

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**



**“TAXONOMÍA FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS
AISLADAS DE NÓDULOS DE *Clitoria brachystegia* Benth., UNA
LEGUMINOSA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”**

Presentada por:

JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E
INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**Lima – Perú
2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO DOCTORADO EN
CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**“TAXONOMÍA FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS
AISLADAS DE NÓDULOS DE *Clitoria brachystegia* Benth., UNA
LEGUMINOSA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE***

Presentada por:

JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Félix Camarena Mayta
PRESIDENTE

Dra. Doris Zúñiga Dávila
ASESOR

Dr. Ernesto Ormeño Orrillo
CO-ASESOR

Ph.D. Gretty Villena Chávez
MIEMBRO

Dra. Ilanit Salmoski Klein
MIEMBRO

Dr. Juan Sanjuán Pinilla
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A Dios,

Cuya bendición y promesa nunca nos abandonaron en los momentos difíciles. Cuyos extraños caminos le han dado sentido a mi existencia.

A mis padres,

Gracias por la vida, por su Amor, inculcaron en mí principios y reglas para superarme constantemente.... despertaron la “curiosidad” por la vida.

A Cristopher y Karina,

La razón de mi vida y de constante superación, regalos de Dios.

A mis hermanos,

Orlando, Marlon, Maribel y Patricia que supieron corregirme, acompañarme, alentarme y apoyarme en este camino, sin ustedes no lo habría logrado.

A mis sobrinos/sobrinas,

María Fernanda, Paola, Andrea, Diana, Fernando, Daniela, Susan, Samantha, Daniel, Arlene y Shawn...por ustedes acepté este reto.

AGRADECIMIENTO

A la Doctora Doris Zúñiga, por su patrocinio, consejos ánimos y apoyo incondicional en todo momento, por recibirme en el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la UNALM.

Al Doctor Ernesto Ormeño, por ser la luz en mi estancia en el Programa Doctoral; su apoyo y dedicación fue fundamental para la culminación de este trabajo.

A todos los profesores del Programa Doctoral en Ciencias e Ingeniería Biológicas de la UNALM, por sus enseñanzas, experiencia, apoyo y confianza, en especial a la Dra. Gretty Villena y el Dr. Marcel Gutiérrez-Correa, PhD (+).

A mis compañeros de laboratorio Yohana, Mariha, Ricardo, Lizbeth, Claudia, Carito, Jesús, Mariale, Katty, Wilson, Mirian, Nataly y Andy, quienes en todo momento fueron apoyo moral, conocimientos, compañía y experiencia para perseguir y culminar este sueño. Gracias por hacerme sentir siempre parte del equipo.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, por su colaboración, respaldo y facilidades brindadas para cumplir este logro, en especial al PhD. Néstor Orrala Borbor, cuya amistad y compañerismo me digno de presumir siempre. Gracias por su invitación y Fé en la capacidad docente e investigadora de este servidor.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Becas para Doctorado (PhD) para docentes de Universidades y Escuelas Politécnicas Senescyt (Ecuador). Fondecyt (Perú) a través de los proyectos 238-2015-Fondecyt-DE, 009-2017-Fondecyt y Magnet por su aporte y respaldo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 BOSQUE SECO TROPICAL.....	4
2.2 DIVERSIDAD DE LEGUMINOSAS EN EL BOSQUE SECO TROPICAL	5
2.3 DISTRIBUCIÓN DE <i>Clitoria brachystegia</i> Benth.	5
2.4 AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i> EN <i>Clitoria</i>.....	6
2.5 TAXONOMÍA DE LOS RIZOBIOS	7
2.5.1 Taxonomía bacteriana.....	8
2.5.2 <i>Rhizobium larrymoorei</i>	9
2.5.3 <i>Rhizobium endophyticum</i>	9
2.5.4 <i>Rhizobium milunoense</i>	10
2.5.5 <i>Rhizobium multihospitium</i>	10
2.5.6 <i>Rhizobium viscosum</i>	11
2.6 TAXONOMÍA DE <i>Bradyrhizobium</i>	11
2.6.1 <i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	11
2.6.2 <i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	12
2.6.3 <i>Bradyrhizobium daqingense</i>	12
2.7 TAXONOMÍA <i>Burkholderia</i>	13
2.8 CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS	13
2.8.1 Caracterización de rhizobia	15
2.9 INTERACCIÓN <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA-SUELO-AMBIENTE	17
2.10 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	21
3.2 MARCO TEMPORAL Y UBICACIÓN	22
3.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, TRATAMIENTO Y SIEMBRA DE LOS NÓDULOS MACERADOS	23
3.4 CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS.....	23
3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA: DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS RIZOBIOS AISLADOS DE <i>C. brachystegia</i>.	23
3.6 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA: PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS	24
3.6.1 Producción de acidez o alcalinidad.....	24
3.6.2 Prueba de crecimiento a diferentes niveles de temperatura.....	24
3.6.3 Prueba de crecimiento a diferentes niveles de pH	24
3.6.4 Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)	24

3.6.5	Detección de bacterias solubilizadoras de fosfato bicálcico y tricálcico.....	25
3.6.6	Detección de la producción de sideróforos.....	25
3.6.7	Producción del ácido Indol Acético (AIA).....	25
3.6.8	Prueba de germinación en semillas inoculadas con rizobios.....	26
3.7	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS RIZOBIOS AISLADOS DE	
	<i>C. brachystegia</i>	26
3.7.1	Extracción de ADN.....	26
3.7.2	Generación de perfiles genómicos.....	27
3.7.3	Amplificación del gen ribosomal 16S	28
3.7.4	Amplificación del gen constitutivo <i>recA</i>	29
3.7.5	Secuenciación y análisis de secuencias	30
3.8	AUTENTICACIÓN DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS Y SU EFECTO EN LA	
	NODULACIÓN Y FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO	31
3.8.1	Desinfección y germinación de las semillas	31
3.8.2	Evaluación de la germinación de las semillas de leguminosas.....	31
3.8.3	Trasplante de semillas a macetas.....	31
3.8.4	Preparación del inóculo	32
3.8.5	Inoculación de las plántulas.....	32
3.8.6	Condiciones del experimento	32
3.8.7	Análisis de reducción del acetileno (ARA) para la determinación de la actividad nitrogenasa	33
3.9	TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	33
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	COLECCIÓN DE SUELOS, PLANTAS Y NÓDULOS	35
4.2	DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS VEGETALES	35
4.3	ANÁLISIS DE SUELO	37
4.4	AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE NÓDULOS DE <i>C. brachystegia</i>	37
4.5	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INICIAL PARA DETERMINACIÓN	
	DEL GÉNERO	42
4.5.1	Perfiles genómicos rep-PCR.....	42
4.5.2	Amplificación del gen ribosomal 16S e identificación a nivel de género	45
4.5.2.1	Rizobios	45
4.5.2.2	Bacterias endófitas.....	47
4.5.3	Taxonomía molecular de los rizobios a nivel de especie	49
4.6	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE RIZOBIOS AISLADOS DE <i>C.</i>	
	<i>brachystegia</i>	52
4.6.1	Pruebas fisiológicas	52
4.6.1.1	Producción de acidez o alcalinidad.....	52
4.6.1.2	Crecimiento a diferentes niveles de temperatura.....	54
4.6.1.3	Prueba de crecimiento a diferentes niveles de pH.....	58
4.6.1.4	Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)	60
4.6.2	Pruebas in vitro de actividad promotora de crecimiento vegetal.....	62
4.6.2.1	Detección de bacterias solubilizadoras de fosfato	62
4.6.2.2	Detección de sideróforos	65
4.6.2.3	Producción del ácido Indol Acético (AIA)	67

4.6.2.4 Capacidad PGPR de cepas de rizobios en la germinación de semillas de rábano	68
4.6.2.5 Actividad nitrogenasa mediante la prueba de reducción de acetileno (ARA)	70
4.7 AUTENTICACIÓN DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS	73
4.7.1 Efecto en la nodulación y crecimiento en plantas trampa	73
4.7.2 Efecto de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> en la germinación de semillas de frejol var. red kidney (<i>P. vulgaris</i>)	75
4.7.2.1 Número de trifolios por planta.....	75
4.7.2.2 Altura de tallo	76
4.7.2.3 Peso fresco parte aérea.....	76
4.7.2.4 Peso seco parte aérea	76
4.7.2.5 Peso fresco de raíz	77
4.7.2.6 Peso seco de raíz.....	77
4.7.2.7 Longitud de raíz.....	77
4.7.3 Efecto de <i>Bradyrhizobium</i> en la germinación de las semillas de frejol caupí (<i>Vigna unguiculata</i>)	79
4.7.3.1 Número de trifolios por planta.....	79
4.7.3.2 Número de nódulos por planta.....	79
4.7.3.3 Altura de tallo	80
4.7.3.4 Peso fresco parte aérea.....	81
4.7.3.5 Peso seco parte aérea	81
4.7.3.6 Peso fresco raíz	81
4.7.3.7 Peso seco raíz.....	82
4.7.3.8 Longitud de la raíz	82
4.8 INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS LOCALIDADES EN LA DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS QUE NODULAN A <i>C. brachystegia</i>.....	86
4.9 DESCRIPCIÓN ULTRAMICROSCÓPICA EN NÓDULOS.....	88
V. CONCLUSIONES	92
VI. RECOMENDACIONES.....	94
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
VIII. ANEXOS	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	17
Tabla 2: Ubicación y condiciones ambientales de <i>C. brachystegia</i> en Ecuador y Perú.	22
Tabla 3: Componentes y volúmenes empleados para la amplificación por rep-PCR de los aislados de nódulos de <i>C. brachystegia</i> Benth.	27
Tabla 4: Temperaturas para la amplificación por BOX-PCR de los aislados de nódulos de <i>C. brachystegia</i>	28
Tabla 5: Componentes empleados para la amplificación por 16S RNAr de los aislados de nódulos de <i>C. brachystegia</i> Benth.	29
Tabla 6: Temperaturas utilizadas para las reacciones de amplificación del gen ribosomal 16S.	29
Tabla 7: Componentes empleados para la amplificación del gen <i>recA</i> de los aislados de nódulos de <i>C. brachystegia</i>	30
Tabla 8: Temperaturas utilizadas para las reacciones de amplificación del gen <i>recA</i>	30
Tabla 9: Características de las plantas, nódulos y suelo de las localidades monitoreadas.	35
Tabla 10: Valores del análisis de suelo obtenidos en cinco localidades de Perú y Ecuador.....	37
Tabla 11: Aislados a partir de nódulos de <i>C. brachystegia</i>	40
Tabla 12: Perfiles genómicos BOX-PCR generados de las cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	42
Tabla 13: Capacidad de producir acidez, alcalinidad o neutralidad de las Proteobacterias aisladas de <i>C. brachystegia</i>	53
Tabla 14: Crecimiento a diferentes temperaturas de las cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	55
Tabla 15: Crecimiento de rizobios aislados de <i>C. brachystegia</i> a diferentes temperaturas a las 48 horas de inoculado.	56
Tabla 16: Crecimiento a diferentes niveles de pH de las cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	58

Tabla 17: Rangos para evaluar el crecimiento a diferentes niveles de NaCl de las cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	60
Tabla 18: Porcentaje de germinación de semillas de rábano inoculadas con rizobios.....	69
Tabla 19: Valores estadísticos descriptivos de la longitud de radícula, obtenidas de la inoculación de rizobios en semillas de rábano.....	70
Tabla 20: Número de nódulos y reducción del acetileno (ARA).....	72
Tabla 21: Características de suelo y diversidad de rizobios asociados con <i>C. brachystegia</i> en el bosque seco tropical de Ecuador-Perú.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Localidades donde se colectaron nódulos de *C. brachystegia* en Ecuador y Perú.22
- Figura 2.** Imágenes de la colecta de la leguminosa *C. brachystegia* Benth. A, B y C) Flores, vaina, y clasificación *in situ* de un arbusto de *C. brachystegia* en el Jardín Botánico de Guayaquil (BG). D) Semillas colectadas en la Universidad de Guayaquil (UG), Facultad de Ciencias Naturales.....36
- Figura 3.** Arbustos de *C. brachystegia* encontrados en el Jardín Botánico (GY) (A) y Puyador (PY) (B) en Ecuador.36
- Figura 4.** Distribución de los aislados encontrados en nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.38
- Figura 5.** Secuencia de las cepas de rizobios obtenidas a partir de los nódulos encontrados en *C. brachystegia* B. A) Nódulos conservados en sílica gel. B) Nódulos en proceso de desinfección para su aislamiento. C) Colonias cremosas blanquecinas de *Bradyrhizobium* aisladas.38
- Figura 6.** Distribución de aislados mucoprodutores encontrados en los nódulos de *C. brachystegia*.39
- Figura 7.** Bacterias Gram negativas obtenidas en plantas autenticadas de *Phaseolus vulgaris* L. A) Nódulos con coloración rojiza y blanquecina localizadas en la misma raíz. B) Nódulos observados al estereomicroscopio con objetivo 2x. C) Nódulo activo, cepa CIAT 899. D) Tinción Gram con presencia de bacilos Gram negativos, característico de *Rhizobium*.39
- Figura 8.** Distribución de los 35 perfiles genómicos del grupo de Proteobacterias que pertenecen a géneros de rizobios encontrados en los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.45
- Figura 9.** Distribución de los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Burkholderia* encontrados en los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú, mediante el gen *recA*.....46
- Figura 10.** Número y distribución de los géneros de cepas bacterianas endofíticas asociadas a los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.....48
- Figura 11.** Árbol filogenético del gen *recA* secuenciado de aislados de *Rhizobium* y *Agrobacterium* de nódulos de *C. brachystegia* Benth. El árbol fue construido por el método Neighbor-Joining, usando la versión Mega 7.0. Los números de las ramas son valores de soporte de *bootstrap*.50

Figura 12. Árbol filogenético basado en secuencias del gen <i>recA</i> de <i>Bradyrhizobium</i> aislados de <i>C. brachystegia</i> , usando el método Neighbor-Joining. Los números de las ramas son valores de soporte <i>bootstrap</i> .	51
Figura 13. Porcentaje de la producción de acidez o basicidad de las cepas de rizobios en medio LMA-BT.	52
Figura 14. Número de cepas de <i>Bradyrhizobium</i> basadas en la filogenia del gen <i>recA</i> , consideradas mejor productoras de ácido en medio LMA-ABT, en Perú.	54
Figura 15. Comparación del crecimiento de los rizobios en nivel de pH 4 a las 48 horas.	59
Figura 16. Comparación del crecimiento de los rizobios en nivel de pH 8 a las 48 horas.	59
Figura 17. Cepas de rizobios crecidas a diferentes niveles de NaCl en medio LMA pH 7.	61
Figura 18. Crecimiento de las cepas de <i>Rhizobium</i> al 0,5 y 1% de NaCl a las 48 horas.	61
Figura 19. Crecimiento de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> a 0,25, 0,5, 1 y 2% de NaCl a las 144 horas.	61
Figura 20. Índice de solubilización de fosfato bicálcico de las cepas de rizobios.	62
Figura 21. Comparación del índice de solubilidad de las cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> solubilizadoras de fosfato tricálcico.	64
Figura 22. Comparación del índice de solubilidad de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> solubilizadoras de fosfato tricálcico.	64
Figura 23. Solubilización de las cepas de rizobios en fosfato bicálcico (A) y tricálcico (B).	65
Figura 24. A y B) Formación de halos de los rizobios en medio Cromo Azurol Sulfonato (CAS). C) Formación de halo de la cepa 33J <i>B. gladioli</i> .	65
Figura 25. Producción de halos de las cepas de rizobios en medio CAS, sideróforos.	66
Figura 26. Producción de AIA en rizobacterias aisladas de nódulos de <i>C. brachystegia</i> . Una mayor intensidad de color rojizo indica mayor producción de AIA.	67
Figura 27. Concentración de rizobios productores de ácido indol-acético.	68
Figura 28. Efecto de la inoculación de rizobios en semillas de rábano. A) Semillas inoculadas con rizobios. B y C) Efecto en la germinación de las cepas 30J y CIAT 899. R1, R2 y R3 indican una unidad experimental compuesta de 10 semillas.	68

Figura 29. Gráfico del porcentaje de germinación obtenido de la inoculación de rizobios inoculados en semillas de rábano.....	69
Figura 30. A) Plántulas de frejol caupí con nódulos empleados en el experimento de reducción del acetileno (ARA). B, C y D) Procesamiento de nódulos para el análisis de ARA en cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> , aisladas en <i>C. brachystegia</i>	71
Figura 31. Valores comparados de nódulos y ARA en cepas de rizobios, aisladas en <i>C. brachystegia</i>	71
Figura 32. Valores comparados de nódulos y ARA en cepas de <i>Bradyrhizobium</i> , aisladas en <i>C. brachystegia</i>	72
Figura 33. Porcentaje de plantas de frejol noduladas al ser inoculadas con cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> acorde a las repeticiones empleadas.	74
Figura 34. Porcentaje de germinación y número de trifolios, obtenidos de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> inoculados en semillas de frejol rojo (<i>P. vulgaris</i>).....	74
Figura 35. Comparación de la altura de tallo y número de nódulos, obtenidos de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> inoculados en semillas de frejol rojo (<i>P. vulgaris</i>).....	75
Figura 36. A) Raíces de frejol rojo var. red kidney noduladas con cepas de <i>R. tropici</i> y de <i>Agrobacterium</i> en el experimento de autenticación (B y C).....	75
Figura 37. Comparación del peso fresco y seco de la parte aérea de frejol rojo var. red kidney inoculados con cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	76
Figura 38. Plantas de frejol rojo red kidney, inoculados con <i>Agrobacterium</i> (83J)....	77
Figura 39. Plantas de frejol rojo red kidney a los 30 días de cultivo, inoculados con cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> (21J, 83J arriba y los controles N- y CIAT 899 abajo).....	78
Figura 40. Comparación del peso fresco, seco y longitud de raíz de plántulas de frejol rojo red kidney, inoculados con <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	78
Figura 41. Germinación de semillas de frejol caupí (<i>V. unguiculata</i>). A) Inoculado con <i>Bradyrhizobium</i> . B) Sin inocular.	79
Figura 42. Plántulas de frejol caupí (<i>V. unguiculata</i>) inoculado con <i>B. yuanmingense</i> (cepa LMTR 28).	80
Figura 43. Porcentaje de germinación y número de trifolios en frejol caupí inoculado con <i>Bradyrhizobium</i>	80
Figura 44. Número de trifolios, altura de tallo (cm) y número de nódulos en <i>V. unguiculata</i> inoculado con cepas de <i>Bradyrhizobium</i>	81

Figura 45. Peso fresco y longitud de raíz en <i>V. unguiculata</i> inoculado con cepas de <i>Bradyrhizobium</i>	82
Figura 46. Experimento de autenticación y efecto en el crecimiento de plantas de <i>V. unguiculata</i> inoculadas con cepas de <i>Bradyrhizobium</i> . A) Experimento en maceta en condiciones de vivero. B) Comparación del efecto en planta de cuatro de los tratamientos inoculados (superior) y no inoculados (inferior).....	83
Figura 47. Análisis de Clúster del efecto de las cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> en <i>P. vulgaris</i>	84
Figura 48. Análisis de Clúster del efecto de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> en <i>V. unguiculata</i>	85
Figura 49. Relación entre el pH del suelo, diversidad y Fijación de N ₂ de los <i>Rhizobium</i> en el bosque seco tropical.	86
Figura 50. Secuencia de la magnificación a 1.000x, 5.000x y 10.000x con SEM, al interior de un nódulo de frejol caupí (<i>V. unguiculata</i>), cepa 125J (<i>Bradyrhizobium</i> sp. grupo B3). A) Nódulo cortado transversalmente, exponiendo las celdillas (membrana peribacteroidal). B) Bacterias con forma de Bacilos colonizadores de los nódulos.	88
Figura 51. Microfotografías del interior de un nódulo de <i>V. unguiculata</i> , cepa 139J (<i>B. pachyrhizi</i>), mostrando el tamaño de los bacteroides rodeados de la membrana peribacteroidal a 10.000x.....	89
Figura 52. Microfotografías de la cepa CIAT 899, en <i>P. vulgaris</i> var. frejol rojo. A) Magnificación a 5.000x evidencia de la cepa control <i>R. tropici</i> en colonia, al interior del nódulo. B y C) Bacilos en el interior de una membrana peribacteroidal intacta. D) Medida de los bacteroides.....	89
Figura 53. Microfotografías del interior de un nódulo de <i>C. brachystegia</i> , cepa LMTR 28. A y B) Secuencia de la magnificación a 5.000x y 10.000x de <i>Bradyrhizobium</i> colonizando el interior del nódulo. C y D) Medida tomada a los bacteroides encontrados.	90
Figura 54. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) del interior de un nódulo de <i>C. brachystegia</i> , inoculada con la cepa LMTR 28. A y B) Secuencia de la magnificación a 13.000x y 18.500x con formas bacteroidales de <i>B. yuanmingense</i> . C y D) Bacteroides fijadores de nitrógeno en <i>P. vulgaris</i> , con gránulos blancos de poli-β-hidroxibutirato (PHB).	91
Figura 55. Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (MET) del interior de un nódulo de <i>C. brachystegia</i> , inoculada con la cepa 88J (<i>Agrobacterium</i> sp. grupo A2). CI: Cuerpo de inclusión de PHB; N: Nucleoide; M: Mesosoma; MP: Membrana plasmática; P: Pared celular.....	91

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis Taxonómico de las muestras vegetales colectadas en Guayaquil, Puyango (Ecuador) y Moyobamba (Perú).	113
Anexo 2. Análisis de muestra de suelo de Universidad de Guayaquil (Ecuador).	114
Anexo 3. Análisis de muestra de suelo del Jardín Botánico de Guayaquil (Ecuador).....	115
Anexo 4. Análisis de muestra de suelo de Puyango (Ecuador).	116
Anexo 5. Análisis de muestra de suelo de Moyobamba (Perú).	117
Anexo 6. Análisis de muestra de suelo de Bagua Grande (Perú).	118
Anexo 7. Efecto de 4 niveles de pH en el crecimiento de cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	119
Anexo 8. Efecto de diferentes niveles de NaCl en el crecimiento de cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	121
Anexo 9. Crecimiento e índice de solubilización de fosfato en medio con fosfato bicálcico de cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	122
Anexo 10. Crecimiento e índice de solubilización de fosfato en medio con fosfato tricálcico de cepas aisladas de <i>C. brachystegia</i>	123
Anexo 11. Producción de sideróforos de cepas de rizobios aisladas de nódulos de <i>C. brachystegia</i>	124
Anexo 12. Producción del ácido indol-acético a los 3 días de crecimiento de las cepas de rizobios.	125
Anexo 13. Efecto de las mejores cepas de rhizobia en el % de germinación y longitud de radícula de semillas de rábano.	126
Anexo 14. Subconjuntos de grupos generados del porcentaje de germinación de 11 cepas de rizobios, inoculados en semillas de rábano.	128
Anexo 15. Subconjuntos de grupos generados del tamaño radicular de 11 cepas de rizobios, inoculados en semillas de rábano.	129
Anexo 16. Fijación de nitrógeno por diferentes rizobios, con el método de la reducción del acetileno (ARA) en nódulos de <i>P. vulgaris</i> y <i>V. unguiculata</i>	130
Anexo 17. Evaluación de las cepas de <i>Rhizobium</i> noduladoras de plantas trampa....	131
Anexo 18. Efecto de cepas de <i>Rhizobium</i> en el crecimiento de plantas de frejol red kidney.....	132
Anexo 19. Estadísticos descriptivos del análisis de la Varianza del experimento de autenticación de <i>Rhizobium</i> en semillas de frejol red kidney.	134
Anexo 20. Estadísticos descriptivos del análisis de la Varianza del experimento de	

autenticación de <i>Bradyrhizobium</i> en semillas de frejol red kidney.	140
Anexo 21. Reportes de la estación meteorológica del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú.....	147

RESUMEN

En este trabajo de investigación se describen las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de los microorganismos aislados de los nódulos de una leguminosa endémica del bosque seco tropical. Las evaluaciones morfobioquímicas establecen concordancia con las descripciones fenotípicas de rizobia. Las técnicas moleculares BOX-PCR y amplificación de los genes 16S y *recA*, así como la ultramicroscopía, confirman la presencia de Proteobacterias simbiotes y acompañantes. Aquí se reporta por primera vez la especificidad simbiótica entre *Clitoria brachystegia* Benth. y sus rizobios hospederos. Se aislaron cuarenta y siete cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Burkholderia*, a partir de las raíces noduladas colectadas en cinco localidades con suelos que van de ácidos (pH 4,28) a neutros y ligeramente alcalinos (7,32), con alta humedad relativa promedio (83%), temperaturas cálidas (19 a 22,5 °C), hasta los 858 msnm de altitud. Además, se obtuvieron valores de solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético, sideróforos, crecimiento en diferentes niveles de temperatura, pH, salinidad, el efecto en la nodulación y crecimiento en plantas trampa; así como en valores de fijación simbiótica de nitrógeno, mediante la prueba de reducción de acetileno (ARA), con rangos significativos al ecosistema, que van desde 0,5 a 54,27 $\mu\text{mol etileno h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. El objetivo de esta investigación fue evidenciar la tipificación, relaciones taxonómicas, diversidad y una probable especificidad simbiótica de *C. brachystegia* con sus rizobios, este último quizás limitado por los factores edafoclimáticos particulares de un hábitat considerado como uno de los ecosistemas más amenazados del mundo; y, que en un futuro pudieran ser clave para la conservación y reforestación de esta leguminosa en peligro de extinción, reportada en la también llamada región tumbesina que comparten Perú y Ecuador.

Palabras Clave: *Rhizobium*, *Clitoria brachystegia*, 16S RNAr, bosque seco tropical.

ABSTRACT

In this research the morphological, biochemical and molecular characteristics of the microorganisms isolated from the nodules of a legume endemic to the tropical dry forest are described. Morphobiochemical evaluations establish agreement with the phenotypic descriptions of rhizobia. BOX-PCR molecular techniques and amplification of the 16S and *recA* genes, as well as ultramicroscopy, confirm the presence of symbiont and companion Proteobacteria. Symbiotic specificity between *Clitoria brachystegia* Benth is reported here for the first time. and its host rhizobia. Forty-seven strains of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Burkholderia* were isolated from nodulated roots collected in five locations with soils ranging from acidic (pH 4,28) to neutral and slightly alkaline (7,32), with high average relative humidity (83%), warm temperatures (19 to 22,5 ° C), up to 858 meters above sea level. In addition, phosphate solubilization values, indoleacetic acid production, siderophores, growth at different levels of temperature, pH, salinity, the effect on nodulation and growth in trap plants were obtained; as well as in symbiotic nitrogen fixation values, through the acetylene reduction test (ARA), with ranges significant to the ecosystem, ranging from 0,5 to 54,27 $\mu\text{mol ethylene h}^{-1} \text{g}^{-1}$. The objective of this research was to show the typification, taxonomic relationships, diversity and a probable symbiotic specificity of *C. brachystegia* with its rhizobia, the latter perhaps limited by the particular edaphoclimatic factors of a habitat considered one of the most threatened ecosystems in the world; and, that in the future could be key to the conservation and reforestation of this endangered legume, reported in the so-called Tumbes region shared by Peru and Ecuador.

Keywords: *Rhizobium*, *Clitoria brachystegia*, 16S RNAr, tropical dry forest.

I. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad biológica del nitrógeno, fósforo y potasio son de considerable importancia económica, debido a que son los principales nutrientes vegetales; donde el nitrógeno es el más susceptible a las transformaciones microbianas e indispensable en el protoplasma de plantas, animales y microorganismos (Alexander 2010).

Entre los nutrientes, el nitrógeno (N) es uno de los elementos limitantes para el desarrollo de las plantas, está clasificado dentro de los criterios de esencialidad como un macronutriente primario. Sin embargo, es conocido que los suelos de la zona tropical son en general pobres en N, lo que requiere el aporte de este elemento para lograr una alta productividad en los cultivos (Leite 2015).

Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno invaden las raíces de las plantas leguminosas, causando la formación de un crecimiento tumoral en la raíz llamado nódulo, y en su interior convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco para el crecimiento de la planta y de las bacterias, estableciendo una asociación mutualista (Bartha y Atlas 2002).

Cultivadas desde la antigüedad para alimentación humana, animal y mejora de los suelos, las leguminosas tienen la capacidad de beneficiarse de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) mediante simbiosis con las bacterias diazótroficas del suelo; conocidas como rizobios, que residen en el interior de los nódulos de sus raíces. La FBN es uno de los procesos más importantes para mantener la vida, pues proporciona alrededor del 70% de todo el nitrógeno requerido en los ecosistemas (Burns y Hardy 1975).

Existen más de 19.700 especies de plantas leguminosas en todo el mundo, pero solo unas pocas han sido investigadas por sus microsimbiontes. Muchos estudios han demostrado el potencial de los rizobios y los micronutrientes asociados para mejorar la FBN en leguminosas (Allen y Allen 1981; Thilakarathna *et al.* 2019), la capacidad PGPR (Angulo *et al.* 2014; Moreno *et al.* 2018) y la producción de polisacáridos (Lancheros *et al.* 2002; Acosta 2017).

En la actualidad, uno de los ecosistemas más amenazados del mundo son los bosques secos tropicales, y por su acelerada pérdida de cobertura vegetal, se encuentran restringidos a una pequeña fracción de su área de distribución histórica. Conocer su diversidad biológica, así como los factores que controlan su funcionamiento y estructuración resulta prioritario para desarrollar acciones de conservación efectivas (Espinoza 2012).

La leguminosa *Clitoria brachystegia* Benth., es un arbusto o árbol endémico de los bosques secos tropicales de Perú y Ecuador. Esta planta se encuentra actualmente en peligro de extinción (FAO 2005). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), en su libro rojo la clasifica en A4c (reducción del tamaño de la población observada, estimada, inferida, proyectada o sospechada, hasta un máximo de 100 años en el futuro), donde las causas de la reducción pueden no haber cesado o no ser entendidas y conocidas o pueden no ser reversibles (UICN 2012).

Jorgensen y León-Yáñez (1999) citado por Cornejo (2015), recomiendan cultivarla en suelos empobrecidos, debido a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno que forman nódulos en sus raíces. Los rizobios de leguminosas del género *Clitoria* han sido relativamente poco estudiados y hasta la fecha no existen reportes sobre los simbioses asociados a *C. brachystegia*.

La caracterización fenotípica, bioquímica, molecular, capacidad PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) Kloepper y Schroth (1978) y el efecto de las bacterias aisladas de los nódulos de *C. brachystegia* en las plantas; así como su relación con los factores edafoclimáticos, pretende contribuir al conocimiento de las interacciones planta-microorganismo-suelo de una leguminosa en peligro de extinción, colectada en una región endémica del bosque seco tropical; donde sus microorganismos pueden aportar información relevante para contribuir a la conservación, mitigación de la pérdida de biodiversidad de nuestros bosques nativos.

Objetivo principal

Caracterizar las bacterias aisladas del interior de los nódulos de *C. brachystegia*, encontradas en el bosque seco tropical de Perú y Ecuador.

Objetivos específicos

- Aislar bacterias del interior de los nódulos de *C. brachystegia*, encontradas en Perú y Ecuador.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente las bacterias aisladas.
- Identificar por taxonomía molecular las bacterias aisladas.
- Evaluar la capacidad PGPR y el efecto en plantas de las cepas identificadas.
- Evaluar la influencia de los factores físico-químicos de las localidades estudiadas frente a la diversidad de las bacterias que nodulan a *C. brachystegia*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 BOSQUE SECO TROPICAL

Los bosques secos tropicales (BST) son formaciones vegetales que se distribuyen desde el nivel del mar hasta aproximadamente 1.600 metros de altitud, con precipitaciones anuales entre 60 a 400 mm en las zonas bajas, así como prolongados periodos de sequía que generalmente duran entre seis y nueve meses; las temperaturas medias varían de 17 a 27 °C y la capa freática fluctúa entre 15 y 60 m de profundidad. Consecuentemente los procesos ecológicos son marcadamente estacionales y la productividad primaria neta es menor que en los bosques húmedos, debido a que solo se presentan en la temporada de lluvias (Linares-Palomino 2004).

Estos bosques tropicales se clasifican por su relieve fisiográfico en BST de montaña, BST de colinas y BST de llanura; este último constituye el más productivo. Así, el valor económico total de los servicios ecosistémicos del BST de llanura de Piura (Perú) asciende aproximadamente a S/. 73 millones de Soles por año, valor importante por su contribución a la economía local (Orihuela y Albán 2012).

La vegetación del BST la componen árboles, arbustos y hierbas, con reducido número de especies adaptadas a las condiciones áridas, sufriendo modificaciones anatómicas y fisiológicas. Tan es así que algunas especies pierden sus hojas en la época seca para reducir la transpiración (caducifolias), también hay especies que con la misma finalidad han evolucionado transformando hojas en espinas, mientras que otras especies presentan tallos abombados para almacenar más agua (familia Bombacaceae), pivotantes para aprovechar el agua subterránea (algarrobo) u hojas coriáceas como los del sapote (Otivo 2015).

Por otro lado, en los bosques tropicales las leguminosas noduladas pueden ser muy importantes, aunque la cantidad de nitrógeno fijado es muy variable. Considerados también como puntos críticos de la biodiversidad, debido a que no hay evidencia suficiente sobre el papel de las leguminosas noduladas en el funcionamiento general de éstos ecosistemas (Sprent *et al.* 2014).

2.2 DIVERSIDAD DE LEGUMINOSAS EN EL BOSQUE SECO TROPICAL

En República Dominicana y Costa Rica se evidencia una gran abundancia de leguminosas en el BST, el 88% de las cuales son maderables (May 2013). En Colombia prevalece principalmente especies de Leguminosae, que a nivel florístico es la familia que presentan mayor riqueza, con 61 especies y 37 géneros (Rodríguez *et al.* 2012).

En Ecuador, la diversidad de este bosque en la provincia de Loja es media, y está representada por 58 especies, 51 géneros y 29 familias, las más diversas son: Fabaceae, Leguminosae, Bombacaceae y Capparaceae (Aguirre 2013).

Las leguminosas son una de las familias con mayor número de especies en el norte peruano (región Tumbesina) (Ceroni 2003). Los BST tumbesinos compartidos entre el suroccidente del Ecuador y noroccidente del Perú, son considerados un hotspot muy amenazados por su alta diversidad y endemismo, algunas especies forestales están en listas rojas con algún grado de peligro (Romero-Saritama y Pérez 2016).

Acero y Rodríguez (1987), reconocieron en los BST la existencia de leguminosas con alta y media capacidad de fijación de nitrógeno, observando la tonalidad interior de los jugos o exudados de los nódulos; lo cual influye en la sostenibilidad de los bosques secos.

2.3 DISTRIBUCIÓN DE *Clitoria brachystegia* Benth.

En The plant List (2013), registra al género *Clitoria* con 178 especies de leguminosas predominantemente distribuidas en el continente americano. *C. brachystegia*, es una especie endémica de los bosques secos tropicales de Perú y Ecuador. Cornejo (2015) sitúa a *C. brachystegia* en el BST; en suelos arcillosos, calizos, rocosos y compactados, bien drenados. Con florecimiento y fructificación desde junio hasta noviembre, y en febrero. La especie está protegida en el interior del Bosque Protector Cerro Blanco, cerca de Guayaquil y en el bosque petrificado de Puyango, provincia de Loja. Mientras que Neill y Pittman (2004) la describen como infrecuente en los alrededores de Guayaquil, pero observada en grupos cerca de algunos arroyos en el Bosque de Puyango en Ecuador.

En Perú, *C. brachystegia* ha sido reportada en los departamentos de Lambayeque, Cajamarca y La Libertad; considerando que los bosques de la costa ecuatoriana forman parte de la región tumbesina (135.000 km²), compartidos entre Ecuador y Perú, desde la provincia de Esmeraldas en el norte del Ecuador hasta el departamento de La Libertad en el NW de Perú

(entre 0-2.000 m). Es un área muy conocida por su alto nivel de endemismo de especies de flora (Aguirre *et al.* 2006; Aguirre 2012).

2.4 AISLAMIENTO DE *Rhizobium* EN *Clitoria*

Si bien no existen reportes sobre aislamiento de bacterias de nódulos de *C. brachystegia*, si se han reportado bacterias de otras especies de *Clitoria*. Ahmad *et al.* (1984) caracterizaron cepas de rizobios de varias leguminosas silvestres en Jamaica, incluyendo un aislado de *C. ternatea* y otro de *C. verrucosa*, determinando a través del análisis de fenotipos y serología que los aislados pertenecían al grupo de rizobios de crecimiento lento. Sosa *et al.* (2004), aislaron e identificaron por características morfológicas y culturales 50 cepas de diversas leguminosas rastreras entre ellas 19 cepas de *C. ternatea* en Cuba, encontrando cepas con características de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, aunque en el estudio no diferenciaron cuál de estos géneros correspondió a las cepas de *C. ternatea*. En otro estudio de la diversidad de cepas aisladas de *C. ternatea* en el noroeste de Brasil (Messias *et al.* 2010) se encontraron varios grupos con características morfológico-culturales de varios géneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Es importante mencionar que las características fenotípicas usadas en los estudios anteriores no permiten realizar una determinación taxonómica inequívoca en el caso de los rizobios. Por ese motivo otros estudios han usado el análisis de secuencias de ADN. Así, en el marco de un trabajo para determinar la afiliación taxonómica de un grupo de rizobios aislados de diversas leguminosas de todo el mundo, Menna *et al.* (2006) analizaron las secuencias del gen ribosomal 16S de la cepa SEMIA 6053 aislada de *C. ternatea* en Malasia y la cepa SEMIA 6412 obtenida de *C. fairchildiana* en Brasil, determinando que pertenecían a los géneros *Bradyrhizobium* y *Burkholderia*, respectivamente.

Duangkhet *et al.* (2018), aislaron 11 rizobios de los nódulos de *C. ternatea* en Tailandia e investigaron la filogenia del gen ribosomal 16S y de la región espaciadora transcrita interna (ITS), mostrando que todos pertenecieron al género *Bradyrhizobium*, 10 al grupo de *B. elkanii* y uno al de *B. japonicum*. En México, se ha reportado una cepa de *Rhizobium grahamii* aislada de *C. ternatea* (López-López *et al.* 2012).

En otro estudio con *C. ternatea*, Nunes *et al.* (2018) usaron un enfoque polifásico (caracteres morfológicos y genéticos) para caracterizar 45 aislamientos de nódulos en Brasil. La secuenciación del gen ribosomal 16S de seis de dichos aislados identificó que uno

correspondió a *Bradyrhizobium* y otro a *Rhizobium* (n=1), mientras que el resto correspondieron a los géneros no rizobianos *Leifsonia* y *Bacillus*. La presencia de bacterias distintas a rizobios en los nódulos de *C. ternatea* también ha sido reportada por Aeron *et al.* (2015), mediante secuenciación de gen 16S, cepas de *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*. Estos autores no pudieron aislar rizobios y ninguna de las bacterias encontradas volvió a nodular la planta huésped, evidenciando así una aparente predominancia de bacterias no rizobiales dentro de los nódulos, lo que supone que son más que simples colonizadores oportunistas de los nódulos.

De nódulos de *C. javitensis* en Panamá (Parker 2001) y *C. mariana* en E.E.U.U. (Parker 2012) se han identificado solo cepas de *Bradyrhizobium* mediante análisis de secuencias del gen ribosomal 16S u otros genes. Coelho *et al.* (2018) aislaron principalmente cepas de *Bradyrhizobium* de *C. fairchildiana* en Brasil, aunque también encontraron bacterias endófitas de los géneros *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* y *Leifsonia*. Por otro lado, Binde *et al.* (2009) analizaron una cepa de *C. fairchildiana* aislada en Brasil y determinaron que pertenecía al género *Rhizobium*.

2.5 TAXONOMÍA DE LOS RIZOBIOS

Rhizobia es uno de los grupos más estudiados en la microbiota de las plantas. Son oligotróficos, α y β proteobacterias simbióticos de sus leguminosas hospederas. La mayoría de rhizobia están en el suelo, compitiendo con la microbiota antes de infectar las leguminosas y formar bacteroides para fijar N_2 . Este dramático estilo de vida y desarrollo de cambios están soportados por largos genomas y por un complejo pan-genoma, que acompaña a toda su población y sujetos a un intercambio genético rápido (Poole *et al.* 2018).

En bacterias, los genes que codifican los ARNr se organizan en operones ribosómicos (*rrn*), e incluyen genes para 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*). La filogenia del gen *rrs* (comprende a la división Proteobacteria), la mayoría en α -Proteobacteria: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*; y β -Proteobacteria con *Burkholderia* y *Wautersia* (Lloret y Martínez-Romero 2005).

Los géneros grampositivos *Bacillus* y *Micromonospora* considerados PGPR se han reportado en nódulos de soja y *Lupinus angustifolius*. Por lo tanto, ahora se espera que los nódulos pueden albergar muchas bacterias distintas de rhizobia con múltiples funciones, incluida la fijación de nitrógeno (Trujillo *et al.* 2010; Agrawal *et al.* 2012).

2.5.1 Taxonomía bacteriana

Brock (1979), menciona que la taxonomía busca descubrir el orden en el aparente caos de la diversidad biológica, a través de la construcción de un esquema de clasificación que permita reconocer la similitud del organismo en estudio frente a los organismos previamente caracterizados. Siendo la taxonomía una actividad amplia, filosóficamente orientada; que difiere de la identificación, práctica y orientada; y, de la nomenclatura, que es la denominación de los organismos. El nombre es simplemente un manejo conveniente, que expresa en una especie de abreviatura las propiedades colectivas del organismo.

El mismo autor menciona también como unidad de la taxonomía microbiológica el clon o cepa, que es una población de células genéticamente idénticas derivadas de una sola célula. Siendo muy fácil aislar de la naturaleza un gran número de clones que reflejan la enorme diversidad de tipos microbianos. Pero, en un estudio taxonómico no se puede tratar con la totalidad de las bacterias, sino que se debe seleccionar un subgrupo para un estudio más detallado. Es muy deseable ensamblar una colección de cepas del subgrupo en estudio, para que se pueda determinar la variabilidad dentro del grupo.

Tradicionalmente, el estudio de la taxonomía bacteriana ha estado basado en técnicas de cultivo clásico estandarizado, medios selectivos, coloración de Gram y pruebas fisicoquímicas. Si bien en su momento estas técnicas fueron importantes, tienen limitaciones como el tiempo necesario para el crecimiento bacteriano, la interferencia por los antibióticos, el crecimiento de otros microorganismos, además de la extraordinaria capacidad de modulación genética de las bacterias gracias a fenómenos de mutación, recombinación e intercambios de genes (Aquino *et al.* 2017).

El gran avance en taxonomía bacteriana se produjo con la inclusión de los criterios filogenéticos propuestos por Woese y Fox (1977), demostraron que las estructuras y secuencias moleculares (genotipo) son las relaciones evolutivas más reveladoras que el uso de características morfológicas clásicas (fenotipo). De este modo, el gen ribosómico 16S se convirtió en la principal herramienta taxonómica utilizada en la última edición del Bergey's Manual (2012), que describe la sistemática, fisiología, ecología y hábitats de los distintos grupos de procariotas (Ramírez-Bahena *et al.* 2016).

El uso de técnicas moleculares ha provisto una descripción precisa de rhizobia. Los estudios de identificación y diversidad genética basados en técnicas de PCR, se logran con iniciadores

o cebadores universales que generan fragmentos que con frecuencia son llamadas huellas dactilares genómicas o *fingerprints* genómico (Van Belkum 1994; Louws *et al.* 1999).

2.5.2 *Rhizobium larrymoorei*

De acuerdo con la nomenclatura del género *Rhizobium* publicada por Young (2004), propone que *Agrobacterium larrymoorei* sea nombrado como *Rhizobium larrymoorei* comb. nov.

Bouzar *et al.* (2001) lo describen como un bastón gramnegativo y estricto aerobio; móviles con flagelos peritricos. Las colonias que crecen en el medio Roy-Sasser son de color blanco, crema con un centro rojo, 1 mm de diámetro, circular, convexo y brillante. La reacción de las cepas en la leche de tornasol es alcalina. Las cepas no producen 3-ketolactosa y no crecen a 35 °C. La prueba de citrato de amonio férrico es negativa.

Las cepas producen ácido del manitol y crecen en NaCl al 2%. Las cepas pueden diferenciarse de *Agrobacterium* por su capacidad para metabolizar los sustratos de carbono N-acetil D-glucosamina, gentiobiosa, m-inositol, lactulosa, mono-metil succinato, ácido D-L-láctico, ácido D-sacárico, glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato y por su incapacidad para metabolizar el tween 40 y 80, eritritol, α -lactosa-rafinosa, ácidos acético, cítrico, D-glucosamínico, malónico, succinámico, alaninamida, hidrox-D-prolina y ácido L-piroglutámico. Una característica clave que diferencia a esta especie de otras agrobacterias es su incapacidad para metabolizar el ácido cis-acónítico.

La cepa tipo de *A. larrymoorei* es AF3.10T (=ATCC 51759T=CFBP 5473T=NCPPB 4096T).

2.5.3 *Rhizobium endophyticum*

Rhizobium endophyticum (endofítica, dentro de las plantas), se aisló de raíces desinfectadas superficiales de *Phaseolus vulgaris* cultivados en laboratorio. Crece en LB medio, YM, PY y medio mínimo, usa como fuentes de carbono y nitrógeno asparagina y arginina. En medio PY forma colonias regulares perladas típicas de rizobios, en YM las colonias son semitranslúcidas y gomosas. El tiempo de duplicación es de 2,25 h en medio PY. Crece en NaCl al 3%, produciendo una biopelícula y sustancia amarilla. CCGE 2052 es resistente al ácido nalidíxico, carbenicilina y cloranfenicol. No crece a 37 °C en medio PY. Tiene la capacidad de solubilizar el fitato y usarlo como fuente de P y Ca. No tiene motilidad en agar (0,3%). La cepa tipo es CCGE 2052 (ATCC BAA-2116; HAMBI 3153), aislada en México. El contenido de ADN G + C (61,23%) (López-López *et al.* 2012).

2.5.4 *Rhizobium milunoense*

Rhizobium milunoense, son bacilos aerobios, gramnegativos, no forman esporas de 0,6-0,86 y 1,8-3,2 μm . Las colonias crecen en YMA, circulares, convexas, translúcidas y generalmente de 2 a 3 mm de diámetro después de 3 días.

La incubación es a 28 °C, en amigdalina, D-arabinosa, gluconato y malonato de calcio, meso-eritritol, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, inositol, lactosa, citrato, D-gluconato, succinato y DL-malato de sodio, maltosa, D-manosa, turanosa, rafinosa, L-ramnosa, salicina, sorbosa, sacarosa, trehalosa, D-xilosa, L-arginina, L-prolina y el ácido L-aspartico las usa como fuentes únicas de carbono. Como fuentes de N, usa DL-ácido aminopropiónico, L-arginina, L-ácido aspartico, L-cistina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, hipoxantina, L-isoleucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-valina, glicina, L-treonina y L-hydroxyprolina. Resistente a sensible a la ampicilina, cloranfenicol, neomicina y estreptomicina sulfato.

Crece de forma óptima entre 25-30 °C; puede crecer a 37 °C, pero no a 4 °C. El pH óptimo es 6-8. Sensible al 1% (w/v) NaCl en YMA. No crece en medio Luria-Bertani. La cepa tipo es CCBAU 41251T (5LMG 24208T5HAMBI 2971T), aislada de nódulos de la raíz de *Lespedeza* cultivadas en la provincia de Hunan, China. El contenido de ADN G + C de la cepa CCBAU 41251T es 58,4% en moles (Gu *et al.* 2008).

2.5.5 *Rhizobium multihospitium*

Son bacilos gramnegativos, aerobios, móviles, no forman esporas, van de 0,3 a 0,5 μm de ancho y 1-3 μm de largo. Las colonias crecidas en YMA son circulares, convexas, blancas, opacas y generalmente con diámetro de 1 a 2 mm en 2 a 3 días a 28 °C. Crece en YMA con 2% de NaCl. El crecimiento ocurre a 12-37 °C y pH 5-10 en YMA. Utiliza d-amigdalina, d-arabinosa, gluconato de calcio, meso-eritritol, d-fructosa, d-galactosa, d-glucosa, inositol, lactosa, malato de sodio, maltosa, d-manosa, turanosa, piruvato de sodio, rafinosa, L-ramnosa, salicina, citrato, formiato, gluconato y D-succinato de sodio, sorbosa, sacarosa, trehalosa, D-xilosa, DL-arginina, ácido DL-aspartico y DL-prolina como fuentes de carbono, DL-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, L-cistina, ácido D-glutámico, ácido L-glutámico, hipoxantina, L-isoleucina, L-lisina, L-fenilalanina, D-trononina, L-valina, glicina, L-treonina y L-hidroxi-prolina como fuentes únicas de nitrógeno. No utiliza ácido adípico, inulina, melezitosa, acetato, tartrato e hipurato de sodio, almidón soluble, ácido sirínico, ácido vanílico, glicina o l-metionina como fuentes únicas de carbono. Resistente a la kanamicina, eritromicina, neomicina, estreptomicina, cloranfenicol y ampicilina. Produce catalasa,

ureasa y oxidasa, pero no L-fenilalaninasa. El nitrato no lo reduce y no se observa reducción del azul de metilo. Produce ácido en la leche de tornasol. El contenido de G + C del ADN entre 65,3 a 66 % en moles (Han *et al.* 2008).

2.5.6 *Rhizobium viscosum*

La descripción coincide con la de *Arthrobacter viscosus*, excepto por la asimilación de citrato, que es negativa, y el crecimiento a 37 °C, que es positivo. Las características adicionales son: Crecimiento en NaCl al 1% (p/v) y reducción de nitrato. La hidrólisis de urea y esculina. La producción de α -arabinosidasa, α y β -glucosidasas, b-galactosidasas, b-glucosaminidasa, b-galactosaminidasa, b-fucosidasas, a y b-manosidasas, b-xilosidasa, aramenosidasa y fosfatasa alcalina. Sin producción de fosfatasa ácida, b-celobiasa y b-maltosidasa es débil. La producción de b-arabinosidasa, galacturonidasa, glucuronidasa, lactosidasa, a-maltosidasa y a-xilosidasa, indol, arginina deshidrolasa y gelatinasa. Asimilación de manosa, malato, L-ramnosa, N-acetil-glucosamina, D-ribosa, inositol, sacarosa, maltosa, manitol, glucosa, salicina, melibiosa, L-fucosa, L-sorbosa, L-arabinosa, Lactina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, itaconato, suberato, malonato, acetato, gluconato de 2 y 5 ceto-glucógeno, 3-hidroxibenzoato, L-serina, propionato, gluconato, caprato, adipato, fenilacetato, valerato, citrato, 3-hidroxibutirato y 4-hidroxibenzoato es negativa. Sensible a la ciprofloxacina, oxitetraciclina, cefuroxima, neomicina y gentamicina. Resistente a la eritromicina, penicilina, ampicilina, polimixina B y cloxacilina. La cepa tipo LMG 16473T (= CECT 908T), se aisló del suelo de Guatemala. El contenido de ADN G + C es de 61,5% en moles (Flores-Félix *et al.* 2017).

2.6 TAXONOMÍA DE *Bradyrhizobium*

2.6.1 *Bradyrhizobium tropiciagri*

Delamutta *et al.* (2015), describen a *B. tropiciagri* (*tropiciagri* de un pasto tropical, con capacidad de fijación de nitrógeno). Son bacilos gramnegativos, no forman esporas. Las colonias son de menos de 1 mm de diámetro, circulares, convexas y opacas, con baja producción de moco y ligeramente rosadas en medio YMA que contiene rojo Congo, después de 7 días de crecimiento a 28 °C. Produce una reacción alcalina en YMA con azul de bromotimol. Crece a ritmo de 7,42 h con pH 4,5-8,0 (pH óptimo 6,8) en caldo YM. No crece a 37 °C, ni en NaCl al 1% o en caldo LB. La prueba de actividad de la ureasa es positiva. Asimila D- y L-arabinosa, D-ribosa, D-galactosa, D-manosa y D-fucosa como fuentes de carbono. Muestra un crecimiento débil con D- y L-xilosa, D-adonitol, L-ramnosa, dulcitol,

D-mannitol, D-sorbitol, citrato de aesculina-hierro, D-lixosa, L-fucosa, D-arabitol, glicerol y D-fructosa y no crece con el eritritol, metil β -D-xilopiranosida, L-sorbosa, D-glucosa, inositol, metil α -D-manopiranosida, metil α -D-glucopiranosida, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutin, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, vitamina E, , rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, gentiobiosa, turanosa, D-tagatosa, L-arabitol, gluconato de potasio, 2-cetogluconato de potasio o 5-cetogluconato de potasio. Resistente a los antibióticos, eritromicina, cefuroxima, estreptomicina, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y bacitracina y moderadamente sensible a la neomicina. La cepa tipo CNPSO 1112T, fue aislada de un nódulo de *Neonotonia wightii* en Brasil y muy eficaz para fijar nitrógeno con la leguminosa huésped. Su contenido en ADN G + C es de 63,49% en moles.

2.6.2 *Bradyrhizobium liaoningense*

Bradyrhizobium liaoningense sp. nov. Los bacilos son de aproximadamente 0,5 por 1,5 a 4,5 mm. No forma esporas, Gram negativos. Las colonias son circulares, enteras, semitranslúcidas, elevadas, no mucoides y generalmente de 0,2 a 1 mm de diámetro entre los 7 a 14 días en YMA. Las cepas utilizan una estrecha gama de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes únicas de carbono.

Todas las cepas analizadas utilizan arabinosa, ácido glutámico y glutamato de sodio. La mayoría de las cepas asimilan ramnosa, xilosa, manosa, xilosa, ribosa, glutamina, sodio lactato, gluconato de sodio, piruvato de sodio y succinato de sodio. Las cepas estudiadas usan cistina, isoleucina, histidina, valina, ácido aspártico, monohidrocloreuro de arginina, glutamina, ácido glutámico, citosina y asparagina como fuentes únicas de nitrógeno.

La mayoría de las cepas también utilizan metionina, serina, triptófano, lisina, prolina, arginina, tirosina, leucina y prolina. Producción de álcali ocurre en YMA (pH 7,45 a 8). La temperatura y pH óptimos de crecimiento son de 25 a 30 °C y de 6,5 a 6,8, respectivamente. La tolerancia de las cepas a los antibióticos es menor que la de otras *Bradyrhizobium* spp. La cepa tipo de *R. liaoningense* es 2281 (Xu *et al.* 1995).

2.6.3 *Bradyrhizobium daqingense*

Bradyrhizobium daqingense presenta bacilos gramnegativos, aerobios, no formadores de esporas. Las colonias en medio YMA son blancas, translúcidas, circulares, y de 1 mm de diámetro después de 7 días de incubación a 28 °C. El tiempo de generación de la colonia es de 10 horas. El rango de pH para el crecimiento es 6-9 y el óptimo es 7,0. El crecimiento

entre 28 y 37 °C, y temperatura óptima de 28 °C. Las bacterias se debilitan en presencia de NaCl al 1%. El tipo de cepa puede utilizar ácido acético, propiónico, succínico, succinámico y α -cetoglutárico, α -D-glucosa, L-fucosa, mono-metil éster y no utiliza D-serina, D-celobiosa, D, L - α -glicerol fosfato, D-glucosa-6-fosfato, hidroxil-L-prolina, inosina, L-histidina, putrescina, timidina, ácido γ -aminobutírico 2,3-butanodiol. La cepa tipo CCBAU 15774T (= LMG 26137T = HAMBI 3184T = CGMCC 1,10947 T 29 se aisló de un nódulo de *Glycine max* en la ciudad de Daqing en la provincia de Heilongjiang, China. El contenido de ADN G + C es de 61,2 mol% (Wang *et al.* 2013).

2.7 TAXONOMÍA *Burkholderia*

Coenye *et al.* (2000), evidencian que la secuencia 16S rDNA de *Pseudomonas antimicrobica* cepa LMG 18920T fue muy similar a *Burkholderia gladioli* LMG 2216T (X67038) ($97 \pm 8\%$), *Burkholderia glumae* LMG 2196T (U96931) ($97 \pm 9\%$) y *Burkholderia plantarii* LMG 9035T (U96933) ($98 \pm 2\%$). Niveles de similitud con los miembros del complejo *Burkholderia cepacia* (entre 97 ± 2 y $97 \pm 4\%$) y con otras *Burkholderia*.

Los niveles de similitud con otros taxones pertenecientes a las β -proteobacterias fueron inferiores a $87 \pm 2\%$. Estos datos indican inequívocamente que *P. antimicrobica* pertenece al género *Burkholderia*, con *B. gladioli*, *B. glumae* y *B. plantarii* como sus parientes más cercanos. Los resultados de hibridación ADN-ADN revelaron que el valor de ADN-ADN entre *P. antimicrobica* LMG 18920T y *B. gladioli* LMG 2216T fue alto (96%). Los niveles de ADN-ADN entre *P. antimicrobica* LMG 18920T y las cepas tipo *B. glumae* (14%) y *B. plantarii* (19%) fueron bajos. Estos datos mostraron inequívocamente que *P. antimicrobica* LMG 18920T y *B. gladioli* representan el mismo taxón.

Palleroni (1984); Attafuah y Bradbury (1989); Gillis *et al.* (1995) y Coyne *et al.* (2000), coinciden en que las características fenotípicas de la cepa LMG 18920T y *B. gladioli* fueron muy similares, las diferencias son la incapacidad de LMG 18920T para utilizar adipato, malato y m-tartrato y para acumular poli- β -hidroxibutirato, y la incapacidad de *B. gladioli* para hidrolizar esculina. Sin embargo, se debe tener cuidado al comparar estos datos obtenidos con diferentes metodologías.

2.8 CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS

Las bacterias de vida libre o asociativas que habitan la rizosfera pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de varios mecanismos como: síntesis de sustancias

reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo. Entre los más estudiados se encuentran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Loredo-Osti *et al.* 2004).

Moreno *et al.* y Chi *et al.* (2018), mencionan que las interacciones de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) con el medio biótico-plantas y microorganismos son muy complejas y utilizan diferentes mecanismos de acción para promover el crecimiento de las plantas, como la biofertilización, fitoestimulación y el biocontrol.

Santillana (2007) y Gonzales (2013), consideraron los rasgos fenotípicos, simbióticos, capacidad PGPR y moleculares para caracterizar cepas de rizobios aislados de *Vicia faba* L. Incluyendo pruebas de crecimiento a diferentes niveles de temperatura, salinidad, pH, solubilización de fosfatos y AIA en suelos de Perú.

Los géneros *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Pantoea* fueron aislados y caracterizados de nódulos de las raíces de la fabácea *Onobrychis* en el desierto de Uzbekistán e identificados con la amplificación del gen 16S (Shakirov *et al.* 2010). Con la misma herramienta Angulo *et al.* (2014) identificaron y caracterizaron las rizobacterias pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus* en raíces de *Eucalyptus nitens* en invernadero.

Leite (2015), citando a Meyer *et al.* (2015) menciona que las bacterias aisladas de los nódulos de las leguminosas que no pueden nodular el huésped se consideran bacterias endofíticas y que estos autores identificaron una amplia diversidad de bacterias endofíticas de nódulos. Los autores caracterizaron 654 aislamientos obtenidos de nódulos de 30 especies de leguminosas en Bélgica y caracterizaron 50 géneros diferentes, la mayoría de ellos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus*. Según los autores, de los 50 géneros encontrados, 33 se informaron por primera vez en nódulos como: *Pantoea*, *Corynebacterium*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, *Micromonospora* y *Xanthomonas*.

En el caso del género *Burkholderia* considerado como buen productor de sideróforos, varios autores sugieren que puede ser usado como biocontrolador (Suárez-Moreno *et al.* 2012), con gran potencial en procesos biotecnológicos (Compant *et al.* 2008) y como eficaz promotor de crecimiento vegetal por su capacidad productora de exopolisacáridos, solubilizadora de fosfatos e inhibición de patógenos (Bolívar-Anillo *et al.* 2016).

2.8.1 Caracterización de rhizobia

Las bacterias del grupo rhizobia son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos, que están en una misma clasificación por su capacidad para nodular las leguminosas (Somasegaran *et al.* 1981).

El aislamiento de rizobios de los nódulos incluye varios pasos para separarlos de los contaminantes, pruebas para caracterizar y autenticar los aislados; para luego evaluar su efectividad potencial; es decir su capacidad de fijar nitrógeno (N₂) con las leguminosas. El medio de cultivo comúnmente utilizado para el aislamiento de rizobios es el LMARC o YEM (extracto de levadura, manitol, agar, rojo Congo), que además contiene fosfato dipotásico, sulfato de magnesio y cloruro de sodio (Allen y Allen 1981; CIAT 1988).

López-Alcocer *et al.* (2017) destacan que los estudios de caracterización morfológica y bioquímica en el género *Rhizobium* se han utilizado con diferentes y múltiples propósitos. Como las descritas por Granda *et al.* (2013) en un remanente de bosque seco tropical en Loja (Ecuador) de 24 aislados con características de *Rhizobium* de crecimiento rápido (2 a 3 días), coloración blanca o rosada, bordes lisos y ondulados y figura elevada y plana en el frejol *Phaseolus vulgaris* L.

Padmanabhan *et al.* (1990), estudiaron las características culturales y velocidad de crecimiento asociados con los cambios de pH en el medio, temperatura óptima y patrones de flagelación de *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., de leguminosas tropicales. Así como la capacidad de estos aislados de producir polihidroxibutiratos (PHB) (Hernández *et al.* 2012).

Un componente importante de la caracterización de los rizobios es la determinación de sus características fenotípicas como pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, salinidad, pH, fuentes de carbono y/o nitrógeno y determinación de capacidades relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal como producción de fitohormonas (Ferrera *et al.* 1993; Zúñiga 2012; Bolívar-Anillo *et al.* 2016), solubilización de fosfatos (Fernández *et al.* 2005; Walpola y Yoon 2013; Hernández *et al.* 2015) y antagonismo contra hongos fitopatógenos (Kim *et al.* 1997).

La capacidad de las cepas inoculantes para leguminosas tropicales para solubilizar fosfatos inorgánicos fue evaluada por Marra *et al.* (2011), compararon cepas de *Bradyrhizobium* sp., *B. elkanii*, *B. japonicum* y *Rhizobium tropici* (CIAT 899), y como control positivo a *Burkholderia cepacia* (LMG 1222T). Sridevi y Mallaiah (2009) reportaron también valores

de 4 a 10 mm de índice de solubilización en cinco especies de *Rhizobium* en leguminosas tropicales de la India.

En el caso de la producción de AIA (Ácido Indol-3-acético), como principal auxina vegetal, por la vía IPA (Indol-3-Piruvato) ha sido descrita en diversas bacterias, como el fitopatógeno *Pantoea agglomerans* y en las bacterias benéficas *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Enterobacter cloacae* (Vega-Celedón 2016) y en *Bradyrhizobium elkanii* ICA8001 (Hernández *et al.* 2015).

Los rizobios pertenecen a varios géneros dentro de las subdivisiones alfa y beta Proteobacterias (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Burkholderia*, entre otros). Las especies de *Rhizobium* son de crecimiento rápido, mientras *Bradyrhizobium* crece lentamente, forma nódulos en las plantas de soya, altramuza, chícharos (*Vigna sinensis*), y en diversas leguminosas tropicales; mientras que *Rhizobium* forma nódulos en judías, alfalfa, tréboles y gran parte de otras leguminosas (Atlas y Bartha 2002). Otras diferencias entre estos géneros se presentan en la Tabla 1.

Sin embargo, varios investigadores mencionan que la determinación del género y especie a la que pertenece un rizobio no puede ser realizado sólo en base a sus características fenotípicas y bioquímicas, sino que requiere de técnicas y herramientas de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de genes marcadores, en un enfoque polifásico (Bécquer 1998; Pérez *et al.* 2008; Cuadrado *et al.* 2009; Rivera 2012; Ramírez-Bahena *et al.* 2016; Bécquer *et al.* 2016).

El gen ribosomal 16S es empleado en filogenia y taxonomía bacteriana por su estructura y funciones constantes, transmisión vertical no sujeta a transferencia génica horizontal entre microorganismos. Además, este gen es utilizado en bacterias cultivables y no cultivables (Jiménez 2007). Si el objetivo es identificar una bacteria desconocida sin conocimiento previo, el gen ribosomal 16S es la mejor elección. El análisis de este gen constituye el eje principal sobre el que se estructuran las últimas ediciones del libro de referencia taxonómica bacteriana Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Fernández *et al.* 2010).

Tabla 1: Características de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Carácter	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
Flagelados en medio líquido	Ninguna	Ninguna
Flagelados en medio sólido	Peritrica	Un flagelo polar o subpolar
Velocidad de crecimiento	Normalmente rápida	Normalmente lenta
Localización de los genes <i>nod</i> y <i>nif</i> .	Principalmente en un plásmido.	Principalmente en el cromosoma.
Rango de especificidad con el hospedador.	Normalmente reducido	Normalmente amplio
Importancia agrícola	La mayoría de las leguminosas, cereales y forraje.	Soya

FUENTE: ATLAS Y BARTHA (2002).

Ribeiro *et al.* (2013) evidenciaron nuevos linajes de *Rhizobium* aislados de frejol común (*Phaseolus vulgaris* L.) originarios de los Andes y Mesoamérica, empleando análisis del gen 16S y cuatro secuencias de genes housekeeping (*recA*, *glnII*, *gyrB* y *rpoA*). Adicionalmente, la caracterización molecular de los rizobios puede incluir los perfiles genómicos que son propios de cada cepa mediante la técnica de rep PCR, usando cebadores BOX A1R o ERIC.

Las secuencias repetidas REP, ERIC y BOX son altamente conservadas en los genomas de rizobios y otras bacterias de gran utilidad para realizar discriminaciones a nivel de cepa (Van Belkum 1994; Xue *et al.* 1999; Giongo *et al.* 2008; Patiño y Sánchez 2012).

Patiño y Sánchez (2012), emplearon técnicas moleculares BOX-PCR y el análisis del gen 16S, en el análisis de biodiversidad microbiana asociada a la rizosfera del cultivo de *Bactris ambifaria*. Las mismas herramientas moleculares fueron empleadas por Rickli *et al.* (2009) para identificar y recomendar las cepas *Burkholderia*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, originarias de suelos tropicales de Brasil en la fabricación de inoculantes comerciales.

2.9 INTERACCIÓN *Rhizobium*-LEGUMINOSA-SUELO-AMBIENTE

El éxito ecológico de las leguminosas puede estar influenciado por sus simbioses bacterianas (Selosse *et al.* 2004). Existen ejemplos de uso de rizobios para complementar la conservación de leguminosas en peligro, para lo cual se requiere tener conocimiento de la diversidad y características de los simbioses asociados a la planta (Navarro *et al.* 2014).

Por otro lado, varias investigaciones mencionan que las poblaciones de leguminosas de

diferentes regiones geográficas difieren en la diversidad y composición de las especies de rizobios asociados con ellas, en relación directa con las condiciones locales (Bissett *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011; Li *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013).

El medio ambiente influye en el desarrollo de la asociación simbiótica, provocando alteraciones en la fisiología del hospedero y el desarrollo de los nódulos. La nodulación se logra generalmente en todas las temperaturas del suelo que tolera la planta, pero la abundancia en los nódulos se reduce en temperaturas extremas. La duración del día e intensidad lumínica y altos niveles de CO₂ disminuye o aumenta el número de nódulos respectivamente (Alexander 2010).

Los microorganismos se encuentran en casi todos los ambientes y cada uno presenta un rango de temperatura de crecimiento, con una temperatura mínima, debajo de la cual no se evidencia el crecimiento; una óptima, donde este es máximo y una máxima, por encima de la cual el crecimiento cesa (Madigan *et al.* 2004).

En relación a los factores físico-químicos en la interacción planta-*Rhizobium*, Frioni (2011) menciona que, aunque esta bacteria es muy sensible a la acidez, diferentes cepas de una misma especie son muy sensibles al pH. El encurvamiento de los pelos radicales se detiene a 4,5 y eleva a pH 5,5. Mientras que siendo los rizobios mesófilos, habitan casi todos los ecosistemas terrestres. Los rizobios de las leguminosas tropicales soportan un amplio rango de temperaturas, sin embargo, la temperatura del suelo afecta a la fijación, aunque la tolerancia a temperaturas extremas varía con las especies. *Rhizobium* es más sensible a la salinidad que la mayoría de las bacterias.

Fernández (2005), menciona que la ocurrencia de los factores de estrés ambientales (temperatura, humedad, acidez, alcalinidad, etc.) afecta la supervivencia de los rizobios, disminuyendo el número y peso de nódulos de la población de cepas, reduciendo la producción de la biomasa vegetal de su hospedante.

Cao *et al.* (2014) reportaron 226 cepas de rizobios aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* de 9 ecorregiones localizadas en el norte y sur de la República Popular China, con pH de suelos entre 8,06 a 4,97. Identificaron 4 especies *Bradyrhizobium*, *R. leguminosarum*, *R. etli* y *Rhizobium* sp. Concluyen además que la diversidad de los rizobios del frejol demuestra la posible evolución y emergencia de nuevos rhizobia bajo la selección combinada entre la planta hospedera, patrones geográficos y condiciones del suelo.

Beukes *et al.* (2019) identificaron 88 aislados de la leguminosa *Vachellia karroo*, al sur de África; para el nivel de género usaron el análisis 16S y para especie, el gen *recA*. Sus resultados mostraron cuatro géneros de Alfaproteobacterias (*Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*) y una Betaproteobacteria, muchos de los cuales parecían ser nuevos para la ciencia. Demostrando además que *V. karroo* es un huésped promiscuo capaz de formar nódulos efectivos con alfa y beta-rhizobia, lo que podría ser una fuerza impulsora detrás del éxito ecológico de esta especie arbórea.

2.10 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

Castillo y Cárdenas (1987) manifiestan que, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un proceso restringido a muy pocas especies de microorganismos, quizá por su alto coste energético y su extrema sensibilidad al oxígeno, pero de extraordinaria importancia bioquímica, genética, microbiológica y agrícola.

La naturaleza pone al dinitrógeno (N_2) a disposición de la vida por medio de un grupo reducido de bacterias con capacidad de romper el triple enlace que une los dos átomos de la molécula. El proceso se denomina fijación del nitrógeno. Esas bacterias especializadas viven en la tierra y en las aguas dulces y saladas; mantienen relaciones simbióticas con las raíces de leguminosas, que figuran entre las cosechas más importantes del mundo (Townsend y Howarth 2010).

En los hábitats terrestres la FBN es llevada a cabo por los rizobios que representan la mayor contribución de nitrógeno combinado. La tasa de fijación de nitrógeno de los rizobios simbióticos suele ser 2 o 3 órdenes de magnitud superior a la tasa de fijación de las bacterias fijadoras de vida libre en el suelo (Atlas y Bartha 2002).

Las reacciones claves de la FBN ocurren en las células infectadas por *Rhizobium* en forma de bacteroides en el tejido central del nódulo. Las formas bacteroidales difieren de las células normales en su morfología, también presentan alteraciones en los citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones y además contienen nitrogenasa activa (Azcón *et al.* 1983).

La molécula clave en la ruta de la FBN es la nitrogenasa, contenida en todos los microorganismos fijadores de N_2 (simbióticos o de vida libre). Ningún organismo carente de nitrogenasa puede fijar N_2 (Brill 1977).

Por otra parte, la estimación de la FBN es necesaria para evaluar los efectos de las interacciones específicas leguminosa-*Rhizobium*-ambiente (Danso *et al.* 1993). El estudio de la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa se lleva a efecto con el objetivo de comparar la fijación simbiótica de N₂ y la producción de biomasa (Epping *et al.* 1994).

Los estudios de la tasa de fijación del N₂ avanzaron mucho con la prueba de la reducción del acetileno, basada en que la enzima nitrogenasa reduce el acetileno a etileno. De este modo, la tasa de formación de etileno es también una medida de la actividad de fijación de N₂ o de la nitrogenasa (Atlas y Bartha 2002).

Para la cuantificación de la tasa de fijación de N₂, los investigadores dependen principalmente del ensayo de reducción de acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄) por la nitrogenasa, en lugar de reducir N₂ a NH₃ (Crews *et al.* 2001).

Zúñiga (1997), experimentó con el efecto de la salinidad en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium* sp. obteniendo valores representativos de la fijación de nitrógeno mediante la actividad reductora de acetileno (ARA). Pliego *at al.* (2003), comparan durante el ciclo vegetativo de *P. vulgaris*, la fijación de nitrógeno con dosis de KNO₃, empleando el ARA; en ambos casos se consideró la cepa CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

He *et al.* (2011) manifiestan que la inoculación de *Rhizobium* aumentó significativamente el ARA en comparación con el control no inoculado. La capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas seleccionadas osciló entre 1,56 y 20,51 μmol de C₂ H₄.

Duangkhet *et al.* (2018), reportaron dos cepas de *Bradyrhizobium* con capacidad de nodular y fijar nitrógeno en su huésped *Clitoria ternatea*, con niveles más altos de actividad de reducción de acetileno en nódulos infectados con la cepa de *B. elkanii* con respecto a *B. japonicum*.

Las leguminosas silvestres noduladas y adaptadas a las condiciones climáticas locales, pueden ser vitales para la fertilidad del suelo y el ciclo del nitrógeno, como fuente importante para las cepas rizobianas de élite. Los rizobios simbióticos naturales de estas leguminosas silvestres exhiben una mayor tolerancia a las condiciones adversas predominantes como el estrés salino, la temperatura elevada y la sequía, que pueden ser importantes para aumentar la productividad de los cultivos de leguminosas cuando se inoculan de forma cruzada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

- Agitador mecánico orbital (MRC)
- Autoclave horizontal (Barnstead)
- Baguetas
- Balanzas analíticas (Sartorius) y de platillo (OHAUS Scout ProSP202)
- Beakers 250 mL y 500 mL (PIREX)
- Bolsas de papel y polietileno
- Cámara fotográfica digital (Panasonic)
- Congeladores de -20 (Whirlpool) y -80°C (Sanyo)
- Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A, USA)
- Espectrofotómetro (Genesys 6 - ThermoElectron Corp.)
- Estereomicroscopio (Leica MZ6)
- Estufa eléctrica de 28 °C
- Horno de secado (Mettler)
- Matraces Erlenmeyer 250 mL, 500mL y 1L
- Microcentrífuga (Sigma)
- Micropipetas automáticas 1-2 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, y 100-1.000 µL
- Microscopio (Leica EC 3)
- Microtubos 1,5 mL y 200 µL
- Pinzas, tijeras y asas de metal
- Placas Petri de vidrio y plástico 90 x 15"
- Potenciómetro (Hanna Instruments pH 211)
- Probetas 10mL, 25mL, 50mL, 100mL, 250mL, 500mL y 1.000mL
- Cámara de germinación (FríoCell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH)
- Termociclador (Eppendorf AG 22331 Hamburg)
- Vórtex (Gemmy UM-300)

3.2 MARCO TEMPORAL Y UBICACIÓN

Todos los experimentos se desarrollaron en el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB), Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina de Lima, Perú (UNALM). Los muestreos se realizaron durante los meses de diciembre 2015 a julio 2016, en los remanentes de Bosque Seco Tropical (Figura 1), en las diferentes condiciones ambientales de cada localidad de Perú y Ecuador (Tabla 2). Las muestras vegetales y suelo se identificaron en el Herbario de la Universidad de Guayaquil (Ecuador) y en el Laboratorio del Departamento de Recursos Hídricos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM, Perú), respectivamente (Anexo 1).

Tabla 2: Ubicación y condiciones ambientales de *C. brachystegia* en Ecuador y Perú.

Localidad	Temp.	Humedad relativa	pH suelo	Ubicación geográfica	Altitud msnm
Universidad Guayaquil (UG)	27 °C	88%	6,27	2° 8'55.83"S; 79°54'56.75"O	7
Jardín Botánico Guayaquil (BG)	27 °C	88%	6,98	2° 4'47.14"S; 79°54'36.94"O	60
Puyango (PY)	22,5 °C	79%	4,28	3°52'27.0"S; 80°02'56.3"W	366
Bagua Grande (PB)	23 °C	83%	6,98	5°45'26"S; 78°26'43"O	576
Moyobamba (MY)	19 °C	79%	7.32	6°02'00"S; 76°58'00"O	858



Figura 1. Localidades donde se colectaron nódulos de *C. brachystegia* en Ecuador y Perú.

3.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, TRATAMIENTO Y SIEMBRA DE LOS NÓDULOS MACERADOS

Las raíces con nódulos de *C. brachystegia* fueron colectadas, conservadas y procesadas acorde al protocolo de trabajo del Manual de Microbiología Agrícola (Zúñiga 2012).

Con ayuda de una pala de jardín se extrajo la raíz, escarbando con mucho cuidado 20 cm alrededor y 10 cm de profundidad de cada planta encontrada. Los nódulos se colectaron en microtubos de 1,5 ml con sílica gel y algodón para su conservación hasta el laboratorio, asignándoles un código acorde al lugar de muestreo y número de planta colectada.

En el laboratorio, los nódulos se hidrataron en agua destilada por 30 minutos, dentro de sobres de papel filtro. Acorde al protocolo de desinfección, se sumergieron en alcohol al 70% por un minuto, luego en solución de lejía al 3% por tres minutos, enjuagados con agua destilada estéril por siete veces o hasta eliminar remanente de lejía. Con ayuda de pinzas estériles se abrieron los sobres con los nódulos y se colocaron en placas Petri, agregando una gota de agua estéril a cada uno y con una bagueta estéril se procedió a macerar cada nódulo.

El macerado se sembró en placas Petri con medio extracto de levadura manitol agar con rojo Congo (LMA-RC) por estrías paralelas. El rojo Congo en concentración 0,25% se añadió a razón de 10 mL/L de medio (pH 7-7,01). Las placas se incubaron a 28 °C por 24 a 72 horas para *Rhizobium* sp. y de 5 a 7 días para *Bradyrhizobium* sp., asignándoles un código único para cada aislado obtenido. Obtenidos los aislados, se realizaron las pruebas para identificación y caracterización de las cepas bacterianas (Zúñiga 2012).

3.4 CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Los aislados se sembraron en caldo extracto de levadura manitol (LMC), incubándolos de 48 a 72 horas en un agitador de tubos a 150 rpm y 28 °C. Luego se colocaron en criotubos de 2 mL con glicerol estéril (crioprotector) al 20% en proporción 1:1 (inóculo-glicerol). Se homogeneizó la mezcla en un vortex, se rotuló y almacenó en criocajas a -80 °C.

3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA: DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS RIZOBIOS AISLADOS DE *C. brachystegia*.

Para la caracterización fenotípica se empleó un objetivo 100x inmersión en aceite y tinción Gram para observar la forma y reacción de las células bacterianas cultivadas. La

ultramicroscopía se realizó como servicio en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima), empleando los microscopios electrónicos de barrido (MEB) Inspect S50 (FEI) y de transmisión (MET) que permitió evidenciar la presencia y formas bacterianas al interior de los nódulos (Padmanabhan *et al.* 1990). La descripción macroscópica incluyó la forma, coloración y consistencia de la colonia; y la velocidad de crecimiento de los aislados, sembrados por triplicado en el medio LMA-RC (Ferrera *et al.* 1993; Zúñiga 2012).

3.6 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA: PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS

Las pruebas de caracterización bioquímica se realizaron una vez reactivadas las cepas en tubos con 4 mL de LMC hasta obtener poblaciones de 10^8 UFC/mL, por triplicado. Mediante las técnicas de sembrando por estrías y por gota (5µL de inóculo) en el medio de cultivo formulado correspondiente, incluyendo las cepas testigos: CIAT 899 y LMTR 28, y agua destilada estéril como testigo sin inóculo. Los diámetros de colonias bacterianas y las zonas de efecto alrededor de las colonias bacterianas sembradas se midieron utilizando un calibrador digital DIGIMESS.

3.6.1 Producción de acidez o alcalinidad

Se sembraron las cepas en medio extracto de levadura manitol agar con azul de bromotimol (LMA-ABT 0,5% en NaOH 0,016N), mediante estrías e incubadas de 3 a 7 días; evaluando el cambio de color del medio: azul indica alcalinidad, amarillo acidez y sin cambio es neutro.

3.6.2 Prueba de crecimiento a diferentes niveles de temperatura

Las cepas fueron sembradas mediante gota del inóculo en la superficie de las placas con LMARC. Luego se incubaron a las temperaturas 6 °C, 28 °C, 35 °C y 40 °C. El efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas se evaluó mediante la medición del diámetro de la colonia entre los 7 y 14 días de crecimiento en las 3 repeticiones.

3.6.3 Prueba de crecimiento a diferentes niveles de pH

Se sembró por medio de gota en LMARC ajustado con los siguientes pH: 4, 5, 7 y 8; luego se incubaron a 28 °C. Se evaluó midiendo el tamaño de las colonias, entre los 7 y 14 días.

3.6.4 Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

Se sembró por medio de gota en LMARC ajustado con las siguientes concentraciones de

NaCl 0,25%, 0,5%, 1% y 2%. Las placas se incubaron y evaluaron por 7-14 días evaluando el crecimiento de cada colonia (CIAT 1988; Bernal y Graham 2001).

3.6.5 Detección de bacterias solubilizadoras de fosfato bicálcico y tricálcico

La metodología para evaluar las cepas solubilizadoras de fosfatos se realizó en base al protocolo empleado por Nautiyal (1999). Empleando el medio de cultivo National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) con fosfato bicálcico o tricálcico, respectivamente. La evaluación se realizó tomando como positivas las cepas que formaron un halo alrededor de los 5 µL de la gota sembrada en el medio sólido.

Los resultados de la medición se utilizaron para calcular el índice de solubilización (IS) (Berraqueiro *et al.* 1976), que se determinó como la relación del diámetro de la zona de solubilización al diámetro de la colonia. La eficiencia de la solubilización se evaluó según la escala formulada por Silva Filho y Vidor (2000).

3.6.6 Detección de la producción de sideróforos

Se realizó en base al protocolo usado por Schwyn y Neilands (1987), modificado por Loudon *et al.* (2011). Se empleó el medio CAS (Cromoazurol S) y el HDTMA (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) como indicador. Previamente todo el material de vidrio se lavó con HCl 6M y enjuagó tres veces con agua bidestilada, para remover algún elemento traza. Se evaluaron como positivas las cepas que crecieron en el medio de cultivo y mostraron presencia de un halo transparente/amarillento alrededor de la cepa sembrada.

3.6.7 Producción del ácido Indol Acético (AIA)

Para la detección del AIA se empleó la metodología para bacterias del grupo *Pseudomonas* seguida por Naik y Sakthivel (2006), *Rhizobium* y otros PGPR (Zúñiga 2012).

Se sembró cada cepa en tubos con 3 mL de caldo LMC suplementado con el aminoácido L-triptófano (5 mM) y se incubaron a 13, 22, 28 y 37 °C por 7 días. Se evaluó la producción de AIA con una alícuota de 500 µL en un microtubo de 1,5 mL, centrifugándolo a 12.000 rpm por 5 minutos. Luego, se tomó 250 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensayo. Se agregó 1 mL de reactivo de Salkowski (proporción 1:4) a cada tubo, incubando por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se evaluó el viraje de color de la solución a tonalidades rojizas y se midió en el espectrofotómetro a 530 nm. El nivel producido de AIA (µg/mL) se estimó por una curva estándar determinada previamente.

3.6.8 Prueba de germinación en semillas inoculadas con rizobios

Una de las pruebas más utilizadas para conocer el efecto de un extracto celular o cultivo bacteriano en otras semillas no leguminosas, es el test de Zucconi *et al.* (1981), también llamado de fitotoxicidad. Mediante el empleo del sobrenadante de un cultivo bacteriano para evaluar la germinación y crecimiento de semillas de plantas de respuesta rápida, como es el caso del berro, rábano, pimiento, tomate, etc.

Se reactivaron las bacterias con mejores resultados en las pruebas bioquímicas, en 3 mL del medio LMC hasta alcanzar densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Luego se centrifugaron los caldos de crecimiento a 10.000 rpm por 5 min, en condiciones de esterilidad, para sedimentar las bacterias. Se pasaron 400 µL del caldo sobrenadante a microtubos rotulados. Las semillas se sumergieron en agua destilada estéril por 2 horas. Posteriormente se colocaron 12 semillas dentro de placas Petri que contenían papel filtro estéril humedecido, se inoculó 10 µL del sobrenadante en cada semilla, con tres réplicas por cepa. Como testigo sin inocular se adicionó solo agua destilada estéril a las semillas. Finalmente se rotularon las cajas Petri de los diferentes tratamientos y se colocaron en cámara de germinación a 25 °C por 3 días en completa oscuridad.

Las semillas empleadas para este experimento fueron Rabanito Crimson Giant, de la empresa Hortus S.A. (www.hortus.com.pe). Se evaluó la germinación y la longitud del crecimiento de la raíz de cada plántula de rábano (*Raphanus sativus*). Los resultados se expresan como índice de germinación:

$$\text{IG (\%)} = (\%G \times \%L) / 100$$

%G= Porcentaje de germinación.

%L= Porcentaje de la longitud del crecimiento de la raíz de cada plántula.

3.7 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS RIZOBIOS AISLADOS

DE *C. brachystegia*

3.7.1 Extracción de ADN

Las bacterias fueron cultivadas y reproducidas en tubos con 3 ml de caldo peptona extracto de levadura (PY) (peptona 0,5%, extracto de levadura 0,3% y Ca Cl₂ 0,09%) a 28 °C por 48 h y 200 rpm de agitación (Noel 1984). Una vez obtenida la concentración bacteriana mínima (1x10⁶ UFC/mL) se siguió el protocolo del Gene Jet Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific, USA). El ADN genómico extraído se almacenó a -20 °C en microtubos

debidamente rotulados. Se comprobó la calidad de ADN extraído, realizando una corrida de electroforesis, empleando gel de agarosa al 1% en tampón Tris Borato (TBE) 1x, por 60 min a 80V. Se reveló el gel de agarosa diluyendo el reactivo stock Gel Red TM 10.000X en la solución de gel de agarosa a 1:10.000 (0,5 µL/50 mL de agarosa), para finalmente observar en el transiluminador y obtener la imagen.

Se utilizó ADN del fago Lambda digerido con la enzima *Hind* III como marcador de peso molecular. Las concentraciones de ADN se calcularon por absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm, empleando un equipo Nanodrop 2.000 C (Thermo Scientific, USA). El ADN genómico de las cepas se diluyó a una concentración estándar de 10 ng/µL, para su posterior uso en las reacciones de amplificación de los genes escogidos.

3.7.2 Generación de perfiles genómicos

Los perfiles se generaron mediante la técnica rep-PCR, por su considerada simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales) y alta confiabilidad (Versalovic 1994), empleando el iniciador BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). Se consideró un volumen de reacción de 50 uL. La concentración de los stocks, volúmenes de reacción, concentración final de los reactantes y el programa de amplificación se detallan en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Se comprobó la presencia de las bandas de amplificación realizando una corrida de electroforesis, con gel de agarosa al 1% en tampón TBE a 80V por 180 minutos. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb ADN Ladder Plus.

Tabla 3: Componentes y volúmenes empleados para la amplificación por rep-PCR de los aislados de nódulos de *C. brachystegia* Benth.

Componente	Stocks	V1 para una reacción (uL)	Conc. Final
Agua (MilliQ)	-	2,24	-
Oligo BOX A1R	25 pmol/uL (= uM)	2	50 pmoles
dNTPs	10 nM (c/u)	3,125	1,25 mM (c/u)
Buffer KCl - Mg Cl ₂	10x	2,5	1x
Mg Cl ₂	50 mM	7,5	7,5mM
Taq Pol	5 U/uL	0,4	2 U
DMSO	100%	2,5	10%
ADN diluido (10ng/uL)	-	5,0	50 ng

Tabla 4: Temperaturas para la amplificación por BOX-PCR de los aislados de nódulos de *C. brachystegia*.

PASO		TEMPERATURA (° C)	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	3 min
2	Desnaturalización	93	45 s
3	Alineamiento	53.4	1 min
4	Extensión	65	8 min
		(Paso 2 al 4 se repite 25 veces)	
5	Extensión final	65	16 min
6		4	

Las imágenes de los geles electroforéticos revelados con los productos de amplificación se alinearon en función a los marcadores de peso molecular. Se compararon los perfiles generados de cada cepa obtenida, con bandas en común que mostraron el mismo peso molecular.

Se consideraron perfiles diferentes a aquellos que mostraron al menos una banda diferente.

3.7.3 Amplificación del gen ribosomal 16S

Se amplificó fragmentos del gen ribosomal 16S casi completo mediante PCR (Weisburg *et al.* 1991). La concentración de los stocks, volúmenes de reacción, concentración final de los reactantes y el programa de amplificación se detallan en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

Se comprobó la amplificación del gen 16S mediante la corrida en gel de electroforesis a 60 V por 150 minutos.

Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb ADN Ladder Plus.

Tabla 5: Componentes empleados para la amplificación por 16S RNAr de los aislados de nódulos de *C. brachystegia* Benth.

Componente	Stocks	V1 para una reacción (uL)	Conc. Final
Agua ultra pura (MilliQ)	-	31,8	-
Primer fD1	10 μ M (= 10 pmol/ μ L)	2	0,4 μ M
Primer rD1	10 μ M (= 10 pmol/ μ L)	2	0,4 μ M
dNTPs	10 mM (c/u)	1	200 μ M (c/u)
Taq Buffer KCl	10x	5	1x
Mg Cl ₂	25 mM	3	1,5mM
Taq ADN Polimerasa	5 U/ μ L	0,2	1 U
ADN diluido (10ng/ μ L)	-	5,0	50 ng

Tabla 6: Temperaturas utilizadas para las reacciones de amplificación del gen ribosomal 16S.

PASO		TEMPERATURA (° C)	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	94	3 min
2	Desnaturalización	94	45 s
3	Alineamiento	55	45 s
4	Extensión	72	2 min
		(Paso 2 al 4 se repite 30 veces)	
5	Extensión final	72	5 min
6		4	

3.7.4 Amplificación del gen constitutivo *recA*

Se amplificó fragmentos de aproximadamente 550 pb del gen *recA* (Gaunt *et al.* 2001), mediante una mezcla de 50 μ L. El gen *recA* codifica para la proteína recombinasa A requerida en la replicación del ADN. Las concentraciones de los stocks, los volúmenes de reacción y concentración final de los reactantes; y el programa de amplificación se detallan en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7: Componentes empleados para la amplificación del gen *recA* de los aislados de nódulos de *C. brachystegia*.

Componente	Stocks	V1 para una reacción (uL)	Conc. Final
Agua ultra pura (MilliQ)	-	31,8	-
Oligo <i>recA</i> 6F / <i>recA</i> 41F	25 pmol/uL (= uM)	2,0	50 pmoles
Oligo <i>recA</i> 55R/ <i>recA</i> 640R	25 pmol/uL (= uM)	2,0	50 pmoles
dNTPs	10 nM (c/u)	1,0	1,25 mM (c/u)
Buffer KCl	10x	5,0	1x
Mg Cl ₂	50 mM	3,0	7,5mM
Taq Pol	5 U/uL	0,2	2 U
ADN diluido (10ng/uL)	-	5,0	50 ng

Tabla 8: Temperaturas utilizadas para las reacciones de amplificación del gen *recA*.

PASO		TEMPERATURA (° C)	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	5 min
2	Desnaturalización	94	44 s
3	Alineamiento	50	1 min
4	Extensión	72	1:30 min
		(Paso 2 al 4 se repite 30 veces)	
5	Extensión final	72	5 min
6		4	

3.7.5 Secuenciación y análisis de secuencias

Una vez amplificados los fragmentos de los genes 16S y *recA* se enviaron a secuenciar como un servicio externo por la compañía Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur). A partir de los cromatogramas obtenidos por la secuenciación, las secuencias fueron editadas con el programa Chromas Lite, versión v2.01. Las secuencias de ARNr 16S se verificaron, alinearon y empalmaron para su identificación con la herramienta BLASTN, y fueron comparadas con las del GenBank (National Centre for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; (Altschul *et al.* 1990; Benson *et al.* 2017) y con el servidor EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Kim *et al.* 2014).

Las relaciones filogenéticas se infirieron usando el método Neighbor-Joining, con las distancias genéticas de Tamamura-Nei y mediante un análisis de *bootstrap* inferido con 500 réplicas. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo mediante el paquete de software MEGA 7.0 (Felsenstein 1985; Angulo *et al.* 2014).

3.8 AUTENTICACIÓN DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS Y SU EFECTO EN LA NODULACIÓN Y FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

3.8.1 Desinfección y germinación de las semillas

Para la autenticación de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se emplearon las variedades red kidney (*Phaseolus vulgaris* L.) y caupí (*Vigna unguiculata*), que son capaces de formar nódulos con cada rizobio. Las semillas fueron hidratadas colocándolas en vasos de precipitación con 400 mL de agua destilada estéril por 2 horas.

Posteriormente, se empleó un protocolo de desinfección de las semillas con alcohol al 70%, luego con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos en ambos casos, luego se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril hasta obtención de nivel cloro 0 (cero), testeado con *kit* analizador de pH y cloro marca Humboldt Pool. Con pinzas estériles se tomaron las semillas de cada variedad por cepa inoculada acorde al tratamiento, y se colocaron en placas Petri con la base cubierta de papel filtro humedecido con agua estéril, se colocaron en cámara de germinación (FrioCell) a 24 °C por 72 horas en oscuridad.

3.8.2 Evaluación de la germinación de las semillas de leguminosas

La germinación de las semillas se evaluó cada 24 horas, considerando los parámetros: porcentaje de germinación, número de radículas con punta roma, número de radículas con punta fina y necrosis radicular.

3.8.3 Trasplante de semillas a macetas

Para la autenticación se escogieron las semillas que presentaron radículas con punta fina, se colocaron en placas Petri para proceder a quitar el pericarpio con ayuda de bisturí y pinzas estériles. Luego se transfirieron a macetas de 1 kg de capacidad con sustrato de arena-vermiculita fina en proporción 1 a 1 (v/v), previamente esterilizados en tres tiempos a 121 °C por 30 min. Se realizaron los respectivos controles de la pureza del sustrato estéril, mediante diluciones y siembra en medios papa dextrosa agar (PDA) y LMA, para evaluar el crecimiento de hongos y bacterias, respectivamente.

3.8.4 Preparación del inóculo

Se reactivaron las cepas de rizobios conservadas a -80 °C, se tomaron 20 µL de cada una para sembrarlas por estrías en medio LMARC y luego de 72 horas, verificar su pureza para pasarlas a tubos con tapa con 4 mL de caldo levadura manitol (LMC), luego se incubaron a 28 °C por 2 a 5 días (según el tiempo de crecimiento) hasta obtener una población de 10⁸.

3.8.5 Inoculación de las plántulas

La inoculación de las plántulas se realizó en dos tiempos, al momento de sembrar en maceta y a los 7 días posteriores a la siembra. En cada tiempo, se colocó 1 mL del inóculo bacteriano respectivo, a la altura del cuello de la raíz de cada brote y plántula, respectivamente. Las plántulas se regaron con solución nutritiva estéril de Broughton y Dilworth (SNBD) N+ (0,05% de KNO₃, concentración de nitrógeno de 70 ppm) y N- (sin nitrógeno), cada 3 o 5 días, acorde a requerimiento. No se aplicó ninguna sustancia química adicional para combatir patógenos. Se evaluó la aparición de nódulos a partir de los 25 a 30 días.

3.8.6 Condiciones del experimento

Para evaluar la efectividad de la nodulación de cada cepa se sembraron dos semillas desinfectadas, germinadas e inoculadas en cada maceta, procediendo a ralea a los 15 días, dejando la planta con mayor vigor. Las plantas se mantuvieron en el invernadero del LEMYB. Se empleó un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones. Las variables que permitieron inferir los resultados de las variables fueron: porcentaje de germinación, número de trifolios, número de nódulos, longitud de la parte aérea, peso fresco parte aérea, peso seco parte aérea, peso fresco raíz, peso seco raíz y longitud de raíz.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: Cepas control CIAT 899 o LMTR 28.

T2: Control sin inocular y sin nitrógeno (N-).

T3: Control sin inocular y con 70 ppm de nitrógeno (nitrato de amonio) (N+).

T4: Inoculado con la cepa respectiva.

Las condiciones meteorológicas de La Molina, acorde al sistema modificado de Köppen, le corresponde la clasificación de desierto subtropical árido caluroso (Cantaro-Segura *et al.* 2019). Durante el ciclo del cultivo de las leguminosas, la precipitación, humedad y temperatura media se determinó en el sitio experimental (Anexo 21).

3.8.7 Análisis de reducción del acetileno (ARA) para la determinación de la actividad nitrogenasa

Se tomó una muestra de raíces noduladas de 1 gramo de peso por cada uno de los tratamientos evaluados y se introdujeron en frascos con tapa de goma apropiados de 28 mL, se cerraron herméticamente con cinta Parafilm.

Se sustituyó el 10% del volumen de la atmósfera del frasco con acetileno y se incubó durante 1 hora a 32 °C. Para generar el acetileno, se hizo reaccionar piedras de carburo de calcio troceadas con agua en el interior de un recipiente de vidrio sellado y adecuado para evitar fuga y contaminación.

Posteriormente, con el fin de medir la concentración de etileno, 1 mL del recipiente colector herméticamente sellado de cada muestra fue inyectado en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A, USA) por dos ocasiones a los 15 y 30 minutos. Este modelo posee un detector de ionización de llama y una columna HP-PLOT/Q (30; 0,530; 40), detector FID-GC. Las condiciones del cromatógrafo para realizar esta prueba fueron temperatura del horno a 60 °C, temperatura FID a 250 °C y temperatura del puerto inyector a 250 °C.

La valoración de la actividad nitrogenasa para medir la concentración de etileno se expresó en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1} (\text{NDW}) \text{ h}^{-1} \text{ g}$ (Zúñiga 1997).

3.9 TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la mayoría de las pruebas en el laboratorio con los aislados obtenidos de los nódulos de *C. brachystegia*, se consideró a cada placa Petri como una unidad experimental con cinco repeticiones y empleando los controles respectivos (positivo y negativo), se utilizó un diseño completamente al azar, con análisis de varianza (ANOVA), con desviaciones estándar y comparación de medias, aplicando la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD).

Los experimentos de germinación en semillas de rábano y autenticación de rizobios se efectuaron con los respectivos tratamientos, incluyendo los controles positivos: *Rhizobium tropici*, cepa CIAT 899 en frejol red kidney y *Bradyrhizobium yuanmingense*, cepa LMTR 28 para frejol caupí (*Vigna unguiculata*), así como un control negativo con agua destilada, sin inoculación. Para evaluar el grado de asociación entre todas las características analizadas se realizó un análisis de los datos con herramientas estadísticas que incluyó el análisis estadístico descriptivo de los datos (promedio, valor mínimo y máximo) (Anexo 2).

Además, se determinaron las diferencias significativas para cada variable, luego se analizó el grado de variabilidad de los parámetros evaluados, a través de una prueba ANOVA (análisis de varianza) y el análisis de rangos múltiples de Tukey al 0,05% de límite de error, empleando el programa estadístico Info Stat/L versión 2018-I para las correlaciones entre variables del ensayo en plántulas de frejoles rojo (red kidney) y caupí.

Para la estimación de la diversidad de las poblaciones de *Rhizobium* encontradas se empleó el índice de Shannon-Weaver, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad y superiores a 3 son altos en diversidad de especies (Pla 2006).

Además, para obtener grupos de características compatibles entre las cepas aisladas, se realizó el análisis de clúster aglomerativo de distancias euclidianas ligado al método de Ward para inferir en el efecto de las cepas aisladas en las plantas trampa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 COLECCIÓN DE SUELOS, PLANTAS Y NÓDULOS

Se colectaron suelos, plantas y nódulos en cinco localidades de bosque seco tropical; tres ubicados en Ecuador (dos en Guayaquil, provincia del Guayas y uno en Puyango, provincia de Loja) y dos en Perú (Moyobamba y Bagua, Departamentos de Lambayeque y Amazonas, respectivamente). Las características climáticas de las localidades al momento del muestreo se indican en la Tabla 3 (ver materiales y métodos).

De manera general, en todas las localidades monitoreadas se encontraron pocas plantas, lo cual es consistente con su condición de planta en peligro de extinción (FAO 2005). En tres de las cinco localidades se encontró al menos una inflorescencia, sólo en PY y MY no hubo flores en los arbustos (Tabla 9).

Tabla 9: Características de las plantas, nódulos y suelo de las localidades monitoreadas.

Localidad	Código	No. plantas	Inflorescencia	Frutos	Color nódulos
Universidad Guayaquil	UG	2	Sí	Sí	Crema
Jardín Botánico Guayaquil	BG	9	Sí i	Sí	Rojizos
Puyango	PY	11	No	Sí	Crema y rojizos
Bagua Grande	PB	3	Sí i	Sí	Crema
Moyobamba	MY	2	No	Sí	Crema

4.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS VEGETALES

Las muestras de inflorescencia (Figura 2A) y vainas de las plantas colectadas (Figura 2B) en las zonas de muestreo en cinco localidades de bosque seco tropical, corresponden a una misma especie de árbol o arbusto, hasta los 10 m de alto; tronco hasta 30 cm DAP (figura 2C). Hojas trifoliadas, alternas, foliolos foliosos hasta cartáceos, ovados hasta amplio-elípticos, el terminal 6-12 x 4-9 cm, base obtusa hasta redondeada, ápice agudo hasta acuminado, margen entero; peciolos 5-15 cm. Las inflorescencias terminales, ramifloras y caulifloras, en racimos de 5-30 cm, subrectas a pendulares, flores de cáliz verde, corola blanca hasta rosada, bandera con pigmentaciones rojas; fruto legumbre de 10-25 x 1-2 cm, café claro, con nervios finos y prominentes, piloso, glabrescente; semillas color café oscuro, aplanadas, lisas, glabras (Figura 2D).

Con base en sus características, las muestras fueron clasificadas de la siguiente forma:

Clase: Equisetiopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Nývák ex. Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Género: *Clitoria*

Nombre científico: *Clitoria brachystegia* Benth.



Figura 2. Imágenes de la colecta de la leguminosa *C. brachystegia* Benth. A, B y C) Flores, vaina, y clasificación in situ de un arbusto de *C. brachystegia* en el Jardín Botánico de Guayaquil (BG). D) Semillas colectadas en la Universidad de Guayaquil (UG), Facultad de Ciencias Naturales.



Figura 3. Arbustos de *C. brachystegia* encontrados en el Jardín Botánico (GY) (A) y Puyango (PY) (B) en Ecuador.

4.3 ANÁLISIS DE SUELO

Las características del suelo evidencian que la localidad Universidad de Guayaquil (UG) presenta textura franco-arenosa, pH ligeramente ácido (6,27) y valores altos de fósforo (P), potasio (K) y materia orgánica (MO). En la localidad Jardín Botánico (BG); el suelo tiene textura franco arenoso, pH neutro, valor medio en P y MO, pero bajo en K y calcáreo total (CaCO₃). Puyango, posee suelo arcilloso de color rojizo, pH fuertemente ácido (4,28), valores bajos en materia orgánica (0,33%), valores medios en P y K; y sin valor de CaCO₃.

En las dos localidades muestreadas en Perú, Moyobamba y Bagua, los suelos tienen valores bajos a medianos en K, MO y CaCO₃, neutros en pH y alto a medianos en P (Tabla 10).

Tabla 10: Valores del análisis de suelo obtenidos en cinco localidades de Perú y Ecuador.

Características del suelo	Ecuador			Perú	
	BG	UG	PY	MY	PB
Tipo	FA*	FA	A	AF	FA
Valor de pH	6,98	6,27	4,28	6,98	7,32
Valor P ppm	12,59	33,18	11,28	26,22	13,91
Valor K ppm	62,4	490	176	84	91,2
M.O. %	3,62	8,69	0,33	2,15	2,66
Conductividad eléctrica (Ds/m)	1,05	0,84	0,12	0,41	0,78
CaCO ₃ %	0,23	0	0	0,21	5,46

* FA = FRANCO ARENOSO, A = ARCILLOSO, AF = ARENA FRANCA

4.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE NÓDULOS DE *C. brachystegia*

Se aislaron y purificaron bacterias a partir del interior de nódulos de *C. brachystegia* (Figuras 5A y 5B) colectados en las cinco localidades de bosque seco tropical mencionadas anteriormente. Las colonias obtenidas se repicaron en nuevas placas con medio LMA-RC hasta conseguir cultivos puros. Se obtuvieron 87 aislados en total, la mayoría correspondieron a las localidades PY y UG con 27,6 y 26,4%, respectivamente. Seguidos de PB con 20,7% y MY con 17,2%; mientras que el menor número de aislados se encontró en BG con el 8% de los aislados (Figura 4).

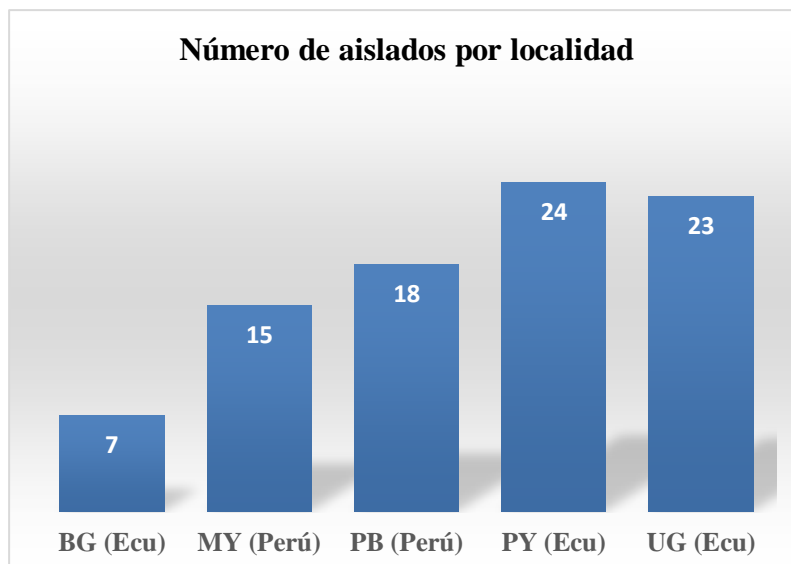


Figura 4. Distribución de los aislados encontrados en nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.

Se observaron 13 tipos morfológicos entre las cepas aisladas, el más abundante fue cremoso rosado (36,5%) (Figura 5 C) presente en 4 localidades, seguido de cremoso blanquecino (16,09%) en todas las localidades y el translúcido blanquecino (11,5%) en 3 de las 5 localidades.

La caracterización fisiológica de las cepas evidencia colonias cremosas, translúcidas, mucilaginosas y ligosas acorde a las caracterizaciones reportadas por Ferrera *et al.* (1993); Ahmad *et al.* (1984), Sosa *et al.* (2004), (Messias *et al.* 2010 y Zúñiga 2012).

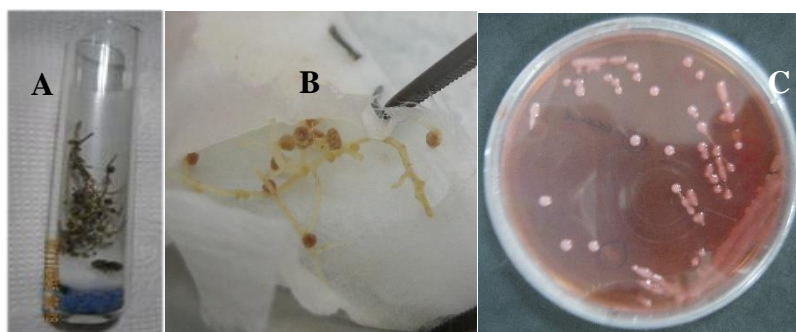


Figura 5. Secuencia de las cepas de rizobios obtenidas a partir de los nódulos encontrados en *C. brachystegia*. A) Nódulos conservados en sílica gel. B) Nódulos en proceso de desinfección para su aislamiento. C) Colonias cremosas blanquecinas de *Bradyrhizobium* aisladas.

El 68,9% de los aislados produjeron moco, también llamados exopolisacáridos (Figura 6), varios autores mencionan la importancia de esta capacidad de las rizobacterias y de sus posibles aplicaciones industriales (Lancheros *et al.* 2002 y Acosta 2017). El 10,34 y 28,74% de los aislados fueron buenos y medianos productores de exopolisacáridos, respectivamente. Todos los aislados productores de moco fueron Gram negativos, acorde a Ferrera *et al.* (1993) y Lancheros *et al.* (2002).

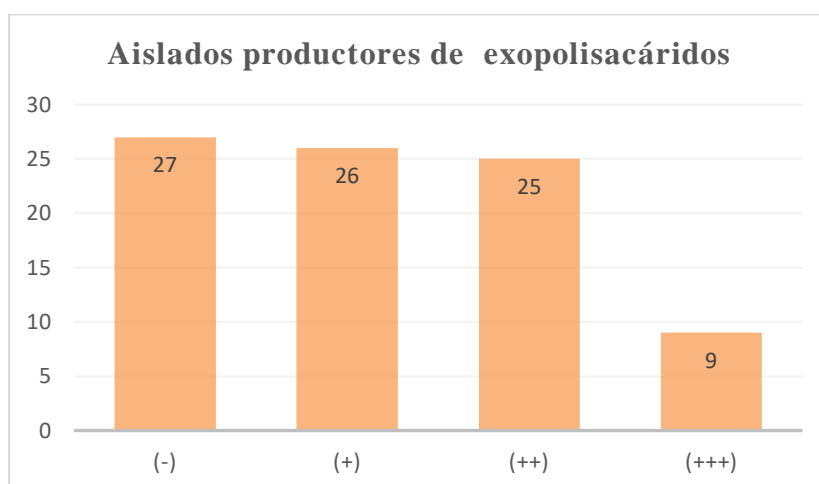


Figura 6. Distribución de aislados mucoproducidos encontrados en los nódulos de *C. brachystegia*.

Todos los aislados de nódulos (Figuras 7A, 7B y 7C) presentaron células de forma bacilar al microscopio (Figura 7D), siendo la mayoría Gram negativas a excepción de 6J, 18J, 19J, 32J, 104J y 105J con reacción Gram positiva. En la Tabla 11 se muestran el origen geográfico y las morfologías de los aislados obtenidos.

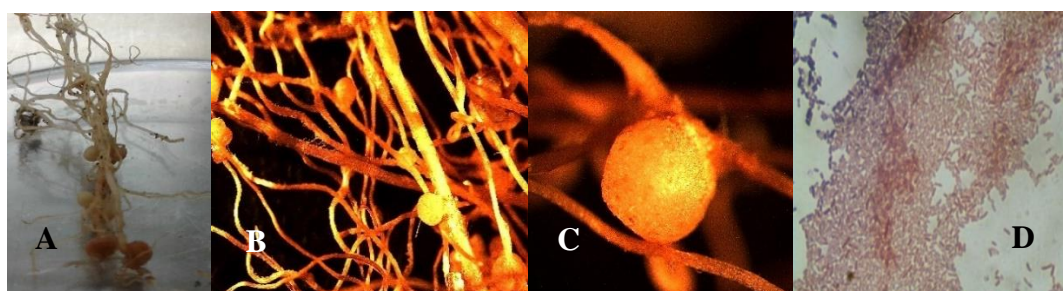


Figura 7. Bacterias Gram negativas obtenidas en plantas autenticadas de *Phaseolus vulgaris* L. A) Nódulos con coloración rojiza y blanquecina localizadas en la misma raíz. B) Nódulos observados al estereomicroscopio con objetivo 2x. C) Nódulo activo, cepa CIAT 899. D) Tinción Gram con presencia de bacilos Gram negativos, característico de *Rhizobium*.

La reacción Gram positiva de algunos aislados indicó la presencia de bacterias diferentes a rizobios (Ferrera *et al.* 1993). En nódulos desinfectados pueden encontrarse bacterias que no son *Rhizobium* (Shakirov *et al.* 2010; Rojas-Rojas *et al.* 2018), con morfología similar a ellos, por lo cual antes de continuar con las demás pruebas se realizó una caracterización molecular inicial para determinar la identidad de los géneros bacterianos de los aislados obtenidos de los nódulos.

Tabla 11: Aislados a partir de nódulos de *C. brachystegia*.

No.	Código cepas	Apariencia/color	Producción goma	Tinción Gram	Origen cepa
1	1J	Creмосa/rosada	(++)	(-)	UG (Ecu)
2	7J	Creмосa/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
3	26J	Creмосa/blanq	(++)	(-)	BG (Ecu)
4	27J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	BG (Ecu)
5	30J	Translúcida/rosada	(+)	(-)	BG (Ecu)
6	2J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	UG (Ecu)
7	29J	Creмосa/rosada	(+)	(-)	UG (Ecu)
8	35J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	BG (Ecu)
9	34J	Creмосa/blanq	(+)	(-)	UG (Ecu)
10	4J	Creмосa/naranja	(-)	(-)	UG (Ecu)
11	11J	Translúcida/rosada	(+)	(-)	UG (Ecu)
12	54J	Mucosa/blanq	(+++)	(-)	PY (Ecu)
13	5J	Translúcida/blanq	(+)	(-)	UG (Ecu)
14	6J	Creмосa/rosada	(-)	(+)	UG (Ecu)
15	17J	Creмосa/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
16	83J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	PY (Ecu)
17	84J	Creмосa/blanq	(+)	(-)	PY (Ecu)
18	14J	Creмосa/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
19	18J	Creмосa/rosada	(-)	(+)	UG (Ecu)
20	19J	Translúcida/rosada	(+)	(+)	UG (Ecu)
21	21J	Translúcida/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
22	8J	Translúcida/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
23	23J	Translúcida/rosada	(+)	(-)	BG (Ecu)
24	32J	Translúcida/blanq	(++)	(+)	BG (Ecu)
25	37J	Mucosa/blanq	(+++)	(-)	UG (Ecu)
26	38J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	UG (Ecu)
27	48J	Creмосa/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
28	49J	Creмосa/rosada	(-)	(-)	UG (Ecu)
29	39J	Creмосa/blanq	(+)	(-)	UG (Ecu)
30	40J	Creмосa/blanq	(-)	(-)	UG (Ecu)
31	42J	Creмосa/blanq	(+)	(-)	BG (Ecu)
32	33J	Creмосa/rosada	(+)	(-)	UG (Ecu)
33	44J	Creмосa/rosada	(++)	(-)	UG (Ecu)
34	58J	Creмосa/rosada	(+)	(-)	PY (Ecu)
35	59J	Creмосa/rosada	(+)	(-)	PY (Ecu)
36	56J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	PY (Ecu)
37	60J	Translúcida/iridiscent	(-)	(-)	PY (Ecu)
38	68J	Creмосa/rosada	(+)	(-)	PY (Ecu)
39	65J	Creмосa/roja	(++)	(-)	PY (Ecu)

Continuación...

40	70J	Cremosa/rojiza	(++)	(-)	PY (Ecu)
41	72J	Cremosa/rojiza	(++)	(-)	PY (Ecu)
42	75J	Cremosa/rojiza	(++)	(-)	PY (Ecu)
43	77J	Cremosa/rojiza	(++)	(-)	PY (Ecu)
44	66J	Cremosa/roja	(+++)	(-)	PY (Ecu)
45	85J	Translúcida/blanq	(+++)	(-)	PY (Ecu)
46	71J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	PY (Ecu)
47	73J	Translúcida/blanq	(++)	(-)	PY (Ecu)
48	78J	Cremosa/rosada	(++)	(-)	PY (Ecu)
49	80J	Cremosa/rosada	(+)	(-)	PY (Ecu)
50	87J	Translúcida/blanq	(+++)	(-)	PY (Ecu)
51	81J	Cremosa/blanq	(+)	(-)	PY (Ecu)
52	82J	Cremosa/blanq	(+)	(-)	PY (Ecu)
53	86J	Cremosa/rosada	(+)	(-)	PY (Ecu)
54	88J	Mucosa/blanq	(+++)	(-)	PY (Ecu)
55	90J	Cremosa/blanq	(+)	(-)	MY (Perú)
56	91J	Cremosa/rosada	(++)	(-)	MY (Perú)
57	96J	Cremosa/blanq	(++)	(-)	MY (Perú)
58	97J	Translúcida/rosada	(+)	(-)	MY (Perú)
59	98J	Cremosa/blanca	(-)	(-)	MY (Perú)
60	99J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
61	102J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
62	108J	Ligosa/rosada	(+)	(-)	PB (Perú)
63	104J	Cremosa/roja	(-)	(+)	PB (Perú)
64	105J	Cremosa/rojiza	(-)	(+)	PB (Perú)
65	106J	Cremosa/rosada	(+)	(-)	PB (Perú)
66	109J	Cremosa/rosada	(+)	(-)	PB (Perú)
67	111J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
68	117J	Cremosa/blanq	(-)	(-)	PB (Perú)
69	118J	Mucosa/rojiza	(++)	(-)	PB (Perú)
70	119J	Mucosa/rosada	(++)	(-)	PB (Perú)
71	124J	Cremosa/blanq	(++)	(-)	PB (Perú)
72	125J	Chorreada/rosada	(++)	(-)	MY (Perú)
73	127J	Mucosa/rosada	(+++)	(-)	MY (Perú)
74	132J	Ligosa/blanq	(+)	(-)	MY (Perú)
75	134J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	MY (Perú)
76	139J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	MY (Perú)
77	144J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	MY (Perú)
78	136J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	MY (Perú)
79	146J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
80	142J	Mucosa/rosada	(+++)	(-)	MY (Perú)
81	143J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	MY (Perú)
82	148J	Mucosa/blanq	(++)	(-)	PB (Perú)
83	150J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
84	151J	Cremosa/rosada	(-)	(-)	PB (Perú)
85	153J	Ligosa/blanq	(+)	(-)	MY (Perú)
86	157J	Ligosa/rosada	(+)	(-)	PB (Perú)
87	159J	Mucosa/rosada	(+++)	(-)	PB (Perú)

BLANQ = BLANQUECINA

SIN CRECIMIENTO (-); POCO CRECIMIENTO (+); MEDIANO CRECIMIENTO (++) ; BUEN CRECIMIENTO (+++)
 PRODUCCIÓN MOCO: SIN PRODUCCIÓN (-); POCA (+); MEDIANA (++) ; BUENA (+++).

4.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INICIAL PARA DETERMINACIÓN DEL GÉNERO

4.5.1 Perfiles genómicos rep-PCR

Dada su reproducción asexual, una población de bacterias está compuesta de grupos de células genéticamente idénticas derivadas de una sola célula madre. La técnica rep-PCR permitió generar perfiles genómicos para determinar cepas idénticas a nivel genómico (clonas) y así realizar el análisis de secuenciación solamente a cepas que sean diferentes unas de otras. La técnica se basa en la amplificación por PCR de largos fragmentos polimórficos ubicados entre secuencias palindrómicas repetidas del genoma (Versalovic *et al.* 1994). En este caso usamos el cebador BOX para generar los perfiles genómicos en vista de que se ha reportado antes para rizobios (Xue *et al.* 1999; Giongo *et al.* 2008; Ribeiro *et al.* 2013).

Del total de 87 cepas obtenidas de nódulos de *C. brachystegia*, se obtuvieron 61 perfiles BOX diferentes. El 51,7% de las cepas presentó un perfil distinto a cualquier otra cepa mientras que para el resto se encontraron entre 2 a 5 cepas compartiendo el mismo perfil. La mayoría de cepas que compartieron el perfil BOX se aislaron de la misma localidad con excepción de las cepas 124J y 125J (perfil α) aisladas de Bagua (PB) y Moyobamba (MY), respectivamente; 39J y 40J de UG y 42J de BG (Perfil T); y las cepas 2J, 29J y 35J (perfil D) aisladas las dos primeras de UG y la tercera de BG, respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12: Perfiles genómicos BOX-PCR generados de las cepas aisladas de *C. brachystegia*.

No.	Código cepas	Total cepas	Perfil genómico (BOX-PCR)	Origen cepa	Mejor coincidencia en EzTaxon	
					Especie	% Identidad
1	1J	1	A	UG	<i>Rhizobium multihospitium</i>	99,52
2	7J	1	B	UG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,82
3	26J-27J-30J	3	C	BG	<i>Rhizobium miluonense</i>	99,24
4	2J-29J-35J	3	D	UG (2J,29J) BG (35J)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	100
5	34J	1	E	UG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,71
6	4J	1	F	UG	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,9
7	11J	1	F'	UG	<i>Franconibacter pulveris</i>	99,02
8	54J	1	G	PY	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	99,42

Continuación...

9	5J	1	H	UG	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	99,13
10	6J	1	I	UG	<i>Leifsonia xyli</i>	99,73
11	17J	1	J	UG	<i>Rhizobium miluonense</i>	99,24
12	83J-84J	2	K	PY	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	99,9
13	14J	1	L	UG	<i>Rhizobium miluonense</i>	99,24
14	18J-19J	2	M	UG	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	98,42
15	21J	1	N	UG	<i>Rhizobium viscosum</i>	99,81
16	8J	1	O	UG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,5
17	23J	1	R	BG	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	100
18	32J	1	R'	BG	<i>Bacillus siamensis</i>	99,37
19	37J-38J-48J-49J	4	S	UG	<i>Rhizobium multihospitium</i>	99,52
20	39J-40J-42J	3	T	UG (39J,40J) BG (42J)	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	98,11
21	33J	1	U	UG	<i>Burkholderia gladioli</i>	99,72
22	44J	1	W	UG	<i>Achromobacter alioverae</i>	98,31
23	58J-59J	2	X	PY	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,81
24	56J	1	Z	PY	<i>Pantoea dispersa</i>	100
25	60J	1	a	PY	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99,9
26	68J	1	b	PY	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,47
27	65J-70J-72J-75J-77J	5	c	PY	<i>Lelliottia jeotgali</i>	98,76
28	66J-85J	2	d	PY	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	100
29	71J	1	e	PY	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,2
30	73J	1	f	PY	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98,66
31	78J	1	h	PY	<i>Enterobacter huaxiensis</i>	96,33
32	80J-87J	2	i	PY	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,91
33	81J-82J	2	j	PY	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98,54
34	86J	1	k	PY	<i>Enterobacter tabaci</i>	98,84
35	88J	1	l	PY	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	99,62
36	90J	1	m	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100

Continuación...

37	91J	1	n	MY	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
38	96J	1	o	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
39	97J	1	p	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
40	98J	1	q	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
41	99J-102J-108J	3	r	PB	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99,9
42	104J-105J	2	s	PB	<i>Bacillus megaterium</i>	99,7
43	106J	1	t	PB	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
44	109J-111J	2	u	PB	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	98,26
45	117J	1	w	PB	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
46	118J	1	x	PB	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99,9
47	119J	1	y	PB	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44
48	124J-125J	2	α	PB(124J) MY(125J)	<i>Bradyrhizobium daqingense</i>	100
49	127J	1	β	MY	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
50	132J	1	γ	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
51	134J-139J-144J	3	δ	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
52	136J	1	ε	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
53	146J	1	ζ	PB	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99,9
54	142J	1	η	MY	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
55	143J	1	θ	MY	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	100
56	148J	1	ι	PB	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44
57	150J	1	κ	PB	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44
58	151J	1	λ	PB	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44
59	153J	1	μ	MY	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44
60	157J	1	ξ	PB	<i>Acinetobacter schindleri</i>	99,43
61	159J	1	ρ	PB	<i>Rhizobium endophyticum</i>	98,44

*LAS CEPAS MOSTRADAS EN NEGRITA SON LAS QUE SE SELECCIONARON PARA SECUENCIAR EL GEN RIBOSOMAL 16S.

4.5.2 Amplificación del gen ribosomal 16S e identificación a nivel de género

A partir de los resultados obtenidos con los perfiles genómicos BOX-PCR, se escogió una cepa representante de cada perfil genómico (mostradas en negritas en la Tabla 14) y se les amplificó fragmentos casi completos del gen ribosomal 16S (~1.500 pb) con los primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGT GATCCAGCC-3'). Una vez amplificados y secuenciados los fragmentos y editadas las secuencias respectivas, éstas se analizaron en la base de datos EzTaxon para determinar las cepas tipo más relacionadas (Kim *et al.* 2014). A continuación, se presentan los resultados obtenidos dividiéndolos en aquellos correspondientes a géneros de rizobios y luego a géneros de bacterias endófitas.

4.5.2.1 Rizobios

Se determinó que 48 aislados, es decir el 55,17% del total, correspondieron a los géneros *Rhizobium* (n=17), *Agrobacterium* (n=7) o *Bradyrhizobium* (n=22) de las α -Proteobacterias; o a *Burkholderia* (n=2) de las β -Proteobacterias (Figura 8), que son considerados como géneros que incluyen rizobios, es decir bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y colonizadoras de los nódulos de las leguminosas (Somasegaran *et al.* 1981; Allen y Allen, 1981; CIAT 1988; Lloret y Martínez-Romero 2005; Poole *et al.* 2018).

Estas 46 cepas de α -Proteobacterias y 2 de β -Proteobacterias encontradas, generaron 35 perfiles genómicos diferentes. La mayoría de estos perfiles (n=28) estuvieron representados por una sola cepa, lo cual refleja una alta diversidad y grado de variabilidad de los rizobios de *C. brachystegia* (Ribeiro *et al.* 2013; Ribeiro *et al.* 2015; Galvis y Carrillo 2015).

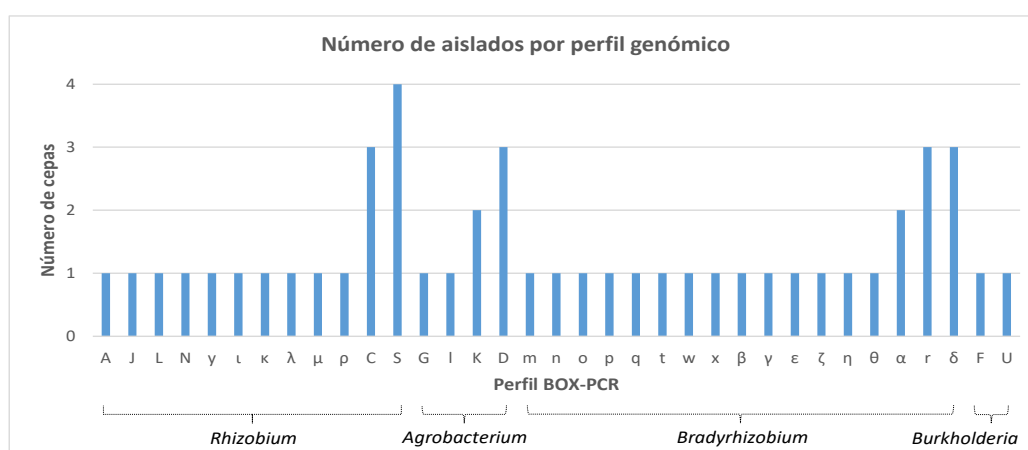


Figura 8. Distribución de los 35 perfiles genómicos del grupo de Proteobacterias que pertenecen a géneros de rizobios encontrados en los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.

Las cepas de *Rhizobium* representaron el 19,53% del total de aislados obtenidos y el 35,42% de los rizobios encontrados. Las cepas de este género se encontraron en todas las localidades excepto en PY (Figura 9), localidad que presentó suelos de carácter ácido. La mayoría de estas cepas (64,71%) se encontraron en Ecuador concentradas en la localidad UG (47,06%); así mismo los *Rhizobium* de Perú también se encontraron principalmente en una localidad (PB). Las localidades de Ecuador y Perú donde se encontraron *Rhizobium* mostraron características climáticas y edafológicas similares (Tablas 2 y 3).

El género *Agrobacterium* representó 8,05% y 14,58% del total de aislados y de los rizobios, respectivamente. Este género se encontró solo en las localidades de Ecuador (Figura 9).

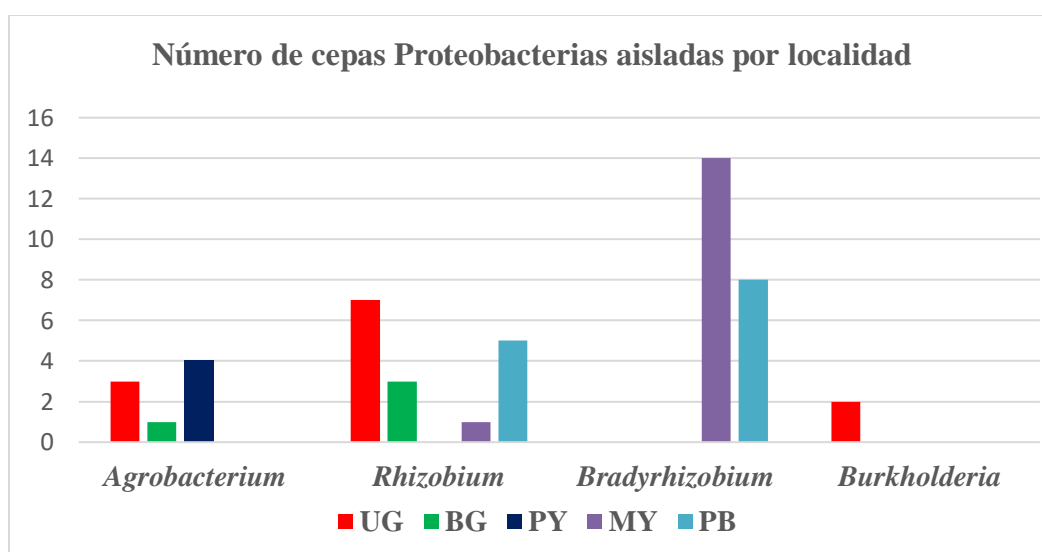


Figura 9. Distribución de los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Burkholderia* encontrados en los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú, mediante el gen *recA*.

El género *Bradyrhizobium* aportó con el 25,28% del total de los aislados de *C. brachystegia* y con el 45,83% de los rizobios. Todos los aislados de *Bradyrhizobium* fueron obtenidos en Perú, 14 de Moyobamba (MY) y 8 en Bagua Grande (PB).

El género *Burkholderia* (β -Proteobacterias) fue el menos numeroso y sólo se encontraron dos cepas en la localidad UG de Ecuador, donde también se encontraron cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium*; una cercana a *B. cepacia* (4J) y la otra a *B. gladioli* (33J). Según Bolívar-Anillo *et al.* (2016) y Rojas-Rojas *et al.* (2019), *Burkholderia* incluye cepas patógenas y no patógenas PGPR, rizoremediadoras y colonizadoras de nódulos de leguminosas.

Algunas investigaciones refieren como promiscuas a las leguminosas hospederas capaces de formar nódulos efectivos con diferentes géneros de rizobios (Beukes *et al.* 2019). Acorde a este enfoque, *C. brachystegia* podría ser considerada promiscua, porque estableció relación simbiótica con cuatro géneros de rizobios. Los rizobios del género *Clitoria* han sido relativamente poco estudiados y hasta la fecha no existen reportes sobre sus simbioses asociados. En Brasil, México y Tailandia investigadores como Menna *et al.* (2006), López-López *et al.* (2012), de Oliveira *et al.* (2018) y Duangkhet *et al.* (2018), respectivamente, han caracterizado cepas de rizobios de la especie *C. ternatea*. La gran mayoría de aislados obtenidos de dicha planta pertenecen al género *Bradyrhizobium*, solamente en los tres primeros estudios mencionados se reportaron cepas de *Rhizobium*, una cepa por estudio, además de una cepa de *Burkholderia* en el estudio de Menna *et al.* (2006). Coelho *et al.* (2018) aisló solamente cepas de *Bradyrhizobium* en nódulos de *C. fairchildiana* en Brasil; mientras que Binde *et al.* (2009) reportó una cepa de *Rhizobium* de esa misma planta. Parker (2012) reportó solamente *Bradyrhizobium* en nódulos de *C. javitensis* y *C. mariana* en Panamá y la isla de Guadalupe, respectivamente. En conjunto estos reportes indican que los simbioses preferidos de *Clitoria* spp. son del género *Bradyrhizobium*, por lo que sorprende haber encontrado un número relativamente grande de *Rhizobium* en este estudio, quizás con relación a que las poblaciones de leguminosas de diferentes regiones geográficas difieren en la diversidad y composición de rizobios asociados con ellas, acorde a las condiciones locales (Bissett *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011; Li *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013).

4.5.2.2 Bacterias endófitas

Además de los aislados pertenecientes a géneros rizobianos, el resto de 39 aislados pertenecieron a otros 12 géneros de bacterias. Según Leite (2015), las bacterias aisladas de los nódulos de las leguminosas que no pueden nodular el huésped se consideran bacterias endófitas y por lo general colonizan los nódulos junto con los rizobios simbioses naturales de la planta huésped. Varios investigadores como Bai *et al.* (2002) y De Mayer *et al.* (2015) identificaron géneros de *Bacillus* (bacterias endófitas) y *Bradyrhizobium* (rhizobia) en nódulos de varias leguminosas. Indicando que, los mecanismos de colonización de nódulos por bacterias endofíticas aún no se han dilucidado y aún están bajo investigación.

La mayoría de los géneros no rizobianos encontrados en los nódulos de *C. brachystegia* han sido mencionados como PGPR en otros estudios y plantas como *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Loredo-Osti *et al.* 2004; Angulo *et al.* 2014;

Moreno *et al.* 2018), *Enterobacter* y *Achromobacter* (Shakirov *et al.* 2010; Shakirov y Khakimov 2010), *Stenotrophomonas* (Jeong *et al.* 2010; Rojas-Solís y Santoyo 2018; An y Berg 2018), *Leifsonia* (Turan *et al.* 2012; Leite 2015; Nunes *et al.* 2018) y *Lelliottia* (Muensritharam *et al.* 2016). Otros géneros como *Leclercia* y *Franconibacter* son mencionados como contaminantes de lácteos (Pal *et al.* 2017; Kam *et al.* 2019).

En *C. brachystegia*, las gamma Proteobacterias fueron las bacterias endófitas más abundantes representando el 71,8% de los aislados, seguidas de beta Proteobacterias y Actinobacterias con 10,3% cada una y luego por Firmicutes con 7,7%. El género más representado fue *Enterobacter* (23,1%), todos aislados en la misma localidad PY (Puyango, Ecuador) (Figura 10). Este género ha sido mencionado y recomendado por Chi *et al.* (2018) como PGPR. El segundo género en abundancia fue *Stenotrophomonas* con 17,9%, también con propiedades PGPR, pero incluye bacterias que son patógenos oportunistas (Jeong *et al.* 2010; Rojas-Solís y Santoyo 2018; An y Berg 2018).

Varios de los géneros encontradas en *C. brachystegia* como *Leifsonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*, también han sido encontrados en los nódulos de otras especies de *Clitoria* (Aeron *et al.* 2015; Coelho *et al.* 2018; Nunes *et al.* 2018) consideradas como bacterias endófitas de estas plantas.

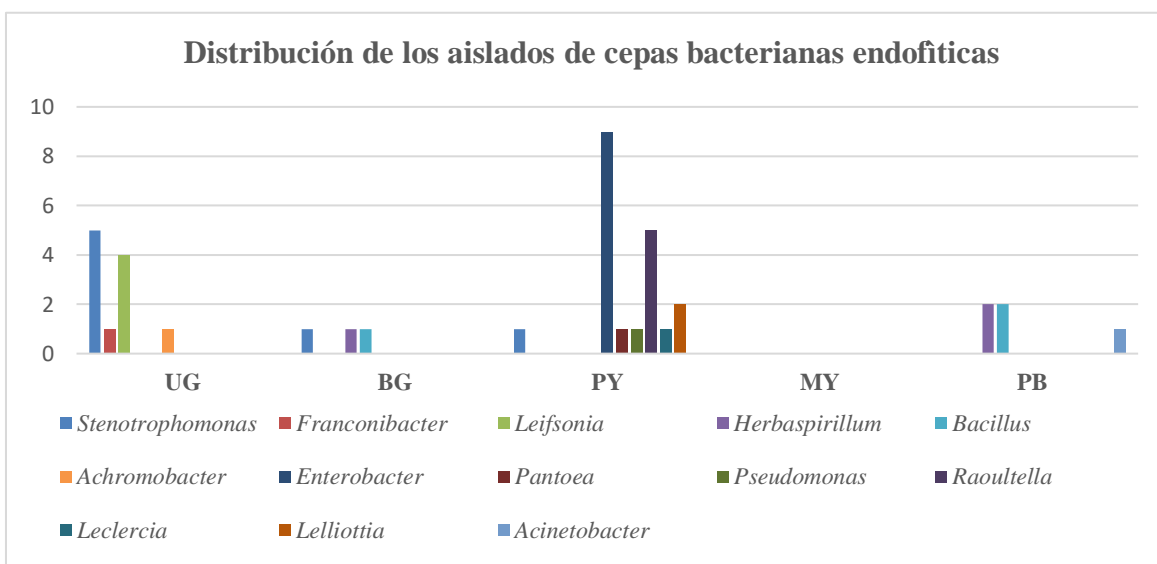


Figura 10. Número y distribución de los géneros de cepas bacterianas endofíticas asociadas a los nódulos de *C. brachystegia* de Ecuador y Perú.

4.5.3 Taxonomía molecular de los rizobios a nivel de especie

Acorde a lo mencionado por Valverde *et al.* (2006), el gen ribosómico 16S es universalmente utilizado para clasificar las bacterias. Sin embargo, se ha demostrado que en el caso del género *Rhizobium* la secuencia de este gen no es capaz de discriminar entre especies muy próximas que nodulan *Phaseolus*. Por lo cual, se han secuenciado otras regiones del genoma bacteriano con alta variabilidad genética a lo largo de la evolución y de gran utilidad para diferenciar entre especies muy próximas, son los genes denominados “housekeeping”. Dentro de los rhizobia se han utilizado fundamentalmente los genes *recA* y *atpD*.

Según los resultados obtenidos y debido a que la secuencia del gen ribosomal 16S es muy conservada para poder diferenciar entre especies cercanas, en este trabajo se evaluaron las relaciones filogenéticas de las cepas de *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Bradyrhizobium* construyendo filogenias en base a las secuencias del gen *recA* que codifica para la proteína recombinasa A y que ha sido ampliamente utilizado en taxonomía de rizobios.

Las cepas de *Rhizobium* evaluadas formaron 4 grupos (Figura 14). En el primer grupo las cepas 14J, 17J y 27J estuvieron estrechamente relacionadas con la cepa tipo de *Rhizobium hainanense* con valores de identidad de 98,6% que son los suficientemente altos para proponer que esas cepas pertenecen a la especie *R. hainanense*. Otro grupo estuvo formado por la cepa 21J y la cepa tipo de *Rhizobium viscosum* compartiendo una identidad de 98,6% lo que sugiere que ambas son de la misma especie.

Las cepas 1J y 37J formaron un grupo independiente al que se nombró aquí como R1, mientras que las cepas 119J, 148J, 150J, 151J y 159J constituyeron otro grupo independiente denominado R2. Las cepas de los grupos R1 y R2 mostraron valores de identidad menores a 95% con cualquier especie conocida de *Rhizobium* lo que indica que pueden representar especies nuevas aún no descritas.

Las cepas 84J, 88J y 54J de *Agrobacterium* compartieron menos 95% de identidad entre ellas y menos de 96,2% con cualquier especie descrita del género. Dichas cepas formaron ramas independientes en la filogenia de *recA*, nombradas como A1, A2 y A3 (Figura 11), por lo que cada una representaría una nueva especie de *Agrobacterium*.

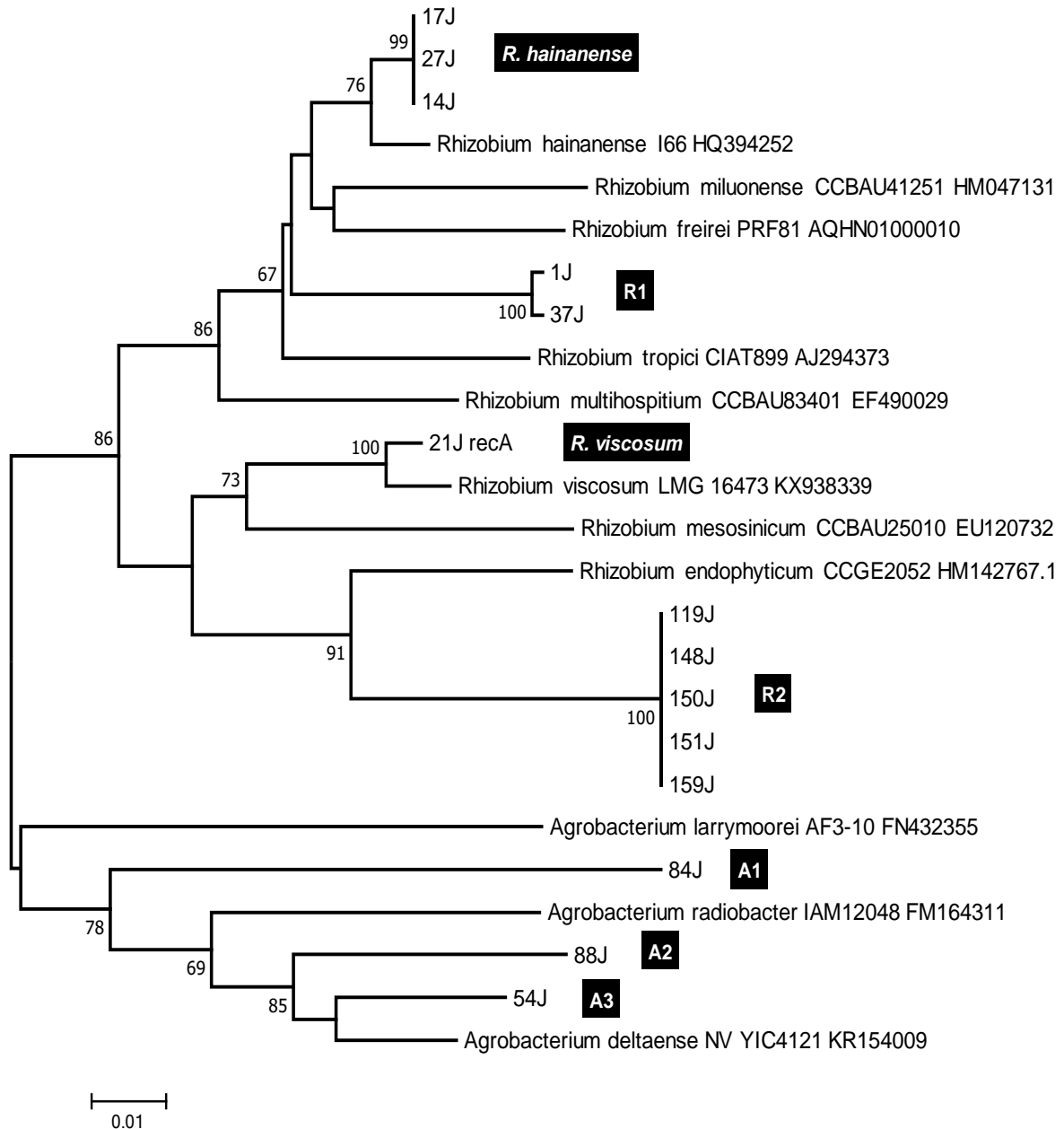


Figura 11. Árbol filogenético del gen *recA* secuenciado de aislados de *Rhizobium* y *Agrobacterium* de nódulos de *C. brachystegia* Benth. El árbol fue construido por el método Neighbor-joining, usando la versión Mega 7.0. Los números de las ramas son valores de soporte de *bootstrap*.

Las cepas de *Bradyrhizobium* formaron cuatro grupos, tres dentro del superclado japonicum y la cuarta dentro del superclado elkanii. El primer grupo, denominado aquí como B1, estuvo formado por las cepas 118J, 146J y 102J; el segundo grupo (B2) por las cepas 91J, 106J, 153J, 127J, 142J y 117J, y el tercer grupo (B3) solo por la cepa 124J. Estos grupos compartieron menos de 97,3% de identidad entre sí y con las especies descritas del género

por lo que representarían nuevas especies de *Bradyrhizobium*. El cuarto grupo estuvo formado por las cepas 98J, 139J, 90J, 96J, 97J, 143J y 132J.

Estas cepas estuvieron estrechamente relacionadas con la cepa tipo de *Bradyrhizobium pachyrhizi* con identidad de 99,2% lo cual indica que pertenecen a dicha especie (Figura 12).

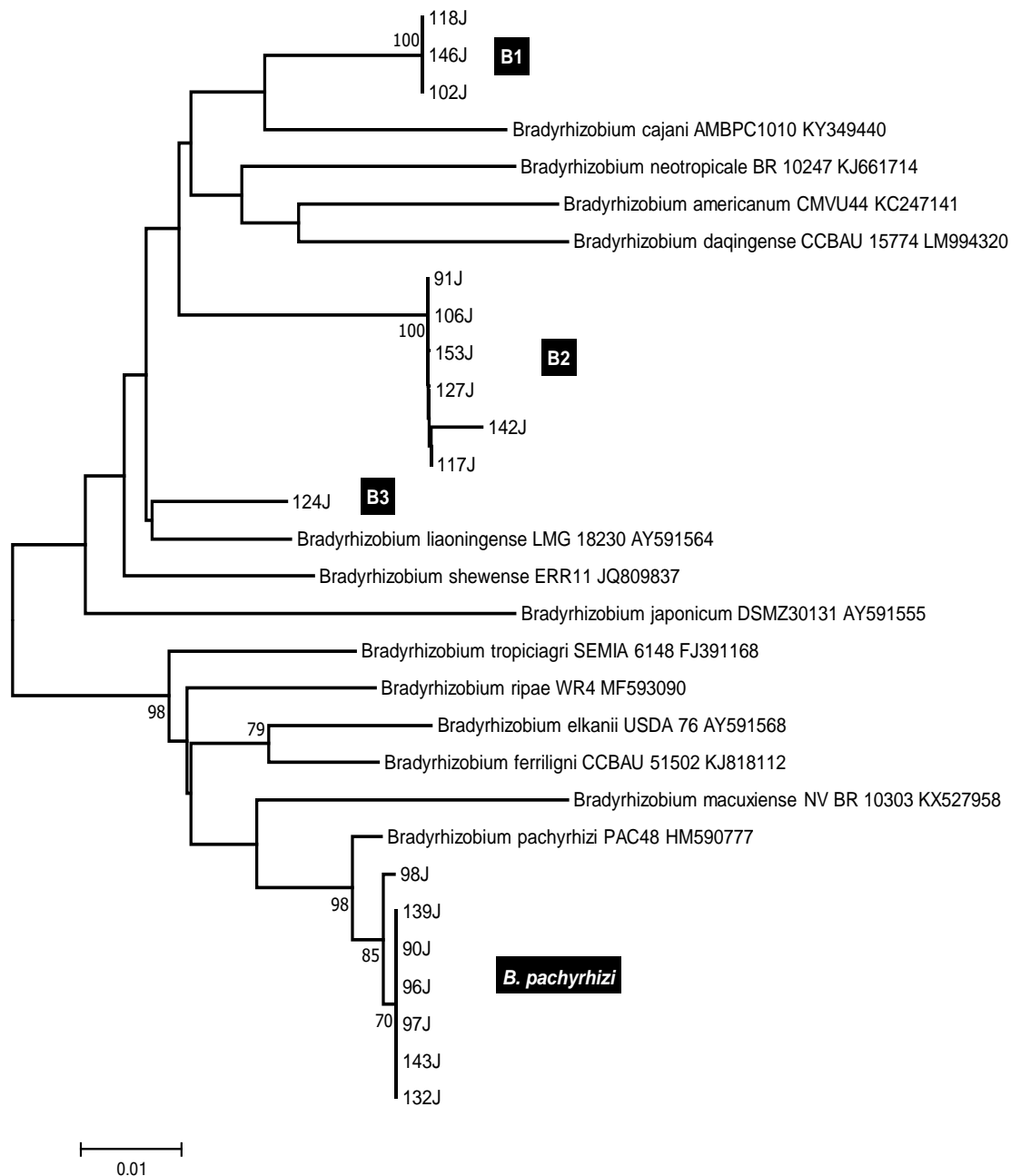


Figura 12. Árbol filogenético basado en secuencias del gen *recA* de *Bradyrhizobium* aislados de *C. brachystegia*, usando el método Neighbor-joining. Los números de las ramas son valores de soporte *bootstrap*.

4.6 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE RIZOBIOS AISLADOS DE *C. brachystegia*

Las caracterizaciones fisiológicas se realizaron principalmente con cepas de géneros rizobianos, aunque también se incluyeron ocasionalmente algunas cepas de géneros no rizobianos endofíticos como comparación.

4.6.1 Pruebas fisiológicas

4.6.1.1 Producción de acidez o alcalinidad

Se sembraron las cepas en medio extracto de levadura manitol agar con azul de bromotimol (LMA-ABT), se incubaron de tres a siete días evaluando el cambio de color del medio: azul indica alcalinidad (N), amarillo indica acidez con poco viraje (+), mediano viraje (++) y fuerte viraje (+++).

El 36% de las cepas no viraron el medio, lo cual indica que las cepas producen compuestos básicos, mientras que el 20, 14 y 30% produjeron mucha, mediana y poca acidez respectivamente, en el medio LMA-ABT (Figura 13). Siendo *Rhizobium* la cepa con mayor frecuencia reportada para fuerte viraje del medio y por consiguiente el mejor ácido productor (Tabla 13).

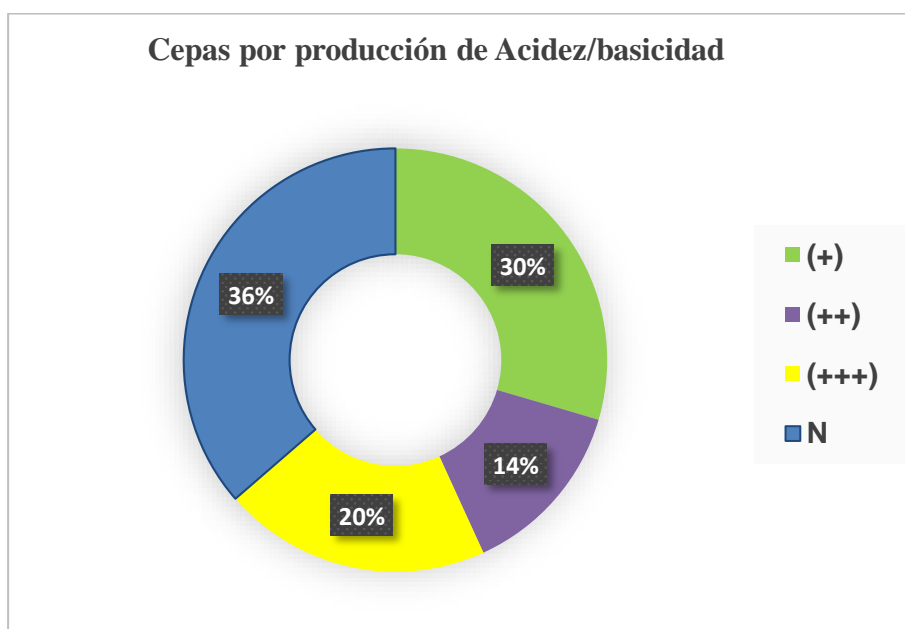


Figura 13. Porcentaje de la producción de acidez o basicidad de las cepas de rizobios en medio LMA-BT.

Tabla 13: Capacidad de producir acidez, alcalinidad o neutralidad de las Proteobacterias aisladas de *C. brachystegia*.

CEPA	16S	<i>recA</i>	Viraje del medio Azul bromotimol
1J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R1)	(+)
2J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>		(+)
14J	<i>R. miluonense</i>	<i>R. hainanense</i>	(+)
15J	<i>Burkholderia gladioli</i>		N
17J	<i>R. miluonense</i>	<i>R. hainanense</i>	(+++)
21J	<i>R. viscosum</i>	<i>R. viscosum</i>	(+++)
27J	<i>R. miluonense</i>	<i>R. hainanense</i>	(++)
29J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	N
33J	<i>Burkholderia gladioli</i>		N
35J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	N
37J	<i>R. multihospitium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R1)	N
38J	<i>R. multihospitium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R1)	N
48J	<i>R. multihospitium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R1)	(+)
49J	<i>R. multihospitium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R1)	N
54J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. (A3)	
83J	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. (A1)	(+)
84J	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. (A1)	N
88J	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. (A1)	N
119J	<i>R. multihospitium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R2)	(+)
148J	<i>R. endophyticum</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R2)	(+++)
150J	<i>R. endophyticum</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R2)	(+)
151J	<i>R. endophyticum</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R2)	(+++)
153J	<i>R. endophyticum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	(+++)
159J	<i>R. endophyticum</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (R2)	(+)
90J	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(+)
91J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	N
96J	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(++)
97J	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(+++)
98J	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(+++)
99J (108J)	<i>B. liaoningense</i>		(+++)
102J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B1)	(++)
106J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	(++)
117J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	N
118J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B1)	N
124J	<i>B. daqingense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B3)	(++)
127J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	(+)
132J	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(++)
136J	<i>B. tropiciagri</i>		(++)
139J (134J-144J)	<i>B. tropiciagri</i>		(+)
142J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)	N
143J	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrrhizi</i>	(+)
146J	<i>B. liaoningense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B1)	N

N, (+), (++) , (+++): SIN, POCO, MEDIANO Y MUY BUEN VIRAJE DEL MEDIO LMA-ABT.

Las cepas 1J, 2J, 14J, 17J, 21J, 27J, 48J, 83J, 148J, 150J, 151J, 153J, 159J, 119J, 90J, 96J, 97J, 98J, 99J, 102J, 106J, 124J, 127J, 132J, 134J, 139J, 136J, 143J y 146J mostraron acidificación del medio por el cambio de coloración, de verde al amarillo. Los resultados de esta prueba permiten agrupar a estas cepas como productoras de acidez (Ferrera *et al.* 1993).

Las cepas de *Agrobacterium* y *Rhizobium* se comportaron típicamente acorde a su género como reporta Wang *et al.* (2013). Sin embargo, el comportamiento de las cepas de *Bradyrhizobium* fue atípico ya que generalmente las cepas de dicho género tienen reacción neutra o alcalinizan el medio de cultivo (Marquina *et al.* 2011). Sin embargo, el estudio de las características culturales y las fisiológicas, así como la producción y excreción de compuestos al medio de cultivo, no es común entre todos los géneros de rizobios (Pérez *et al.* 2008). La Figura 14 muestra la comparación de las especies de *Bradyrhizobium* productores de ácido en el medio LMA-ABT. Destacando el género *B. pachyrhizi*.

Las cepas del género *Burkholderia* (β -Proteobacterias), los *Agrobacterium* 29J, 35J, 84J y 88J, las cepas de *Rhizobium* 37J, 38J y 49J; los *Bradyrhizobium* 91J, 108J, 117J, 118J, 125J, 142J, 144J y 146J, las cepas de referencia CIAT 899 de *R. tropici* y LMTR 28 de *B. yuanmingense* no cambiaron el color del medio.

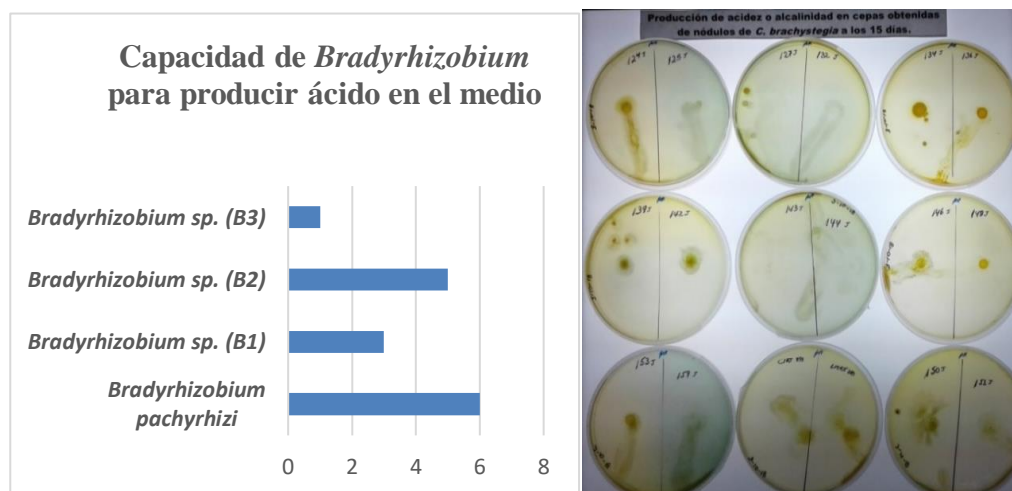


Figura 14. Número de cepas de *Bradyrhizobium* basadas en la filogenia del gen *recA*, consideradas mejor productoras de ácido en medio LMA-ABT, en Perú.

4.6.1.2 Crecimiento a diferentes niveles de temperatura

Las cepas fueron sembradas en LMC (levadura, manitol, caldo) hasta obtener poblaciones de 10^8 cel/mL. Se colocaron 5 μ L del cultivo en la superficie de las placas con LMARC. Las

placas se incubaron a 4 temperaturas diferentes (6 °C, 28 °C, 36 °C y 40 °C) por un período de hasta 14 días. El efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas se evaluó midiendo el diámetro de la colonia cada 48 horas con 3 repeticiones y se representó el grado de crecimiento (Luyo 1992; Matos 1994; Mayo *et al.* 2004). Acorde a la siguiente valoración: abundante (+++), bueno (++) , regular (+) y sin crecimiento (-) (Tabla 14).

Tabla 14: Crecimiento a diferentes temperaturas de las cepas aisladas de *C. brachystegia*.

Rango (cm)	Símbolo	Significado
0	(-)	Sin crecimiento
0,4-1,0	(+)	Regular crecimiento
1,01-1,5	(++)	Buen crecimiento
1,51-1,73	(+++)	Abundante crecimiento

Los resultados obtenidos en esta prueba indicaron que la temperatura óptima de crecimiento de los rizobios fue entre 28 a 36 °C, acorde a Guamán *et al.* (2016). También que las cepas 1J, 2J, 29J y 35J no crecieron a 6 °C, coincidentemente todas pertenecientes a *Agrobacterium*. Así como también, las cepas 14J, 17J, 27J, 30J y 48J, las tres primeras pertenecientes a *R. hainanense* y la última al grupo R1, no lograron crecer a los 40 °C. Un caso particular se observó en las cepas 21J, 26J, 49J y CIAT 899 (Cepa control) demoraron en iniciar su crecimiento a 6 °C, hasta las 48 horas en que recién se observaron las primeras colonias. Los resultados de las demás cepas de este género se presentan en la Tabla 15.

En el caso de las cepas de *Bradyrhizobium* 108J y 146J no crecieron a 6 °C. Mientras que todas las demás cepas (91%) mostraron crecimiento a esta temperatura, a partir de las 48 horas; acorde a lo reportado por Santillana (2007) con cepas de rizobios aislados de nódulos de las leguminosas *Vicia faba* L. y *Pisum sativum*, originarias de Perú a 6 °C.

Se encontró que todas las cepas fueron capaces de crecer en rango regular (+) o mayor a 36 °C y que el 14.6% de las cepas de rizobios tuvieron buen crecimiento (++) a las 48 horas de haber sido inoculado en el medio, acorde a Gonzales (2013), que reporta la caracterización fenotípica de 23 cepas de *Rhizobium*, el 64,35% crecieron a 37 °C, aisladas de *P. vulgaris* L., en suelos de La Molina (Lima, Perú).

Acorde a Frioni (2011) y Madigan *et al.* (2004), los rizobios de leguminosas tropicales soportan un amplio rango de temperaturas. Así como también, en términos generales la

mayoría de las cepas aquí reportadas (93,7%) presentan crecimiento entre los 36 y 40 °C, lo cual puede atribuirse al clima tropical de las localidades de donde fueron aisladas, que tienen características mesofílicas mencionadas por Cuadrado *et al.* (2009). Sin embargo, se observaron casos como las cepas 14J, 17J, 27J, 30J y 48J, de la localidad de Guayaquil (Ecuador) y pertenecientes a *R. hainanense* y al grupo R1, que no lograron crecer a 40 °C, similar a lo referido por Gonzáles (2013), cuyos rizobios tampoco crecieron a esta temperatura. Considerando que Guayaquil presenta los mayores valores de temperatura y humedad relativa con respecto a las demás localidades, aunque por debajo de los 40 °C.

Tabla 15: Crecimiento de rizobios aislados de *C. brachystegia* a diferentes temperaturas a las 48 horas de inoculado.

Cepa	T°	Crecimiento	Cepa	T°	Crecimiento	Cepa	T°	Crecimiento
1J	6	(-)	33J	6	(+)	139J	6	(+)
1J	28	(++)	33J	28	(+)	139J	28	(+)
1J	36	(++)	33J	36	(+)	139J	36	(++)
1J	40	(+)	33J	40	(+)	139J	40	(+)
2J	6	(-)	90J	6	(+)	142J	6	(+)
2J	28	(++)	90J	28	(+)	142J	28	(+)
2J	36	(++)	90J	36	(+)	142J	36	(++)
2J	40	(++)	90J	40	(+)	142J	40	(+)
29J	6	(-)	91J	6	(+)	143J	6	(+)
29J	28	(+)	91J	28	(++)	143J	28	(+)
29J	36	(+)	91J	36	(++)	143J	36	(+)
29J	40	(+)	91J	40	(+)	143J	40	(+)
35J	6	(-)	96J	6	(+)	144J	6	(+)
35J	28	(++)	96J	28	(+)	144J	28	(+)
35J	36	(++)	96J	36	(+)	144J	36	(+)
35J	40	(++)	96J	40	(+)	144J	40	(+)
54J	6	(+)	97J	6	(+)	146J	6	(-)
54J	28	(+)	97J	28	(+)	146J	28	(+)
54J	36	(+)	97J	36	(+)	146J	36	(++)
54J	40	(+)	97J	40	(+)	146J	40	(+)
88J	6	(+)	98J	6	(+)	148J	6	(+)
88J	28	(++)	98J	28	(++)	148J	28	(+)
88J	36	(++)	98J	36	(+)	148J	36	(+)
88J	40	(+)	98J	40	(+)	148J	40	(+)
14J	6	(+)	99J	6	(+)	119J	6	(+)
14J	28	(++)	99J	28	(++)	119J	28	(+)
14J	36	(++)	99J	36	(++)	119J	36	(++)
14J	40	(-)	99J	40	(+)	119J	40	(+)
17J	6	(+)	102J	6	(+)	150J	6	(+)
17J	28	(++)	102J	28	(++)	150J	28	(+)
17J	36	(+)	102J	36	(++)	150J	36	(+)
17J	40	(-)	102J	40	(+)	150J	40	(+)
26J	6	(+)	108J	6	(-)	151J	6	(+)

Continuación...

26J	28	(+)	108J	28	(+)	151J	28	(+)
26J	36	(++)	108J	36	(+)	151J	36	(+)
26J	40	(-)	108J	40	(+)	151J	40	(+)
27J	6	(+)	106J	6	(+)	153J	6	(+)
27J	28	(++)	106J	28	(+)	153J	28	(+)
27J	36	(+)	106J	36	(+)	153J	36	(+)
27J	40	(-)	106J	40	(+)	153J	40	(+)
30J	6	(+)	117J	6	(+)	159J	6	(+)
30J	28	(++)	117J	28	(++)	159J	28	(+)
30J	36	(++)	117J	36	(++)	159J	36	(+)
30J	40	(-)	117J	40	(+)	159J	40	(+)
21J	6	(+)	118J	6	(+)	CIAT899	6	(+)
21J	28	(++)	118J	28	(++)	CIAT899	28	(++)
21J	36	(++)	118J	36	(+)	CIAT899	36	(+)
21J	40	(++)	118J	40	(+)	CIAT899	40	(+)
83J	6	(+)	124J	6	(+)			
83J	28	(++)	124J	28	(+)			
83J	36	(+)	124J	36	(+)			
83J	40	(+)	124J	40	(+)			
84J	6	(+)	125J	6	(+)			
84J	28	(++)	125J	28	(++)			
84J	36	(+)	125J	36	(++)			
84J	40	(+)	125J	40	(+)			
37J	6	(+)	127J	6	(+)			
37J	28	(++)	127J	28	(+)			
37J	36	(++)	127J	36	(+)			
37J	40	(++)	127J	40	(+)			
38J	6	(+)	132J	6	(-)			
38J	28	(+)	132J	28	(++)			
38J	36	(++)	132J	36	(++)			
38J	40	(++)	132J	40	(+)			
48J	6	(+)	134J	6	(+)			
48J	28	(+)	134J	28	(++)			
48J	36	(++)	134J	36	(++)			
48J	40	(++)	134J	40	(+)			
49J	6	(+)	136J	6	(+)			
49J	28	(+)	136J	28	(+)			
49J	36	(++)	136J	36	(+)			
49J	40	(++)	136J	40	(+)			

Como se esperaba, el crecimiento de las cepas a 6 °C fue de regular a menos. En cepas de *Bradyrhizobium*, Santillana (2007) menciona que si la temperatura disminuye a 6 °C se reducen las poblaciones de noduladores de soja en estos suelos tropicales.

Algunas cepas tropicales pueden ser sensibles a las temperaturas bajas, y que los cultivos repetidos de una cepa pueden provocar cambios genéticos en los rizobios (CIAT 1988).

4.6.1.3 Prueba de crecimiento a diferentes niveles de pH

Una vez realizadas las mediciones del diámetro de las cepas sembradas en el medio LMC e incubadas a 28 °C con tres repeticiones, se elaboró una escala de rangos para comparar el crecimiento cualitativo de las cepas en los niveles de pH 4, 5, 7 y 8 (Tabla 16).

El periodo de evaluación fue hasta los 7 días para *Rhizobium* y *Agrobacterium*; y, 14 días para *Bradyrhizobium*, respectivamente (Anexo 7).

Tabla 16: Crecimiento a diferentes niveles de pH de las cepas aisladas de *C. brachystegia*.

Rango (cm)	Símbolo	Significado
0	(-)	Sin crecimiento
0,4-1,0	(+)	Regular crecimiento
1,01-1,5	(++)	Buen crecimiento
1,51-2,4	(+++)	Abundante crecimiento

Los crecimientos obtenidos en esta prueba indicaron que el pH óptimo de crecimiento de los rizobios fue entre 5 y 7, similar a lo reportado por Cuadrado *et al.* (2009).

En las Figuras 15 y 16 se comparan los gráficos de la capacidad de crecimiento de las cepas bacterianas aisladas en los niveles de pH 4 y 8 a las 48 horas de crecimiento. Se observó que las cepas de *Rhizobium* 1J (Grupo R1), 14J y 17J (*R. hainanense*); así como los *Bradyrhizobium* 124J y 139J presentaron buen crecimiento en el medio ácido.

En el medio alcalino las cepas de *Rhizobium* con buen crecimiento coinciden 14J y 17J (*R. hainanense*) y además las cepas 37J y 49J del grupo R1; y la cepa 84J correspondiente a *Agrobacterium* (A1). Los controles CIAT 899 y LMTR 28 mostraron el comportamiento típico de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, respectivamente.

Algunos autores indican que varios géneros de *Rhizobium* y *Agrobacterium* crecen en amplios rangos de pH, como *Rhizobium miluonense* (pH 6 y 8) (Gu *et al.* 2008), *R. multihospitium* y *Agrobacterium* (pH 5 y 10) (Han *et al.* 2008; Yang *et al.* 2013).

Para *Bradyrhizobium*, Delamuta *et al.* (2015) describen a *B. tropiciagri* en un rango de crecimiento a pH 5 a 8. *B. liaoningense* entre pH 7 y 8, para *B. daqingense* el rango de

crecimiento es de pH 6 a 9, siendo el óptimo pH 7. Acorde a lo manifestado por Frioni (2011) respecto a que diferentes cepas de una especie de *Rhizobium* son muy sensibles al pH.

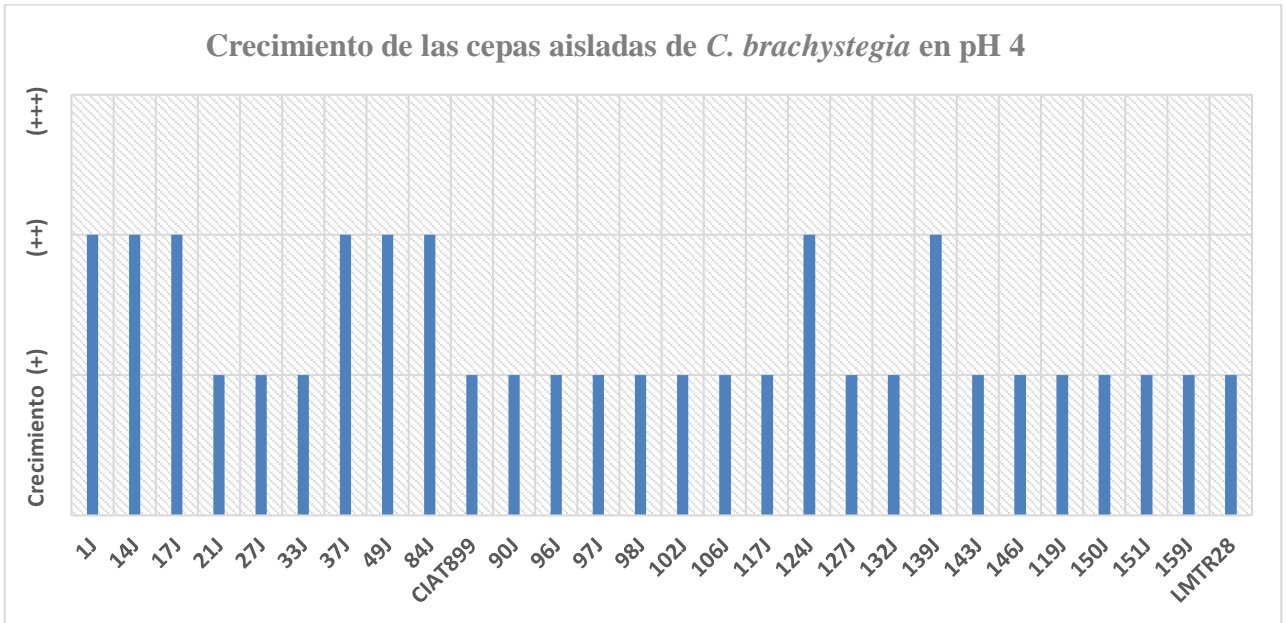


Figura 15. Comparación del crecimiento de los rizobios en nivel de pH 4 a las 48 horas.

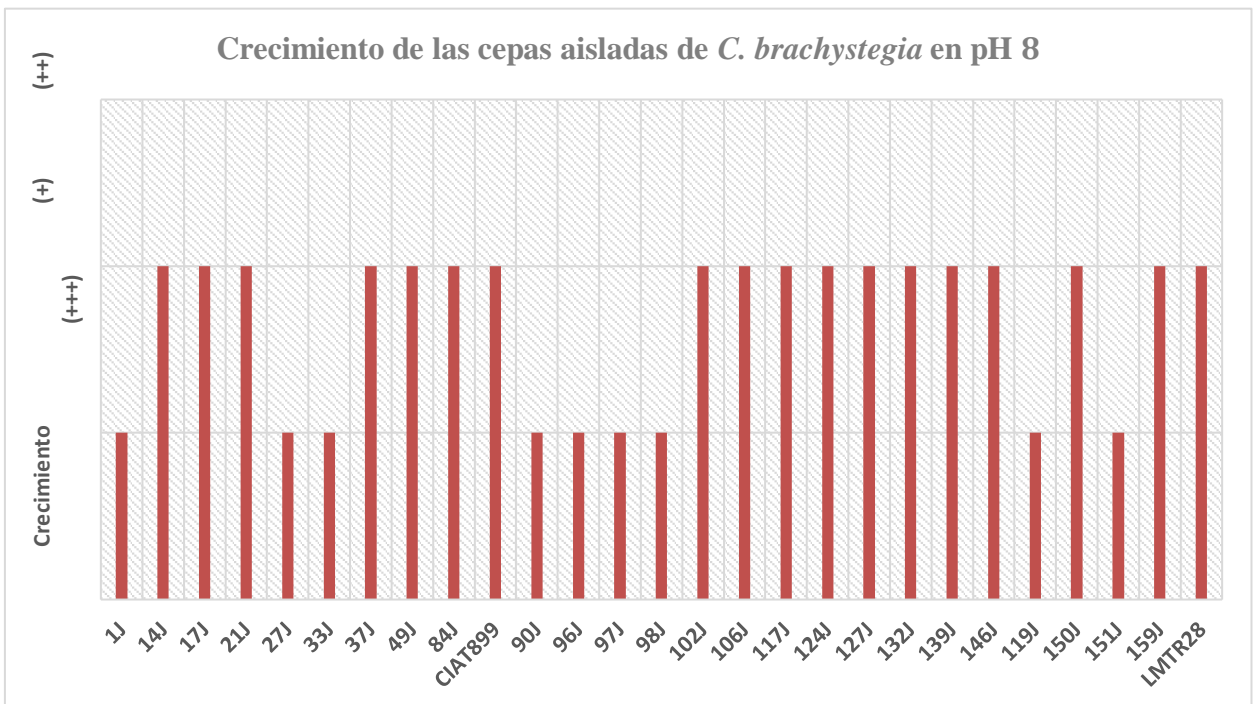


Figura 16. Comparación del crecimiento de los rizobios en nivel de pH 8 a las 48 horas.

4.6.1.4 Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

Los aislados fueron estriados en LMA-RC con concentraciones de 0,25%, 0,5%, 1% y 2% de NaCl (Figura 17). Las placas se incubaron a 28 °C por 7-14 días evaluando cada dos días el crecimiento de las cepas (CIAT 1988; Bernal y Graham 2001). Para comparar el crecimiento cualitativo de las cepas se elaboró una escala de rangos (Tabla 17).

Tabla 17: Rangos para evaluar el crecimiento a diferentes niveles de NaCl de las cepas aisladas de *C. brachystegia*.

Rango (cm)	Símbolo	Significado
0	(-)	Sin crecimiento
0,2-1,0	(+)	Regular crecimiento
1,01-1,5	(++)	Buen crecimiento
1,51-1,74	(+++)	Abundante crecimiento

Las cepas del grupo tropici (1J, 37J, 38J, 48, 49J y 119J) y de *Agrobacterium* (29J, 35J, 54J, 88J) crecieron muy bien al 2% de NaCl; también 83J y 84J (*Agrobacterium*) (Han *et al.*, 2008). Las cepas referentes CIAT 899 toleran este nivel (Bouzar *et al.* 2001; Young 2004; Gonzales 2013). Las cepas que mostraron buen crecimiento en todos los niveles de NaCl fueron 148J, 150J, 151J y 159J correspondientes al grupo R2 relacionada a *R. endophyticum*, también encontrado por López *et al.* (2009).

En *Bradyrhizobium*, las cepas de *B. pachyrhizi* 90J, 96J, 97J, 98J, 132J, 134J, 136J, 143J y 144J; del grupo B3 124J y 125J presentaron regular crecimiento (+) al 1% (Delamuta *et al.* 2015), sólo la cepa 139J (*B. pachyrhizi*) de este grupo presentó buen crecimiento (++) y poco crecimiento al 2% (+) de NaCl. Las cepas de los grupos B1 o B2 91J, 99J, 102J, 106J, 108J, 117J, 118J, 127J, 142J y 146J presentaron crecimiento regular al 0,5, 1 y 2% de NaCl con similares resultados a Silva *et al.* (2014) y Marquina *et al.* (2011) (Figuras 18 y 19).

En el Anexo 8 se muestran los resultados del crecimiento de todas las cepas evaluadas en el medio de cultivo LMA ajustado a las concentraciones de cloruro de sodio mencionadas.

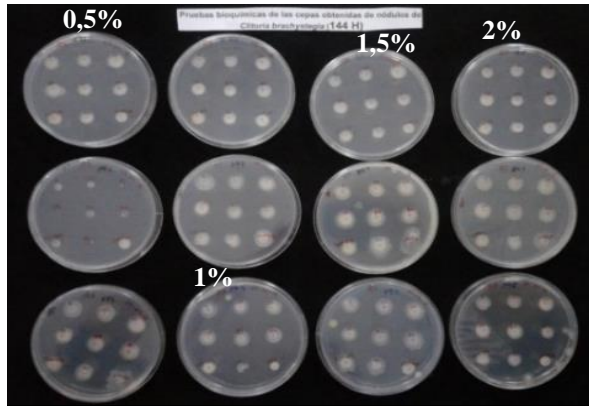


Figura 17. Cepas de rizobios crecidas a diferentes niveles de NaCl en medio LMA pH 7.

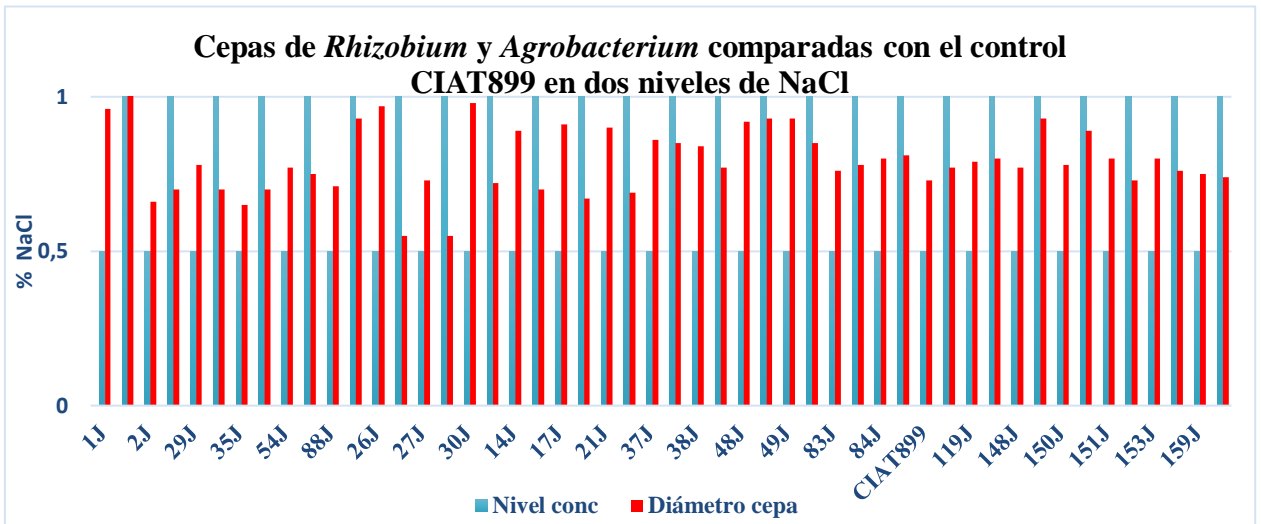


Figura 18. Crecimiento de las cepas de *Rhizobium* al 0.5 y 1% de NaCl a las 48 horas.

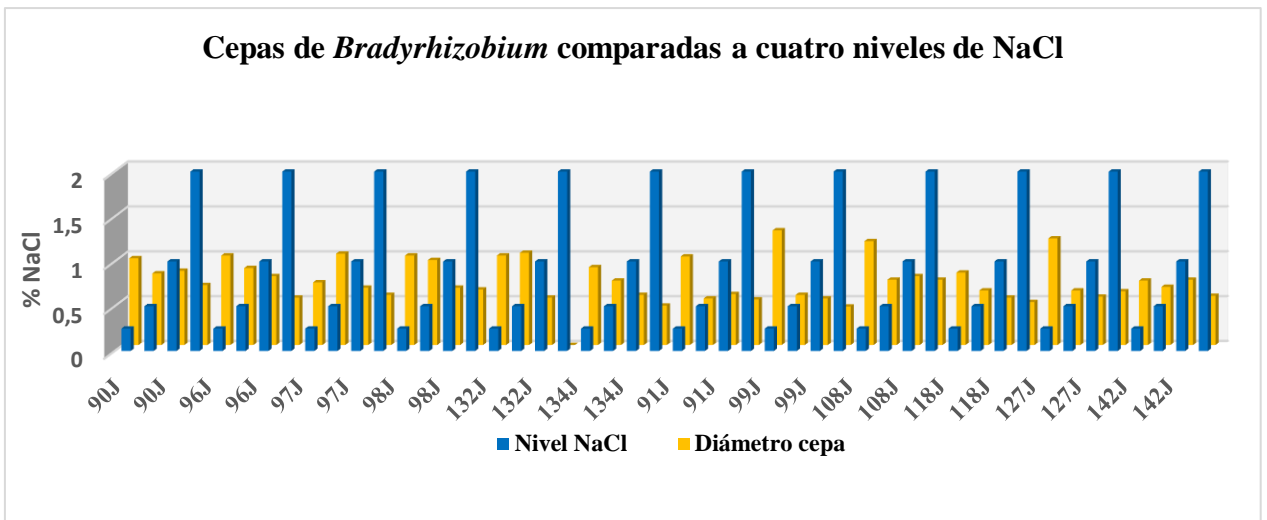


Figura 19. Crecimiento de las cepas de *Bradyrhizobium* a 0,25, 0,5, 1 y 2% de NaCl a las 144 horas.

4.6.2 Pruebas in vitro de actividad promotora de crecimiento vegetal

4.6.2.1 Detección de bacterias solubilizadoras de fosfato

La evaluación se realizó tomando como positivas las cepas que crecieron en el medio de cultivo y mostraron presencia de un halo transparente alrededor de la estría (Anexo 9).

Las cepas destacadas como solubilizadoras en fosfato bicálcico fueron 33J (*Burkholderia gladioli*), 27J (*R. hainanense*), 38J (grupo R1) y 19J (*L. shinshuensis*), con valores de 2,7, 2,6, 2,46 y 2,02 de índice de solubilización (I.S.), respectivamente; considerados como valores intermedios. Las demás cepas se encontraron por debajo de este valor, como CIAT 899 con I.S. de 1,36 (Figura 20), la cepa de *Bradyrhizobium* fue 143J (*B. pachyrhizi*) con 2,23 (Anexo 9). Valores comparables con los reportados por Marra *et al.* (2011), al evaluar las cepas CIAT 899, *Bradyrhizobium* sp. y *Burkholderia cepacia*, con valores de 2,01, 1,27 y 2,51 respectivamente.

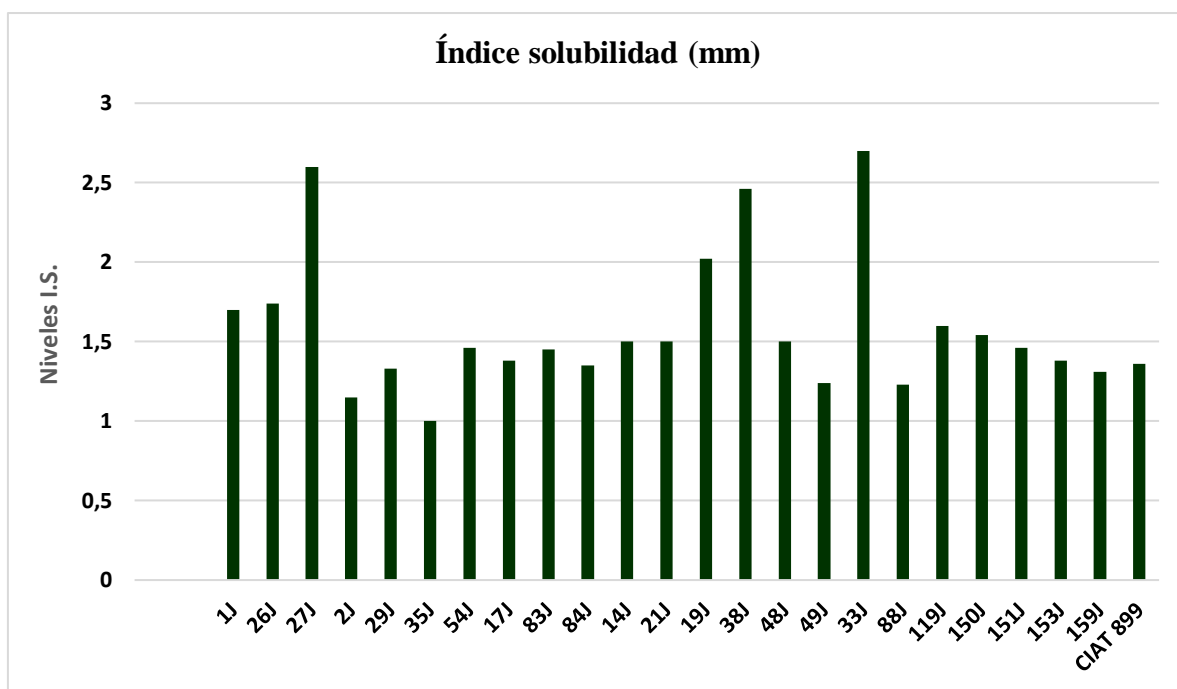


Figura 20. Índice de solubilización de fosfato bicálcico de las cepas de rizobios.

En fosfato tricálcico, los mejores índices de solubilidad de las cepas fueron 38J y 48J (grupo R1), 27J (*R. hainanense*), 2J (*Agrobacterium*), 19J (*Leifsonia*), y 33J (*Burkholderia*), con valores de 2,15, 2,04, 1,9, 1,88 y 1,65 respectivamente (Figuras 21 y 22). Resultados cercanos a las caracterizaciones realizadas por Fernández *et al.* (2005) y Hernández *et al.* (2015) que mencionan la habilidad para solubilizar fosfato inorgánico de las cepas de *Rhizobium*. Así como de *Pantoea* y *Burkholderia* reportadas por Walpola y Yoon (2013)

como solubilizadoras de fosfato, mencionando que los valores por debajo de 1, los clasificaron como solubilizantes muy bajos, de 1,0 a 2,0 como solubilizantes bajos; los valores de 2 a 3 como medio y los valores por encima de 3 como solubilizantes altos. El resultado completo de las cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico obtenido en este trabajo se presenta en el Anexo 10.

Cabe mencionar como dato curioso, relacionado con la capacidad solubilizadora de los rizobios que las cepas 21J, 26J, 29J, 32J, 33J, 38J, 90J, 104J, 125J, 134J, 143J y 144J presentaron halos de solubilización definidos para fosfato bicálcico; y, 14J, 17J, 18J, 27J, 33J, 38J, 48J, 49J, 104J, 143J, 146J y 153J para fosfato tricálcico (Figura 22).

En resumen, los mejores valores de la eficiencia de solubilización de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se encontraron en *R. hainanense* y *Rhizobium* sp. (R1) y *Bradyrhizobium pachyrhizi*. Siendo la mejor cepa solubilizadora *Burkholderia gladioli* en ambos medios fosfatados, acorde a las investigaciones reportadas por Sridevi y Mallaiiah (2009), Silva Filho y Vidor (2000) y Gupta *et al.* (2012). Sin embargo, para Marra *et al.* (2011) la solubilización de fosfato no es una característica extendida entre todas las cepas de *Rhizobium* en el medio de cultivo NBRIP.

Considerando que la mayoría de los suelos tropicales y subtropicales son deficientes en fósforo biodisponible, el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, principalmente las solubilizadoras de fosfato, pueden reducir el uso de fertilizantes químicos (Restrepo *et al.* 2015).

En la Figura 23, se compara el crecimiento de las cepas de rizobios en los medios bi y tricálcico, donde destaca el halo de inhibición de la cepa 33J (*Burkholderia gladioli*), 38J (*Rhizobium* sp. grupo R1) y 132J (*Bradyrhizobium pachyrhizi*).

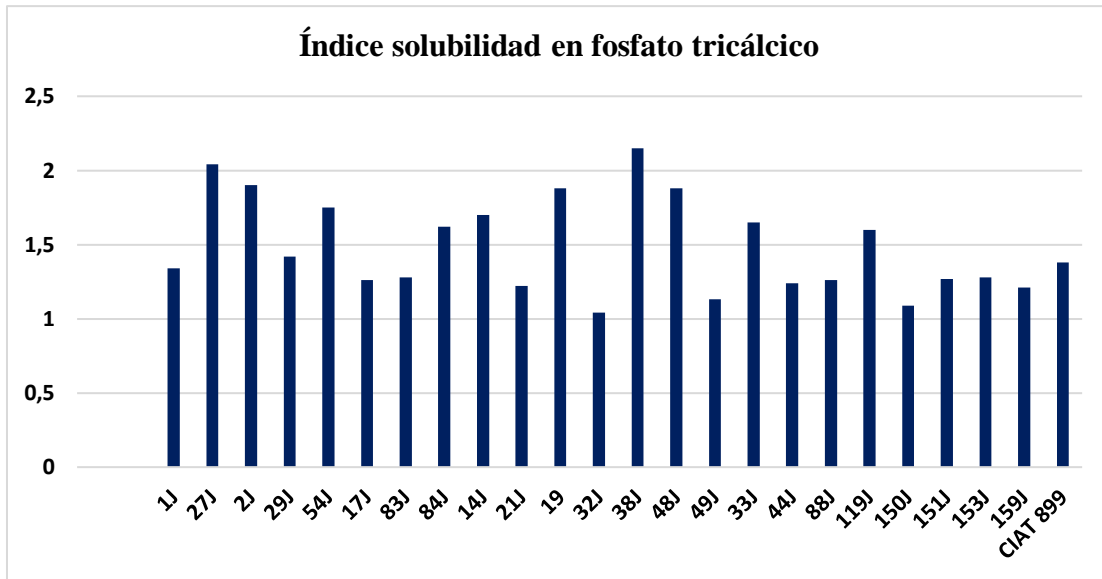


Figura 21. Comparación del índice de solubilidad de las cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* solubilizadoras de fosfato tricálcico.

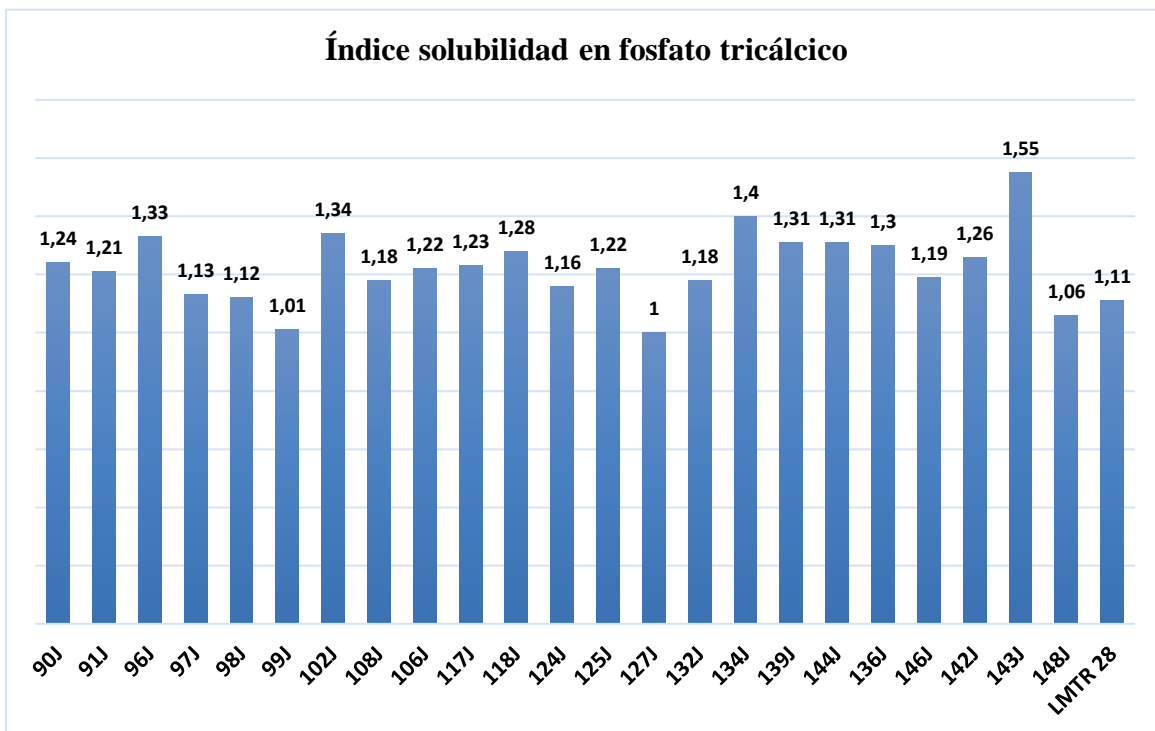


Figura 22. Comparación del índice de solubilidad de las cepas de *Bradyrhizobium* solubilizadoras de fosfato tricálcico.

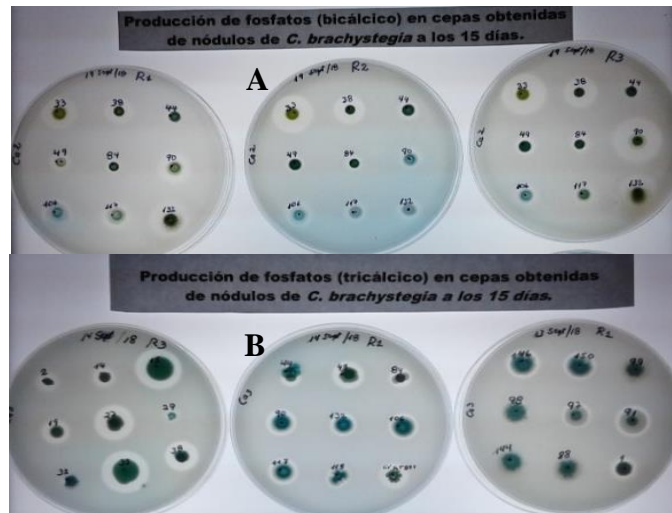


Figura 23. Solubilización de las cepas de rizobios en fosfato bicálcico (A) y tricálcico (B).

4.6.2.2 Detección de sideróforos

Las mejores cepas productoras de sideróforos fueron 33J, 29J, 2J y 1J; 84J, 98J, 99J y 148J con valores de 8,5, 8,1, 8, 7, 5,8, 5,3 y 5,1 mm de halo, la CIAT 899 con 2,1 mm. (Figuras 24A, 24B y 24C). Similares resultados fueron obtenidos por Pooja (2012), citado por Hernández *et al.* (2015) con cepas de *Rhizobium*, procedentes de *Cicer arietinum*, detectando halos de coloración naranja con diámetros de 1,0 a 2,22 mm.

Nuevamente destaca la cepa 33J (*B. gladioli*), mostrada en la figura 24C, seguida de *Rhizobium* sp. (1J, grupo R1). Varias investigaciones mencionan que este género es muy buen productor de sideróforos (Compant *et al.* 2008; Bolívar-Anillo *et al.* 2016). Estos resultados se comparan en la Figura 25 y los resultados completos en el Anexo 11.

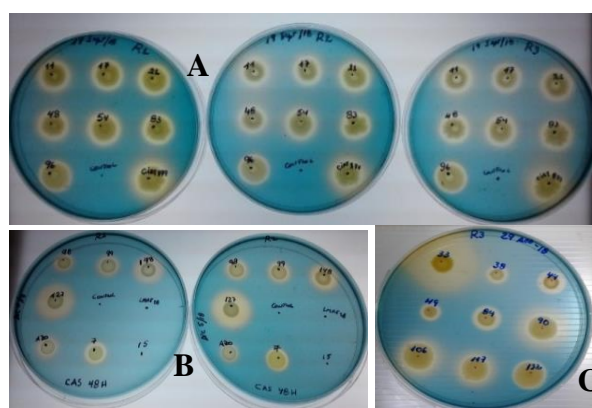


Figura 24. A y B) Formación de halos de los rizobios en medio Cromo Azurol Sulfonato (CAS). C) Formación de halo de la cepa 33J *B. gladioli*.

Rizobios aislados de *C. brachystegia*, productores de sideróforos

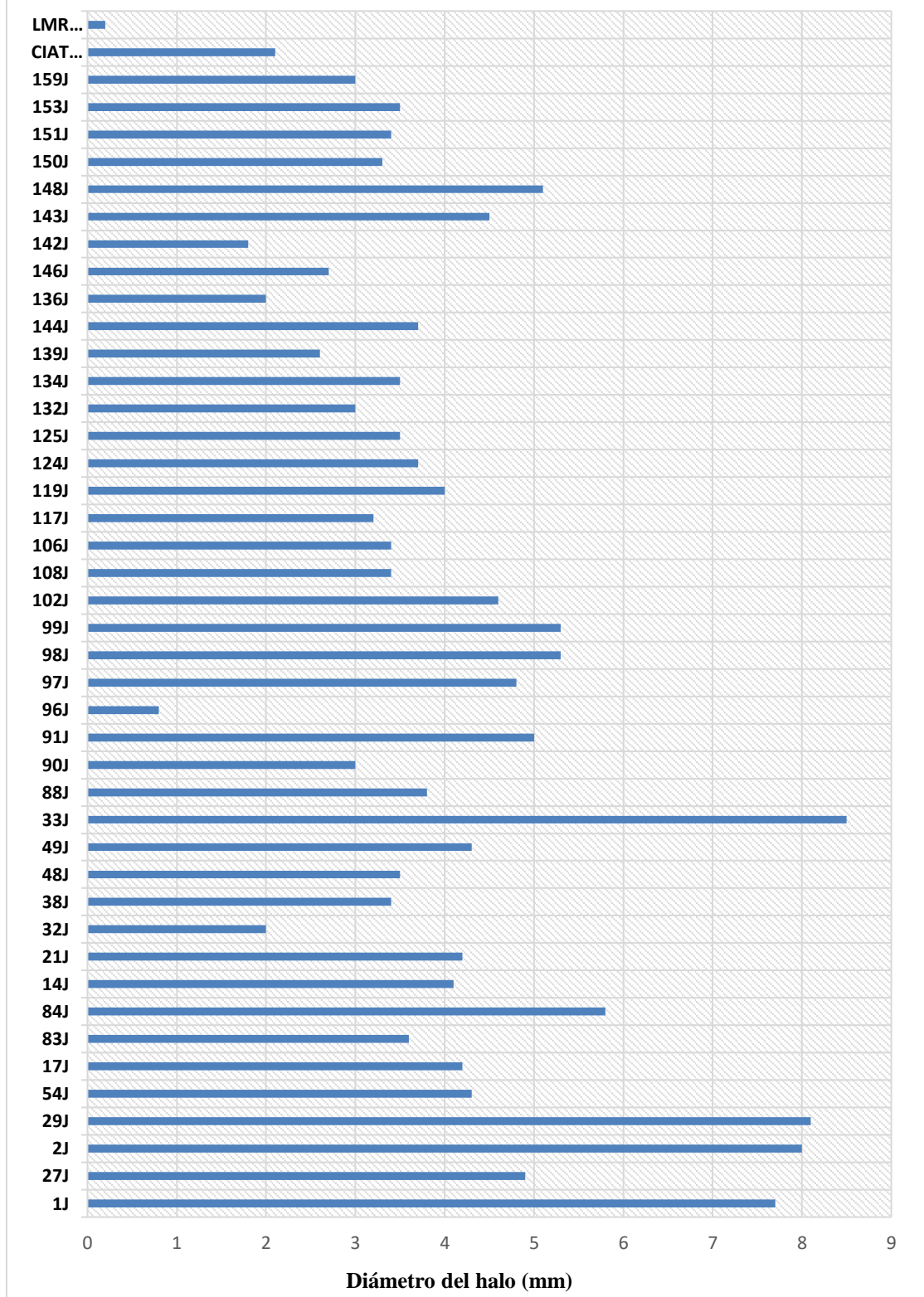


Figura 25. Producción de halos de las cepas de rizobios en medio CAS, sideróforos.

4.6.2.3 Producción del ácido Indol Acético (AIA)

Las mayores concentraciones de ácido indol acético se obtuvieron con las cepas 84J y 150J (56,5 y 37,7 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. La cepa 33J (*B. gladioli*) obtuvo un valor de 14 $\mu\text{g/mL}$, frente a 21,53 $\mu\text{g/mL}$ obtenido por Hernández *et al.* (2004) en *B. cepacia*.

Los datos obtenidos en este experimento (Anexo 12), coinciden con lo descrito por Vega-Celedón *et al.* (2016) y Nunes *et al.* (2018), en el sentido que en diversas bacterias como el fitopatógeno *P. agglomerans* y las bacterias benéficas como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Leifsonia*, *Rhizobium* y *Enterobacter* son consideradas productoras de AIA.

Los resultados presentados por las cepas 150J y 159J del grupo R2 con 37,7 y 32,4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, 37J del grupo R1 con 34,2 $\mu\text{g/mL}$, 14J de *R. hainanense* con 34 $\mu\text{g/mL}$ y 21J de *R. viscosum* con 33 $\mu\text{g/mL}$, están acorde a Clavijo *et al.* (2012) aislaron, caracterizaron e identificaron rizobacterias en *Olea europaea* en Perú, obteniendo valores de AIA de 0 para *Bacillus* y *Burkholderia* y de 37,78 $\mu\text{g/mL}$ para *Rhizobium*. Las cepas de *Agrobacterium*, la cepa control CIAT 899 obtuvo un valor intermedio de 15 $\mu\text{g/mL}$; y, 54J del grupo A3 con 27,3 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, la cepa de *Agrobacterium* más destacada fue 84J (Grupo A1) con 56,5 $\mu\text{g/mL}$.

Las cepas del género *Bradyrhizobium* que obtuvieron los mayores valores de AIA fueron 118J y 146J del grupo B1 y la 142J del grupo B2 con 31,9, 26,8 y 26,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Valores muy cercanos a los encontrados por Hernández *et al.* (2015) para *B. elkanii* ICA 8001. En la Figura 26 se muestran las reacciones de las cepas obtenidas, donde los colores más intensos indican mayor concentración de AIA. La Figura 27 muestra la comparación de los resultados de las cepas de rizobios evaluadas en esta investigación.

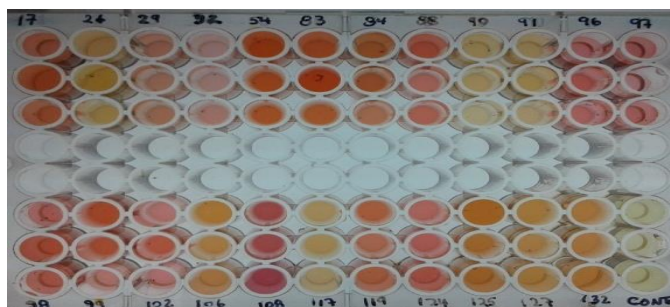


Figura 26. Producción de AIA por rizobacterias aisladas de nódulos de *C. brachystegia*. Una mayor intensidad de color rojizo indica mayor producción de AIA.

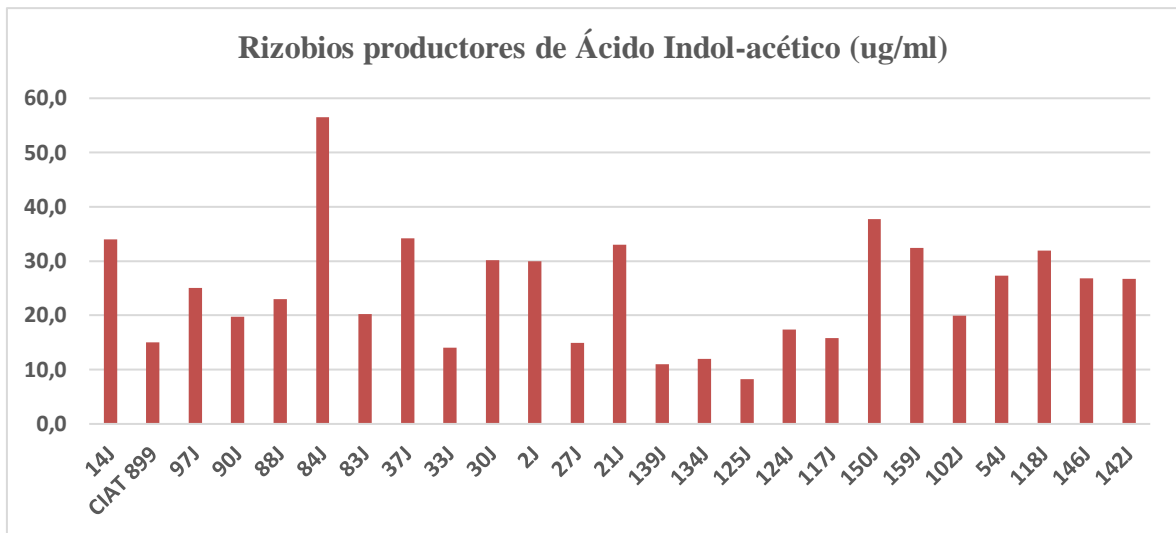


Figura 27. Concentración de rizobios productores de Ácido Indol-acético.

4.6.2.4 Capacidad PGPR de cepas de rizobios en la germinación de semillas de rábano

Para esta prueba se escogieron 10 cepas que sobresalieron en los ensayos anteriormente realizados y luego inoculadas en semillas de rábano (Figura 28). Los mejores valores de germinación fueron con las cepas 1J (grupo R1), 32J (*Bacillus*) y 134J (*B. pachyrhizi*) con 90 y 88,3% respectivamente (Tabla 18). Mientras que *Burkholderia* (33J), presentó el 53,3% ratificando lo encontrado en ensayos durante la germinación de las semillas de frejol rojo y caupí. El porcentaje de germinación de las cepas escogidas se presenta en la Figura 29.

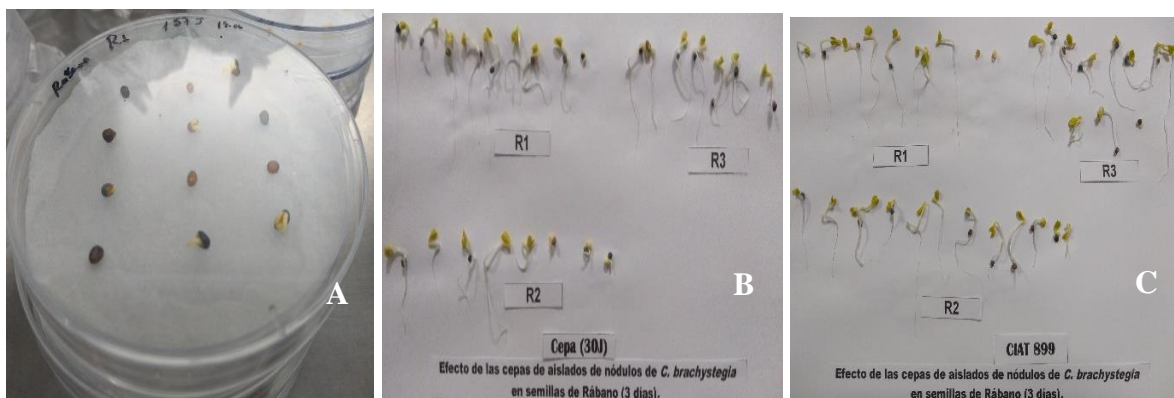


Figura 28. Efecto de la inoculación de rizobios en semillas de rábano. A) Semillas inoculadas con rizobios. B y C) Efecto en la germinación de las cepas 30J y CIAT 899. R1, R2 y R3 indican una unidad experimental compuesta de 10 semillas.

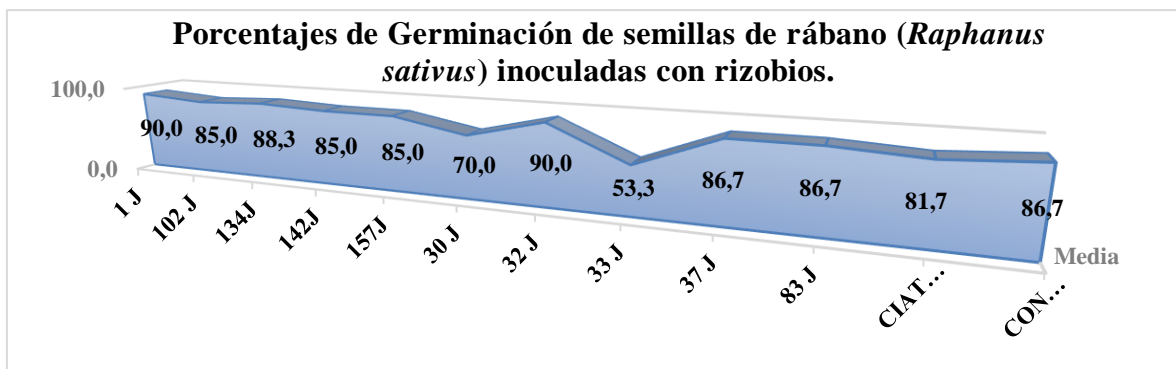


Figura 29. Gráfico del porcentaje de germinación obtenidos de la inoculación de rizobios inoculados en semillas de rábano.

Tabla 18: Porcentaje de germinación de semillas de rábano inoculadas con rizobios.

Estadísticos descriptivos		
Tratamiento	Media	
1 J	90,0	c
32 J	90,0	c
134J	88,3	c
37 J	86,6	c
CONTROL	86,6	c
83 J	86,6	c
102 J	84,9	c
142J	84,9	c
157J	84,9	c
CIAT899	81,6	c
30 J	70,0	b
33 J	53,3	a

La variable longitud de radícula (a los tres días), luego de la germinación de las semillas inoculadas, mostró cinco grupos estadísticos (Tabla 19). Destacando significativamente las cepas 37J, 1J, 102J y 32J, respecto al control sin inocular, con valores de 5,43, 5,41, 5,38, y 5,28 cm de longitud. Seguidos de la cepa 83J (Grupo A1) y CIAT 899 con valores de 4,92 y 4,87 cm, respectivamente (Figura 30). Mientras que la cepa 33J (*B. gladioli*) obtuvo el menor valor (3,14 cm), mencionado género bifuncional debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, mientras que otras establecen asociaciones simbiótico-patológicas con plantas, animales y humanos (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Tabla 19: Valores estadísticos descriptivos de la longitud de radícula, obtenidas de la inoculación de rizobios en semillas de rábano.

Estadísticos descriptivos		
longitud de radícula		
tratamiento	Media	
1 J	5,4	e
37 J	5,4	e
102 J	5,3	e
32 J	5,2	de
134J	5,1	cde
83 J	4,9	bcde
CIAT899	4,8	bcde
142J	4,7	bcd
Control	4,7	bcd
157J	4,6	bc
30 J	4,3	b
33 J	3,1	a

4.6.2.5 Actividad nitrogenasa mediante la prueba de reducción de acetileno (ARA)

Para la determinación de la reducción del acetileno, fueron escogidas 18 cepas con buenas capacidades promotoras de crecimiento, incluyendo los controles negativos N+ y N- y los controles con las cepas CIAT 899 y LMTR 28. Una vez estandarizados y ponderados los valores obtenidos a 1 g de peso seco de los nódulos, los resultados permiten establecer diferencias entre *Bradyrhizobium* respecto a *Rhizobium* (Tabla 20).

Sarr *et al.* (2009) encontraron en frejol caupí, valores de 0,8 a 35,9 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de ARA en ocho especies del género *Bradyrhizobium*, incluida la especie *B. yuanmingense* con valor de 16,8 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ cercano a la cepa control LMTR 28 (15,3 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) del mismo género evaluado en este trabajo; así como también, Duangkhet *et al.* (2018), reportaron también valores de 15 a 35 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ para *Bradyrhizobium* obtenidos de nódulos de *C. ternatea*.

Según He *et al.* (2011), para algunas cepas de *Rhizobium* reportan valores entre 1,56 y 20,51 μmol de ARA; así mismo, Imada *et al.* (2016) obtuvieron valores de 29,48 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ para la cepa CIAT 899, comparado con el valor de 22,2 μmol obtenido en este trabajo mediante cromatografía de gases, con la cepa CIAT 899 como cepa control. La secuencia de la determinación del ARA se muestra en las Figuras 36A, 36B, 36C y 36B.

Tabla 20: Número de nódulos y reducción del acetileno (ARA) en frejol caupí.

Tratamiento	<i>recA</i>	Color nódulos	Peso (g) prom. nódulos (R1-R2)	No. Prom. Nódulos (R1-R2)	Valor acetileno μ mol C_2H_2 h ⁻¹ (NDW) h ⁻¹ . g
Cepa 1J	Grupo R1	Crema	0,865	95	21,29
Cepa 2 J	<i>Agrobacterium</i>	Blancos	0,565	81	7,48
Cepa 14J	<i>R. hainanense</i>	Blancos	0,725	190	0,50
Cepa 27J	<i>R. hainanense</i>	Rosados / blanquecinos	0,585	103	10,26
Cepa 30J	<i>R. hainanense</i>	Crema	1,0	110	33,82
Cepa 37J	Grupo R1	Rosados	1,0	112	21,20
Cepa 83J	Grupo A1	Rosados / blanquecinos	1,0	94	1,75
CIAT 899	<i>R. tropici</i>	Rosados	1,0	190	22,20
N (+)	No inoculado	Sin nódulos	0,0	-	-
Cepa 88 J	Grupo A2	Blanquecinos / Rosados	0,88	80	3,75
Cepa 151J	Grupo R2	Rosados	0,85	92	5,15
N (-)	No inoculado	Sin nódulos	0,0	-	-
Cepa 99 J	Grupo B1	Blanquecinos / Rosados	0,645	33	8,07
Cepa 102 J	Grupo B1	Blancos	1,01	82	34,70
Cepa 124 J	Grupo B3	Blanquecinos / Rosados	0,765	89	16,55
Cepa 125 J	Grupo B3	Rosados	0,86	136	54,27
Cepa 134 J	<i>B. pachyrhizi</i>	Blanquecinos / Rosados	0,89	61	38,69
Cepa 136 J	<i>B. pachyrhizi</i>	Crema	0,565	89	4,86
Cepa 139 J	<i>B. pachyrhizi</i>	Blancos	0,98	60	11,70
Cepa 142 J	Grupo B2	Blanquecinos / Rosados	0,95	73	16,94
Cepa 143 J	<i>B. pachyrhizi</i>	Blanquecinos	0,54	56	17,60
LMTR28	<i>B. yuanmingense</i>	Rosados	0,88	86	15,55

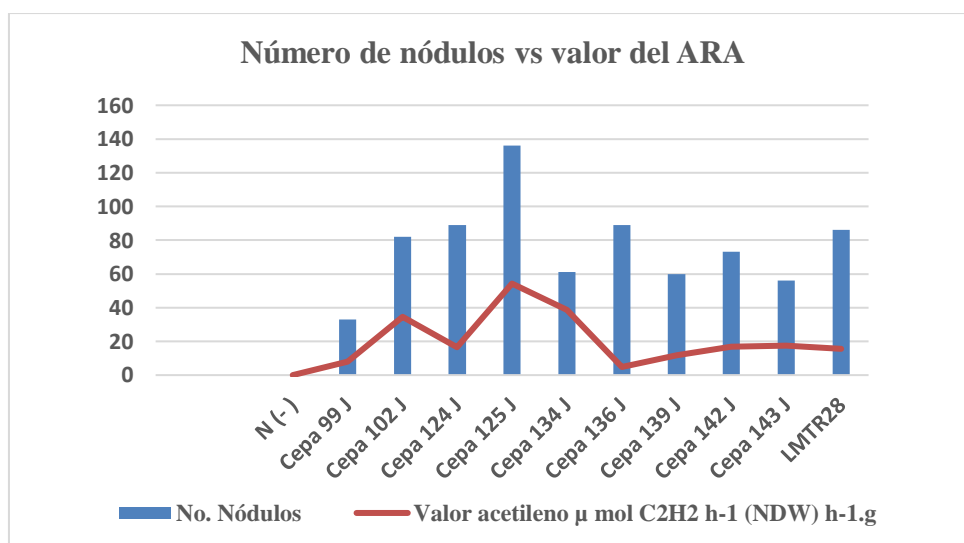


Figura 32. Valores comparados de nódulos y ARA en cepas de *Bradyrhizobium*, aisladas en *C. brachystegia*.

Finalmente, Duangkhet *et al.* (2018), encontraron que dos cepas de *Bradyrhizobium* pueden producir nódulos y fijar nitrógeno en su huésped *C. ternatea*, con niveles más altos de actividad de reducción de acetileno en nódulos infectados con la cepa de *B. elkanii* con respecto a *B. japonicum*. En este trabajo se reportan especies de *Bradyrhizobium* con valores altos de ARA como las cepas 125J, 134J y 102J, con 54,27, 38,69 y 34,7 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ respectivamente.

4.7 AUTENTICACIÓN DE LAS CEPAS DE RIZOBIOS

4.7.1 Efecto en la nodulación y crecimiento en plantas trampa

El efecto de la inoculación de las cepas de *Rhizobium* en las semillas de *Phaseolus vulgaris* (frejol var. red kidney), se llevaron a macetas de 1kg una vez germinadas, luego colocadas en un invernadero instalado a condiciones ambientales. El ensayo fue realizado a inicios de septiembre del 2016, donde la temperatura oscila en el día entre 20 a 24 °C, y de noche entre 12 a 15 °C; con una humedad relativa menor a 75%.

Las cepas de *Rhizobium* con alto porcentaje de nodulación, que a los 30 días todas las plantas colocadas en el experimento lograron formar nódulos (100%) fueron 1J, 14J, 27J y 83J; con 80 y 60% de plantas noduladas se presentaron las cepas 88J y 151J, respectivamente. Con 40% la cepa 150J; con 25% las cepas 37J y 148J; y la cepa 54J con el 20%. Mientras que las cepas 17J, 21J, 119J, 153J y 159J no nodularon, lo cual representa que el 33.3% no tuvieron la capacidad de nodular a *Phaseolus vulgaris*, en el caso de *Rhizobium*.

En el caso de *Bradyrhizobium*, los ensayos con plantas se realizaron durante los meses de enero a junio de 2019, el promedio de temperatura en el día fue de 22,2 °C, y en la noche 22,0 °C; con una humedad relativa promedio de 78,4%. En estas condiciones, las cepas 91J, 96J, 97J, 98J, 99J, 106J, 108J, 118J, 124J, 132J, 134J, 139J y 146J presentaron el 80% de nodulación; con baja 33% de nodulación, las cepas 102J y 117J y la cepa 90J no presentó nodulación (Figura 33).

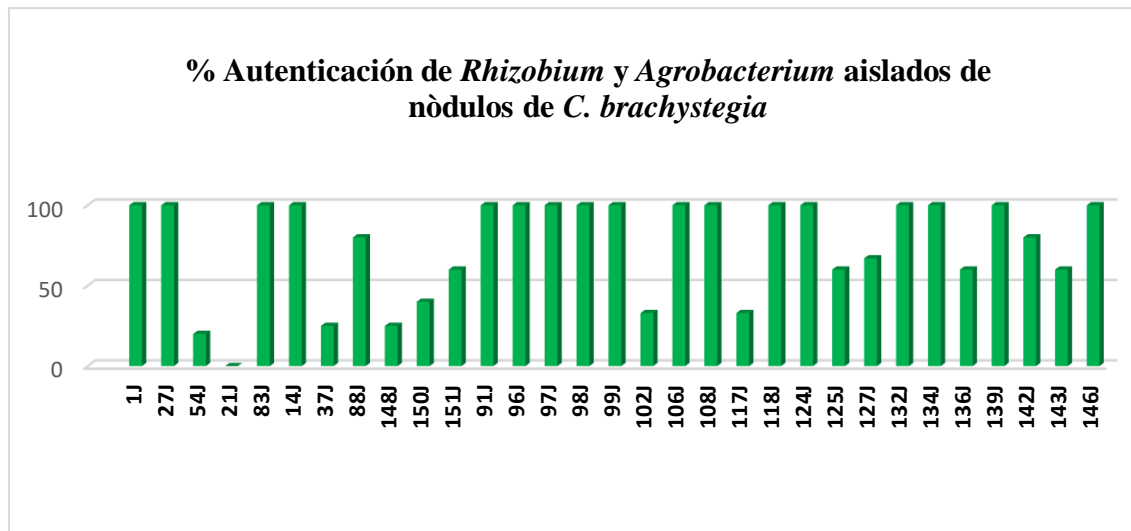


Figura 33. Porcentaje de plantas de frejol noduladas al ser inoculadas con cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* acorde a las repeticiones empleadas.

Cabe mencionar también que, dentro del grupo de las cepas acompañantes en experimentos previos a la caracterización molecular y en condiciones de invernadero, las cepas de *B. gladioli* inhibió el 68% de las semillas en la germinación del frejol var. red kidney.

Los valores encontrados en este trabajo se encuentran acorde a Cuadrado *et al.* (2009), sobre la importancia de realizar autenticaciones para verificar la presencia de los nódulos, su localización en la raíz y la supervivencia del inóculo en la semilla. Sin embargo, si la confirmación de la nodulación no es positiva, no deberá considerarse literalmente como que no pertenecen a rhizobia, debido al hecho de que no necesariamente todo *Rhizobium* (y dada su amplia diversidad genética) deba nodular frejol (Martínez-Scott *et al.* 2002).

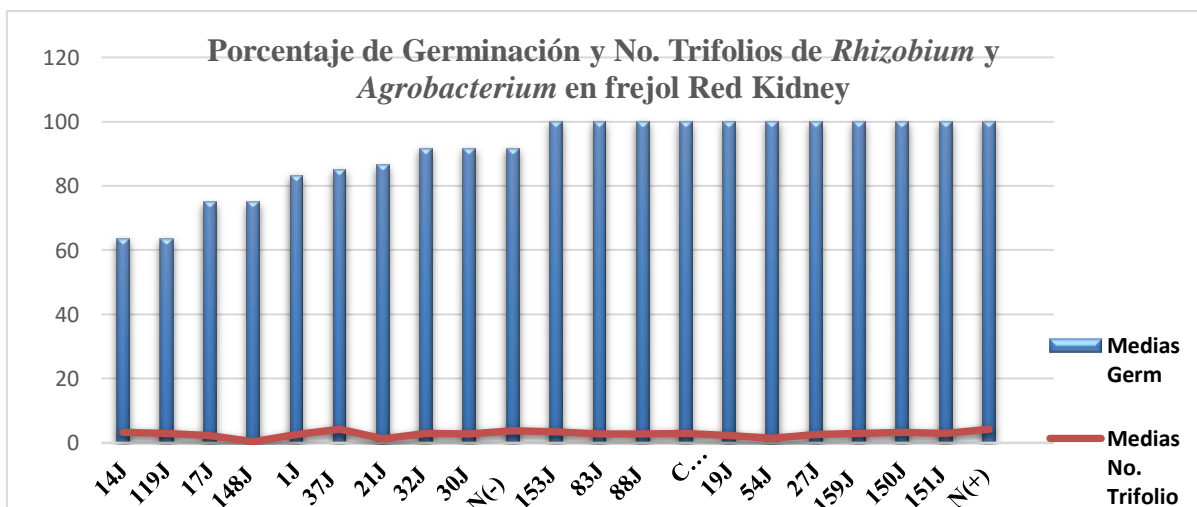


Figura 34. Porcentaje de germinación y número de trifolios, obtenidos de *Rhizobium* y *Agrobacterium* inoculados en semillas de frejol rojo (*P. vulgaris*).

4.7.2 Efecto de *Rhizobium* y *Agrobacterium* en la germinación de semillas de frejol var. red kidney (*P. vulgaris*)

4.7.2.1 Número de trifolios por planta

Esta variable formó siete grupos estadísticos (Anexo18) cuyo valor más alto en media aritmética presentó la cepa 37J y N (+), con 4,25. Seguido de N (-) con 3,8 y 3,5 respectivamente.

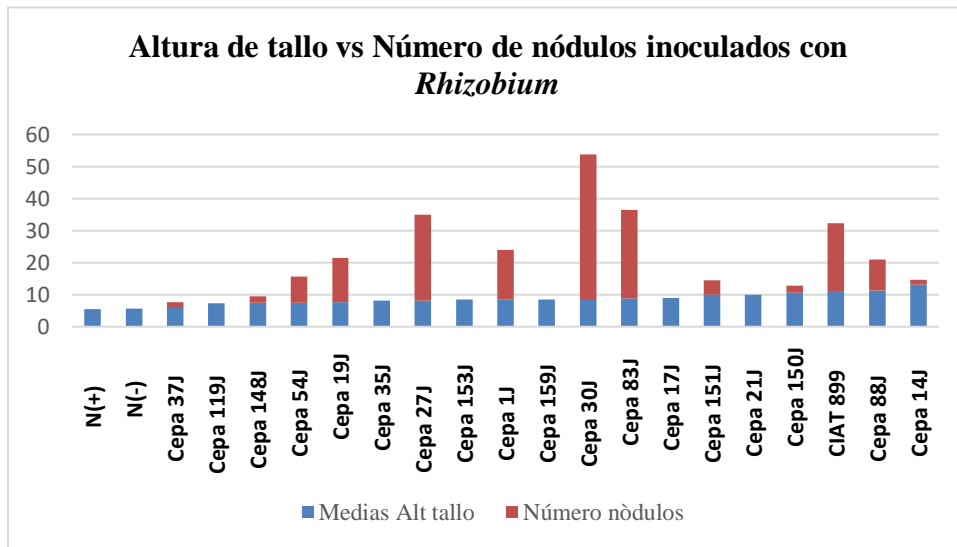


Figura 35. Comparación de la altura de tallo y número de nódulos de plantas de frejol rojo (*P. vulgaris*), inoculadas con cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

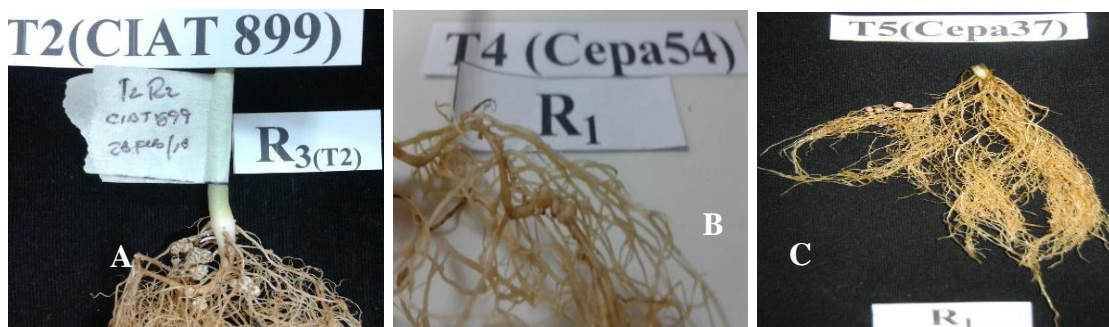


Figura 36. A) Raíces de frejol var. red kidney noduladas con cepas de *R. tropici* y de *Agrobacterium* en el experimento de autenticación (B y C).

4.7.2.2 Altura de tallo

Esta variable también presentó siete grupos estadísticos, con valores de 13,22, 11,24 y 11,08 cm de las cepas 14J, 88J y CIAT 899 respectivamente, por encima de los valores más bajos obtenidos por los controles N (+) y N (-) con 5,40 y 5,72 cm, respectivamente.

4.7.2.3 Peso fresco parte aérea

El análisis estadístico de esta variable no presentó ninguna diferencia significativa. Sin embargo, las cepas 14J, 88J, 83J, 37J y CIAT 899 con valores de 2,42, 2,35, 2,28, 2,06 y 2 g estuvieron por encima de los obtenidos por los controles N (+) y N (-) con 1,40 y 1,05 g.

4.7.2.4 Peso seco parte aérea

Las cepas 14J, 150J y 37J con valores de 0,48, 0,34 y 0,33 g., seguida de 151J y de la cepa control CIAT 899 con 0,32 g. La figura 37 muestra los resultados del peso fresco y peso seco obtenido en la inoculación de cepas de *Rhizobium* y de *Agrobacterium* en frejol rojo.

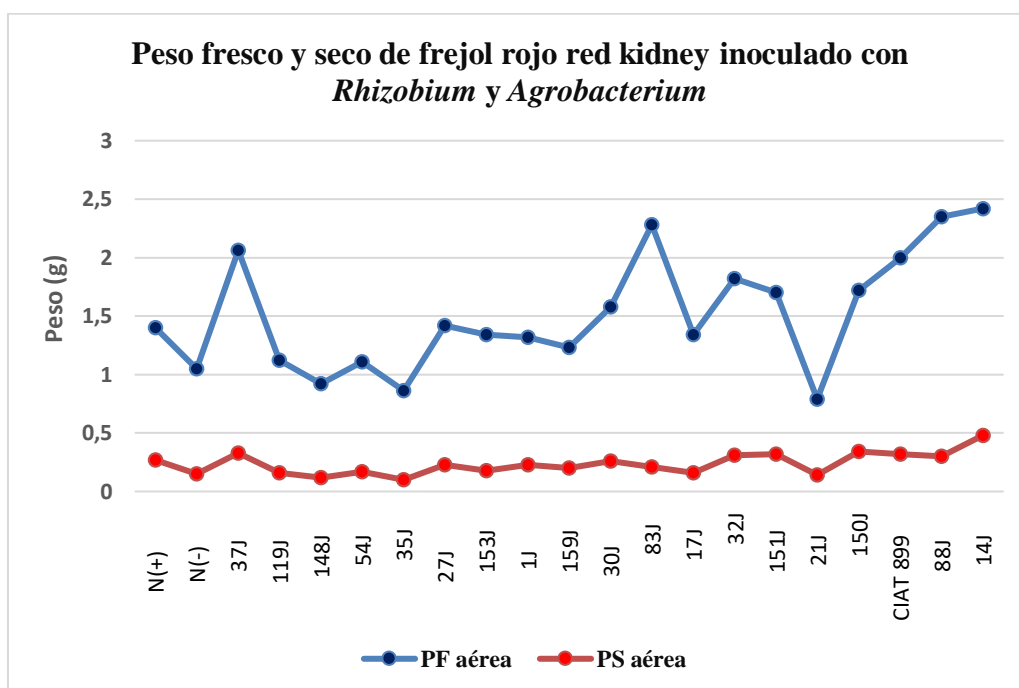


Figura 37. Comparación del peso fresco y seco de la parte aérea de frejol var. red kidney inoculados con cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

4.7.2.5 Peso fresco de raíz

Destacan en esta variable las cepas 151J, 37J, 83J, 32J y N (+) cuyos valores de 3,01, 2,99, 1,95, 1,90 y 1,88 g., destacaron sobre el control (N-) 0,78 g que fue el más bajo observado. Se formaron tres grupos estadísticos.

4.7.2.6 Peso seco de raíz

Se formaron cinco grupos estadísticos donde destacan las cepas 151J, 32J, 37J y 150J, con pesos de 0,22, 0,19 y 0,18 g respectivamente. Los controles CIAT 899 y N (+) y N (-) con 0,13, 0,14 y 0,05 g., respectivamente.

4.7.2.7 Longitud de raíz

Se obtuvieron valores de 21,30, 20,90 y 20,46, correspondientes a las cepas 14J, 30J y 1J. Nuevamente los valores registrados para N (+) y N (-) fueron los más bajos encontrados para esta variable con 13,75 y 11,06 cm., respectivamente. Los resultados del peso fresco, seco y longitud de raíz de plántulas de frejol red kidney, inoculados con cepas de *Agrobacterium* y *Rhizobium* se muestran en las Figuras 38, 39 y 40.

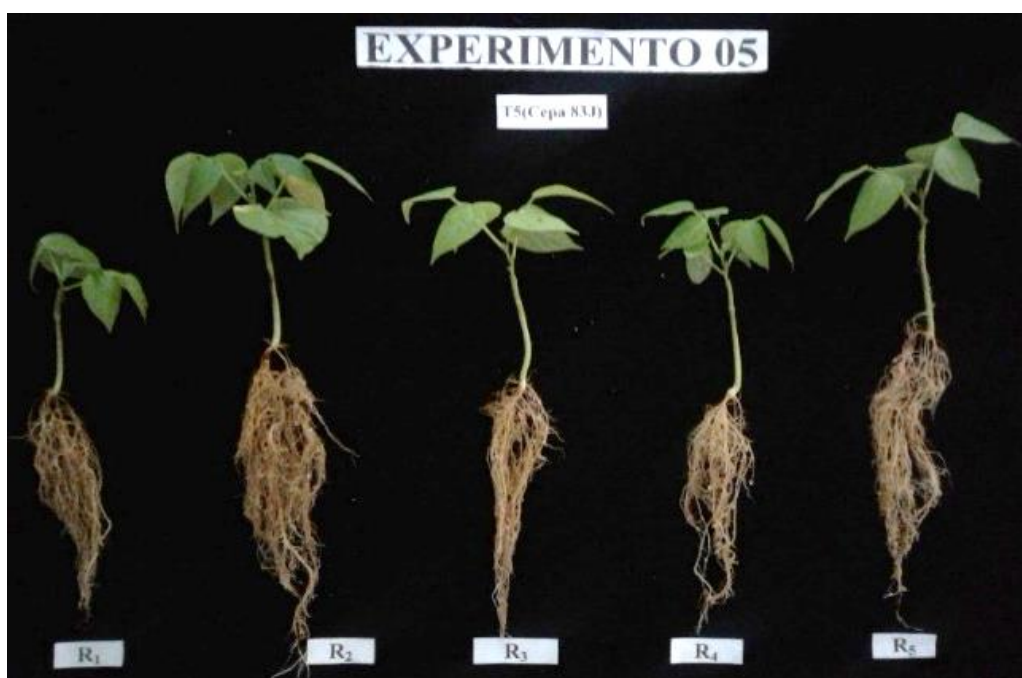


Figura 38. Plantas de frejol red kidney, inoculadas con *Agrobacterium* (83J).

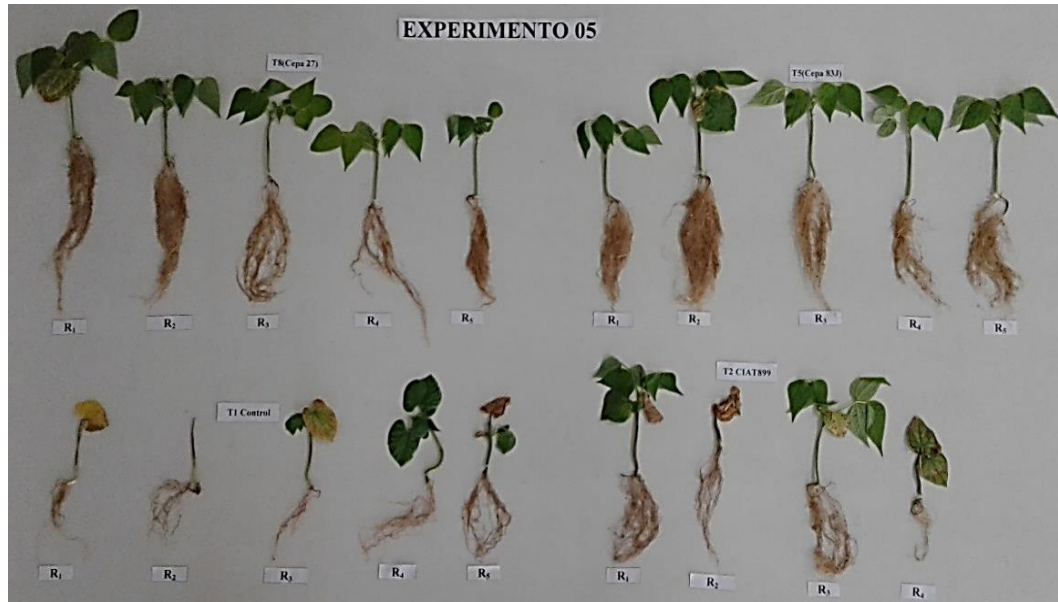


Figura 39. Plantas de frejol red kidney a los 30 días de cultivo, inoculados con cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* (21J, 83J arriba y los controles N- y CIAT 899 abajo).

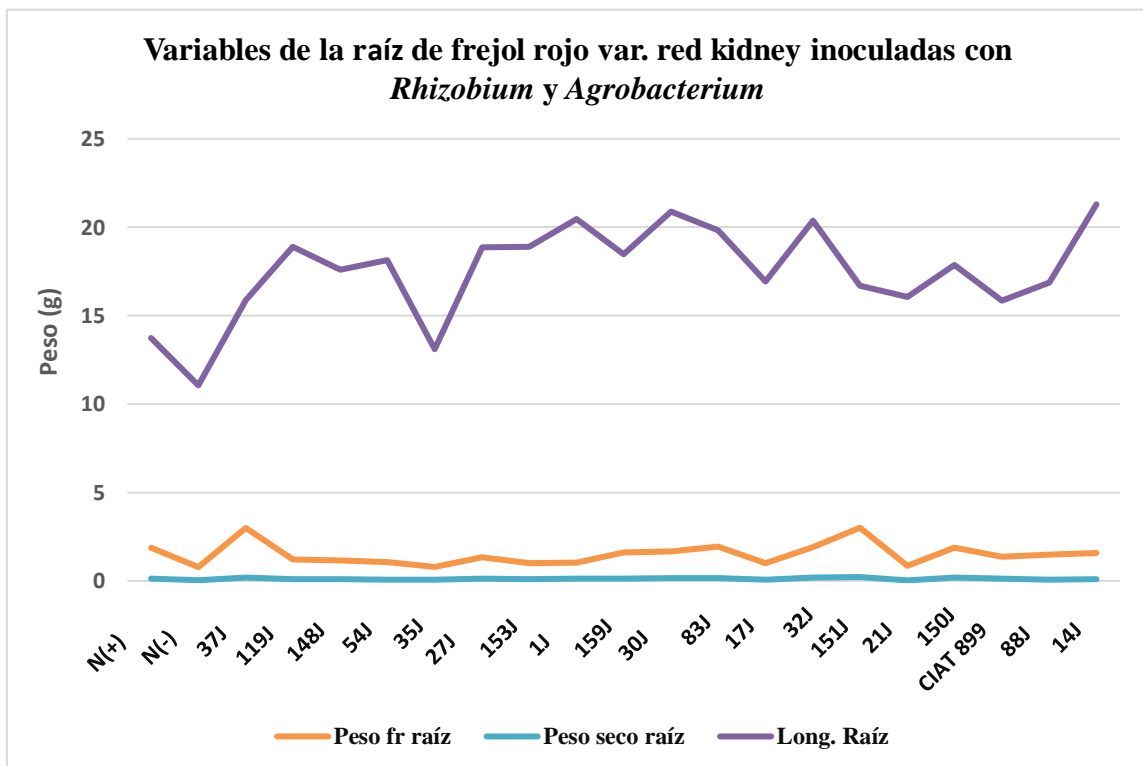


Figura 40. Comparación del peso fresco, seco y longitud de raíz de plántulas de frejol red kidney, inoculados con *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

4.7.3 Efecto de *Bradyrhizobium* en la germinación de las semillas de frejol caupí (*Vigna unguiculata*)

Se formaron cinco grupos estadísticos para esta variable, el grupo 100% de cepas germinadoras fueron 90J, 91J, 97J, 99J, 117J, 118J, 124J, 125J, LMTR 28 y el control N (+). Las cepas 106J y 146J estuvieron por debajo del 75% de germinación. La Figura 41 muestra el efecto en la germinación de cepas de *Bradyrhizobium* inoculado en frejol caupí.

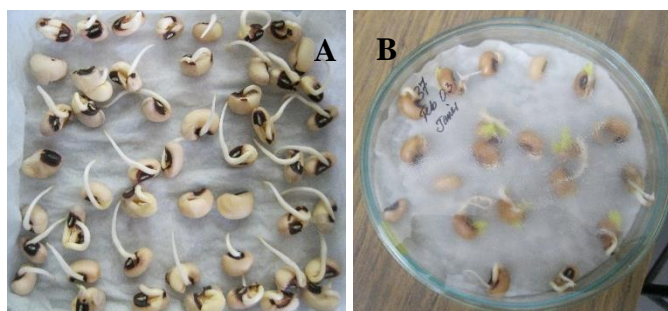


Figura 41. Germinación de semillas de frejol caupí (*V. unguiculata*). A) Inoculadas con *Bradyrhizobium*. B) Sin inocular.

4.7.3.1 Número de trifolios por planta

Las cepas que sobresalieron en esta variable fueron 106J y 99J con 4,80 y 4,20 trifolios respectivamente. Los valores de los controles fueron de 2,75, 2 y 1,5 de N (+), LMTR 28 (Figura 42) y N (-), respectivamente.

4.7.3.2 Número de nódulos por planta

Los resultados más altos para evaluar el número de nódulos, fueron de las cepas 118J, 91J, 98J y 99J con valores de 41,20, 35,4, 34,4 y 32,2. El grupo con baja capacidad de formar nódulos en la planta trampa fueron 134J, 107J, 102J y 127J, con valores de 5,8, 4,67, 1,67 y 1,0, respectivamente. Cabe mencionar que la cepa 90J no fue capaz de nodular, así como los controles N (+) y N (-).

Las Figuras 43 y 44 muestran la comparación entre el porcentaje de germinación, número de trifolios, altura de tallo y número de nódulos obtenidos de la inoculación con las cepas de *Bradyrhizobium* aisladas en este trabajo.



Figura 42. Plántulas de frejol caupí (*V. unguiculata*) inoculadas con *B. yuanmingense* (cepa LMTR 28).

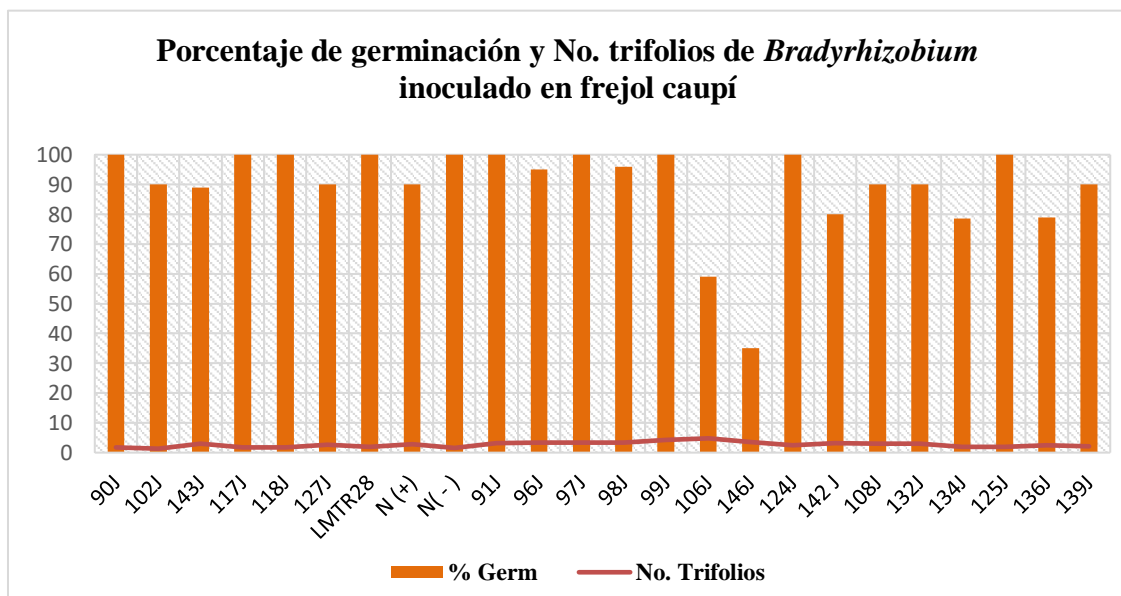


Figura 43. Porcentaje de germinación y número de trifolios en frejol caupí inoculado con *Bradyrhizobium*.

4.7.3.3 Altura de tallo

Se formaron cuatro grupos estadísticos muy diferenciados, donde las cepas con los valores más altos fueron 118J, 127J y LMTR 28 con 13,82, 13,37 y 13,05 cm respectivamente. Mientras que las cepas 125J, 134J y 136J presentaron los valores de 4,42, 4,10 y 3,96 cm, los más bajos obtenidos de altura de tallo.

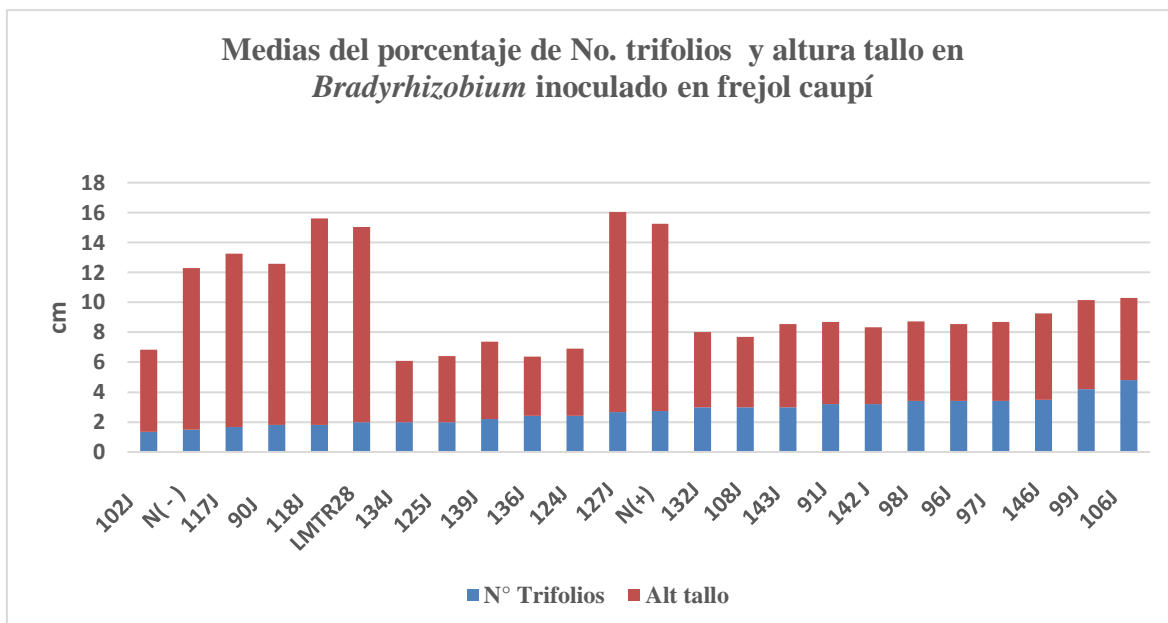


Figura 44. Número de trifolios y altura de tallo (cm) en *V. unguiculata* inoculado con cepas de *Bradyrhizobium*.

4.7.3.4 Peso fresco parte aérea

En esta variable, las cepas 106J, 146J y N (+) presentaron los mayores valores 3,25, 3,06 y 2,83 g, mientras que los controles LMTR 28 y N (-) presentaron valores de 1,86 y 1,38 respectivamente. El valor más bajo fue de la cepa 102J con 0,51 cm. Esta variable formó siete grupos estadísticos.

4.7.3.5 Peso seco parte aérea

Las cepas 106J, 146J y 97J con valores de 0,73, 0,70 y 0,59 g fueron los más altos obtenidos, en cambio el control N (-), 134J y 102J con 0,21, 0,16 y 0,02 g fueron los más bajos registrados. El control LMTR 28 obtuvo 0,30 g.

4.7.3.6 Peso fresco raíz

Esta variable presentó nueve grupos estadísticos para el análisis de la varianza con Tukey al 0,05% de confiabilidad. Las cepas 127J, 146J y 117J con valores de 2,42, 2,38 y 2,32 g respectivamente. Los controles LMTR 28, N (+) y N (-) registraron valores de 1,58, 1,43 y 0,74 g; siendo la de menor valor la cepa 102J con 0,43 g.

4.7.3.7 Peso seco raíz

Los valores más altos para esta variable fueron de 0,30, 0,27 y 0,26 g logrados por las cepas 146, 99J y 108J respectivamente. El menor valor obtenido fue de la cepa 134J con 0,07 g. Los controles LMTR 28, N (+) y N (-) presentaron valores de 0,20, 0,14 y 0,09 g respectivamente.

4.7.3.8 Longitud de la raíz

Se formaron siete grupos estadísticos en esta variable, destacando las cepas 108J, 117J y 127J con valores de 18,4 y 18,3 cm de longitud de raíz. Mientras que los controles LMTR 28, N (+) y N (-) obtuvieron valores de 15,55, 13,73 y 12,55 g. este último el valor más bajo en comparación con los demás tratamientos. En la Figura 45 muestra la comparación entre las variables peso fresco y longitud de raíz de este experimento.

Los experimentos de autenticación y efecto del género *Bradyrhizobium*, en condiciones de invernadero (Figura 46), están acorde a los realizados por Leite (2015) en el mismo frejol (*V. unguiculata*), en una región semiárida de Brasil. Todos los datos obtenidos de la estadística descriptiva del análisis de la varianza de las variables consideradas para la autenticación de las cepas de *Bradyrhizobium* se encuentran en el Anexo 20.

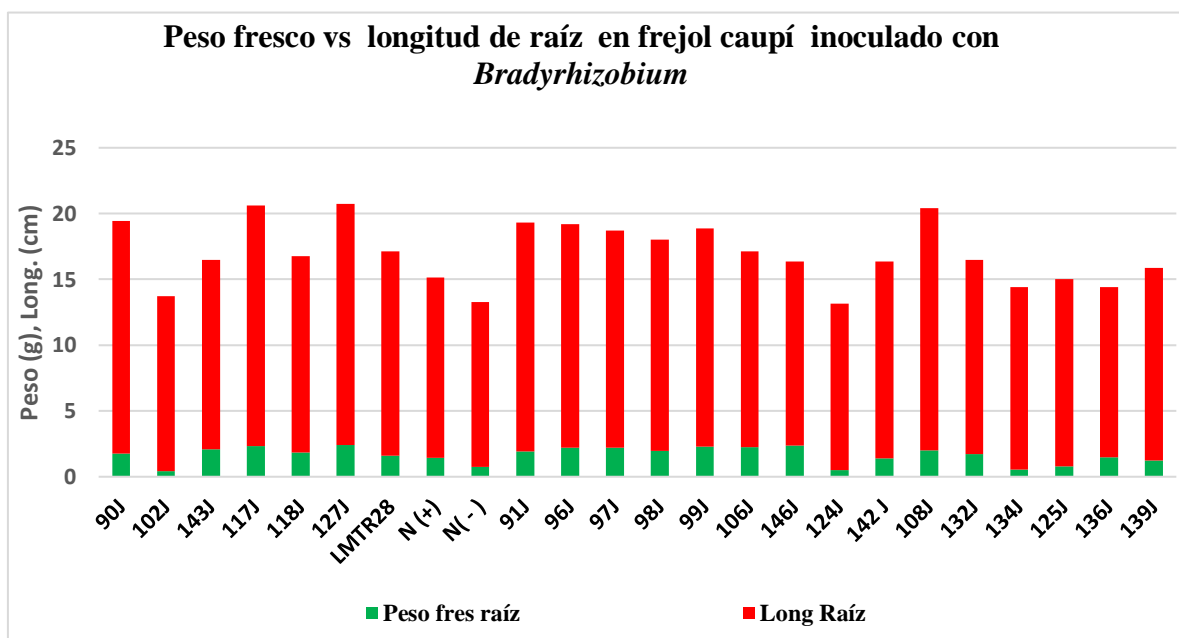


Figura 45. Peso fresco y longitud de raíz en *V. unguiculata* inoculado con cepas de *Bradyrhizobium*.



Figura 46. Experimento de autenticación y efecto en el crecimiento de plantas de *V. unguiculata* inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium*. A) Experimento en maceta en condiciones de vivero. B) Comparación del efecto en planta de cuatro de los tratamientos inoculados (superior) y no inoculados (inferior).

Finalmente se realizó un análisis clúster con los resultados del efecto de los rizobios en la germinación, variables de crecimiento y nodulación en las plántulas que permitió agrupar a los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Bradyrhizobium* en subgrupos (Figuras 47 y 48). Las cepas de *Rhizobium/Agrobacterium* generaron dos grupos, en el primero se agruparon las cepas 17J, 29J, 21J, 35J, 54J, 119J, 148J y el control y N (-).

En el segundo grupo están las cepas 14J, 37J, 88J, 150J, 151J, 1J, 27J, 30J, 32J, 83J, 153J, 159J, los controles CIAT 899 y N (+).

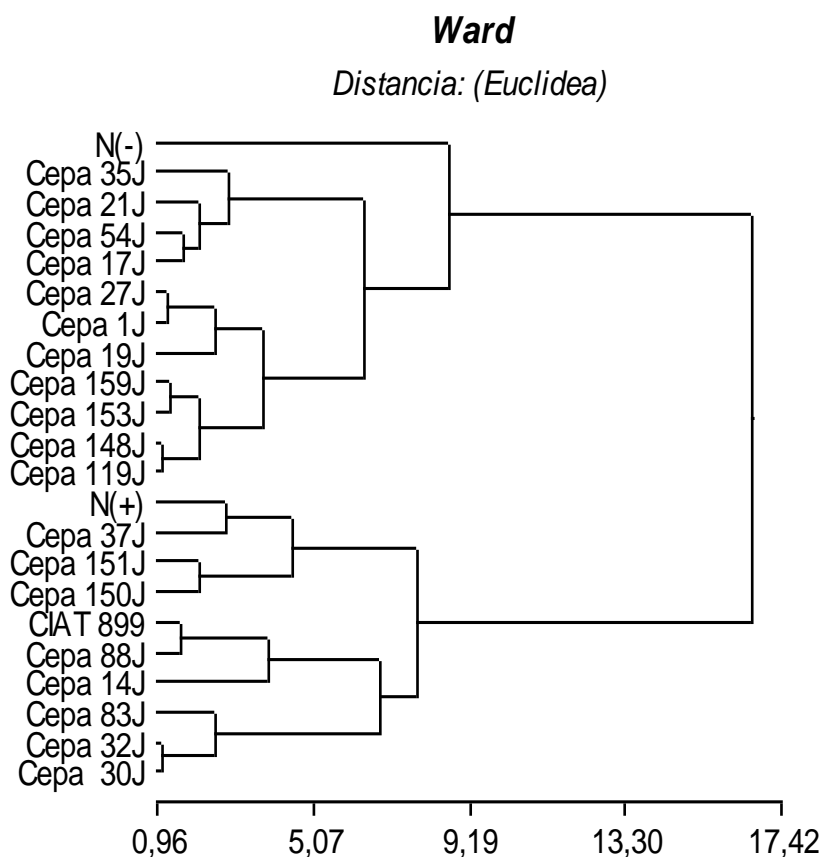


Figura 47. Análisis de Clúster del efecto de las cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* en *P. vulgaris*.

Mientras que las cepas de *Bradyrhizobium* formaron tres grupos, en el primero se encuentran seis cepas 90J, 117J, 118J, 127J y los controles LMTR 28 y N (-). En el segundo grupo está formado por las cepas 91J, 96J, 97J, 98J, 99J, 106J, 108J, 132J, 136J, 139J, 142J, 143J y 146J. Mientras que en el tercer grupo se encuentran 102J, 124J, 125J, 134J y N (-).

Los valores obtenidos en los experimentos de autenticación y efecto en las plantas trampa por 30 días promedio en condiciones de invernadero de las 37 cepas de rizobios evaluados en este trabajo, evidencian que la mayoría de las cepas nodularon sus plantas trampa simbiotes con crecimiento acorde a Ahmad *et al.* (1984) y Menna *et al.* (2009), excepción de siete cepas (18,9%) que no nodularon. Quizás debido a la poca o ninguna interacción entre los simbiotes (Aeron *et al.* 2015).

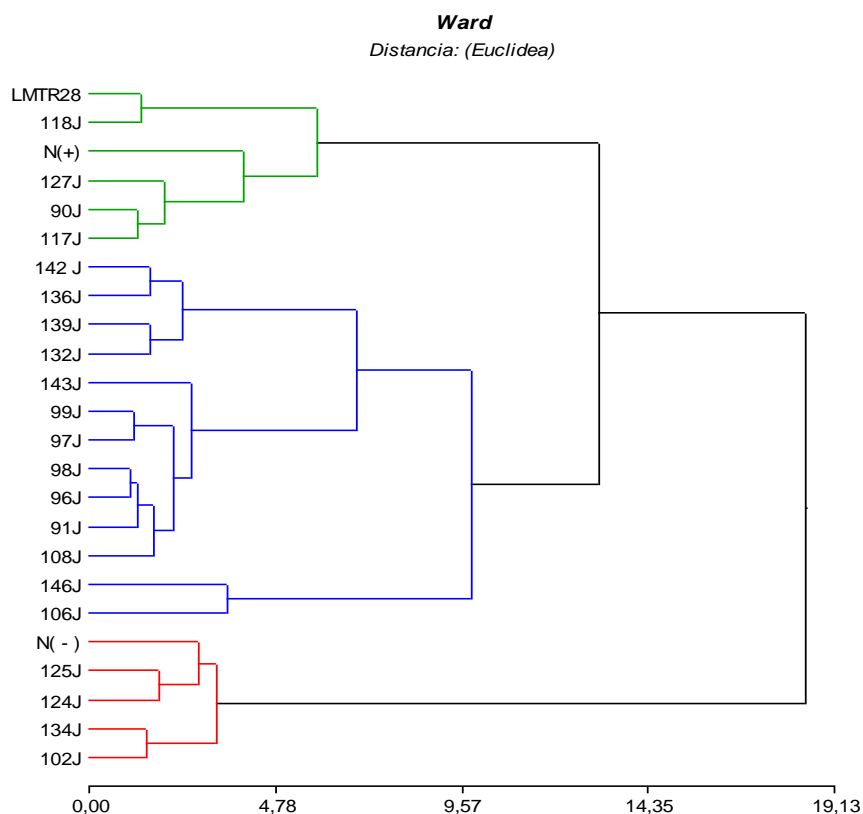


Figura 48. Análisis de Clúster del efecto de las cepas de *Bradyrhizobium en V. unguiculata*.

En resumen, al comparar las medias del análisis de la varianza para el efecto de *Rhizobium* y *Agrobacterium* en *P. vulgaris*, encontrando diferencias significativas en las variables altura de tallo, pesos fresco y seco de la parte aérea y longitud de raíz, la cepa con mejor resultado fue 14J (*R. hainanense*), seguido de la cepa acompañante 32J (*B. amyloliquefaciens*), esta última mencionada como una cepa con capacidad de producir compuestos antibióticos, las cuales ayudan al antagonismo de patógenos que producen enfermedades devastadoras en las plantas (Moncada 2014; Villareal-Delgado *et al.* 2018).

Para el caso del efecto de las cepas de *Bradyrhizobium*, las más prominentes fueron 146J, 99J (Grupo B1), y la cepa 106J (Grupo B2) la primera cepa se destacó en las variables número de nódulos, pesos frescos y secos de las partes aérea y raíz. Seguida de la cepa 106J, en las variables número de trifolios, peso fresco de la parte aérea y seca. La cepa 99J, se destaca en el porcentaje de germinación y acompaña a las otras dos cepas en el número de trifolios y peso seco de la raíz.

4.8 INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS LOCALIDADES EN LA DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS QUE NODULAN A *C. brachystegia*.

Mediante la genotipificación molecular, las 46 cepas de *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Bradyrhizobium* están adaptadas a la capacidad de nodular su huésped simbiótico *C. brachystegia*, bajo condiciones locales y disponibilidad de nutrientes únicos de cada localidad, mencionados por Cao *et al.* (2014). Enfatizando que, diferentes cepas de una misma especie son muy sensibles al pH y el género *Rhizobium* en particular, es sensible a la acidez acorde a lo mencionado por Frioni (2011) y a los valores encontrados en la localidad de Puyango, Ecuador (Tabla 21).

La relación entre las características de suelo y diversidad (H') evidencia que la localidad UG con textura franco arenosa, pH neutro (6,27) y valores altos de fósforo (P), potasio (K) y materia orgánica (MO) presenta el mayor índice de diversidad (1,34) de las localidades monitoreadas (Figura 49).

La localidad de Puyango con suelo arcilloso, pH ácido (4,28), valores bajos en materia orgánica (0,33%), valores medios en P y K presenta el menor índice de diversidad (1,0). MY y PB, con valores bajos a medianos en K, MO y CaCO₃, neutros en pH y valores alto a mediano en fósforo, presentan valores de diversidad 0,81 y 0,98 respectivamente, acorde a las conclusiones de Cao *et al.* (2014) respecto a que los pH de los suelos son claves en la distribución y diversidad de los rizobios.

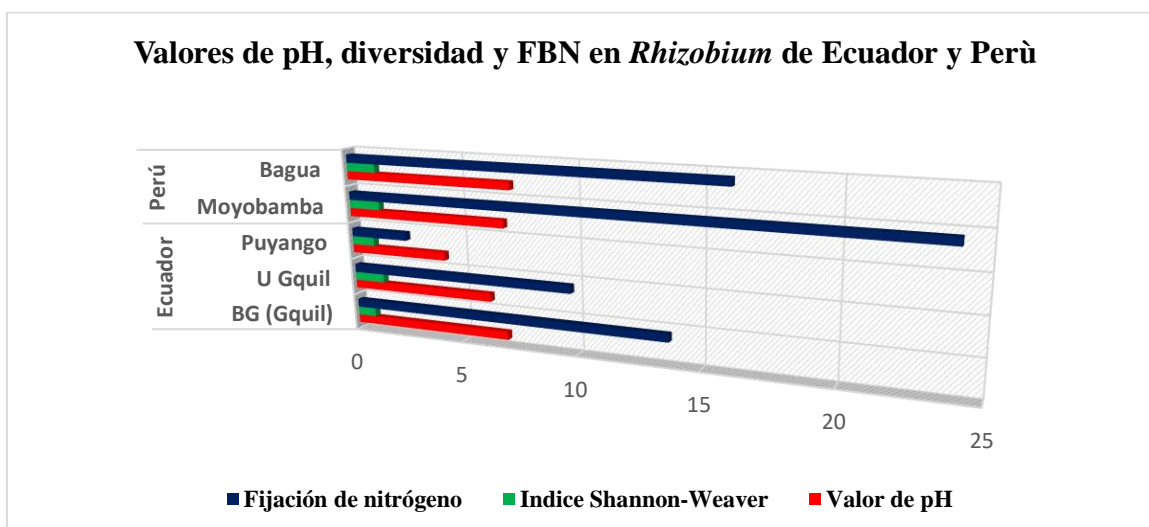


Figura 49. Relación entre el pH del suelo, diversidad y Fijación de N₂ de los *Rhizobium* en el bosque seco tropical.

Tabla 21: Características de suelo y diversidad de rizobios asociados con *C. brachystegia* en el bosque seco tropical de Ecuador-Perú.

Especies	Ecuador			Perú	
	JB (Gquil) (BG)	U Gquil (UG)	Puyango (PY)	Moyobamba (MY)	Bagua (PB)
	Número (%) *				
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		3 (6,97)			
<i>Agrobacterium</i> sp. (A1)			2 (4,65)		
<i>Agrobacterium</i> sp. (A2)			1 (2,32)		
<i>Agrobacterium</i> sp. (A3)			1 (4,65)		
Subtotal <i>Agrobacterium</i>		3 (6,97)	4 (9,3)		
<i>Rhizobium hainanense</i>	3 (6,97)	2 (4,65)			
<i>Rhizobium viscosum</i>		1 (2,32)			
<i>Rhizobium</i> sp. (R1)		6 (13,95)			
<i>Rhizobium</i> sp. (R2)					5 (11,62)
Subtotal <i>Rhizobium</i>	3 (6,97)	9 (20,93)			5 (11,62)
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>				8 (18,6)	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B1)					5 (11,62)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B2)				4 (10,0)	2 (5,0)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (B3)					2 (5,0)
Subtotal <i>Bradyrhizobium</i>				12 (27,9)	8 (18,6)
Total (<i>Agrobacterium</i>+<i>Rhizobium</i> + <i>Bradyrhizobium</i>) = 43 (100)	3 (6,97)	12 (27,9)	4 (9,3)	12 (27,9)	13 (30,23)
Índice Shannon-Weaver	0,01	1,39	1,10	0,64	1,39
Fijación biológica de Nitrógeno (FBN)	13,74	9,76	2,53	24,01	16,12

% CONSIDERA EL NÚMERO ENTRE PARÉNTESIS REPRESENTA EL PORCENTAJE DE CADA GÉNERO DE SU LOCALIDAD.

El análisis de la diversidad por localidad empleando el índice de Shannon de los rizobios noduladores fue bajo (< 2), quizás su relación con los factores físico-químicos y ambientales (T° y humedad) podrían influir en su distribución y biodiversidad con su huésped endémico, infiriendo de que *C. brachystegia* estaría asociada a por lo menos nueve especies diferentes de *Rhizobium* en las cinco localidades del BST monitoreadas y con evidente contribución a la fijación biológica de nitrógeno al ecosistema. Así como también, de una probable preferencia de *C. brachystegia* por α y β Proteobacterias (*Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Burkholderia*) en las localidades de Ecuador y Perú; y, la especificidad de *C. brachystegia* por el género *Bradyrhizobium* en Perú. Acorde a lo mencionado por Bissett *et al.* (2010); Wu *et al.* (2011); Li *et al.* (2012); Yang *et al.* (2013), con relación a que las condiciones edáficas y biogeográficas influyen en la distribución y biodiversidad de rhizobia en su huésped leguminosa. Leite (2015) encontró varios de los géneros reportados en este trabajo, en nódulos de *V. unguiculata* del noroeste de Brasil.

4.9 DESCRIPCIÓN ULTRAMICROSCÓPICA EN NÓDULOS

Las muestras de nódulos para analizar al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), incluyó un proceso de secado para evitar que se produzca deformación en las muestras. Para lograr esto se realizaron procesos de fijación, deshidratación, secado por evaporación y secado de punto crítico con dióxido de carbono. Luego se realizaron cortes histológicos transversales con micrótopo a las muestras de nódulos desecados.

Todos los nódulos fueron colectados de los experimentos de autenticación en las plantas trampa correspondientes frejol rojo (*Phaseolus vulgaris*) para *Rhizobium* y *Agrobacterium*, y caupí (*Vigna unguiculata*) para *Bradyrhizobium*. Así como también, de las plántulas de *C. brachystegia* obtenidas por germinación en experimentos in vitro, que implicó la escarificación y posterior germinación de las semillas colectadas en los sitios muestreados en el campo. Las semillas de *C. brachystegia* presentaron baja tasa de germinación y crecimiento de las plántulas obtenidas, quizás debido a las condiciones ambientales desfavorables y condiciones intrínsecas desconocidas de esta leguminosa.

Por otra parte, la ultramicroscopía con MEB y TEM, evidenció formas bacilares características de la colonización de rhizobia al interior de los nódulos de *V. unguiculata* (Figuras 50 y 51), *P. vulgaris* (Figura 52) y *C. brachystegia* (Figuras 53, 54 y 55).

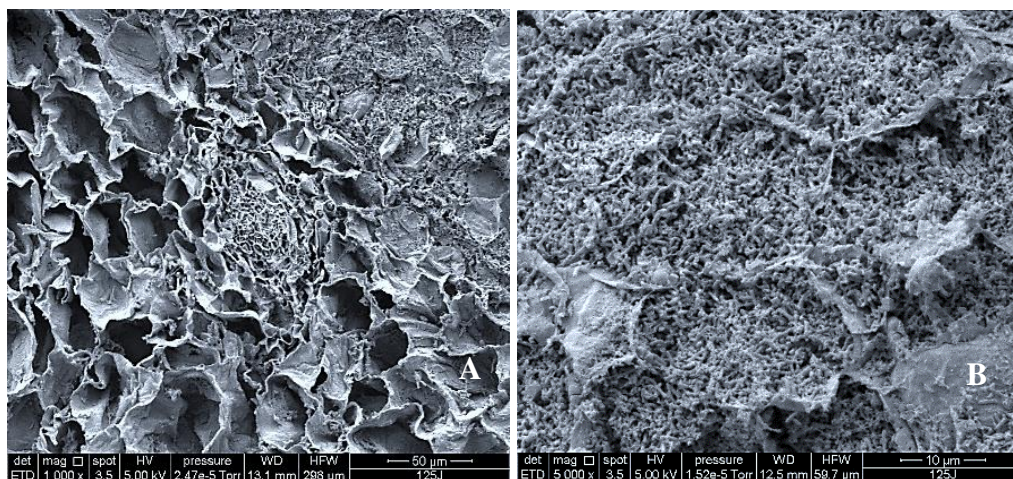


Figura 50. Secuencia de la magnificación a 1.000x, 5.000x y 10.000x con SEM, al interior de un nódulo de frejol caupí (*V. unguiculata* L.), cepa 125J (*Bradyrhizobium* sp. Grupo B3). A) Nódulo cortado transversalmente, exponiendo las celdillas (membrana peribacteroidal). B) Bacterias con forma de Bacilos colonizadores de los nódulos.

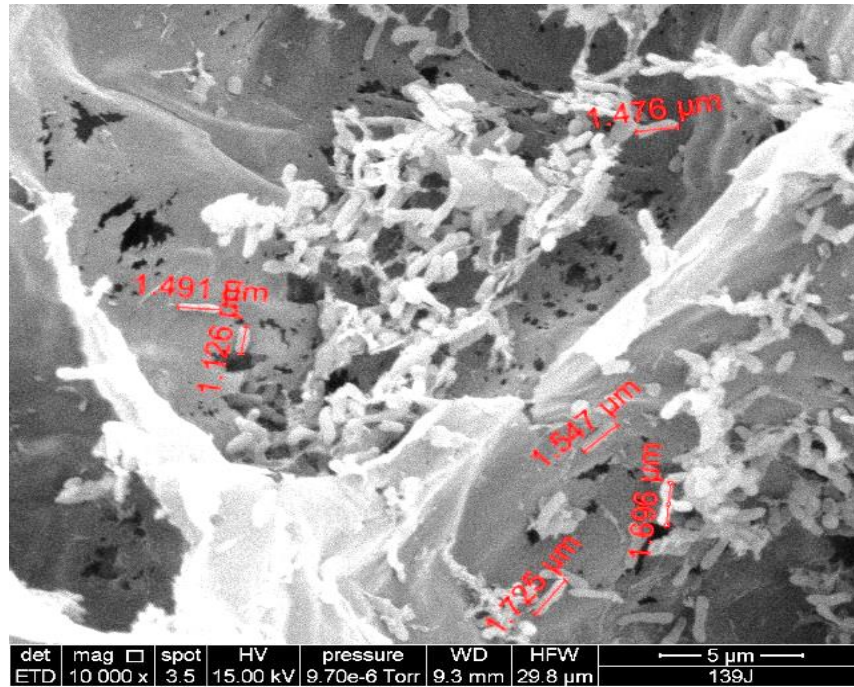


Figura 51. Microfotografías del interior de un nódulo de *V. unguiculata*, cepa 139J (*B. pachyrhizi*), mostrando el tamaño de los bacteroides rodeados de la membrana peribacteroidal a 10.000x.

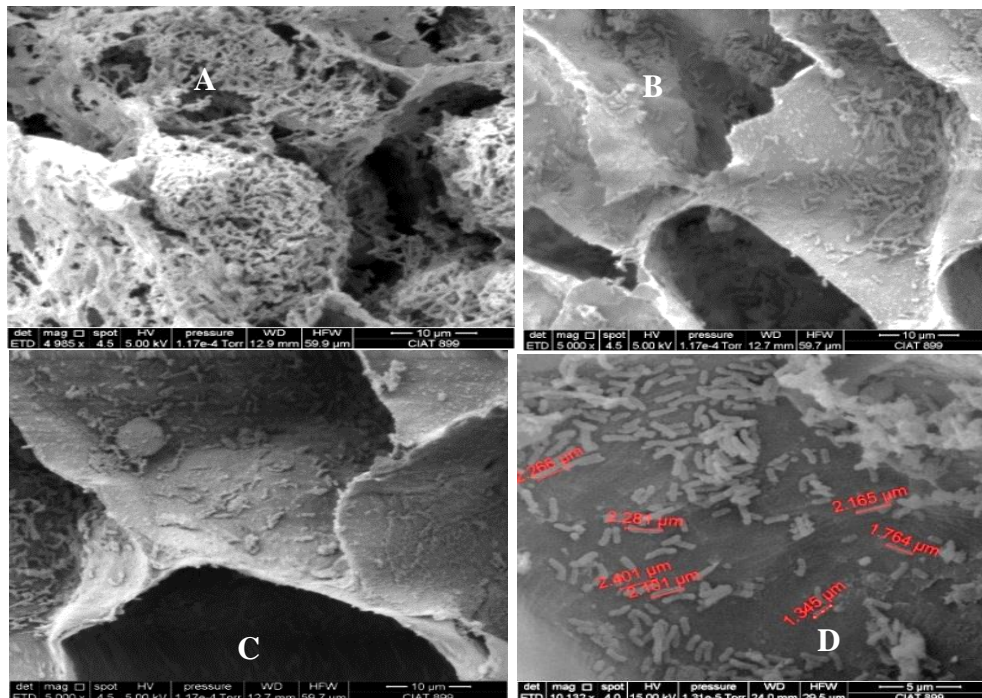


Figura 52. Microfotografías de la cepa CIAT 899, en *P. vulgaris* var. frejol rojo. A) Magnificación a 5.000x evidencia de la cepa control *R. tropici* en colonia, al interior del nódulo. B y C) Bacilos en el interior de una membrana peribacteroidal intacta. D) Medida de los bacteroides.

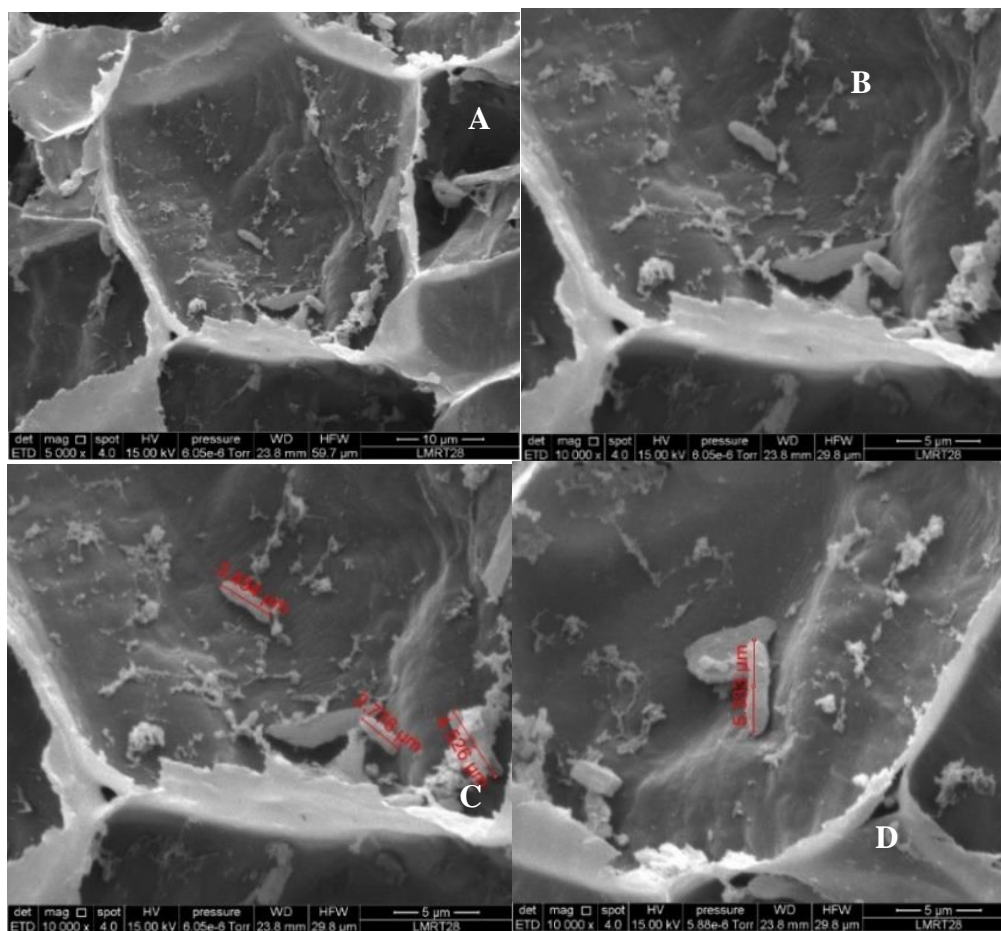


Figura 53. Microfotografías del interior de un nódulo de *C. brachystegia*, cepa LMTR 28. A y B) Secuencia de la magnificación a 5.000x y 10.000x de *Bradyrhizobium* colonizando el interior del nódulo. C y D) Medida tomada a los bacteroides encontrados.

En la microscopía electrónica de transmisión (MET), se observan las formas que difieren con las células normales de las bacterias, llamados bacteroides; típicos de las células infectadas por rhizobia, en el tejido central del nódulo. Los bacteroides difieren de las células normales en su morfología (Azcón *et al.* 1983) (Figura 54).

Montiel *et al.* (2017) señalan que, en los nódulos de las leguminosas, los rhizobia se diferencian en formas fijadoras de N_2 , llamados bacteroides, que están encerrados por una membrana vegetal estructural, llamada simbiosoma. Esta diferenciación es terminal debido a la pérdida irreversible de la capacidad de división celular asociada con la amplificación del genoma y diferentes morfologías de los bacteroides que pueden estar hinchadas, alargadas, esféricas y ramificadas dependiendo de la planta huésped (Figuras 54B, 54C, 54D y 55).

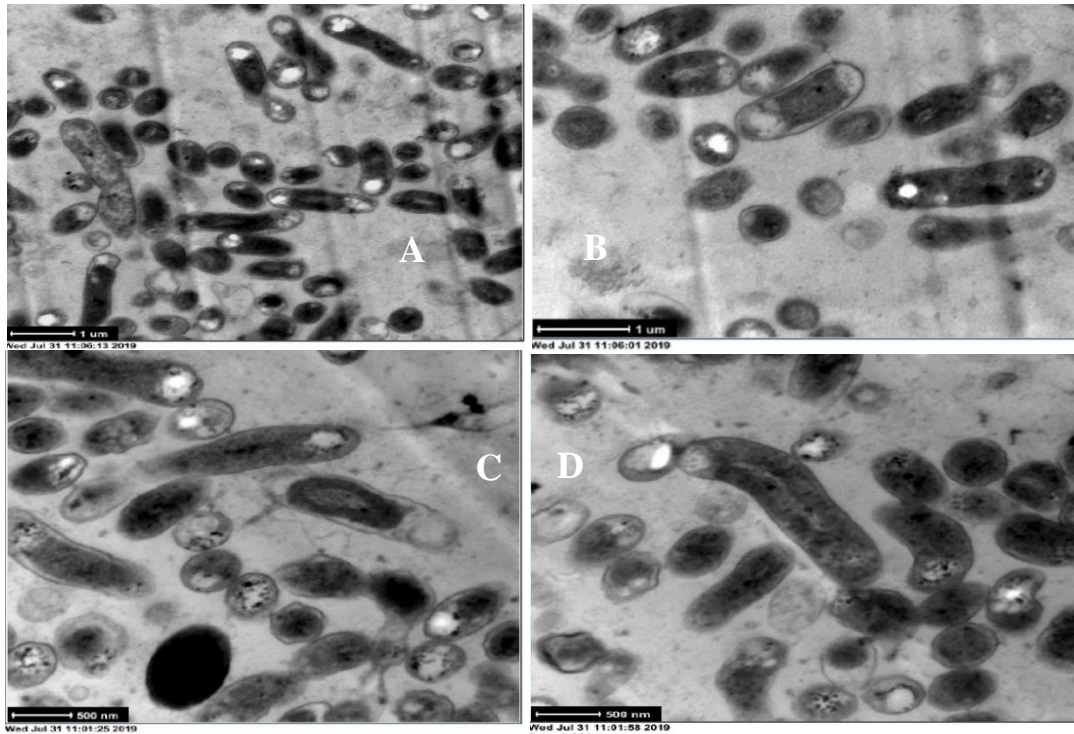


Figura 54. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) del interior de un nódulo de *C. brachystegia*, inoculada con la cepa LMTR 28. A y B) Secuencia de la magnificación a 13.000x y 18.500x con formas bacteroidales de *B. yuanmingense*. C y D) Bacteroides fijadores de nitrógeno en *P. vulgaris*, con gránulos blancos de poli- β -hidroxibutirato (PHB).

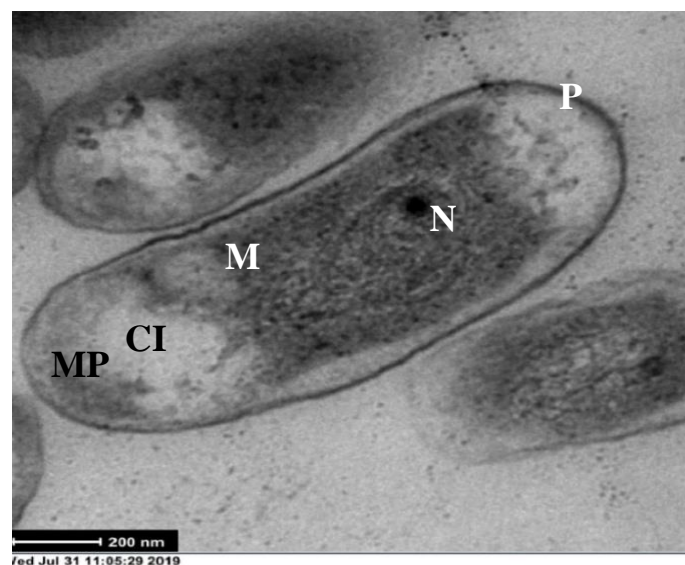


Figura 55. Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (MET) del interior de un nódulo de *C. brachystegia*, inoculada con la cepa 88J (*Agrobacterium* sp. grupo A2). CI: Cuerpo de inclusión de PHB; N: Nucleoide; M: Mesosoma; MP: Membrana plasmática; P: Pared celular.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones generadas en este trabajo son las siguientes:

1. Se obtuvieron 87 aislados de nódulos de *Clitoria brachystegia* B., originarios de tres localidades de Ecuador y dos de Perú. Mostrando cepas de bacterias con forma bacilar al microscopio, la mayoría Gram negativas a excepción de los aislados 6J, 18J, 19J, 32J, 104J y 105J que fueron Gram positivas.
2. Las pruebas de la caracterización morfológica y bioquímica establecieron que las cepas con los mejores resultados para ser recomendadas como PGPR fueron 2J, 88J, 83J y 84J (*Agrobacterium*), 1J y 37J (grupo R1) y 14J, 27J y 30J (*R. hainanense*). Destacando en la mayoría de las pruebas la cepa 37J. Las cepas de *Bradyrhizobium* destacadas fueron 90J, 134J y 139J (*B. pachyrhizi*), 102J (Grupo B1), 117J (Grupo B2), 124J (Grupo B3). Sin embargo, la cepa *Burkholderia gladioli* (33J), obtuvo los mejores resultados en varias de las pruebas, siendo muy referida por varias investigaciones.
3. Las herramientas moleculares BOX-PCR, y la amplificación del gen *recA* permitieron identificar a 8 cepas de *Agrobacterium* (6 cepas de *A. radiobacter* y 2 cepas de *A. larrymoorei*, 16 cepas de *Rhizobium* con cuatro especies: *R. miluonense*, *R. viscosum*, *R. multihospitium* y *R. endophyticum*. Del género *Bradyrhizobium* se identificaron 22 cepas, con cuatro especies: *B. pachyrhizi* y tres posibles nuevas especies, todas encontradas en Perú. Los géneros de *Burkholderia*, con las especies *cepacia* (4J) *B. gladioli* (33J), y *Bacillus amyloliquefaciens* (32J) fueron encontrados en Ecuador.
4. A pesar de considerar que las secuencias del gen ribosomal 16S son altamente conservadas para poder diferenciar entre especies cercanas de rhizobia, se muestran las relaciones taxonómicas de 46 cepas de la clase α -Proteobacteria y 2 de β -Proteobacteria. Las cepas de *Rhizobium* formaron 4 grupos, en el primer grupo las cepas 14J, 17J, 26J y 37J están relacionadas con especies del grupo tropici. Las del segundo grupo 148J, 150J, 151J, 153J y 159J se relacionan con *R. endophyticum*. En el tercer grupo, las cepas 1J, 2J, 54J y 88J están relacionadas con *R. radiobacter* y el cuarto grupo formado por la cepa 84J se relacionó con *R. larrymoorei*. Mientras que 21J se encuentra poco relacionada con *R. tibeticum*.

Finalmente, la cepa 119J no se agrupó con ninguna especie conocida ubicándose independiente en el árbol filogenético.

5. Ocho géneros de las 22 cepas de *Bradyrhizobium* caracterizadas molecularmente (91J, 102J, 106J, 117J, 118J, 127J, 142J y 146J) se agruparon dentro del supergrupo japonicum que incluye a la especie *Bradyrhizobium japonicum*. Por otro lado, las cepas 96J, 97J, 98J, 132J, 136J, 139J y 143J están relacionadas con *Bradyrhizobium elkanii*. La cepa 124J se posicionó en forma independiente en el árbol filogenético.

6. La diversidad de las especies de rhizobia aislados de los nódulos de *C. brachystegia* de las 5 localidades en relación con los factores físico-químicos, presentaron índices de diversidad de bajos a intermedios. Adaptados a suelos con pH ácidos hasta ligeramente neutros, inclusive con bajo porcentaje de materia orgánica, valores medios y muy altos de fósforo, medios y bajos en potasio. En su mayoría productoras de goma, con características PGPR y aporte significativo a la fijación biológica de nitrógeno al ecosistema.

7. Finalmente, los resultados obtenidos y discutidos en este trabajo evidenciaron mediante un enfoque polifásico, el aislamiento y evaluación para caracterizar la diversidad de bacterias asociadas con los nódulos de *Clitoria brachystegia*, confirmando la hipótesis de que existe una gran diversidad de bacterias asociadas con los nódulos de esta leguminosa localizada en un ecosistema con elevado endemismo.

VI. RECOMENDACIONES

- La caracterización de bacterias debe siempre complementarse con enfoques morfológicos, bioquímicos y moleculares con amplificación de varios genes constitutivos. De manera que se obtenga un máximo acercamiento a la adecuada tipificación e identificación de los microorganismos en estudio.
- Continuar evaluando y clasificando las bacterias del suelo con enfoque polifásico, buscando otros genes de interés en los microsimbiontes de las leguminosas silvestres, que permitan contribuir a su reforestación y perpetuación de sus especies; así como a la conservación, mitigación y pérdida de biodiversidad de nuestros bosques nativos.
- La región Tumbesina contiene muchas especies endémica del bosque seco tropical, su estudio y entendimiento permitirá establecer normativas que eviten su acelerada pérdida de cobertura vegetal y desarrollar acciones de conservación efectivas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acero, L.; Rodríguez, L. 1987. Algunas leguminosas de utilidad potencial en el sector agropecuario en tres regiones de Colombia. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal. Bogotá, Colombia. 90p.

Acosta, S. 2017. Regulación de la producción del exopolisacárido en *Sinorhizobium fredii* HH103, un simbiote de la soja y otras leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Aeron, A.; Chauhan, P.; Dubey, R.; Dubey, R.; Maheshwari, D.; Bajpai, B. 2015. Root nodule bacteria from *Clitoria ternatea* L. are putative invasive nonrhizobial endophytes. Canadian Journal of Microbiology 61(2):131-142.

Aguirre, Z.; Kvist, L.; Linares, R. 2006. Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. Arnaldoa 13(2): 326-346.

Aguirre, Z. 2012. Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO-Finlandia. Quito, Ecuador. 140p.

Aguirre, Z. 2013. Estructura del bosque seco de la provincia de Loja y sus productos forestales no maderables: caso de estudio Macará. Tesis doctoral en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Río, Cuba 190p.

Agrawal, P.; Agrawal, S.; Singh, U.; Katiyar, N.; Verma, S. 2012. Phenotypic characterization of rhizobia from legumes and its application as a bioinoculant. Journal of Agricultural Technology 8(2): 681-692.

Ahmad, M.; Uddin, M.; McLaughlin, W. 1984. Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. FEMS Microbiology Letters 24: 197-203.

Allen, O.; Allen, K. 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin Press, Madison. Macmillan Publishing Company. London, UK. 812 p.

Alexander, M. 2010. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, S.A. Segunda edición 491 pp.

Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.

An, S.; Berg, G. 2018. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends in Microbiology* 26(7): 637-638.

Angulo, V.; Sanfuentes, E.; Rodríguez, F.; Sossa, K. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología* 46(4): 338-347.

Aquino, R.; Gonzáles, E.; Samaniego, S.; Rivera, J.; Cedeño, V.; Urbina, Y.; Diringier, B. 2017. Caracterización molecular de bacterias patógenas de las vías respiratorias de pacientes peruanos con fibrosis quística. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 34(3): 423-435.

Atlas, R.; Barth, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación. Cuarta edición 677 pp.

Attafuah, A.; Bradbury, J. 1989. *Pseudomonas antimicrobica*, a new species strongly antagonistic to plant pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 567-573.

Azcón, C.; Barca, J.; Olivares, J. 1983. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. *Investigación y Ciencia* 82: 84-93.

Bai, Y.; Pan, B.; Charles, TC.; Smith, DL. 2002. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1953-1957.

Bécquer, C. 1998. Diversidad genética y posición taxonómica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras nativas en Sancti-Spíritus, Cuba. Tesis de Maestría, Universidad de La Habana.

Bécquer, C.; Galdo, Y.; Ramos, Y.; Peña, M.; Almaguer, N.; Peña, Y.; Mirabal, A.; Quintana, M.; Puentes, A. 2016. Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Nodulación y evaluación morfocultural (fase I). *Cuban Journal of Agricultural Science* 50(4): 607-617.

Benson, D.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.; Ostell, J. 2017.

GenBank. Nucleic Acids Research 45: 37-42.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9na Edition. Krieg NR, Holt J. (Editores) Ed. Baltimore. London. Williams and Wilkins. (1994): 1105-39p.

Bernal, G.; Graham, P. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with mexican bean rhizobia. Journal Microbiology 47(6): 526-534.

Berraqueiro, F.; Baya, A.; Cormenzana, A. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. ARS Pharmaceutica 17: 399-406.

Beukes, C.; Boshoff, F.; Phalane, F.; Hassen Le Roux, M.; Stępkowski, T.; Venter, S.; Steenkamp, E. 2019. Both Alpha- and Beta-rhizobia Occupy the Root Nodules of *Vachellia karroo* in South Africa. Frontiers in Microbiology 10: 10-15.

Bissett, A.; Richardson, A.; Baker, G.; Wakelin, S.; Thrall, P. 2010. Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. Molecular Ecology 19: 4315-4327.

Bolívar-Anillo, H.; Contreras-Zentella, M.; Teherán-Sierra, L. 2016. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 19(2): 102-108.

Bouzar, H.; Jones, J. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1023-1026.

Burns, R.; Hardy, R. 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag. 189 pp.

Brill, W. 1977. Fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia 8: 44-54.

Brock, T. 1979. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Inc. Tercera edición 802 pp.

Cantaro-Segura, L.; Huaranga-Joaquín, A.; Zúñiga, D. 2019. Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. IDESIA 37(4): 73-81.

- Cao, Y.; Wang, E.; Zhao, L.; Chen, W.; Wei, G. 2014. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology & Biochemistry* 78: 128-137.
- Castillo, F.; Cárdenas, J. 1987. Fijación biológica de nitrógeno. *Investigación y Ciencia* 134: 88-96.
- Ceroni, A. 2003. Distribución de las leguminosas de la parte alta de la cuenca La Gallega Morropón, Piura. *Revista Ecología Aplicada* 2(1): 9-13.
- Chi, Q.; Tang, W.; Meng, J.; Dong, X.; Chen, W.; Li, X. 2018. Isolation and Properties of *Enterobacter* sp. LX3 Capable of Producing Indoleacetic Acid. *Applied Sciences* 8: 1-11.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988). Simbiosis Leguminosas-*Rhizobium*. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Sección Microbiología de Suelos. Programa de pastos tropicales y programas de frijól. Colombia 189 p.
- Clavijo, C.; Chipana, V.; Centeno, J.; Zúñiga, D.; Guillèn, C. 2012. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada* 11(2): 89-102.
- Coelho, K.; De Almeida, P.; Moura, E.; Ferreira, A.; Louzada, T.; De Souza, FM. 2018. Symbiosis of rhizobia with *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State. *Acta Scientiarum* 40: 2-9.
- Coenye, T.; Gillis, M.; Vandamme, P. 2000. *Pseudomonas antimicrobica* Attafuah and Bradbury 1990 is a junior synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchiet al. 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2135-2139.
- Compant, S.; Nowak, J.; Coenye, T.; Clément, C.; Barka, E. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *Microbiological Reviews* 32: 607-626.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Ediciones Paraninfo S.A. 440 pp.
- Cornejo, X. 2015. Árboles y arbustos nativos del Bosque Seco del Pacífico Ecuatorial para la arborización urbana en la costa de Ecuador y noroccidente de Perú. Tesis Maestría. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 254 pp.

Crews, T.; Kurina, M.; Vitousek, P. 2001. Organic matter and nitrogen accumulation and nitrogen fixation during early ecosystem development in Hawaii. *Biogeochemistry* 52: 259-279.

Cuadrado, B.; Rubio, G.; Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales binóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacia* 38(1): 78-104.

Danso, S.; Hardarson, G.; Zapata, F. 1993. Misconceptions and practical problems in the use of ^{15}N soil enrichment techniques for estimating N_2 fixation. *Plant Soil* 152: 25-52.

Delamuta, J.; Ribeiro, R.; Ormeño-Orillo, E.; Parma, M.; Melo, I.; Martínez-Romero, E.; Hungría, M. 2015. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitro-gen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 4424-4433.

De Oliveira, G.; Souza, K.; Araújo, A.; Leite, J.; Fernandes-Júnior, P.; Lima, S.; Zilli, J.; Viena, L. 2018. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. *Revista de Ciências Agrárias* 41(3): 612-624.

De Mayer, S.; De Beuf, K.; Vekeman, B.; Willems, A. 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry* 83: 1-11.

Duangkhet, M.; Chikoti, Y.; Thepsukhon, A.; Thapanapongworakul, P.; Chungopast, S.; Tajima, M. 2018. Isolation and characterization of rhizobia from nodules of *Clitoria ternatea* in Thailand. *Plant Biotechnology* 35: 123-129.

Epping, B.; Hansen, A.; Djalali, B.; Martin, P. 1994. Symbiotic effectivity of four *Phaseolus vulgaris* genotypes after inoculation with different strains of *Rhizobium* under controlled conditions. *Naturforsch* 49c: 343-351.

Espinoza, C. 2012. Estructura y funcionamiento de los ecosistemas secos del sur de Ecuador. Tesis Doctoral. Universidad Rey Juan Carlos. 171 pp.

Espinosa-Victoria, D.; López-Reyes L.; Carcaño-Montiel, MG.; Serret-López, M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of*

Phytopathology 38(3).

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2005. Evaluación de los recursos forestales mundiales (Ecuador). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento Forestal. Informe nacional 101.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

Fernández, A.; García, C.; Sáenz, J.; Valdezate, F. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Cercenado, E.; Cantón, R. (Ed.). ISBN-978-84-614-7932-0. 52p.

Fernández, L.; Zalba, P.; Gómez, M.; Sagardoy, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo* 23(1): 27-31.

Ferrera, R.; González, M.; Rodríguez, M. 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas S.A. México. 142 p.

Flores-Félix, J.; Ramírez-Bahena, M.; Salazar, S.; Peix, A.; Velásquez, E. 2017. Reclassification of *Arthrobacter viscosus* as *Rhizobium viscosum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 1789-1792.

Frioni, L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Orientación Gráfica editora. República Argentina. 744p.

Galvis, F.; Carrillo, M. 2015. Identificación y Caracterización Molecular de Aislados de *Burkholderia glumae*, Agente Causante del Añublo Bacterial en el Cultivo de Arroz. *Información Tecnológica* 26(3): 33-40.

Gaunt, M.; Turner, S.; Rigottier-Gois, L.; Lloyd-Macgilp, S.; Young, J. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2037-2048.

Gillis, M.; Van Van, T.; Bardin, R.; Goor, M.; Hebbbar, P.; Willems, A.; Segers, P.; Kersters, K.; Heulin T.; Fernandez, MP. 1995. Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia*

vietnamiensis sp. nov. for N₂-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45(2): 284-289.

Giongo, G.; Ambrosini, A.; Vargas, L.; Freire, J.; Bodanese, M.; Passaglia, L. 2008. Evaluation of genetic diversity of *Bradyrhizobia* strains nodulating soybean (*Glycine max*) isolate from South Brazilian fields. *Applied Soil Ecology* 38: 261-269.

Gonzales, E. 2013. Estudio de la diversidad de cepas de *Rhizobium* provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. Tesis de grado 138p.

Granda, K.; Paccha, H.; Campoverde, C.; Torres, R. 2013. Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur de Ecuador. *Centro de Biotecnología* 2: 6-15.

Gu, C.; Wang, E.; Tian, C.; Han, T.; Chen, W.; Sui, X.; Chen, W. 2008. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1364-1368.

Guamán, F. 2016. Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. En el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales* 37(1): 40-47.

Gupta, M.; Kiran, S; Gulati, A.; Singh, B.; Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research* 167(6): 358-363.

Han, T.; Wang, E.; Wu, L.; Chen, W.; Gu, J.; Gu, C.; Tian, C.; Chen, W. 2008. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1693-1699.

He, Y.; Guo, L.; Zhang, H.; Huang, G. 2011. Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming systems in the western Loess Plateau, China. *African Journal of Biotechnology* 10(18): 3540-3548.

Hernández, A.; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A.; Heydrich, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1): 6-13.

Hernández, I.; Nápoles, C.; Rosales, P.; Pérez, G.; Baños, R.; Ramírez, J. 2012. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales* 33(4): 21-28.

Hernández, I.; Nápoles, C.; Morales, B. 2015. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* L. Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales* 36(1): 65-72.

Imada, E.; Dos Santos, A.; Martínez De Oliveira, A.; Hungría, M.; Rodríguez, E. 2016. Indole-3-acetic Acid production via the índole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology* 168(3): 283-292.

Jeong, H.; Lee, O.; Jeon, Y.; Kim, J.; Lee, N.; Lee, C.; Son, H. 2010. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. *Process Biochemistry* 45: 1738-1745.

Jiménez, D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana 105p.

Jørgensen, P.; León-Yáñez, S. (eds.) 1999. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. Saint Louis Missouri Botanical Garden. 1182p.

Kam, X.; Cai, X.; Liu, Z.; Zheng, Y. 2019. Identification and characterization of an amidase from *Leclercia adecarboxylata* for efficient biosynthesis of L-phosphinothricin. *Bioresource Technology* 289: 1-8.

Kim, B.; Ramanan, R.; Cho, Dae-Hyun, O.; Hee-Mock, K.; Hee-Sik, K. 2014. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Energy* 69: 95-105.

Kim, D.; Cook, R.; Weller, D. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.

Kloepper, J.; Schroth, M. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers, France, INRA, p. 879.

Lancheros, S.; Caicedo, L.; Navarro, Y. 2002. Polisacáridos rhizobianos, una nueva alternativa. *Ingeniería e investigación* 49: 4-8.

Leite, J. 2015. Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Agronomia. Tesis doctoral 89p.

Li, M.; Li, Y.; Chen, W.; Sui, X.; Li, Y.; Wang, E.; Chen, W. 2012. Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 239-245.

Linares-Palomino, R. 2004. Los Bosques Tropicales Estacionalmente Secos: I. El concepto de los bosques secos en el Perú. *Arnaldoa* 11: 85-102.

López, S.; Peticari, A.; Piccinetti, C.; Ventimiglia, L.; Arias, A.; De Battista, J.; Althabegoiti, M.; Mongiardini, E.; Pérez, J.; Quelas, J.; Lodeiro, A. 2009. In-Furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* nodulation. *Agronomy Journal* 101: 357-363.

López-López, A.; Rogel-Hernández, M.; Barolis, I.; Ortíz, A.; Martínez, J.; Ormeño-Orrillo, E.; Martínez-Romero, E. 2012. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2264-2271.

López-Alcocer, J.; Lépiz-Ildfonso, R.; González-Eguiarte, D.; Rodríguez-Macías, R.; López-Alcocer, E.; Olalde-Portugal, V. 2017. Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40(1): 73-81.

Loredo-Osti, C.; López-Reyes, L.; Espinosa-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana* 22(2): 225-239.

Louden, B.; Haarmann, D.; Lynne, M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Microbiology Education* 12(1): 51-53.

Louws, F.; Rademaker, J.; Bruijn, F. 1999. The tree Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37: 81-125.

Luyo, C. 1992. Aislamiento, purificación, autenticación y selección de cepas eficientes de *Rhizobium* sp. en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* (Bayo y Canario PF-210) in vitro. UNMSM. Lima-Perú.

Lloret, L.; Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47(1-2): 43-60.

Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos*. Pearson Prentice-Hall décima Edición 1096 pp.

Martínez-Scott, M.; Hernández-Hernández, V; Palomo-Gil, A.; Vásquez-Arroyo, J. 2002. Diversidad genética de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 3: 9-18.

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

Marra, L.; Oliveira, S.; Soares, C.; Moreira, F. 2011. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola* 68(5): 603-609.

Matos, G. 1994. Aislamiento de *Rhizobium* de diferentes variedades de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y el estudio de su eficiencia en la productividad de la leguminosa. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. Tesis de grado 150p.

May, T. 2013. Plantas preferidas para leña en la zona de bosque seco de Pedro Santana y Bánica, República Dominicana. Aspectos etnobotánicos y de manejo sustentable. *Ambiente y Desarrollo* 17(33): 71-85.

Mayo, J.; Hernández, I.; Ormeño, E.; Zúñiga, D. 2004. Caracterización de nódulos y rhizobios aislado de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en el departamento de Ica (Perú). Congreso Nacional de Microbiología. Cancún-México. pp: 27-29.

Menna, P.; Hungría, M.; Barcellos, F.; Bangel, E.; Hess, P.; Martínez-Romero, E. 2006.

Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 315-332.

Menna, P.; Barcellos, F.; Hungria, M. 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2934-2950.

Messias, C.; Leite, J.; Vieira, M.; Mistura, C.; Sampaio, P.; Almeida De Oliveira, F.; Dos Santos, A. 2010. Perfil Morfológico de Rizóbio Nodulando Cunhã (*Clitoria ternatea* L.) em Neossolo Fluvico 12(1): 27-30.

Moncada, R. 2014. Evaluación de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 para la recuperación de suelos contaminados con *Ralstonia solanacearum*. Universidad EAFIT-Escuela de Ingeniería. Medellín, Colombia. Tesis de Maestría 105p.

Montiel, J.; Downie, A.; Farkas, A.; Herczeg, R.; Bálint, B.; Kereszt, A.; Kondorosi, E. 2017. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Plant Biology* 114(19): 5041-5046.

Moreno, A.; García, V.; Reyes, J.; Vàsquez, J.; Cano, P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10 (1): 68-83.

Muensritharam, L.; Fanning, S.; Meharg, C. 2016. Pathogens in Milk: *Enterobacter* species. *Reference Module in Food Science* 1: 72-80.

Naik, P.; Sakthivel, N. 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* 157(6): 538-546.

Navarro, A.; Fos, S.; Laguna, E.; Durán, D.; Rey, L.; Rubio-Sanz, L.; Imperial, J.; Ruíz-Argüeso, T. 2014. Conservation of endangered *Lupinus mariae-josephae* in its natural habitat by inoculation with selected, native *Bradyrhizobium* strains. *PloS ONE*. 9, e102205.

Nautiyal, S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.

Neill, D.; Pitman, N. 2004. *Clitoria brachystegia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004:e.T45217A10986289.

Nunes, G.; Menezes, K.; Sampaio, A.; Leite, J.; Fernandes-Júnior, P; Seido, S.; Zilli, J.; Martins, L. 2018. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. *Revista de Ciências Agrárias* 41(3): 31-40.

Orihuela, C.; Albán, L. 2012. Estudio de identificación, priorización, evaluación e integración de la valorización económica de los servicios ecosistémicos en los procesos de planificación y de inversión pública de la Región Piura. Informe Final de Estudio de Consultoría. Perú. 100p.

Otivo, J. 2015. Aportes para un manejo sostenible del ecosistema bosque tropical seco de Piura. *Asociación para la Investigación y Desarrollo integral*, Perú 67: 12-14.

Padmanabhan, S.; Hirtz, D.; Broughton W. 1990. rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. *Soil Biology Biochemistry* 22(1): 23-28.

Pal, S.; Kundu, A.; Banerjee, T.; Mohapatra, B.; Roy, A.; Manna, R.; Sar, P.; Kazy, S. 2017. Genome analysis of crude oil degrading *Franconibacter pulveris* strain DJ34 revealed its genetic basis for hydrocarbon degradation and survival in oil contaminated environment. *Genomics* 109: 374-382.

Palleroni, NJ. 1984. Pseudomonadaceae, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 1, 1st ed. (N. R. Krieg and J. G. Holt, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore.

Parker, MA. 2001. Mutualism as a constant on invasion success for legumes and rhizobia. *Diversity and Distributions* 7: 125-136.

Parker, MA. 2012. Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. *Molecular Ecology* 21: 1769-1778.

Patiño, C.; Sánchez, M. 2012. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* Kunth). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10(2): 177-187.

Pérez, G.; Gómez, G.; Nápoles, M.; Morales, B. 2008. Aislamiento y caracterización de

cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes* 31(2): 151-160.

Pla, L. 2006. Biodiversidad: inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia* 31(8): 583-590.

Pliego, L.; Ocaña, A.; Lluch, C. 2003. Crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación y asimilación de nitratos con dosis de nitrógeno en frijol. *Terra Latinoamericana* 21(2): 213-223.

Poly, F.; Monrozier, L.; Bally, R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152: 95-103.

Poole, P.; Ramachandran, V.; Terpolilli, J. 2018. rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology* 16: 291-303.

Ramírez-Bahena, M.; Peix, A.; Velázquez, E.; Bedmar, E. 2016. Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor* 192 (779).

Restrepo, G.; Marulanda, S.; De La Fe-Pérez, Y.; Díaz-De La Osa, A.; Lucia-Baldani, V.; Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* 46(1): 63-76.

Ribeiro, R.; Ormeño-Orrillo, E.; Fuzinato, R.; Graham, P.; Martínez-Romero, E.; Hungría, M. 2013. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology* 164: 740-748.

Ribeiro, R.; Busullini, T.; Ormeño-Orrillo, E.; Marcon, J.; Rogel, M.; Martínez-Romero, E.; Hungría, M. 2015. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 3162-3169.

Rickli, D.; Menna, P.; Villamil, E.; Gomes, F.; Hungría, M. 2009. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Applied Genetics & Molecular Biotechnology* 83: 897-908.

- Rivera, D. 2012. Formulación de un prototipo de biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Tesis de Magíster en Ciencias Farmacéuticas 94p.
- Rodríguez, G.; Banda, K.; Reyes, S.; Estupiñán, A. 2012. Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano). *Revista Biota Colombiana* 13(2): 7-39.
- Rojas-Rojas, F.; López-Sánchez, D.; Meza-Radilla, G.; Méndez-Canarios, A.; Ibarra, J.; Estrada-De Los Santos, P. 2019. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* 51(1): 84-92.
- Rojas-Solís, D.; Santoyo, G. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 Endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13: 46-52.
- Romero-Saritama, J.; Pérez, C. 2016. Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de especies leñosas en los bosques secos Tumbesinos. *Revista Ecosistemas* 25(2): 59-65.
- Santillana, N. 2007. Caracterización de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Vicia faba* L. y *Pisum sativum* var. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. Facultad de Ciencias. Tesis doctoral. 121p.
- Sarr, P.; Yamakawa, T.; Fujimoto, S.; Saeki, Y.; Thao, H.; Miyimht, A. 2009. Phylogenetic Diversity and Symbiotic Effectiveness of Root-Nodulating Bacteria Associated with Cowpea in the South-West Area of Japan. *Microbes Environments* 24(2): 105-112.
- Selosse, M.; Baudoin, E.; Vandenkoomhuysse, P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327: 639-648.
- Schwyn, B.; Neilands, B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Shakirov, Z.; Khakimov, S.; Shomurodov, K.; Umarov, B. 2010. Nodulation in Onobrychis Perennial Legume Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 1, 119-130.

Shakirov, Z.; Khakimov, S. 2010. Symbiosis of nodule bacteria with perennial xerophyte leguminous plants of Central Asia. *Agricultural Sciences* 1(1): 24-38.

Silva, F.V.; De Meyer, S.E.; Simoes-Araujo, J.L.; Da Costa Barbe, T.; Xavier, G.R.; O'Hara, G. 2014. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2358-2363.

Silva Filho, G.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24: 311-319.

Sridevi, M.; Mallaiah, KV. 2009. Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian Journal of Microbiology* 49(1): 98-102.

Soberón, G. 1977. Mecanismo de nodulación de las leguminosas. *Investigación y Ciencia* 8: 6-13.

Somasegaran, P.; Hoben, H.; Hallida, J. 1981. Ejercicios prácticos en tecnología *Rhizobium*-leguminosa. Curso regional de entrenamientos sobre la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas tropicales de importancia agrícola. Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica 85 p.

Sosa, A.; E.; García, O.; Sarmiento, M. 2004. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38(2): 197-201.

Sprent, J.; Ardley, J.; James, E. 2014. From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany* 89: 31-41.

Suárez-Moreno, Z.; Caballero-Mellado, J.; Coutinho, B.; Mendoca-Previato, L.; James, E.; Venturi, V. 2012. Common features of environmental and Potentially beneficial Plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology* 63(2): 249-266.

The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>(accessed 1st January). <http://www.theplantlist.org/1.1/terms/>

Thilakarathna, M.; Chapagain, T.; Ghimire, B.; Pudasaini, R.; Tamang, B.; Gurung, K.; Choi, K.; Rai, L.; Magar, S.; Bishnu, B.; Gaire, S.; Raizada, M. 2019. Evaluating the

effectiveness of *Rhizobium* inoculants and micronutrients as technologies for Nepalese common bean small holder farmers in the real-world context of highly variable Hillside environments and indigenous farming practices. *Agriculture* 9(20): 1-17.

Townsend, A.; Howarth, R. 2010. El problema global del nitrógeno. *Investigación y Ciencia* 71: 64-71.

Trujillo, M.; Alonso-Vega, P.; Rodríguez, R.; Carro, L.; Cerda, E.; Martínez-Molina, E. 2010. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* 4: 1265-1281.

Turan, M.; Gulluce, M.; Sahin, F. 2012. Effects of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria on Yield, Growth, and Some Physiological Characteristics of Wheat and Barley Plants. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43: 1658-1673.

UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA (UICN). 2012. Directrices para el uso de los Criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel regional y nacional: Versión 4.0. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. http://www.iucnredlist.org/documents/redlist_cats_crit_sp.pdf

Valverde, A.; Igual, J. M.; Peix, A.; Cervantes, E.; Velázquez, E. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2631-2637.

Van Belkum, A.; Melchers, W.; De Pauw, B.; Scherer, S.; Quint, W.; Meis, J. 1994. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *Journal of the Infectious Diseases* 169: 1062-1070.

Vega-Celedón, P.; Canchignia, H.; González, M.; Seeger, M. 2016. Biosíntesis de Ácido Indol-3-Acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales* 37: 33-39.

Versalovic, J.; Schneider, M.; De Bruijn, F.; Lupski, J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.

Villareal-Delgado, M.; Villa-Rodríguez, E.; Cira-Chávez, L.; Estrada-Alvarado, M. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural

biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(1): 95-130.

Walpola, B.; Yoon, M.H. 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *African Journal of Microbiology Research* 7(3): 266-275.

Wang, J.; Wang, R.; Zhang, Y.; Liu, H.; Chen, W.; Wang, E.; Sui, X.; Chen, W. 2013. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 616-624.

Weisburg, W.; Barns, S.; Pelletier, D.; Lane, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Woese, C.R.; Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS* 74(11): 5088-5090.

Wu, L.; Wang, H.; Tao Wang, E.; Xin Chen E.; Fu Tian, C. 2011. Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China. *FEMS Microbiology Ecology* (76)3: 439-450.

Xue, Z.; Muilenburg, M.; Lie, T.; Jun, Z.; Fu, L. 1999. Characterization of soybean rhizobia at different levels using PCR based techniques. *Biodiversity Science* 7(4): 277-284.

Xu, L.; Ge, C.; Cui, Z.; Li, J.; Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., Isolated from the Root Nodules of Soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(4): 706-711.

Yang, W.; Kong, Z.; Chen, W.; Wei, G. 2013. Genetic diversity and symbiotic evolution of rhizobia from root nodules of *Coronilla varia*. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 49-55.

Young, J.; Kuykendall, L.; Martínez-Romero, E.; Kerr, A.; Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 89-103.

Young, J. 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as

Rhizobium larrymoorei (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 19.

Zucconi, F.; Pera, A.; Forte, M.; De Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. BioCycle, 22 (4): 54-57.

Zúñiga, D. 1997. Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral. Granada, España. Universidad de Granada. 302p.

Zúñiga, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola. *Rhizobium*, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. ISBN: N° 978-612-414-04-3. Primera edición. Perú. 112p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis Taxonómico de las muestras vegetales colectadas en Guayaquil, Puyango (Ecuador) y Moyobamba (Perú).

Herbario GUAY

Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Guayaquil

Código 1,2 3 (todos corresponden a una misma especie)

Clase: Equisetiopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Nývák ex. Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Género: *Clitoria* L.

Nombre científico: *Clitoria brachystegia* Benth.



Descripción taxonómica:

Árbol o arbusto, hasta 10 m de alto; tronco hasta 30 cm DAP. Hojas trifolioladas, alternas, foliolos foliosos hasta cartáceos, ovados hasta amplio-elípticos, el terminal 6-12 x 4-9 cm, base obtusa hasta redondeada, ápice agudo hasta acuminado, margen entero; peciolos 5-15 cm. Inflorescencias terminales, ramifloras y hasta caulifloras, en racimos, 5-30 cm, suberectos hasta pendulares, caliz verde, corola blanca hasta rosada, la bandera con pigmentaciones rojas; fruto legumbre ca. 10-25 x 1-2 cm, café claro, con nervios finos y prominentes, pilosa, glabrescente; semillas de color café oscuro, aplanadas, lisas, glabras.

Av. Juan Tanca Marengo y Av. Gómez Lince s.n.

P.O. Box 09-01-10634

Guayaquil-Ecuador

Anexo 2. Análisis de muestra de suelo de la Universidad de Guayaquil (Ecuador).



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO

Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe



ANALISIS DE SUELO - RUTINA

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Microorganismos de Nodos de Leguminosas
PROCEDENCIA : Ecuador
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 11 de Diciembre del 2015

Número de muestra		CE	pH	M.O.	P	K	CaCO ₃
Lab.	Campo	dS / m Relación 1:1	Relación 1:1	%	ppm	ppm	%
8793	Cod - UG	0.84	6.27	8.69	33.18	490.00	-

ANALISIS DE SUELO

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Bacterias Simbióticas de Leominosas
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 30 de Setiembre del 2016

Número de muestra		Análisis Mecánico			
Lab.	Campo	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura
10809	Universidad de Guayaquil 1	64.56	24.00	11.44	Franco arenoso

LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUA Y SUELO

Ing. Msc. Teresa Velásquez Bejarano
JEFE DE LABORATORIO



Anexo 3. Análisis de muestra de suelo del Jardín Botánico de Guayaquil (Ecuador).



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO**

Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe



ANALISIS DE SUELO - RUTINA

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Microorganismos de Nodos de Leguminosas
PROCEDENCIA : Ecuador
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 11 de Diciembre del 2015

Número de muestra		CE	pH	M.O.	P	K	CaCO ₃
Lab.	Campo	dS / m	Relación 1:1	%	ppm	ppm	%
8795	Cod - JB	1.05	6.98	3.62	12.59	62.40	0.23

ANALISIS DE SUELO

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Bacterias Simbióticas de Leominosas
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 30 de Setiembre del 2016

Número de muestra		Análisis Mecánico			
Lab.	Campo	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura
10811	Jardin Botánico	68.56	24.00	7.44	Franco arenoso

LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUA Y SUELO
 Ing. Msc. Teresa Velásquez Bejarano
 JEFE DE LABORATORIO



Anexo 4. Análisis de muestra de suelo de Puyango (Ecuador).



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO

Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe

Nº 010015

ANÁLISIS DE SUELO - RUTINA

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de bacterias simbióticas de leguminosa
PROCEDENCIA : Puyango, Ecuador
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 31 de Mayo del 2016

Número de muestra		CE	pH	M.O.	P	K	CaCO ₃	Al ³⁺ +H ⁺
Lab.	Campo	dS / m	Relación 1:1	%	ppm	ppm	%	
		Relación 1:1						
10015	Suelo	0.12	4.28	0.33	11.28	176.00	-	5.73

ANÁLISIS DE SUELO

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Bacterias Simbióticas de Leominosas
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 30 de Setiembre del 2016

Número de muestra		Análisis Mecánico			
Lab.	Campo	Arena	Limo	Arcilla	Textura
		%	%	%	
10812	Puyango	36.56	20.00	43.44	Arcilla

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y SUELO

Ing. Msc. Teresa Velásquez Bujarrero
 JEFE DE LABORATORIO



Anexo 5. Análisis de muestra de suelo de Moyobamba (Perú).



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO**

Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe



Nº 010349

ANALISIS DE SUELO - RUTINA

SOLICITANTE : JAVIER SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de bacterias simbióticas aisladas de leguminosas .
PROCEDENCIA : Moyobamba
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 12 de Agosto del 2016

Número de muestra		CE	pH	M.O.	P	K	CaCO ₃	Al ³⁺ +H ¹⁺
Lab.	Campo	dS / m	Relación 1:1	%	ppm	ppm	%	
10349	Suelo	0.41	6.98	2.15	26.22	84.00	0.21	-

ANALISIS DE SUELO

SOLICITANTE : JAVIER OSWALDO SOTO VALENZUELA
PROYECTO : Caracterización de Bacterias Simbióticas de Leominosas
RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 30 de Setiembre del 2016

Número de muestra		Análisis Mecánico			
Lab.	Campo	Arena	Limo	Arcilla	Textura
		%	%	%	
10813	Moyobamba	82.56	12.00	5.44	Arena franca

LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUA Y SUELO
 Ing. Msc. Teresa Velásquez Bejarano
 JEFE DE LABORATORIO



Anexo 6. Análisis de muestra de suelo de Bagua Grande (Perú).



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO

Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe



Nº 010350

ANÁLISIS DE SUELO - RUTINA

SOLICITANTE : JAVIER SOTO VALENZUELA
 PROYECTO : Caracterización de bacterias simbióticas aisladas de leguminosas .
 PROCEDENCIA : Bagua
 RESP. ANÁLISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
 FECHA DE ANÁLISIS : La Molina, 12 de Agosto del 2016

Número de muestra		CE	pH	M.O.	P	K	CaCO ₃	Al ³⁺ +H ⁺
Lab.	Campo	dS / m	Relación 1:1	%	ppm	ppm	%	
		Relación 1:1						
10350	Suelo	0.78	7.32	2.66	13.91	91.20	5.46	-

Anexo 7. Efecto de 4 niveles de pH en el crecimiento de cepas aisladas de *C.*

brachystegia.

Cepa	pH	Crecim	Cepa	pH	Crecim	Cepa	pH	Crecim	Cepa	pH	Crecim
1J	4	(++)	54J	4	(+)	118J	4	(+)	151J	4	(+)
1J	5	(++)	54J	5	(+)	118J	5	(++)	151J	5	(+)
1J	7	(++)	54J	7	(+)	118J	7	(++)	151J	7	(+)
1J	8	(+)	54J	8	(+)	118J	8	(++)	151J	8	(+)
2J	4	(++)	83J	4	(++)	124J	4	(++)	153J	4	(+)
2J	5	(++)	83J	5	(++)	124J	5	(++)	153J	5	(+)
2J	7	(++)	83J	7	(++)	124J	7	(+)	153J	7	(+)
2J	8	(+)	83J	8	(++)	124J	8	(++)	153J	8	(+)
14J	4	(++)	84J	4	(++)	125J	4	(+)	159J	4	(+)
14J	5	(++)	84J	5	(++)	125J	5	(++)	159J	5	(++)
14J	7	(++)	84J	7	(++)	125J	7	(+)	159J	7	(++)
14J	8	(++)	84J	8	(++)	125J	8	(+)	159J	8	(++)
17J	4	(++)	88J	4	(++)	127J	4	(+)	157J	4	(+)
17J	5	(++)	88J	5	(+)	127J	5	(+++)	157J	5	(+)
17J	7	(++)	88J	7	(+)	127J	7	(++)	157J	7	(+)
17J	8	(++)	88J	8	(+)	127J	8	(++)	15J	4	(+)
21J	4	(+)	CIAT 899	4	(+)	132J	4	(+)	15J	5	(+)
21J	5	(++)	CIAT 899	5	(++)	132J	5	(+++)	15J	7	(+)
21J	7	(++)	CIAT 899	7	(+)	132J	7	(++)	15J	8	(+)
21J	8	(++)	CIAT 899	8	(++)	132J	8	(++)	LMT R28	4	(+)
26J	4	(+)	90J	4	(+)	134J	4	(+)	LMT R28	5	(++)
26J	5	(++)	90J	5	(++)	134J	5	(++)	LMT R28	7	(++)
26J	7	(+)	90J	7	(+)	134J	7	(++)	LMT R28	8	(++)
26J	8	(++)	90J	8	(+)	134J	8	(++)			
27J	4	(+)	91J	4	(+)	136J	4	(+)			
27J	5	(+)	91J	5	(++)	136J	5	(+)			
27J	7	(++)	91J	7	(++)	136J	7	(+)			
27J	8	(+)	91J	8	(++)	136J	8	(+)			
29J	4	(+)	96J	4	(+)	139J	4	(++)			
29J	5	(+)	96J	5	(+)	139J	5	(+++)			
29J	7	(+)	96J	7	(+)	139J	7	(++)			
29J	8	(+)	96J	8	(+)	139J	8	(++)			
30J	4	(+)	97J	4	(+)	142J	4	(++)			
30J	5	(++)	97J	5	(+)	142J	5	(++)			
30J	7	(++)	97J	7	(++)	142J	7	(++)			
30J	8	(++)	97J	8	(+)	142J	8	(++)			
33J	4	(+)	98J	4	(+)	143J	4	(+)			
33J	5	(+)	98J	5	(+)	143J	5	(+)			
33J	7	(+)	98J	7	(+)	143J	7	(+)			
33J	8	(+)	98J	8	(+)	144J	4	(+)			
35J	4	(++)	99J	4	(+)	144J	5	(+)			
35J	5	(++)	99J	5	(+++)	144J	7	(+)			
35J	7	(++)	99J	7	(++)	144J	8	(+)			
35J	8	(++)	99J	8	(++)	146J	4	(+)			
37J	4	(++)	102J	4	(+)	146J	5	(+)			
37J	5	(++)	102J	5	(++)	146J	7	(+)			
37J	7	(++)	102J	7	(++)	146J	8	(++)			
37J	8	(++)	102J	8	(++)	119J	4	(+)			
38J	4	(++)	108J	4	(+)	119J	5	(++)			
38J	5	(++)	108J	5	(+)	119J	7	(++)			
38J	7	(++)	108J	7	(+)	119J	8	(+)			
38J	8	(++)	108J	8	(+)	148J	4	(++)			
48J	4	(++)	106J	4	(+)	148J	5	(++)			

Continuación...

48J	5	(++)	106J	5	(++)	148J	7	(++)			
48J	7	(++)	106J	7	(++)	148J	8	(++)			
48J	8	(++)	106J	8	(++)	150J	4	(+)			
49J	4	(++)	117J	4	(+)	150J	5	(++)			
49J	5	(++)	117J	5	(++)	150J	7	(+)			
49J	7	(++)	117J	7	(+)	150J	8	(++)			
49J	8	(++)	117J	8	(++)						

Anexo 8. Efecto de diferentes niveles de NaCl en el crecimiento de cepas aisladas de *C. brachystegia*.

Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crec
1J	0,25	(++)	17J	0,25	(++)	132J	0,25	(++)	142J	0,25	(+)
1J	0,5	(++)	17J	0,5	(++)	132J	0,5	(++)	142J	0,5	(+)
1J	1	(++)	17J	1	(+)	132J	1	(+)	142J	1	(+)
1J	2	(++)	17J	2	(+)	132J	2	(+)	142J	2	(+)
2J	0,25	(+)	21J	0,25	(++)	134J	0,25	(+)	146J	0,25	(+)
2J	0,5	(+)	21J	0,5	(++)	134J	0,5	(+)	146J	0,5	(+)
2J	1	(++)	21J	1	(++)	134J	1	(+)	146J	1	(+)
2J	2	(+)	21J	2	(+)	134J	2	(+)	146J	2	(+)
29J	0,25	(+)	37J	0,25	(++)	139J	0,25	(++)	124J	0,25	(++)
29J	0,5	(++)	37J	0,5	(++)	139J	0,5	(++)	124J	0,5	(++)
29J	1	(+)	37J	1	(++)	139J	1	(++)	124J	1	(+)
29J	2	(+)	37J	2	(++)	139J	2	(+)	124J	2	(+)
35J	0,25	(++)	38J	0,25	(++)	144J	0,25	(+)	125J	0,25	(+)
35J	0,5	(+)	38J	0,5	(++)	144J	0,5	(+)	125J	0,5	(+)
35J	1	(++)	38J	1	(++)	144J	1	(+)	125J	1	(+)
35J	2	(+)	38J	2	(++)	144J	2	(+)	125J	2	(+)
54J	0,25	(+)	48J	0,25	(++)	136J	0,25	(+)	157J	0,25	(+)
54J	0,5	(+)	48J	0,5	(++)	136J	0,5	(+)	157J	0,5	(+)
54J	1	(+)	48J	1	(++)	136J	1	(+)	157J	1	(+)
54J	2	(+)	48J	2	(++)	136J	2	(+)	157J	2	(+)
88J	0,25	(++)	49J	0,25	(++)	143J	0,25	(+)	119J	0,25	(+)
88J	0,5	(+)	49J	0,5	(++)	143J	0,5	(+)	119J	0,5	(+)
88J	1	(++)	49J	1	(++)	143J	1	(+)	119J	1	(+)
88J	2	(+)	49J	2	(++)	143J	2	(+)	119J	2	(+)
15J	0,25	(+)	83J	0,25	(+)	91J	0,25	(+)	148J	0,25	(++)
15J	0,5	(+)	83J	0,5	(++)	91J	0,5	(+)	148J	0,5	(++)
15J	1	(+)	83J	1	(++)	91J	1	(+)	148J	1	(++)
15J	2	(+)	83J	2	(+)	91J	2	(+)	148J	2	(+)
26J	0,25	(++)	84J	0,25	(+)	99J	0,25	(++)	150J	0,25	(++)
26J	0,5	(++)	84J	0,5	(+)	99J	0,5	(+)	150J	0,5	(++)
26J	1	(+)	84J	1	(++)	99J	1	(+)	150J	1	(++)
26J	2	(+)	84J	2	(++)	99J	2	(+)	150J	2	(+)
27J	0,25	(+)	90J	0,25	(++)	102J	0,25	(++)	151J	0,25	(++)
27J	0,5	(+)	90J	0,5	(+)	102J	0,5	(+)	151J	0,5	(+)
27J	1	(+)	90J	1	(+)	102J	1	(+)	151J	1	(+)
27J	2	(+)	90J	2	(+)	102J	2	(+)	151J	2	(++)
27J	0,25	(+)	96J	0,25	(++)	108J	0,25	(++)	153J	0,25	(++)
27J	0,5	(+)	96J	0,5	(+)	108J	0,5	(+)	153J	0,5	(+)
27J	1	(+)	96J	1	(+)	108J	1	(+)	153J	1	(+)
Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crecim	Cepa	Conc NaCl	Crec
27J	2	(+)	96J	2	(+)	108J	2	(+)	153J	2	(+)
30J	0,25	(++)	97J	0,25	(+)	118J	0,25	(+)	159J	0,25	(+)
30J	0,5	(++)	97J	0,5	(++)	118J	0,5	(+)	159J	0,5	(+)
30J	1	(+)	97J	1	(+)	118J	1	(+)	159J	1	(+)
30J	2	(+)	97J	2	(+)	118J	2	(+)	159J	2	(+)
14J	0,25	(++)	98J	0,25	(+)	127J	0,25	(+)			
14J	0,5	(+)	98J	0,5	(+)	127J	0,5	(+)			
14J	1	(+)	98J	1	(+)	127J	1	(+)			
14J	2	(+)	98J	2	(+)	127J	2	(+)			
CIAT899	0,25	(++)	LMRT28	0,25	(+)	117J	0,25	(+)			
CIAT899	0,5	(++)	LMRT28	0,5	(++)	117J	0,5	(+)			
CIAT899	1	(++)	LMRT28	1	(++)	117J	1	(+)			
CIAT899	2	(++)	LMRT28	2	(++)	117J	2	(+)			

Anexo 9. Crecimiento e índice de solubilización de fosfato en medio con fosfato bicálcico de cepas aisladas de *C. brachystegia*.

Cepas	16S	3-7 días de cultivo								
		Medida colonia			Medida del halo			Halo prom (mm)	Crec prom UFC (mm)	Índice solubilidad (mm)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3			
1J	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,50	0,50	0,52	1,0	0,75	0,85	8,7	5,1	1,7
26J	<i>R. miluonense</i>	0,60	0,70	0,60	1,05	1,05	1,20	11	6,33	1,74
27J	<i>R. miluonense</i>	0,50	0,55	0,48	1,40	1,50	1,05	13,2	5,1	2,6
2J	<i>R. radiobacter</i>	0,45	0,45	0,45	0,50	0,55	0,50	5,2	4,5	1,15
29J	<i>R. radiobacter</i>	0,45	0,45	0,40	0,55	0,55	0,60	5,7	4,3	1,33
35J	<i>R. radiobacter</i>	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	4,5	4,5	1
54J	<i>R. radiobacter</i>	0,50	0,65	0,55	0,70	0,90	0,85	8,2	5,6	1,46
17J	<i>R. miluonense</i>	0,45	0,45	0,45	0,60	0,60	0,65	6,2	4,5	1,38
83J	<i>R. larrymoorei</i>	0,55	0,60	0,55	0,85	0,80	0,85	8,3	5,7	1,45
84J	<i>R. larrymoorei</i>	0,40	0,45	0,45	0,60	0,60	0,55	5,8	4,3	1,35
14J	<i>R. miluonense</i>	0,50	0,60	0,55	0,90	0,80	0,75	8,2	5,5	1,5
21J	<i>R. viscosum</i>	0,45	0,50	0,50	0,70	0,75	0,70	7,2	4,8	1,5
19J	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	0,40	0,45	0,45	1,0	0,75	0,85	8,7	4,3	2,02
32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,45	0,50	0,50	0,55	0,95	0,75	7,5	4,8	1,56
38J	<i>R. multihospitium</i>	0,50	0,50	0,50	1,20	1,25	1,25	12,33	5	2,46
48J	<i>R. multihospitium</i>	0,40	0,40	0,45	0,55	0,60	0,75	6,3	4,2	1,5
49J	<i>R. multihospitium</i>	0,55	0,50	0,45	0,60	0,60	0,65	6,2	5	1,24
33J	<i>Burkholderia gladioli</i>	0,60	0,60	0,60	1,50	1,65	1,70	16,2	6	2,7
88J	<i>R. radiobacter</i>	0,80	0,95	0,90	1,10	1,15	1,0	10,8	8,8	1,23
90J	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	0,65	0,60	0,70	1,10	0,80	1,20	10,3	6,5	1,6
91J	<i>B. liaoningense</i>	0,60	0,60	0,55	0,75	1,0	0,75	8,3	5,8	1,43
96J	<i>B. tropiciagri</i>	0,90	0,90	1,10	1,10	1,05	1,25	11,3	9,6	1,18
97J	<i>B. tropiciagri</i>	0,72	0,60	0,65	0,90	1,0	0,80	9	6,6	1,36
98J	<i>B. tropiciagri</i>	0,50	0,50	0,60	0,75	0,75	0,75	7,5	5,3	1,4
99J	<i>B. liaoningense</i>	0,45	0,50	0,50	0,65	0,95	0,80	8	4,8	1,67
102J	<i>B. liaoningense</i>	0,65	0,60	0,60	0,95	1,10	0,80	9,5	6,1	1,56
108J	<i>B. liaoningense</i>	0,55	0,75	0,60	0,90	1,10	0,80	9,3	6,3	1,47
106J	<i>B. liaoningense</i>	0,65	0,70	0,60	1,10	0,95	0,75	9,3	6,5	1,43
117J	<i>B. liaoningense</i>	0,65	0,55	0,50	1,0	0,75	0,65	8	5,7	1,4
118J	<i>B. liaoningense</i>	0,60	0,60	0,65	0,90	0,75	0,90	8,5	6,1	1,4
119J	<i>R. multihospitium</i>	0,50	0,55	0,55	0,90	0,85	0,80	8,5	5,3	1,6
124J	<i>B. daqingense</i>	0,55	0,60	0,55	0,90	1,05	0,85	9,3	5,6	1,67
125J	<i>B. daqingense</i>	0,55	0,65	0,60	0,75	0,80	1,0	9,3	6	1,55
127J	<i>B. liaoningense</i>	0,55	0,60	0,60	0,70	0,85	0,85	8	5,8	1,38
132J	<i>B. tropiciagri</i>	0,55	0,60	0,60	1,40	1,0	1,35	12,5	5,8	2,15
134J	<i>B. tropiciagri</i>	0,55	0,55	0,55	0,70	0,75	1,30	9,2	5,5	1,67
139J	<i>B. tropiciagri</i>	0,85	0,85	0,68	0,85	0,85	0,75	8,2	8,2	1
144J	<i>B. tropiciagri</i>	0,90	0,90	0,75	1,40	1,35	1,20	13,2	8,5	1,55
136J	<i>B. tropiciagri</i>	0,42	0,45	0,46	0,42	0,45	0,46	4,4	4,4	1
146J	<i>B. liaoningense</i>	0,70	0,75	0,65	1,15	1,15	0,90	10,7	7	1,53
142J	<i>B. liaoningense</i>	0,55	0,70	0,55	0,70	0,90	0,90	8,3	6	1,38
143J	<i>B. tropiciagri</i>	0,60	0,55	0,55	1,30	1,30	1,20	12,7	5,7	2,23
148J	<i>R. endophyticum</i>	0,60	0,55	0,60	0,60	0,55	0,60	5,8	5,8	1
150J	<i>R. endophyticum</i>	0,85	0,90	0,65	1,45	1,30	0,95	12,3	8	1,54
151J	<i>R. endophyticum</i>	0,50	0,50	0,50	0,80	0,60	0,80	7,3	5	1,46
153J	<i>R. endophyticum</i>	0,75	0,68	0,62	1,30	0,75	0,76	9,4	6,8	1,38
159J	<i>R. endophyticum</i>	0,60	0,60	0,64	0,75	0,75	0,90	8	6,1	1,31
CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i>	0,55	0,50	0,55	0,60	0,80	0,75	7,2	5,3	1,36
LMRT 28	<i>B. yuanmingense</i>	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	1	1	1
Agua dest	Control absoluto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0	0,0

Anexo 10. Crecimiento e índice de solubilización de fosfato en medio con fosfato tricálcico de cepas aisladas de *C. brachystegia*.

CEPA	16S	3-7 días de cultivo								
		Medida cultivo			Medida del halo			Halo prom (mm)	Crec prom UFC (mm)	Índice solubilidad (mm)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3			
1J	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,65	0,60	0,60	0,80	1,0	0,85	8,3	6,2	1,34
27J	<i>R. miluonense</i>	0,45	0,55	0,60	0,98	1,05	1,20	10,8	5,3	2,04
2J	<i>R. radiobacter</i>	0,35	0,35	0,45	0,75	0,70	0,70	7,2	3,8	1,9
29J	<i>R. radiobacter</i>	0,45	0,45	0,45	0,60	0,65	0,66	6,4	4,5	1,42
54J	<i>R. radiobacter</i>	0,55	0,45	0,45	0,90	0,80	0,83	8,4	4,8	1,75
17J	<i>R. miluonense</i>	0,50	0,40	0,50	0,60	0,55	0,60	5,8	4,6	1,26
83J	<i>R. larrymoorei</i>	0,45	0,40	0,45	0,55	0,50	0,60	5,5	4,3	1,28
84J	<i>R. larrymoorei</i>	0,45	0,45	0,45	0,70	0,80	0,70	7,3	4,5	1,62
14J	<i>R. miluonense</i>	0,40	0,45	0,45	0,80	0,70	0,70	7,3	4,3	1,7
21J	<i>R. viscosum</i>	0,45	0,45	0,45	0,55	0,55	0,55	5,5	4,5	1,22
19	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	0,50	0,60	0,60	1,10	1,05	1,05	10,7	5,7	1,88
32J	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,50	0,50	0,50	0,55	0,50	0,50	5,2	5	1,04
38J	<i>R. multihospitium</i>	0,55	0,60	0,60	1,30	1,25	1,20	12,5	5,8	2,15
48J	<i>R. multihospitium</i>	0,45	0,45	0,45	0,85	0,80	0,90	8,5	4,5	1,88
49J	<i>R. multihospitium</i>	0,75	0,75	0,75	0,85	0,85	0,85	8,5	7,5	1,13
33J	<i>Burkholderia gladioli</i>	1,05	1,10	1,10	1,75	1,80	1,80	17,8	10,8	1,65
44J	<i>Achromobacter aloeverae</i>	0,60	0,65	0,65	0,75	0,78	0,80	7,8	6,3	1,24
88J	<i>R. radiobacter</i>	0,80	1,05	1,10	1,15	1,25	1,20	12,3	9,8	1,26
90J	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	0,85	0,90	1,10	1,15	1,15	1,25	11,8	9,5	1,24
91J	<i>B. liaoningense</i>	1,10	1,15	1,05	1,35	1,40	1,25	13,3	11	1,21
96J	<i>B. tropiciagri</i>	0,90	0,85	0,80	1,15	1,15	1,10	11,3	8,5	1,33
97J	<i>B. tropiciagri</i>	0,98	0,99	1,0	1,10	1,10	1,15	11,2	9,9	1,13
98J	<i>B. tropiciagri</i>	1,0	1,0	1,10	1,15	1,10	1,20	11,5	10,3	1,12
99J	<i>B. liaoningense</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,03	10,1	10	1,01
102J	<i>B. liaoningense</i>	0,90	0,90	0,80	1,20	1,20	1,10	11,7	8,7	1,34
108J	<i>B. liaoningense</i>	0,85	0,90	0,75	1,10	1,0	0,85	9,8	8,3	1,18
106J	<i>B. liaoningense</i>	0,90	1,0	0,90	1,10	1,15	1,15	11,3	9,3	1,22
117J	<i>B. liaoningense</i>	0,90	1,0	1,0	1,15	1,20	1,20	11,8	9,6	1,23
118J	<i>B. liaoningense</i>	0,60	0,75	0,70	0,75	0,90	0,95	8,7	6,8	1,28
119J	<i>R. multihospitium</i>	1,0	1,10	1,10	1,15	1,25	1,30	12,3	10,6	1,6
124J	<i>B. daqingense</i>	0,90	0,90	0,88	1,10	1,15	1,0	10,8	9,3	1,16
125J	<i>B. daqingense</i>	0,70	0,75	0,85	0,80	1,0	1,10	9,3	7,6	1,22
127J	<i>B. liaoningense</i>	0,50	0,45	0,55	0,50	0,45	0,55	5	5	1
132J	<i>B. tropiciagri</i>	0,88	0,90	0,90	1,0	1,05	1,10	10,5	8,9	1,18
134J	<i>B. tropiciagri</i>	0,65	0,65	0,75	0,85	0,95	1,05	9,5	6,8	1,4
139J	<i>B. tropiciagri</i>	0,60	0,70	0,80	0,85	0,90	1,0	9,2	7	1,31
144J	<i>B. tropiciagri</i>	0,80	1,0	0,90	1,10	1,25	1,20	11,8	9	1,31
136J	<i>B. tropiciagri</i>	0,85	0,90	0,90	1,20	1,15	1,15	11,7	9	1,3
146J	<i>B. liaoningense</i>	1,10	0,90	1,10	1,25	1,20	1,25	12,3	10,3	1,19
142J	<i>B. liaoningense</i>	0,70	0,80	0,80	0,90	1,0	1,0	9,7	7,7	1,26
143J	<i>B. tropiciagri</i>	0,55	0,60	0,65	0,90	0,90	1,0	9,3	6	1,55
148J	<i>R. endophyticum</i>	1,10	1,10	1,12	1,15	1,15	1,20	11,7	11,06	1,06
150J	<i>R. endophyticum</i>	1,10	1,05	1,0	1,20	1,15	1,10	11,5	10,5	1,09
151J	<i>R. endophyticum</i>	0,70	0,79	0,70	0,95	0,95	0,90	9,3	7,3	1,27
153J	<i>R. endophyticum</i>	0,75	0,75	0,75	0,95	0,95	1,0	9,6	7,5	1,28
159J	<i>R. endophyticum</i>	0,60	0,65	0,65	0,70	0,80	0,78	7,6	6,3	1,21
CIAT 899	<i>R. tropici</i>	0,40	0,45	0,40	0,55	0,60	0,60	5,8	4,2	1,38
LMRT 28	<i>B. yuanmingense</i>	0,95	1,0	0,95	1,05	1,15	1,05	10,8	9,7	1,11
H2O dest	Control	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0	0

Anexo 11. Producción de sideróforos de cepas de rizobios aisladas de nódulos de *C. brachystegia*.

Cepa	16S	Diámetro Halo (cm)
1J	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,77*
27J	<i>R. miluonense</i>	0,49
2J	<i>R. radiobacter</i>	0,80*
29J	<i>R. radiobacter</i>	0,81*
54J	<i>R. radiobacter</i>	0,43
17J	<i>R. miluonense</i>	0,42
83J	<i>R. larrymoorei</i>	0,36
84J	<i>R. larrymoorei</i>	0,58*
14J	<i>R. miluonense</i>	0,41
21J	<i>R. viscosum</i>	0,42
32J	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,20
38J	<i>R. multihospitium</i>	0,34
48J	<i>R. multihospitium</i>	0,35
49J	<i>R. multihospitium</i>	0,43
33J	<i>Burkholderia gladioli</i>	0,85
88J	<i>R. radiobacter</i>	0,38
90J	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	0,30
91J	<i>B. liaoningense</i>	0,50
96J	<i>B. tropiciagri</i>	0,08
97J	<i>B. tropiciagri</i>	0,48
98J	<i>B. tropiciagri</i>	0,53*
99J	<i>B. liaoningense</i>	0,53*
102J	<i>B. liaoningense</i>	0,46*
108J	<i>B. liaoningense</i>	0,34
106J	<i>B. liaoningense</i>	0,34
117J	<i>B. liaoningense</i>	0,32
119J	<i>R. multihospitium</i>	0,40
124J	<i>B. daqingense</i>	0,37*
125J	<i>B. daqingense</i>	0,35
132J	<i>B. tropiciagri</i>	0,30
134J	<i>B. tropiciagri</i>	0,35
139J	<i>B. tropiciagri</i>	0,26
144J	<i>B. tropiciagri</i>	0,37
136J	<i>B. tropiciagri</i>	0,20
146J	<i>B. liaoningense</i>	0,27
142J	<i>B. liaoningense</i>	0,18
143J	<i>B. tropiciagri</i>	0,45*
148J	<i>R. endophyticum</i>	0,51*
150J	<i>R. endophyticum</i>	0,33
151J	<i>R. endophyticum</i>	0,34
153J	<i>R. endophyticum</i>	0,35
159J	<i>R. endophyticum</i>	0,30
CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i>	0,21
LMRT 28	<i>B. yuanmingense</i>	0,02

* CONSIDERA LAS CEPAS DESTACADAS EN LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Anexo 12. Producción del Ácido Indol-acético a los 3 días de crecimiento de las cepas de rizobios.

Cepas	R1	R2	R3	X	concentración (µg/ml)
1J	0,072	0,077	0,075	0,07	2,0
2J	0,632	0,63	0,687	0,65	30,0
14J	0,66	0,638	0,895	0,73	34,0
15J	1,594	1,538	1,576	1,57	74,9
17J	0,525	0,538	0,513	0,53	24,0
21J	0,734	0,691	0,704	0,71	33,0
26J	0,283	0,262	0,307	0,28	12,2
27J	0,34	0,361	0,317	0,34	14,9
29J	0,357	0,384	0,373	0,37	16,5
30J	0,611	0,688	0,658	0,65	30,2
32J	0,034	0,045	0,046	0,04	0,4
33J	0,349	0,303	0,314	0,32	14,0
35J	0,385	0,282	0,285	0,32	13,8
37J	0,714	0,755	0,734	0,73	34,2
38J	0,376	0,369	0,305	0,35	15,4
48J	0,415	0,434	0,417	0,42	18,9
49J	0,69	0,664	0,657	0,67	31,0
54J	0,587	0,609	0,587	0,59	27,3
83J	0,45	0,45	0,447	0,45	20,2
84J	1,408	1,078	1,093	1,19	56,5
88J	0,497	0,502	0,52	0,51	23,0
90J	0,464	0,422	0,428	0,44	19,7
91J	0,289	0,247	0,263	0,27	11,3
96J	0,232	0,337	0,264	0,28	11,9
97J	0,546	0,555	0,547	0,55	25,1
98J	0,365	0,342	0,379	0,36	16,0
99J	0,388	0,328	0,323	0,35	15,2
102J	0,441	0,435	0,449	0,44	19,9
104J	0,37	0,416	0,386	0,39	17,4
106J	0,279	0,306	0,305	0,30	12,8
108J	0,46	0,399	0,454	0,44	19,7
117J	0,308	0,373	0,391	0,36	15,8
118J	0,694	0,685	0,686	0,69	31,9
119J	0,486	0,507	0,521	0,50	23,0
124J	0,394	0,367	0,411	0,39	17,4
125J	0,21	0,188	0,21	0,20	8,2
127J	0,364	0,357	0,392	0,37	16,4
132J	0,287	0,285	0,277	0,28	12,1
134J	0,285	0,291	0,261	0,28	12,0
136J	0,15	0,116	0,139	0,14	4,9
139J	0,236	0,26	0,283	0,26	11,0
142J	0,555	0,592	0,595	0,58	26,7
143J	0,336	0,337	0,313	0,33	14,4
144J	0,383	0,373	0,359	0,37	16,5
146J	0,592	0,585	0,571	0,58	26,8
148J	0,471	0,47	0,461	0,47	21,1
150J	0,802	0,794	0,826	0,81	37,7
151J	0,5	0,571	0,518	0,53	24,2
153J	0,587	0,612	0,638	0,61	28,2
157J	0,428	0,511	0,432	0,46	20,6
159J	0,643	0,766	0,684	0,70	32,4
CIAT 899	0,349	0,348	0,325	0,34	15,0

Anexo 13. Efecto de las mejores cepas de rhizobia en el % de germinación y longitud de radícula de semillas de rábano.

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Long. Radícula	Germinadas	Total semillas	% germin
30 J (R1)	6,45	5,1	5,3	4,7	5,4	4,8	4,3	4,9	2,5				4,83	9	12	75,00
30 J (R2)	4,5	4,2	3,8	3,9	4,4	2,8	3,7	4,4					3,96	8	12	66,67
30 J (R3)	4,6	3,8	4,3	3,5	3,8	3,6	3	5,1					3,96	8	12	66,67
30 J (R4)	5,64	4,4	4,1	4,6	5,7	3,75	5,1	4,3					4,70	8	12	66,67
30 J (R5)	5,1	4,9	5,45	3,3	4,5	4,4	3,8	3,9	3,35				4,30	9	12	75,00
CIAT899 (R1)	4,76	4,8	5,1	5,8	5,2	4,1	4,5	7	3,8				5,01	8	12	66,67
CIAT899 (R2)	6,1	4,9	3,8	4,8	6,2	5,4	5,5	4,8	3,2	4,8	2,4	2,7	4,55	12	12	100,00
CIAT899 (R3)	4,9	5,5	4,1	3,8	4,4	4	3,9	4,5	3,4	6,6			4,51	10	12	83,33
CIAT899 (R4)	5,6	6,6	5,4	4,9	5,7	4,6	4,7	5,9	4,9				5,37	9	12	75,00
CIAT899 (R5)	5	4,4	4,7	5,2	6,1	4,3	3,4	5,6	6,2	4,3			4,92	10	12	83,33
134J (R1)	5,8	5,1	6,1	4,8	5,25	4	4,2	4,7	5,3	4,2	3,9		4,85	11	12	91,67
134J (R2)	5,9	5,3	5,5	3,8	4	4,5	6	3,8	4,2	5	6,5		4,95	11	12	91,67
134J (R3)	4,1	6,3	4,4	5,5	3,5	4	7,5	6,8	6,7	6,6			5,54	10	12	83,33
134J (R4)	4,8	5,1	5,1	4,2	4,9	6	5,7	5,3	5,1	4,6	4,5		5,03	11	12	91,67
134J (R5)	6,3	5,8	4,7	4,9	5,6	5,2	5,5	4,9	6	3,9			5,28	10	12	83,33
142J (R1)	5,9	5,6	3	3,4	3,5	5,8	3,8	5,7	5	5,6			4,73	10	12	83,33
142J (R2)	7,2	3	3,5	4,4	3,2	4,2	6,5	3	4,5	2,6			4,21	10	12	83,33
142J (R3)	3,7	5,8	6,3	7,8	5	3,5	5,3	5,5	3	3,2			4,91	10	12	83,33
142J (R4)	5,5	5	4,5	4,7	5,3	4,7	5,2	4,4	3,7	4,7	4,9		4,78	11	12	91,67
142J (R5)	4,8	4,9	3,8	5,3	4,4	5,1	4,8	6	4,9	5,4			4,94	10	12	83,33
32 J (R1)	7,4	5,4	4,3	5,6	7,8	7,4	5,8	4,4	6,2	3	2,5	1,2	5,08	12	12	100,00
32 J (R2)	6,8	6,6	4,2	6	5,4	6,3	3,3	2,9	8,5	5,5			5,55	10	12	83,33
32 J (R3)	6,6	6	5	5,4	5,75	5,4	5,7	3,8	4,6	2,7	1,5		4,77	11	12	91,67
32 J (R4)	7	5,5	5,3	6,4	6,3	6,4	4,9	4,9	7,2	3,9			5,78	10	12	83,33
32 J (R5)	5,9	6,2	5,1	6,6	5,9	5,7	3,8	4,5	6	4,8	3,2		5,25	11	12	91,67
37 J (R1)	5,1	6,3	7,5	5,5	8,5	5,6	3,5	3,3	3	3	3,7		5,00	11	12	91,67
37 J (R2)	5,25	6,9	6,5	8,3	6	6,9	6,8	3,4	6,6	5,7	4,5		6,08	11	12	91,67
37 J (R3)	8,1	5,3	6,5	7,5	5,2	6,1	5,2	6,4	2,5	6,4			5,92	10	12	83,33
37 J (R4)	5,1	4,2	5,7	4,1	5,8	5,3	5	5,5	5,8	5,9			5,24	10	12	83,33
37 J (R5)	3,9	5,8	4,3	5,2	4,9	4,2	4,6	4,9	5,3	6			4,91	10	12	83,33
33 J (R1)	3,5	2,9	3,2	3,4	2,4								3,08	5	12	41,67
33 J (R2)	3,1	3,5	3,8	3,9	3,3	3,7	4	3,5					3,60	8	12	66,67
33 J (R3)	3,3	3,2	3,1	2,6	3,3	3,4	1,5	0,75					2,64	8	12	66,67
33 J (R4)	3,6	2,7	4	2,5	3,9			2,5					3,20	6	12	50,00
33 J (R5)	3	2,4	2,8	3,6	3,2								3,00	5	12	41,67
CONTROL (R1)	6,5	5,4	4,4	5,8	5,1	7,2	3,3	5,9	2,6	5,1	3,4		4,97	11	12	91,67
CONTROL (R2)	5,4	3,9	4,1	6,3	4,8	5,3	5,8	5,8	3,5	5,6	4,9		5,04	11	12	91,67
CONTROL (R3)	4	6,1	4,2	5,3	5,2	4,6	4,8	5,6	4,2	3,6			4,76	10	12	83,33
CONTROL (R4)	5,5	4,2	5,2	5	4,1	4	3,9	5,3	3,4	2,9			4,35	9	12	75,00
CONTROL (R5)	3,9	5	4,1	4,7	5,2	4,9	5	4,6	4,6	4,4	3,5		4,54	11	12	91,67

Continuación...

157J (R1)	4,2	4,6	3,7	3,6	4,2	4	6,75	4,25	4,7	4,5	3	4,32	11	12	91,67	
157J (R2)	4,3	5,7	4,4	4,6	4,6	4	5,2	3,8	3,7	5		4,53	10	12	83,33	
157J (R3)	3,7	4,4	4,3	4,2	3,5	5,2	6,1	4,3	6	3,5		4,52	10	12	83,33	
157J (R4)	3,9	6,2	4,6	4,8	4,8	4,4	6	4,9	5,7	6,2		5,15	10	12	83,33	
157J (R5)	5	4,7	5,1	3,8	4,3	5,7	5,5	4	4,8	2,3		4,52	10	12	83,33	
1 J (R1)	7,1	5,3	7,4	6,5	7	4,5	4,7	4,3	4,7	4,4	2,3	2,7	5,08	12	12	100,00
1 J (R2)	6,8	6,3	3,4	6,7	3,8	7,8	7,9	8,4	7,6	4			6,27	10	12	83,33
1 J (R3)	6	6,5	8,1	6,9	5,7	6,8	6,7	4,4	4,5	3,6	2,7		5,63	11	12	91,67
1 J (R4)	5,4	5,2	3,9	4,1	4,9	6,3	5,6	5,7	5,5	4,7			5,13	10	12	83,33
1 J (R5)	3,6	3,2	5,2	3,7	5,8	5,5	4,9	6,3	6,8	5,1	4,7		4,98	11	12	91,67
83 J (R1)	7,1	6,15	6,5	4,7	4,7	5,6	3,2	7,5	4	2,8			5,23	10	12	83,33
83 J (R2)	4,5	5,5	4,6	4,9	6,8	6,6	3,4	6,4	4,7	3,7			5,11	10	12	83,33
83 J (R3)	3,6	5,6	4,1	6,2	6,4	6,6	5,3	7,6	6,1	3,5	2		5,18	11	12	91,67
83 J (R4)	5,4	4,1	3,1	5,2	4,8	5,8	4,8	5,2	5,9	4,3			4,86	10	12	83,33
83 J (R5)	3,3	3,6	3,8	4,4	5,4	4,2	3,3	4,4	4,6	5,5	4,3		4,25	11	12	91,67
102 J (R1)	7,8	6,2	4,8	4	6,3	6	3,8	2,6	2,3	1,4			4,52	10	12	83,33
102 J (R2)	5,6	7,3	4,9	5,7	6,3	7,4	6,6	6,75	6,3	3,6	4,2		5,88	11	12	91,67
102 J (R3)	6,7	7,1	5,5	7,6	6,9	8,6	5	3,4	3,8	3,1			5,77	10	12	83,33
102 J (R4)	4,9	6,6	5,4	5,9	7	7,1	4,7	5,4	5,7	4,9			5,76	10	12	83,33
102 J (R5)	5,5	4,9	5,1	4,6	5,7	5,9	5,6	4,9	4,4	3,5			5,01	10	12	83,33

Anexo 14. Subconjuntos de grupos generados del porcentaje de germinación de 11 cepas de rizobios, inoculados en semillas de rábano.

Porcentaje Germinación				
Duncan ^{a,b}				
Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
33 J	5	53,3360		
30 J	5		70,0020	
CIAT899	5			81,6660
102 J	5			84,9980
142J	5			84,9980
157J	5			84,9980
37 J	5			86,6660
83 J	5			86,6660
CONTROL	5			86,6680
134J	5			88,3340
1 J	5			90,0000
32 J	5			90,0000
Sig.		1,000	1,000	0,120
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = 49,207.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.				
b. Alfa = .05.				

Anexo 15. Subconjuntos de grupos generados del tamaño radicular de 11 cepas de rizobios, inoculados en semillas de rábano.

Longitud Radícula						
Duncan ^{a,b}						
Tratamiento	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
33 J	5	3,1040				
30 J	5		4,3500			
157J	5		4,6080	4,6080		
142J	5		4,7140	4,7140	4,7140	
CONTROL	5		4,7320	4,7320	4,7320	
CIAT899	5		4,8720	4,8720	4,8720	4,8720
83 J	5		4,9260	4,9260	4,9260	4,9260
134J	5			5,1300	5,1300	5,1300
32 J	5				5,2860	5,2860
102 J	5					5,3880
1 J	5					5,4180
37 J	5					5,4300
Sig.		1,000	0,055	0,082	0,057	0,067
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,168.						
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.						
b. Alfa = .05.						

Anexo 16. Fijación de nitrógeno por diferentes rizobios, con el método de la reducción del acetileno (ARA) en nódulos de *P. vulgaris* y *V. unguiculata*.

Tratamiento	Repetición	Planta inoculada	Color nódulos	No. Nódulos	Peso nódulos (g)	Valor etileno	Peso Normalizado nódulos (g)	Valor etileno Normalizado	Valor prom acetileno $\mu\text{ mol C}_2\text{H}_2\text{ h}^{-1}$ (NDW) h-1.g
Cepa 1J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Crema	98	1.01	28.93	1	28.93	21.29
	R2			67	0.72	9.82	1	13.64	
Cepa 2 J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Blancos	62	0.6	5.4	1	8.5	7.48
	R2			31	0.53	3.42	1	6.45	
Cepa 14J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Blancos	118	0.51	0	1	0	0.5
	R2			140	0.94	0.93	1	0.99	
Cepa 27J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosados / blanquesinos	68	0.7	10.86	1	15.51	10.26
	R2			51	0.47	2.36	1	5.02	
Cepa 30J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Crema	61	1	53.16	1	53.16	33.82
	R2			158	1	14.12	1	14.12	
Cepa 37J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosados	108	1	27.92	1	27.92	21.2
	R2			116	1	14.49	1	14.49	
Cepa 83J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosados / blanquesinos	118	1	3.13	1	3.13	1.75
	R2			70	1	0.36	1	0.36	
Cepa CIAT 899	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosados	157	1	10.03	1	10.03	22.2
	R2			222	1	34.36	1	34.36	
N (+)	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sin nódulos	0	0	0	0	0	0
	R2			0	0	0	0	0	
Cepa 88 J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Blanquesinos / Rosados	63	0.84	5.56	1	6.62	3.75
	R2			78	0.92	0.822	1	0.89	
Cepa 151J	R1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rosados	57	0.7	4.43	1	6.33	5.15
	R2			103	1	3.98	1	3.98	
N (-)	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Sin nódulos	0	0	0	0	0	0
	R2			0	0	0	0	0	
Cepa 99 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blanquesinos / Rosados	29	0.72	9.88	1	13.72	8.07
	R2			14	0.57	1.38	1	2.42	
Cepa 102 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blancos	78	1	51.76	1	51.76	34.7
	R2			87	1.02	18.76	1	18.39	
Cepa 124 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blanquesinos / Rosados	38	0.86	15.13	1	17.59	16.55
	R2			89	0.67	10.42	1	15.5	
Cepa 125 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Rosados	151	0.87	66.77	1	76.74	54.27
	R2			83	0.85	27.03	1	31.8	
Cepa 134 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blanquesinos / Rosados	59	0.94	9.75	1	10.37	38.69
	R2			49	0.84	56.29	1	67.01	
Cepa 136 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Crema	47	0.6	1.17	1	1.95	4.86
	R2			53	0.53	4.12	1	7.77	
Cepa 139 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blancos	63	1.04	3.47	1	3.34	11.7
	R2			54	0.92	18.47	1	20.07	
Cepa 142 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blanquesinos / Rosados	59	1.02	28.04	1	27.49	16.94
	R2			78	0.89	5.69	1	6.39	
Cepa 143 J	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Blanquesinos	35	0.56	3.03	1	5.41	17.6
	R2			25	0.52	6.34	1	12.19	
Cepa LMRT28	R1	<i>Vigna unguiculata</i>	Rosados	52	0.76	11.05	1	14.54	15.55
	R2			104	1	15.77	1	15.77	

Anexo 17. Evaluación de las cepas de *Rhizobium* noduladoras de plantas trampa.

Código	EzTaxon	% Nodulación	Resultado inoculación	Origen cepa	Planta inoculada
1	<i>R. radiobacter</i>	100	(+) 3/3	UG	<i>P. vulgaris</i>
27	<i>R. miluonense</i>	100	(+) 5/5	BG	<i>P. vulgaris</i>
35	<i>R. radiobacter</i>	0	(-) Sin nodular	BG	<i>P. vulgaris</i>
54	<i>R. radiobacter</i>	20	(+) 1/5	PY	<i>P. vulgaris</i>
17	<i>R. miluonense</i>	0	(-) Sin nodular	UG	<i>P. vulgaris</i>
21	<i>R. viscosum</i>	0	(-) Sin nodular	UG	<i>P. vulgaris</i>
83	<i>R. larrymoorei</i>	100	(+) 5/5	PY	<i>P. vulgaris</i>
14	<i>R. miluonense</i>	100	(+) 4/4	UG	<i>P. vulgaris</i>
37	<i>R. multihospitium</i>	25	(+) 1/4	UG	<i>P. vulgaris</i>
88	<i>R. radiobacter</i>	80	(+) 4/5	PY	<i>P. vulgaris</i>
119	<i>R. multihospitium</i>	0	(-) Sin nodular	PB (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
148	<i>R. endophyticum</i>	25	(+) 1/4	PB (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
150	<i>R. endophyticum</i>	40	(+) 2/5	PB (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
151	<i>R. endophyticum</i>	60	(+) 3/5	PB (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
153	<i>R. endophyticum</i>	0	(-) Sin nodular	MY (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
159	<i>R. endophyticum</i>	0	(-) Sin nodular	PB (Pe)	<i>P. vulgaris</i>
90	<i>B. tropiciagri</i>	0	(-) Sin nodular	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
91	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
96	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
97	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
98	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
99	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
102	<i>B. liaoningense</i>	33	(+) 1/3	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
106	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
108	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
117	<i>B. liaoningense</i>	33	(+) 1/3	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
118	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
124	<i>B. daqingense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
125	<i>B. daqingense</i>	60	(+) 3/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
127	<i>B. liaoningense</i>	67	(+) 2/3	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
132	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
134	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
136	<i>B. tropiciagri</i>	60	(+) 3/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
139	<i>B. tropiciagri</i>	100	(+) 5/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
142	<i>B. liaoningense</i>	80	(+) 4/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
143	<i>B. tropiciagri</i>	60	(+) 3/5	MY (Pe)	<i>V. unguiculata</i>
146	<i>B. liaoningense</i>	100	(+) 5/5	PB (Pe)	<i>V. unguiculata</i>

Anexo 18. Efecto de cepas de *Rhizobium* en el crecimiento de plantas de frejol red kidney.

Tratamiento	No. Trifolios	% Germin.	Alt. tallo	No. Nódulos	Peso fresco parte aérea	Peso seco parte aérea	Peso fresco raíz	Peso seco de raíz	Long. Raíz
Cepa 1J	2	83,3	6,4	4	0,61	0,22	0,53	0,0748	16,1
Cepa 1J	3	83,3	9,5	22	2,25	0,39	1,8	0,2334	27,2
Cepa 1J	2	83,3	8,9	6	1,15	0,1	0,48	0,0803	15,1
Cepa 1J	3	83,3	8,7	31	1,54	0,24	1,47	0,1853	22,3
Cepa 1J	3	83,3	8,9	14	1,07	0,18	0,95	0,1151	21,6
Cepa 14J	4	63,6	12,1	0	1,73	0,26	1,55	0,09	22,6
Cepa 14J	3	63,6	8	0	1,28	0,97	0,97	0,05	19,1
Cepa 14J	3	63,6	13,1	7	2,85	0,41	1,57	0,1	20,8
Cepa 14J	3	63,6	17,8	0	3,92	0,5	2,24	0,15	23,5
Cepa 14J	3	63,6	15,1	0	2,31	0,27	1,62	0,09	20,5
Cepa 17J	2	75	9,2	0	1,61	0,14	0,9	0,05	16,2
Cepa 17J	3	75	10,3	0	1,4	0,19	0,86	0,05	16,3
Cepa 17J	2	75	9	0	1,01	0,14	1,15	0,07	17,4
Cepa 17J	3	75	8,6	0	1,29	0,13	0,96	0,05	12,5
Cepa 17J	1	75	7,5	0	1,38	0,18	1,25	0,09	22,3
Cepa 21J	1	86,6	9,2	0	0,64	0,16	0,78	0,03	19,2
Cepa 21J	1	86,6	11	0	0,95	0,18	0,88	0,01	14,3
Cepa 21J	2	86,6	9,8	0	0,78	0,09	0,88	0,04	14,7
Cepa 27J	3	100	9,6	43	2,73	0,47	1,61	0,2082	20,8
Cepa 27J	2	100	8,2	28	1,46	0,19	1,62	0,1673	20,5
Cepa 27J	3	100	7,6	27	1,06	0,14	1,27	0,127	19,6
Cepa 27J	2	100	7,5	19	0,72	0,22	0,9	0,0883	17,4
Cepa 27J	3	100	7,9	17	1,12	0,11	1,37	0,1305	16,1
Cepa 30J	3	91,6	10	61	2,11	0,36	1,64	0,1776	24,9
Cepa 30J	3	91,6	9,8	83	2,25	0,36	2,44	0,2492	19,7
Cepa 30J	2	91,6	7,8	10	0,92	0,14	1,29	0,1026	21,5
Cepa 30J	3	91,6	8	44	1,6	0,24	1,43	0,1252	18,7
Cepa 30J	3	91,6	7,3	28	1,03	0,2	1,6	0,1498	19,7
Cepa 35J	0	40	8	0	0,82	0,08	0,59	0,11	13,6
Cepa 35J	2	40	9,4	0	1,21	0,18	0,99	0,05	12,1
Cepa 35J	1	40	7	0	0,54	0,03	0,78	0,03	13,6
Cepa 37J	4	85	7,6	6	2,14	0,29	1,9	0,11	14,8
Cepa 37J	5	85	6	0	1,35	0,25	1,57	0,1	12,7
Cepa 37J	5	85	6,6	0	2,91	0,48	5,57	0,34	18,6
Cepa 37J	3	85	4,5	0	1,82	0,31	2,93	0,2	17,4
Cepa 54J	1	100	6,5	0	0,49	0,1	0,84	0,0558	24,3
Cepa 54J	1	100	7,5	40	1,61	0,18	1,84	0,129	15,4
Cepa 54J	1	100	7,7	0	1,6	0,27	0,91	0,0551	15,2
Cepa 54J	1	100	6,3	0	0,5	0,12	0,89	0,0572	19,12
Cepa 54J	3	100	9,8	0	1,34	0,2	0,84	0,04	16,7
Cepa 83J	3	100	7,7	15	1,07	0,17	1,43	0,1032	13,1
Cepa 83J	3	100	9,3	49	6,22	0,34	3,3	0,2529	26,4
Cepa 83J	2	100	9,2	28	1,31	0,16	1,8	0,1271	21,6
Cepa 83J	3	100	8,7	15	1,18	0,14	1,23	0,105	21,2
Cepa 83J	3	100	9,3	31	1,6	0,25	2,01	0,1791	16,8
Cepa 88J	3	100	10,1	11	1,75	0,24	1,07	0,07	14,3
Cepa 88J	3	100	9,7	0	1,51	0,2	1,15	0,06	16,7
Cepa 88J	2	100	9,5	5	1,72	0,22	0,92	0,04	23,6
Cepa 88J	3	100	14,7	7	3,37	0,44	2,13	0,12	16,3

Continuación...

Tratamiento	No. Trifolios	% Germin.	Alt. tallo	No. Nódulos	Peso fresco parte aérea	Peso seco parte aérea	Peso fresco raíz	Peso seco de raíz	Long. Raíz
Cepa 88J	3	100	12,2	26	3,39	0,41	2,2	0,1	13,4
Cepa 119J	4	63,6	7,7	0	1,49	0,26	1,91	0,15	19
Cepa 119J	3	63,6	8,1	0	1,28	0,19	1,03	0,11	22,3
Cepa 119J	2	63,6	7,9	0	0,61	0,06	0,89	0,05	19,1
Cepa 119J	3	63,6	5,8	0	1,11	0,13	1	0,1	15,2
Cepa 148J	3	75	8,4	8	1,53	0,24	1,48	0,15	18,2
Cepa 148J	3	75	8,3	0	0,94	0,13	1,19	0,09	19,1
Cepa 148J	1	75	7,1	0	0,5	0,02	0,82	0,06	17,6
Cepa 148J	3	75	5,8	0	0,71	0,08	1,12	0,08	15,5
Cepa 150J	3	100	12,1	7	2,78	0,55	2,82	0,24	15,8
Cepa 150J	4	100	11,4	4	1,81	0,36	1,8	0,14	22,4
Cepa 150J	3	100	6,7	0	1,06	0,18	1,11	0,12	23
Cepa 150J	3	100	12,4	0	1,83	0,39	2,42	0,23	14,5
Cepa 150J	3	100	10,4	0	1,11	0,22	1,22	0,16	13,6
Cepa 151J	3	100	8,9	0	1,53	0,28	1,87	0,16	17,6
Cepa 151J	4	100	9,1	5	1,4	0,29	2,11	0,2	15,3
Cepa 151J	2	100	9	0	1,18	0,17	1,41	0,11	16,4
Cepa 151J	3	100	9,8	6	2,01	0,33	3,07	0,17	16,6
Cepa 151J	3	100	12,7	12	2,39	0,53	6,6	0,44	17,6
Cepa 153J	3	100	7,4	0	0,9	0,13	0,73	0,08	18,3
Cepa 153J	4	100	10	0	1,89	0,27	1,31	0,11	17,1
Cepa 153J	3	100	8,7	0	1,36	0,18	1,07	0,12	17,1
Cepa 153J	4	100	7,5	0	1,2	0,14	0,94	0,06	23,1
Cepa 159J	3	100	6,7	0	0,75	0,1	1,17	0,1	13,5
Cepa 159J	3	100	8,1	0	1	0,12	1,16	0,05	26
Cepa 159J	2	100	9,2	0	1,28	0,25	2,07	0,16	23,4
Cepa 159J	4	100	9	0	1,49	0,26	1,53	0,11	14,5
Cepa 159J	3	100	9,6	0	1,64	0,28	2,14	0,16	15
CIAT 899	4	100	9	4	1,39	0,16	1,54	0,09	16,3
CIAT 899	3	100	11,5	22	2,27	0,33	1,52	0,1	11,7
CIAT 899	3	100	12,4	4	2,11	0,45	1,66	0,2	12
CIAT 899	2	100	9,1	63	1,56	0,28	0,82	0,175	16,8
CIAT 899	3	100	13,4	13	2,68	0,37	1,35	0,1	22,4
N(+)	4	100	4,5	0	1,64	0,27	1,72	0,13	15
N(+)	3	100	6,3	0	1,65	0,34	2,17	0,18	16,3
N(+)	5	100	4,4	0	0,96	0,17	1,89	0,12	11,7
N(+)	5	100	6,4	0	1,35	0,29	1,75	0,12	12
N(-)	2	91,6	7,7	0	1,16	0,14	0,65	0,04	11,6
N(-)	4	91,6	4,5	0	1,64	0,27	1,72	0,13	13,5
N(-)	3	91,6	6,3	0	0,53	0,04	0,56	0,04	10,8
N(-)	5	91,6	4,4	0	1,15	0,18	0,67	0,02	9,4
N(-)	5	91,6	5,7	0	0,78	0,109	0,28	0,0301	10

Anexo 19. Estadísticos descriptivos del análisis de la Varianza del experimento de autenticación de *Rhizobium* en semillas de frejol red kidney.

Análisis de la varianza

No. Trifolios

Variable N R² R² Aj CV**
No. Trifolios 96 0,58 0,47 25,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54,59	20	2,73	5,20	<0,0001
Tratamiento	54,59	20	2,73	5,20	<0,0001
Error	39,37	75	0,52		
Total	93,96	95			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,79713

Error: 0,5249 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Cepa 35J	1,00	3	0,42	A
Cepa 21J	1,33	3	0,42	A B
Cepa 54J	1,40	5	0,32	A B
Cepa 17J	2,20	5	0,32	A B C
Cepa 148J	2,50	4	0,36	A B C D
Cepa 27J	2,60	5	0,32	A B C D
Cepa 1J	2,60	5	0,32	A B C D
Cepa 83J	2,80	5	0,32	B C D
Cepa 88J	2,80	5	0,32	B C D
Cepa 30J	2,80	5	0,32	B C D
Cepa 119J	3,00	4	0,36	B C D
Cepa 151J	3,00	5	0,32	B C D
Cepa 159J	3,00	5	0,32	B C D
Cepa 32J	3,00	5	0,32	B C D
CIAT 899	3,00	5	0,32	B C D
Cepa 14J	3,20	5	0,32	C D
Cepa 150J	3,20	5	0,32	C D
Cepa 153J	3,50	4	0,36	C D
N(-)	3,80	5	0,32	C D
Cepa 37J	4,25	4	0,36	D
N(+)	4,25	4	0,36	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

% Germin.

Variable N R² R² Aj CV**
% Germin. 96 0,22 0,01 87,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	153829,91	20	7691,50	1,06	0,4070
Tratamiento	153829,91	20	7691,50	1,06	0,4070
Error	543708,29	75	7249,44		
Total	697538,20	95			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=211,20204

Error: 7249,4438 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Continuación...

Cepa 35J	40,00	3	49,16	A
Cepa 14J	63,60	5	38,08	A B
Cepa 119J	63,60	4	42,57	A B
Cepa 17J	75,00	5	38,08	A B
Cepa 148J	75,00	4	42,57	A B
Cepa 1J	83,30	5	38,08	A B
Cepa 37J	85,00	4	42,57	A B
Cepa 21J	86,60	3	49,16	A B
Cepa 32J	91,50	5	38,08	A B
Cepa 30J	91,60	5	38,08	A B
Cepa 54J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 83J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 88J	100,00	5	38,08	A B
CIAT 899	100,00	5	38,08	A B
Cepa 159J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 151J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 27J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 150J	100,00	5	38,08	A B
Cepa 153J	100,00	4	42,57	A B
N(+)	100,00	4	42,57	A B
N(-)	86,48	5	38,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alt. tallo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Alt. tallo	96	0,64	0,54	18,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	331,49	20	16,57	6,61	<0,0001
Tratamiento	331,49	20	16,57	6,61	<0,0001
Error	188,19	75	2,51		
Total	519,68	95			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,92932

Error: 2,5092 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
N(+)	5,40	4	0,79	A
N(-)	5,72	5	0,71	A
Cepa 37J	6,18	4	0,79	A B
Cepa 119J	7,38	4	0,79	A B C
Cepa 148J	7,40	4	0,79	A B C
Cepa 54J	7,56	5	0,71	A B C
Cepa 35J	8,13	3	0,91	A B C
Cepa 27J	8,16	5	0,71	A B C
Cepa 153J	8,40	4	0,79	A B C
Cepa 1J	8,48	5	0,71	A B C
Cepa 159J	8,52	5	0,71	A B C
Cepa 30J	8,58	5	0,71	A B C
Cepa 83J	8,84	5	0,71	A B C
Cepa 17J	8,92	5	0,71	A B C
Cepa 32J	9,32	5	0,71	A B C D
Cepa 151J	9,90	5	0,71	B C D
Cepa 21J	10,00	3	0,91	B C D
Cepa 150J	10,60	5	0,71	C D
CIAT 899	11,08	5	0,71	C D
Cepa 88J	11,24	5	0,71	C D
Cepa 14J	13,22	5	0,71	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Continuación...

No. Nódulos

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
No. Nódulos	96	0,70	0,62	10,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	21941,50	20	1097,08	8,63	<0,0001
Tratamiento	21941,50	20	1097,08	8,63	<0,0001
Error	9535,00	75	127,13		
Total	31476,50	95			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=27,96891

Error: 127,1333 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

N(+)	0,00	4	5,64	A
Cepa 21J	0,00	3	6,51	A
Cepa 35J	0,00	3	6,51	A
Cepa 17J	0,00	5	5,04	A
N(-)	0,00	5	5,04	A
Cepa 119J	0,00	4	5,64	A
Cepa 153J	0,00	4	5,64	A
Cepa 159J	0,00	5	5,04	A
Cepa 14J	1,40	5	5,04	A
Cepa 37J	1,50	4	5,64	A
Cepa 148J	2,00	4	5,64	A
Cepa 150J	2,20	5	5,04	A
Cepa 151J	4,60	5	5,04	A
Cepa 54J	8,00	5	5,04	A
Cepa 88J	9,80	5	5,04	A
Cepa 1J	15,40	5	5,04	A
CIAT 899	21,20	5	5,04	A B
Cepa 27J	26,80	5	5,04	A B
Cepa 83J	27,60	5	5,04	A B
Cepa 30J	45,20	5	5,04	B
Cepa 32J	48,60	5	5,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso fresco parte aérea

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV**</u>
Peso fresco parte aérea	96	0,33	0,15	49,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	21,30	20	1,07	1,83	0,0321
Tratamiento	21,30	20	1,07	1,83	0,0321
Error	43,63	75	0,58		
Total	64,94	95			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,89201

Error: 0,5818 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Cepa 21J	0,79	3	0,44	A
Cepa 35J	0,86	3	0,44	A
Cepa 148J	0,92	4	0,38	A
N(-)	1,05	5	0,34	A
Cepa 54J	1,11	5	0,34	A
Cepa 119J	1,12	4	0,38	A
Cepa 159J	1,23	5	0,34	A

Continuación...

Cepa 1J	1,32	5	0,34	A
Cepa 153J	1,34	4	0,38	A
Cepa 17J	1,34	5	0,34	A
N(+)	1,40	4	0,38	A
Cepa 27J	1,42	5	0,34	A
Cepa 30J	1,58	5	0,34	A
Cepa 151J	1,70	5	0,34	A
Cepa 150J	1,72	5	0,34	A
Cepa 32J	1,82	5	0,34	A
CIAT 899	2,00	5	0,34	A
Cepa 37J	2,06	4	0,38	A
Cepa 83J	2,28	5	0,34	A
Cepa 88J	2,35	5	0,34	A
Cepa 14J	2,42	5	0,34	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso seco parte aérea

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV**
Peso seco parte aérea	96	0,44	0,29	47,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,79	20	0,04	2,93	0,0004
Tratamiento	0,79	20	0,04	2,93	0,0004
Error	1,01	75	0,01		
Total	1,80	95			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,28816

Error: 0,0135 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Cepa 35J	0,10	3	0,07	A
Cepa 148J	0,12	4	0,06	A
Cepa 21J	0,14	3	0,07	A
N(-)	0,15	5	0,05	A
Cepa 17J	0,16	5	0,05	A
Cepa 119J	0,16	4	0,06	A
Cepa 54J	0,17	5	0,05	A
Cepa 153J	0,18	4	0,06	A
Cepa 159J	0,20	5	0,05	A B
Cepa 83J	0,21	5	0,05	A B
Cepa 27J	0,23	5	0,05	A B
Cepa 1J	0,23	5	0,05	A B
Cepa 30J	0,26	5	0,05	A B
N(+)	0,27	4	0,06	A B
Cepa 88J	0,30	5	0,05	A B
Cepa 32J	0,31	5	0,05	A B
CIAT 899	0,32	5	0,05	A B
Cepa 151J	0,32	5	0,05	A B
Cepa 37J	0,33	4	0,06	A B
Cepa 150J	0,34	5	0,05	A B
Cepa 14J	0,48	5	0,05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Continuación...

Peso fresco raíz

Variable N R² R² Aj CV**

Peso fresco raíz 96 0,44 0,29 49,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor

Modelo 34,15 20 1,71 2,98 0,0003

Tratamiento 34,15 20 1,71 2,98 0,0003

Error 43,04 75 0,57

Total 77,19 95

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,87915

Error: 0,5739 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

N(-) 0,78 5 0,34 A

Cepa 35J 0,79 3 0,44 A

Cepa 21J 0,85 3 0,44 A

Cepa 153J 1,01 4 0,38 A

Cepa 17J 1,02 5 0,34 A

Cepa 1J 1,05 5 0,34 A

Cepa 54J 1,06 5 0,34 A

Cepa 148J 1,15 4 0,38 A B

Cepa 119J 1,21 4 0,38 A B

Cepa 27J 1,35 5 0,34 A B

CIAT 899 1,38 5 0,34 A B

Cepa 88J 1,49 5 0,34 A B

Cepa 14J 1,59 5 0,34 A B

Cepa 159J 1,61 5 0,34 A B

Cepa 30J 1,68 5 0,34 A B

Cepa 150J 1,87 5 0,34 A B

N(+) 1,88 4 0,38 A B

Cepa 32J 1,90 5 0,34 A B

Cepa 83J 1,95 5 0,34 A B

Cepa 37J 2,99 4 0,38 B

Cepa 151J 3,01 5 0,34 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso seco de raíz

Variable N R² R² Aj CV**

Peso seco de raíz 96 0,49 0,35 46,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor

Modelo 0,23 20 0,01 3,61 <0,0001

Tratamiento 0,23 20 0,01 3,61 <0,0001

Error 0,24 75 3,2E-03

Total 0,47 95

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14059

Error: 0,0032 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

Cepa 21J 0,03 3 0,03 A

N(-) 0,05 5 0,03 A B

Cepa 17J 0,06 5 0,03 A B

Cepa 35J 0,06 3 0,03 A B

Cepa 54J 0,07 5 0,03 A B

Cepa 88J 0,08 5 0,03 A B C

Cepa 153J 0,09 4 0,03 A B C

Cepa 148J 0,10 4 0,03 A B C

Continuación...

Cepa 14J	0,10	5	0,03	A	B	C
Cepa 119J	0,10	4	0,03	A	B	C
Cepa 159J	0,12	5	0,03	A	B	C
CIAT 899	0,13	5	0,03	A	B	C
N(+)	0,14	4	0,03	A	B	C
Cepa 1J	0,14	5	0,03	A	B	C
Cepa 27J	0,15	5	0,03	A	B	C
Cepa 83J	0,15	5	0,03	A	B	C
Cepa 30J	0,16	5	0,03	A	B	C
Cepa 150J	0,18	5	0,03	B	C	
Cepa 37J	0,19	4	0,03	B	C	
Cepa 32J	0,19	5	0,03	B	C	
Cepa 151J	0,22	5	0,03	C		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Long. Raíz

Variable N R² R² Aj CV
Long. Raíz 96 0,42 0,26 19,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	631,40	20	31,57	2,68	0,0011
Tratamiento	631,40	20	31,57	2,68	0,0011
Error	885,06	75	11,80		
Total	1516,46	95			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,52121

Error: 11,8008 gl: 75

Tratamiento Medias n E.E.

N(-)	11,06	5	1,54	A	
Cepa 35J	13,10	3	1,98	A	B
N(+)	13,75	4	1,72	A	B
CIAT 899	15,84	5	1,54	A	B
Cepa 37J	15,88	4	1,72	A	B
Cepa 21J	16,07	3	1,98	A	B
Cepa 151J	16,70	5	1,54	A	B
Cepa 88J	16,86	5	1,54	A	B
Cepa 17J	16,94	5	1,54	A	B
Cepa 148J	17,60	4	1,72	A	B
Cepa 150J	17,86	5	1,54	A	B
Cepa 54J	18,14	5	1,54	A	B
Cepa 159J	18,48	5	1,54	A	B
Cepa 27J	18,88	5	1,54	A	B
Cepa 153J	18,90	4	1,72	A	B
Cepa 119J	18,90	4	1,72	A	B
Cepa 83J	19,82	5	1,54	B	
Cepa 32J	20,38	5	1,54	B	
Cepa 1J	20,46	5	1,54	B	
Cepa 30J	20,90	5	1,54	B	
Cepa 14J	21,30	5	1,54	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 20. Estadísticos descriptivos del análisis de la Varianza del experimento de autenticación de *Bradyrhizobium* en semillas de frejol caupí.

% Germinación

Variable N R² R² Aj CV
%Germ 111 0,81 0,77 9,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26534,22	23	1153,66	16,58	<0,0001
Cepas	26534,22	23	1153,66	16,58	<0,0001
Error	6055,20	87	69,60		
Total	32589,42	110			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=20,92625

Error: 69,6000 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

146J	35,00	5	3,73	A
106J	59,00	5	3,73	B
134J	78,60	5	3,73	B C
136J	79,00	5	3,73	B C
142J	80,00	5	3,73	C D
143J	89,00	5	3,73	C D
N(+)	90,00	4	4,17	C D
139J	90,00	5	3,73	C D
132J	90,00	5	3,73	C D
108J	90,00	5	3,73	C D
102J	90,00	3	4,82	C D
127J	90,00	3	4,82	C D
96J	95,00	5	3,73	C D
98J	96,00	5	3,73	C D
97J	100,00	5	3,73	D
N(-)	100,00	4	4,17	D
LMTR28	100,00	4	4,17	D
99J	100,00	5	3,73	D
118J	100,00	5	3,73	D
124J	100,00	5	3,73	D
125J	100,00	5	3,73	D
91J	100,00	5	3,73	D
90J	100,00	5	3,73	D
117J	100,00	3	4,82	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

No. Trifolios

Variable N R² R² Aj CV**
No. Trifolios 111 0,64 0,55 25,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	78,94	23	3,43	6,79	<0,0001
Cepas	78,94	23	3,43	6,79	<0,0001
Error	43,96	87	0,51		
Total	122,90	110			

Continuación...

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,78298

Error: 0,5053 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

102J	1,33	3 0,41	A
N(-)	1,50	4 0,36	A B
117J	1,67	3 0,41	A B C
90J	1,80	5 0,32	A B C D
118J	1,80	5 0,32	A B C D
LMTR28	2,00	4 0,36	A B C D
134J	2,00	5 0,32	A B C D
125J	2,00	5 0,32	A B C D
139J	2,20	5 0,32	A B C D
136J	2,40	5 0,32	A B C D
124J	2,40	5 0,32	A B C D
127J	2,67	3 0,41	A B C D E
N(+)	2,75	4 0,36	A B C D E
132J	3,00	5 0,32	A B C D E
108J	3,00	5 0,32	A B C D E
143J	3,00	5 0,32	A B C D E
91J	3,20	5 0,32	B C D E F
142 J	3,20	5 0,32	B C D E F
98J	3,40	5 0,32	C D E F
96J	3,40	5 0,32	C D E F
97J	3,40	5 0,32	C D E F
146J	3,48	5 0,32	D E F
99J	4,20	5 0,32	E F
106J	4,80	5 0,32	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

No. Nódulos

Variable N R² Aj CV**

No. Nódulos 111 0,67 0,59 63,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor

Modelo 33007,48 23 1435,11 7,78 <0,0001

Cepas 33007,48 23 1435,11 7,78 <0,0001

Error 16058,08 87 184,58

Total 49065,57 110

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=34,07799

Error: 184,5757 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

N(+)	0,00	4 6,79	A
N(-)	0,00	4 6,79	A
90J	0,00	5 6,08	A
117J	1,00	3 7,84	A B
102J	1,67	3 7,84	A B C
127J	4,67	3 7,84	A B C
134J	5,80	5 6,08	A B C
125J	8,60	5 6,08	A B C D
136J	11,80	5 6,08	A B C D E
143J	12,00	5 6,08	A B C D E
106J	12,80	5 6,08	A B C D E
142 J	13,40	5 6,08	A B C D E
124J	15,80	5 6,08	A B C D E
108J	20,20	5 6,08	A B C D E
96J	24,00	5 6,08	A B C D E F
97J	25,80	5 6,08	A B C D E F

Continuación...

139J	28,80	5 6,08	A B C D E F G
99J	32,20	5 6,08	A B C D E F G
98J	34,40	5 6,08	B C D E F G
91J	35,40	5 6,08	C D E F G
118J	41,20	5 6,08	D E F G
132J	43,40	5 6,08	E F G
LMTR28	57,75	4 6,79	F G
146J	60,20	5 6,08	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alt. tallo

Variable N R² Aj CV
Alt. tallo 111 0,90 0,87 17,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1144,57	23	49,76	34,10	<0,0001
Cepas	1144,57	23	49,76	34,10	<0,0001
Error	126,97	87	1,46		
Total	1271,54	110			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,03026

Error: 1,4594 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

136J	3,96	5 0,54	A
134J	4,10	5 0,54	A
125J	4,42	5 0,54	A
124J	4,52	5 0,54	A
108J	4,70	5 0,54	A
132J	5,00	5 0,54	A
96J	5,14	5 0,54	A
142 J	5,14	5 0,54	A
139J	5,18	5 0,54	A
97J	5,30	5 0,54	A
98J	5,32	5 0,54	A
91J	5,48	5 0,54	A
106J	5,50	5 0,54	A
102J	5,50	3 0,70	A
143J	5,54	5 0,54	A
146J	5,80	5 0,54	A
99J	5,94	5 0,54	A
90J	10,78	5 0,54	B
N(-)	10,80	4 0,60	B C
117J	11,60	3 0,70	B C
N(+)	12,50	4 0,60	B C
LMTR28	13,05	4 0,60	B C
127J	13,37	3 0,70	B C
118J	13,82	5 0,54	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso Fresco Parte aèrea

Variable N R² Aj CV**
PFPaerea 111 0,53 0,41 32,33

Continuación...

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	40,67	23	1,77	4,34	<0,0001
Cepas	40,67	23	1,77	4,34	<0,0001
Error	35,43	87	0,41		
Total	76,09	110			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,60064

Error: 0,4072 gl: 87

Cepas	Medias	n	E.E.	
102J	0,51	3	0,37	A
134J	0,88	5	0,29	A B
125J	1,15	5	0,29	A B
124J	1,24	5	0,29	A B C
N(-)	1,38	4	0,32	A B C
139J	1,77	5	0,29	A B C D
98J	1,78	5	0,29	A B C D
142 J	1,81	5	0,29	A B C D
136J	1,83	5	0,29	A B C D
90J	1,85	5	0,29	A B C D
LMTR28	1,86	4	0,32	A B C D
91J	1,92	5	0,29	A B C D
96J	1,96	5	0,29	A B C D
132J	2,05	5	0,29	A B C D
108J	2,12	5	0,29	B C D
117J	2,15	3	0,37	B C D
118J	2,20	5	0,29	B C D
99J	2,31	5	0,29	B C D
127J	2,35	3	0,37	B C D
97J	2,36	5	0,29	B C D
143J	2,43	5	0,29	B C D
N(+)	2,83	4	0,32	C D
146J	3,06	5	0,29	D
106J	3,24	5	0,29	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso Seco Parte aérea

Variable	N	R ²	Aj	CV**
PSP aérea	111	0,64	0,54	32,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,67	23	0,12	6,64	<0,0001
Cepas	2,67	23	0,12	6,64	<0,0001
Error	1,52	87	0,02		
Total	4,18	110			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,33141

Error: 0,0175 gl: 87

Cepas	Medias	n	E.E.	
102J	0,06	3	0,08	A
134J	0,16	5	0,06	A B
N(-)	0,21	4	0,07	A B C
125J	0,23	5	0,06	A B C D
90J	0,24	5	0,06	A B C D
LMTR28	0,30	4	0,07	A B C D E
124J	0,33	5	0,06	A B C D E
N(+)	0,34	4	0,07	A B C D E
127J	0,34	3	0,08	A B C D E
117J	0,35	3	0,08	A B C D E

Continuación...

118J	0,35	5 0,06	A B C D E
136J	0,36	5 0,06	A B C D E
142 J	0,39	5 0,06	A B C D E F
139J	0,41	5 0,06	B C D E F G
98J	0,42	5 0,06	B C D E F G
132J	0,45	5 0,06	B C D E F G
108J	0,47	5 0,06	B C D E F G
96J	0,48	5 0,06	B C D E F G
91J	0,52	5 0,06	C D E F G
99J	0,53	5 0,06	C D E F G
143J	0,54	5 0,06	D E F G
97J	0,59	5 0,06	E F G
146J	0,70	5 0,06	F G
106J	0,73	5 0,06	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Peso Fresco raíz

Variable N R² Aj CV**

PF raíz 111 0,69 0,61 27,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor

Modelo 41,28 23 1,79 8,56 <0,0001

Cepas 41,28 23 1,79 8,56 <0,0001

Error 18,25 87 0,21

Total 59,53 110

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,14877

Error: 0,2097 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

102J	0,43	3 0,26	A
124J	0,50	5 0,20	A
134J	0,55	5 0,20	A
N(-)	0,74	4 0,23	A B
125J	0,80	5 0,20	A B C
139J	1,22	5 0,20	A B C D
142J	1,38	5 0,20	A B C D E
N(+)	1,43	4 0,23	A B C D E
136J	1,49	5 0,20	A B C D E
LMTR28	1,58	4 0,23	A B C D E
132J	1,74	5 0,20	B C D E
90J	1,78	5 0,20	B C D E
118J	1,85	5 0,20	B C D E
91J	1,91	5 0,20	C D E
98J	1,95	5 0,20	C D E
108J	2,02	5 0,20	D E
143J	2,08	5 0,20	D E
97J	2,21	5 0,20	D E
96J	2,22	5 0,20	D E
106J	2,26	5 0,20	D E
99J	2,28	5 0,20	D E
117J	2,32	3 0,26	D E
146J	2,38	5 0,20	E
127J	2,42	3 0,26	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Continuación...

Peso Seco raíz

Variable N R² Aj CV**
PS raíz 111 0,65 0,56 26,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor
Modelo 0,42 23 0,02 6,98 <0,0001
Cepas 0,42 23 0,02 6,98 <0,0001
Error 0,23 87 2,6E-03
Total 0,64 110

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12778

Error: 0,0026 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

134J 0,07 5 0,02 A
102J 0,07 3 0,03 A
N(-) 0,09 4 0,03 A B
125J 0,11 5 0,02 A B
N(+) 0,14 4 0,03 A B C
136J 0,14 5 0,02 A B C
117J 0,15 3 0,03 A B C D
90J 0,16 5 0,02 A B C D
127J 0,17 3 0,03 A B C D
142J 0,17 5 0,02 A B C D
118J 0,17 5 0,02 A B C D
124J 0,19 5 0,02 A B C D E
132J 0,19 5 0,02 A B C D E
139J 0,19 5 0,02 A B C D E
LMTR28 0,20 4 0,03 A B C D E
98J 0,20 5 0,02 A B C D E
96J 0,22 5 0,02 B C D E
143J 0,24 5 0,02 C D E
97J 0,25 5 0,02 C D E
91J 0,25 5 0,02 C D E
106J 0,26 5 0,02 C D E
108J 0,26 5 0,02 C D E
99J 0,27 5 0,02 D E
146J 0,30 5 0,02 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Long. Raíz

Variable N R² Aj CV
Long. Raíz 111 0,51 0,38 12,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor
Modelo 334,95 23 14,56 3,93 <0,0001
Cepas 334,95 23 14,56 3,93 <0,0001
Error 322,35 87 3,71
Total 657,30 110

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,82827

Error: 3,7052 gl: 87

Cepas Medias n E.E.

N(-) 12,55 4 0,96 A
124J 12,66 5 0,86 A B
136J 12,94 5 0,86 A B C
102J 13,30 3 1,11 A B C
N(+) 13,73 4 0,96 A B C D

Continuación...

134J	13,86	5 0,86	A B C D
146J	13,98	5 0,86	A B C D
125J	14,20	5 0,86	A B C D
143J	14,38	5 0,86	A B C D
139J	14,64	5 0,86	A B C D
132J	14,74	5 0,86	A B C D
106J	14,86	5 0,86	A B C D
118J	14,92	5 0,86	A B C D
142 J	14,96	5 0,86	A B C D
LMTR28	15,55	4 0,96	A B C D
98J	16,06	5 0,86	A B C D
97J	16,48	5 0,86	A B C D
99J	16,58	5 0,86	A B C D
96J	16,98	5 0,86	A B C D
91J	17,42	5 0,86	B C D
90J	17,66	5 0,86	C D
127J	18,30	3 1,11	D
117J	18,30	3 1,11	D
<u>108J</u>	<u>18,40</u>	<u>5 0,86</u>	<u>D</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CV** (> 20% quizás por no encontrar semillas certificadas)

Anexo 21. Reportes de la estación meteorológica del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú.

Reporte 1X: Estación meteorológica grande y completa, mide Temperatura, Humedad, Precipitaciones, Radiación y Viento.

Date	Time	Temp Out	Hi Temp	Low Temp	Out Hum	Wind Speed	Wind Dir	Rain	Solar Rad.	UV Index
01/01/2019	0:00	20.3	20.3	20	85	0	---	0	0	0
01/01/2019	1:00	20.4	20.4	20.3	85	0	---	0	0	0
01/01/2019	2:00	20.4	20.5	20.4	85	0	SW	0	0	0
01/01/2019	3:00	20.3	20.5	20.2	86	0	SW	0	0	0
01/01/2019	4:00	20.2	20.3	20.2	85	0	WSW	0	0	0
01/01/2019	5:00	20.1	20.2	20.1	86	0	SSW	0	0	0
01/01/2019	6:00	19.9	20.1	19.8	87	0	SW	0	0	0
01/01/2019	7:00	20	20	19.9	87	0	SSW	0	13	0
01/01/2019	8:00	20.4	20.6	20	84	0	S	0	52	0
01/01/2019	9:00	20.8	20.9	20.4	83	0	SSW	0	115	0.5
01/01/2019	10:00	21.3	21.3	20.8	81	0	SW	0	171	1
01/01/2019	11:00	22.1	22.1	21.3	79	0	SW	0	284	1.7
01/01/2019	12:00	23.1	23.3	22.1	75	0	SW	0	433	2.8
01/01/2019	13:00	23.7	23.8	23	73	0	WSW	0	556	3.9
01/01/2019	14:00	24.1	24.4	23.3	73	0.4	WSW	0	783	4.3
01/01/2019	15:00	23.8	24.3	23.7	75	0.9	SW	0	678	3.4
01/01/2019	16:00	23.8	24.1	23.4	74	0.4	WSW	0	532	2.2
01/01/2019	17:00	22.6	23.8	22.6	78	0	SW	0	310	1
01/01/2019	18:00	21.7	22.6	21.7	79	0	SW	0	73	0.1
01/01/2019	19:00	21.8	22	21.7	78	0	ESE	0	5	0
01/01/2019	20:00	21.6	21.9	21.6	78	0	E	0	0	0
01/01/2019	21:00	20.8	21.6	20.8	82	0	SSW	0	0	0
01/01/2019	22:00	20.9	20.9	20.7	82	0	---	0	0	0
01/01/2019	23:00	21.2	21.2	20.9	81	0	E	0	0	0
01/02/2019	0:00	20.2	21.2	20.2	84	0	---	0	0	0
01/02/2019	1:00	20.1	20.2	20.1	85	0	---	0	0	0
01/02/2019	2:00	20.4	20.4	20.1	83	0	---	0	0	0
01/02/2019	3:00	20.6	20.6	20.4	82	0	---	0	0	0
01/02/2019	4:00	20.7	20.7	20.6	82	0	---	0	0	0
01/02/2019	5:00	20.7	20.7	20.7	82	0	---	0	0	0
01/02/2019	6:00	20.7	20.7	20.6	80	0	---	0	0	0
01/02/2019	7:00	20.6	20.8	20.6	84	0	---	0	10	0
01/02/2019	8:00	21.5	21.5	20.6	78	0	---	0	67	0
01/02/2019	9:00	22.1	22.2	21.5	77	0	---	0	136	0.6
01/02/2019	10:00	23.2	23.2	22.1	74	0	SSW	0	285	1.5
01/02/2019	11:00	23.9	24.2	23.2	70	0.4	SW	0	729	3.8
01/02/2019	12:00	24.6	24.7	23.8	67	0.4	SW	0	798	4.7
01/02/2019	13:00	25.6	25.6	24.3	64	0.4	SW	0	821	4.8
01/02/2019	14:00	24.7	25.6	24.7	67	0.9	WSW	0	773	4.2
01/02/2019	15:00	25.1	25.3	24.6	66	0.9	SW	0	662	3.2
01/02/2019	16:00	24.2	25.1	24.2	71	0.9	SW	0	503	2
01/02/2019	17:00	23.7	24.2	23.6	74	0.4	WSW	0	326	1
01/02/2019	18:00	22.8	23.7	22.8	77	0	WSW	0	137	0.1
01/02/2019	19:00	21.8	22.8	21.8	81	0	SW	0	12	0

Continuación...

01/02/2019	20:00	21.7	21.8	21.6	81	0	---	0	0	0
01/02/2019	21:00	21.8	21.8	21.6	80	0	E	0	0	0
01/02/2019	22:00	20.7	21.8	20.7	85	0	SW	0	0	0
01/02/2019	23:00	20.3	20.7	20.3	87	0	SW	0	0	0
01/03/2019	0:00	20.2	20.3	20.2	87	0	SSE	0	0	0
01/03/2019	1:00	20.4	20.4	20.2	86	0	---	0	0	0
01/03/2019	2:00	20.3	20.4	20.3	86	0	---	0	0	0
01/03/2019	3:00	20.2	20.4	20.1	86	0	---	0	0	0
01/03/2019	4:00	20.2	20.2	20.1	86	0	SSW	0	0	0
01/03/2019	5:00	20	20.2	20	86	0	---	0	0	0
01/03/2019	6:00	20.3	20.3	20	85	0	---	0	0	0
01/03/2019	7:00	20.3	20.3	20.2	83	0	WSW	0	7	0
01/03/2019	8:00	20.2	20.3	20.2	84	0	---	0	38	0
01/03/2019	9:00	20.7	20.7	20.2	83	0	---	0	58	0
01/03/2019	10:00	21.1	21.1	20.7	80	0	SSW	0	79	0.3
01/03/2019	11:00	21.7	21.8	21.1	76	0	SSW	0	130	0.8
01/03/2019	12:00	22.4	22.4	21.7	74	0	SSW	0	153	1
01/03/2019	13:00	23.1	23.1	22.4	71	0	WSW	0	236	1.6
01/03/2019	14:00	24.4	24.4	23.1	63	0	WSW	0	426	2.7
01/03/2019	15:00	24.3	25.1	24.2	67	0	SW	0	456	2.6
01/03/2019	16:00	23.9	24.4	23.8	69	0	SW	0	428	1.9
01/03/2019	17:00	23.1	24.1	23.1	73	0	WSW	0	279	0.9
01/03/2019	18:00	22.2	23.1	22.2	75	0	WSW	0	58	0
01/03/2019	19:00	21.8	22.2	21.8	75	0	WSW	0	8	0
01/03/2019	20:00	21.6	21.8	21.6	79	0	SW	0	0	0
01/03/2019	21:00	21.6	21.6	21.6	80	0	SW	0	0	0
01/03/2019	22:00	21.8	21.9	21.6	75	0	---	0	0	0
01/03/2019	23:00	21.9	21.9	21.8	73	0	---	0	0	0
01/04/2019	0:00	21.4	22	21.4	79	0	SW	0	0	0
01/04/2019	1:00	21.2	21.4	21.1	82	0	NW	0	0	0
01/04/2019	2:00	20.9	21.2	20.9	84	0	---	0	0	0
01/04/2019	3:00	20.4	20.9	20.4	87	0	---	0	0	0
01/04/2019	4:00	20.2	20.4	20.2	88	0	---	0	0	0
01/04/2019	5:00	19.8	20.2	19.8	89	0	---	0	0	0
01/04/2019	6:00	19.9	19.9	19.8	89	0	---	0	0	0
01/04/2019	7:00	20.4	20.4	19.8	89	0	---	0	43	0
01/04/2019	8:00	22.8	22.8	20.4	76	0	---	0	187	0.5
01/04/2019	9:00	23.9	24	22.8	72	0	SSW	0	381	1.4
01/04/2019	10:00	25	25.2	23.8	69	0	WSW	0	524	2.3
01/04/2019	11:00	25.8	25.8	24.9	65	0	SW	0	697	3.5
01/04/2019	12:00	25.8	25.9	25.4	64	0	SW	0	770	4.2
01/04/2019	13:00	25.9	26.3	25.8	65	0	SW	0	788	4.4
01/04/2019	14:00	25.2	26.1	25.2	65	0.4	SW	0	729	3.8
01/04/2019	15:00	25.4	25.9	25.2	67	0.4	WSW	0	614	2.9
01/04/2019	16:00	24.7	25.4	24.7	69	0.4	WSW	0	478	1.8
01/04/2019	17:00	23.4	24.7	23.4	74	0.4	SW	0	233	0.8
01/04/2019	18:00	23.1	23.4	23.1	76	0	WSW	0	132	0
01/04/2019	19:00	22.1	23.1	22.1	80	0	SW	0	28	0
01/04/2019	20:00	21.7	22.1	21.7	81	0	SW	0	0	0
01/04/2019	21:00	21.7	21.7	21.7	82	0	---	0	0	0
01/04/2019	22:00	21.4	21.7	21.4	83	0	---	0	0	0
01/04/2019	23:00	21.6	21.6	21.4	83	0	---	0	0	0
01/05/2019	0:00	21.4	21.6	21.3	84	0	---	0	0	0
01/05/2019	1:00	21.2	21.3	21.2	84	0	---	0	0	0
01/05/2019	2:00	20.7	21.2	20.7	87	0	---	0	0	0
01/05/2019	3:00	20.6	20.7	20.4	88	0	---	0	0	0

Continuación...

01/05/2019	4:00	20.6	20.7	20.6	87	0	---	0	0	0
01/05/2019	5:00	20.6	20.7	20.6	87	0	---	0	0	0
01/05/2019	6:00	20.7	20.7	20.6	87	0	---	0	0	0
01/05/2019	7:00	20.9	20.9	20.7	86	0	---	0	21	0
01/05/2019	8:00	21.4	21.4	20.9	84	0	---	0	75	0.1
01/05/2019	9:00	22.2	22.2	21.4	82	0	SW	0	195	1.1
01/05/2019	10:00	24.2	24.2	22.2	76	0	WSW	0	542	2.6
01/05/2019	11:00	25.6	25.6	24.2	70	0	SW	0	688	3.6
01/05/2019	12:00	25.8	26.3	25.6	68	0.9	SW	0	762	4.2
01/05/2019	13:00	26.2	26.7	25.8	65	0.4	SW	0	781	4.3
01/05/2019	14:00	25.8	26.2	25.6	65	0.9	WSW	0	746	3.8
01/05/2019	15:00	26.3	26.3	25.6	63	0.9	WSW	0	657	3
01/05/2019	16:00	25	26.3	25	67	0.9	WSW	0	479	1.8
01/05/2019	17:00	24.3	25	24.3	70	0.4	WSW	0	281	0.9
01/05/2019	18:00	23.3	24.4	23.3	75	0	WSW	0	129	0.1
01/05/2019	19:00	22.6	23.3	22.5	78	0	WSW	0	17	0
01/05/2019	20:00	21.8	22.6	21.8	81	0	WSW	0	0	0
01/05/2019	21:00	21.7	21.8	21.6	82	0	WSW	0	0	0
01/05/2019	22:00	21.7	21.8	21.6	81	0	---	0	0	0
01/05/2019	23:00	21.3	21.7	21.3	82	0	---	0	0	0
01/06/2019	0:00	21	21.4	21	84	0	---	0	0	0
01/06/2019	1:00	20.6	21	20.6	85	0	W	0	0	0
01/06/2019	2:00	20.6	20.7	20.6	86	0	WSW	0	0	0
01/06/2019	3:00	20.6	20.8	20.6	85	0	SW	0	0	0
01/06/2019	4:00	20.7	20.7	20.5	84	0	WSW	0	0	0
01/06/2019	5:00	20.4	20.7	20.4	85	0	SSW	0	0	0
01/06/2019	6:00	20.4	20.5	20.4	84	0	SSE	0	0	0
01/06/2019	7:00	20.9	20.9	20.3	84	0	SE	0	13	0
01/06/2019	8:00	21.6	21.7	20.9	81	0	---	0	59	0
01/06/2019	9:00	22	22.1	21.6	78	0	SW	0	90	0.1
01/06/2019	10:00	22.2	22.2	21.9	78	0	WSW	0	108	0.6
01/06/2019	11:00	22.6	22.7	22.2	76	0	SW	0	159	1
01/06/2019	12:00	22.3	22.6	22.3	76	0	WSW	0	113	0.8
01/06/2019	13:00	22.8	22.8	22.3	74	0	S	0	132	0.9
01/06/2019	14:00	22.8	22.9	22.7	74	0	SW	0	119	0.8
01/06/2019	15:00	23.4	23.4	22.4	73	0	SW	0	173	1
01/06/2019	16:00	23.4	23.7	23.2	71	0	SSW	0	166	0.8
01/06/2019	17:00	24.5	24.5	23.4	68	0	WSW	0	200	0.6
01/06/2019	18:00	23.9	25.1	23.9	68	0	WSW	0	120	0
01/06/2019	19:00	22.1	23.9	22.1	75	0	SW	0	17	0
01/06/2019	20:00	21.8	22.1	21.7	76	0	WSW	0	0	0
01/06/2019	21:00	21.9	21.9	21.7	75	0	---	0	0	0
01/06/2019	22:00	21.8	21.9	21.7	75	0	---	0	0	0