centenario' en laboratorio. En estas plantas se evaluó el número de nódulos, el diámetro del nódulo; la fijación se evaluó visualizando el color y la forma del nódulo, del mismo según la metodología propuesta por Somasegaran y Hoben (1985). Para el ensayo se seleccionaron cuatro cepas de 48h y una de 24horas.

Las semillas fueron desinfectadas con alcohol de 96° por 3 minutos y luego con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos. Luego se enjuagaron con agua estéril y se procedió a hidratarlas por espacio de 3h en 400mL de agua estéril. Luego se colocaron en placas con papel filtro estériles, se les agregó agua destilada estéril, después se llevaron a incubar a 25°C por 72h. Al término del período de germinación las semillas fueron transplantadas a los tubos de ensayo con polipropileno En donde fueron inoculadas con 1mL de caldo de cultivo con rizobios, cultivo de tres días, con una densidad de  $10^8$  células /mL. Luego fueron trasladadas a una cámara de crecimiento, con 12 horas de luz blanca y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de 22 a 23 °C. Los tubos contenían la solución Broughton & Dillworth, con esta misma solución las plantas fueron regadas periódicamente. Luego de treinta y siete días de realizado el experimento se evaluó la aparición y número de los nódulos, peso seco de la parte aérea, la fijación de nitrógeno.

#### **4.4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Rhizobium***

La caracterización fenotípica se realiza a través de la caracterización bioquímica en base a los protocolos recomendados por CIAT (1987), Somasegaran y Hoben (1985).

#### **4.4.3.1 Producción de acidez o alcalinidad**

Se sembraron las cepas rizobios en el medio LMA con azul de bromotimol al 0.5%. Estas placas Petri fueron llevadas a incubar a 28°C por 2 a 12 días. Los rizobios de crecimiento lento (3 días a más), *Bradyrhizobium* producen alcalinidad cuando hay un viraje del medio de verde al azul, mientras que los rizobios de crecimiento rápido producen acidez y cambian dicha coloración a amarillo. Según Palma (2003), el rango de viraje del azul de bromotimol es de pHs comprendidos entre 6.2 a 7.6, valores inferiores a 6.2 indican que es un medio ácido y se torna amarillo en cambio valores por encima de 7.6 se torna azul.

#### **4.4.3.2 Prueba bioquímicas (LMA)**

Se empleó la metodología recomendada por el CIAT (1987), utilizada por Matos (1994) y Mayo (2002), se realizó de la siguiente manera:

##### **Crecimiento a varios niveles de pH**

Se sembró cada una de las cepas aisladas en medios con diferentes valores de pH (4, 5, 8 y 8.8) y el control con la ayuda de un palillo, se llevaron a incubación a 28°C. Luego de 2 a 10 días se evaluó el grado de desarrollo de las cepas.

##### **Crecimiento a varios niveles de temperatura**

Las cepas fueron sembradas en el medio LMA e incubadas a 8°C, 28°C, 37°C y 40°C. Luego de 48h a 10 días se evaluó el grado de desarrollo de las cepas.

##### **Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl**

Se cepas crecieron en el medio LMA con diferentes concentraciones de NaCl (0.5%, 1% y 2%) y se incubaron todas a 28°C. Luego se evaluó el grado de desarrollo de las cepas desde 48 horas hasta 10 días. Todas estas placas fueron comparadas con las placas control (pH 7.0, NaCl 0,02% y 28° C de temperatura). Estas cepas también fueron controladas de 48 horas hasta 10 días.



#### **4.4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PGPR DE *Rhizobium***

Las pruebas para demostrar que las bacterias del género *Rhizobium* poseen cualidades como promotor de crecimiento vegetal, se realizó en base a los protocolos propuestos por Nautiyal (1999), Naik y Sakthivel (2005) y Ahmed (2005), según lo señala Zúñiga (2012).

##### **4.4.4.1 Prueba de solubilización de fosfato**

Se empleó el método propuesto por Nautiyal (1999). Las cepas fueron cultivadas en LMA e incubadas por 48h a 28°C. Se sembraron las cepas en el medio NBRIP con ayuda de un palillo estéril (Anexo3, gráfico 6). Las placas de cultivo fueron llevadas a incubar hasta 48h a 28°C. Se observó la aparición de un halo alrededor del punto sembrado. Se evaluó hasta 14 días la aparición del halo de solubilización. El control positivo empleado fue *Pseudomona sp.* La magnitud de la solubilización se evaluó midiendo los bordes solubilizados transparentes alrededor de la estría luego de 14 días de evaluación. El radio del halo se determinó restando el halo total menos el radio de colonia promedio (dos repeticiones por cepa).

##### **4.4.4.2 Prueba de producción de AIA**

Se empleó el método colorimétrico propuesto por Naik y Sakthivel (2005). El procedimiento fue el siguiente: Se prepararon 100 mL de (Caldo Levadura-Manitol) LMC+ Triptófano (1.02µg/mL) y se dispensaron 3mL de caldo LMC en 1 tubitos de 10cm aproximadamente se llevó a autoclavar por 121°C por 15 minutos. Al día siguiente, se sembraron cada una de las cepas y controles (CIAT 899 y CFN42) en los tubitos y fueron incubados a 28°C todas las cepas por 3 días. Se tomó una alícuota 100 µL de este caldo en placas de poliestireno de 96 pocillos (se pueden emplear también tubos de ensayo estériles). Sobre cada una de ellas se aplicaron 200 µL de reactivo de Salkowski FeCl<sub>3</sub>- HClO<sub>4</sub>). La evaluación de la producción de AIA se determinó observando el cambio de coloración, si es de color rojo a rojo grosella (AIA +), transparente (AIA-). La presencia de un color rojo grosella intenso reveló la presencia de AIA o producción de parte de la cepa por conversión del L-triptófano. En ausencia de AIA el caldo no cambia de color.

#### **4.4.4.3 Prueba de Antagonismo**

Se sembró el hongo *Macrophomina phaseolina*, por triplicado, en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) con la ayuda de un sacabocado (Ahmed *et al.*, 2007). Estos hongos fueron incubados de 22 °C a 25 °C por cinco días.

Se hicieron siete porciones del medio, donde crecía el hongo, con ayuda de un sacabocado. Luego estos trozos fueron colocados en el centro de la placa en forma invertida, con la ayuda de un asa de Kolle, en la placa de cultivo con LMA. Se sembraron las tres cepas por placa (con un palillo de madera) de forma equidistante con respecto al trozo de micelio. Luego de 48 horas se observó la aparición de un halo de inhibición alrededor de la colonia bacteriana como indicador de bacteria antagonista. Luego de tres semanas, se midió el halo de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de la colonia sembrada. Se contrastó con un control positivo *Trichoderma sp.*

#### **4.4.5 ENSAYO DE APLICACIÓN DE *RHIZOBIUM* EN PLÁNTULAS DE FRIJOL**

Se realizó un ensayo en plántulas de frijol variedad 'Canario Centenario', sólo con las cepas de 48h, para evaluar el efecto en el crecimiento de la plántula y en la nodulación. La metodología fue realizada en base a los protocolos de Somasegaran y Hoben (1985).

##### **4.4.5.1. Diseño experimental**

Se utilizó el diseño experimental de tipo Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), con 17 tratamientos, con cuatro bloques. (Cuadro 6).

La desinfección, germinación de semillas e inoculación se realizó siguiendo la metodología de autenticación propuesta por Somasegaran y Hoben en 1985, mencionado anteriormente, para la caracterización simbiótica.

Las plántulas codificadas como controles N+ se regaron con la solución Broughton & Dillworth al 0.05% de KNO<sub>3</sub> dando una concentración de nitrógeno de 70ppm(N+) (Anexo 5) y a los demás tratamientos sin nitrógeno.

**Cuadro 6.** Distribución de grupos experimentales y de control en el ensayo en plántulas de frijol ‘Canario Centenario’.

GRUPO	CEPA
1	Cepa 1 (*)
2	Cepa 4 (*)
3	Cepa 8 (*)
4	Cepa 10 (†)
6	Cepa 14 (†)
7	Cepa 15 (†)
8	Cepa 16 (†)
9	Cepa 17 (†)
10	Cepa 18 (†)
11	Cepa 21 (†)
12	Cepa 22 (†)
13	Cepa 26 (‡)
14	<i>R. tropici</i> (CIAT 899)
15	<i>R. etli</i> (CFN 42)
16	CONTROL N <sup>+</sup>
17	CONTROL (-)

(\*) Aisladas de Variedad Blanco Molinero (†) Canario Centenario

(‡) Variedad Variedad Alubia Argentina

#### 4.4.5.7 Evaluación de las plántulas

Luego de 28 días de instalado el experimento, se procedió a evaluar todas las plántulas. Los parámetros evaluados fueron:

**Longitud de la parte aérea.** Se midió la longitud de la parte aérea desde el cuello de la plántula hasta el ápice del tallo.

**Longitud de raíz.** En el caso de la raíz desde el cuello de la plántula hasta la raíz más larga de la plántula.

**Peso fresco de parte aérea.** Se seccionaron las hojas y tallos de cada plántula y se registró su peso en una balanza digital.

**Peso fresco de raíz.** Se registró el peso de la raíz una balanza digital.

**Peso seco de la parte aérea.** Para obtener el peso seco todas las plántulas fueron llevadas a una estufa, donde permanecieron por 48 horas a 70 °C. El peso se determinó en una balanza analítica.

**Número de hojas** Se contaron los trifolios de cada plántula.

**Número de nódulos:** Se contó el número de nódulos de las plántulas evaluadas.

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico, para el ensayo en plántulas, se realizó con la ayuda del programa estadístico *Statgraphics Plus 5.1*. Todos los datos a evaluar eran cuantitativos. En primer lugar se realizó el análisis estadístico descriptivo de los datos (promedio, valor mínimo y máximo) (Anexo2, Tablas 8-14). Luego se analizó el grado de variabilidad de los parámetros evaluados, a través de una prueba ANOVA (Análisis de Varianza). Además, se determinaron las diferencias significativas para cada variable analizada y el análisis de rangos múltiples de Duncan.

El análisis de las correlaciones entre las variables analizadas se determinó con la ayuda del paquete estadístico *SPSS* (Statistical Package For Social Sciences) para analizar las correlaciones entre variables del ensayo en plántula de frijol. Además para evaluar el grado de asociación entre todas las características analizadas se realizó un análisis de los datos en Excel, herramientas estadísticas.

Finalmente, para evaluar las similitudes entre las cepas se las agrupó gracias a herramienta “Análisis cluster o agrupamiento” de *Statgraphics Plus 5.1*, por el método del “Vecino más cercano”.

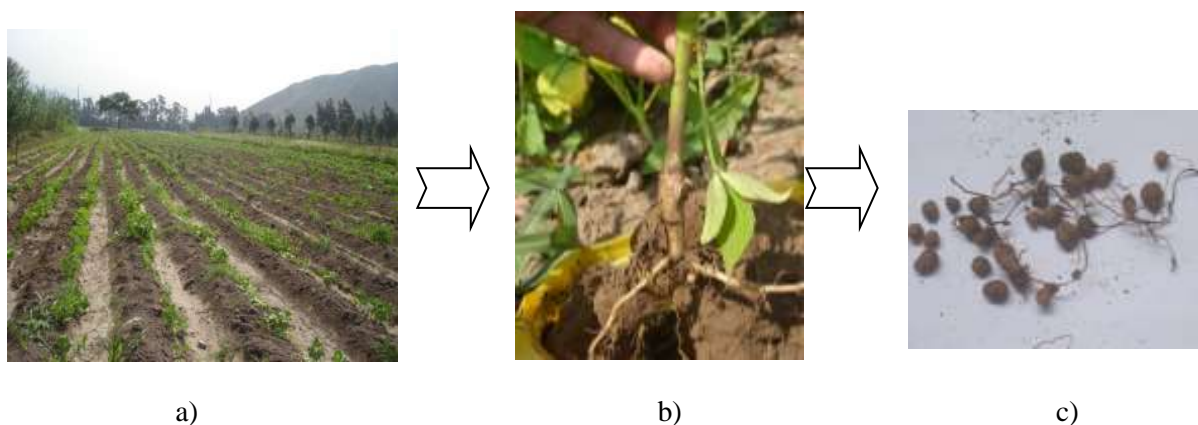
## V. RESULTADOS

### 5.1 MUESTREO Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE NÓDULOS

Se realizó el muestreo de las plantas de frijol de las tres variedades (Fig1), las cuales fueron colectadas en el mes de julio, en fase reproductiva (llenado de vainas). El diámetro de los nódulos fue de  $1-3 \pm 0.1$  mm. La variedad 'Canario Centenario' presentó el mayor número de nódulos (56 en promedio) que las otras variedades (Cuadro 7). Los nódulos de la variedad 'Canario Centenario' eran rojizos y pequeños con un diámetro promedio de 2mm. En esta variedad también se encontró mayor peso seco promedio de 4.5 g. En el caso de la variedad 'Blanco Molinero' el peso seco de la parte aérea fue de 4g. En base a la información registrada se eligieron cinco nódulos al azar de cada variedad para luego realizar el aislamiento.

**Cuadro 7.** Características de las simbiosis de las tres variedades de frijol (*P. vulgaris*) en época de llenado de vainas (fase reproductiva)

Variedad	N° de planta	N° de nódulos	N° de Vainas	PSPA (g)
Blanco molinero	P1	36	2	4.7
	P2	64	2	3.3
Alubia argentina	P1	41	4	5.0
	P2	26	4	4.6
	P3	30	7	5.6
Canario Centenario	P1	58	1	4.1
	P2	87	0	1.0
	P3	24	0	8.8



**Fig1.** Muestreo de plantas de frijol de la variedad 'Canario Centenario' (a) campo de cultivo del programa de leguminosas, (b) plántula muestreada y (c) nódulos.

## 5.2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

### 5.2.1 Aislamiento de las cepas

Se lograron aislar e identificar un total de 23 cepas en el medio LMA (Levadura-Manitol-Agar), 9 cepas crecieron a las 24h de incubación y 14 cepas crecieron a las 48h de incubación (Cuadro 9 y Anexo 4, Fotos 3-6). De todas las cepas aisladas el 52.17% fueron aisladas de la variedad 'Canario Centenario', el 34.8% de las cepas fueron aisladas de la variedad 'Blanco Molinero' y el 13% restante de la variedad 'Alubia Argentina' (Cuadro 8).

Al evaluar las cepas de 48h, con características de *Rhizobium*, el 64,3% pertenecían a la variedad 'Canario Centenario', el 28.6% de ellas pertenecían a la variedad Blanco Molinero y el 7.1% a la variedad 'Alubia Argentina' (Fig 3). El 78.5% de estas cepas tenían apariencia rosadas, opacas y cremosas (Fig2) y el 21.5% restante eran cepas con apariencia rosadas, opacas y con ligosidad y diámetros de las colonias de 1mm a 3mm como se aprecia en la Cuadro 9. Curiosamente tres cepas de 48h, cepas 1, 16 y 21 eran más ligosas, esta característica se evaluó al tocar el asa de Kollé. Además, todas las bacterias de 48h poseían características muy semejantes al género *R. etli* (CFN 42), el cual se empleó como control (Anexo 4).

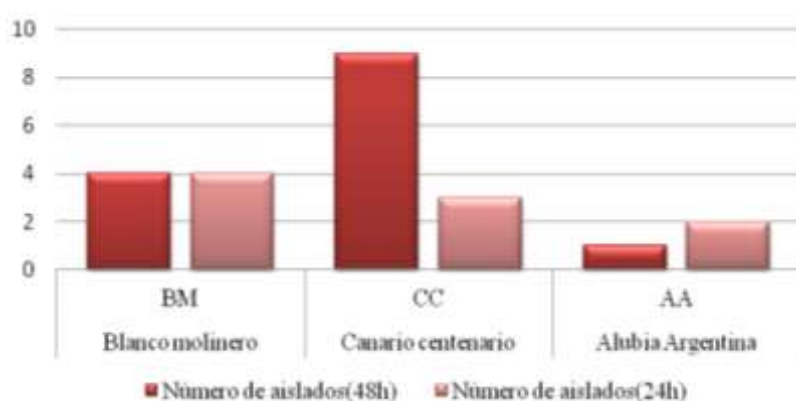


**Fig2.** Colonias de la cepas *Rhizobium* aislados de la variedad 'Canario Centenario', cepa ligosa, de 2mm, rosada, opaca, tiempo de aparición en LMA, 48h.

**Cuadro 8.** Resumen las cepas aisladas en función de la variedad analizada.

Variedad hospedera	Cepa	Número de aislados(48h)	Número de aislados(24h)	Total	Producción de acido *
Blanco molinero	BM	4	4	<b>8 (52.17%)</b>	+
Canario centenario	CC	9	3	<b>12(34,8% )</b>	+
Alubia Argentina	AA	1	2	<b>3 (13%)</b>	+
Total		14	9	23	

\*Viraje en medio LMA con azul de bromotimol



**Fig 3. Gráfico comparativo de las cepas aisladas según la variedad de frijol**

Según el manual del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT 1987), ninguna cepa de *Rhizobium* debe absorber el colorante rojo congo; porque si lo absorbe será considerado como contaminante. Los contaminantes se caracterizaron por ser pequeñas colonias rojizas. Además, el género *Pseudomonas*, genera unas colonias atornazoladas en el medio LMA.

En relación a las cepas de 24h, el 44% de los aislados pertenecieron a la variedad 'Blanco Molinero', el 33.3% a la variedad 'Canario Centenario' y el 22.2% a la variedad 'Alubia Argentina'. En este grupo de cepas las colonias eran traslúcidas, cremosas, rosadas, con diámetros de colonia de 2 a 4 mm. Estas cepas tuvieron rápida aparición en placa de LMA. Además, ninguna de las cepas era ligosa. Sus características morfológicas se aproximaban más a *R. tropici*. Finalmente, todas las cepas aisladas fueron conservadas en tubos de ensayo con LMA, para posteriores ensayos y también se conservaron en glicerol a -20°C.

**Cuadro 9.** Características de las cepas creciendo en el medio de cultivo Levadura-Manitol-Agar (LMA)

N°	COD.	COD.ORIGINAL	Características de las colonias			
			Tamaño	Apariencia	Color	Textura
1	<b>1</b>	BMP1Nod1	1mm	opaca	rosadas	ligosa
2	<b>4</b>	BMP1Nod4-2	3mm	opaca	rosadas	cremosa
3	<b>5</b>	BMP1Nod4-2	3mm	opaca	rosadas	cremosa
4	<b>8</b>	BMP2Nod4	1mm	opaca	rosadas	cremosa
5	<b>10</b>	FCCP1Nod2	2mm	opaca	rosadas	cremosa
6	<b>13</b>	FCCP2Nod2	1mm	opaca	rosadas	cremosa
7	<b>14</b>	FCCP2Nod3	2mm	opaca	rosadas	cremosa
8	<b>15</b>	FCCP2Nod4	1y 2 mm	opaca	rosadas	cremosa
9	<b>16</b>	FCCP2Nod5-2b	1y 2 mm	opaca	rosadas	ligosa
10	<b>17</b>	FCCP3Nod1	2mm	opaca	rosadas	mucosa
11	<b>18</b>	FCCP3Nod2-1	2.5mm	opaca	rosadas	cremosa
12	<b>21</b>	FCCP3Nod4	2mm	opaca	rosadas	ligosa
13	<b>22</b>	FCCP3Nod5	0.5mm	opaca	rosadas	cremosa
14	<b>26</b>	AAP3Nod4-2	2mm	opaca	rosadas	cremosa
	<b>CIAT 899</b>	<i>R.tropici</i>	2mm	traslucida	rosadas	cremosa
	<b>CFN42</b>	<i>R.etli</i>	2mm	opaca	rosadas	ligosa
15	<b>2*</b>	BMP1Nod2	2mm	traslucida	atorz.	cremosa
16	<b>3*</b>	BMP1Nod5	3mm	traslucida	rosadas	cremosa
17	<b>6*</b>	BMP2Nod1	4mm	traslucida	rosadas	cremosa
18	<b>7*</b>	BMP2Nod3	4mm	traslucida	rosadas	cremosa
19	<b>9*</b>	FCCP1Nod1	4mm	traslucida	rosadas	cremosa
29	<b>11*</b>	FCCP1Nod5	2mm	traslucida	rosadas	cremosa
21	<b>20*</b>	FCCP3Nod3	3mm	traslucida	rosadas	cremosa
22	<b>27*</b>	AAP3Nod1-1	3mm	traslucida	rosadas	cremosa
23	<b>28*</b>	AAP3Nod4	3mm	traslucida	rosadas	cremosa

\*Cepas que crecieron a las 24h BM= Blanco Molinero, FCC= Canario Centenario AA= Alubia Argentina, CIAT (*R. tropici*) y CFN (*R. etli*)



### 5.2.2 Prueba de pureza

Las 23 cepas pasaron por un proceso de selección antes de realizar el ensayo en plántulas. El objetivo de la prueba es distinguir los rizobios de los contaminantes como *Agrobacterium* u otro género bacteriano (CIAT 1987).

Todas las cepas aisladas crecieron en el medio Peptona-Glucosa (PG). El 14.3 % de las cepas de 48h, viraron el medio de morado a amarillo (Cuadro 10). La cepa *R. tropici*, CIAT 899, creció pero no viró el medio PG, mientras que la cepa *R. etli*, CFN 42, creció y viró el medio de morado a amarillo.

En el caso del medio Lactosa-Levadura-Agar (LLA), el 68.75% del total de las cepas aisladas crecieron adecuadamente en el medio con lactosa como fuente de carbono. Luego de 10 minutos de agregarle el reactivo de Benedict se observó que ninguna de las cepas de 48h viró el medio de cultivo; en cambio, todas las cepas de 24h viraron a amarillo, indicando de esta forma que muy probablemente pertenecían al grupo de *Agrobacterium*. Las cepas *R. etli* y *R. tropici* crecieron pero no viraron en este medio de cultivo, al agregarle el reactivo de Benedict.

Para el caso del medio de cultivo Luria-Bertanni (LB), la diferencia entre ambos grupos fue más notoria, pues todas las cepas de 48h no lograron crecer; en cambio si lo hicieron todas las cepas de crecimiento rápido. La cepa *R. etli* (CFN 42) no creció en este medio de cultivo, luego del período de incubación, de forma similar al crecimiento de las cepas de 48h. En el caso de la cepa *R. tropici* (CIAT 899) sí creció en este medio de cultivo.

**Cuadro 10.** Resultados de la prueba de pureza, medios de cultivo tanto en crecimiento(C) como en viraje (V).

	PG		LLA		LB
	C	V	C	V	C
<b>48h(14 cepas)*</b>	14(+)	2(+)	11(+)	0	0
<b>24h(9 cepas)</b>	9(+)	1(+)	9(+)	8(+)	9(+)
<b>CIAT 899</b>	+	-	+	-	+
<b>CFN42</b>	+	+	+	-	-

\*Datos completos Anexo1 (Tabla1).

### 5.3 CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA

Se escogieron las cepas, 4, 15 y 21 de 48h y la cepa 11 de 24h para el ensayo de autenticación. Se utilizaron cuatro repeticiones por cepa. En la Cuadro 11 se aprecian los resultados de las evaluaciones. La cepa 21 fue la que obtuvo mayor peso seco de parte aérea y mayor número de nódulos, 17 en total.

**Cuadro 11.** Resultados de la autenticación en frijol (*P. vulgaris* variedad ‘Canario Centenario’)

Cepa	Tiempo de crecimiento	PSPA (g)	Nº de nódulos	Fija N <sub>2</sub>	Diámetro (mm)	Color	Forma
4	48h	0.289	0	-	-	-	-
15	48h	0.239	8	+	0.5-2mm	rosados	rugosos
21	48h	0.294	17	+	2mm	rosados	rugosos
11	24h	0.249	3	-	2mm	blancos	rugosos
CIAT 899	48h	0.208	5	+	1-2mm	rosados	rugosos

Los nódulos observados fueron de tipo determinados y rugosos. Según Somasegaran y Hoben (1985), este tipo de nódulo se observan en plantas del género *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*. Los nódulos tenían una coloración rosada. Estos resultados muestran que los nódulos estaban activos y fijaban nitrógeno. Los nódulos se ubicaron principalmente en las raíces laterales.

Según Somasegaran y Hoben (1985), los nódulos pueden ser pequeños y distribuidos las raíces secundarias. Así mismo, afirma que la distribución de los nódulos en las raíces es independiente de la especie de planta hospedera, del tipo de *Rhizobium*, de la estructura y composición del suelo. Los nódulos de *R. tropici*, eran de 1-2mm, de color rosado y rugosos. En el caso de la cepa 11, cepa de 24h, logró nodular a *P. vulgaris*, pero obtuvo un menor número de nódulos en comparación con las cepas de 48h y eran de color blanco, lo cual nos indica que no eran efectivos para fijar nitrógeno. En base a estos resultados y a las pruebas de pureza, se separó a este grupo de cepas bacterianas, de 24h, porque no cumplía con las características de *Rhizobium*.

## 5.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

En esta prueba se evaluaron las características de crecimiento de las cepas de 48h, posibles *Rhizobium*. Se evaluó la capacidad de las cepas de producir ácidos y crecer en LMA a distintos valores de pH, temperatura y de salinidad.

### 5.4.1 Producción de ácido

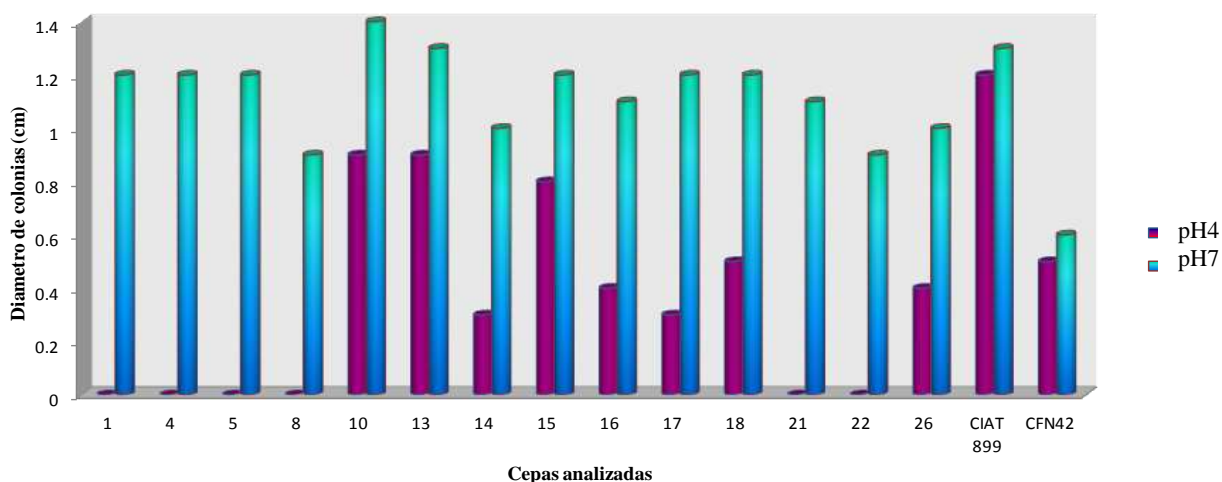
Todas las cepas, de 24h y 48h, viraron el medio de cultivo LMA con azul de bromotimol de verde a amarillo.

### 5.4.2 Tolerancia a la acidez y alcalinidad

El 42.8% de las cepas aisladas toleraron pH comprendidos entre 5 y 8.8; mientras que, el 57.1% de las cepas restantes toleraron entre pH 4 y 8.8. Las cepas control *R. etli* y *R. tropici* toleraron valores de pH de 4.0 y crecieron bien hasta pH 8.8.

En relación a la variedades de frijol. El 100% de las cepas de la variedad 'Blanco Molinero' toleraron entre 5 a 8.8 de pH. El 77.8% de las cepas aisladas de la variedad Canario centenario toleraron un mayor rango de pH entre 4 a 8.8. De la misma forma, la *cepa 26* de la variedad Alubia toleró este último rango de pH.

**Fig4. Gráfico comparativo entre el crecimiento de *Rhizobium* a pH4 y pH7**



En el Fig 4, se aprecia las variaciones observadas en el crecimiento de las colonias con respecto al control pH7. Las cepas 1, 4, 5, 8, 21 y 22 fueron afectadas por la acidez, pH4. Esta información nos permite evaluar la respuesta que cada cepa antes de inocularla en campo, cuando cambian las condiciones de acidez del suelo y debe tenerse en cuenta para la selección del bioinoculante.

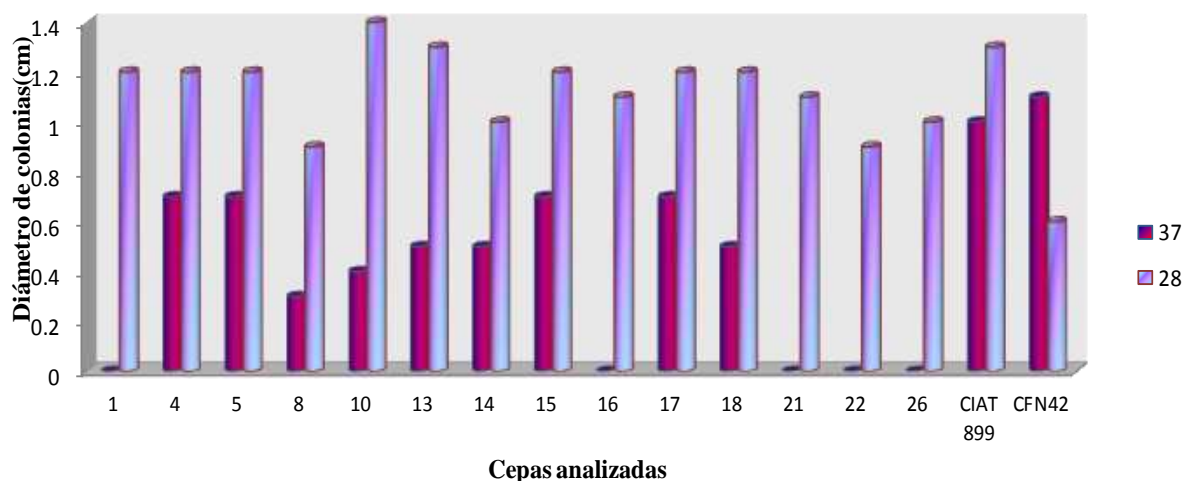
### 5.4.3 Crecimiento a varios niveles de temperatura

Las cepas que fueron incubadas a 28 °C en LMA tuvieron diámetros de colonia en crecimiento entre 0.9 cm y 1.4cm. El 64.3% de las cepas crecieron regular a una temperatura de 37 °C; las cepas que fueron afectadas por esta temperatura fueron las cepas 1, 16, 21, 22 y 26. Mientras que, las temperaturas de 8 °C y 40 °C afectaron el crecimiento de todas las cepas analizadas, ninguna creció a estas temperaturas (Fig 5).

En relación a la variedad origen, el 75% de las cepas aisladas de la variedad Blanco molinero crecieron a 37 °C. El 66.7% de las cepas aisladas de la variedad Canario centerario crecieron a 37 °C y la *cepa 26* fue la única aislada de Alubia Argentina su crecimiento fue afectado a temperaturas de 8, 37 y 40 °C, pero no a 28 °C.

Las dos cepas control *R. tropici* (CIAT899) y *R. etli* (CFN42) crecieron bien a 37 °C, pero no crecieron a 8 y 40 °C de temperatura.

**Fig5. Gráfico comparativo entre el crecimiento de *Rhizobium* a 37°C y 28 °C**



#### 5.4.4 Crecimiento en medios con diferentes concentraciones de NaCl

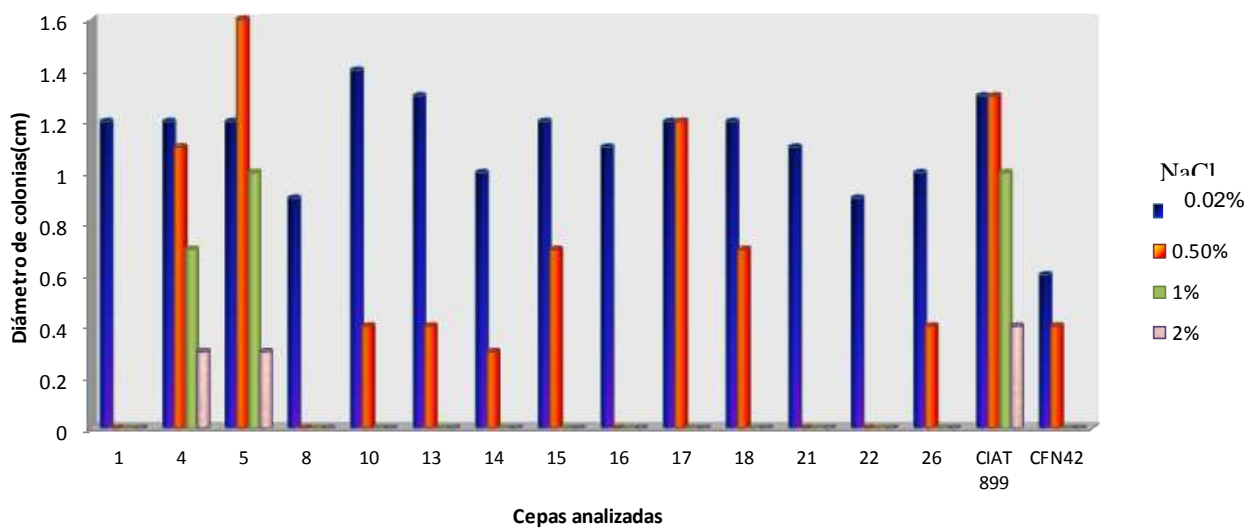
El 85% de las cepas aisladas no toleraron concentraciones de NaCl de 1 y 2%. Sólo las cepas 4, 5 toleraron concentraciones de 1 y 2% de NaCl. El 64.3% de las cepas toleraron concentraciones 0.5 % de NaCl.

En relación a la variedad origen, el 50% de las cepas aisladas de la variedad Blanco molinero toleraron concentraciones de 0.5%, 1% y 2% de NaCl. El 42.9% de las cepas aisladas de la variedad 'Canario Centenario' toleraron concentraciones de 0.5% de NaCl, pero no presentaron tolerancia al NaCl al 1y 2%. La cepa 26, aislada de la variedad 'Alubia Argentina', creció bien a 0.5% de NaCl.

En el ensayo se demuestra que concentraciones superiores a 0.5% de NaCl afectan el crecimiento de las cepas bacterianas. En total cinco cepas, 1, 8, 16, 21 y 22, fueron afectadas por concentraciones de NaCl mayores a 0.5%. La cepas 17 no fue afectada por una concentración de 0.5%; se observó que tuvo un crecimiento muy similar a 0.02% y 0.5%, sin embargo no creció a 1 y 2% de salinidad (Fig 6).

La cepa de *R. tropici* (CIAT899) toleró hasta 2% de NaCl; mientras que, la cepa *R. etli* (CFN42), no toleró concentraciones de sal de 1 y 2%.

**Fig6. Gráfico comparativo entre el crecimiento de *Rhizobium* a distintas concentraciones de NaCl**



## 5.5 CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDAD PGPR

### 5.5.1 Prueba de solubilización de fosfato

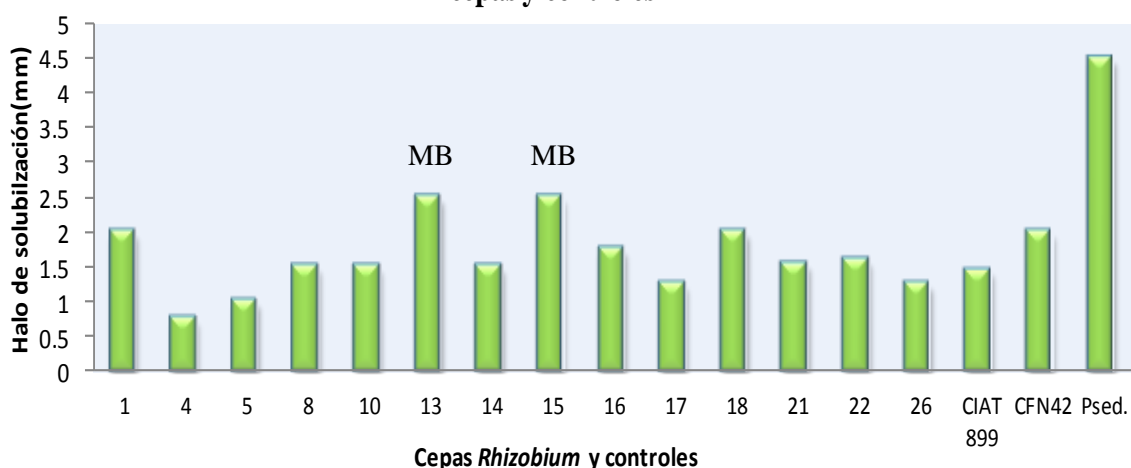
El 100% de las cepas analizadas fueron solubilizadoras de fósforo en el medio NBRIP (Fig 7). Los halos de solubilización median entre 0.75 y 2.5mm. Se establecieron cuatro escalas de la Cuadro 12.

**Cuadro 12.** Escalas de los halos de solubilización

	Escala de halos
MBS= Muy buena	2.5 mm $\leq$
B= buena	1.5-2.4mm
P= poca	0.1-1.4mm
N= ninguna	0mm

Fuente: Elaboración propia

**Figura 7.** Comparación de la longitud del halo de solubilización de las cepas y controles



Las cepas 13 y 15 fueron clasificadas como muy buenas solubilizadoras, ambas cepas formaron halos de 2.5mm. Estas cepas representaron un 14.28% de las cepas aisladas de la variedad 'Canario Centenario'. El 57.14% de las cepas analizadas fueron clasificadas como buenas solubilizadoras y el 28.57% de las cepas se clasificaron como poco solubilizadoras. Por otro lado, los controles positivos de *Rhizobium* también solubilizaron el fosfato del medio de cultivo, la cepa *R. tropici* (CIAT 899) presentó un halo de 1.45mm y la cepa *R. etli* (CFN42) con un halo de 2.0mm. De esta forma demostramos que las cepas *Rhizobium* si son capaces de solubilizar el fosfato del medio de cultivo.

Si se considera la variedad de *P. vulgaris*, de donde fue aislada la cepa bacteriana, se aprecia que el 50% de los aislados de la variedad 'Blanco Molinero' son poco solubilizadoras y el 50% restantes buenas solubilizadoras. En la variedad 'Canario Centenario' el 22.2% de las cepas fueron cepas muy buenas solubilizadoras, el 66.7% de las fueron buenas y el 11.1% fueron poco solubilizadoras. En el caso de la variedad 'Alubia Argentina' la cepa aislada 26 solubilizó poco el fosfato tricálcico del medio NBRIP.

### **5.5.2 Producción de Acido Indolacético**

El 100% de las cepas analizadas fueron productoras de AIA (Anexo 1, Tabla 3), empleando al Triptófano como precursor. Los *Rhizobium* controles *R. etli* y *R. tropici* también viraron el medio cuando se le añadió el reactivo de Salkowski. No se apreció cambio de color en el caldo con el LMC+ (Anexo 4, foto 14).

### **5.5.3 Prueba de Antagonismo**

En el estudio realizado no se identificaron *Rhizobium* antagonistas de *Macrophomina phaseolicola* en placa de cultivo (Anexo 4, foto 16). La verificación que el medio y condiciones eran las adecuadas para ambos microorganismos se realizó apreciando el halo generado por *Trichoderma* (Anexo 1, Tabla 3).

## 5.6 ENSAYO EN PLÁNTULAS DE FRIJOL

Se trabajaron sólo las cepas que crecían a las 48h. Luego de diez días de realizada la inoculación se apreciaron nódulos pequeños de 0.5 mm. El 84.6% de las cepas nodularon las raíces de *P. vulgaris* var. 'Canario Centenario'. Las plántulas inoculadas con las cepas 21, 10, 8 y 15 generaron la mayor cantidad de nódulos, con 30, 28, 26 y 22 nódulos respectivamente (Cuadro 13).

Dentro del grupo de bacterias que nodularon *P. vulgaris*, la cepa 10 tuvo una mayor longitud de parte aérea con  $27.23 \pm 2.368$  cm. La cepa 13 fue la de mayor longitud raíz  $16.55 \pm 2.859$  cm y tuvo mayor peso fresco de hojas  $2.78 \pm 0.50$  g de todas las cepas evaluadas. Se apreció que las plántulas inoculadas con estas cepas estaban vigorosas y sanas.

La cepa 17 fue una de las cepas que obtuvo el mejor comportamiento en la planta, de todas las cepas analizadas (Fig 9); en ella se observó una mayor abundancia de raíces. Esta cepa generó una longitud de raíz promedio de  $17.83 \pm 1.964$  cm; peso fresco de raíz  $2.33 \pm 0.2986$ g; longitud de parte aérea de  $26.30 \pm 3.074$ cm; peso fresco de hojas de  $3.15 \pm 0.351$ g y peso seco de hojas de  $0.34 \pm 0.61$ g. Además, presentó una mayor diferencia con respecto a las plantas control sin nitrógeno(N-) Sin embargo, esta cepa no noduló esta variedad.

### 5.6.1 Análisis estadístico

Luego de hacer el análisis de rangos múltiples de medias de Duncan con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ) se logró encontrar mayores diferencias significativas entre las cepas y los controles en los parámetros, peso fresco de hojas, peso fresco de raíz, peso seco de parte aérea, número de nódulos. En el Cuadro 13 se señala todas las cepas que tuvieron diferencias significativas con respecto al control N-, para todas las características evaluadas.



**Cuadro 13.** Efecto de la inoculación de *Rhizobium* en el crecimiento de plántulas de frijol (‘Canario Centenario’)

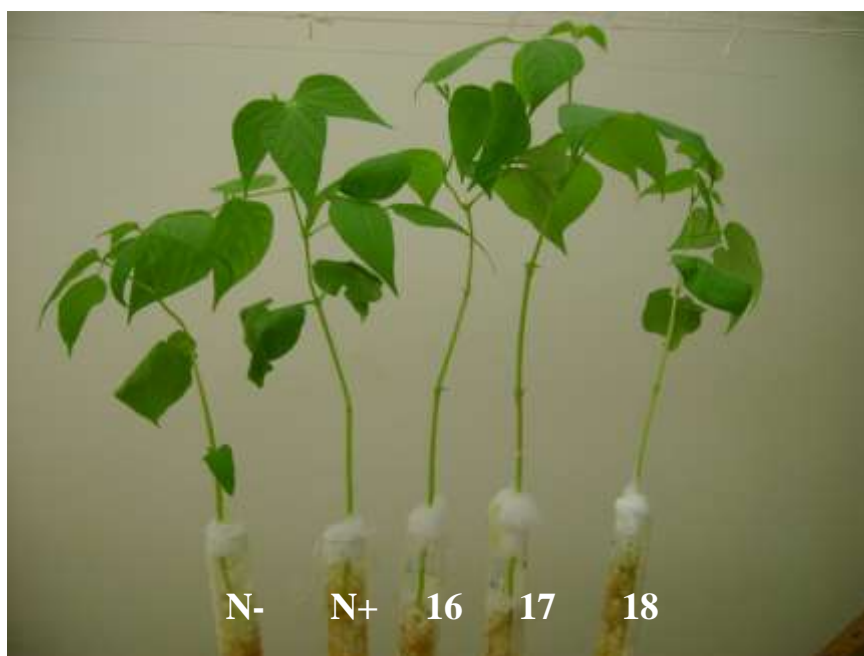
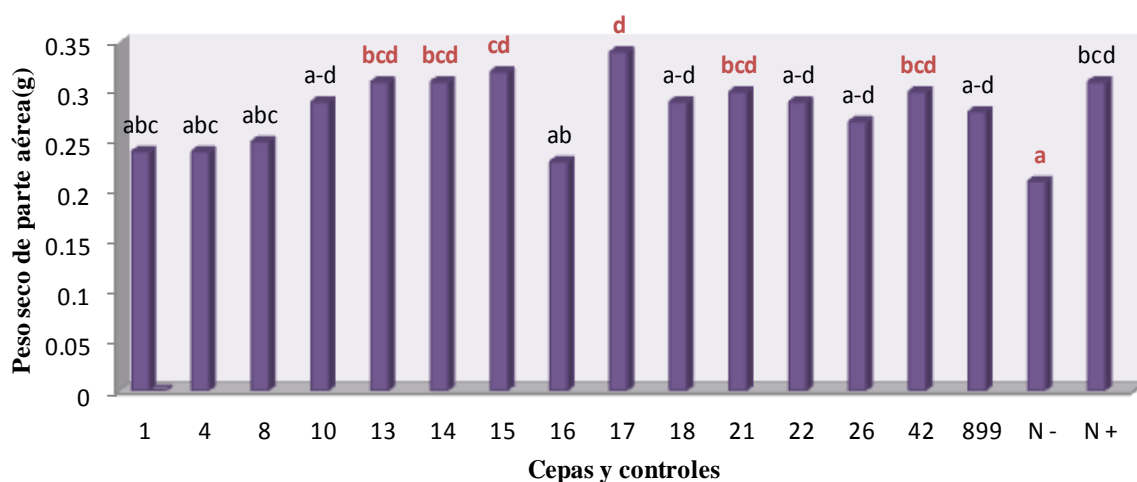
CEPAS	Longitud de la parte aérea (cm)		Longitud de la Raíz (cm)		Peso Fresco de parte aérea (g)		Peso Fresco de Raíz (g)		Peso Seco de las parte aérea (g)		Numero de Nódulos		Numero de Trifolios	
1	21.00	ab	13.93	ab	2.03	ab	1.40	a	.24	abc	5	a	3.25	b
4	22.53	abc	14.43	ab	2.20	abc	1.55	ab	.24	abc	0	f	3.00	ab
8	25.10	abc	11.80	a	2.23	abc	1.53	ab	.25	abc	<b>26</b>	c-e	2.25	ab
10	27.23	bc	14.83	ab	2.65	a-e	1.88	a-d	.29	a-d	<b>28</b>	de	2.00	a
13	25.25	abc	16.55	ab	2.78	c-e	1.88	a-d	.31	bcd	21	b-e	2.00	a
14	23.03	abc	16.05	ab	2.65	a-e	2.00	b-d	.31	bcd	14	abc	2.50	ab
15	25.02	abc	15.18	ab	3.14	e	2.10	cd	.32	cd	<b>22</b>	b-e	2.80	ab
16	23.15	abc	15.63	ab	2.23	abc	1.70	abc	.23	ab	18	a-e	2.25	ab
17	26.30	abc	17.83	b	3.15	e	2.33	d	.34	d	0	f	2.50	ab
18	22.98	abc	14.38	ab	2.63	a-e	1.98	b-d	.29	a-d	19	a-e	2.50	ab
21	25.33	abc	14.40	ab	2.97	de	2.0	b-d	.30	bcd	<b>30</b>	e	2.67	ab
22	23.15	abc	13.38	ab	2.70	a-e	1.70	abc	.29	a-d	11	ab	2.00	a
26	24.45	abc	16.08	ab	2.50	a-e	1.80	abc	.27	a-d	17	a-e	2.00	a
42	26.10	abc	11.30	a	2.73	b-e	1.78	abc	.30	bcd	17	a-e	2.00	a
899	25.40	abc	14.50	ab	2.38	a-d	1.83	abc	.28	a-d	15	a-d	2.25	ab
N -	19.77	a	12.00	a	2.00	a	1.77	abc	.21	a	0	f	2.00	a
N +	28.98	c	14.00	ab	2.88	c-e	1.78	abc	.31	bcd	0	f	3.00	ab

En cada columna tratamientos seguidos por las misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ); 899 (*R. tropici*, CIAT899) y 42 (*R. etli*, CFN42). Con rojo, diferencias significativas con respecto al N-.

En relación a longitud de parte aérea sólo la cepa 10 obtuvo una mayor diferencia significativa en la longitud de parte aérea con respecto al control N-, con un incremento de 27.4% con respecto al control N-. Al evaluar el peso fresco de hojas, apreciamos que las cepas 13, 15, 17, 21 y 42 (*R. etli*, CFN42) presentaron diferencias significativas con respecto al control N-, con incrementos de 28.06%, 36.1%, 36.51%, 32.66% y 26.74% respectivamente. La cepa 17 tuvo un peso fresco de raíz con un incremento significativo de 24.03% con respecto al N-.

Además, se aprecia que las cepas, 13, 14, 15, 17, 21 y 42 (CFN42, *R. etli*) tuvieron mayores diferencias significativas de peso seco de parte aérea con respecto al control N-. La cepa 17 tuvo la mayor diferencia significativa peso seco de parte aérea con respecto al N-, con 38.24% mayor al control N-, lo cual coincide con las observaciones antes mencionadas, sin embargo no noduló. Las cepas 13, 14, 15, 21 tuvieron incrementos de 32.26%, 32.26%, 34.37% y 30% respectivamente con respecto al control N-.

**Fig 8. Comparación del peso seco de plántulas de frijol (variedad 'Canario Centenario') inoculadas con *Rhizobium***



**Fig 9. Comparación del efecto de las cepas 16, 17, y 18 frente al control negativo N- (sin nitrógeno) y control positivo N+ (con nitrógeno) en el crecimiento de frijol (variedad 'Canario Centenario').**

En la Figura 8, las barras señaladas en rojo son las que tuvieron mayor diferencia significativa con respecto al control N-. El Análisis de Varianza (ANOVA) se realizó para evaluar diferencias significativas de todas las características analizadas *Rhizobium*. Se determinó que las características peso fresco de hojas, raíz, peso seco de raíz y número de nódulos poseían diferencias significativas con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) (Anexo2, Tabla 7).

**Cuadro 14. Correlaciones entre todas las características evaluadas**

		<i>Longitud de la parte aérea</i>	<i>Longitud de la Raíz</i>	<i>Peso Fresco de Hojas</i>	<i>Peso Fresco de Raíz</i>	<i>Peso Seco de las Hojas</i>	<i>Numero de Nódulos</i>
Longitud de la Raíz	Correlación de Pearson	.592					
	Sig. (bilateral)	<b>.000</b>					
Peso Fresco de Hojas	Correlación de Pearson	.719	.593				
	Sig. (bilateral)	<b>.000</b>	<b>.000</b>				
Peso Fresco de Raíz	Correlación de Pearson	.625	.698	.788			
	Sig. (bilateral)	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>			
Peso Seco de las Hojas	Correlación de Pearson	.758	.631	.952	.774		
	Sig. (bilateral)	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>	<b>.000</b>		
Numero de Nódulos	Correlación de Pearson	.191	.183	.240	.251	.241	
	Sig. (bilateral)	<b>.115</b>	<b>.132</b>	<b>.047</b>	<b>.037</b>	<b>.046</b>	
Numero de Trifolios	Correlación de Pearson	.393	.309	.238	.276	.215	-.186
	Sig. (bilateral)	<b>.001</b>	<b>.010</b>	<b>.049</b>	<b>.021</b>	<b>.076</b>	<b>.126</b>

Analizando las correlaciones entre las características observamos que existen correlaciones significativas entre la longitud de la raíz con la longitud de la parte aérea; el peso fresco de las hojas con la longitud de la parte aérea y la longitud de la raíz; el peso fresco de la raíz con la longitud de la parte aérea, con la longitud de la raíz y con el peso fresco de las hojas; el peso seco de las hojas con la longitud de la parte aérea con la longitud en la raíz, con el peso fresco de las hojas y con el peso fresco de la raíz ; a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ )(Cuadro 14).

Ahora analizando el número de nódulos sólo tiene correlación con el peso fresco de las hojas, peso fresco de raíz y peso seco de hojas a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Así mismo, el número de trifolios tiene correlación con la longitud de la parte aérea, con la longitud de la raíz, con el peso fresco de las hojas y con el peso fresco de la raíz a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ).

### **5.6.2. Análisis de asociaciones entre parámetros analizados**

Se observó una alta asociación entre el peso seco de la parte aérea con el peso fresco de la parte aérea, peso fresco de raíz, los coeficientes de correlación variaron entre 0.66 y 0.99. La materia seca de la parte aérea también mostró regular asociación, con el crecimiento a 37°C, con la longitud de la parte aérea y la longitud de raíz, los coeficientes de correlación variaron entre 0.57 y 0.65. Asimismo, la materia seca mostró una baja asociación con el pH4, pH 8.8, 0.5% de NaCl, con coeficientes de correlación entre 0.45 y 0.56.

En relación al número de nódulos, presentaron poca asociación con pH4, concentraciones 1 y 2 % de NaCl. Entre los resultados de las pruebas de solubilización el número de nódulos presentó asociación media con pH4, las concentraciones de 1 y 2% de NaCl. Además, la temperatura de 37°C estuvo muy asociada con el pH8.8, con coeficiente de correlación de 0.70. La concentración de NaCl al 0.5% estuvo asociada a un crecimiento de 37°C en LMA. Finalmente la concentración de NaCl al 0.5% estuvo asociada con el pH 8.8, con un coeficiente de correlación de 0.75 (Cuadro 15).

En el caso de la asociación entre la solubilización el pH4. Esta asociación estaría relacionada con la liberación de ácidos de parte de las cepas, necesarios para solubilizar fosfato. Para ello es necesario identificar el tipo de ácido liberado por las cepas. Además, la materia seca de la parte aérea tuvo asociación con la mayoría de los ensayos realizados.

**Cuadro 15.** Asociación entre los resultados de las pruebas realizadas, pruebas bioquímicas, solubilización y ensayo en plántulas

	Pruebas bioquímicas											Sol.			Ensayo en plántulas						
	Cepa	Var.	pH4	pH5	pH8	pH8.8	28°C	37°C	0.5s	1s	2s	SS	NN	LPA	LR	PFPA	PFR	PSPA	NN	HOJAS	
Cepa	1.00																				
Var.	0.51	1.00																			
pH4	0.21	0.54	1.00																		
pH5	-0.59	-0.35	-0.36	1.00																	
pH8	0.01	0.13	0.55	0.14	1.00																
pH8.8	-0.21	-0.09	0.44	0.32	0.88	1.00															
28°C	-0.38	0.19	0.58	0.02	0.50	0.53	1.00														
37°C	-0.36	0.04	0.28	0.20	0.57	<b>0.70</b>	0.46	1.00													
0.5s	-0.26	-0.20	0.02	0.23	0.55	<b>0.75</b>	0.43	<b>0.82</b>	1.00												
1s	-0.51	-0.54	-0.39	0.45	0.35	0.47	0.18	0.47	0.73	1.00											
2s	-0.53	-0.55	-0.39	0.46	0.36	0.46	0.19	0.48	0.71	0.98	1.00										
SS	0.15	0.49	<b>0.59</b>	-0.34	0.09	-0.11	0.21	-0.11	-0.41	<b>-0.60</b>	<b>-0.63</b>	1.00									
NN	0.25	0.29	<b>0.45</b>	-0.45	0.11	-0.19	0.02	-0.21	-0.49	<b>-0.50</b>	<b>-0.50</b>	0.41	1.00								
LPA	0.00	0.14	<b>0.64</b>	-0.29	0.21	0.44	0.28	<b>0.49</b>	0.39	-0.16	-0.16	0.05	0.13	1.00							
LR	0.10	0.23	0.54	0.18	0.44	<b>0.69</b>	0.35	<b>0.45</b>	<b>0.56</b>	-0.04	-0.04	0.08	-0.39	0.58	1.00						
PFPA	0.40	0.60	<b>0.59</b>	-0.44	0.35	0.42	0.23	<b>0.59</b>	0.54	-0.29	-0.29	0.31	0.00	<b>0.62</b>	0.59	1.00					
PFR	0.37	0.59	0.60	-0.17	0.45	0.58	0.27	0.64	0.62	-0.28	-0.28	0.18	-0.07	0.63	0.74	0.92	1.00				
PSPA	0.26	<b>0.52</b>	<b>0.56</b>	-0.29	0.30	<b>0.45</b>	0.23	<b>0.62</b>	<b>0.51</b>	-0.31	-0.31	0.28	-0.09	<b>0.64</b>	<b>0.65</b>	<b>0.95</b>	<b>0.91</b>	1.00			
NN	0.25	0.29	0.45	-0.45	0.11	-0.19	0.02	-0.21	-0.49	-0.50	-0.50	0.41	1.00	0.13	-0.39	0.00	-0.07	-0.09	1.00		
HOJAS	-0.67	-0.39	-0.26	0.62	0.12	0.33	0.20	0.35	0.35	0.44	0.44	0.01	-0.61	-0.24	0.09	-0.16	-0.09	-0.09	-0.61	1.00	

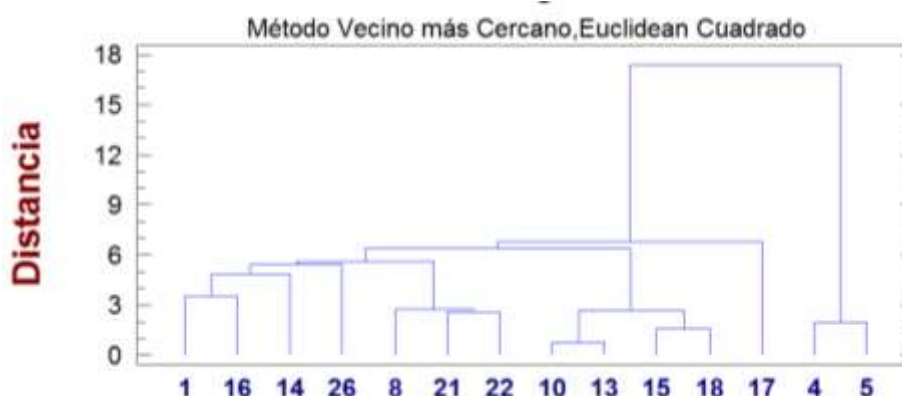
0.66-0.99 Alta asociación
  0.57-0.65 Regular asociadas
  0.45-0.56 Baja asociación

## 5.7. ANÁLISIS INTEGRADO DE LAS CEPAS

En base a los resultados de las pruebas bioquímicas, ensayo de plantas y solubilización de fosfato se procedió a analizar las cepas agrupándolas en dendogramas. En ellos se plasma los diversos grupos de cepas de *Rhizobium*.

### 5.7.1 Pruebas bioquímicas (crecimiento a distintas condiciones ambientales)

Al realizar el análisis integrado de las cepas *Rhizobium*, cepas de 48h en LMA, se observa que las cepas logran formar cuatro grupos distantes entre ellos. El Grupo I, que incluye a las cepas 1, 16, 14 y 24 en el subgrupo Ia y el segundo subgrupo Ib en el que se encuentran las 8, 21 y 22. El Grupo II, incluye a las cepas 10, 13, 15 y 18. El Grupo III, que incluye a la cepa 17 y el Grupo IV que incluye a las cepas 4 y 5. En la Cuadro 16 y en el Figura 10 se aprecian las características de crecimiento de las cepas evaluadas.



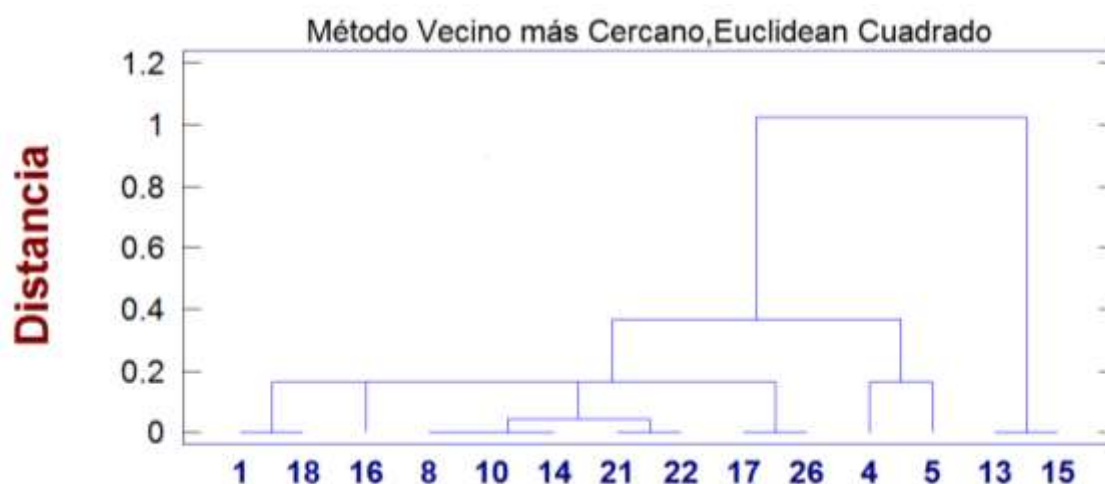
**Figura 10.** Dendrograma de las cepas evaluadas en las pruebas bioquímicas

**Cuadro 16.** Agrupación de las cepas evaluadas en las pruebas bioquímicas

GRUPOS	Subgrupo	Cepas	T (°C)	PH	NaCl%
Grupo I	Ia	1	28 °C	5-8.8	0.02%
		16	28-37 °C	4-8.8	0.02%
		14	28-37 °C	4-8.8	0.02-0.5%
		26	28 °C	4-8.8	0.02-0.5%
	Ib	8	37 °C 28 °C	5 -8.8	0.02%
		21 y 22			
Grupo II	-	10,13,15,18	28-37 °C	4-8.8	0.02-0.05%
Grupo III	-	17	28-37 °C	4-8.8	0.02-0.5%
Grupo IV	-	4, 5	28°-37 °C	4-8.8	0.02-2%

### 5.7.2. Prueba de solubilización

En base a los resultados de la prueba de solubilización se elaboró un dendograma para agrupar a las cepas. Se observó la aparición de tres grupos. En el Grupo I, las cepas 1, 18, 16, 8, 10, 14, 21, 22, 17 y 26 (distribuidos en cuatro subgrupos). En el Grupo II las cepas 4 y 5 y en el Grupo III, las cepas 13 y 15, estas dos últimas son las que tuvieron los mayores halos de solubilización (Figura 11 y Cuadro 17).



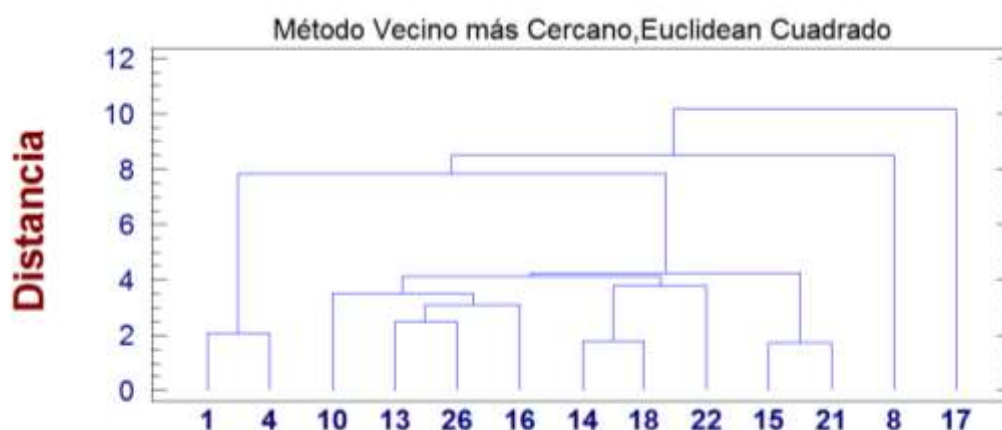
**Figura 11.** Dendograma de las cepas *Rhizobium* evaluadas en la prueba de solubilización

**Cuadro 17.** Agrupación de las cepas evaluadas en la prueba de solubilización de fosfato

GRUPOS	Subgrupos	Cepas	Halo (mm)
<b>Grupo I</b>	<b>Ia</b>	1, 18	2
	<b>Ib</b>	16	1.75
	<b>Ic</b>	8,10, 14, 21, 22	1.5-1.6
	<b>Id</b>	17, 26	1.25
<b>Grupo II</b>	-	4 y 5	0.75 y 1
<b>Grupo III</b>	-	13,15	2.5

### 5.7.3. Ensayo en plántulas

Después de realizar la evaluación de las plántulas de frijol al inocularlas con las cepas *Rhizobium*, se procedió a realizar un análisis de agrupamiento de las cepas considerando los resultados de los siete parámetros evaluados (Figura 12). Se observó la aparición de cuatro grupos. El Grupo I, incluyó a las cepas 1 y 4. El Grupo II, a las cepas 10, 13, 26, 16, 14, 18, 22, 15 y 21 (distribuidas en cuatro subgrupos). El Grupo III, incluyó a la cepa 8 y el Grupo IV a la cepa 17 (Cuadro 18).



**Figura 12.** Dendrograma de las cepas *Rhizobium* considerando los siete parámetros evaluados en las plántulas de frijol

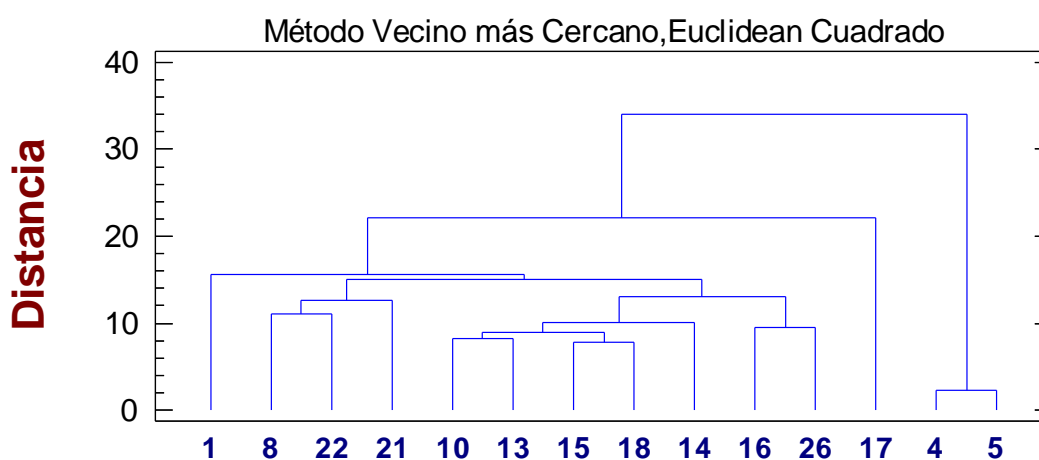
**Cuadro 18.** Agrupación de las cepas evaluadas en el ensayo de las plántulas de frijol

GRUPOS	Subgrupo	Cepas	Nód.	N°Nódulos	PSPA
<b>Grupo I</b>	-	1	+	5	0.24g
		4	-	0	0.24g
<b>Grupo II</b>	<b>Ia</b>	10	+	28	0.29g
	<b>Ib</b>	13, 26 y 16	+	21, 17 y 18	0.31g, 0.27g y 0.23g
	<b>Ic</b>	14, 18 y 22	+	14, 19 y 11	0.31g, 0.29g y 0.29g
	<b>Id</b>	15, y 21	+	22 y 30	0.32g y 0.3g
<b>Grupo III</b>	-	8	+	26	0.25g
<b>Grupo IV</b>	-	17	-	0	0.34g



#### 5.7.4. Integración de las evaluaciones en un dendograma

En base a la integración de los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas (crecimiento a distintos valores de pH, temperatura y salinidad), prueba de solubilización de fosfato y los resultados de ensayo en plántulas de frijol, se elaboró un sólo dendograma. En el Figura 13, se pueden apreciar hasta tres grupos de cepas, el primer Grupo Ia, incluye a la cepa 1. El segundo Grupo II, se aprecian dos subgrupos el subgrupo Ia que incluye a las cepas 8, 22 y 21 en el subgrupo IIb que incluye a las cepas 10, 13, 15, 18, 14, 16 y 26. En el Grupo III a la cepa 17 y en Grupo IV a las cepas 4 y 5 (Cuadro 19).



**Figura 13.** Dendograma de las cepas *Rhizobium* en base a la integración de los resultados de la pruebas

**Cuadro 19.** Agrupación de las cepas evaluadas en base a la integración de los resultados de las pruebas

<i>GRUPOS</i>	<i>Subgrupo</i>	<i>Cepas</i>
<b>Grupo I</b>	-	<b>1</b>
<b>Grupo II</b>	<b>IIa</b>	<b>8, 22, 21</b>
	<b>IIb</b>	<b>10, 13, 15, 18, 14, 16, 26</b>
<b>Grupo III</b>	-	<b>17</b>
<b>Grupoo IV</b>	-	<b>4, 5</b>

Al analizar las cualidades de las cepas por grupos apreciamos lo siguiente: En el Grupo I se incluye a la cepa, 1a cual noduló las plántulas de frijol, formó nódulos efectivos. Además fue capaz de solubilizar fosfato con halos de 2mm y de producir de ácido indolacético. Así mismo, toleró valores de pH entre 5 y 8, 8; fue sensible a concentraciones de NaCl mayores a 0.02% y le afectó las temperaturas de 8 °C y 40 °C.

En el Grupo II, se incluye a las cepas 8, 22, 21, 10, 13, 15, 18, 14, 16 y 26, las cuales tuvieron en común la capacidad de nodular a frijol en el ensayo en plántulas de frijol, todas producen ácido indolacético y solubilizan fosfato y no lograron crecer a 8 °C y 40 °C. Al evaluar las diferencias en este grupo, las cepas 21, 10, 8 y 15 formaron la mayor cantidad de nódulos y las cepas 13, 14, 15, 17, 21 tuvieron mayor peso seco de parte aérea en comparación con el control N-. En este grupo hay diferencias de crecimiento a distintas temperaturas, las cepas 8, 10, 13, 15, 16, 14 y 18 crecen de 28 °C a 37 °C, mientras que algunas sólo a 28 °C o 37 °C. La cepas, 16, 14, 26, 10, 13, 15 y 18, crecen desde pH 4 a 8.8 y toleran hasta 0.5% de NaCl a excepción de la cepa 16 que tolera hasta 0.2%.

En el Grupo III, a la cepa 17, la cual no logró nodular frijol; sin embargo, generó el mayor peso seco de todas cepas evaluadas, produce ácido indolacético y solubilizar fosfato, cualidades de cepa promotora de crecimiento. En las pruebas bioquímicas toleró de 28°C a 37°C, pero fue sensible a 8 y 40°C, creció entre 4 a 8.8 de pH y toleró sólo hasta 0.5% de NaCl.

Finalmente, en el Grupo IV, las cepas 4 y 5, las cuales son cepas no noduladoras de frijol, produjeron ácido indolacético y solubilizan fosfato, crecieron a temperaturas de 28°C a 37°C, pero fueron sensibles a 8 y 40°C, crecieron de 4 a 8.8 y toleraron sólo hasta 2% de NaCl.

El dendograma observado permitió identificar cuatro grupos de cepas, en base al grado de similitudes y diferencias entre las cepas. Esta agrupación es la evidencia que dentro de una misma especie existen variaciones fenotípicas las cuales nos indican el grado de variación entre las cepas. En la Cuadro 20, se resume los resultados totales de las pruebas realizadas.

**Cuadro 20.** Resumen de los resultados de la caracterización fenotípica, capacidad PGPR y la capacidad simbiótica de las cepas de 48h

C.	Var	Pruebas Bioquímicas											Pruebas PGPR			C. S		Ensayo en plántulas de frijol				
		PH4	PH5	PH8	PH8.8	T8°	T37°	T28°	T40	0.5*	1*	2*	Sol	AIA	Ant	Fi	#n	LPA	LR	PSPA	PFR	PSR
1	BM	0	0.9	1	1.1	0	0	1.2	0	0	0	0	2	+	-	+	5	21	13.93	2.03	1.4	0.24
4	BM	0	0.9	1.5	1.5	0	0.7	1.2	0	1.1	0.7	0.3	0.8	+	-	-	0	22.53	14.43	2.2	1.55	0.24
5	BM	0	0.9	1.5	1.6	0	0.7	1.2	0	1.6	1	0.3	1	+	-							
8	BM	0	0.7	0.9	0.9	0	0.3	0.9	0	0	0	0	1.5	+	-	+	26	25.1	11.8	2.23	1.53	0.25
10	CC	0.9	0.6	1.4	1.4	0	0.4	1.4	0	0.4	0	0	1.5	+	-	+	28	27.23	14.83	2.65	1.88	0.29
13	CC	0.9	0.6	1.4	1.3	0	0.5	1.3	0	0.4	0	0	2.5	+	-	+	21	25.25	16.55	2.78	1.88	0.31
14	CC	0.3	1	1.4	1.4	0	0.5	1	0	0.3	0	0	1.5	+	-	+	14	23.03	16.05	2.65	2	0.31
15	CC	0.8	0.6	1.6	1.5	0	0.7	1.2	0	0.7	0	0	2.5	+	-	+	22	25.02	15.18	3.14	2.1	0.32
16	CC	0.4	0.9	1.3	1.2	0	0	1.1	0	0	0	0	1.8	+	-	+	18	23.15	15.63	2.23	1.7	0.23
17	CC	0.3	0.7	1.1	1.3	0	0.7	1.2	0	1.2	0	0	1.3	+	-	-	0	26.3	17.83	3.15	2.33	0.34
18	CC	0.5	0.7	1.6	1.5	0	0.5	1.2	0	0.7	0	0	2	+	-	+	19	22.98	14.38	2.63	1.98	0.29
21	CC	0	0.6	1.1	0.8	0	0	1.1	0	0	0	0	1.6	+	-	+	30	25.33	14.4	2.97	2	0.3
22	CC	0	0.5	1	0.9	0	0	0.9	0	0	0	0	1.6	+	-	+	11	23.15	13.38	2.7	1.7	0.29
26	AA	0.4	0.6	1.4	1.4	0	0	1	0	0.4	0	0	1.3	+	-	+	17	24.45	16.08	2.5	1.8	0.27
R1	-	1.2	1.1	1.7	1.8	0	1	1.3	0	1.3	1	0.4	1.5	+	-	+	15	21	13.93	2.03	1.4	0.24
R2	-	0.5	0.7	0.9	1.1	0	1.1	0.6	0	0.4	0	0	2	+	-	+	17	22.53	14.43	2.2	1.55	0.24

BM=Blanco Molinero, CC=Canario Centenario, AA=Alubia Argentina, \*= Salinidad en %, #nod= nodulación, Sol= solubilizadores, Ant<sup>1</sup>=Antagonismo, C.S.=capacidad simbiótica, nod: nodulación (+/-), #n =número de nódulos, Fij. Fijación +/- R1: CIAT 899(*R. tropici*), R2: CFN42 (*R. etli*)

## VI. DISCUSIONES

### **Aislamiento y pruebas de pureza de *Rhizobium***

En el aislamiento se verificó las características morfológicas, de apariencia, tamaño, tiempo de crecimiento y color las cuales corresponden al género *Rhizobium* de crecimiento rápido (Sessitsch et al, 2002; Wang y Martínez-Romero, 2002; Matsubara, 2010, Paima, 2005). La textura elástica encontrada se debe a la producción de exopolosacáridos (EPS), polímeros de glucosa y otras hexosas que forman parte de la cápsula bacteriana. Según Rinaudi (2010), los EPS son importantes componentes que le dan forma y estabilidad a los biofilms bacterianos.

En relación a las pruebas de pureza, las cepas de crecimiento a las 24h correspondieron al género *Agrobacterium* porque producen cetolactasa en el medio de cultivo LLA, este reactivo tiene interacción con los azúcares reductores presentes de la degradación de la lactosa como galactosa y glucosa. Esta enzima es propia del género y puede emplearse como indicador para la diferenciación entre cepas el género *Rhizobium* y *Agrobacterium* en el medio de cultivo luego del aislamiento (CIAT 1987).

El prueba de crecimiento de las cepas, en el cultivo LB, permitió observar notablemente la diferencia de ambos grupos. Las cepas *Rhizobium* no crecieron en este medio de cultivo y las cepas *Agrobacterium* si lograron crecer (CIAT 1987). Asimismo, *Rhizobium tropici*, utilizado como control, logró crecer en este medio de cultivo; lo cual coincide con Marquina *et al* (2012) y Wang y Martínez-Romero (2002). Para el caso de *R. etli*, no logra crecer en este medio de cultivo, coincidiendo con los resultados de estos dos últimos autores.

### **Caracterización simbiótica**

La característica simbiótica de *Rhizobium* se evaluó en función de la infectividad (capacidad de infectar la leguminosa, formando nódulos) y efectividad (capacidad de fijar nitrógeno). Estas características han sido evaluadas por varios investigadores (Matsubara, 2010; Santillana, 2007, Ogata, 2005, Zúñiga, 1997, Matos, 1994).

Matsubara (2010) observó la coloración rojiza en nódulos de *Phaseolus lunatus* inoculados con *Bradyrhizobium*. Además, Matos *et al* (2002) purificaron 10 cepas de rizobios del cultivo de *Phaseolus lunatus* y observaron que la coloración de los nódulos fue de rosado a rojo. Según Orozco (1999), afirma que la leghemoglobina es una ferrohemo-proteína que es formada exclusivamente por la simbiosis y se encuentra en el citoplasma de las células infectadas. Madigan (2008) menciona que la función de la leghemoglobina es controlar las condiciones de O<sub>2</sub>, manteniendo una baja concentración de O<sub>2</sub> hasta la membrana peribacteroidal, de tal forma que los bacteroides reciban el oxígeno, permitiendo de esta forma que los bacteroides reduzcan el N<sub>2</sub> atmosférico, sin que la nitrogenasa se inactive irreversiblemente por altas concentraciones de O<sub>2</sub>.

Según Kellman (2008) la evaluación visual de la leghemoglobina (grado de pigmentación) de los nódulos es una medida relativa su efectividad, lo cual fue evaluado en el presente trabajo de investigación. Este autor propone el empleo de técnicas más precisas como la técnica de dilución isotópica de <sup>15</sup>N; la medida de la reducción del acetileno (ARA), para medir la actividad nitrogenasa; método del exudado de ureídos del xilema; método de la equivalencia del fertilizante nitrogenado y la técnica de la abundancia natural de <sup>15</sup>N. En el caso de *P. vulgaris* la determinación de la cantidad fijada es limitada por la presencia de rizobios nativos, algunas veces infectivos y la falta de nodulación de los inóculos incorporados al suelo.

### **Caracterización bioquímica**

El ensayo de acidez en azul de bromotimol, permitió diferenciar las cepas de crecimiento lento, como *Bradyrhizobium* de las cepas de crecimiento rápido *Rhizobium* (48horas). Además, se observó que todas las cepas aisladas crecieron y viraron el medio de cultivo de verde a amarillo, debido a la fermentación de azúcares, en el caso de los *Bradyrhizobium* se debe a la producción de amonio provenientes de la degradación de compuestos nitrogenados provenientes del extracto de levadura en el medio (Marsudi, 1999). Según Marquina *et al* (2011) tanto *R.etli* como *R.tropici* deben acidificar a amarillo el medio de cultivo, con azul de bromotimol, lo cual coincide con el ensayo realizado.

Los valores extremos de pH son un factor limitante para los microorganismos en el suelo. Ligeras variaciones del pH en el medio pueden tener efectos significativos en el crecimiento de las bacterias (Shetta *et al*, 2011). En el presente estudio, el 42.8% toleraron valores de pH de 5 a 8.8. Estos resultados se aproximan con los resultados de Shetta *et al* (2011), quienes indicaron que la mayoría de los rizobios, aislados de *Acacia*, crecieron a 6.5, 7 y 8, ninguna cepa creció a pH 12. Estos autores afirman que el pH óptimo fue de 9.0, en el presente estudio el pH óptimo fue de 7 a 8.8.

El 57.1% de las cepas aisladas toleraron valores de pH 4.0; los controles *R. tropici* y *R. etli* crecieron bien a pHs de 4.0, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos por Marquina *et al* (2011) en dicho estudio ambas cepas crecen a pH 4.4. Valores similares fueron obtenidos en un estudio de cepas *R. etli* aisladas de suelos de Egipto en donde la mayoría de cepas era capaz de sobrevivir a pH 4.7 y *R. tropici* (CIAT 899) a pH 4. Como se mencionó anteriormente el pH del suelo de *P. vulgaris* es de 7.86 por lo tanto, las cepas pueden recomendarse para este tipo de suelos característicos de la costa.

Según Ricillo *et al* (2000) y los distintos géneros de rizobios muestran una significativa variabilidad de crecimiento a bajas condiciones de pH, aunque no estén claras las bases moleculares. Además, afirman que la tolerancia a la acidez está relacionada con la producción de aminoácidos, azúcares, betaínas, diferencia en la composición y cantidad de sus exopolisacáridos, composición de lipopolisacáridos, acumulación de poliaminas. Estos investigadores demuestran que la producción metabólica de glutatona es esencial para proteger a *R. tropici* del estrés ácido en el ambiente. Zahran (1999) sostiene que hay una gran variabilidad de respuestas al ácido. Estas investigaciones puede explicar porqué las bacterias del género *Rhizobium* fueron tolerantes a condiciones ácidas del medio de cultivo, pH de 4 y 5.

La temperatura óptima de *Rhizobium* es 28 °C, por debajo o por encima de lo cual su metabolismo se ve afectado. Si la temperatura se encuentra debajo de 5 °C se impide el adecuado transporte de nutrientes, así como la formación del gradiente protónico de los rizobios(Santillana, 2007).En el presente estudio se apreció que el crecimiento óptimo de las cepas se presentó entre 28 °C (abundante) y 37 °C (menos abundante) y ninguna de las cepas creció a temperaturas muy bajas, 8 °C, ni muy altas 40 °C.Ogata (2005), también aisló rizobios que no crecen a 8 °C; Matsubara (2010) sostiene que algunos

casos *Rhizobium* logran crecer a 40 °C. En las investigaciones de Pahuara y Zúñiga (2002) aislaron cepas de *Rhizobium* que crecieron a 8, 28 y 37 °C pero no a 40 °C. Shetta *et al* (2011), estudiaron el efecto de la temperatura en rizobios aislados de la leguminosa arbórea *Acacia* sp. Estos autores concluyen que la mayoría de los aislados poseen un crecimiento óptimo de 30 °C y algunos crecen a 37 °C aproximándose a los resultados del presente estudio. Marquina *et al* (2011) indican que el 25% de los rizobios fueron tolerantes a temperaturas de 27 °C-35 °C. Según Zahran (1999) tanto las cepas sensibles como tolerantes sintetizan proteínas del shock al calor, esta característica fue observada en cepas que crecen de 40 a 45 °C. Santillana (2007) menciona que las proteínas de shock frío (CSP) y la síntesis de proteínas de aclimatación al frío (CAPs) y variaciones en la composición de los ácidos grasos serían responsables de la tolerancia al frío de algunas cepas de *Rhizobium*.

El 64.3% de las cepas toleraron una concentración de 0.5% de NaCl y el 35.7% restante no logró crecer a esta concentración. Las concentraciones mayores a 0.5% afectaron al 87.5% analizadas, sólo las cepas 4 y 5 fueron las únicas cepas tolerantes a 1 y 2% de NaCl. Los resultados fueron semejantes a los obtenidos por Hungría *et al* (2000) y Zúñiga (1997), quienes afirman que hay una inhibición del crecimiento de cepas *Rhizobium* desde concentraciones 0.58 % hasta 2.9% de NaCl. Sin embargo, algunas cepas lograron crecer al 2% de NaCl coincidiendo con los estudios de Luyo (1992) y Mayo (2002). Además, la cepa de *R. tropici* (CIAT899) toleró una concentración de 2% de NaCl; mientras que, la cepa *R. etli* (CFN42), toleró hasta 0.5% de NaCl. En el caso de *R. tropici* los resultados se aproximaron a los obtenidos por Marquina *et al* (2011), sin embargo, para el caso de *R. etli* se aprecia una incongruencia porque según el autor esta cepa tolera hasta 1% de NaCl; sin embargo en el presente estudio se apreció que no toleró esa concentración de sal.

La tolerancia a sal de las cepas analizadas está relacionada con la acumulación de solutos en su interior. Según Vriezen *et al* (2007), indican que la trehalosa es un agente osmoprotector que provee protección contra la desecación por el mantenimiento de la integridad de la membrana durante el secado y rehumectación. El mismo autor señala que los polisacáridos como EPS (Exopolisacáridos) también contribuyen a tolerar el efecto osmótico, sin embargo, no juega un rol primario en la sobrevivencia de los rizobios.

### **Capacidad promotora de crecimiento de *Rhizobium***

Todas las cepas de *Rhizobium* aisladas de los nódulos; así como, los controles positivos, *R. etli* y *R. tropici* solubilizaron el fosforo del medio NBRIP. Las cepas con mayor capacidad de solubilización fueron las cepas 13 y 15, al clasificarlas como muy buenas solubilizadoras. Sin embargo, ninguna de ellas logró superar a la cepa *Pseudomona sp.* La capacidad de muchas bacterias de solubilizar el fosfato se debe en algunos casos a la excreción de ácidos orgánicos. Entre ellos ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, etc. (Mohammand y Almas 2006). Sin embargo, no hay una relación definida entre la cantidad de ácido producido y la cantidad de fosfato solubilizado. En el caso de *Rhizobium* esta capacidad se debe a la producción de ácidos como el alfa cetoglucónico producido por *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* analizados por Halder y Chakrabarty (1993). Si bien es una prueba preliminar se requieren mayores ensayos en invernadero e identificación del tipo de ácido producido, por cada cepa aislada.

En la presente investigación todas las cepas bacterianas fueron productoras de AIA, lo cual coincide con el estudio realizado por Sridevi (2007). Este autor verificó además la producción de AIA a través del tiempo, las cepas *Rhizobium* aisladas de especies de *Sesbania sp*, produjeron AIA hasta las 72h. Luego de este tiempo de incubación, la producción decreció posiblemente debido a la liberación de enzimas degradadoras de de AIA como la AIA oxidasa y la AIA peroxidasa. La cantidad máxima que obtuvo fue 30.2µg/ ml después de 72 horas. Además en otros estudios se ha determinado que se obtiene mayor producción de AIA cuando se le incorpora triptófano al medio y su concentración para lograr la mayor producción de AIA varía entre 2.5 y 3µg/mL de triptófano dependiendo del tipo de *Rhizobium*.

Por otro lado, las pruebas de antagonismo los rizobios no lograron inhibir el desarrollo de los hongos *Macrophomina phaseolicola*. Los resultados se aproximan a los obtenidos por Matsubara (2010), quien determina que sólo el 7% de las cepas , identificadas como *Bradyrhizobium*, lograron inhibir al hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolicola*, en un ensayo realizado en laboratorio siguiendo la misma metodología aplicada en el presente estudio. Sin embargo, hay otros estudios que afirman que esta bacteria es capaz de inhibir su crecimiento. Ehteshamul-Haque y Ghaffar (1993), señalan que el género *Rhizobium* también inhiben significativamente el crecimiento de hongos fitopatógenos de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Gold,



*Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp., en plantas leguminosa como en no leguminosas. Antoun y Prevost (2005) también menciona que los rizobios son un buen potencial como controlador de algunos patógenos de plantas.

La capacidad de las bacterias de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos frente a hongos fitopatógenos se puede deber a la diferentes mecanismos o a la combinación de los mismos, tales como la inhibición por la producción de sustancias antimicrobianas(antibiosis), producción de metabolitos como sideróforos o rhizobiotina, competencia. En relación a la planta inducción de mecanismos de resistencia, inactivación de factores de germinación del patógeno, degradación de factores de patogenicidad, así como, la producción de enzimas extracelulares degradadoras de la pared celular como las quitinasas (El- Mehalawy, 2004). Ahmadzadeh y Sharifi (2009), mencionan que las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de producir cianida, floroglucinol, pioluteorina, *Pseudomona fluorescens* produce 2,4 diacetilfloroglucinol (DAPG).

Los resultados obtenidos, en las pruebas PGPR, son de gran utilidad para la realización de pruebas adicionales en plántulas de distintos cultivos. Estos estudios ya se vienen realizando desde los últimos doce años. Antoun y Prevost (2005) y Verma *et al* (2010) hacen mención de distintos ensayos realizados en recipientes, en invernadero y en campo aplicando las cepas de *Rhizobium* en cultivos de frijol, lechuga, trigo, papa, algodón, cebada , con una cepa o como inoculante mixto.

### **Ensayo en plántulas de frijol**

En base a los resultados estadísticos y las observaciones realizadas en el ensayo en plántulas, la cepa 17 fue la que obtuvo mejores resultados. En el estudio realizado, se pudo apreciar que la cepa 17 tuvo diferencias significativas de pesos seco de parte aérea y raíz, incrementos de 38.24% de materia fresca de parte aérea y aumentos de 24% en peso fresco de raíz, con respecto al control N-. Además, esta cepa produjo AIA y fue capaz de solubilizar fosfato tricálcico. Las cepas noduladoras 15, 13 y 14 tuvieron incrementos de 34.38%, 32.26% y 32.26% respectivamente.

Éstos resultados se aproximan a los obtenidos por Santillana (2007), quien afirma que las cepas incrementaron la materia seca de la parte aérea en un 47.0% ensayo realizado en las mismas condiciones controladas empleadas en el presente estudio.

La ausencia de nódulos en dos cepas analizadas, en el experimento en plántulas de frijol, se pudo deber a la ausencia del plásmido *Sym* que posee los genes de nodulación, genes *nod*, los cuales dirigen la nodulación y los genes *nif* los cuales se encargan de la fijación. La otra posibilidad es que las planta produzca flavonoides que puedan inhibir a los factores *nod D*, impidiendo que se realice la formación del nódulo (Madigan, 2008).

En numerosos ensayos Calvo (2008), Santillana (2007), Mayo (2002) y Urzúa (2001) demuestran que la materia seca de plántulas se correlaciona con la cantidad de nitrógeno fijado. El nitrógeno se acumula en las hojas y semillas. Es por esta razón que en el ensayo realizado al analizar la materia seca de la parte aérea se observan diferencias significativas, en especial entre las cepas 13, 14, 15, 21 y 17 con respecto a los controles N- .

Si bien la inoculación fue realizada en el laboratorio bajo condiciones controladas es importante resaltar que se han empleado las bacterias 10 y 14 en campos de la UNALM según se informa en la última publicación de Camarena *et al* (2009). Resultados previos también apoyarían la hipótesis que las cepas aisladas de los mismos suelos son efectivas en la nodulación. Paima (2005), realizó el aislamiento de una cepa *Rhizobium* codificada como P1C1N1 que luego fue aplicada en campo. En su ensayo en campo logró formar un gran número de nódulos.

### **Discusiones finales**

El análisis de agrupamiento, para evaluar la diversidad microbiana, es utilizado tanto para características fenotípicas como moleculares de los aislados como sostienen diversos autores entre ellos Hungría (2000) en Brasil al aislar *Rhizobium* nativos de *Phaseolus vulgaris*; Marquina *et al* (2011), quienes estudiaron la diversidad de rizobios a través de la caracterización fenotípica y genotípica de doce aislados de distintas regiones de Venezuela; Matsubara (2010), quien estudió la diversidad de simbiontes de *Phaseolus lunatus* del Valle de Supe en Barranca.

Santillana (2007) realizó la caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Vicia faba* provenientes de Ayacucho y Huancavelica y *Pisum sativum* provenientes de Cañete.

Por otro lado, este es un método que nos permite seleccionar el aislado con mejores características para aplicarlo en campo, numerosos investigadores coinciden que es necesaria la selección de los rizobios antes de aplicarlo en campo (Matsubara, 2010; Zúñiga, 1997; Cuadrado, 2009; Santillana, 2007).

Para lograr seleccionar un buen aislado o conjunto de aislados es importante conocer las características de cada cepa; debido a que, las ligeras variaciones entre las cepas repercutirán en su respuesta en un ambiente determinado. Por ejemplo a bajas temperaturas Santillana (2007), logró aislar cepas adaptadas al frío que toleraban de 6 a 12°C de temperatura, estas cepas pueden recomendarse para ambientes fríos. Matsubara (2010), aisló simbioses de *Phaseolus lunatus* de ambientes cálidos que fueron sensibles a bajas temperaturas. Del mismo modo, para seleccionar una cepa que sea tolerante a la salinidad y que se adapte a estos suelos depende de las características de la cepa. Luyo (1992) y Mayo (2002) lograron aislar rizobios que crecen al 2% de NaCl de suelos de la costa. En el presente estudio sólo dos cepas 4 y 5 son regularmente tolerantes, aquellas cepas pueden recomendarse para suelos salinos.

En los análisis de agrupamiento de características fenotípicas pueden aplicarse numerosos ensayos adicionales como pruebas de producción de antibióticos, tolerancia a metales (Matsubara, 2010; Santillana, 2007 y Mayo, 2002, Marquina, 2011). Se ha demostrado la habilidad de las bacterias del género *Rhizobium* para asimilar una gama de carbohidratos, lo cual se considera de alta significancia taxonómica, en particular para este grupo, los más usados sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol y dextrina (Cuadrado, 2009).

La capacidad de de las cepas nodular y fijar nitrógeno es un criterio que también debe considerarse en la selección de rizobios para inoculación en campo. Dash y Gupta (2011) mencionan que para lograr una máxima fijación de nitrógeno las leguminosas es necesario seleccionar correctamente e identificar los *Rhizobium* antes que estén disponibles comercialmente para ensayos en campo.

En el presente estudio no todos los *Rhizobium* aislados tuvieron esa capacidad, debido posiblemente a la pérdida del plásmido que posee los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. Ormeño-Orillo *et al* (2006) y Matsubara (2010) recomiendan secuenciar los genes *nifB*, *nod D* de nodulación y de fijación de N<sub>2</sub> como el *nifH* para conocer si efectivamente la cepa ha perdido la capacidad de fijar o nodular la leguminosa de estudio.

El suelo es un ambiente altamente variable en donde hay factores que afectan el inicio de la nodulación y la fijación; tales como, la salinidad del suelo, las temperaturas altas o bajas y la acidez del suelo (Kellman, 2008). Además, existen poblaciones autóctonas que pueden competir con los rizobios introducidos. La efectividad de la nodulación dependerá de varios factores entre ellos las condiciones del campo, los nutrientes del suelo y la disponibilidad de agua, para la planta y los rizobios. Santillana (2007), reporta que hay especies *Rhizobium* con capacidad de captar más P, K, Ca, Mn y Fe. En el caso del hierro los rizobios usan sideróforos para movilizar el hierro. Ocaña (2008), sostiene que la aplicación Mo y Co con inóculo de *Rhizobium leguminosarum* mejoró significativamente el rendimiento de grano de frijol en campos del distrito de la Molina. El Mo es un metal importante que forma parte de la nitrogenasa y el Co para la formación de la leghemoglobina (Báscones *et al*, 2000).

Las características PGPR también fueron variables entre los aislados, en especial la solubilización de fosfato. Matsubara (2010), también encuentra variaciones entre los aislados. Esta cualidad posiblemente se deba a las diferencias de producción de ácidos que pueden ser ácidos glucónicos como ya ha sido evidenciado por Halder y Chakrabarty (1993) o por otros tipos de ácidos que aún no han sido identificados para el caso de *Rhizobium*.

En el análisis integrador de todas las características evaluadas se identificaron cuatro grupos, en el Grupo I sólo la cepa 1 y en el Grupo II hasta diez cepas, en ellas se encontró mayor grado de variaciones, se aglutinaron la mayor parte de las cepas; estas cepas tienen en común la capacidad de nodular a frijol, producen ácido indolacético y solubilizan el fosfato tricálcico del medio. En el Grupo III, sólo a la cepa 17 y en el Grupo IV a las cepas 4 y 5.

En el Grupo II, las cepas 15 y 21 pueden recomendarse para aplicarlas en campo por su capacidad de nodular frijol; por ser las cepas con el mayor número de nódulos; tuvieron valores significativos de peso seco de la parte aérea en relación al N-, ambas cepas crecieron bien de 28 °C a 37 °C, la cepa 15 creció hasta 0.5% de NaCl. En el Grupo III, cepa 17, también es una cepa que puede recomendarse para aplicarla como bioinoculante porque obtuvo la mayor diferencia significativa peso seco de parte aérea, sin embargo no noduló a frijol, es productora de AIA y solubilizadora de fosfato. Finalmente, en el Grupo IV, las cepas 4 y 5 tuvieron como característica particular crecer en el medio LMA al 2% de NaCl y pueden recomendarse para suelos salinos. Además estas cepas produjeron ácido indolacético y solubilizan fosfato.

Por otro lado, también puede considerarse un bioinoculante conformado por las cepas 17, 15 y 4; debido a que, cada una de ellas tiene una cualidad particular y juntas pueden complementarse. La cepa 15 por generar buen peso seco de parte aérea y por generar un buen número de nódulo, además para asegurar que se realice la nodulación y fijación de nitrógeno en el inoculante mixto, la cepa 17 por tener el mayor peso seco y por ser productora de ácido indolacético y solubilizador el fosfato tricálcico. Además, fue la cepa que obtuvo la mayor diferencia significativa en peso seco de parte aérea con respecto al N-. Finalmente la cepa 4, por su crecimiento hasta 2% de NaCl.

Finalmente, pueden aplicarse como inoculante sólo o mixto, entre las cepas aisladas o con otras bacterias promotoras de crecimiento como *Bacillus* y *Pseudomonas*, para mejorar la producción de otras leguminosas y no leguminosas pastos, cebada, trigo, por sus cualidades como promotor de crecimiento vegetal como ha sido evidenciado en recientes publicaciones de Verma *et al* (2010).

## VII CONCLUSIONES

1. Se aislaron 23 cepas, 14 crecieron a 48h y 9 crecieron a las 24h en el medio Levadura Manitol Agar (LMA). Las cepas de 48 h horas, corresponden al género *Rhizobium* según las pruebas bioquímicas y capacidades simbióticas, el 64.3 % de ellas provenían de la variedad 'Canario Centenario'; mientras que, las cepas de 24h, podrían estar relacionadas con *Agrobacterium* y/u otros géneros.
2. Se logró caracterizar fenotípicamente las cepas en condiciones de La Molina, provenientes de un suelo franco arenoso, con conductividad de 1.85 y pH 7.86. En las pruebas bioquímicas se encontró mayores diferencias de crecimiento cuando crecían a pH 4 y 5, a una temperatura de 37 °C y crecimiento a 0.5 % de NaCl.
3. El 64.3% de las cepas de 48h toleraron concentraciones de 0.5% de NaCl; el 64.3% de las cepas crecieron a una temperatura de 37°C. Las cepas fueron sensibles bajas y altas temperaturas, ninguna creció a 8° C ni a 40°C. El 57.1% de las cepas toleraron entre pH4 y 8.8.
4. En el ensayo en plantas de frijol, el 84.6% de las cepas de 48h formaron nódulos efectivos e infectivos en la variedad 'Canario Centenario'. La cepa 17 incrementó la materia seca de parte aérea en 38.24 % respecto al N-, siendo esta diferencia la mayor estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Además, produjo AIA y solubilizó el fosfato del medio NBRIP.
5. Todas las cepas *Rhizobium* además de formar nódulos y fijar nitrógeno para el cultivo de frijol, tuvieron características PGPR, todas produjeron ácido indolacético (AIA) y solubilizaron el fosfato tricálcico del medio NBRIP. Sin embargo, ninguna cepa inhibió el crecimiento del hongo fitopatógeno *Macrophomina*.

6. En el análisis de agrupamiento de todas características evaluadas se identificaron hasta cuatro grupos de cepas. El Grupo I y III cada uno conformado por una sola cepa, el Grupo IV conformado por dos cepas y el Grupo II por diez cepas. Estos resultados son un indicador del grado de diversidad de las cepas analizadas. En el grupo III, la cepa 17 destacó porque fue la que obtuvo el mayor peso seco de parte aérea. En el grupo IV, las cepas 4 y 5, se caracterizaron por su capacidad de crecer hasta 2% de salinidad.
  
7. Se observó una alta asociación entre el peso seco de la parte aérea con el peso fresco de la parte aérea y el peso fresco de raíz. Los coeficientes de correlación variaron entre 0.66 y 0.99. En relación al número de nódulos, presentaron poca asociación con el crecimiento a pH4, concentraciones de 1 y 2% de NaCl.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Aplicar bioinoculantes mixtos en invernadero y campo. Una opción es la mezcla de las cepas 15 y 21 porque generaron el mayor número de nódulos en las plántulas de frijol y tuvieron valores significativos de peso seco de la parte aérea en relación al N-. La otra opción, aplicar las cepas 15, 17 y 4 en forma conjunta o con una cepa de *Pseudomona* o *Bacillus*. Para lograr aplicarlas en forma conjunta deberá realizarse pruebas de interacciones entre las cepas en laboratorio.
2. Analizar un mayor número de aislados de suelos de la sierra y selva del país, para evaluar las poblaciones de *Rhizobium*. Asimismo, utilizar otras técnicas para evaluar la fijación de nitrógeno, como la reducción del acetileno, acumulación de nitrógeno o producción de ureídos.
3. Evaluar la capacidad PGPR de *Rhizobium* en la germinación de varias semillas de leguminosas y no leguminosas como trigo, cebada, lechuga, algodón y papa. Así como, identificar los tipos de metabolitos producidos por las cepas a través de la utilización de cromatografía de capa fina y el HPLC o cromatografía de gases.
4. Evaluar la diversidad de *Rhizobium* en ambientes perturbados o poco perturbados evaluando el impacto negativo en la fijación de nitrógeno.
5. Generar un banco de germoplasma para bacterias *Rhizobium*, bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* y *Azospirillum* y bacterias promotoras de crecimiento, antagonistas y productoras de AIA; con la finalidad de lograr aplicarlas en la actualidad y en un futuro para mejorar la calidad de los suelos.
6. Formular bioinoculantes bacterianos a mayor escala como bioinoculante sólo o mixto para aplicarlos en plántulas en invernadero o campo. En diversos países como Brasil, Venezuela, Argentina, México y España es aplicado por ser una alternativa viable, amigable con el ambiente menos costosa que los fertilizantes nitrogenados contaminantes.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarons, S. & Graham, P. 1991. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant soil*. 134: 145-151.
2. Aguirre, J., Irizar, M., Duran, A., Grajeda, O., Peña, Ma. & Loredó, C. 2009; Alternativa para la agricultura en México. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo experimental Rosario Izapa. España.
3. Ahmadzadeh, M. & Sharifi, A. 2009. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*. 48 (2009) 101–107.
4. Ahmed, I., Labuschagne, N. y Korsten, L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Etiopia. *Biological Control*. 40: 9-106.
5. Allan, D. y Graham, P. 2002. Symbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis. Dep. of soil, water, and climate. University of Minesota. Soil Biology and Fertility. Soil 5611. Disponible: <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>.
6. Anyango, B., Wilson, K. & Beynon, J. 1995. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with constraining pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4016-4021.
7. Araya, C. 2003. Coevolución Hospedante-Patógeno en Frijol común. *Review de la Revista de Fitopatología Brasileira*. 28: 221-228.
8. Antoun, H. & Prevost, D. 2005. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol y Biofertilización*. Pgs1-38.
9. Baca, B., Soto, L. y Prado, P. 2000. Fijación Biológica de Nitrógeno. Ciencia y cultura elementos. Versión impresa. Puebla, México. Pgs 43-49.
10. Báscones, E. Imperial, J. Ruiz- Argueso, & Palacios, J.M. 2000. Generation of new hydrogen-recycling Rhizobiacea stains by introduction of novel *hup* minitransposon. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4292-4299.
11. BIOFAG, 2007. Red Iberoamericana de Biofertilizantes microbianos para la agricultura. Biofertilizantes en Iberoamérica visión técnica, científica y empresarial. Montevideo. Uruguay.

12. Brack, A. y Mendiola, C. 2004. Enciclopedia virtual “Ecología del Perú” ONG. Disponible en: <http://www.peruecologico.com.pe/libro.htm>. Revisado en Abril 2009.
13. Calvo, P., Reymundo, L. y Zúñiga, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en las zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 7: 141-148.
14. Camarena, M., Huaranga, J. A., Mostacero N. E. 2009. Innovación Tecnológica para el Incremento de la Producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Primera Edición. Universidad Nacional Agraria La Molina - Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica. 232p.
15. Camarena, F. 2008. III Curso Internacional Teórico-Práctico “Estudio de las Bacterias Promotoras de Crecimiento y su Aplicación en la Agricultura. Lima.
16. Canchari, G. 2005. Efecto de la aplicación de cepas *Rhizobium*, bioestimulantes y fertilizantes en el rendimiento de frijol canario (*Phaseolus vulgaris*). Tesis para obtener el Título de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
17. Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J. & Manuel Acosta 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*. 27: 137-142.
18. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1987. Simbiosis Leguminosa – Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Colombia. Editado por Rosemay Sylvester- Bradley.1-25
19. Collazos, C. 1996. Cuadros peruanas de composición de los Alimentos. Ministerio de Salud. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Séptima edición. Lima.p9.
20. Cuadrado, B., Rubio, G. & 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.
21. Cubero, J. y Moreno, M. 2004. Leguminosas de grano. Editorial Mundi Prensa.pp 69-89.
22. Dash, S & Gupta, N. 2010. Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2(13): 232-251. India.

23. Debouck, D. & Gepts, P. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Economic Botany* 47(4): 448. Sólo resumen.
24. Ehteshamul- Haque, S. 1994. Use of rizobios in the control of soilborne plant diseases caused by root infecting fungi. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Botany. University of Karachi. Pakistan.
25. Ehteshamul- Haque, S. & Ghaffar, A. 1993. Effect of *Trichoderma* sp. and *Rhizobium meliloti* in control of root rot fungus. *Pakistan Journal of Botany*. 24: 217-221.
26. El-Mehalawy, A.A 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporium*. *International Journal Agriculture and Biology*. 6:310-316.
27. Elsheikh, E. A. E & m. Wood. M 1990. Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Letters in Applied Microbiology*. 10, 127-129.
28. Frankenberger, W. & Arshad, M. 1995. Phytohormones in soils: Microbial production and function. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p 503.
29. Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. & Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. London, United Kingdom, p 267.
30. Gordon, S. & Weber, R. 1950. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26: 192-195.
31. Graham, P., Sadowsky, M. & Keyser, H. 1991. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 4:582-587.
32. Gyaneshwar, P., Naresh, K. & Parekh, L. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14:669-673.
33. Halder, A. & Chakrabarty, P. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiologica* 38, 325–330.
34. Herrera-Cervera, J., Caballero-Mellado, J. & Laguerre, G. 1999. At least five rhizobial species nodule *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology* .30:87-97.

35. Higuera, A. 2003. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo de harina de semillas de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., fríjol chino *Vigna*. Maracaibo-Venezuela. Revista Ciencia 11(2):14-21
36. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth ed., Baltimore, USA Eds. Williams & Wilkins, pp. 544-558.
37. Hungría, M., Andrade, D., Chueire, L., Probanza, A., Gutierrez-Mañero. F., Megías, M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brasil. Soil Biology and Biochemistry 32: 1515-1528.
38. Hungria, M. & Vargas, M. 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research. 65: 151-164.
39. Illmer & Schinner, 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochemistry 24: 389-395.
40. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2011. Perú, estadísticas anuales ambientales.
41. Instituto Nacional de Investigación y Extensión agraria (INIEA). 2006. Hoja divulgativa del frijol. Editado por Estrada, R; Medina, T. Primera edición. Lima.
42. Joseph, B., Ranjan, R. & Lawrence R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production 1(2):1735-6814.
43. Karaca, U. & Uyanoz. R. 2012. Effectiveness of native *Rhizobium* on nodulation and growth properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). African Journal and Biotechnology. 11(37): 8986-8991.
44. Kellman, A. W. 2008. *Rhizobium* inoculation, cultivar and management Effects on the growth, development and yield of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Thesis for the Degree of Doctor of Phylosophy at Lincoln University. Canterbury New Zealand.
45. Khan, M., Zaidi, A. & Wani, P. 2006. Role of phosfate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture –A review. Agronomy for Sustainable Development. 26:1-9.

46. Khokhar, S., Khan, M. & Chaudhri, M. 2001. Some characters of chickpea-nodulating rhizobia native to Thal soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4:1016-1019.
47. Kim, J., & Rees, D.C. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*. 33: 389-397.
48. Kumar, V. y Rishi, K. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological. Research*. 156:87-93.
49. López-Lara, I. 2000. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Versión virtual. Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno. UNAM-México. pp 1-9.
50. Luyo, C. 1992. Aislamiento, purificación, autenticación y selección de cepas eficientes de *Rhizobium leguminosarum* en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* (bayo y canario PF – 210) in vitro. Tesis de Biología. UNMSM.
51. Madigan, M. 2008. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Editorial Pearson Prentice Hall.
52. Marquina, M.E., González, N. E. & Castro, Y. 2011. Caracterización fenotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 59(3):1017-1036.
53. Marsudi, N. Glemm A & Dilworth, M. 1999. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 1229-1238.
54. Martínez, Y., Uku, S. y Albiac, J. 2002. El Control de la Contaminación por Nitratos en el Regadío. Servicio de Investigación Agroalimentaria. Zaragoza. *Economía Agraria y Recursos Naturales*. 2(2):115-131.
55. Martínez-Romero, E. 2001. Poblaciones de rhizobia nativos de México. *Acta Zoológica Mexicana*.1: 29-38.
56. Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15:113-140.
57. Mayo, J y Hernández, J. 2002. Infectividad y efectividad de cepas nativas de rizobios aislados de la provincia de Ica en *P. lunatus* (pallar) var. 'Criollo Iqueño' y var. Sieva. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Tesis para optar los Títulos de Biólogos.

58. Matos, G. y Ormeño, E. , Zúñiga, D. 2002. Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L) en la costa central del Perú. *Ecología Aplicada* 1: 42-46.
59. Matos, G. 1994. Aislamiento de *Rhizobium* de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* y estudio de su eficiencia en la productividad de la leguminosa. Tesis de Biología. UNALM. Lima-Perú.
60. Matsubara, 2010. Diversidad fenotípica y molecular de bacterias simbióticas del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus*) en el Valle de Supe-Barranca. Tesis para optar el Título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú.
61. Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación Biológica de Nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1): 1-20.
62. Mora, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. Eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de costa rica. *Costa Rica. Agronomía Mesoamericana*. 6: 68-74. 1995.
63. Motsara M., Bhattacharyya P. & Srivastava B. 1995. Biofertilizers their description and characteristics, in: *Biofertilizer Technology, Marketing and Usage, A sourcebook- cum-Glossary, Fertilizer development and consultation organization* 204–204. India, pp. 9–18.
64. MINAG 2011. Ministerio de Agricultura del Perú. Portal Agrario. Base de datos de cultivos agrícolas del Perú. Disponible en: <http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca>. Revisado en Agosto del 2012.
65. Nadal, S., Moreno, M. y Cubero, J. 2004. Leguminosas de grano en la Agricultura moderna. Coedición de la Junta de Andalucía. Edición Mundi-Prisma. Madrid-Barcelona-México.
66. Nahas, 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal Microbiology and Biotechnology*.12:567-572.
67. Naik, P. R. & Sakthivel, N. 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. Strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology*. 157:538-546.
68. Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 265 - 270.

69. Ocaña, R. J. 2008. Efecto del Molibdeno y Cobalto, con inoculación de *Rhizobium leguminosarum* en el rendimiento de grano seco del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Canario Centenario, bajo un sistema de labranza. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina.
70. Ogata, K. 2008. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Zonas Áridas* 12(1). 191-208.
71. 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 Perú. *Systematic and Applied Microbiology*. 29:253-262.
72. Orozco, P., Hernando, F. *Biología del Nitrógeno* 1999. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. 1era edición. Medellín, Colombia, 231 pgs.
73. Pahuara, D. & D. Zúñiga. 2002. Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junín. *Ecología Aplicada* 1(1): 57- 64.
74. Paima, R. 2005. Evaluación de una cepa nativa de *Rhizobium sp.* Inoculada en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y la interacción con la materia orgánica y microelementos. Tesis para Optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Pgs 72-77.
75. Palma, 2003. *Química Analítica. Ensayos de laboratorio de la Universidad Nacional Agraria La Molina.* Impreso por Puflifer. Lima-Perú. Pg 47.
76. Patten, C.L., & Glick, B.R. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 635-642.
77. Rajash, P. 2005. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on canola (*Brassica napus*. L) and lentil (*Lens culinaris*. Medik) plants. Thesis for the Degree of Master of Science. University of Saskatoon. Saskatoon.
78. Ricillo, P., Munglia C., Brujin, F, Row, A., Booth, I., Aguilar, O. 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* 182: 1748-1753.
79. Rinaudi, L. 2010. An integrated view of biofilms formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*. 304:1–11.
80. Rivas, R., García-Fraile, P. & Velázquez E. 2009. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights*. 2: 51–69.

81. Rodriguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*.17:319-339.
82. Ryczel, M. 2006. Presencia en el agua de bebida de nitratos y nitritos y su impacto sobre la salud. *Temas de actualidad*.
83. Sahasrabudhe, M. 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production *Annals of Biological Research*. 2 (4):460-468.
84. Santillana, N. 2007. Caracterización de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Vicia Faba* y *Pisum sativum* var. Macrocarpum. Tesis Doctoral. Programa Doctoral en Ciencias Biológicas e Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
85. Santillana, N. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el Crecimiento de plantas de tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. *Ecología Aplicada*. 4(1,2):47-45.
86. Salisbury, F. *Fisiología vegetal* 1992. Ed. Iberoamericana S.A. de C.V. México. 319-338.
87. Schoonhoven, A. & Voyses, O. 1991. *Common beans Research for Crops Improvements*. CIAT. Cali, Colombia
88. Sharif, T. 2003. Effect of *Rhizobium* sp. growth of pathogenic fungi under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 6(18):1597-1599.
89. Shetta, 2011. Identification and Characterization of *Rhizobium* associated with Woody Legume Trees Grown under Saudi Arabia Condition. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 10(3):410-418.
90. Simpfendorfer, S., Harden, T., Murray, G. 1999. The *in vitro* inhibition of *Phytophthora clandestine* by some rhizobia and the possible role of *Rhizobium trifolii* in biological control of *Phytophthora* root rot of subterranean clover. *Austrian Journal Agricultural Research*. 50: 1469-1473.
91. Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remas, R. 2007. Indole-3-Acetic Acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31:425-448.
92. Somasegarán, P. & Hoben, H. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. University of Hawaii NIFTAL Project. Hawaii, USA.
93. Sridevi, M. & Mallaiiah. 2007. Production of índole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. *African Journal of Microbiology Research*. 1(7): 125- 128
94. Surange, S. & Kumar, N. 1993. Phosphate solubilizing under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian Journal Experimental Biology*. 31: 855-857.



95. Toro, D. 2004. La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir  
Versión impresa: <http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/4575c121>.
96. Urzúa, H., Urzúa, J. & Pizarro, R. 2001. Preselección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en vicia forrajera, para abonos verdes. *Ciencia e investigación Agraria*. 28(1): 3-6.
97. Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews*. 59:124-142.
98. Velázquez E, Peix, A. & Zurdo-Piñeiro, JL. 2005. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular Plant Microbe Interactions*.18:1325–32.
99. Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari K. N., Lavakush & Singh, V. 2010. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. *International Journal of Agricultural Research*. 5(11):954-983. India.
100. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes .*Nucleic Acids research*.19 (24): 6823 -6831.
101. Vicent, J. & Humphrey, B. 1970. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *Journal General Microbiology*. 63:379-382.
102. Vilcapoma, G. & Flores, M. 2003 .Manual de Botánica Sistemática de la UNALM.
103. Vriezen, J., Bruijn, F., Nüsslein, K. 2007. Response of Rhizobia to desiccation in relation to Osmotic stress, Oxygen and Temperature.73:11. 3451-3459.
104. Wang, T. y Martínez-Romero, J. 2002. Taxonomía de *Rhizobium*. Departamento de Microbiología Agrícola de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de México (UNAM).
105. Weller, D. 1998. Biological control of soil-borne pathogens in rhizosphere with bacteria. *Journal of Phytopathology*. 26: 379-407.
106. White, W. 1989. Fríjol: Fisiología del Potencial del Rendimiento y la tolerancia al estrés. Juan Izquierdo: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe (RLAC).Santiago de Chile.
107. Young, J. 2004. Park, DCh., Bevan, S. 2004. Diversity of 16S DNA sequences of *Rhizobium* spp. Implications for species determinatios. *FEMS Microbiology Letters* .238: 125–131.

108. Young, J. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant and Soil*. 186: 45-52
109. Zahran, H.H., 1999. *Rhizobium*–Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999. 63(4):968.
110. Zúñiga, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: *Rhizobium*, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
111. Zúñiga, D. 1997. Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno para *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral. Granada, España.

## **ANEXO 1: TABLAS**

**Tabla 1- Resultado de pruebas de pureza**

<i>COD.</i>	<i>CODIGO ORIGINAL</i>	<i>PG</i>		<i>LLA</i>		<i>LB</i>
		Crecimiento	Viraje	Crecimiento	Viraje	Crecimiento
<b>1</b>	BMP1Nod1	+	-	+	-	-
<b>4</b>	BMP1Nod4-2	+	-	+	-	-
<b>5</b>	BMP1Nod4-2	+	-	+	-	-
<b>8</b>	BMP2Nod4	+	+	+	-	-
<b>10</b>	FCCP1Nod2	+	-	+	-	-
<b>13</b>	FCCP2Nod2	+	+	+	-	-
<b>14</b>	FCCP2Nod3	+	-	+	-	-
<b>15</b>	FCCP2Nod4	+	-	+	-	-
<b>16</b>	FCCP2Nod5-2b	+	-	+	-	-
<b>17</b>	FCCP3Nod1	+	-	-	-	-
<b>18</b>	FCCP3Nod2-1	+	-	-	-	-
<b>21</b>	FCCP3Nod4	+	-	+	-	-
<b>22</b>	FCCP3Nod5	+	-	+	-	-
<b>26</b>	AAP3Nod4-2	+	-	-	-	-
<b>CIAT 899</b>	<i>R. tropici</i>	+	-	+	-	+
<b>CFN42</b>	<i>R. etli</i>	+	+	+	-	-
<b>2*</b>	BMP1Nod2	+	+	+	-	+
<b>3*</b>	BMP1Nod5	+	-	+	+	+
<b>6*</b>	BMP2Nod1	+	-	+	+	+
<b>7*</b>	BMP2Nod3	+	-	+	+	+
<b>9*</b>	FCCP1Nod1	+	-	+	+	+
<b>11*</b>	FCCP1Nod5	+	-	+	+	+
<b>20*</b>	FCCP3Nod3	+	-	+	+	+
<b>27*</b>	AAP3Nod1-1	+	-	+	+	+
<b>28*</b>	AAP3Nod4	+	-	+	+	+

\*cepas de crecimiento rápido( 24h) +/- (Presencia= +, Ausencia= - )

**Tabla 2.- Evaluación del diámetro de las colonias (cm) bajo diferentes condiciones ambientales**

CODIGO	pH				T(°C)Temperatura			%NaCl			
	4	5	8	8.8	8	28	37	40	0.50%	1%	2%
1	0	0.9	1	1.1	0	1.2	-	0	0	0	0
4	0	0.9	1.5	1.5	0	1.2	0.7	0	1.1	0.7	0.3
5	0	0.9	1.5	1.6	0	1.2	0.7	0	1.6	1	0.3
8	0	0.7	0.9	0.9	0	0.9	0.3	0	0	0	0
10	0.9	0.6	1.4	1.4	0	1.4	0.4	0	0.4	0	0
13	0.9	0.6	1.4	1.3	0	1.3	0.5	0	0.4	0	0
14	0.3	1	1.4	1.4	0	1	0.5	0	0.3	0	0
15	0.8	0.6	1.6	1.5	0	1.2	0.7	0	0.7	0	0
16	0.4	0.9	1.3	1.2	0	1.1	0	0	0	0	0
17	0.3	0.7	1.1	1.3	0	1.2	0.7	0	1.2	0	0
18	0.5	0.7	1.6	1.5	0	1.2	0.5	0	0.7	0	0
21	0	0.6	1.1	0.8	0	1.1	0	0	0	0	0
22	0	0.5	1	0.9	0	0.9	0	0	0	0	0
26	0.4	0.6	1.4	1.4	0	1	0	0	0.4	0	0
CIAT899	1.2	1.1	1.7	1.8	0	1.3	1	0	1.3	1	0.4
CFN42	0.5	0.7	0.9	1.1	0	0.6	1.1	0	0.4	0	0

**Tabla 3.- Resultado de pruebas PGPR (Solubilización de fosfato, producción de AIA y antagonismo)**

<i>COD.</i>	<i>COD.ORIGINAL</i>	<i>Solubilización de fosfato *</i>		<i>AIA</i>	<i>Antagonismo</i>
		<i>+/-</i>	<i>Halo (mm)</i>		
<b>1</b>	BMP1Nod1	+	2	+	-
<b>4</b>	BMP1Nod4-2	+	0.75	+	-
<b>5</b>	BMP1Nod4-2	+	1	+	-
<b>8</b>	BMP2Nod4	+	1.5	+	-
<b>10</b>	FCCP1Nod2	+	1.5	+	-
<b>13</b>	FCCP2Nod2	+	2.5	+	-
<b>14</b>	FCCP2Nod3	+	1.5	+	-
<b>15</b>	FCCP2Nod4	+	2.5	+	-
<b>16</b>	FCCP2Nod5-2b	+	1.75	+	-
<b>17</b>	FCCP3Nod1	+	1.25	+	-
<b>18</b>	FCCP3Nod2-1	+	2	+	-
<b>21</b>	FCCP3Nod4	+	1.55	+	-
<b>22</b>	FCCP3Nod5	+	1.6	+	-
<b>26</b>	AAP3Nod4-2	+	1.25	+	-
<b>CR1</b>	CIAT 899	+	1.45	+	-
<b>CR2</b>	CFN42	+	2	+	-
<b>C</b>	AIA			+	
<b>C(Solubilizado r)</b>	<i>Pseudomona</i> sp.	+	4.5		
<b>C(Antagonismo)</b>	<i>Trichoderma</i> sp				+

\* La solubilización de fosfato en medio NBRIP \*La Producción de AIA (con Trp) 1:1

+ Este halo se obtuvo de los datos de la Cuadro 5 (Prueba de solubilización en medio NBRIP)

**Tabla 4. Resultados de la prueba de solubilización en medio NBRIP**

<i>COD.</i>	<i>Variedad</i>	<i>Diámetro Total(mm)</i>	<i>Diámetro de la colonia(mm)</i>	<i>Halo (mm)*</i>	<i>Grado de solubilización+</i>
1	Blanco molinero	5.5	3.5	2	B
4	Blanco molinero	6.5	5.75	0.75	P
5	Blanco molinero	6.75	5.75	1	P
8	Blanco molinero	5.5	4	1.5	B
10	Canario centenario	6	4.5	1.5	B
13	Canario centenario	6.5	4	2.5	MBS
14	Canario centenario	6	4.5	1.5	B
15	Canario centenario	7	4.5	2.5	MBS
16	Canario centenario	6.25	4.5	1.75	B
17	Canario centenario	5.25	4	1.25	P
18	Canario centenario	6	4	2	B
21	Canario centenario	6	4.45	1.55	B
22	Canario centenario	6	4.4	1.6	B
26	Alubia Argentina	6	4.75	1.25	P
CIAT 899	CC(1) +	5.75	4.3	1.45	B
CFN42	CC(2)+	7	5	2	B
<b>C(Solubilizador)</b>	<i>Pseudomona</i> sp.	9.5	5	4.5	MBS

- cc: cepa control, medida del Halo= Diámetro Total- Diámetro de la colonia (mm)  
+ Grado de solubilización

<b>Escala de halos</b>	
MBS= Muy buena	2.5 mm ≤
B= buena	1.5-2.4mm
P= poca	0.1-1.4mm
N= ninguna	0mm

**Tabla 5. Composición química, mecánica y ambiental del suelo**

<i>Tipos de análisis</i>	<i>Resultado</i>	<i>Método</i>
<i>Análisis fisicoquímico</i>		
pH	7.86	1:1
C.E( ds/m)	1.85	1:1
CaCO <sub>3</sub> (%)	2.1	Método volumétrico usando calcímetro
MO (%)	1.8	Método de Walkley y Black
P(ppm)	51.6	Método de Olsen
K(ppm)	444	Método de extracción con acetato de amonio
<i>Análisis mecánico</i>		
		Método del hidrómetro
Arena (%)	58	
Limo (%)	32	
Arcilla (%)	10	
Clase textural	Fr.A	Franco arenoso
<i>Cationes ambientales</i>		
		Método del remplazamiento con acetato de amonio( CH <sub>3</sub> -COO-NH <sub>4</sub> )N; pH 7, Saturación con acetato de amonio
<b>CIC total</b>	10.88	
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	7.85	cuantificación por fotometría de llama y absorción atómica
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	1.74	fotometría de llama y absorción atómica
<b>K<sup>+1</sup></b>	0.99	fotometría de llama y absorción atómica
<b>Na<sup>+</sup></b>	0.30	fotometría de llama y absorción atómica
<b>Al<sup>+3</sup> + H<sup>+</sup></b>	0.00	Método de Yuan

Fuente: Laboratorio de suelos, plantas y agua de la UNALM, CIC: Capacidad de Intercambio iónico, Fr. A: Franco arenoso

**Tabla 6. Características de las variedades de frijol *P. vulgaris* \***

<b>Parámetros</b>	<b>Canario Centenario</b>	<b>Blanco Molinero</b>	<b>Alubia Argentina</b>
Hábito de crecimiento	Arbustivo determinado	Arbustivo determinado	Arbustivo determinado
Altura de la planta	60 cm	-	-
Número de vainas/ planta	15- 30	-	-
Color de flor	Blanca	Blanca	Blanca
Color de grano	Amarillo intenso brillante	Blanco	Blanco semibrillante
Peso de 100 semillas	45g	50g	55g
Período vegetativo	110 días	110 días	100 días

Fuente: Programa de Investigación y proyección social de leguminosas de grano. 2003. Canario Centenario Nueva variedad de frijol común. Lima Perú, \* variedades mejoradas



## **ANEXO 2: ESTADÍSTICAS**

**Tabla7. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)**

Característica		Caso					Control				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Longitud de la parte aérea	Inter-grupos	263.831	14	18.845	.705	.758	400.445	1	400.445	7.020	<b>.038</b>
	Intra-grupos	1228.998	46	26.717			342.275	6	57.046		
	Total	1492.829	60				742.720	7			
Longitud de la Raíz	Inter-grupos	219.583	14	15.685	1.216	.297	50.000	1	50.000	2.381	.174
	Intra-grupos	593.448	46	12.901			126.000	6	21.000		
	Total	813.031	60				176.000	7			
Peso Fresco de parte aérea	Inter-grupos	6.688	14	.478	1.493	.152	3.781	1	3.781	6.153	<b>.048</b>
	Intra-grupos	14.722	46	.320			3.688	6	.615		
	Total	21.410	60				7.469	7			
Peso Fresco de Raíz	Inter-grupos	3.518	14	.251	1.709	.087	.405	1	.405	.959	.365
	Intra-grupos	6.763	46	.147			2.535	6	.423		
	Total	10.280	60				2.940	7			
Peso Seco de las parte aérea	Inter-grupos	.070	14	.005	1.202	.306	.047	1	.047	7.197	<b>.036</b>
	Intra-grupos	.192	46	.004			.039	6	.006		
	Total	.262	60				.085	7			
Numero de Nódulos	Inter-grupos	4269.840	14	304.989	4.056	<b>.000</b>	.000	1	.000	.	.
	Intra-grupos	3458.750	46	75.190			.000	6	.000		
	Total	7728.590	60				.000	7			
Numero de Trifolios	Inter-grupos	9.266	14	.662	1.228	.289	4.500	1	4.500	9.000	<b>.024</b>
	Intra-grupos	24.800	46	.539			3.000	6	.500		
	Total	34.066	60				7.500	7			

## ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

**Tabla 8. Longitud de parte aérea ( LPA)**

Resumen Estadístico para LPA

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	21.0	8.4534	13.1	28.8
10	4	27.225	2.36837	24.0	29.7
13	4	25.25	1.5	24.0	27.0
14	4	23.025	2.48244	20.6	25.5
15	5	25.02	2.78155	21.4	29.1
16	4	23.15	3.69279	19.4	28.2
17	4	26.3	3.07354	22.9	29.0
18	4	22.975	6.50301	13.9	28.7
21	3	25.3333	0.862168	24.4	26.1
22	4	23.15	2.92859	21.2	27.5
26	4	24.45	2.31876	21.4	26.7
4	4	22.525	4.37445	18.0	28.5
42	4	26.1	3.01773	24.0	30.4
8	4	25.1	5.9425	21.9	34.0
899	4	25.4	3.16965	21.3	29.0
N+	4	28.975	3.28164	24.9	32.5
N-	3	19.7667	2.90918	17.0	22.8
Total	67	24.4612	4.09097	13.1	34.0

**Tabla9. Longitud de raíz ( LR)**

Resumen Estadístico para LR

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	13.925	3.66003	9.6	18.4
10	4	14.825	2.27065	12.0	17.5
13	4	16.55	2.85949	13.0	19.2
14	4	16.05	2.37276	13.0	18.3
15	5	15.18	5.4099	9.7	21.0
16	4	15.625	2.92617	12.0	18.0
17	4	17.825	1.96363	15.0	19.3
18	4	14.375	2.95452	11.5	18.5
21	3	14.4	2.50599	12.0	17.0
22	4	13.375	2.86865	10.0	17.0
26	4	16.075	4.29214	10.8	21.0
4	4	14.425	0.722842	13.5	15.0
42	4	11.3	3.16122	7.5	14.5
8	4	11.8	2.14321	9.5	14.0
899	4	14.5	2.73861	11.5	18.0
N+	4	14.0	2.41523	12.0	17.5
N-	3	12.0	0.5	11.5	12.5
Total	67	14.5328	3.11543	7.5	21.0

**Tabla 10. Peso fresco de hojas**

Resumen Estadístico para PFH

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	2.025	0.499166	1.5	2.5
10	4	2.65	0.387298	2.2	3.1
13	4	2.775	0.05	2.7	2.8
14	4	2.65	0.550757	2.0	3.2
15	5	3.14	0.409878	2.7	3.5
16	4	2.225	0.471699	1.9	2.9
17	4	3.15	0.351188	2.8	3.5
18	4	2.625	0.518813	2.0	3.1
21	3	2.96667	0.23094	2.7	3.1
22	4	2.7	0.541603	2.3	3.5
26	4	2.5	0.182574	2.3	2.7
4	4	2.2	0.489898	1.8	2.8
42	4	2.725	0.457347	2.4	3.4
8	4	2.225	0.0957427	2.1	2.3
899	4	2.375	0.585235	1.9	3.1
N+	4	2.875	0.386221	2.5	3.3
N-	3	2.0	0.34641	1.6	2.2
Total	67	2.58806	0.504982	1.5	3.5

**Tabla 11. Peso fresco de raíz**

Resumen Estadístico para PFR

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	1.4	0.11547	1.3	1.5
10	4	1.875	0.298608	1.5	2.2
13	4	1.875	0.485627	1.4	2.5
14	4	2.0	0.365148	1.6	2.4
15	5	2.1	0.367423	1.7	2.4
16	4	1.7	0.355903	1.3	2.0
17	4	2.325	0.298608	1.9	2.6
18	4	1.975	0.262996	1.7	2.2
21	3	2.0	0.34641	1.8	2.4
22	4	1.7	0.2	1.6	2.0
26	4	1.8	0.282843	1.4	2.0
4	4	1.55	0.173205	1.3	1.7
42	4	1.775	0.170783	1.6	2.0
8	4	1.525	0.206155	1.3	1.7
899	4	1.825	0.125831	1.7	2.0
N+	4	1.775	0.189297	1.5	1.9
N-	3	1.76667	0.208167	1.6	2.0
Total	67	1.82388	0.33033	1.3	2.6

**Tabla 12. Peso seco de hojas (PSH)**

Resumen Estadístico para PSH

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	0.24	0.0583095	0.19	0.3
10	4	0.29	0.0496655	0.23	0.35
13	4	0.31	0.0163299	0.29	0.33
14	4	0.305	0.0776745	0.22	0.4
15	5	0.324	0.0336155	0.29	0.36
16	4	0.2325	0.0394757	0.2	0.28
17	4	0.34	0.060553	0.27	0.4
18	4	0.29	0.0886942	0.18	0.38
21	3	0.303333	0.0450925	0.26	0.35
22	4	0.2925	0.0655108	0.25	0.39
26	4	0.2675	0.0262996	0.23	0.29
4	4	0.24	0.0408248	0.18	0.27
42	4	0.3	0.0547723	0.26	0.38
8	4	0.25	0.0141421	0.24	0.27
899	4	0.2775	0.0556028	0.21	0.34
N+	4	0.3075	0.0377492	0.26	0.35
N-	3	0.206667	0.0351188	0.17	0.24
Total	67	0.282388	0.0563563	0.17	0.4

**Tabla 13. Número de nódulos**

Resumen Estadístico para Nodulos

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	5.25	3.59398	2.0	10.0
10	4	28.75	4.42531	24.0	33.0
13	4	21.5	17.1561	6.0	46.0
14	4	14.5	3.0	13.0	19.0
15	5	22.0	4.1833	18.0	28.0
16	4	18.25	3.68556	14.0	23.0
18	4	19.0	6.0	12.0	24.0
21	3	30.0	17.7764	10.0	44.0
22	4	11.25	3.77492	7.0	16.0
26	4	17.5	5.0	12.0	24.0
42	4	17.5	5.56776	12.0	25.0
8	4	26.75	15.3052	13.0	46.0
899	4	15.0	2.0	12.0	16.0
Total	52	18.8654	9.89955	2.0	46.0

**Tabla 14. Número de trifolios**

Resumen Estadístico para Trifolios

CEPAS	Frecuencia	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
1	4	3.25	1.5	2.0	5.0
10	4	2.0	0.0	2.0	2.0
13	4	2.0	0.816497	1.0	3.0
14	4	2.5	0.57735	2.0	3.0
15	5	2.8	0.447214	2.0	3.0
16	4	2.25	0.5	2.0	3.0
17	4	2.5	0.57735	2.0	3.0
18	4	2.5	1.0	2.0	4.0
21	3	2.66667	0.57735	2.0	3.0
22	4	2.0	0.0	2.0	2.0
26	4	2.0	0.0	2.0	2.0
4	4	3.0	0.816497	2.0	4.0
42	4	2.0	0.0	2.0	2.0
8	4	2.25	0.5	2.0	3.0
899	4	2.25	0.5	2.0	3.0
N+	4	3.0	0.0	3.0	3.0
N-	3	2.0	0.0	2.0	2.0
Total	67	2.41791	0.677546	1.0	5.0

## ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

### Tabla 15. Longitud de parte aérea

Tabla ANOVA para LPA según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	307.68	16	19.23	1.21	0.2961
Intra grupos	796.899	50	15.938		
Total (Corr.)	1104.58	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 1.20655, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las LPA medias de un nivel de CEPAS a otro para un 95.0%.

### Tabla 16. Longitud de raíz

Tabla ANOVA para LR según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	184.66	16	11.5412	1.27	0.2558
Intra grupos	455.928	50	9.11856		
Total (Corr.)	640.588	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 1.26569, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las LR medias de un nivel de CEPAS a otro para un 95.0%.

### Tabla17. Peso fresco de parte aérea

Tabla ANOVA para PFH según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8.02178	16	0.501361	2.85	0.0024
Intra grupos	8.80867	50	0.176173		
Total (Corr.)	16.8304	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 2.84584, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las PFH medias de un nivel de CEPAS a otro para un nivel de confianza del 95.0%.

### Tabla 18. Peso fresco de raíz

Tabla ANOVA para PFR según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	G1	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3.24512	16	0.20282	2.56	0.0057
Intra grupos	3.95667	50	0.0791333		
Total (Corr.)	7.20179	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 2.56302, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las PFR medias de un nivel de CEPAS a otro para un nivel de confianza del 95.0%.

### Tabla 19. Peso seco de parte aérea

Tabla ANOVA para PSH según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Va
Entre grupos	0.0796896	16	0.0049806	1.92	0.04
Intra grupos	0.129928	50	0.00259857		
Total (Corr.)	0.209618	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 1.91667, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las PSH medias de un nivel de CEPAS a otro para un nivel de confianza del 95.0%.

### Tabla 20. Número de nódulos

Tabla ANOVA para Nodulos según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Va
Entre grupos	2214.31	12	184.526	2.59	0.0
Intra grupos	2783.75	39	71.3782		
Total (Corr.)	4998.06	51			

El F-ratio, que en este caso es igual a 2.58518, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las nódulos medias de un nivel de CEPAS a otro para un nivel de confianza del 95.0%.

### Tabla 21. Número de trifolios

Tabla ANOVA para Trifolios según CEPAS

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	10.8318	16	0.67699	1.74	0.0695
Intra grupos	19.4667	50	0.389333		
Total (Corr.)	30.2985	66			

El F-ratio, que en este caso es igual a 1.73884, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las Trifolios medias de un nivel de CEPAS a otro para un 95.0%.

### CONTRASTE MÚLTIPLE DE DUNCAN

#### Tabla 22. Longitud de parte aérea

Contraste Múltiple de Rango para LPA según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
N-	3	19.7667	X
1	4	21.0	XX
4	4	22.525	XXX
18	4	22.975	XXX
14	4	23.025	XXX
16	4	23.15	XXX
22	4	23.15	XXX
26	4	24.45	XXX
15	5	25.02	XXX
8	4	25.1	XXX
13	4	25.25	XXX
21	3	25.3333	XXX
899	4	25.4	XXX
42	4	26.1	XXX
17	4	26.3	XXX
10	4	27.225	XX
N+	4	28.975	X



**Tabla 23. Longitud de raíz**

Contraste Múltiple de Rango para LR según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
42	4	11.3	X
8	4	11.8	X
N-	3	12.0	X
22	4	13.375	XX
1	4	13.925	XX
N+	4	14.0	XX
18	4	14.375	XX
21	3	14.4	XX
4	4	14.425	XX
899	4	14.5	XX
10	4	14.825	XX
15	5	15.18	XX
16	4	15.625	XX
14	4	16.05	XX
26	4	16.075	XX
13	4	16.55	XX
17	4	17.825	X

**Tabla 24. Peso fresco de parte aérea**

Contraste Múltiple de Rango para PFH según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
N-	3	2.0	X
1	4	2.025	XX
4	4	2.2	XXX
16	4	2.225	XXX
8	4	2.225	XXX
899	4	2.375	XXXX
26	4	2.5	XXXXX
18	4	2.625	XXXXXX
10	4	2.65	XXXXXX
14	4	2.65	XXXXXX
22	4	2.7	XXXXXX
42	4	2.725	XXXX
13	4	2.775	XXX
N+	4	2.875	XXX
21	3	2.96667	XX
15	5	3.14	X
17	4	3.15	X

**Tabla 25. Peso fresco de raíz**

Contraste Múltiple de Rango para PFR según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
1	4	1.4	X
8	4	1.525	XX
4	4	1.55	XX
16	4	1.7	XXX
22	4	1.7	XXX
N-	3	1.76667	XXX
42	4	1.775	XXX
N+	4	1.775	XXX
26	4	1.8	XXX
899	4	1.825	XXX
13	4	1.875	XXXX
10	4	1.875	XXXX
18	4	1.975	XXX
21	3	2.0	XXX
14	4	2.0	XXX
15	5	2.1	XX
17	4	2.325	X

**Tabla 26. Peso seco de parte aérea**

Contraste Múltiple de Rango para PSH según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
N-	3	0.206667	X
16	4	0.2325	XX
1	4	0.24	XXX
4	4	0.24	XXX
8	4	0.25	XXX
26	4	0.2675	XXXX
899	4	0.2775	XXXX
10	4	0.29	XXXX
18	4	0.29	XXXX
22	4	0.2925	XXXX
42	4	0.3	XXX
21	3	0.303333	XXX
14	4	0.305	XXX
N+	4	0.3075	XXX
13	4	0.31	XXX
15	5	0.324	XX
17	4	0.34	X

**Tabla 27. Número de nódulos**

Contraste Múltiple de Rango para Nódulos según CEPAS

Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
1	4	5.25	X
22	4	11.25	XX
14	4	14.5	XXX
899	4	15.0	XXXX
26	4	17.5	XXXXX
42	4	17.5	XXXXX
16	4	18.25	XXXXX
18	4	19.0	XXXXX
13	4	21.5	XXXX
15	5	22.0	XXXX
8	4	26.75	XXX
10	4	28.75	XX
21	3	30.0	X

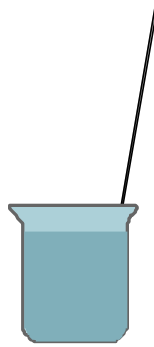
**Tabla 28. Número de trifolios**

Contraste Múltiple de Rango para Trifolios según CEPAS

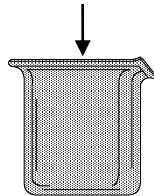
Método: 95.0 porcentaje Duncan			
CEPAS	Frec.	Media	Grupos homogéneos
10	4	2.0	X
42	4	2.0	X
22	4	2.0	X
N-	3	2.0	X
26	4	2.0	X
13	4	2.0	X
16	4	2.25	XX
899	4	2.25	XX
8	4	2.25	XX
17	4	2.5	XX
18	4	2.5	XX
14	4	2.5	XX
21	3	2.66667	XX
15	5	2.8	XX
4	4	3.0	XX
N+	4	3.0	XX
1	4	3.25	X

## **ANEXO 3: GRAFICOS**

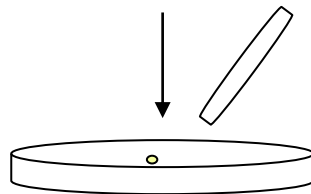
## Gráfico 1. Aislamiento de rizobios de nódulos (CIAT, 1987)



Desinfección con Alcohol 70(1min) y Sol. Hipoclorito de Na 3%(3 min).



Enjuague: 5 veces H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub>

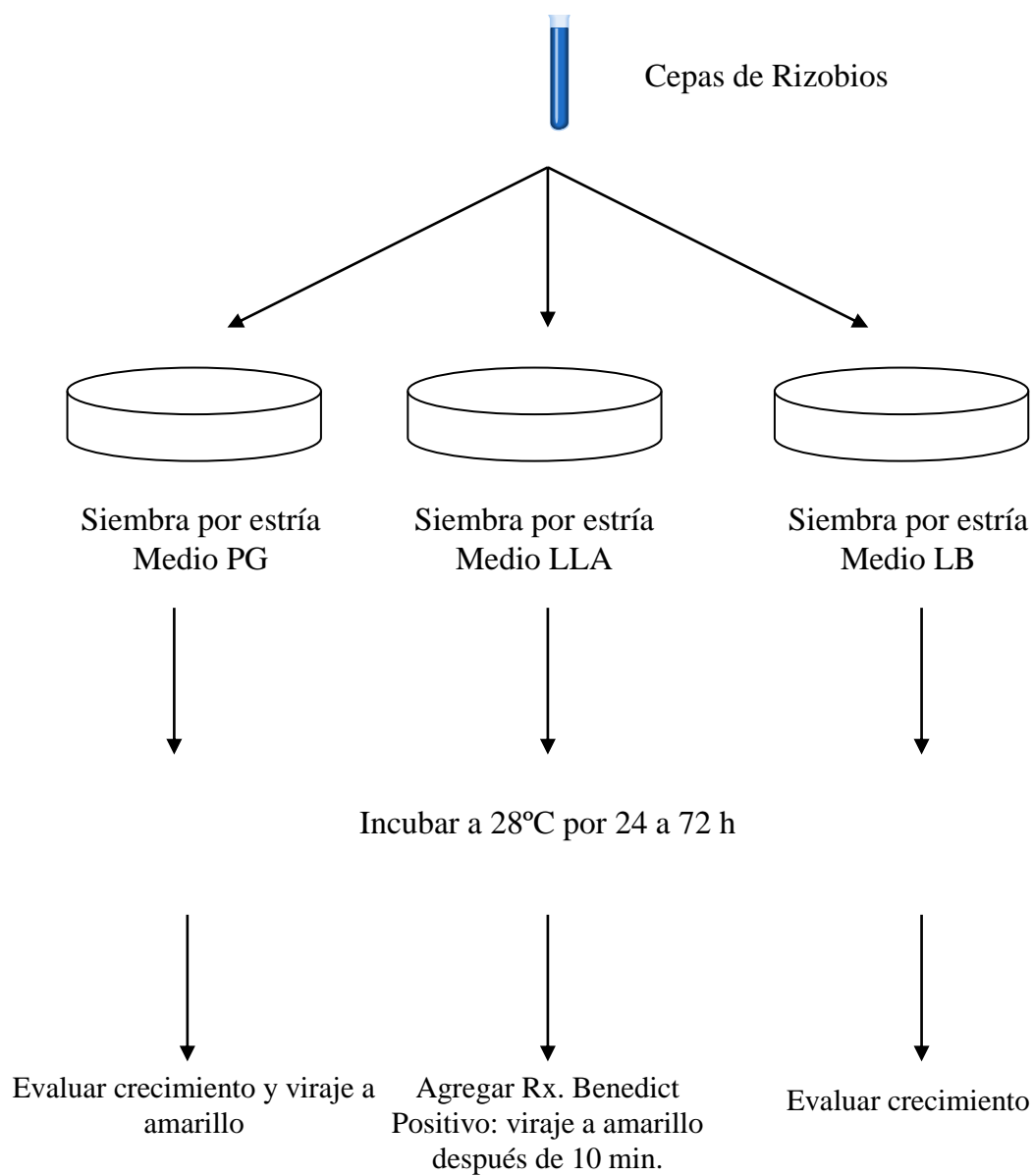


Triturado del nódulo y siembra por estría en Medio LMA.  
Incubar a 28° C por 24 a 72 horas



Conservación de cepas a 4°C

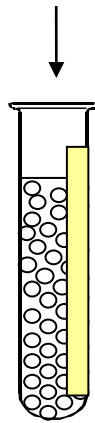
## Gráfico 2. Pruebas de Pureza (CIAT, 1987)



### Gráfico3. Ensayo en plantas (Somasegaran y Hoben, 1985)



Semillas de *Phaseolus vulgaris* pre germinadas



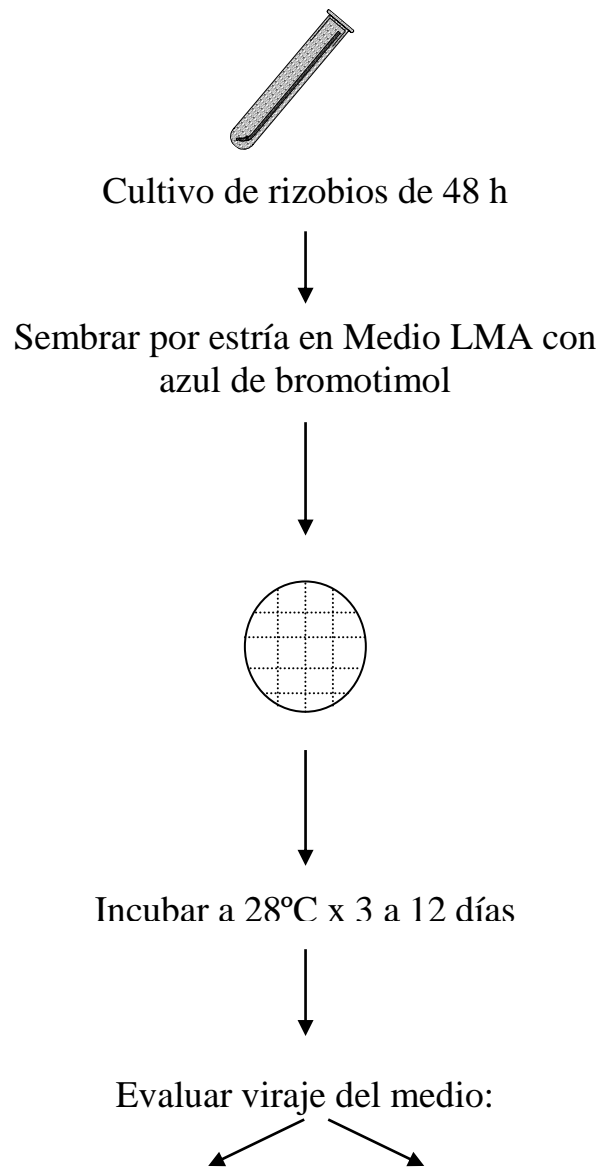
Transplante de las semillas a tubos de ensayo con  
Sol. Nutritiva

Llevar a cámara de crecimiento de 18° a 22°C

Inocular las cepas rizobios ( $10^8$  cel/ml)  
dos días después de la siembra

Observar la aparición de nódulos cada 7 días por  
cinco semanas.

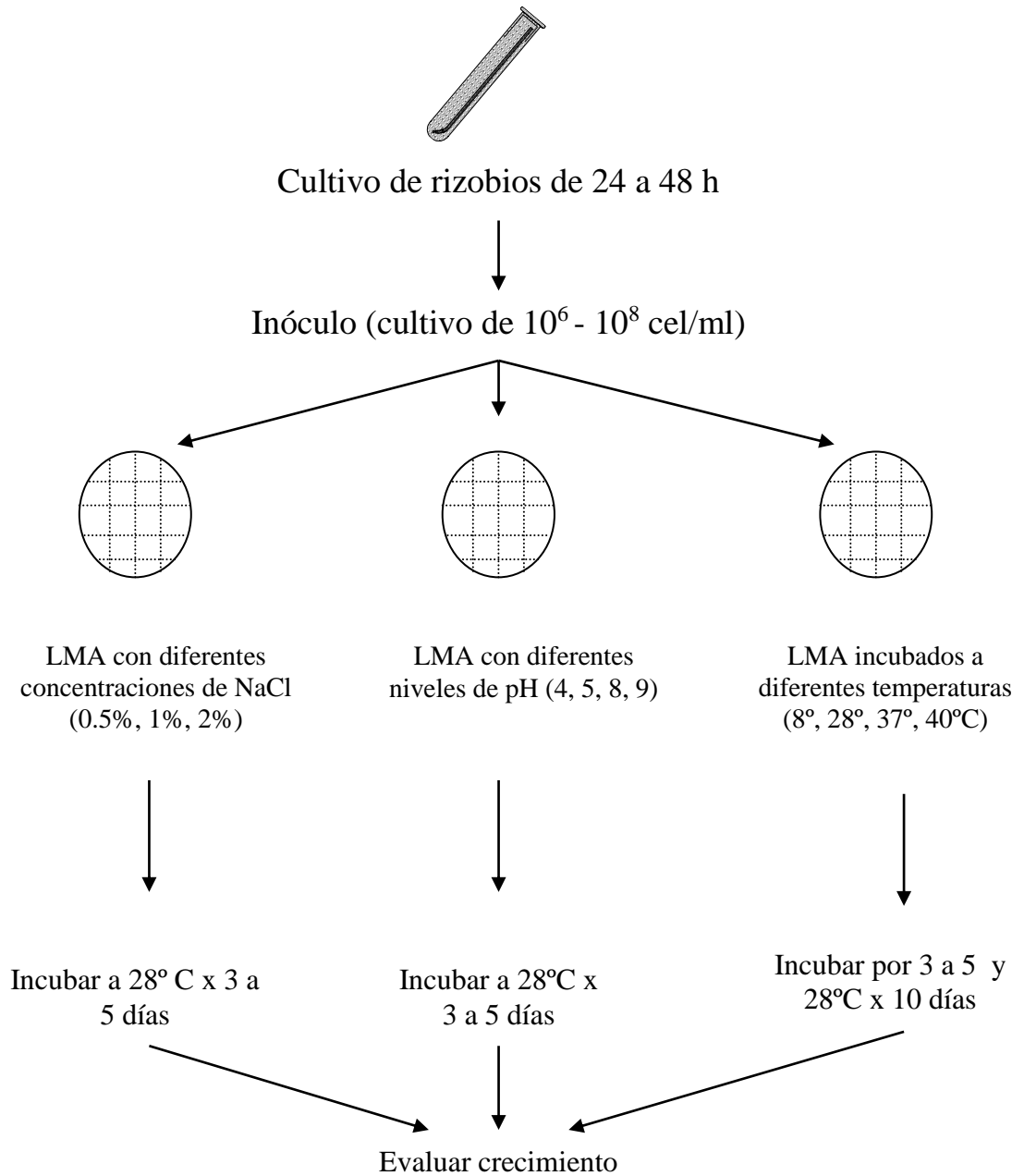
#### Gráfico 4. Caracterización Bioquímica: Producción de Acidez o Alcalinidad (CIAT 1987)



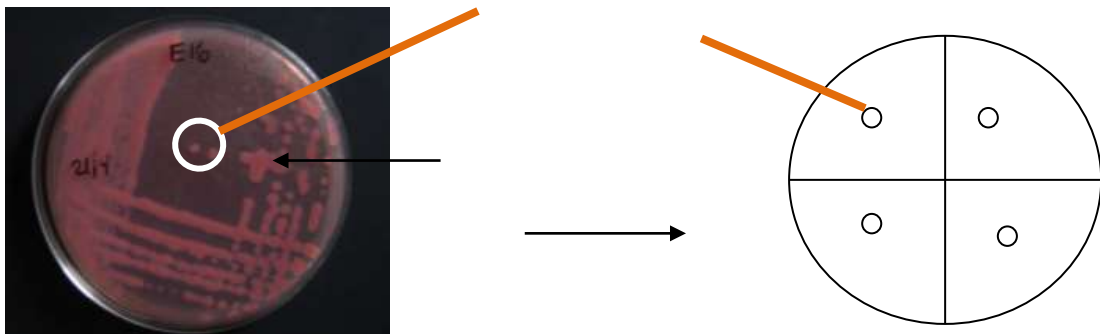
Amarillo – Acidez / Azul – Alcalinidad



**Gráfico 5.**  
**PRUEBAS BIOQUÍMICAS CRECIMIENTO A DIFERENTES**  
**CONDICIONES AMBIENTALES (CIAT 1987)**

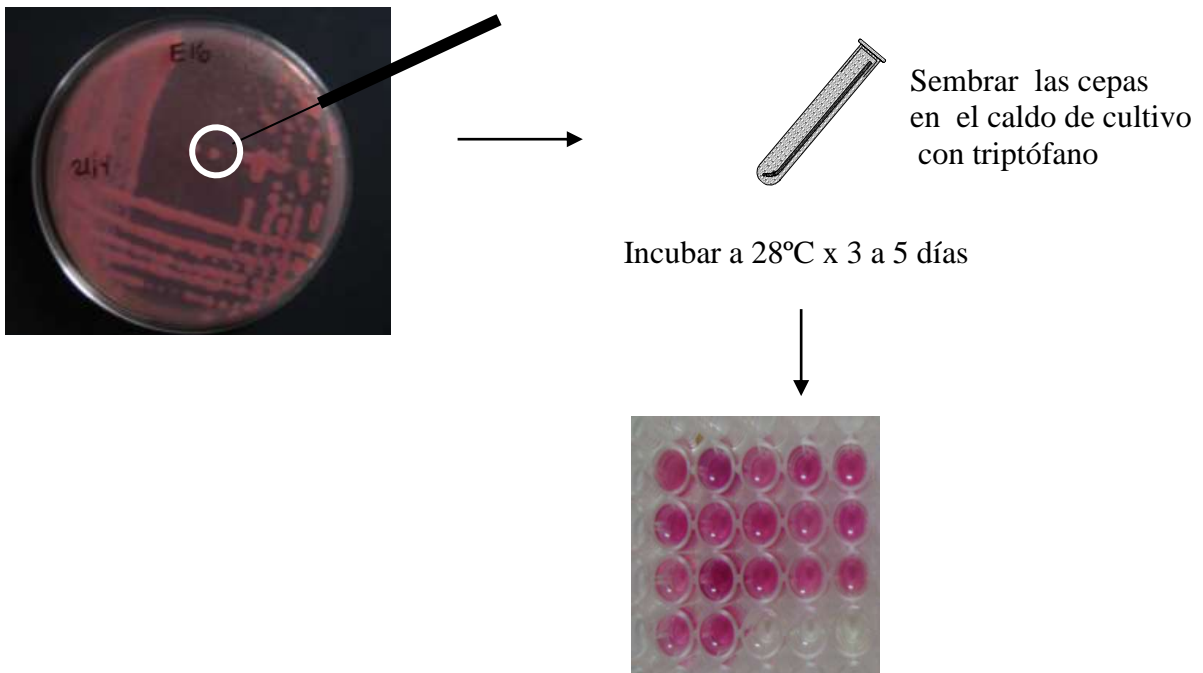


**Gráfico 6. Solubilización de fosfato (Nautiyal, 1999)**



Sembrar los rizobios en el medio NBRIP para solubilizadores de fosfatos

**Gráfico 7. Producción de Ácido Indolacético (Naik y Sakhivel, 2005)**



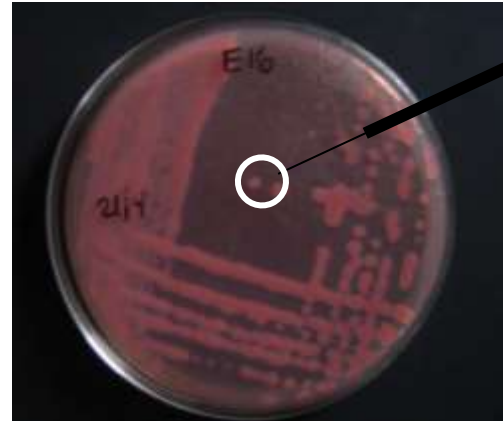
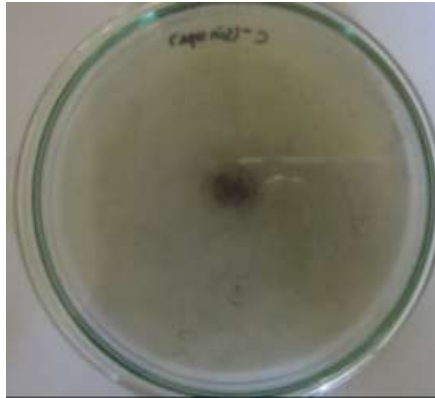
Sembrar las cepas en el caldo de cultivo con triptófano

Incubar a 28°C x 3 a 5 días

Se agregó a cada pocillo: 100  $\mu$ L de las cepa *Rhizobium* + 200  $\mu$ L del Reactivo de Salkowski

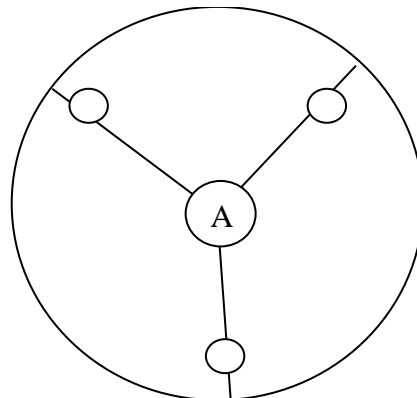
Rojo Grosella (+) Productor de AIA  
Blanco (-) No productor de AIA

### Gráfico 8. Prueba de antagonismo (Ahmed et al, 2007)



1°. Tomar un trozo del micelio, con un sacabocado, y llevarlo a la placa del ensayo

Ese día sembrar las bacterias en LMA e incubar a 28°C por 48h



Colocar en el centro de la placa del ensayo, con (LMA), una porción del hongo *Macrophomina phaseolicola* y puntos primero y luego *Rhizobium* equidistantes al centro el cultivo bacteriano



Llevar la placa a incubar a temperatura ambiente



Observar el halo de inhibición alrededor de la colonia bacteriana

## **ANEXO 4: FOTOS**

## INDICE DE FOTOS

- Foto 1. Vista aérea del campo de cultivo del programa de leguminosas
- Foto 2. Lugar donde se realizó el muestreo de las plantas
- Foto 3 Cepas *Rhizobium* aisladas codificadas (1, 4, 5, 8)
- Foto 4: Cepas *Rhizobium* aisladas codificadas (10, 13, 14, 15)
- Foto 5. Cepas *Rhizobium* aisladas codificadas (18, 21, 22 y 26)
- Foto 6. Cepas control *R. etli* (CFN42) y *R. tropici* (CIAT 899)
- Foto 7. Ensayo de aplicación de cepas *Rhizobium* en plántulas de frijol
- Foto 8. Nódulos de la cepa 14 en plántulas de frijol
- Foto 9. Comparación entre las raíces de la cepa 14 y CN+
- Foto10. Planta inoculada con la cepa 17
- Foto 11. Pruebas bioquímicas crecimiento a diferentes pH
- Foto 12 Prueba de crecimiento diferentes concentraciones de sal
- Foto 13. Prueba de crecimiento a diferentes temperaturas
- Foto 14.Prueba de producción de Ácido Indolacético
- Foto 15. Prueba de solubilización de fosfato en medio NBRIP
- Foto 16.Placas de cultivo con PDA utilizadas para la prueba de Antagonismo



**Foto 1.** Vista aérea del campo de cultivo del programa de leguminosas

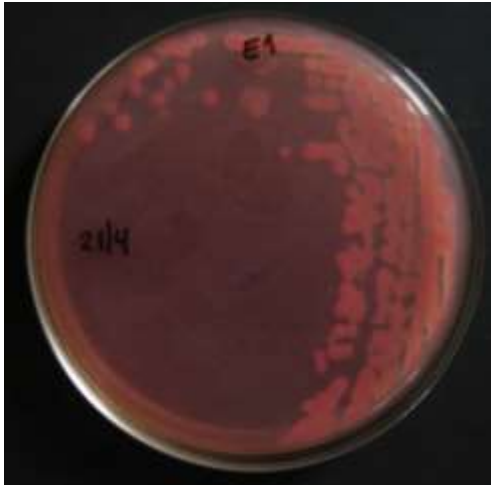


(a)



(b)

**Fotos 2.** a) Campo de cultivo del programa de leguminosas b) Muestreo



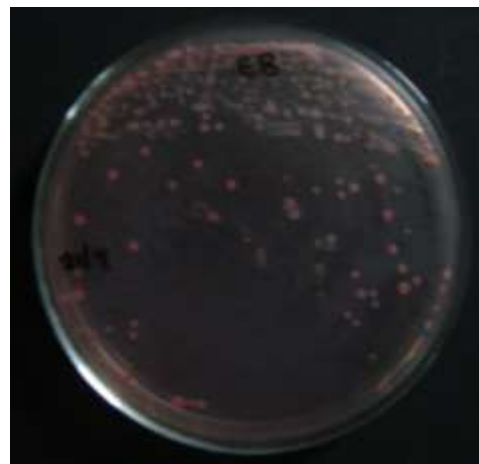
1



4



5



8



10



13

Fotos 3. Cepas *Rhizobium* aisladas codificadas con 1, 4, 5, 8, 10 y 15



14



15



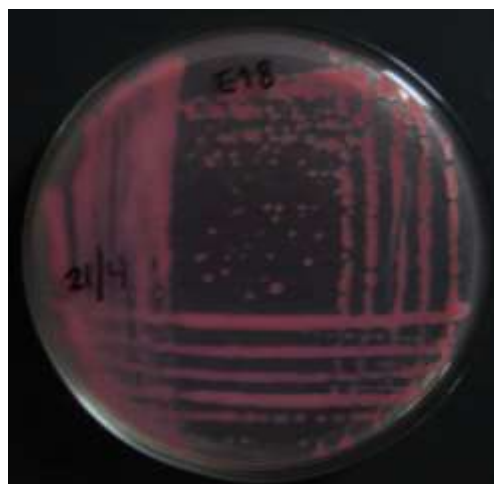
16



17



18



21

Fotos 3. Cepas *Rhizobium* aisladas codificadas con 14, 15, 16, 17, 18 y 21





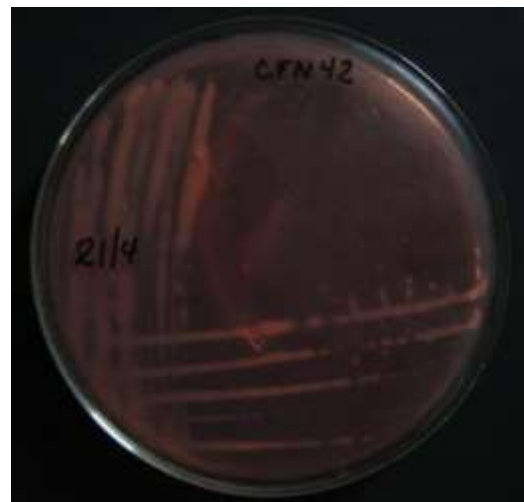
22



26



CIAT 899- *Rhizobium tropici*



CFN 42- *Rhizobium etli*

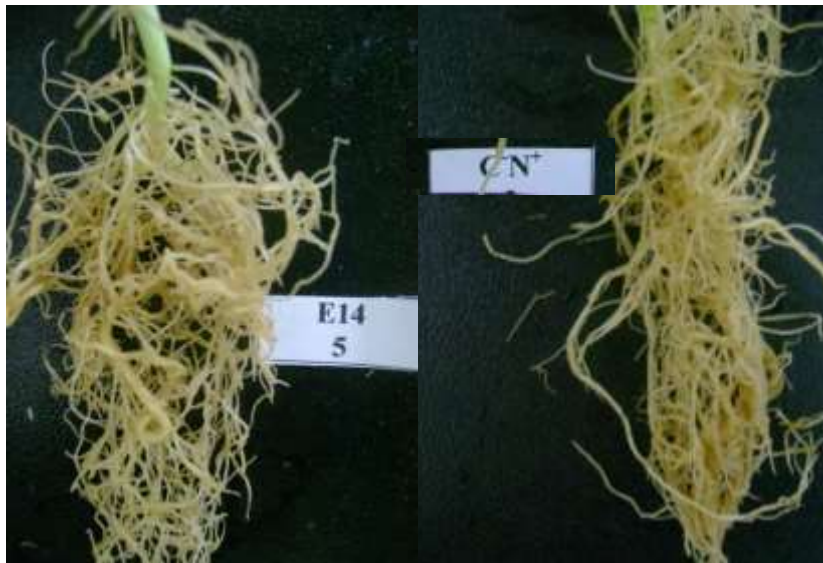
**Fotos4.** Cepas 22 y 26 y controles *R. tropici* y *R. etli*



**Foto7.** Prueba de autenticación de todas las cepas a nivel *in vitro*, *P. vulgaris* var. centenario en tubos de ensayo con perlas de polipropileno



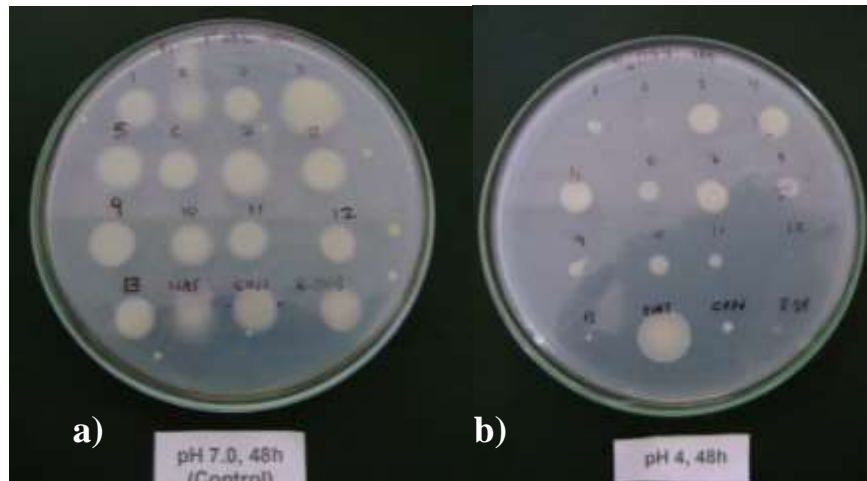
**Foto8.** Nódulos de las cepa 14 en plántula de frijol



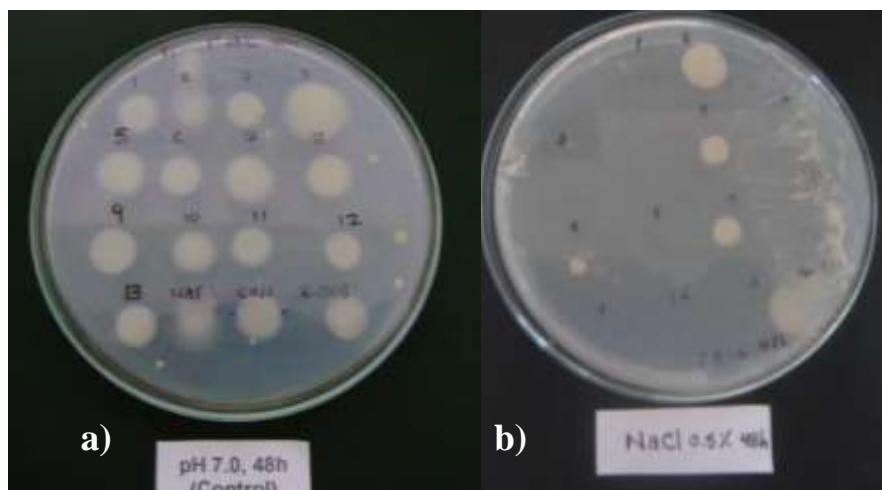
**Foto9.**Comparación entre las raíces de la cepa 14 y CN+



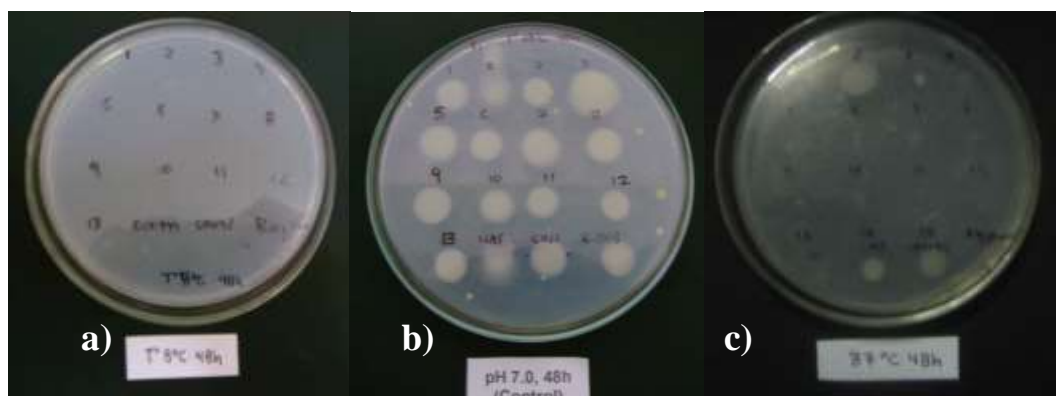
**Foto 10.** Planta inoculada con la Cepa 17



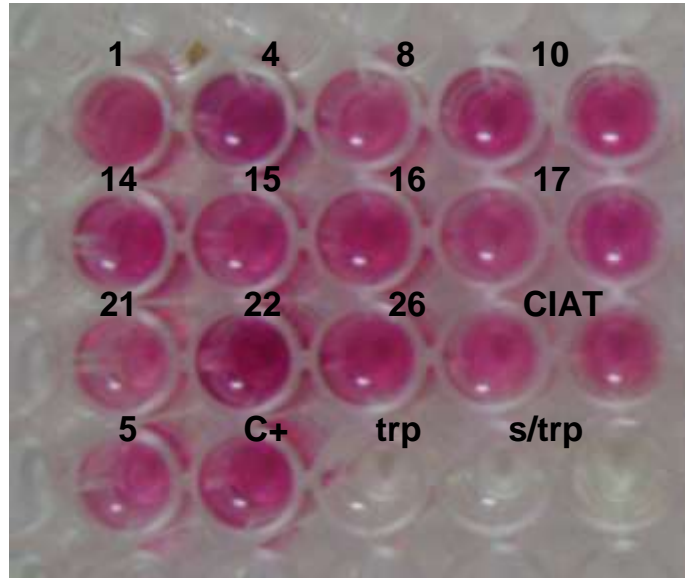
**Foto11.** Ensayo de efecto del pH. Comparación entre la cepa creciendo en el medio LMA a pH 7(control)(a) y las cepas creciendo en LMA a pH4(b).



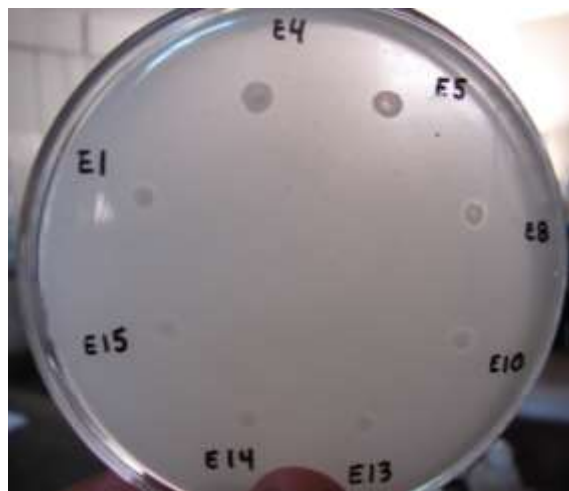
**Foto12.** Ensayo de salinidad. Comparación entre la cepa creciendo a 0.02% (control, a) y las cepas creciendo a 0.5% de NaCl(b)



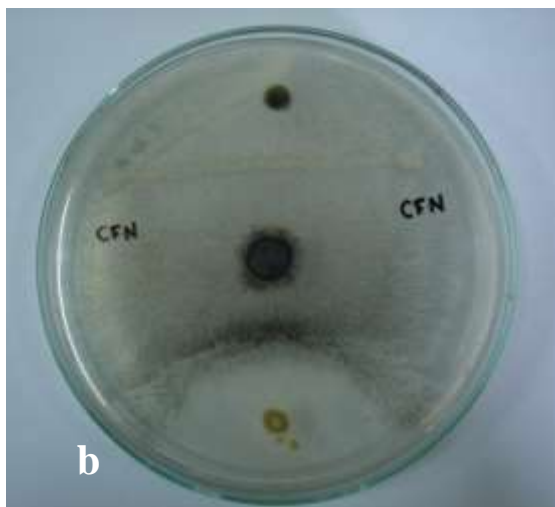
**Foto13.** Ensayo del efecto de la temperatura. Comparación entre la cepa creciendo a 8(a), 28°C (b)y 37°C (c)



**Foto 14.** Resultado de la prueba colorimétrica descrita por Naik y Sakthivel (2005) para evaluar la producción de AIA. Todas las cepas crecieron con trip, como sustrato. C+( Control + , es AIA con Rvo; trp: caldo de cultivo con triptófano pero sin cepa; S/trp: caldo de cultivo sin triptófano; Rvo de Salkoski sólo)



**Foto 15** Resultado de la prueba de solubilización técnica descrita por Nautiyal(1999). Se observa la placa con el medio NBRIP sembrado con las cepas *Rhizobium* codificadas con 1, 4, 5, 8, 10, 13,14 y 15 solubilizadoras de fosfato tricálcico.



**Fotos 16.** Placas de cultivo con PDA utilizadas para la prueba de Antagonismo propuesta por Ahmed *et al.*, (2007) (a) Cepas CFN 42 y el control positivo *Trichoderma* sp.(C). En (b) Control sin inocular, sólo presenta al hongo *Macrophomina phaseolicola*(Tassi)Goid y en (c) Cepas *Rhizobium* 10, 12 y 13 con el hongo ; y finalmente (d)Cepas *Rhizobium* 14, 15 y 16 con el hongo

## **ANEXO 5:**

# **MEDIOS Y SOLUCIONES**





#### 4. MEDIO LB

---

	Cantidad
Triptona	10.00 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.8-7.0

---

#### 5. MEDIO NBRIP (National botanical Research Institute's phosphate growth médium)

---

	Cantidad
Glucosa	10.g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5.0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 7.H <sub>2</sub> O	0.1g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.25g
KCl	0.2g
Mg Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000mL
pH	7.0

---

Se ajusta El pH7.0 y se esteriliza a 121°C y 1 lb durante 15 min

#### 5. MEDIO PDA

Para cultivos de hongos

---

	Cantidad
Infusión de papa ( preparada a partir de 200g de papa)	4g
D-Glucosa	20.0g
Agar	15g
pH	5.6+/-0.1

---

## 6. SOLUCIÓN DE SALKOWSKI

2% de FeCl<sub>3</sub> 0.05M em 35% de Ácido perclórico

## 7. SOLUCION NUTRITIVA LIBRE DE NITROGENO

N – free Nutrient Solution (Brouhgton and Dillworth, 1970)

Solución STOCK	Elemento	M	Fórmula	MW	Ubicación	g/l	M
1	Ca	1000	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147.03	SI 15	294.1	2.0
2	P	500	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	SI 29	136.1	1.0
3	Fe	10	Fe-citrato	335.04	SI 62	6.7	0.02
	Mg	250	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246.5	SI 70	123.3	0.5
	K	250	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.06	SI 74	87.0	0.5
	Mn	1	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169.02	SI 71	0.338	0.002
4	B	2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.84	AI 1	0.247	0.004
	Zn	0.5	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287.56	SI 77	0.288	0.001
	Cu	0.2	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249.69	SI 61	0.100	0.0004
	Co	0.1	CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	281.12		0.056	0.0002
	Mo	0.1	Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	241.98	SI 46	0.048	0.0002

Para cada 10 litros de la solución nutritiva (*full strength culture solution*), tomar 5.0 ml de cada solución stock (1 a 4), luego añadir 5.0 litros de agua, y luego diluya hasta 10 litros..Use NaOH 1N para ajustar el pH a 6.6 – 6.8.

Para el control de los tratamientos con Nitrógeno (N+), añadir KNO<sub>3</sub> (0.05%) dando una concentración de N de 70 ppm.