

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**



**"CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y  
CAPACIDAD SIMBIÓTICA CON SUS RIZOBIOS NATIVOS DE  
PALLAR (*Phaseolus lunatus* L.) EN LA COSTA DEL PERÚ"**

**Presentada por:**

**LUZ MARINA ESPINOZA MELGAR**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**












**Lima - Perú**

**2023**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	Tesis Luz Espinoza Melgar.pdf (D156714822)
<b>Submitted</b>	1/23/2023 3:32:00 PM
<b>Submitted by</b>	Felix Camarena Mayra
<b>Submitter email</b>	camafe@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	7%
<b>Analysis address</b>	camafe.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="http://www.fao.org/3/CA2227ES/ca2227es.pdf">http://www.fao.org/3/CA2227ES/ca2227es.pdf</a> Fetched: 1/23/2023 3:33:00 PM	 <b>9</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.fao.org/3/ca2597es/CA2597ES.pdf">https://www.fao.org/3/ca2597es/CA2597ES.pdf</a> Fetched: 5/10/2022 2:17:31 AM	 <b>9</b>
<b>SA</b>	<b>Tesis-Phaseolus vulgaris L..docx</b> Document Tesis-Phaseolus vulgaris L..docx (D28485688)	 <b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TT_H2_JOSE LUIS ESPINOSA-FINAL.docx</b> Document TT_H2_JOSE LUIS ESPINOSA-FINAL.docx (D146349788)	 <b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Haba pallar- ciclo corto- alex zambrano.docx</b> Document Haba pallar- ciclo corto- alex zambrano.docx (D15009947)	 <b>4</b>
<b>SA</b>	<b>PROYECTO BIOTECNOLOGIA (1).docx</b> Document PROYECTO BIOTECNOLOGIA (1).docx (D132737485)	 <b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="http://www.fao.org/news/story/es/item/456560/icode/">http://www.fao.org/news/story/es/item/456560/icode/</a> Fetched: 1/23/2023 3:33:00 PM	 <b>10</b>
<b>SA</b>	<b>AVANCES EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL HABA(1).pdf</b> Document AVANCES EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL HABA(1).pdf (D140275481)	 <b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / Antay.pdf</b> Document Antay.pdf (D139467216) Submitted by: rborjas@lamolina.edu.pe Receiver: rborjas.unalm@analysis.arkund.com	 <b>5</b>
<b>W</b>	URL: <a href="http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1666-77192015000100007&amp;lng=es&amp;tlng=es">http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1666-77192015000100007&amp;lng=es&amp;tlng=es</a> Fetched: 1/23/2023 3:33:00 PM	 <b>8</b>
<b>SA</b>	<b>contenido_tesis_cacao_chuncho.pdf</b> Document contenido_tesis_cacao_chuncho.pdf (D54945456)	 <b>7</b>

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**

**"CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y  
CAPACIDAD SIMBIÓTICA CON SUS RIZOBIOS NATIVOS DE  
PALLAR (*Phaseolus lunatus* L.) EN LA COSTA DEL PERÚ"**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE**

*Doctoris Philosophiae*

**Presentada por:**

**LUZ MARINA ESPINOZA MELGAR**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Sady García Bendezú  
**PRESIDENTE**

Dr. Félix Camarena Mayta  
**ASESOR**

Dra. Doris Zúñiga Dávila  
**CO-ASESOR**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**MIEMBRO**

Ph.D. Hugo Soplín Villacorta  
**MIEMBRO**

Ph.D. Vidal Cesar Aquino Zacarias  
**MIEMBRO EXTERNO**

## **DEDICATORIA**

**A JULISSA Y JULIO CESAR  
MIS AMADOS HIJOS  
MI RAZÓN DE SER Y ESTAR**

**A JULIO MI ESPOSO  
POR SU AMOR Y COMPRENSION  
SIEMPRE APOYANDOME  
EN TODO LO QUE YO EMPRENDA**

**A LA MEMORIA DE MI MADRE LIBIA MELGAR  
A LA MEMORIA DE MIS HERMANOS: ROLANDO y MARCO ANTONIO  
A MIS HERMANAS: DELIA, ALICIA y ADA  
SÉ QUE COMPARTEN MI ALEGRÍA**

**A LA PRIMERA PROMOCIÓN:  
“LIDERES DE LA AGRICULTURA SUSTENTABLE”  
POR FIN, YO TAMBIÉN LO LOGRÉ**

**MENCIÓN ESPECIAL A LA MEMORIA DEL  
INOLVIDABLE FREDY ARANA**

**A LOS GRANDES AGRICULTORES QUE TIENEN PEQUEÑAS  
CHACRAS O PARCELAS, QUIENES CON MUCHO ESFUERZO  
Y RIESGO LOGRAN COSECHAS AÑOS A AÑO  
SIENDO LOS CONSERVACIONISTAS DE LA DIVERSIDAD  
DEL PALLAR.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Félix Camarena Mayta, Patrocinador de la presente tesis, por compartir conmigo la vocación de docente e investigador en Leguminosas de Grano. Mi profundo agradecimiento por motivarme a lograr esta meta tan ansiada.

A la Dra. Doris Zuñiga Dávila, Co-Patrocinadora de la presente tesis, por compartir conmigo su vocación y experiencia en la investigación de los microorganismos del suelo y en particular en la rizosfera del pallar y otros cultivos. Muy valioso su apoyo.

A los Dres. Manuel Canto y Alberto Julca, por su acertada gestión como coordinadores y a cada uno de los docentes del Doctorado en Agricultura Sustentable.

Al Blgo. Ángel Valladolid Chiroque, colega y amigo, por su valiosa colaboración al proporcionar parte del material genético de pallar para la presente investigación.

Al Ing. Guillermo Espino Tipismana y a los estudiantes de la cátedra de Fitomejoramiento de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”, por su apoyo en las evaluaciones de campo del cultivo de pallar.

A la memoria del Ing. Bernardino Huamaní Calderón de la oficina de Promoción Agraria de la DRA Ica, por su acompañamiento en la colecta de la semilla de pallar y en la extracción de nódulos. Gran conocedor de las zonas productoras de pallar y muy vinculado a los agricultores.

Al Ing. Carlos Zevallos de la Agencia Agraria Nasca, por su apoyo en la toma de muestras en la zona de su competencia.

A la Bachiller en Ciencias Biológicas Karen Uribe Mejía, por su valioso apoyo como asistente de laboratorio en la caracterización y aislamiento de cepas de rizobios.

A la Blga. María Reyes Córdova, por ese gran desprendimiento en compartir sus conocimientos y experiencias en el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria de La Molina.

A todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para este ansiado logro.

# ÍNDICE GENERAL

	<u>Pág.</u>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>01</b>
1.1 Planteamiento del problema	01
1.2 Objetivos	03
1.3 Justificación	03
1.4 Hipótesis	06
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
2.1 El pallar ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.)	07
2.1.1 Origen y distribución	07
2.1.2 Importancia del pallar	09
2.1.3 Requerimientos edafo climáticos	11
2.1.4 Situación del cultivo	12
2.2 Caracterización morfológica	13
2.3 Caracterización molecular	14
2.4 Nódulos de rizobios – simbiosis – fijación de N – <i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 Lugar de ejecución	21
3.2 Materiales	21
3.2.1 Material biológico	21
3.2.2 Materiales, Medios y Equipos	24
3.3 Métodos	29
3.3.1 Caracterización morfológica del pallar	29
3.3.2 Caracterización molecular	31
3.3.3 Caracterización morfológica de cepas de nódulos simbióticos de pallar	34

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Caracterización morfológica del pallar	38
4.1.1 Promedios de las variables	38
4.1.2 Coeficientes de correlación de Pearson de las variables cuantitativas de 30 genotipos de pallar	40
4.1.3 Análisis de Componentes Principales de las variables cuantitativas de 30 genotipos de pallar	41
4.1.4 Análisis de agrupamiento	42
4.1.5 Distribución de los genotipos de pallar	44
4.2 Caracterización molecular de 30 genotipos de pallar	46
4.2.1 Polimorfismo	46
4.2.2 Análisis de agrupamiento	47
4.3 Aislamiento de cepas de rizobios de nódulos simbióticos	50
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>57</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>64</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
Tabla 1: Composición nutricional en 100 g de alimentos	09
Tabla 2: Puntos geo referenciados de procedencia de 30 genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	23
Tabla 3: Codificación de muestras, procedencia y número de nódulos extraídos	24
Tabla 4: Promedios de las variables cuantitativas de la caracterización morfológica de 30 genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	39
Tabla 5: Coeficientes de correlación entre ocho variables cuantitativas de la caracterización morfológica de 30 genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	40
Tabla 6: Valores y porcentajes de la variación de cada componente de la matriz de 30 genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i>	41
Tabla 7: Variables morfológicas de <i>Phaseolus lunatus</i> asociadas a los componentes más importantes	42
Tabla 8: Combinación de iniciadores AFLP, PIC y su polimorfismo	47
Tabla 9: Número de cepas de rizobios aisladas, por género, localidad, distrito y provincia de la región Ica.	50
Tabla 10: Base de datos de 30 genotipos de pallar	65
Tabla 11: Base de datos de cepas de nódulos de rizobios extraídos de plantas de pallar	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Dendrograma de 30 genotipos de <i>Phaseolus lunatus</i> clasificadas con siete variables morfológicas cualitativas y nueve cuantitativas	43
Figura 2. Comportamiento de los vectores-variables con base en el análisis de componentes principales (CP) de siete variables cualitativas y nueve cuantitativas de <i>Phaseolus lunatus</i>	44
Figura 3. Distribución de los genotipos de pallar según los dos componentes principales (2 CP)	45
Figura 4. Distribución de los genotipos de pallar según el origen (Provincia) de dos componentes principales (2CP)	46
Figura 5. Dendrograma UPGMA que agrupa 30 accesiones del pallar con 141 marcadores AFLP, según código de accesión.	48
Figura 6. Dendrograma UPGMA que agrupa 30 accesiones de pallar con 141 marcadores con 141 marcadores AFLP, según provincias de origen	49
Figura 7. Número y porcentaje total de cepas aisladas de rizobios según género	50
Figura 8. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género de la provincia de Chincha	51
Figura 9. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género de la provincia de Ica	51
Figura 10. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género de la provincia de Nasca	52
Figura 11. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género de la provincia de Pisco	53
Figura 12. Mapa de ubicación de los rizobios en las cuatro provincias de la región Ica	54
Figura 13. Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Chincha	78
Figura 14. Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Pisco.	79
Figura 15. Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Ica.	80
Figura 16. Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Nasca.	81
Figura 17. Campo mostrando los genotipos de pallar en evaluación	82
Figura 18. Campo mostrando los genotipos de pallar en evaluación	82
Figura 19. Diversidad de vainas y granos de genotipos de pallar	82
Figura 20. Diversidad de vainas y granos de genotipos de pallar	82

Figura 21. Diversidad en el color de la testa de la semilla de los genotipos de pallar	82
Figura 22. Diversidad en el color de la testa de la semilla de los genotipos de pallar	82
Figura 23. Diversidad en vainas y color de la testa de la semilla de pallar	83
Figura 24. Diversidad en vainas y color de la testa de la semilla de pallar	83
Figura 25. Diversidad en forma de vainas y granos de genotipos de pallar	83
Figura 26. Diversidad en forma de vainas y granos de genotipos de pallar	83
Figura 27. Diversidad en tamaño de grano	83
Figura 28. Diversidad en vaina y grano	83
Figura 29. Extracción de ADN de genotipos de pallar	84
Figura 30. Bandas de ADN diluidas	84
Figura 31. Escoreo de genotipos de pallar	84
Figura32. Planta de pallar en floración	85
Figura 33. Extracción de nódulos	85
Figura 34. Diversidad de nódulos	85
Figura 35. Vista microscópica del cultivo de cepas	85
Figura 36. Placa con cultivo de cepas	85

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<u>Pág.</u>
ANEXOS	
Anexo 1. Base de datos de 30 genotipos de pallar	65
Anexo 2. Base de datos de los nódulos de rizobios	67
Anexo 3. Reactivos para la extracción de ADN	72
Anexo 4. Reactivos de concentración de ADN	73
Anexo 5. Reactivos para la obtención de marcadores AFLP	74
Anexo 6. Electroforesis	76
Anexo 7. Tinción y revelado	77
Anexo 8. Mapas de ubicación de los nódulos de rizobios en cuatro provincias de la región Ica	78
Anexo 9. Panel fotográfico	82

## RESUMEN

El pallar (*Phaseolus lunatus* L.) es una leguminosa de grano, nativa de la región andina, cuya utilidad reside en el contenido de proteína en su semilla (entre 20 y 22 por ciento). Las bacterias conocidas como rizobios viven en simbiosis con el pallar formando nódulos en los cuales fijan nitrógeno atmosférico. Tiene gran importancia para la región Ica, por el área que ocupa, su gran adaptabilidad a las condiciones edafológicas y climáticas y la producción de granos con particulares características culinarias, contando por ello, con denominación de origen; pero su diversidad no ha sido suficientemente analizada. Con el objetivo de determinar la diversidad genética del pallar y de sus simbiosis nativos, se realizó la caracterización morfológica y molecular de 30 genotipos de pallar de cinco provincias de la costa del Perú, y se determinaron los probables géneros más frecuentes de las bacterias simbióticas nativas por el tiempo de crecimiento y análisis bioquímico. El análisis de componentes principales muestra que los cinco primeros explican el 86.5 por ciento de la variación total, de los cuales el CP1 con 36.7 por ciento de la variación estuvo definido por las variables peso de 100 granos, ancho, largo y espesor de grano, días a madurez de la vaina y días al 50 por ciento de floración. A un coeficiente de distancia genética de 0.5, los genotipos de pallar conformaron cuatro grupos definidos; mostrando una importante diversidad expresada en el patrón de crecimiento, días a la floración y madurez de vainas, forma y tamaño de semilla. Se encontraron 141 loci polimórficos, variando de 10 a 30 fragmentos, el contenido de índice de polimorfismo (PIC) varía de 0.18 a 38. Se aislaron 235 cepas de rizobios, de las cuales el 6.81 por ciento fueron de crecimiento muy rápido, no identificadas; 32.34 por ciento de crecimiento rápido, probablemente *Rhizobium*; 57.87 por ciento de crecimiento lento, probablemente *Bradyrhizobium* y 2.98 por ciento de crecimiento extra lento, no identificadas. Se concluye que hay una importante diversidad morfológica en el pallar, aunque la variabilidad molecular de la población es baja; asimismo, en los nódulos simbióticos analizados, las bacterias del género *Bradyrhizobium* fueron más frecuentes.

**Palabras clave:** Diversidad; *Phaseolus lunatus*; Caracterización molecular; Simbiosis

## ABSTRACT

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is a grain legume, native to the Andean region, whose usefulness lies in the protein content in its seed (between 20 and 22 percent). Bacteria known as rhizobia live in symbiosis with the lima bean, forming nodules in which they fix atmospheric nitrogen. It is of great importance for the Ica region, due to the area it occupies, its great adaptability to edaphoclimatic conditions and the production of grains with particular culinary characteristics, counting for this reason, with appellation of origin; but its diversity has not been sufficiently analyzed. In order to determine the genetic diversity of the lima bean and its native symbionts, the morphological and molecular characterization of 30 lima bean genotypes from five provinces of the coast of Peru was carried out, and the probable most frequent genera of native symbiotic bacteria were determined by growth time and biochemical analysis. The principal component analysis shows that the first five explain 86.5 percent of the total variation, of which PC1 with 36.7 percent of the variation was defined by the variables weight of 100 grains, width, length, and grain thickness, days to pod maturity and days to 50 percent flowering. At a genetic distance coefficient of 0.5, the lima bean genotypes formed four defined groups; showing an important diversity expressed in the pattern of growth, days to flowering and maturity of pods, shape and size of seed. 141 polymorphic loci were found, ranging from 10 to 30 fragments, the polymorphism index content (PIC) varies from 0.18 to 38. 235 rhizobia strains were isolated, of which 6.81 percent were very fast growing, unidentified; 32.34 percent fast-growing, probably *Rhizobium*; 57.87 percent slow growing, probably *Bradyrhizobium* and 2.98 percent extra slow growing, unidentified. It is concluded that there is an important morphological diversity in the lima bean, although the molecular variability of the population is low; in the symbiotic nodules analyzed, the bacteria of the genus *Bradyrhizobium* were more frequent.

**Keywords:** Diversity; *Phaseolus lunatus*; Molecular characterization; symbiosis

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso sostenible y la conservación de la biodiversidad son muy necesarios para mantener la salud de los ecosistemas, así como para el aumento sostenible de la producción de alimentos y para crear medios de subsistencia resilientes. Al respecto, la FAO (2018), señala que el alarmante ritmo de pérdida de biodiversidad que ocurre actualmente, amenaza con consecuencias devastadoras la seguridad alimentaria de la humanidad si no hacemos algo al respecto de manera urgente.

De manera preocupante, sólo cinco cultivos –arroz, trigo, maíz, mijo y sorgo– cubren aproximadamente la mitad de las necesidades de energía alimentaria humana; lo que evidencia una base genética reducida e incrementa la vulnerabilidad de los sistemas agrícolas poniendo en riesgo la seguridad alimentaria y la nutrición (FAO 2018); sin embargo, es necesario tener en cuenta que los cultivos locales, que no se encuentran entre los principales mencionados, son una fuente importante de alimentos para cientos de millones de personas y tienen potencial para proporcionar nutrición a muchos otros; por ello, es crucial la biodiversidad para producir suficientes alimentos nutritivos de manera sostenible, frente a desafíos como el cambio climático, el cambio en las demandas del mercado, de una población humana en aumento (FAO 2018).

La pérdida de biodiversidad juega en contra de la capacidad de la humanidad para alimentarse en el futuro, los 9000 millones de personas que se estima para el 2050, siendo los más pobres del mundo los más afectados (FAO 2011). Al respecto, es necesario tener en cuenta que la recolección, preservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos son actividades de mucha importancia que se deben realizar para hacer frente al cambio climático y la creciente inseguridad alimentaria, que son los grandes desafíos para los sistemas agrícolas del mundo (FAO 2011); en este sentido, se considera que la caracterización morfológica de la diversidad existente viene a ser el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación para lograr tener un mayor conocimiento del material genético disponible.

Durante el proceso de domesticación de las especies cultivadas, el hombre ha ejercido una

fuerte presión de selección que ha permitido la preservación de muchas variantes las cuales, posiblemente, hubieran desaparecido en condiciones naturales. De la misma manera, el hombre también indujo la producción de nuevas variantes, tanto para facilitar el manejo agronómico como para incrementar la producción. Este fenómeno se puede encontrar en todas las especies cultivadas, especialmente en las altamente domesticadas como los cereales (trigo, maíz, arroz), papa, frijol y otras (Franco e Hidalgo 2003).

Cubero y Moreno (1983), señalan que las leguminosas de grano son plantas que pertenecen a la familia *Fabaceae*, una de las más numerosas del reino vegetal con más de 19 000 especies, entre árboles, arbustos y hierbas; su fruto es conocido como legumbre y se deriva del uso directo que se da a sus granos en la alimentación humana y animal; mientras que para la FAO (2016), legumbre seca es la semilla deshidratada comestible que producen las leguminosas de la familia *Fabaceae* que suma más de 20 000 especies y supera los 700 géneros, de los cuales solo una parte es considerada dentro del grupo alimentario de las legumbres, como son *Cicer*, *Cajanus*, *Faba*, *Lens* o *Phaseolus*.

Los valles de la región Ica, reúnen condiciones agroecológicas apropiadas para cultivar las diferentes variedades de pallar, ya sea de patrón de crecimiento indeterminado o determinado, siendo una interesante alternativa económica para los productores, pues al tener denominación de origen (MINAG 2008), pueden colocar sus granos a mejores precios, aunque los rendimientos no superan los 2000 kg ha<sup>-1</sup> en promedio, debido a diferentes factores como inadecuado manejo del suelo, agua, nutrientes, plagas y enfermedades, entre otros. Su adaptación a las condiciones edafo climáticas de la región Ica, su menor contenido de ácido cianhídrico, que se refleja en su sabor agradable, textura suave y delgada y aspecto cremoso al cocerse, son algunas de las cualidades del pallar de Ica, que le hacen merecedor de las preferencias del público consumidor, en comparación con el de otras zonas del país, productoras de pallar (Espinoza 2012; MINAG 2008).

El pallar, cultivo de consumo ancestral en la región Ica y el país, juega un rol importante como especie leguminosa que aporta a la nutrición humana y animal un alto contenido de proteína. Presenta una amplia diversidad en sus diferentes zonas ecológicas, la cual aún no ha sido suficientemente identificada ni evaluada. Es considerado ideal para mejorar el suelo dentro de un plan de rotación, por su habilidad simbiótica con sus rizobios que le permiten proveerse del nitrógeno necesario, contribuyendo con la disminución de la contaminación



del agua y suelo por el uso de fertilizante sintético nitrogenado. Por ello, es necesario también identificar y evaluar dichos rizobios provenientes de colectas de nódulos simbióticos *in situ*, a fin de posibilitar la futura selección de las cepas más eficientes y realizar investigación participativa en las chacras o parcelas de los pequeños agricultores, de manera que puedan adoptar prácticas sencillas de mejoramiento de su semilla y de tecnología innovadora como la biofertilización nitrogenada, a base de cepas eficientes de rizobios, logrando cosechas sustentables con el valor agregado de producir granos más sanos, contribuyendo así, con la salud del suelo y el desarrollo sostenible de su localidad, región y del país en general.

El empleo de cultivares mejorados de pallar, de mayor rendimiento, ha reducido o desplazado algunas variedades tradicionales, como las “criollas” de largo ciclo vegetativo o “tardías”, de hábito de crecimiento indeterminado postrado, erosionando peligrosamente la biodiversidad de este cultivo. El uso de altas dosis de fertilizantes inorgánicos y agroquímicos, viene causando contaminación química de la tierra y el agua, así como el aumento de las plagas, como consecuencia de la creciente resistencia a los plaguicidas; por lo tanto, la intensificación agrícola se está cuestionando, ya que los campos no rinden como antes (Espinoza 2012).

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 General**

Determinar la diversidad genética del pallar y de sus simbiontes nativos mediante la caracterización morfológica del material colectado en cinco provincias de la costa del Perú.

### **1.2.2 Específicos**

- Analizar la diversidad genética del pallar colectado en cinco provincias de la costa del Perú, según los marcadores morfológicos y moleculares.
- Identificar la diversidad de géneros de los rizobios simbióticos nativos del pallar en el ámbito de la región Ica y determinar su frecuencia.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA), incluyen todo material fitogenético poseedor de valor actual o potencial para la alimentación y la agricultura. Esos recursos, que constituyen un reservorio de atributos heredables, son una ‘materia prima’ indispensable para generar variedades de cultivos de superior calidad. La diversidad de alternativas que brindan hace posible la muy deseada diversificación de cultivos, alimentos y sistemas de explotación agrícola, todos los cuales son índices de la resiliencia de los sistemas agrícolas (FAO 2015).

La FAO (2009), señala que los objetivos del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA), son: la conservación y el uso sostenible de todos los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, y la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de su uso, en armonía con el Convenio sobre Diversidad Biológica, para la agricultura sostenible y la seguridad alimentaria.

La utilidad primaria de las leguminosas radica en las semillas que se consumen por su alto contenido proteínico y como utilidad secundaria, el forraje, abono verde, ensilado, henificado o paja, de las cuales, en América Latina, se cultivan unas 15 (Nadal *et al.* 2004). En el Perú donde se les conoce con el nombre de menestras, se cultivan 11 especies tanto en costa, sierra y selva desde el nivel del mar hasta los 3 800 m.s.n.m. (Valladolid y Voysest 2006).

El pallar (*P. lunatus* L.), es una especie domesticada desde épocas prehispánicas y es una de las leguminosas de grano más importantes, habiendo encontrado condiciones agroecológicas excepcionales en los valles de la costa del Perú y en el departamento o región Ica en particular, lo que ha permitido su conservación de generación en generación, destacando por sus cualidades culinarias tanto en consumo de su grano tierno o inmaduro como en grano seco. Todas las características mencionadas, unidas a los estudios genéticos, morfológicos, arqueológicos y la adaptación a las condiciones particulares de características de suelo y clima (latitud, longitud y altitud) donde desarrolla exitosamente el pallar, fueron argumentos fehacientes para que el Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI), le otorgue la Denominación de Origen “Pallar de

Ica” (MINAG 2008); sin embargo, los hábitos de consumo local, nacional y exigencias del mercado internacional, están originando el uso sólo de determinados cultivares mejorados, en detrimento de las variedades tradicionales de ciclo tardío que son fuente importante de genes para los programas de mejoramiento participativo que deberían propiciarse.

Jacinto-Hernández *et al.* (2014), sostienen que la diversidad de los cultivos a nivel mundial se encuentra en peligro frecuente debido a cambios constantes; por lo que la caracterización del germoplasma es fundamental para el conocimiento de la diversidad genética y su aprovechamiento en los programas de fitomejoramiento.

La caracterización morfológica, según Jaramillo y Baena (2000), consiste en describir sistemáticamente los cultivares de una especie a partir de características cualitativas como el hábito de crecimiento, la altura de planta y el color de flor, que son de alta heredabilidad y no varían con ambiente.

La caracterización molecular, permite ahorrar tiempo y utiliza técnicas cada vez más manejables en el material genético, siendo los marcadores moleculares los que revelan sitios de variación en el ADN (Jones *et al.* 1997), y son los más utilizados en el análisis del germoplasma vegetal. Los marcadores moleculares, son generados por diferentes tipos de mutaciones en el ADN, así como mutaciones por substitución (puntuales), reordenamientos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación del ADN en tándem (Paterson 1996); como señalan Collard *et al.* (2005), los marcadores moleculares, son selectivamente neutros debido a que usualmente se localizan en regiones no codificantes del ADN.

El suelo, alberga una infinidad de organismos diferentes que interactúan entre sí y contribuyen a los ciclos globales que hacen posible la vida; siendo uno de los hábitats más diversos de la tierra, que lamentablemente apenas se conoce por estar bajo tierra y ser, en gran medida, invisible para el ojo humano (FAO 2015).

Para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas, es necesario tener en cuenta los servicios esenciales que brindan las actividades de los organismos del suelo, en los ciclos de nutrientes, en la regulación de la materia orgánica, la captación de carbono y las emisiones de gases de efecto invernadero, modificando la estructura del suelo y los regímenes hídricos, aumentando el volumen y la eficiencia de la absorción de nutrientes por la vegetación

mediante relaciones mutuamente beneficiosas y mejorando la salud vegetal; servicios que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales, siendo un recurso importante para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas (FAO 2015).

Entre las directrices para la gestión sostenible de los suelos, la FAO (2017) menciona que debería fomentarse la utilización de especies leguminosas que fijan el nitrógeno, inoculantes microbianos, micorrizas (esporas, hifas y fragmentos de raíces), lombrices de tierra y otros organismos beneficiosos del suelo a nivel micro, meso y macro, prestando atención a limitar el riesgo de procesos invasivos, promoviendo el uso de la biodiversidad local, minimizar la degradación del suelo y evitar la erosión. Señala además que, se debería restaurar la biodiversidad de las plantas en los ecosistemas, favoreciendo así la biodiversidad de los suelos, y que deberían promoverse en las explotaciones agrícolas la rotación y el intercalado de cultivos, así como la conservación de los refugios de biodiversidad.

Por todo lo expresado, se justifica la presente investigación.

#### **1.4 HIPÓTESIS**

- Los campos de pallar de la región Ica en el Perú, contienen una abundante diversidad genética determinada mediante los marcadores morfológicos y moleculares.
- Los nódulos del pallar contienen diversos géneros de rizobios, determinados con la caracterización morfológica.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 EL PALLAR (*Phaseolus lunatus* L.)

#### 2.1.1 Origen y distribución

En las prospecciones que Debouck (1986), realizó desde México hasta Argentina, tomó en cuenta la repartición geográfica de las formas y especies silvestres, considerando tres centros de diversidad para *Phaseolus*:

- Un centro mesoamericano, el más rico en especies, que se extiende del sudeste de Estados Unidos, al oeste de Panamá.
- Un centro norandino, que se extiende del oeste de Venezuela al norte del Perú.
- Un centro surandino, extendiéndose del norte del Perú a Argentina.

Sauer (1993), indica que las habas lima (pallares), se originaron en América Central y América del Sur, en donde fueron domesticadas por lo menos hace 8500 años. Sostiene que la domesticación de *P. lunatus* parece haber ocurrido dos veces y en lugares distintos; la primera, al noroeste de América del Sur, produciendo las variedades de habas lima (peso de 100 semillas: 54 – 280 g), por la evidencia encontrada en restos arqueológicos peruanos, cuya fecha data de 6500 a.C.; la segunda, en América Central, cerca del año 800 d.C., donde se originaron las variedades Sieva, de semilla pequeña (peso de 100 semillas: 24 – 70 g) probablemente en Guatemala, aunque la evidencia arqueológica más antigua es de México.

Gutiérrez-Salgado *et al.* (1995), señalan que el frijol lima, *P. lunatus* L., es una especie de frijol con una amplia distribución en las Américas, que rivaliza con la del frijol común (*P. vulgaris*). Estos autores realizaron una revisión de la información disponible sobre la distribución geográfica de las formas silvestres y cultivadas de esta especie y una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS unidimensional de proteínas de semilla en una muestra de 84 formas silvestres, 6 de malezas y 426 cultivadas. Sus resultados indicaron que las formas silvestres se pueden dividir en dos grupos, uno con semillas más pequeñas y una distribución muy extensa que incluye a México, América Central y la vertiente oriental de los Andes, y el otro con una distribución más circunscrita en la vertiente occidental de los

Andes en Ecuador y el norte de Perú.

*P. lunatus* L., se originó en América tropical y fue domesticada tanto en Mesoamérica como en los Andes entre los 8000 y 10 000 años (Baudoin 1991; Kaplan y Lynch 1999); los estudios sobre su origen, evolución y distribución, han permitido reconocer la existencia de dos acervos genéticos, el mesoamericano y el andino, ambos con poblaciones silvestres y domesticadas (Gutiérrez-Salgado *et al.* 1995; Maquet *et al.* 1999; Caicedo *et al.* 1999; Fofana *et al.* 1999).

Las variedades cultivadas (*P. lunatus* var. *lunatus*) se han dividido en tres cultigrupos: Sieva, Papa y Gran Lima (Baudet 1977). El cultigrupo Sieva se caracteriza por el tamaño moderado de las semillas planas y es cultivado principalmente en Mesoamérica. El cultigrupo Papa se caracteriza por semillas pequeñas y redondas y se encuentra distribuido mayormente alrededor de las islas del Caribe. El cultigrupo Gran Lima se caracteriza por semillas elípticas, redondas, planas y grandes y es cultivado principalmente en la región andina, de 1800-2800 m.s.n.m. (Fofana *et al.* 1999).

El origen mesoamericano y andino de las variedades locales de *P. lunatus* L., fue explicada mediante el análisis del ADN del cloroplasto y los polimorfismos de ITS en una muestra de 59 accesiones silvestres y 50 de variedades locales, por Motta-Aldana *et al.* (2010), quienes señalan que, de acuerdo con el tamaño de la semilla, los análisis de distancia genética y las redes de haplotipos, se proponen al menos dos eventos de domesticación independientes. El primero habría ocurrido en los Andes del sur de Ecuador-noroeste de Perú, dando lugar a las variedades de semillas grandes conocidas como cultivares "Big Lima". El segundo habría tenido lugar en el centro-occidente de México, donde se habría dado lugar a las variedades nativas mesoamericanas de semillas pequeñas, conocidas como cultivares "Sieva".

Andueza-Noh *et al.* (2016), sostienen que el acervo genético mesoamericano del frijol lima silvestre (*P. lunatus* L.) representa una fuente importante de genes para el mejoramiento genético de la especie. Refieren que, esta especie presenta una amplia distribución geográfica que abarca del norte de México al norte de Argentina. Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene sobre la distribución de este acervo, señalan que en México aún existen regiones con vacíos de colecta para *P. lunatus*; por lo cual realizaron colectas de poblaciones silvestres del frijol lima en México, para conocer su distribución. Informan que

los resultados demostraron que las poblaciones silvestres del frijol lima, presentan una amplia distribución geográfica localizándose principalmente en zonas de selva tropical caducifolia y subcaducifolia con altitudes de 0 a 2 292 m.s.n.m. Los autores observaron un bajo estado de conservación en la mayoría de las poblaciones silvestres colectadas, en consecuencia, propusieron el desarrollo de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* para las poblaciones silvestres con mayor grado de erosión.

### 2.1.2 Importancia del pallar

El pallar, es reconocido por ser un producto de cáscara delgada, de fácil y rápida cocción y es preferido por su sabor agradable y dulce, de textura suave y cremosa al ser cocido (MINAG 2008). Su valor alimenticio se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1. Composición nutricional en 100 g de alimento**

Componentes	Alimentos	Pallar seco	Pallar sin cáscara	Pallar cocido con cáscara
Energía (kcal)		253	260	94
Energía (kj)		1060	1088	393
Agua (g)		11,6	12,2	68,1
Proteínas (g)		20,4	21,6	7,7
Grasa total (g)		1,2	1,4	0,8
Carbohidratos totales (g)		61,4	61,6	21,9
Carbohidratos disponibles (g)		42,4	42,6	14,9
Fibra dietaria (g)		19,0	19,0	7,0
Cenizas (g)		5,4	3,2	1,5
Calcio (mg)		70	38	28
Fósforo (mg)		318	205	34
Zinc (mg)		2,83	2,83	0,93
Hierro (mg)		6,7	5,2	1,28
Tiamina (mg)		0,28	0,55	0,00
Riboflavina (mg)		0,28	0,21	0,02
Niacina (mg)		3,2	2,25	0,59
Vitamina C (mg)		7,5	0,00	0,10
Sodio (mg)		55	55	*
Potasio (mg)		576	576	*

\*Imputado Tabla INCAP (2012)

**Fuente: Adaptado de: Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud (2017)**

Las leguminosas se diferencian del resto de especies cultivadas, no sólo por sus altos

porcentajes de proteínas que contienen, sino también por la habilidad que tienen para establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>). Esta relación *Rhizobium*-leguminosas es muy importante, en cuanto al volumen de nitrógeno fijado total (Nadal *et al.* 2004).

Es innegable la importancia de las legumbres, leguminosas de grano o menestras en la alimentación humana por su aporte de proteínas. Dicha importancia ha quedado resaltada plenamente desde que la FAO empezó a realizar una serie de eventos internacionales, precisamente para incentivar su cultivo y por ende su consumo como parte de las estrategias para la seguridad alimentaria y lucha contra la desnutrición. Tan es así, que el año 2016 fue declarado como el Año Internacional de las Legumbres.

El suelo y el cultivo de las legumbres pueden ser de gran ayuda para conseguir alimentar a una creciente población mundial, contribuir con la disminución de la desnutrición y combatir o prevenir los efectos del cambio climático, sobre todo cuando ambos se combinan. Como señala la FAO (2016): "Los suelos y las legumbres encarnan una simbiosis única que protege al medio ambiente, incrementa la productividad, contribuye a la adaptación al cambio climático y aporta nutrientes fundamentales al suelo y a los cultivos siguientes", simbiosis que en el presente estudio destaca la que se produce especialmente entre las leguminosas y sus rizobios.

Las legumbres son cultivos resilientes a nivel ambiental, ofrecen alimentos muy nutritivos a las personas y nutrientes esenciales a los ecosistemas biológicos, sus plantas fijan nitrógeno que beneficia a la salud del suelo, lo que ofrece mejores condiciones de crecimiento para ellas y para otras plantas; tan es así que, los cereales que se cultivan después de las legumbres llegan a producir 1,5 toneladas más por hectárea que los no precedidos por legumbres, lo que equivale al uso de 100 kg de fertilizante nitrogenado por unidad de superficie (FAO 2016).

Con la resolución [A/RES/73/251](#), la Asamblea General de las Naciones Unidas designó el 10 de febrero como *Día Mundial de las Legumbres*, revalorando y reafirmando la contribución de las legumbres a la agricultura sostenible y al logro de la Agenda 2030 (FAO 2019).



### 2.1.3 Requerimientos edafo climáticos

*P. lunatus*, es una especie generalmente rústica, que prefiere climas secos y suelos profundos (pH 6.0 – 7.2) con buen drenaje. Su rango de distribución en altitud va de 50 a 2800 m, temperaturas de 16 a 26 °C, particularmente en el Perú, donde algunas formas pueden resistir temperaturas bajas. Es una especie heliófita, tanto cultivada como silvestre. Esta especie, se desarrolla en zonas con precipitación media de 0 a 2 800 mm/año. El ciclo del cultivo es variable, va de 90 a 365 días, con rendimientos promedios de 400 – 5 000 kg ha<sup>-1</sup> (Debouck 1992).

El pallar necesita temperaturas moderadas y humedad relativa también moderada. Se ha observado que en las regiones tropicales el contenido de ácido cianhídrico (HCN) aumenta en los granos de pallar. La temperatura óptima para el pallar tipo “big lima” (grano grande), se encuentra en el rango de 16 – 27 °C y para el tipo “baby” (grano pequeño) entre 18 y 30 °C. Cuando las temperaturas son superiores a los 28 °C durante la floración, se produce caída de flores; por ello es fundamental evitar coincidir con altas temperaturas en esta etapa fenológica (Debouck 1999).

En los valles de la región Ica, el cultivo de pallar se desarrolla en suelos de textura media a moderadamente gruesa (francos y franco arenosos), con moderada a alta aireación, permeabilidad moderada a moderadamente rápida y drenaje bueno. La reacción del suelo va de neutra a moderadamente básica o alcalina (pH: 7.01 a 8.06), con contenido bajo a medio de carbonatos (0.0 a 2.7 por ciento) y sin problemas de sales (conductividad eléctrica, CE, menor de 4 dS/m: 0.42 a 2.52 dS/m), con niveles bajos de materia orgánica (0.5 a 1.1 por ciento) y muy bajo en nitrógeno mineral (MINAG 2008).

Los estudios que se realizaron para sustentar la denominación de origen ‘Pallar de Ica’, describen las condiciones particulares de los valles de la región Ica, en los que se desarrolla este cultivo. Por ejemplo, para la etapa de siembra, requiere temperaturas cálidas, siendo 24.4 °C un promedio favorable, que estimula una buena germinación. Durante el desarrollo del cultivo, la temperatura máxima promedio debe ser de 21.9 °C (MINAG 2008). Se ha encontrado que, durante la floración, la temperatura promedio disminuye a 17.7 °C, la humedad relativa promedio se incrementa a 85.3 por ciento, condiciones favorables para esta etapa. Para la cosecha, la temperatura comienza a incrementar y la humedad relativa a

disminuir, lo que favorece en la última etapa de desarrollo del cultivo a la madurez de vainas y granos (MINAG 2008).

#### **2.1.4 Situación del cultivo**

El pallar representa para la región Ica, un producto bandera, una menestra bandera, por el área que se siembra en sus valles productores; sin embargo, no es ajeno a la inestabilidad que se genera por factores que están incidiendo por el cambio climático, como el incremento de la temperatura, lo que origina disminución de las cosechas por una mayor proliferación de plagas y enfermedades, alto costo de producción y escasa asistencia técnica, produciendo inestabilidad en los precios, con la consecuente tendencia hacia la disminución de las áreas sembradas.

Durante la campaña agrícola 2013-2014, se sembraron 4 219.70 ha; en la campaña 2014-2015, se incrementó a 5 460.09 hectáreas sembradas. En la campaña 2016-2017, se instalaron 4 927 ha de pallar, con un resultado en la cosecha realmente negativo, generando grandes pérdidas y la disminución significativa del área dedicada a este cultivo. En la campaña 2017-2018, solamente se sembraron 2 795 hectáreas de pallar en toda la región Ica, lo que finalmente encareció el precio del grano. El rendimiento promedio regional oscila entre 1 200 y 1 500 kg ha<sup>-1</sup> de grano seco; los rendimientos promedios en Ica van de 2 500 a 2 800 kg ha<sup>-1</sup>, superados por Nasca, donde llegan a 3 500 kg ha<sup>-1</sup> de grano seco. Los precios alcanzaron como valor mínimo de S/. 5.00 por kilogramo (INFODRA 2018).

Sobre las variedades y cultivares de pallar que con mayor frecuencia se siembran en la región Ica, Espinoza (2012) y MINAG (2008), mencionan a la variedad de pallar tradicionalmente conocida como "Criolla" de grano blanco, grande (big lima), cuyo ciclo es muy largo o tardío (más de ocho meses). El uso de cultivares mejorados datan desde hace más de 40 años, como "Generoso de Ica" (ICA 1548-71) y "Señor de Luren" de ciclo intermedio o semiprecoz (seis meses), de patrón de crecimiento indeterminado o guiador, grano blanco brillante, tamaño grande; al igual que los cultivares "Sol de Ica" (ICA 450 – 3 – 71) e "Iqueño Precoz INIA" (ICA 205-74) ambos de ciclo más corto o precoces (cuatro y cuatro meses y medio), de patrón de crecimiento determinado, grano blanco, tamaño mediano (Espinoza 2012). Debido a la disponibilidad del recurso hídrico, la adaptación de estos cultivares y sobre todo teniendo en cuenta su ciclo vegetativo, el período de siembra del pallar se encuentra entre los meses

de febrero a abril, permitiendo que se formen granos de buena calidad (Espinoza 2012; MINAG 2008).

## **2. 2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA**

Según Franco e Hidalgo (2003), la caracterización de la variabilidad detectable visualmente hace referencia a las características responsables de la morfología y la arquitectura de la planta, llamadas botánicas-taxonómicas; las características relacionadas con aspectos de manejo agronómico y de producción se denominan morfoagronómicas y las evaluativas, son las que se expresan como reacción a estímulos ambientales bióticos (plagas y enfermedades) o abióticos (estrés por temperatura, agua, nutrientes). En general, la respuesta se expresa en características de tipo cualitativo.

Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Los descriptores se emplean en la caracterización y evaluación de las accesiones debido a que ayudan a su diferenciación y a expresar el atributo de manera precisa y uniforme, lo que simplifica la clasificación, el almacenamiento, la recuperación y el uso de los datos. Estos descriptores han sido definidos por el IPGRI (2001) para un gran número de especies cultivadas (Hernández-Villarreal 2013).

Algunos caracteres pueden ser altamente heredables, fácilmente observables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la variabilidad genética, para identificar plantas y para conservar los recursos genéticos. Por lo tanto, Hernández-Villarreal (2013), sostiene que la caracterización es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación. Señala además que, los parámetros más usados para el análisis de los datos son la varianza, el coeficiente de variación, correlación lineal, entre otros; mientras que los análisis de componentes principales son los métodos estadísticos más utilizados.

Pesantes *et al.* (2015), reportan que determinaron la variabilidad morfo-agronómica de ocho poblaciones de pallar cultivadas bajo condiciones agroecológicas del norte peruano, procedentes de Trujillo (costa) y Huamachuco (sierra del Perú), que fueron analizadas tomando en cuenta seis caracteres cuantitativos los cuales fueron procesados

estadísticamente. Refieren que encontraron marcadas diferencias fenotípicas y genéticas entre las ocho colectas cultivadas, así: PLUNT 06 fue más precoz para el carácter días a la floración (39.77 días) y PLUNT 04 fue más tardía (50.44 días); la mayor variación y heterogeneidad fenotípica (C.V. mayor al 10 por ciento) se presentó en las colectas pertenecientes a la costa (PLUNT: 01, 02, 03, 04 y 05), para los caracteres peso de los granos y número de semillas por vaina; las colectas de la sierra (PLUNT: 07 y 08), a diferencia de las de la costa, presentaron un tipo de crecimiento arbustivo o mata.

López-Alcocer (2016), refiere que para conocer la variabilidad de poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* L. originarias del occidente de México, realizó la caracterización morfológica de 30 colectas, con 25 descriptores cualitativos y 10 cuantitativos. Los resultados que obtuvo indican que las variables cualitativas color de hipocótilo, color de flores y color de vainas, presentaron diferencias significativas entre poblaciones; los rasgos cuantitativos de mayor variabilidad fueron: longitud y ancho de hoja primaria, longitud y ancho del foliolo central, días a floración, longitud de vaina y peso de 100 semillas. El análisis de conglomerados conformó dos grupos: el grupo A de floración tardía y el grupo B de floración precoz, y dentro de cada grupo se detectaron los subgrupos A1 y B1 de semillas pequeñas procedentes de localidades de baja altitud y los subgrupos A2 y B2 de semillas grandes originarios de localidades de mayor altitud. La representación Biplot de los dos primeros componentes principales muestra la separación de las poblaciones en tres grupos relacionados con el tamaño de semilla y la procedencia de la zona.

### **2.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

La caracterización de la variabilidad que no es detectable a simple vista se denomina caracterización molecular porque se refiere a la identificación de productos o funciones internas de la célula, a través de los llamados marcadores moleculares. La aplicación de las nuevas técnicas para la caracterización de germoplasma, según los avances de la biología molecular, todavía no se ha generalizado en la mayoría de los bancos de germoplasma de la región (Franco e Hidalgo 2003).

Los marcadores genéticos representan diferencias genéticas entre individuos o especies; generalmente no representan genes objetivo, pero actúan como señales o marcas ya que se encuentran cerca de los genes de interés; la mayoría no afecta el fenotipo de la característica

de interés ya que se encuentran cerca o ligados a los genes que controlan la característica, son selectivamente neutros debido a que usualmente se localizan en regiones no codificantes del ADN (Collard *et al.* 2005).

García (2008) refiere que estudió las relaciones genéticas entre las cinco especies cultivadas del género *Phaseolus* y la diversidad genética y flujo genético de *P. lunatus* L., en zonas silvestres y cultivadas en Imbabura, Ecuador; para lo cual utilizó ocho *loci* microsatélites. Señala que encontró que los índices de diversidad genética globales como heterocigosis observada (0.122), heterocigosis esperada (0.33) y riqueza alélica (5.37) fueron menores que en la Península de Yucatán, donde esta planta tiene un uso intensivo en la alimentación, pero mayores respecto a los valores obtenidos en el valle central de Costa Rica, y está sujeta a fuertes presiones antropogénicas, lo que sugiere que el sistema agrícola tradicional manejado en Imbabura favorece el mantenimiento de la diversidad genética. Encontró además que *P. lunatus* se diferenció de las otras cuatro especies cultivadas y, dentro de *P. lunatus* se diferenciaron las accesiones mesoamericanas, del acervo genético andino, corroborando la hipótesis de domesticación múltiple del complejo *P. lunatus*.

Zoro *et al.* (2003), analizaron la estructura genética de 29 poblaciones de *P. lunatus* en el Centro Valle de Costa Rica. Usando 22 *loci* de enzimas, cuantificaron la proporción de *loci* polimórficos (Pp), el número medio de alelos por *locus* (A), y el número efectivo medio de alelos por *locus* (Ae), obteniendo valores de 10.32 por ciento, 1.10 y 1.05, respectivamente. El total de la heterocigosidad (HT), la diversidad genética intrapoblacional (HS) y la diversidad genética interpoblacional (DST) fueron 0.193, 0.082, y 0.111, respectivamente. La composición genotípica de las poblaciones analizadas, mostró una desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ( $F_{IT} = 0.932$ ). Este desequilibrio se debió a la diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{ST} = 0.497$ ) o al apareamiento no aleatorio dentro de las poblaciones ( $F_{IS} = 0.866$ ). Observaron una correlación positiva significativa entre el tamaño de la población y Pp, A y Ho (heterocigosidad observada). Sostienen que la pérdida de la variabilidad genética en las poblaciones se debe a la consanguinidad y los efectos del cuello de botella que caracterizaron a las poblaciones objetivo.

## 2.4 NÓDULOS DE RIZOBIOS – SIMBIOSIS – FIJACIÓN DE N – RHIZOBIUM – BRADYRHIZOBIUM

Matos *et al.* (1998), refieren que estudiaron la diversidad de 36 cepas de rizobios aisladas de *P. lunatus* en la costa central del Perú, agrupándolas según características morfológicas y fisiológicas. De acuerdo a los resultados, encontraron que el 75 por ciento de cepas pertenecían al género *Rhizobium*, de crecimiento rápido (tres a cinco días para observar las primeras colonias) y productoras de metabolitos ácidos; mientras que el 25 por ciento fue del género *Bradyrhizobium*, de crecimiento lento (cinco a siete días para observar las primeras colonias) y productoras de metabolitos alcalinos. Observaron una gran diversidad en la apariencia de las colonias, tolerancia al cloruro de sodio y crecimiento a diferentes niveles de pH y temperatura. Los resultados sugieren que dos grupos taxonómicos de rizobios (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) nodulan pallar en la costa central del Perú.

Hernández y Mayo (2002), aislaron, autenticaron, diferenciaron y caracterizaron cepas nativas de rizobios provenientes de campos de *P. lunatus* (pallar) de la provincia de Ica, para determinar su infectividad y efectividad en las variedades de pallar “Criollo” y “Sieva”. Señalan que aislaron 18 cepas nativas de rizobios Nod+, que se diferenciaron en dos géneros: *Rhizobium* (22 por ciento) y *Bradyrhizobium* (78 por ciento). La cepa más infectiva y efectiva fue *Bradyrhizobium* PCYGIVN3, según el código utilizado por los autores.

La simbiosis rizobio-leguminosa, es altamente sensible a la carencia de fósforo, indispensable para la fijación biológica del nitrógeno, por la alta energía que este proceso requiere (16 moléculas de ATP/N<sub>2</sub> fijado), a lo que se debe sumar el consumo para la formación de tejido de los nódulos y para los procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y rizobio). Para que sea posible la nodulación y fijación de nitrógeno, es necesario un aporte suficiente de fósforo. Cuando la concentración de fósforo en la planta es inferior al 0,2 por ciento, la nodulación y la fijación del nitrógeno son casi despreciables. Las concentraciones de fósforo en los nódulos son, en general, mayores que las concentraciones en el tallo y en la raíz (Fernández 2003).

Nadal *et al.* (2004), indican que *Rhizobium*, es el nombre genérico con el que se designan a las bacterias formadoras de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico, principalmente en las plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae*. Son bacterias gram-negativas y aerobias

obligadas, dotadas de flagelos para facilitar su movilidad en el suelo. Se consideran de crecimiento rápido, cuando desarrollan colonias de uno a cinco milímetros de tamaño en un período de tiempo de tres a cinco días, a una temperatura de 25 – 28 °C, en un medio de agar con extracto de levadura y manitol, y de crecimiento lento, cuando para el período de tiempo indicado, la colonia no supera un milímetro de tamaño (Jordan 1983; Vincent 1982).

Si bien en nuestros suelos habitan gran cantidad de cepas nativas de rizobios, sus poblaciones no siempre contribuyen eficazmente en el aporte de nitrógeno, ya sea por su escaso número o simplemente porque no pueden establecer una simbiosis eficiente con la leguminosa de interés. Una alternativa económica y no contaminante, es la inoculación con cepas de rizobios.

La relación biológica de *simbiosis*, es la que se establece entre dos o más individuos manteniéndose contacto directo entre ellos, con beneficio mutuo entre los participantes en la asociación, en el caso leguminosa-bacteria, forman un complejo en el cual factores químicos, físicos, bióticos y abióticos, influirán en cada individuo por separado, así como en el complejo formado, determinando el éxito o fracaso de tal relación. La leguminosa aporta a dicha relación energía, principalmente en forma de carbohidratos y la bacteria aporta nitrógeno en forma amoniacal (Nadal *et al.* 2004).

Olivares (2005), señala que el nitrógeno es el factor limitante más importante en la producción vegetal, después del agua, por lo que debe ser aplicado en grandes cantidades para conseguir rendimientos aceptables. Refiere que las bacterias conocidas como rizobios transforman el nitrógeno del aire en asimilable y lo proporcionan a las plantas, a través de sus raíces donde forman los nódulos, cuyas células están ocupadas por estos microorganismos. Dichos nódulos, funcionan como auténticas fábricas biológicas de amoníaco, utilizando los productos de la fotosíntesis que llegan a la raíz desde las hojas, en lugar de combustibles fósiles. Es una forma limpia y barata de suministrar a las plantas el nitrógeno que requieren.

Vinuesa *et al.* (2005), reportan que la identificación y las relaciones entre las bacterias, se han establecido con base en estudios filogenéticos, considerando las secuencias de genes que codifican proteínas y también de los genes ribosomales. Estos enfoques moleculares han permitido revelar la gran diversidad genética de bacterias asociadas a plantas y su más certera

identificación. Señalan además que una de las interacciones más ampliamente estudiadas, es la interacción leguminosa-*Rhizobium*, que se basa en un reconocimiento mutuo de los dos organismos compatibles, basado a la vez, en una respuesta quimiotáctica y una unión específica a las estructuras radicales. La asociación se caracteriza por el desarrollo de nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno atmosférico.

Mediante métodos moleculares, Ormeño *et al.* (2005) evaluaron una colección de 21 aislamientos de *Bradyrhizobium* del pallar en la costa norte y central del Perú, de los cuales nueve (43 por ciento) fueron de crecimiento lento, de 1-3 mm a los 5 a 6 días de incubación en medio YEM, mientras que los doce restantes (57 por ciento) fueron de crecimiento extra lento de un tamaño > 1 mm, que se hace visible solamente después de los 7 a 10 días de incubación. Señalan que, todos los aislamientos indujeron nodulación efectiva en plantas de pallar. Los nódulos fueron rosados y las hojas de las plantas inoculadas fueron de color verde oscuro, mientras que el control con plantas no inoculadas, presentaron un color verde amarillento de las hojas.

Matta y Soto (2008), reportan que, de 365 nódulos colectados para su trabajo de investigación, aislaron 80 cultivos de posibles rizobios. Los nódulos fueron extraídos de plantas de pallar sanas y vigorosas, en estadio fenológico de inicios de floración, en la provincia de Ica, desde el distrito de Los Molinos, hasta el distrito de Ocucaje. Señalan que de las 35 cepas de rizobios obtenidas; verificaron que las características morfológicas de las colonias, como tamaño, apariencia, forma y tiempo de crecimiento correspondieron a dos cepas (5,7 por ciento) del género *Rhizobium* de crecimiento rápido y 33 cepas (94,3 por ciento) de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium*.

Las bacterias conocidas como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas, la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales, el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre el 60 – 80 por ciento de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), y esta simbiosis, aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos. Estas bacterias, se emplean como inoculantes (biofertilizantes) en la agricultura. La primera bacteria producida como inoculante a gran escala fue *Rhizobium*, y se ha inoculado durante 105 años a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos (Cuadrado *et al.* 2009).



Toniutti *et al.* (2015), refieren que aislaron y caracterizaron fenotípicamente cepas provenientes de nódulos de *Macropodium atropurpureum* y *Macropodium bracteatum*, que son leguminosas de interés forrajero valoradas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, en relaciones simbióticas con rizobacterias. Señalan que las 19 cepas estudiadas, presentaron colonias pequeñas, translúcidas, poco gomosas y de crecimiento lento. En el análisis de agrupamiento, observaron que se agruparon formando cuatro conglomerados según la velocidad de crecimiento, tolerancia a temperaturas, niveles de pH, concentraciones de sales y resistencia a diferentes antibióticos. Reportan que identificaron siete aislados capaces de crecer en altas temperaturas, alcalinidad y/o salinidad, los cuales tendrían un uso potencial como biofertilizantes.

Sanjuán (2007), indica que la adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos (inoculantes) en la agricultura, está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante para las economías y las sociedades de los países iberoamericanos. La posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el medio ambiente, están irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos, como alternativa al uso masivo de plaguicidas y fertilizantes de origen químico, que son costosos y tienen un impacto muy negativo sobre la salud y el medio ambiente.

Los cultivos de leguminosas brindan múltiples servicios en línea con los principios de sostenibilidad. Sirven como fuente fundamental de alimentos y forrajes de alta calidad, contribuyen a reducir la emisión de gases de efecto invernadero, ya que liberan de 5 a 7 veces menos GEI por unidad de superficie en comparación con otros cultivos. Son cultivos competitivos y, debido a sus beneficios ambientales y socioeconómicos, podrían introducirse en los sistemas de cultivo modernos para aumentar la diversidad de cultivos y reducir el uso de insumos externos. Se desempeñan bien en sistemas de conservación, sistemas de cultivos intercalados. Las leguminosas fijan el nitrógeno atmosférico, liberan en el suelo materia orgánica de alta calidad y facilitan la circulación de los nutrientes del suelo y la retención de agua (Stagnari *et al.* 2017).

De manera similar, el cultivo de pallar, leguminosa o menestra bandera de la región Ica y el Perú, destaca por ser fuente importante de proteína, por su habilidad simbiótica con sus rizobios nativos, que permite reducir notablemente la fertilización nitrogenada sintética al

utilizar el nitrógeno proporcionado por la bacteria, contribuyendo de esta manera con la disminución de la contaminación ambiental y su sustentabilidad. Estas ventajas se potencian, cuando el pallar es cultivado en asociación o intercalado con otras especies como el maíz amiláceo que forman parte de la seguridad alimentaria del poblador rural, de las ciudades cercanas e inclusive de la capital, garantizando la diversidad de sus cosechas y la conservación *in situ* de sus recursos, como ocurre de manera tradicional de generación en generación.

En el agroecosistema “cultivos asociados”, caracterizado en un estudio sobre maíz, el MINAM (2015), señala que los componentes encontrados son: maíz, kiwicha, frijol, habas y arveja, en donde ocurre una mínima pérdida de diversidad, precisamente por este tipo de asociación.

De manera similar, los agricultores de pequeñas áreas de los valles de la región Ica, ya sean parcelas o huertos familiares, en los agroecosistemas “cultivos asociados”, tienen como componentes frecuentes al maíz, pallar, garbanzo, zapallo, entre otros; con lo cual se tiene una importante forma de conservar *in situ*, la diversidad de las especies alimenticias, donde el pallar (nativo) y el garbanzo (naturalizado), juegan un rol importante por sus características de ser especies leguminosas.

Gracias a la capacidad de adaptación a todo tipo de suelos y la relativa falta de cuidados que requieren, las legumbres son un insumo clave para los agricultores, ya que, como fijadoras de nitrógeno, aportan abonos verdes que permiten la recuperación y conservación de los suelos. Cuentan además con una gran diversidad genética y pueden ser muy atractivas para los consumidores, si cuentan con la información necesaria, lo que requiere ampliar la divulgación de sus propiedades, preparaciones y beneficios nutricionales (FAO 2016).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

La caracterización morfológica de 30 genotipos de pallar, se realizó en el fundo Agrorgánica del caserío Arrabales, distrito de Subtanjalla, provincia y departamento de Ica, durante los meses de abril a septiembre del 2018.

El departamento de Ica está situado en la parte central de la costa peruana. Sus coordenadas geográficas se encuentran entre 13° 01' y 15° 26' de Latitud Sur y 74° 42' y 76° 24' de Longitud Oeste del Meridiano Greenwich. Su extenso litoral abarca principalmente la región de la costa, con relieve poco accidentado y donde solo se observan sistemas de colinas que enmarcan valles y pampas construidas por acumulaciones desérticas (INEI-Perú 2009). Limita por el norte con el departamento de Lima, por el sur con el departamento de Arequipa por el este con los departamentos de Ayacucho y Huancavelica y por el oeste con el Mar de Grau.

La caracterización morfológica y aislamiento de las cepas de rizobios, se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

La caracterización molecular de plantas, se llevó a cabo en el Laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT), de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.2 MATERIALES**

##### **3.2.1 Material biológico**

###### **a. Semilla de pallar**

Se obtuvo semillas de pallar de variedades de uso ancestral de autoconsumo y de cultivares mejorados, de campos de cultivo en el momento de cosecha y/o almacenes de reciente cosecha. En menor proporción, se logró obtener semilla de variedades de colores diferentes al blanco, que no eran de cosecha reciente.

Para obtener semillas de pallar, se obtuvo información de la Dirección de Promoción Agraria, de la Dirección Regional Agraria de Ica sobre las áreas sembradas con pallar comercial, también se contó con la información de agricultores de pequeñas áreas con pallar de autoconsumo y la colaboración importante de agricultores que sin darle uso comercial ni de consumo, conservan pequeñas cantidades de granos de pallar con diversas coloraciones. Recorriendo cuatro provincias (Chincha, Pisco, Ica y Nasca), nueve distritos y 14 localidades de la región Ica, totalizando 25 muestras, siendo 21 de patrón de crecimiento indeterminado y cuatro de crecimiento determinado (Tabla 2).

Adicionalmente, se contó con semilla de cinco cultivares proporcionados por el Biólogo Ángel Valladolid, del Programa de Promenestras con sede en Chiclayo, siendo dos de crecimiento determinado y tres indeterminados; procedentes del distrito de Pátapo, provincia de Chiclayo y departamento Lambayeque; cuyas coordenadas geográficas son -6.738080556 Latitud Sur y -79.6271139 Longitud Oeste; por lo tanto, los análisis morfológicos y moleculares se realizaron en 30 genotipos (Tabla 2).

Las semillas de los 30 genotipos de pallar, se sembraron según el diseño sistemático, diez plantas por entrada y los datos se tomaron en cinco plantas, 20 vainas y diez granos, según requerimiento del descriptor. Las plantas se emplearon para la caracterización morfológica y molecular.

#### **b. Nódulos simbióticos de rizobios de pallar**

Los nódulos simbióticos de rizobios, fueron colectados de plantas de pallar que se encontraban en etapa de floración, de cuatro provincias, seis distritos y nueve localidades: Chincha (El Carmen – Blas Herrera y Grocio Prado – Buena Vista), Pisco (Independencia – Santa Beatriz y Cabeza de toro), Ica (Subtanjalla y Ocucaje), Nazca (Changuillo – San Juan, San Javier y Cabildo), (Tabla 3).

Se obtuvieron 94 nódulos simbióticos de rizobios, de plantas de pallar que se encontraban en estado fenológico de floración en cada campo visitado, procedentes de 18 puntos georeferenciados de nueve localidades de cuatro provincias de la región Ica. En total se formaron 18 muestras conteniendo diferente número de nódulos cada una, de acuerdo con el número de nódulos extraídos de cada planta, tratando de causar el menor daño posible, las cuales

fueron llevadas al laboratorio para las evaluaciones respectivas (Tabla 3).

**Tabla 2. Puntos geo referenciados de procedencia de 30 genotipos de pallar**

Código	Procedencia				Geo referencia		Altitud (msnm)
	Región	Provincia	Distrito	Localidad	Coordenadas geográficas Latitud S	Longitud O	
LEM -1	Ica	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168947	19
LEM-2	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-4.34933702	-75.703911	288
LEM-3	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-4.34759602	-75.694792	328
LEM-4	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-4.34759602	-75.694792	328
LEM-5	Ica	Ica	Ocucaje	Callango	-4.47194381	-75.64840049	280
LEM-6	Ica	Chincha	Grocio Prado	Buena Vista	-13.24440898	-76.16643098	306
LEM-7	Ica	Ica	Ocucaje	Callango	-14.47194381	-75.64840049	280
LEM-8	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	318
LEM-9	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	318
LEM-10	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	318
LEM-11	Ica	Ica	Salas	Guadalupe	-13.97992952	-75.77278850	432
LEM-12	Ica	Ica	Salas	Guadalupe	-13.97992952	-75.77278850	432
LEM-13	Ica	Ica	Salas	Los Pobres	-13.99502825	-75.77089089	427
LEM-14	Ica	Ica	Pachacutec	El Palto	-14.18507602	-75.68526736	398
LEM-15	Ica	Ica	Subtanjalla	Arrabales	-14.02857802	-75.745744	428
LEM-16	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134	225
LEM-17	Ica	Ica	Pachacutec	El Palto	-14.18507602	-75.68526736	398
LEM-18	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039	216
LEM-19	Ica	Nasca	Changuillo	Cabildo	-14.67353303	-75.290936	197
LEM-20	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101
LEM-21	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101
LEM-22	Ica	Nasca	Changuillo	Cabildo	-14.67353303	-75.290936	197
LEM-23	Ica	Pisco	Independencia	Cabeza de Toro	-13.69454099	-76.011322	254
LEM-24	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101
LEM-25	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101
LEM-26	Ica	Ica	Subtanjalla	Arrabales	-14.02857802	-75.745744	428
LEM-27	Ica	Nasca	El Ingenio	San Francisco	-14.67879167	-75.1342528	339
LEM-28	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101
LEM-29	Ica	Pisco	Independencia	Santa Beatriz	-13.70147198	-76.00093	274
LEM-30	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134	225

**Tabla 3. Codificación de muestras, procedencia y número de nódulos extraídos por planta en cuatro provincias de la región Ica**

Código de muestra	Procedencia			Número de nódulos/planta
	Provincia	Distrito	Localidad	
01	Nasca	Changuillo	San Juan	3
02	Nasca	Changuillo	San Juan	5
03	Nasca	Changuillo	San Juan	2
04	Nasca	Changuillo	Cabildo	7
05	Nasca	Changuillo	Cabildo	6
06	Nasca	Changuillo	San Juan	5
07	Nasca	Changuillo	San Juan	2
08	Nasca	Changuillo	San Javier	4
09	Nasca	Changuillo	San Javier	1
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	5
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	4
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	12
13	Pisco	Independencia	Santa Beatriz	9
14	Pisco	Independencia	Cabeza de toro	11
15	Ica	Subtanjalla	Arrabales	2
16	Ica	Subtanjalla	Arrabales	7
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	4
18	Chincha	Grocio Prado	Buena Vista	5
<b>TOTAL</b>				<b>94</b>

### 3.2.2 Materiales, medios y equipos

#### a. Para el aislamiento de cepas de rizobios

Los materiales utilizados en el laboratorio para el aislamiento de cepas de rizobios fueron:

- Placas Petri
- Viales
- Baguetas
- Pipetas
- Matraz de Erlenmeyer

- Probetas graduadas
- Micro pipetas
- Mechero
- Pinzas
- Papel filtro

Los medios, reactivos y soluciones utilizados para el aislamiento de cepas de rizobios fueron:

- Medio agar levadura manitol LMA
- Medio agar papa dextrosa PDA
- Medio agar nutritivo AN
- Rojo de Congo RC
- Azul de bromotimol ABT
- Etanol al 70 por ciento
- Hipoclorito de sodio al 3 por ciento
- Agua destilada estéril
- Glicerol al 40 por ciento

Los equipos utilizados para el aislamiento de cepas de rizobios fueron:

- Potenciómetro digital con electrodo de vidrio
- Autoclave
- Agitador
- Balanza analítica
- Incubadora
- Refrigeradora
- Criocongeladora
- Cámara de flujo laminar

**b. Para la caracterización molecular**

**b.1 Materiales para la extracción del ADN**

**Reactivos químicos**

- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Alcohol isoamílico
- Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (Ctab)
- $\beta$  Mercaptoetanol
- Cloroformo
- Cloruro de sodio
- EDTA (ácido etilendiamino tetraacético)
- Etanol absoluto
- Isopropanol
- Nitrógeno líquido
- ARNasa A
- PVP (Polivinilpirrolidona)
- Tris (tris(hidroximetil)aminometano)

**Material de laboratorio**

- Agitadores magnéticos
- Espátulas, pinzas y tijeras
- Contenedor de nitrógeno líquido
- Guantes de vinilo
- Magnetos
- Matraces de Erlenmeyer
- Morteros de porcelana con pistilos
- Pipetores o pipetas
- Puntas plásticas de 10, 200 y 1000  $\mu$ l
- Probetas 10, 100, 1000 ml.
- Racks de polipropileno



- Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml (tipo Eppendorf)
- Vasos de precipitados

### **Equipos**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Bomba de vacío
- Cámara de baño María
- Congelador a -20 °C
- Estufa
- Horno microondas
- Potenciómetro
- Refrigeradora
- Agitador vórtex

## **b.2. Materiales para la electroforesis**

### **Reactivos químicos**

- Ácido acético glacial
- Acrilamida
- Agarosa
- Agua destilada
- Azul de bromofenol
- Bind silano adherente, silane A 174
- Bromuro de etidio
- Bisacrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida)
- Formaldehido
- Formamida
- Hidróxido de sodio
- Marcador de peso fago  $\lambda$  digerido con enzima Pst I
- Nitrato de plata
- Orange G(\*\*)

## **Materiales de laboratorio**

- Tubos Eppendorf
- Pipetas
- Placas de 96 pocillos, capacidad de 200  $\mu$ l
- Racks de polipropileno (soporte de tubos Eppendorf)
- Termómetros
- Vasos precipitados

## **Equipos**

- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de electroforesis vertical
- Transiluminador UV ULTRA LUM
- Escáner
- Fuente de poder
- Horno microondas
- Shaker
- Bomba de vacío

### **b.3 Materiales para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

#### **Reactivos**

- Adaptadores ECO DS y MseI DS
- Agua Milli-Q® (agua ultra pura)
- Alcohol 96 por ciento
- Alcohol absoluto
- BSA 10X
- Buffer 10X
- Buffer 10X Ligasa
- Cloruro de magnesio  $MgCl_2$
- Desoxinucleotidos (dATP, dCTP, dGTP, Dttp)
- Enzimas de restricción: ECORI y MseI

- Enzima T4 ADN ligasa
- Enzima Taq - DNA polimerasa
- Iniciadores para ECO RI y Mse I

### **Materiales de laboratorio**

- Micropipetas regulables de 0.5-10 $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l
- Placas de policarbonato PCR 96 pocillos
- Puntas para micropipetas
- Tapas de placas PCR de 96 pocillos
- Tubos strips 0.2ml para PCR

### **Equipos**

- Microcentrífuga para tubos de 1.7 ml
- Termociclador

## **3.3 MÉTODOS**

### **3.3.1 Caracterización morfológica del pallar**

La caracterización morfológica de la diversidad genética de pallar colectado, se basó en nueve descriptores cuantitativos y siete cualitativos previamente seleccionados (IPGRI, 2001), que se describen a continuación:

#### **a. Descriptores cualitativos y cuantitativos**

- Patrón de crecimiento (PC). - plantas de crecimiento determinado (1), arbustivas, con inflorescencia en el ápice del tallo principal, e indeterminado (2), con emisión de guías e inflorescencia escalonada. Se evaluó durante la floración.
- Color de las alas de la flor (CA). - alas de color blanco (1) y alas de color violeta claro o lila (6). Se evaluó en diez flores al azar.

- Curvatura de la vaina (CV). - obtenido de evaluar 20 vainas maduras. Vainas rectas (0), vainas ligeramente curvas (3), vainas curvas (5).
- Forma del ápice de la vaina (FAV). - Promedio de evaluar 20 vainas maduras. Ápice corto (1), ápice medio (2), ápice largo (3) y ápice grueso (4).
- Forma de la semilla (FS). - Obtenido de evaluar diez semillas maduras. Según el patrón de las formas de la semilla, se encontró semillas de clave 6, 7, 9, 10, 11 y 12, con predominancia de las formas elípticas y arriñonadas (10, 11 y 12).
- Color del fondo de la semilla (CFS). - Obtenido de evaluar diez semillas maduras. Semillas de fondo verde (1), fondo blanco (2), fondo cenizo (3) y fondo rosado (8).
- Patrón del tegumento de la semilla (PTS). - Obtenido de evaluar diez semillas maduras. Ausencia de mácula en el hilium (0), patrón sólo alrededor del hilium (1), semilla con manchas en menos del 50 por ciento (4), semilla con manchas dispersas (11) y semilla intensamente manchada, casi no se distingue el fondo (13).
- Días a la floración (DF). - Días transcurridos desde la emergencia hasta que el 50 por ciento de plantas estén en floración.
- Días a la madurez de la vaina (DMV). - Días transcurridos desde la emergencia hasta que el 50 por ciento de plantas presenten vainas maduras.
- Largo de vaina (LV). - Promedio en centímetros de 20 vainas maduras medidas desde la base de la vaina, hasta el ápice.
- Ancho de vaina (AV). - Promedio en centímetros de 20 vainas maduras medidas en la parte media de cada vaina.
- Largo de grano (LG). - Promedio en centímetros de 10 granos secos medidos al azar.
- Ancho de grano (AG). - Promedio en centímetros de 10 granos secos medidos al azar en la parte media del grano, con un calibrador o vernier.
- Espesor de grano (EG). - Promedio en centímetros de 10 granos secos medidos al azar con un calibrador o vernier.
- Número de granos por vaina (NGV). - Promedio del número de granos de 20 vainas maduras al azar.
- Peso de 100 semillas (P100S). - Peso de 100 semillas en gramos, con un porcentaje de humedad del 12 – 14 por ciento.

## **b. Análisis de datos**

El análisis de componentes principales se realizó mediante el software MINITAB 18, ambiente para computo estadístico R (Versión 3.2.2) y el análisis de conglomerados mediante el software NTSYS 2.1 (Rohlf 2000), aplicando la distancia euclidiana, método UPGMA y WARN. Para medir el grado de relación de las variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (Milton 2007).

### **3.3.2 Caracterización molecular**

#### **a. Extracción de ADN**

El ADN genómico total fue extraído de hojas jóvenes frescas (trifoliadas), según la metodología de Doyle & Doyle (1990), que consiste en mezclar dichas hojas previamente trituradas con nitrógeno líquido, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 0.7 ml de CTAB (Anexo 3), con  $\beta$ -mercaptol e incubados a 65 °C durante 45 minutos. Después de la incubación se añadió 0.7 ml de cloroformo: alcohol isoamílico y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante y se añadió 0,065 ml de CTAB y cloroformo y se volvió a centrifugar. Después se volvió a transferir el sobrenadante y se precipitó con 2-propanol.

Por último, se lavó el ADN con etanol al 70 por ciento y al 90 por ciento, se diluyó en T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> (Anexo 3) y se almacenó a -20 °C.

#### **b. Determinación de la calidad y concentración de ADN**

La determinación de la calidad y concentración del ADN en las muestras extraídas se realizó en gel de agarosa al 1 por ciento. Para ello se realizó previamente una dilución 1:10 de 1  $\mu$ l de ADN extraído con 9  $\mu$ l de tampón de carga (SALB 1X) (Anexo 4). La estimación de la concentración se realizó mediante la comparación de la intensidad de banda de ADN con la primera banda del fago  $\lambda$  digerida con la enzima de restricción Pst I (280 ng/ $\mu$ l equivalente a 14800 pb). La visualización de dichas bandas se hizo con bromuro de etidio (10 mg/ml), bajo la exposición de rayos UV.

### **c. Obtención de marcadores AFLP**

La técnica usada en la detección de marcadores moleculares es la de AFLP (polimorfismo longitudinal de fragmentos amplificados), que consta de cuatro pasos según el procedimiento desarrollado por Vos *et al.* (1995): digestión, ligación, preamplificación y amplificación selectiva; con el empleo de seis combinaciones de cebadores.

#### **c.1 Digestión**

En esta primera etapa, la digestión se efectuó con 50 ng de ADN genómico, con enzimas de restricción Eco RI y Mse I (Anexo 5), haciendo un volumen total de 10 µl por muestra. Cada pocillo se homogenizó y centrifugó y posteriormente se incubó a 37 °C durante 24 horas (Vos *et al.* 1995).

#### **c.2 Ligación de adaptadores**

En esta segunda etapa, la ligación se efectuó con el ADN digerido de la etapa anterior, al cual se le agregó la mezcla de reacción de ligación (Anexo 5); luego de homogenizar y mezclar se incubó a temperatura ambiente por un lapso de 24 horas. Una vez digerido y ligado el ADN, se realizó la dilución 1:4 con tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>, el cual sirvió para realizar la amplificación pre-selectiva (Vos *et al.* 1995).

#### **c.3 Pre-amplificación selectiva**

En esta tercera etapa, el proceso consistió en la pre-amplificación selectiva del ADN-digerido-ligado-diluido, para lo cual se realizó una PCR con los iniciadores complementarios al sitio de corte de Eco RI y Mse I y a la secuencia del adaptador. Para este paso se tomó 5µl del ADN-digerido-ligado-diluido y se homogenizó con 20 µl de máster mix pre-selectivo (Anexo 5). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, con un programa de amplificación de 22 ciclos y que consistió de 94 °C por 30 s., 56 °C por 60 s. y 72 °C por 60 s. (Vos *et al.* 1995). Concluida esta etapa se realizó nuevamente una dilución de 1:4 con agua Milli-Q® tipo I, la cual sirvió para realizar la amplificación selectiva (Vos *et al.* 1995).

#### **c.4 Amplificación selectiva**

En esta cuarta etapa, el proceso consistió en la amplificación selectiva de un número limitado de fragmentos de restricción, el cual se logró con el uso de la combinación de iniciadores que llevan tres nucleótidos selectivos adicionales. Para esto, se tomó 2µl de ADN pre selectivo-diluido y se homogenizó con 8µl de máster mix selectivo (Anexo 5).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador, con un programa de amplificación de 1 ciclo de 94 °C por 20 s., 65 °C por 30 s. y 72 °C por 2 minutos; 10 ciclos de 94 °C por 20 s., 56 °C por 30 s. y 72 °C por 2 minutos; 20 ciclos de 60 °C por 30 minutos y 4 °C de almacenamiento constante (Vos *et al.* 1995).

#### **d. Selección previa de iniciadores AFLP**

Usando ADN de ocho muestras del pallar diferentes morfológicamente, se hizo una selección previa de iniciadores AFLP, con el fin de escoger las combinaciones más polimórficas y que brindaran bandas de mayor calidad. Para escoger los iniciadores finales se tomó en cuenta tanto el número de bandas polimórficas obtenidas por combinación de iniciadores, como la nitidez y definición de las bandas.

Finalizada la amplificación selectiva se procedió a añadir 5 µl de DYE 1X, lo cual permitió observar la corrida de las muestras a través del gel y la visualización de las mismas.

#### **e. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

##### **e.1 Preparación de geles**

Se preparó geles de poliacrilamida al 6 por ciento (Anexo 6) usando vidrios de 41 x 60 cm de 4 mm de espesor, uno con muesca y el otro sin muesca. Ambos vidrios fueron limpiados y pulidos con etanol 96 por ciento con papel toalla. Posteriormente se procedió a tratar los vidrios. El vidrio con muesca se trató con repelente de lluvia usado para evitar la retención de las gotas de agua en el parabrisas de los automóviles (“Rain Repell”); mientras que el vidrio sin muesca fue tratado con una solución adherente (15 µl de Bind silane, 15 µl de ácido acético y 1.5 ml de etanol absoluto). Luego de los respectivos tratamientos se procedió a pulir y dejar secar los vidrios por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se procedió a colocar

los separadores en medio de los dos vidrios en paralelo, los cuales se aseguraron con abrazaderas de metal. Luego se preparó el gel: 70 ml de acrilamida, 45 µl. de TEMED y 450 µl de APS (1 g de persulfato de amonio/10 ml. de agua Milli-Q® tipo I); después verter el gel en los vidrios y se dejó polimerizar por 30 minutos (Anexo 6).

## **e.2 Electroforesis del producto amplificado**

Se preparó la cámara electroforética colocando verticalmente los vidrios con gel de acrilamida, luego se procedió a añadir buffer TBE 0.5X en la parte superior de la cámara (cátodo) y TBE 1X en la parte inferior de la cámara (ánodo), y se conectó a la fuente de poder por 15 minutos a 1600 voltios, iniciándose así la pre-corrída. Concluido ese tiempo se eliminó el buffer 0.5X de los pocillos, con ayuda de una jeringa. Una vez limpios los pocillos se cargaron 5 µl de ADN de la amplificación selectiva en cada uno, y luego se conectó la cámara a la fuente de poder, iniciando así la migración a través del gel. El voltaje varió según la migración (300 V o 1400 V) y el tiempo (4 h o 17 h), y la migración varió según la combinación de cebadores.

## **e.3 Tinción y revelado de los geles**

La visualización de los fragmentos de ADN amplificados, se realizó a través de la tinción y revelado de los geles de poliacrilamida en nitrato de plata. La fijación, tinción, revelado y secado del gel, se efectuaron según el procedimiento descrito en los protocolos de laboratorio del CIMMYT (Anexo 7).

### **3.3.3 Caracterización morfológica de cepas de nódulos simbióticos de pallar**

#### **a. Colección de nódulos simbióticos de rizobios de plantas de pallar**

La región o departamento de Ica, es la zona productora de pallar de grano grande, del cultigrupo Big Lima (Baudett 1977), destacando las provincias de Ica y Nasca por la mayor área dedicada a esta leguminosa. Para poder realizar la colecta o extracción de nódulos simbióticos de rizobios se contó con la autorización y colaboración de los agricultores propietarios de los campos visitados y de un profesional de la Oficina de Promoción Agraria de la Dirección Regional Agraria de Ica. Se seleccionaron campos de pallar en floración para



iniciar la gestión de poder ingresar. Luego del recorrido realizado, finalmente se ubicaron 18 puntos georeferenciados distribuidos en nueve localidades de seis distritos de cuatro provincias del departamento de Ica (Tabla 3).

La extracción de nódulos se realizó utilizando la técnica de muestreo con la menor perturbación tanto del suelo como de la planta, procediendo a retirar suelo de la rizosfera con sumo cuidado con una pequeña lampa, hasta ubicar los nódulos adheridos a las raíces secundarias, de los cuales se tomaron de un número variable de nódulos (de uno a doce), que se limpiaron convenientemente con un pincel suave para eliminar el suelo adherido, se realizó un ligero enjuague con agua mineral cuando fue necesario; se desechó todo resto de raíces y se envolvió en papel secante para ser colocados en bolsas de papel de primer uso, debidamente identificadas, para facilitar el proceso de deshidratación. En total se colectaron 94 nódulos (Tabla 3).

#### **b. Recepción de las muestras de nódulos en laboratorio**

Las muestras fueron recibidas y codificadas en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria de La Molina para los análisis respectivos (Zúñiga 2012; CIAT 1988).

#### **c. Tratamiento y desinfección de nódulos**

- Se realizó la desinfección de los ambientes de trabajo, así como la cámara de flujo, mediante exposición a rayos UV por 15 minutos y 15 minutos de fase oscura.
- Se seleccionaron de uno a tres nódulos de cada una de las 18 muestras.
- Se obtuvo el peso seco de los nódulos utilizando una balanza analítica.
- Cada nódulo se colocó en viales estériles previamente codificados y se hidrataron en agua destilada estéril durante 30 minutos.
- Luego de hidratados, se procedió a medir los nódulos y se les colocó en sobres de papel filtro previamente codificados.

- Los nódulos se desinfectaron con alcohol al 70 por ciento por espacio de 1 minuto en recipientes estériles. Se desechó el alcohol utilizado.
- Los nódulos se trasladaron a otro recipiente con lejía (hipoclorito de sodio) al 3 por ciento durante tres minutos. Se desechó la lejía utilizada.
- Se realizaron seis enjuagues con agua destilada estéril o hasta que no se perciba el olor a lejía.
- Los nódulos esterilizados se colocaron en placas Petri en medio agar nutritivo y medio agar papa dextrosa con ayuda de una pinza estéril para verificar la adecuada desinfección.
- Las placas fueron llevadas a incubar a 28 °C.

**d. Aislamiento de cepas de rizobios a partir de nódulos**

- Esta fase se inició abriendo los sobres con los nódulos desinfectados con ayuda de pinzas estériles y mecheros.
- Los nódulos se colocaron en viales estériles y se agregó una a dos gotas de agua destilada a cada nódulo.
- Con una bagueta estéril se procedió a triturar los nódulos hasta obtener un macerado adecuado.
- El macerado se sembró en placas Petri en medio agar levadura manitol con rojo Congo (LMA-RC), mediante estría y agotamiento, y se llevó a incubar a 28 °C durante 24, 48, 72 horas, hasta 14 días según el crecimiento de las bacterias simbióticas.
- Se tomó nota del tiempo de crecimiento desde las 24 horas, hasta los 14 días, lo que permitió señalar posibles cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, o algún otro no identificado, según sus características.
- Se realizó el sembrado y purificación de las posibles cepas de *Rhizobium* en medio agar levadura manitol con rojo de Congo y de las posibles cepas de *Bradyrhizobium* en medio agar levadura manitol con azul de bromotimol.
- Este procedimiento se realizó de dos a tres veces para obtener cepas puras y de crecimiento homogéneo (Zúñiga 2012).

- Las cepas purificadas pasaron a ser conservadas por duplicado en tubos eppendorf con glicerol al 40 por ciento.
- Cuando las colonias eran grandes, se procedió a tomar una porción para su conservación, y cuando las colonias eran pequeñas, se tomó tres a cuatro porciones, para su conservación respectiva.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PALLAR

#### 4.1.1 Promedios de las variables

A continuación, en la Tabla 4, se presentan los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación hallados a las variables cuantitativas de la caracterización morfológica de los genotipos de pallar en estudio.

En los días a la floración (DF), los genotipos de patrón de crecimiento determinado iniciaron su floración entre los 50 y 54 días después de la emergencia y los de patrón de crecimiento indeterminado lo hicieron entre los 66 y 80 días después de la emergencia, siendo descriptores fácilmente distinguibles, altamente heredables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente (Hernández-Villaruel 2013; Franco e Hidalgo 2003).

En las dimensiones de la vaina, tanto en el largo (LV) como en el ancho (AV), los datos son muy variables y no responden a determinado patrón de crecimiento ni ciclo vegetativo, encontrando que el genotipo LEM-24 presentó las vainas más pequeñas con 6.38 cm de largo y LEM-29 presentó las vainas más largas con 14.21 cm de largo. El genotipo LEM-28 presentó las vainas más angostas con 1.62 cm de ancho y LEM-1 obtuvo las vainas más anchas con 2.57 cm en promedio (Tabla 4).

Las dimensiones del grano, largo (LG), ancho (AG) y espesor (EG), presentaron valores muy variables, destacando el genotipo LEM-4 con 2.93 cm de largo de grano, LEM-1 con el mayor ancho del grano con 2.0 cm en promedio y los genotipos LEM-6, LEM-7 y LEM-17 presentaron los granos con mayor grosor o espesor, con 0.70 cm en promedio cada uno.

El número de granos por vaina (NGV), presentó una interesante variabilidad, desde 2.0 granos por vaina para los genotipos LEM-13 y LEM-24, cada uno, hasta 3.7 y 3.8 granos por vaina en promedio para LEM-1 y LEM-7, respectivamente, lo que indica que la mayoría de vainas de estos genotipos, presentaron cuatro granos por vaina en promedio (Tabla 4).

**Tabla 4. Promedios, desviación standard y coeficiente de variación de las variables cuantitativas de la caracterización morfológica de 30 genotipos de *Phaseolus lunatus*.**

Código	Altitud	DF	LV	AV	LG	AG	EG	NGV	P100S	DMV
LEM -1	18.988	72	12.77	2.57	2.37	2.00	0.67	3.7	234.44	182
LEM-2	287.554	70	12.13	2.25	2.68	1.73	0.66	2.2	244.12	180
LEM-3	328.232	72	11.83	2.05	2.55	1.68	0.69	2.5	240.72	185
LEM-4	328.232	80	11.83	2.37	2.93	1.77	0.65	2.4	247.90	195
LEM-5	280.037	80	11.95	2.32	2.74	1.73	0.64	2.5	250.80	192
LEM-6	305.674	80	11.46	2.41	2.36	1.84	0.70	3.3	226.96	195
LEM-7	280.037	78	12.75	2.41	2.43	1.92	0.70	3.8	238.32	190
LEM-8	317.813	76	12.53	2.12	2.61	1.67	0.65	2.8	211.28	185
LEM-9	317.813	72	11.65	2.10	2.61	1.58	0.62	2.7	211.28	182
LEM-10	317.813	74	12.18	2.19	2.65	1.59	0.69	2.5	229.28	185
LEM-11	432.015	72	12.04	2.07	2.66	1.64	0.67	2.5	219.80	180
LEM-12	432.015	70	11.70	2.02	2.76	1.68	0.64	2.4	227.52	180
LEM-13	427.003	78	11.65	2.13	2.60	1.53	0.68	2.0	230.65	185
LEM-14	398.001	78	10.95	1.92	2.62	1.51	0.65	2.3	191.20	183
LEM-15	428.202	75	12.64	2.35	2.71	1.72	0.66	2.7	217.43	188
LEM-16	224.740	78	10.94	1.76	2.69	1.48	0.62	2.4	172.24	190
LEM-17	398.001	70	12.82	2.20	2.85	1.69	0.70	2.6	260.76	180
LEM-18	216.185	78	12.24	2.13	2.91	1.73	0.68	2.5	261.72	188
LEM-19	196.729	70	12.66	2.31	2.83	1.71	0.69	2.6	254.16	195
LEM-20	101.087	66	8.83	1.85	2.26	1.42	0.65	3.0	157.32	175
LEM-21	101.087	66	9.64	1.98	2.16	1.43	0.63	2.9	147.52	175
LEM-22	196.729	77	11.27	1.90	2.83	1.63	0.69	3.0	242.72	188
LEM-23	254.146	72	10.88	2.25	2.77	1.64	0.69	2.4	241.28	192
LEM-24	101.087	54	6.38	1.75	2.37	1.31	0.61	2.0	158.08	125
LEM-25	101.087	54	8.17	1.99	2.31	1.39	0.62	2.3	153.84	125
LEM-26	428.202	50	10.90	1.97	2.11	1.53	0.64	3.4	165.16	122
LEM-27	339.025	51	13.67	2.14	2.57	1.60	0.62	3.4	217.48	124
LEM-28	101.087	52	6.88	1.62	1.41	0.99	0.45	2.6	45.24	125
LEM-29	273.819	53	14.21	2.24	2.43	1.60	0.62	3.2	197.60	127
LEM-30	224.740	53	12.34	2.21	2.70	1.74	0.69	2.7	240.64	128
Mínimo	18.988	50	6.38	1.62	1.41	0.99	0.45	2.0	45.24	122
Máximo	432.015	80	14.21	2.57	2.93	2.00	0.70	3.8	261.72	195
Promedio	271.906	69	11.40	2.12	2.55	1.61	0.65	2.7	211.25	172
Des. Est.	117.988	10	1.80	0.22	0.30	0.19	0.05	0.5	46.23	27
C.V.(%)	43.393	15	15.79	10.35	11.95	11.90	7.25	17.0	21.88	15

**DF: días a la floración, LV: largo de vaina, AV: ancho de vaina, LG: largo de grano, AG: ancho de grano, EG: espesor de grano, NGV: número de granos/vaina, P100S: peso de 100 semillas, DMV: días a madurez de vaina**

El peso de 100 semillas (P100S) de los genotipos de patrón de crecimiento indeterminado, alcanzó un valor máximo de 261.72 g en promedio para LEM-18 y un valor mínimo de

147.52 g en promedio para LEM-21; mientras que el genotipo LEM-30 de patrón de crecimiento determinado alcanzó un promedio máximo de 240.64 g en 100 semillas y LEM-28 obtuvo 45.24 g en promedio, por ser del cultigrupo Sieva o pallar “baby” de grano muy pequeño. Los valores hallados, indican la existencia de una importante variabilidad en el tamaño del grano (Tabla 4).

Los genotipos de patrón de crecimiento indeterminado, alcanzaron entre 195 días a la madurez de la vaina (DMV) para LEM-19 y 175 días para LEM-20 y LEM-21; mientras que los de patrón de crecimiento determinado tuvieron desde 122 DMV para LEM-26 hasta 128 DMV para LEM-30, siendo muy escasa la variación dentro de ellos; pero con una mayor variación entre ambos patrones de crecimiento (Tabla 4).

Los coeficientes de variación hallados, se encuentran por encima de 10 por ciento, siendo una importante variabilidad entre las características evaluadas, y, como señala Hernández-Villaruel (2013), la caracterización morfológica es un procedimiento que permite medir y conocer la variabilidad genética del genoma de una población, diferenciar taxonómicamente a las plantas, y seleccionar los descriptores morfológicos más adecuados, confiables y discriminantes para evaluarlas.

#### 4.1.2 Coeficientes de correlación de Pearson de las variables cuantitativas de 30 genotipos de pallar

**Tabla 5. Coeficientes de correlación entre ocho variables cuantitativas de la caracterización morfológica de 30 genotipos de *Phaseolus lunatus*.**

	DF	LV	AV	LG	AG	EG	NGV	P100S
LV	0.334							
AV	0.378 *	0.716 **						
LG	0.557 **	0.608 **	0.440 *					
AG	0.518 **	0.782 **	0.878 **	0.627 **				
EG	0.508 **	0.565 **	0.600 **	0.717 **	0.765 **			
NGV	-0.138	0.355	0.366 *	-0.277	0.390 *	0.098		
P100S	0.555 **	0.760 **	0.725 **	0.874 **	0.863 **	0.850 **	0.018	
DMV	0.960 **	0.356	0.409 *	0.560 **	0.534 **	0.550 **	-0.109	0.575 **

\* Significación al 0.05 de probabilidad, \*\* Significación al 0.01 de probabilidad

Existe alta correlación positiva ( $r > 0.8$ ) entre las variables: días a la madurez de la vaina (DMV) y días a la floración (DF); ancho de grano (AG) y ancho de vaina (AV); el peso de 100 semillas (P100S) presentó alta correlación positiva con las variables largo de grano

(LG), ancho de grano (AG) y espesor del grano (EG) (Tabla 5). También se encontró que el Peso de 100 semillas presentó alta correlación positiva ( $r>0.7$ ) con el largo de vaina (LV) y el ancho de vaina (AV). Esto significa que se podría reducir el número de variables en los análisis de diversidad fenotípica del pallar ya que éstas explican lo mismo (Tabla 5).

#### 4.1.3 Análisis de componentes principales de las variables morfológicas de 30 genotipos de pallar

El análisis de componentes principales muestra que las cinco primeras variables, patrón de crecimiento (36.7 por ciento), color de alas de la flor (22.8 por ciento), curvatura de la vaina (10.9 por ciento), forma del ápice de la vaina (9.4 por ciento) y forma de la semilla (6.6 por ciento), explican el 86.5 por ciento de la variación total (Tabla 6).

**Tabla 6. Valores y porcentajes de la variación de cada componente principal de la matriz de 30 genotipos de *Phaseolus lunatus***

Componente	Valor propio	Porcentaje de varianza	Varianza acumulada (porcentaje)
Patrón de crecimiento	5.87	36.7	36.7
Color de las alas/flor	3.65	22.8	59.5
Curvatura de la vaina	1.75	10.9	70.4
Forma del ápice de la vaina	1.51	9.4	79.8
Forma de la semilla	1.06	6.6	86.5
Color de fondo de la semilla	0.72	4.5	91.0
Patrón del tegumento de la semilla	0.60	3.8	94.7
Días a la floración (50%)	0.00	0.0	100.0
Largo de vainas (cm)	0.22	1.4	98.0
Ancho de vainas (cm)	0.10	0.6	98.6
Largo de granos (cm)	0.09	0.6	99.2
Ancho de granos (cm)	0.05	0.3	99.5
Espesor de granos (cm)	0.04	0.3	99.7
Número de granos por vaina	0.02	0.1	99.9
Peso de 100 granos (g)	0.02	0.1	100.0
Días a la madurez de la vaina	0.01	0.0	100.0

El CP1 con 36.7 por ciento de la variación estuvo definido principalmente por las variables peso de 100 semillas (g), ancho de grano (cm), largo de grano (cm), espesor de grano (cm), días a la madurez de la vaina y días a la floración (50 por ciento); el CP2, aportó con una varianza de 22.8 por ciento, constituido por las variables número de granos por vaina, patrón

del tegumento de la semilla, color de fondo de la semilla, forma de la semilla, forma del ápice de la vaina y ancho de la vaina (cm) (Tabla 7).

**Tabla 7. Variables morfológicas de *Phaseolus lunatus* asociadas con los componentes principales más importantes**

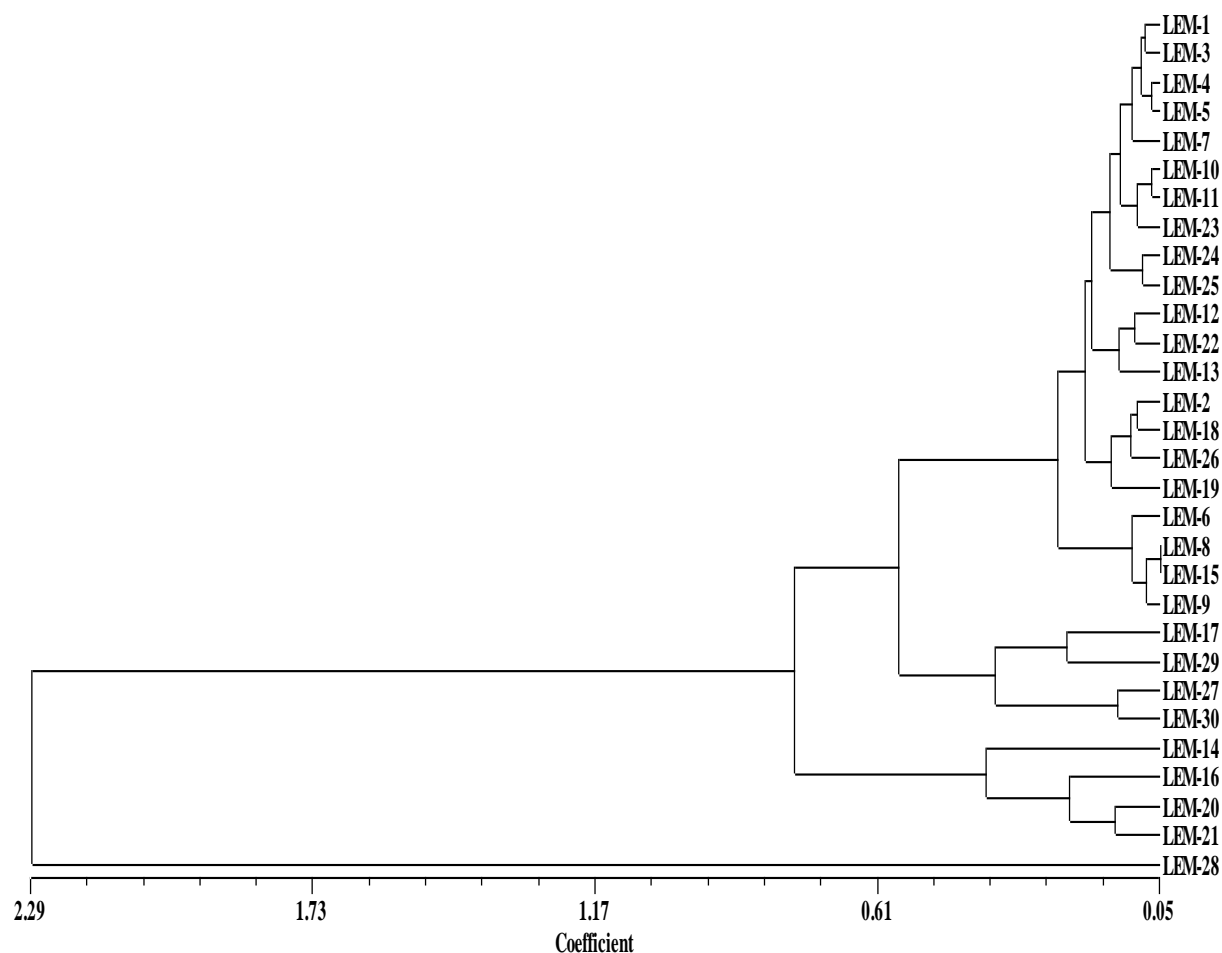
Variabes morfológicas	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
PC	0.221	-0.174	0.439	-0.357	0.116
CA	0.171	-0.109	-0.262	-0.382	0.189
CV	0.009	-0.295	-0.321	0.190	0.475
FAV	-0.025	-0.315	0.060	0.105	-0.689
FS	0.090	-0.338	-0.342	-0.228	-0.201
CFS	0.060	-0.346	0.232	0.506	0.000
PTS	0.075	-0.371	0.145	0.341	0.181
DF	0.324	-0.152	0.358	-0.137	-0.005
LV	0.307	0.157	-0.131	0.190	-0.226
AV	0.294	0.310	-0.037	-0.052	-0.168
LG	0.344	-0.141	-0.277	0.137	-0.083
AG	0.350	0.235	0.014	0.158	-0.042
EG	0.343	0.073	-0.144	0.125	0.242
NGV	0.010	0.392	0.248	0.296	0.123
P100S	0.383	0.059	-0.193	0.086	-0.076
DMV	0.336	-0.133	0.311	-0.208	0.100

El CP3 aportó con una varianza de 10.9 por ciento constituido por las variables patrón de crecimiento, días a la floración (50 por ciento), forma de semilla, curvatura de la vaina, y días a la madurez de la vaina; el CP4 con 9.4 por ciento de la variación, estuvo definido por las variables color de fondo de la semilla, color de las alas/flor, patrón de crecimiento y patrón del tegumento de la semilla y el CP5 con el 6.6 por ciento de la variación, estuvo definido por la forma del ápice de la vaina y curvatura de la vaina (Tabla 7).

#### 4.1.4 Análisis de agrupamiento

En la Figura 1, a un coeficiente de distancia genética de 0.5 se muestran cuatro grupos bien definidos y dentro de ellos, se observan accesiones de distancias taxonómicas muy cercanas, como LEM 8 y LEM 9 que presentan un coeficiente de distancia 0.05, esto indicaría que ambos son muy parecidos y serían el mismo morfotipo; siendo el más distante LEM 28 por ser del cultigrupo Sieva, de grano muy pequeño de color verde.

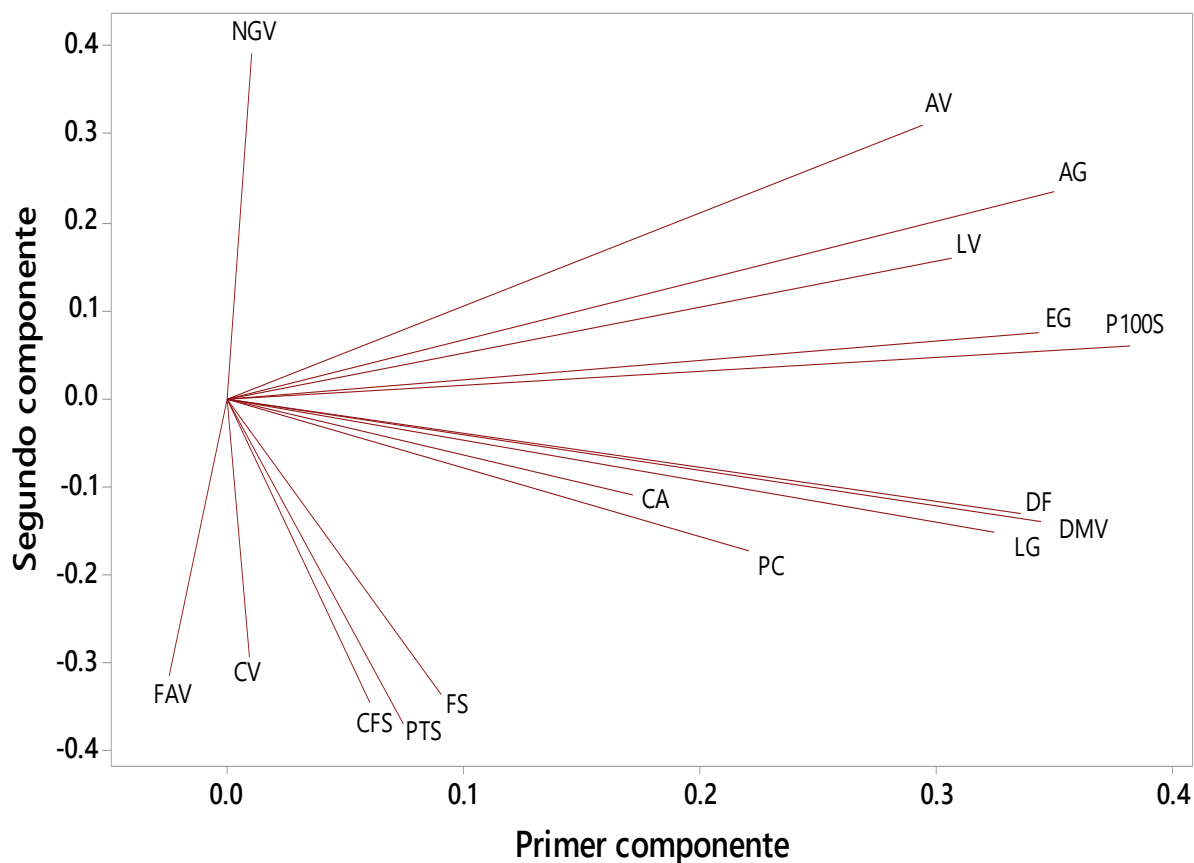




**Figura 1: Dendrograma de 30 genotipos de *Phaseolus lunatus* clasificadas con siete variables morfológicas cualitativas y nueve cuantitativas.**

En la Figura 2, se observa que los vectores: espesor de grano (EG) y peso de 100 granos (P100G) están muy correlacionados por ser muy cercanos; igual ocurre con los vectores días a la madurez de la vaina (DMV), longitud de grano (LG) y días a la floración (DF 50%) que forman un segundo grupo; el tercer grupo lo conforman los vectores patrón de crecimiento (PC) y color de las alas/flor (CA); y un cuarto grupo formado por los vectores color de fondo de la semilla (CFS) y patrón del tegumento de la semilla (PTS).

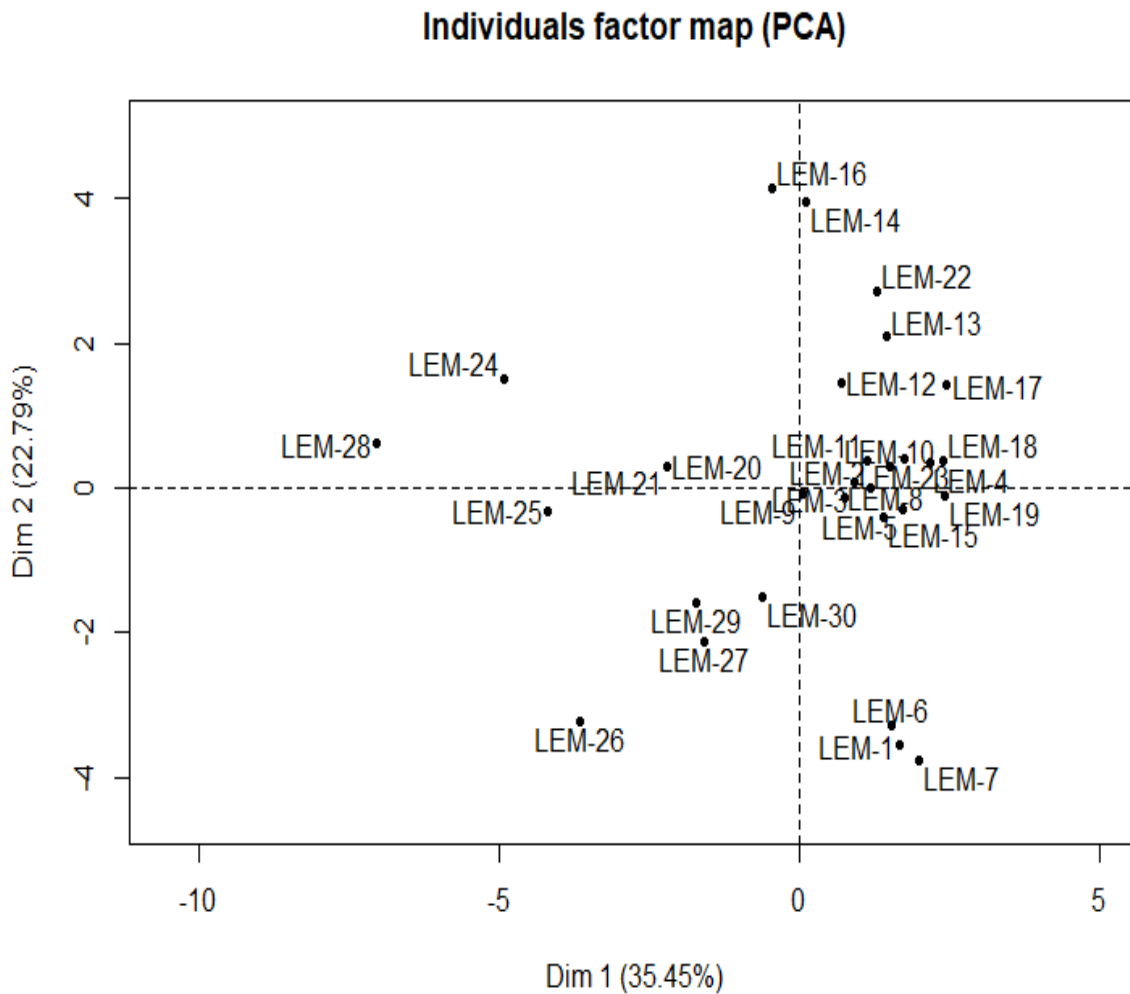
Escriba el texto a



**Figura 2: Comportamiento de los vectores-variables con base en el análisis de componentes principales (CP) de siete variables cualitativas y nueve cuantitativas de *Phaseolus lunatus***

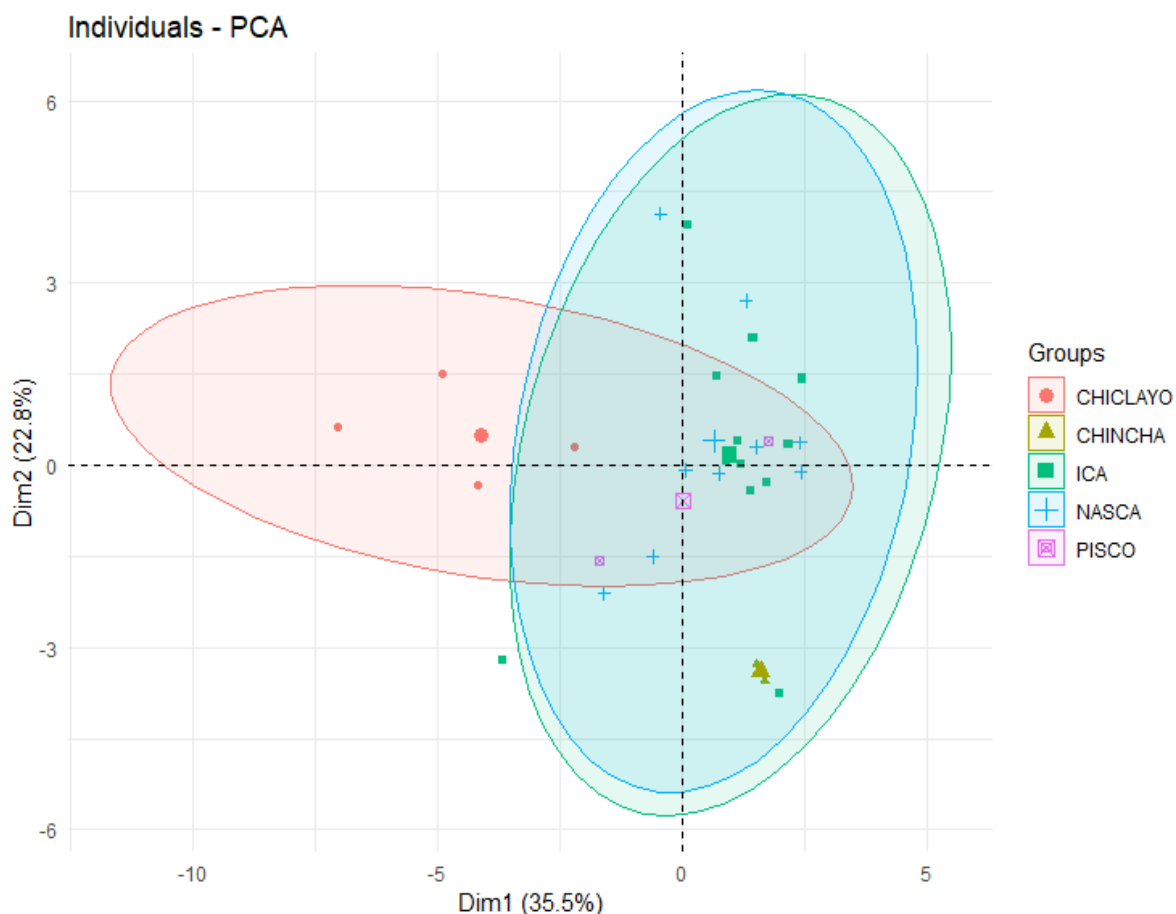
#### 4.1.5 Distribución de los genotipos de pallar

En la figura 3, se observan los genotipos distribuidos según la precocidad, tamaño de granos, etc. Esto ayuda a agrupar el germoplasma por sus rasgos de importancia agronómica para su utilización en los programas de mejoramiento genético del pallar.



**Figura 3: Distribución de los genotipos de pallar según los dos componentes principales (2 CP).**

En la Figura 4, se observa que las entradas procedentes de Chiclayo, se diferencian claramente de las del departamento de Ica. Por otro lado, las accesiones del departamento de Ica no se diferencian según provincia de origen, lo que mostraría que la variabilidad de pallar cultivado en Ica está equitativamente distribuida en sus distintas provincias; es decir, los agricultores utilizan los mismos tipos de semilla, variedades o cultivares por adaptabilidad, por intercambio de semillas, por la uniformidad exigida por el mercado, etc., con algunas excepciones referidas a los pallares de color que son muy escasos.



**Figura 4: Distribución de los genotipos de pallar según el origen (provincia) de dos componentes principales (2 CP)**

## 4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 30 GENOTIPOS DE PALLAR

### 4.2.1 Polimorfismo

En la Tabla 8, se muestra el polimorfismo encontrado con las nueve combinaciones de iniciadores *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) utilizados en el presente trabajo. En total se encontraron 141 *loci* polimórficos, variando de 10 a 30 fragmentos, con un promedio de 15.7. Por otro lado, el contenido de índice de polimorfismo (PIC) varía de 0.18 a 38, con un promedio de 0.28. Estos resultados sugieren que la variabilidad molecular de la población es baja.

El índice de iniciador AFLP varía de 2.03 a 7.68, con un promedio de 4.27. Las mejores combinaciones de los iniciadores son de E58M35, E41M48, E13M50 y E13M48 con valores de 7.68, 5.94, 5.02 y 4.55 respectivamente. Estas combinaciones, si bien su PIC promedio

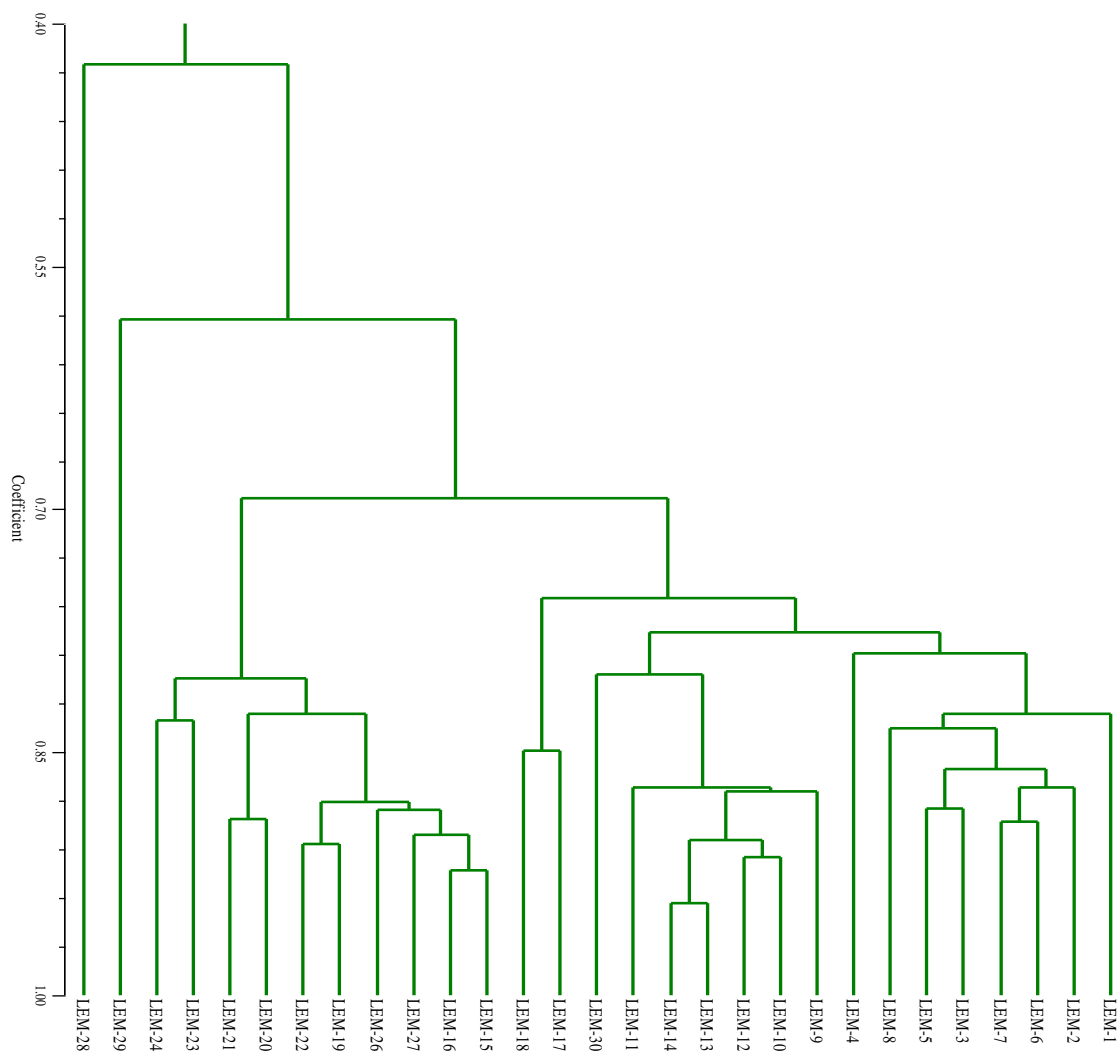
no es elevado, presentan mayor número de *loci* polimórficos, por lo que se sugieren su utilización en estudios de diversidad genética del pallar.

**Tabla 8. Combinación de iniciadores AFLP, PIC y su polimorfismo**

Combinación de iniciadores	PIC promedio	Índice de iniciador	
		AFLP	<i>loci</i> polimórficos
E13M48	0.30	4.55	15
E45M55	0.18	2.03	11
E13M32	0.38	3.01	8
E13M50	0.25	5.02	20
E33M49	0.34	4.05	12
E37M45	0.23	3.24	14
E38M50	0.29	2.93	10
E41M48	0.28	5.94	21
E58M35	0.26	7.68	30
Promedio	0.28	4.27	15.7
Total			141

#### 4.2.2 Análisis de agrupamiento

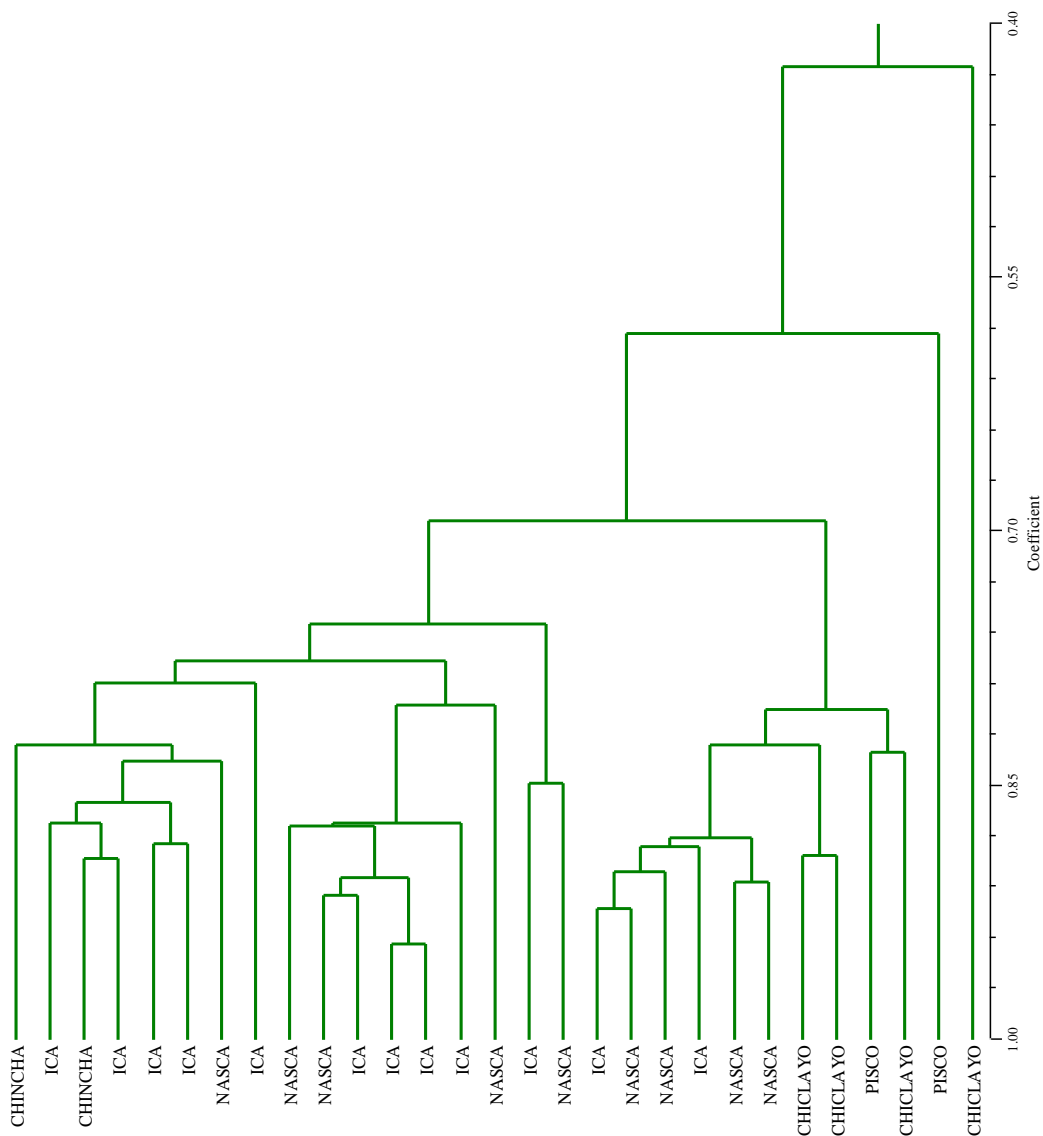
Con las combinaciones de iniciadores AFLP analizadas (Figura 5), se observa que no se han encontrado genotipos duplicados; es decir, todos son distintos. Sin embargo, a un coeficiente de similitud de 0.8, se encuentran cuatro grupos, destacando que la entrada LEM 28 se diferencia del resto. Los tres primeros grupos contienen entradas de las provincias de Ica, Chincha y Nasca. El grupo cuatro incluye entradas de las mismas provincias anteriores e incluyen las cuatro entradas de Chiclayo. Por otro lado, la entrada LEM 29 de Pisco es la más alejada respecto a todas las entradas del departamento de Ica. La entrada LEM 28 procedente de Chiclayo y siendo del cultigrupo Sieva, se muestra más alejada de todas las entradas evaluadas, lo que debe ser analizado en mayor detalle con respecto a su comportamiento agronómico y morfológico.



**Figura 5: Dendrograma UPGMA que agrupa 30 accesiones del pallar con 141 marcadores AFLP, según código de accesión.**

**UPGMA<sup>1</sup> (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages).**

**UPGMA1 (Método de grupo de pares no ponderados utilizando promedios aritméticos).**



**Figura 6: Dendrograma UPGMA que agrupa 30 accesiones del pallar con 141 marcadores AFLP, según provincia de origen.**

En la Figura 6, se puede apreciar que las entradas procedentes de Chiclayo, se diferencian claramente de las del departamento de Ica. Esta misma tendencia se observa con los resultados de análisis molecular con AFLP. Por otro lado, las accesiones del departamento de Ica no se diferencian según provincia de origen, probablemente debido al intercambio continuo de semilla de las variedades o cultivares más adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de las zonas productoras de pallar con fines comerciales; expresados en la preferencia por los cultivares de ciclo corto y mediano (120 a 180 días), de tamaño de grano mediano a grande y forma arriñonada.

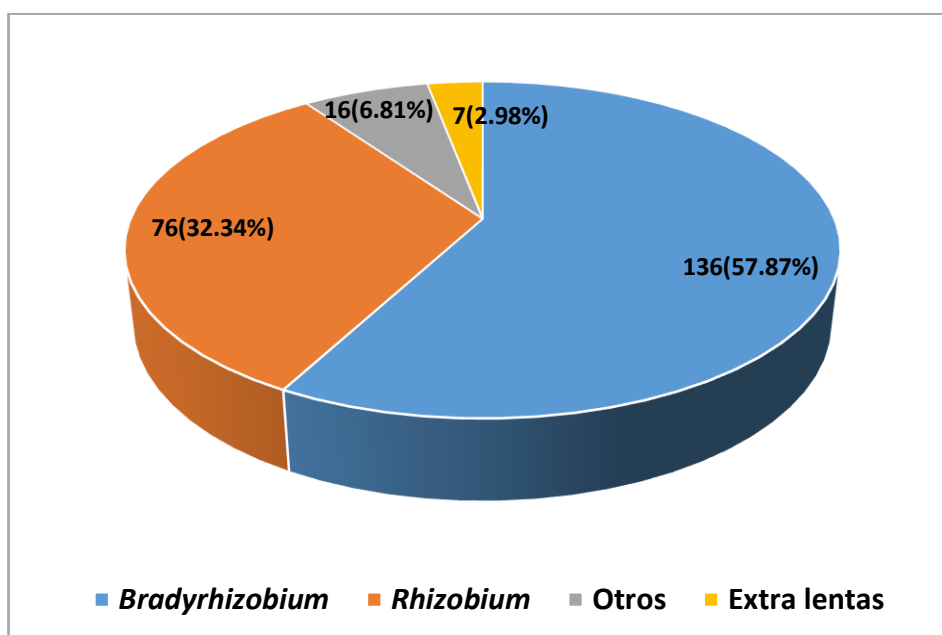
### 4.3 AISLAMIENTO DE CEPAS DE RIZOBIOS DE NÓDULOS SIMBIÓTICOS

**Tabla 9. Número de cepas de rizobios aisladas por género\*, localidad, distrito y provincia de la región Ica.**

Provincia	Distrito	Localidad	Otros	<i>Rhizobium</i>	Por provincia	<i>Bradyrhizobium</i>	Por provincia	Extra lento	TOTAL
Chincha	El Carmen	Blas Herrera	1	6	17	2	18	0	38
	Grocio Prado	Buena Vista	2	11		16		0	
Ica	Ocucaje	El Tambo	1	2	8	41	41	4	55
	Subtanjalla	Arrabales	1	6		0		0	
Nasca	Changuillo	Cabildo	8	16	46	8	40	2	100
	Changuillo	San Javier	2	6		0		0	
	Changuillo	San Juan	1	24		32		1	
Pisco	Independencia	Cabeza de toro	0	3	5	5	37	0	42
	Independencia	Santa Beatriz	0	2		32		0	
<b>Total cepas aisladas</b>			<b>16</b>	<b>76</b>		<b>136</b>		<b>7</b>	<b>235</b>
<b>Porcentaje (%)</b>			<b>6.81</b>	<b>32.34</b>		<b>57.87</b>		<b>2.98</b>	<b>100</b>

(\*) Género probable por tiempo de crecimiento

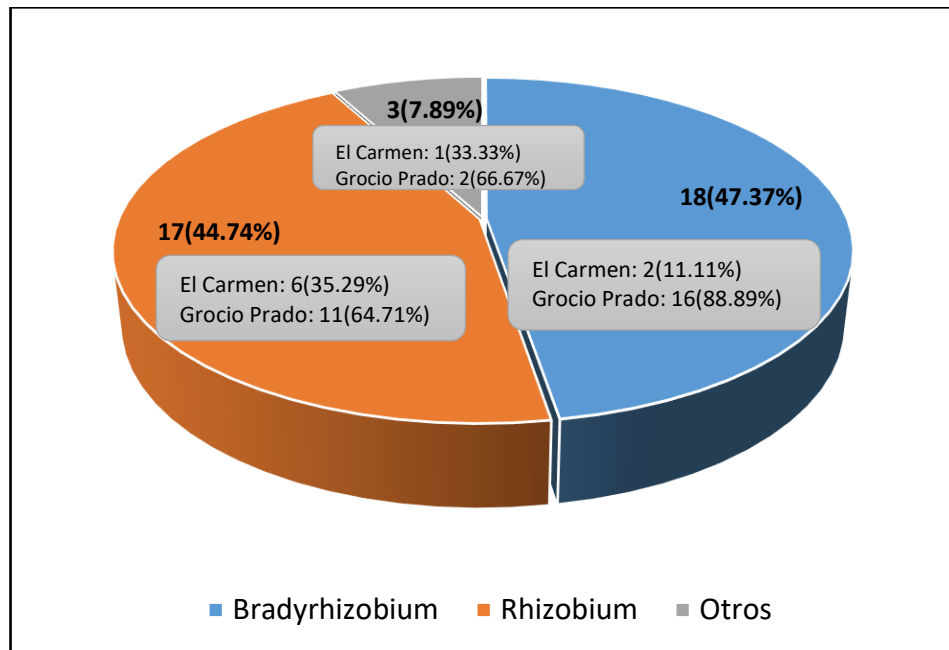
En la Tabla 9, se observa que, en términos generales, de las 235 cepas aisladas, 136 (57.87 por ciento) corresponden probablemente a *Bradyrhizobium* por ser de crecimiento lento, 76 (32.34 por ciento) corresponden probablemente a *Rhizobium* por ser de crecimiento rápido, 16 (6.81 por ciento) corresponden a otros por no haber mostrado indicadores más definidos, y siete cepas (2.98 por ciento) presentaron crecimiento extra lento.



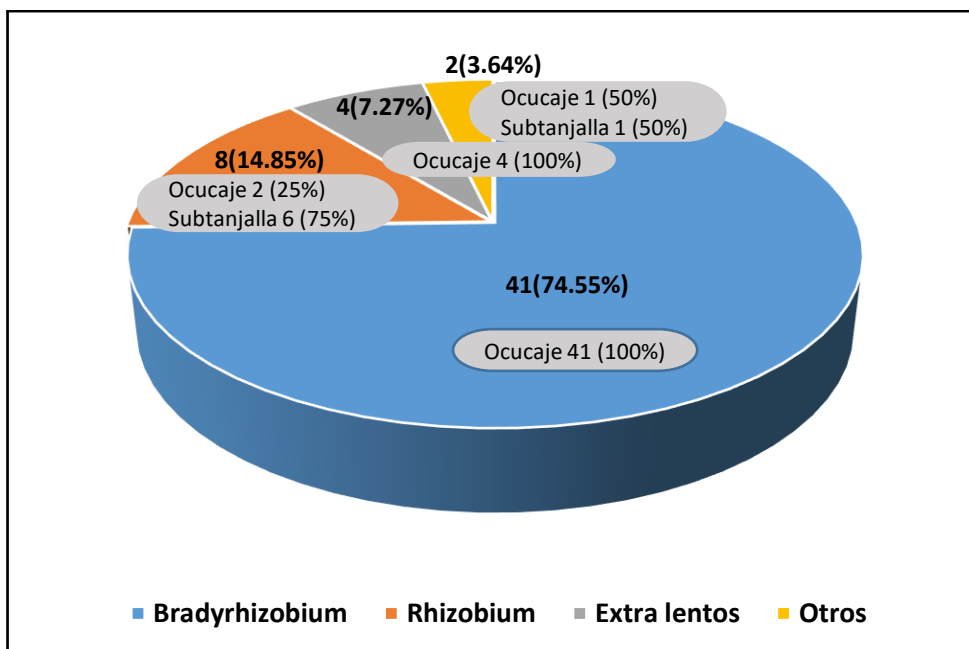
**Figura 7: Número y porcentaje total de cepas aisladas de rizobios por género**



En la Tabla 9, se observa que se han aislado 38 cepas de la provincia de Chincha, de las cuales 17 (44.74 por ciento) son probablemente *Rhizobium* por ser de crecimiento rápido (seis del distrito El Carmen y once de Grocio Prado), 18 (47.37 por ciento) cepas de *Bradyrhizobium* de crecimiento lento (dos de El Carmen y 16 de Grocio Prado) y, 3 (7.89 por ciento) cepas (una de El Carmen y dos de Grocio Prado) denominadas Otros (Figura 8).



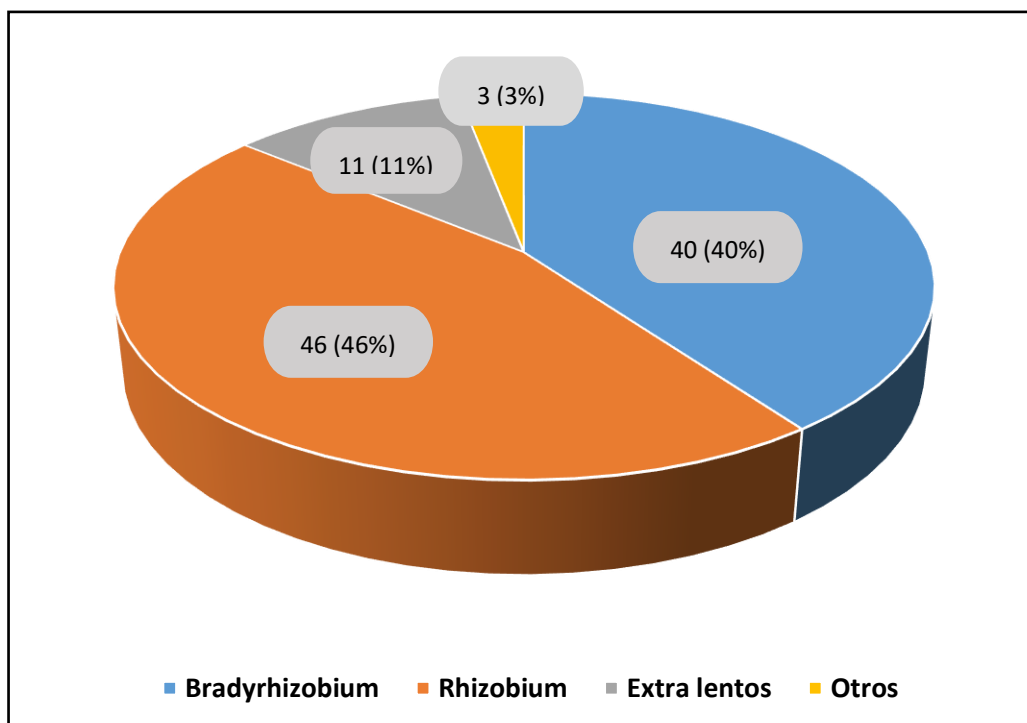
**Figura 8. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género de distritos de la provincia de Chincha**



**Figura 9. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios según género, de distritos de la provincia de Ica**

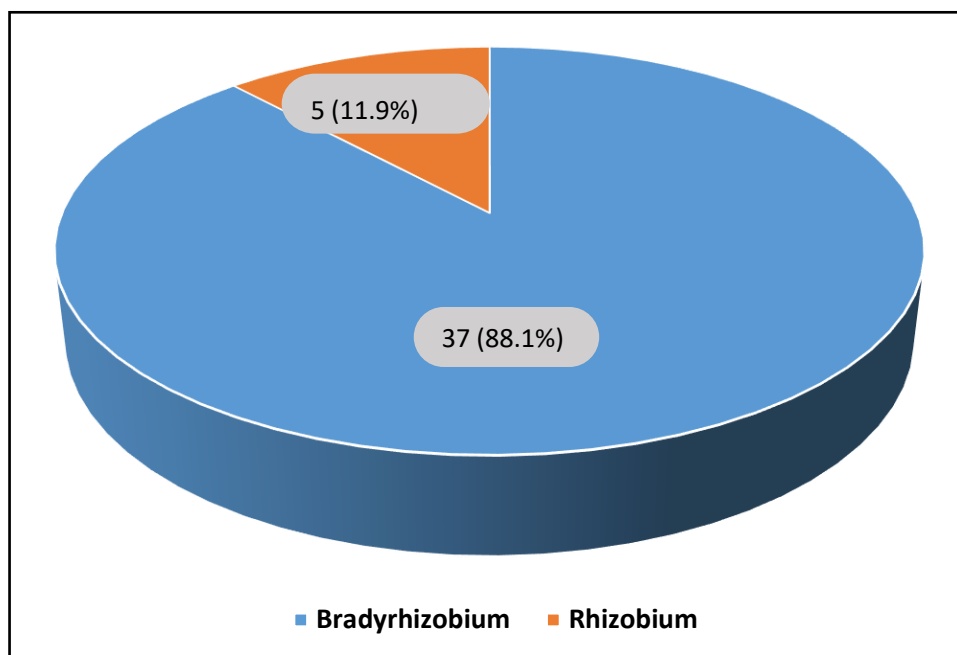
De las 55 cepas provenientes de la provincia de Ica, se han aislado 8 (14.85 por ciento) cepas de *Rhizobium*, con 6 (75 por ciento) cepas provenientes de Subtanjalla y 2 (25 por ciento) de Ocucaje; 41(74.55 por ciento) cepas de *Bradyrhizobium*, siendo las 41 (100 por ciento) procedentes de Ocucaje; 4 (7.27 por ciento) cepas de crecimiento extra lento, no identificadas, procedentes del distrito de Ocucaje, y, 2 (3.64 por ciento) cepas, no identificadas, denominadas “otros”, siendo 1 (50 por ciento) procedente de Ocucaje y 1 (50 por ciento) de Subtanjalla (Tabla 9) y (Figura 9).

Se han aislado 100 cepas provenientes de la provincia de Nasca, distrito de Changuillo, con predominancia de 46 (46 por ciento) cepas de *Rhizobium* en las localidades de Cabildo, San Javier y San Juan; seguidas de 40 (40 por ciento) cepas de *Bradyrhizobium* procedentes de Cabildo y San Juan; también se aislaron 3 (3 por ciento) cepas no identificadas, de crecimiento extra lento una de Cabildo y dos de San Juan, y 11 (11 por ciento) de cepas no identificadas, procedentes de San Javier, que se han denominado “otros” (Tabla 9), (Figura 10).



**Figura 10. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios por género, del distrito de Changuillo, provincia de Nasca**

Se aislaron 42 cepas de la provincia de Pisco, distrito de Independencia, de las cuales 37 cepas son de *Rhizobium* (tres de Cabeza de Toro y 34 de Santa Beatriz) y seis de *Bradyrhizobium* de Cabeza de Toro, ninguna de Santa Beatriz (Tabla 9) y (Figura 10).



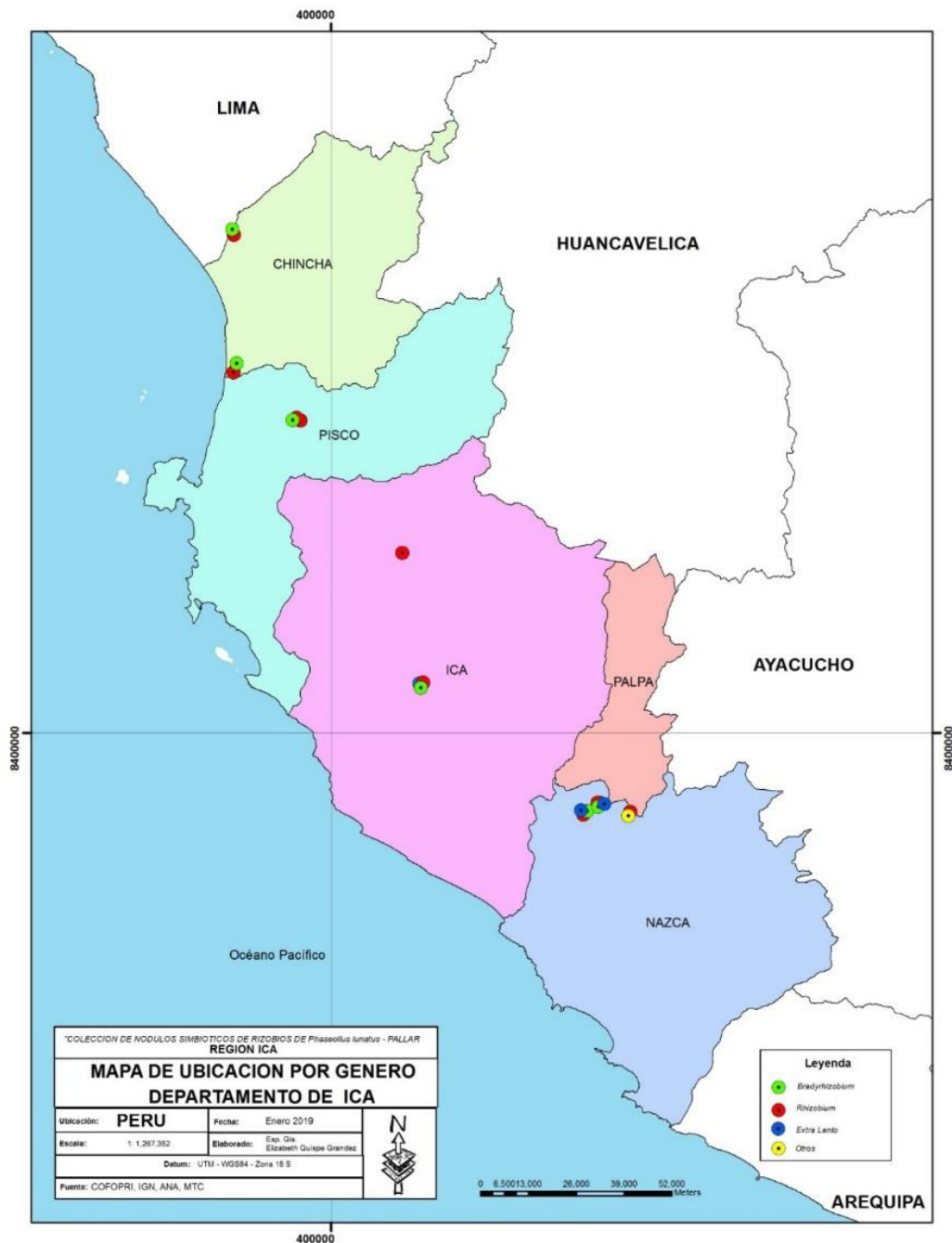
**Figura 11. Número y porcentaje de cepas aisladas de rizobios por género, del distrito de Independencia, provincia de Pisco**

La Figura 12, muestra la ubicación geo referenciada de los lugares de las cuatro provincias de la región Ica, donde se colectaron los nódulos de plantas de pallar en floración, señalando el género más probable, donde se observa que tanto *Rhizobium* como *Bradyrhizobium* son los géneros más frecuentes. Es de particular importancia haber encontrado cepas de crecimiento extra lento, siendo cuatro de Ica (Ocucaje) y tres de Nasca (Changuillo), además de cepas de crecimiento muy rápido (otros), siendo tres de Chincha, dos de Ica y once de Nasca, evidenciando la diversidad de los microorganismos que es necesario evaluar e identificar.

Los resultados encontrados, guardan relación con los estudios realizados por Ormeño *et al.* (2005) quienes evaluaron una colección de 21 aislamientos de *Bradyrhizobium* del pallar en la costa norte y central del Perú, y encontraron que nueve (43 por ciento) fueron de crecimiento lento, y doce (57 por ciento) fueron de crecimiento extra lento.

De igual manera, se menciona la investigación realizada por Matta y Soto (2008), quienes tomaron muestras de nódulos sólo de la provincia de Ica y encontraron que de las 35 cepas de rizobios obtenidas; dos cepas (5.7 por ciento) correspondieron al género *Rhizobium* y 33

cepas (94.3 por ciento) al género *Bradyrhizobium*, coincidiendo con el presente estudio en la preponderancia de *Bradyrhizobium* sobre *Rhizobium*.



**Figura 12. Mapa de ubicación de los rizobios en las cuatro provincias de la región Ica.**

Actualmente se están incrementando y fortaleciendo las actividades tendientes a una mejor protección del medio ambiente y a la producción de alimentos más sanos, de ser posible,

orgánicos; es decir, con la menor cantidad de insumos químicos. En este contexto, los agricultores productores de pallar de la región Ica, tienen predisposición a capacitarse a través de la investigación participativa liderada por las instituciones pertinentes, para profundizar sus conocimientos sobre los beneficios de las bacterias fijadoras de nitrógeno, que tienen en abundancia en sus campos, las cuales se pueden potenciar, seleccionando las más efectivas y eficientes, para contribuir al incremento de sus rendimientos, a la conservación del suelo y agua, en suma, para contribuir con la sostenibilidad del cultivo, con el valor agregado de producir granos más sanos, en beneficio de la población local, regional, nacional e internacional, ya que los granos de pallar de Ica, se exportan desde muchos años atrás.

Es necesario desplegar todo esfuerzo, para impulsar el cambio de paradigma, adoptando las propuestas de la agroecología como disciplina científica con nuevo enfoque. Desde la Academia, el currículo, el análisis interdisciplinario, los grupos de investigación, haciendo preguntas, y buscando respuestas a las preguntas sobre la agricultura sustentable, uso global de la tierra, cambio climático y seguridad alimentaria, de modo tal que el uso de esta disciplina científica nos guíe hacia el uso racional y sostenible de nuestros recursos naturales.

El cambio de paradigma permitirá que todos: gobernantes, políticos, leyes, instituciones, profesionales, técnicos, agricultores y la población en general se involucren en la búsqueda del equilibrio entre las dimensiones ecológicas – económicas y sociales de la agricultura sustentable.

Son los propios agricultores, productores y conservadores del pallar quienes, generación tras generación, vienen manteniendo la diversidad de esta leguminosa, con sus tradiciones, costumbres y formas de cultivo. La mejor garantía de sostenibilidad, es a través de la conservación *in situ* que ellos realizan. La conservación, para largo plazo, sólo requiere ser fortalecida por las instituciones competentes del sector agrario, en alianza estratégica con la universidad, apoyándolos para una mejor organización, capacitación en nuevas técnicas agrícolas, proponiendo mejoras en su comercialización con valor agregado; pero fundamentalmente, empoderándolos como los poseedores del recurso genético, del saber campesino, tradicional, y fomentando su participación en los planes de desarrollo local y regional del pallar, beneficiándose con justicia de la denominación de origen “Pallar de Ica”.

## V. CONCLUSIONES

- *Phaseolus lunatus* ‘pallar’, se encuentra distribuido en todas las provincias del departamento o región Ica, siendo un recurso genético muy adaptado también a las condiciones edafoclimáticas de la costa norte peruana.
- Hay una importante diversidad genética encontrada a través de la caracterización morfológica, destacando las variables patrón de crecimiento con 36.70 por ciento, color de alas de la flor con 22.80 por ciento, curvatura de la vaina con 10.90 por ciento, forma del ápice de la vaina con 9.40 por ciento y forma de la semilla con 6.60 por ciento, que explican el 86.50 por ciento de la variación total.
- La caracterización molecular, sin embargo, ha encontrado que esta diversidad es menor; con un contenido de índice de polimorfismo (PIC) que varía de 0.18 a 38, con un promedio de 0.28, indicando distancias muy cercanas entre los genotipos evaluados.
- Se ha identificado la diversidad de rizobios que hacen simbiosis con el pallar en toda la zona geográfica evaluada, encontrando un 6.81 por ciento de cepas de crecimiento muy rápido, no identificadas; un 32.34 por ciento de cepas de crecimiento rápido correspondiente probablemente a *Rhizobium*, un 57.87 por ciento de cepas de crecimiento lento, probablemente *Bradyrhizobium*, y un 2.98 por ciento de cepas de crecimiento extra lento, no identificadas.
- Se ha encontrado que la única forma de conservación de la diversidad del pallar en la zona geográfica evaluada, generación tras generación, es en condiciones *in situ*, alternando sus graneros o almacenes con sus campos de cultivo, siendo vulnerable ante posibles desastres naturales o efectos del cambio climático.

## VI. RECOMENDACIONES

- Ampliar la zona de obtención del germoplasma de *Phaseolus lunatus* L., de ser posible a nivel nacional, en alianza con el INIA, la Universidad Nacional Agraria La Molina y otras instituciones que pueden tener acceso a este recurso genético.
- Conocer e identificar toda la diversidad genética posible de *Phaseolus lunatus* L., cultigrupo big lima a través de las técnicas conocidas de la biotecnología, para su uso racional y conservación respectiva.
- Realizar la caracterización molecular de las cepas de rizobios aisladas para su identificación y contribuir con el conocimiento sobre estos microorganismos tan valiosos para el cultivo de pallar.
- Seleccionar cepas de rizobios en laboratorio y evaluar su eficiencia y efectividad en condiciones de campo de los productores de pallar.
- Promover a través de alianzas estratégicas entre la academia y el sector agrario regional, programas de difusión y educación respecto al valor actual y potencial del pallar, revalorizándolo como especie nativa por su importante aporte a la oferta culinaria y fomentando el incremento de su consumo por su contenido proteico.
- Fortalecer la alianza estratégica: agricultor – profesionales del sector agrario – academia, para fomentar la conservación *in situ* de la diversidad existente del pallar, sobre todo de las variedades más tardías y granos de color que siendo fuente importante de genes, se encuentran en condiciones de vulnerabilidad por la preferencia del mercado hacia los precoces de grano blanco.
- Proporcionar semilla del material evaluado, con énfasis en los genotipos vulnerables al Banco de Germoplasma del Programa de Leguminosas de Grano de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con una copia al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), para su conservación a largo plazo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andueza-Noh, R., Camacho-Pérez L., Martínez-Castillo, J. y F. May-Pat. 2016. *Distribución geográfica de parientes del acervo genético mesoamericano del frijol lima en México*. Polibotánica 41:101-113.
- Baudett, J. C. 1977. *Origen y clasificación de las especies cultivadas del género Phaseolus*. Bull. Soc. Roy. Bot. Belg. 110:65-76.
- Baudoin, J.P. 1991. *La Culture et l'Amélioration de la Légumineuse Alimentaire Phaseolus lunatus L. en Zonas Tropicales*. Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, Ede, Pays-Bas / Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique.
- Caicedo, A.L.; E. Gaitán, M.C. Duque, O. Toro-Chica, D.G. Debouck, y J. Thome, 1999. *AFLP fingerprinting of Phaseolus lunatus L. and related wild species from South America*. Crop Sci., 39: 1497-1507.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. *Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico*. Cali. 178 p.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142:169–196.
- Cuadrado, B.; Rubio, G. y Santos, W. 2009. *Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (Vigna unguiculata) como potenciales bioinóculos*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 38(1):78-104.
- Cubero J. I. y Moreno M. T. (1983). *Leguminosas de Grano*. Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid. 356 p.
- Debouck, D. 1986. *La búsqueda de la diversidad genética en Phaseolus en los tres centros americanos como servicio de fitomejoramiento del cultivo*. CIAT. Seminarios Internos. SE – 2 – 86. 20 p.
- Debouck, D. 1992. *La agricultura en Mesoamérica. Frijoles. (Phaseolus spp.)*. Disponible en:  
[http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro09/Cap2\\_2.htm#24](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro09/Cap2_2.htm#24)



- Debouck, D.G. 1999. *Diversity in Phaseolus species in relation to the common bean*. In: "Common bean improvement in the twenty-first century", Singh, S.P. (ed.), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Holanda, pp. 25-52.
- Doyle J. J. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*.12:13–15
- Espinoza, L. 2012. *Asistencia técnica dirigida en Manejo y Sanidad en el cultivo de pallar*. Guía Técnica. UNALM – AGROBANCO. 29 p.
- Fernández, M. 2003. *Manual de nodulación*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 53 pp.
- Fofana B., Baudoin J., Vekemans X., Debouck D., & P. Du Jardin. 1999. *Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (Phaseolus lunatus L.) using chloroplast DNA*. Springer-Verlag. *Theor Appl Genet*: 98, 202-212.
- Franco, T. L.; Hidalgo, R. (eds.). 2003. *Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. Boletín técnico N° 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- García V. K. 2008. *Estudio de la diversidad genética de Phaseolus lunatus L. en zonas silvestres y cultivadas en la provincia de Imbabura-Ecuador mediante el uso de microsatélites*. Tesis. Título en Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Imbabura-Ecuador. 106 p.
- Gutiérrez-Salgado, A.; P. Gepts, y D.G. Debouck 1995. *Evidence for two gene pools of the Lima beans, Phaseolus lunatus L., in the Americas*. *Genet Resour Crop Evol.*, 42: 15-28.
- Hernández, J. y Mayo, J. 2002. *Infectividad y efectividad de cepas nativas de rizobios aislados de la provincia de Ica en Phaseolus lunatus (pallar) var. Criollo y var. Sieva*. Tesis. Biólogo. Universidad Nacional "San Luis Gonzaga".
- Hernandez-Villarreal, A. 2013 *Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. *Revista Bio Ciencias*. 2(3): 113-118.
- Informativo de la Dirección Regional Agraria (INFODRA). 2018. *Boletín Agrario*. Año 02 - N° 01. Edición especial enero – julio. 8 p.
- Instituto de Biotecnología (IBT). 2012. *Manual de Protocolos de Biología Molecular*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2009. *ICA: Compendio Estadístico*

*Departamental 2008-2009*. 282 p.

IPGRI. 2001. *Descritores para Phaseolus lunatus (Feijão-espadinho)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 51 p.

Jacinto-Hernández, C.; Garza-García, R.; Garza-García, D. e I. Bernal-Lugo. 2014. *Caracterización de germoplasma nativo de frijol con base en marcadores moleculares y atributos de calidad*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.5 Núm.2 15 de febrero - 31 de marzo, 2014 p. 253-264.

Jaramillo, S. y Baena, M. 2000. *Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 122 p.

Jones, N., Ougham, H., and Thomas, H. 1997. *Markers and mapping: We are all geneticists now*. New Phytologist 137:165–177.

Jordan, D.C. 1983. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams & Williams, Baltimore.

Kaplan, L., y T.F. Lynch 1999. "*Phaseolus (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture*". Econ. Bot., 53: 261-272.

López-Alcocer. 2016. López-Alcocer, J., R. Lépiz-Ildefonso, D. González-Eguiarte, R. Rodríguez-Macías y E. López-Alcocer. *Variabilidad morfológica de Phaseolus lunatus L. silvestre de la región occidente de México*. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 39 (1): 49 - 58, 2016.

Matos, G.; Ormeño, E. y Zúñiga, D. 1998. *Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (Phaseolus lunatus L.) en la costa central del Perú*. Ecología. Revista de la Asociación Peruana de Ecología. Vol. 1, N° 1: 42 – 46.

Matta, J. y Soto, M. 2008. *Caracterización parcial y eficiencia de Bradyrhizobium en la nodulación de Phaseolus lunatus L. en el Valle de Ica*. Tesis. Biólogo. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica. 47 p.

Maquet, A.; X. Vekemans y J.P. Baudoin 1999. *Phylogenetic study on wild allies of lima bean, Phaseolus lunatus (Fabaceae) and implications on its origin*. Plant Syst. Evol., 218: 43-54. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/227199141\\_Phylogenetic\\_study\\_on\\_wild\\_allies\\_of\\_Lima\\_beanPhaseolus\\_lunatus\\_Fabaceae\\_and\\_implications\\_on\\_its\\_origin](https://www.researchgate.net/publication/227199141_Phylogenetic_study_on_wild_allies_of_Lima_beanPhaseolus_lunatus_Fabaceae_and_implications_on_its_origin).

- Milton J. S. 2007. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. McGraw-Hill Interamericana. 3ra. edición ampliada. 744 p.
- Ministerio de Agricultura (MINAG). 2008. *El Pallar de Ica. Denominación de origen*. Dirección General de Promoción Agraria. 96 p.
- Ministerio de Agricultura y Riego. 2016. *Leguminosas de Grano. "Semillas nutritivas para un futuro sostenible"*. GALU GRAF S.A.C. Primera edición. 75 p.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). 2015. *Prospección, colección, elaboración de mapas de distribución y estudio socioeconómico y de conocimientos tradicionales asociados al cultivo de las razas de maíz*. Informe final. 181 p.
- Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. 2017. *Tablas Peruanas de Composición de Alimentos*. Décima edición. Lima, Perú. 146 p.
- Motta-Aldana, J.R., M.L. Serrano-Serrano, J. Hernández-Torres, G. Castillo-Villamizar, D. Debouck, and M.I. Chacón. 2010. *Multiple origins of Lima bean landraces in the americas: evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms*. *Crop Science* 50:1773-1787.
- Nadal, S.; Moreno, MT. y Cubero, J. 2004. *Las leguminosas de grano en la agricultura moderna*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Junta de Andalucía. 314 p.
- Olivares, J. 2005. *Biofertilización: abonar sin contaminar*. En: Granada Hoy. Estación Experimental del Zaidín. Granada. España. 10 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2009. *Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Roma – Italia. 68 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2011. *El Segundo informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el Mundo*. Comisión de Recursos Genéticos para la alimentación y la agricultura. ISBN 978-92-5-306534-9. Roma – Italia. 402 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2015. *Suelos y biodiversidad. Los suelos albergan una cuarta parte de la biodiversidad de nuestro planeta*. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4551s.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2016.

*El Día Mundial del Suelo destaca el papel de las legumbres para impulsar la agricultura sostenible*. Informe. Disponible en:

<http://www.fao.org/news/story/es/item/456560/icode/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2016. *Legumbres. Semillas Nutritivas para un Desarrollo Sostenible*. Roma, Italia. 196 p.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2017. *Directrices voluntarias para la gestión sostenible de los suelos*. Roma, Italia. 26 p.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2018. *Biodiversidad para una Agricultura Sostenible. El trabajo de la FAO sobre el uso de la biodiversidad en la alimentación y la agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/3/CA2227ES/ca2227es.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2019. *Día Mundial de las Legumbres. 10 de febrero del 2019*. Disponible en: <http://www.fao.org/world-pulses-day/es/>

Ormeño, E.; Vinuesa, P.; Zúñiga, D. y E. Martínez. 2005. *Un nuevo linaje de Bradyrhizobium que incluye simbiontes aislados de frijol lima (Phaseolus lunatus L.) en Perú y que también se encuentra en suelos de los Tuxtlas, Veracruz, México*. VII Congreso Nacional de la FBN. Cuernavaca, México.

Paterson, A.H. 1996. *Making genetic maps*. pp. 41–54. In: A.H. Paterson (ed.). *Genome mapping in plants*. Austin, Texas, USA. 330 p.

Pesantes M., León E., De La Cruz, E. y J. Rodríguez 2015. *Variabilidad morfo-agronómica en poblaciones de pallar, Phaseolus lunatus, cultivado en condiciones de Costa de la Provincia de Trujillo (Perú)*. REBIOL. 35(2): 29-38, Julio – Diciembre.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc, Versión 2.1d. Exeter Software, Setauket, NY.

Sanjuan, J. 2007. *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Edit. Izaguirre-Mayoral, Labandera y Sanjuán. 1ra. Edición. CYTED – BIOFAG-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo-Uruguay. 98 p.

Sauer, J. 1993. *Historical Geography of Crop Plants: A select Roster*. CRC PRESS. 1st Edition. Disponible en: [www.crc.press.com](http://www.crc.press.com) . 320 p.

Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A. 2017. *Multiple benefits of legumes for agriculture*

*sustainability: an overview. Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 2 2017.  
<https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>

Toniutti, M. A, Fornasero, L.V, Trod, B.S, Zuber, N.E, & Córdoba, M.S. 2015. *Caracterización fenotípica y funcional de rizobios noduladores de dos especies del género Macroptilium. Fave. Sección ciencias agrarias*, 14(1) Recuperado el 22 de enero de 2019, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1666-77192015000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1666-77192015000100007&lng=es&tlng=es).

Valladolid, A. y Voyses, O. 2006. *Clases comerciales de leguminosas de grano: Catálogo para orientar la comercialización en los Mercados Nacionales e Internacionales* (Market classes of Food Grain Legumes: Catalog for Use in Marketing Pulses in National and International markets). Promenestras tex, Chiclayo, Perú. 112 p.

Vicent, J.M. 1982. *Nature and Basic properties of the Rhizobia*. En: Nitrogen fixation in legumes. J.M. Vincent (ed.). Academic press.

Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. y E. Martínez. 2005. *Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation*. Mol. Phylogenet. Evol. 34:29-54.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. y Reijans, M. 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research, 23 (21): 4407-4414.

Zoro-Bi, I.; A. Maquet, y J.P. Baudoin 2003. *Population genetic structure of wild Phaseolus lunatus (Fabaceae), with special reference to population sizes*. Am. J. Bot., 90: 897-904.

Zúñiga D., D. 2012. *Manual de Microbiología Agrícola. Rhizobium, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad*. Universidad Nacional Agraria La Molina. 112 p.

## **VIII. ANEXOS**

### Anexo 1: Base de datos de 30 genotipos de pallar

**Tabla 10. Base de datos de 30 genotipos de pallar**

N°	Código	Denominación local	Región	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Patrón de crecimiento	Color de las alas/flor	Curvatura de la vaina	Forma del ápice de la vaina
1	LEM -1	Serruchito	Ica	Chincha	El Carmen	Blas Herren	-13.58243898	-76.168947	18.987511	2	1	3	1
2	LEM-2	Criollo	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911	287.554352	2	1	3	2
3	LEM-3	Semi precoz	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792	328.232025	2	1	3	2
4	LEM-4	Criollo	Ica	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792	328.232025	2	1	3	3
5	LEM-5	Criollo	Ica	Ica	Ocucaje	Callango	-14.47194381	-75.64840049	280.03659	2	1	0	3
6	LEM-6	Serruchito	Ica	Chincha	Grocio Prado	Buena Vista	-13.24440898	76.16643098	305.674286	2	1	0	1
7	LEM-7	Serruchito	Ica	Ica	Ocucaje	Callango	-14.47194381	-75.64840049	280.03659	2	1	0	1
8	LEM-8	Jaspeado	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	317.812897	2	1	3	2
9	LEM-9	Pintado	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	317.812897	2	1	3	1
10	LEM-10	Generoso	Ica	Nasca	Changuillo	San Javier	-14.66644797	-75.172378	317.812897	2	6	3	2
11	LEM-11	Pintado	Ica	Ica	Salas	Guadalupe	-13.97992952	-75.77278850	432.014587	2	6	3	1
12	LEM-12	Manchado	Ica	Ica	Salas	Guadalupe	-13.97992952	-75.77278850	432.014587	2	1	5	1
13	LEM-13	Manchado	Ica	Ica	Salas	Los Pobres	-13.99502825	-75.77089089	427.002547	2	6	3	2
14	LEM-14	Variegado	Ica	Ica	Pachacutec	El Palto	-14.18507602	-75.68526736	398.001325	2	1	3	4
15	LEM-15	Moteado	Ica	Ica	Subtanjalla	Arrabales	-14.02857802	-75.745744	428.202026	2	1	3	2
16	LEM-16	Variegado	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134	224.740112	2	1	5	3
17	LEM-17	Rosado	Ica	Ica	Pachacutec	El Palto	-14.18507602	-75.68526736	398.001325	2	6	5	2
18	LEM-18	Generoso	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039	216.18457	2	6	3	2
19	LEM-19	Generoso	Ica	Nasca	Changuillo	Cabildo	-14.67353303	-75.290936	196.729477	2	6	3	2
20	LEM-20	PAMG-1001	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101.086574	2	1	5	1
21	LEM-21	PAMG-1001-5	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101.086574	2	1	5	1
22	LEM-22	Pintado	Ica	Nasca	Changuillo	Cabildo	-14.67353303	-75.290936	196.729477	2	1	5	3
23	LEM-23	Generoso	Ica	Pisco	Independencia	Cabeza de	-13.69454099	-76.011322	254.145889	2	6	3	2
24	LEM-24	PAMA 1002	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101.086574	1	1	5	3
25	LEM-25	PAMA 1003	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101.086574	1	1	5	1
26	LEM-26	Ovalado	Ica	Ica	Subtanjalla	Arrabales	-14.02857802	-75.745744	428.202026	1	1	0	1
27	LEM-27	Precoz	Ica	Nasca	El Ingenio	San Francis	-14.67879167	-75.1342528	339.025469	1	1	3	1
28	LEM-28	PBBV	Lambayeque	Chiclayo	Patapo	Patapo	-6.738080556	-79.6271139	101.086574	2	1	0	3
29	LEM-29	Flor lila	Ica	Pisco	Independencia	Santa Beatr	-13.70147198	-76.00093	273.818573	1	1	3	3
30	LEM-30	Precoz	Ica	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134	224.740112	1	1	3	2

..... Continuación.....												
Codigo	Forma de la semilla	Color de fondo de la semilla	Patrón del tegumento de la semilla	Días a la floración (50%)	Vainas (cm)		Granos (cm)			N° de granos por vaina	Peso de 100 granos (g)	Días a la madurez de la vaina
					Largo	Ancho	Largo	Ancho	Espesor			
LEM -1	7	2	0	72	12.77	2.57	2.37	2.00	0.67	3.7	234.44	182
LEM-2	12	2	0	70	12.13	2.25	2.68	1.73	0.66	2.2	244.12	180
LEM-3	12	2	0	72	11.83	2.05	2.55	1.68	0.69	2.5	240.72	185
LEM-4	12	2	0	80	11.83	2.37	2.93	1.77	0.65	2.4	247.90	195
LEM-5	12	2	0	80	11.95	2.32	2.74	1.73	0.64	2.5	250.80	192
LEM-6	6	2	0	80	11.46	2.41	2.36	1.84	0.70	3.3	226.96	195
LEM-7	7	2	0	78	12.75	2.41	2.43	1.92	0.70	3.8	238.32	190
LEM-8	12	2	0	76	12.53	2.12	2.61	1.67	0.65	2.8	211.28	185
LEM-9	11	2	4	72	11.65	2.10	2.61	1.58	0.62	2.7	211.28	182
LEM-10	12	2	0	74	12.18	2.19	2.65	1.59	0.69	2.5	229.28	185
LEM-11	12	2	4	72	12.04	2.07	2.66	1.64	0.67	2.5	219.80	180
LEM-12	12	3	11	70	11.70	2.02	2.76	1.68	0.64	2.4	227.52	180
LEM-13	12	3	11	78	11.65	2.13	2.60	1.53	0.68	2	230.65	185
LEM-14	12	8	13	78	10.95	1.92	2.62	1.51	0.65	2.3	191.20	183
LEM-15	12	2	0	75	12.64	2.35	2.71	1.72	0.66	2.7	217.43	188
LEM-16	12	8	11	78	10.94	1.76	2.69	1.48	0.62	2.4	172.24	190
LEM-17	12	3	11	70	12.82	2.20	2.85	1.69	0.70	2.6	260.76	180
LEM-18	12	2	0	78	12.24	2.13	2.91	1.73	0.68	2.5	261.72	188
LEM-19	12	2	0	70	12.66	2.31	2.83	1.71	0.69	2.6	254.16	195
LEM-20	11	2	0	66	8.83	1.85	2.26	1.42	0.65	3	157.32	175
LEM-21	12	2	0	66	9.64	1.98	2.16	1.43	0.63	2.9	147.52	175
LEM-22	10	8	12	77	11.27	1.90	2.83	1.63	0.69	3	242.72	188
LEM-23	12	2	0	72	10.88	2.25	2.77	1.64	0.69	2.4	241.28	192
LEM-24	10	2	0	54	6.38	1.75	2.37	1.31	0.61	2	158.08	125
LEM-25	9	2	0	54	8.17	1.99	2.31	1.39	0.62	2.3	153.84	125
LEM-26	7	2	0	50	10.90	1.97	2.11	1.53	0.64	3.4	165.16	122
LEM-27	12	2	0	51	13.67	2.14	2.57	1.60	0.62	3.4	217.48	124
LEM-28	10	1	1	52	6.88	1.62	1.41	0.99	0.45	2.6	45.24	125
LEM-29	11	2	0	53	14.21	2.24	2.43	1.60	0.62	3.2	197.60	127
LEM-30	11	2	0	53	12.34	2.21	2.70	1.74	0.69	2.7	240.64	128



## Anexo 2: Base de datos de los nódulos de rizobios

**Tabla 11. Base de datos de nódulos de rizobios extraídos de plantas de pallar**

PROVI	DISTRITO	CENTRO_PC	LATITUD	LONGITUD	ALTU	ODIGO	EMPO	GENERO	
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
2	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64461203	-75.250039017	216	2C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
6	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	6A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
6	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	6A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
6	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	6C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7A	6	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7A	6	<i>Bradyrhizobium</i>
4	Nasca	Changuillo	Cabildo	-14.67353303	-75.290935999	197	4B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
7	Nasca	Changuillo	San Juan	-14.64454497	-75.255134040	225	7B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
10	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34933702	-75.703911027	288	10B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	11A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	11A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	11B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	11B	6	<i>Bradyrhizobium</i>
11	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	11C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12B	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
12	Ica	Ocucaje	El Tambo	-14.34759602	-75.694792019	328	12C	5	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18A	5	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18A	5	<i>Bradyrhizobium</i>







..... Continuación.....									
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17A	4	<i>Bradyrhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	4	<i>Bradyrhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	4	<i>Bradyrhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17A	3	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17A	2	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	3	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	3	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	3	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	3	<i>Rhizobium</i>
17	Chincha	El Carmen	Blas Herrera	-13.58243898	-76.168946978	19	17C	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	4	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	4	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18C	4	<i>Bradyrhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18A	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18A	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	2	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	3	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18B	2	<i>Rhizobium</i>
18	Chincha	Grocio Prado	Buena vista	-13.24440919	-76.166428135	306	18C	3	<i>Rhizobium</i>

### Anexo 3. Reactivos para la extracción del ADN

<b>BUFFER DE EXTRACCIÓN (CTAB 2X)</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)/Volumen (ml)</b>
CTAB	20 g
NaCl	81,81 g
0.5 M EDTA (pH=8.0)	40 ml
1M Tris:HCl (pH=8.0)	100 ml
PVP	10 g
Agua Destilada	hasta 1000 ml

..... continuación.....

<b>CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMILICO</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>
Cloroformo	960
Alcohol isoamilico	40

..... continuación.....

<b>BUFFER DE EXTRACCIÓN (CTAB 10X)</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)/Volumen (ml)</b>
CTAB	10 g.
NaCl	5 g.
0.5 M EDTA (pH=8.0)	10 ml.
Agua Destilada	hasta 100 ml.

..... continuación.....

<b>ETANOL 70%</b>		<b>ETANOL 90%</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>
Etanol absoluto	700	Etanol absoluto	900
Agua Destilada	300	Agua Destilada	100

..... continuación.....

<b>T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub></b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>
1M Tris:HCl (pH=8.0)	4
0.5 M EDTA (pH=8.0)	0.8
Agua Destilada	400

#### Anexo 4. Reactivos de concentración de ADN

<b>BUFFER TBE 10X</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)/Volumen (ml)</b>
Tris Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
0.5 M EDTA (pH=8.0)	40 ml
Agua Destilada	hasta 1000 ml

.... continuación....

<b>GEL DE AGAROSA 1%</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)/Volumen (ml)</b>
Agarosa	2,5 g
TBE1X	250 ml

<b>TAMPÓN CARGA SALB 10X</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Peso (mg)/Volumen (ml)</b>
Azul de Bromofenol	75 mg
Xilene Cianol	75 mg
Orange G	100 mg
TBE 10X	2,5 ml
Sucrosa	30 g
Agua mili Q	hasta 50 ml

<b>TAMPÓN CARGA SALB 1X</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>
SALB 1X	100
Agua mili Q	Hasta 900

## Anexo 5. Reactivos para la obtención de marcadores AFLP

### a. Digestión de ADN

Digestión		
Reactivos	1X (µl)	220X (µl)
EcoRI NEB (100,000U/ml) = 20U	0.1 µl	22 µl
MseI NEB (50,000U/ml) = 5U	0.05 µl	11 µl
BSA 10X (1mg/ml)	1 µl	220 µl
10X NEB	1 µl	220 µl
H <sub>2</sub> O Mili Q	2.85 µl	627 µl
50 ng DNA	5 µl	1100 µl

### b. Ligación de adaptadores

Ligación		
Reactivos	1X (µl)	220X (µl)
EcoRI DS adapter	0.5 µl	110 µl
MseI DS adapter	0.5 µl	110 µl
10X Ligase Buffer from NEB	1.25 µl	275 µl
T4 ligase NEB (400000U/ml)**	0.15 µl	33 µl
H <sub>2</sub> O Mili Q	0.1 µl	22 µl

### c. Pre-amplificación

Pre-Amplificación		
Reactivos	1X (µl)	220X (µl)
H <sub>2</sub> O Mili Q	11.55 µl	2541 µl
10X PCR Buffer	2.5 µl	550 µl
ClMg	2.5 µl	550 µl
dNTP mix(5mM)	1.25 µl	275 µl
EcoRI+0 primer (10uM)	1 µl	220 µl
MseI+0 primer (10uM)	1 µl	220 µl
Taq polymerase	0.2 µl	44 µl
50 ng DNA RL	5 µl	1100 µl



#### d. Programación

<b>Pre-Amplificación</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Heat 103°C	
72°C	2' 0"
94°C	4' 0"
<b>Inicio de Ciclos 22X</b>	
94°C	30 "
56°C	1'
72°C	1'
<b>Final de Ciclos 22X</b>	
72°C	5'
8°C	Almacenamiento

#### e. Amplificación selectiva

<b>Amplificación Selectiva</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>1X (µl)</b>	<b>220X (µl)</b>
H <sub>2</sub> O Mili Q	2.7 µl	594 µl
10X PCR Buffer	1.1 µl	242 µl
CIMg	1.1 µl	242 µl
dNTP mix(5mM)	0.6 µl	132 µl
EcoRI+3 primer (10uM)	2 µl	440 µl
MseI+3 primer (10uM)	0.3 µl	66 µl
Taq polymerase	0.2 µl	44 µl
50 ng DNA RLA	2 µl	440 µl

#### f. Programación

<b>Amplificación Selectiva</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Calentar 103°C	
94°C	4'
<b>Inicio de Ciclos 10X</b>	
94°C	20"
66°C	30"
72°C	2'
<b>Final de Ciclos 10X</b>	
<b>Inicio de Ciclos 20X</b>	
94°C	20"
56°C	30"
72°C	2'
<b>Final de Ciclos 20X</b>	
60°C	30'
8°C	Almacenamiento

## Anexo 6. Electroforesis

### a. Preparación de gel Poliacrilamida

Solución de poliacrilamida	
Reactivo	Peso g./Volumen ml.
Urea	420 g.
Acrilamida	60 g.
Bis acrilamida	3 g.
TBE 10X	50 ml.
Agua Destilada	hasta 1000 ml.

### b. Solución Adherente

Solución adherente	
Reactivo	Volumen ml.
Bind Silano (adherente)	5 $\mu$ l.
Ácido Acético	5 $\mu$ l.
Etanol	1.5 ml.

### c. Gel de Poliacrilamida

Gel de poliacrilamida	
Reactivo	Volumen ml.
Sol. Poliacrilamida	70 ml.
TEMED	45 $\mu$ l.
APS (Persulfato de amonio)	450.

### d. Soluccion Dye

Stock DYE	
Reactivo	Peso mg./Volumen $\mu$ l.
Xilencianol	50 mg.
Azul de Bromofenol	50 mg.
Agua Mili Q	1 ml.

### e. Stock Carga

Tampón carga	
Reactivo	Peso g./Volumen $\mu$ l.
Formamida	9.6 ml.
0.2 M EDTA	300 $\mu$ l.
Stock Dye	100 $\mu$ l.

## Anexo 7: Tinción y revelado

### a. Solución de Fijación

Solución de Fijación	
Reactivo	Volumen ml.
Ácido Acético	100 ml.
Etanol	5 ml.
Agua destilada	9000 hasta 1 libro

### b. Solución de Tinción

Solución de tinción	
Reactivo	Peso mg./Volumen µl.
Nitrato de Plata	2 g.
Agua destilada	hasta 1000 ml.

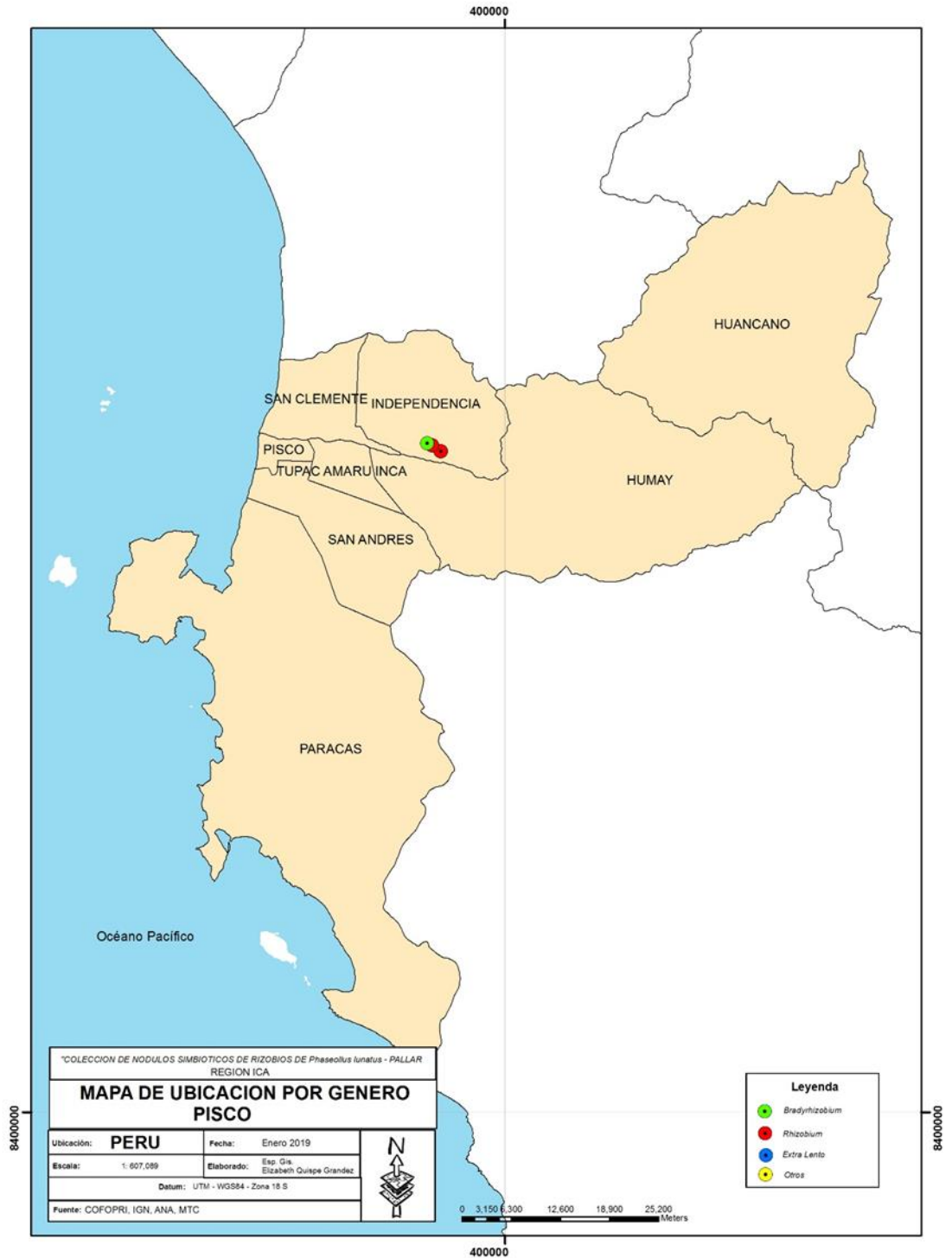
### c. Solución de Revelado

Solución de revelado	
Reactivo	Peso g./Volumen µl.
NaOH	30 g.
Formaldehido	10 ml.
Agua destilada	hasta 1000 ml.

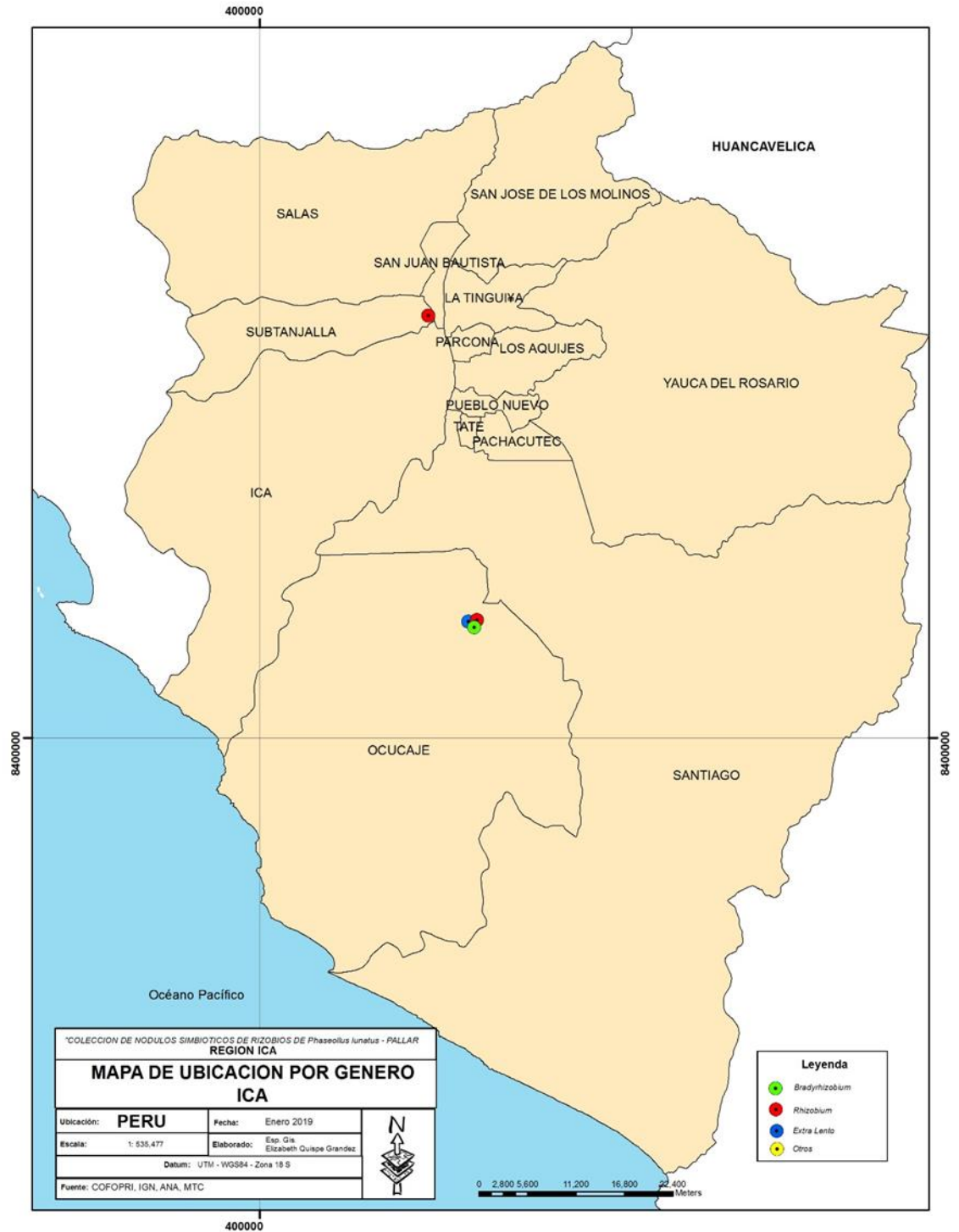
**Anexo 8. Mapas de ubicación de los rizobios en cuatro provincias de la Región Ica**



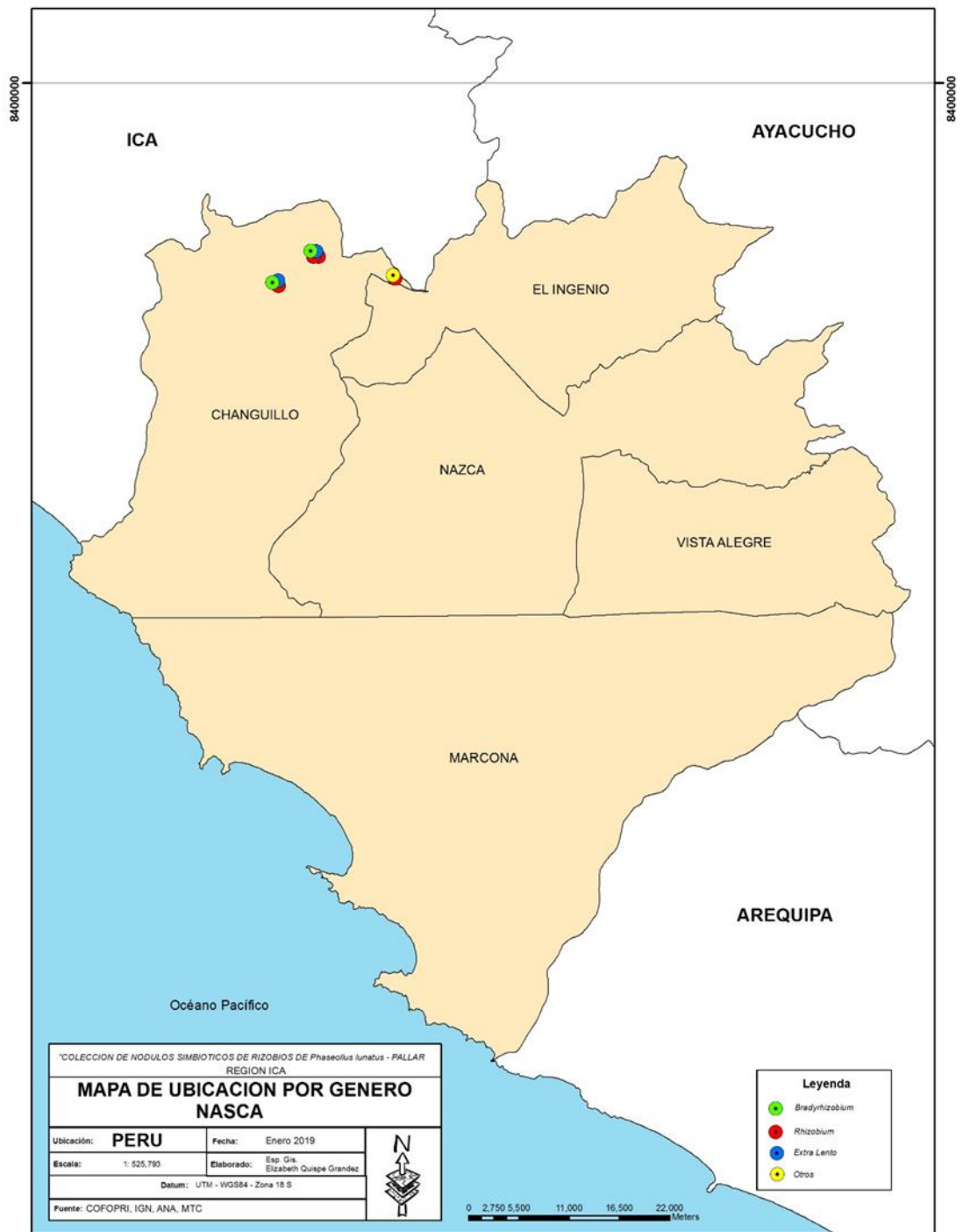
**Figura 13: Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Chincha.**



**Figura 14: Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Pisco.**



**Figura 15: Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Ica**



**Figura 16: Mapa de ubicación de los rizobios en la provincia de Nasca**



## Anexo 9. Panel fotográfico



Figura 17 y 18. Campo mostrando los genotipos de pallar en evaluación



Figuras 19 y 20. Diversidad de vainas y granos de genotipos de pallar



Figuras 21 y 22. Diversidad en el color de la testa de la semilla de genotipos de pallar





**Figuras 23 y 24. Diversidad en vainas y color de la testa de la semilla de pallar**



**Figuras 25 y 26. Diversidad en forma de vainas y granos de genotipos de pallar**



**Figura 27. Diversidad en tamaño de grano**

**Figura 28. Diversidad en vaina y grano**



Figura 29. Extracción de ADN de genotipos

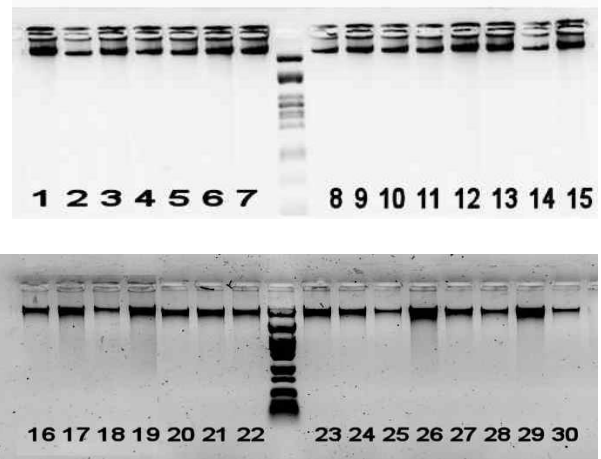


Figura 30. Bandas de ADN diluidas



Figura 31. Escoreo de genotipos de pallar

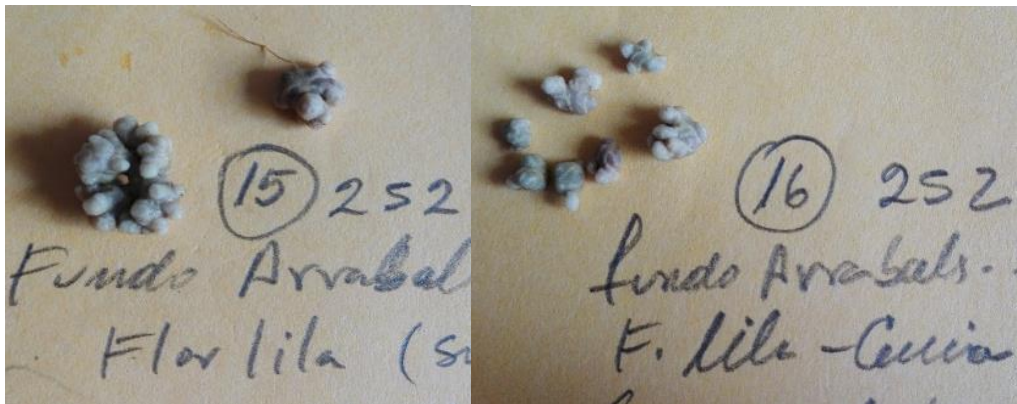




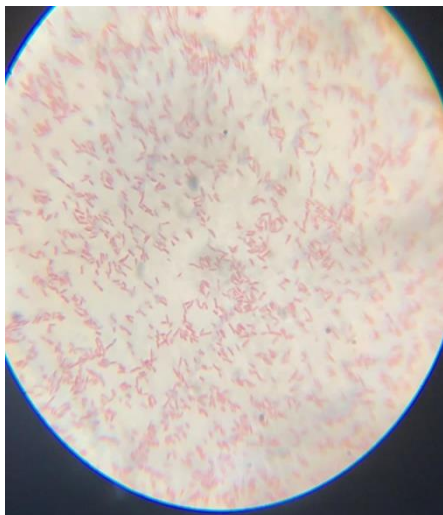
**Figura 32. Planta de pallar en floración**



**Figura 33. Extracción de nódulos**



**Figura 34. Diversidad de nódulos**



**Figura 35. Microscopio**



**Figura 36. Cultivo de cepas**