



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**CARACTERÍSTICAS CULTURALES, RECUECONTOS  
BACTERIANOS Y EFECTO DE *Rhizobium* sp EN LA  
GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE  
PLÁNTULAS DE TRES LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN LA  
REGIÓN PUNO EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. WILLIAM ELBIS HILASACA YUJRA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2023**



## Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**CARACTERÍSTICAS CULTURALES, RECUENTOS BACTERIANOS Y EFECTO DE *Rhizobium* sp EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TRES LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN LA REGIÓN PUNO EN CONDICIONES DE L**

AUTOR

**WILLIAM ELBIS HILASACA YUJRA**

RECuento de palabras

**18322 Words**

RECuento de caracteres

**98535 Characters**

RECuento de páginas

**86 Pages**

Tamaño del archivo

**5.9MB**

Fecha de entrega

**Jul 5, 2023 8:19 AM GMT-5**

Fecha del informe

**Jul 5, 2023 8:21 AM GMT-5**

### ● 19% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 18% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 11% Base de datos de trabajos entregados
- 6% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)





## DEDICATORIA

- *Este trabajo está dedicado a mi familia en especial a mis padres y hermanas.*
- *A mi novia, quien ha estado a mi lado todo este tiempo en que he trabajado en esta tesis.*
- *A mis amigos, quienes me han apoyado y a todos los docentes que me brindaron su apoyo; a todos ellos dedico este trabajo con cariño y muchos agradecimientos.*

***William Elbis Hilasaca Yujra***



## AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Nacional del Altiplano por brindarme la formación académica que me hizo un profesional competente, con valores y principios, con sólida formación académica y profesional.*
- *A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, por sus sabias enseñanzas en mi formación.*
- *A los señores miembros del jurado evaluador, por brindarme su tiempo, conocimientos y guía para el desarrollo de la presente investigación.*
- *A mi Director/Asesor por su apoyo en la concretización de la presente investigación.*
- *A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional.*

***William Elbis Hilasaca Yujra***



## ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN ..... 12**

**ABSTRACT..... 13**

### **CAPÍTULO I**

#### **INTRODUCCIÓN**

**1.1 OBJETIVO GENERAL ..... 15**

**1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 15**

### **CAPÍTULO II**

#### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1 ANTECEDENTES ..... 16**

**2.2 MARCO TEÓRICO ..... 18**

2.2.1 Las fabáceas (Familia Fabaceae)..... 18

2.2.2 Alfalfa (*Medicago sativa* L.) ..... 18

2.2.3 Arveja (*Pisum sativum*) ..... 21

2.2.4 Habas (*Vicia faba*) ..... 23

2.2.5 Tarwi o chocho (*Lupinus mutabilis*)..... 25

2.2.6 Fijación biológica del nitrógeno ..... 28

2.2.7 Fijación simbiótica de nitrógeno en fabáceas..... 31

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1 ZONA DE ESTUDIO..... 33**

**3.2 TIPO DE ESTUDIO ..... 33**

**3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA..... 34**

**3.4 METODOLOGÍA ..... 34**



3.4.1 Caracterización del crecimiento morfológico diferencial y recuentos de <i>Rhizobium</i> sp a partir de nódulos de alfalfa.....	35
3.4.2 Determinación del efecto de las concentraciones $1.5 \times 10^8$ , $15 \times 10^8$ y $30 \times 10^8$ UFC/mL de <i>Rhizobium</i> sp en la germinación de semillas y el crecimiento vegetal de fabáceas .....	39

#### CAPÍTULO IV

##### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO MORFOLÓGICO DIFERENCIAL Y RECuentOS DE <i>Rhizobium</i> sp A PARTIR DE NÓDULOS DE ALFALFA.....	44
4.2 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE <i>Rhizobium</i> sp SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS, EL PESO TOTAL DE LAS PLÁNTULAS, LA LONGITUD DE LAS RAÍCES Y TALLOS DE LAS FABÁCEAS .....	50
V. CONCLUSIONES .....	69
VI. RECOMENDACIONES .....	70
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	82

**Área:** Ciencias Biomédicas.

**Sub línea de investigación:** Diagnóstico y Epidemiología.

**Fecha de sustentación:** 10 de julio del 2023



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Raíces de alfalfa mostrando los nódulos, colectadas en el distrito de Taraco. .....	35
<b>Figura 2.</b> Nódulos aislados de raíces de alfalfa colectadas de las localidades de Jasa Pacsellim, Sacasco y Ramis. ....	36
<b>Figura 3.</b> Desinfección de nódulos radiculares de alfalfa.....	37
<b>Figura 4.</b> Medios de cultivo para el aislamiento de <i>Rhizobium</i> sp, LMA – RC y LMA – ABT.....	37
<b>Figura 5.</b> Frotices de <i>Rhizobium</i> sp.....	38
<b>Figura 6.</b> Recuento de colonias de <i>Rhizobium</i> sp en placa. ....	38
<b>Figura 7.</b> Preparación de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp. ....	39
<b>Figura 8.</b> Desinfección de semillas de fabáceas. ....	40
<b>Figura 9.</b> Germinación de semillas de fabáceas.....	41
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de raíces y tallos inoculados con <i>Rhizobium</i> sp.....	42
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de colonias de <i>Rhizobium</i> sp en LMA – RC y LMA – ABT...	45
<b>Figura 12.</b> Coloración Gram de <i>Rhizobium</i> sp observada en el microscopio óptico compuesto a 1000X.....	45
<b>Figura 13.</b> Prueba de Tukey para los recuentos de <i>Rhizobium</i> sp (UFC/g) en nódulos de alfalfa, procedentes del distrito de Taraco.....	46
<b>Figura 14.</b> Prueba de Tukey de la germinación de semillas (%) de tres fabáceas. ....	53
<b>Figura 15.</b> Prueba de Tukey de la germinación de semillas (%) inoculadas con tres concentraciones bacterianas. ....	53
<b>Figura 16.</b> Prueba de Tukey de los pesos totales de las plántulas de fabáceas inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. ....	56
<b>Figura 17.</b> Prueba de Tukey de los pesos totales de las plántulas de fabáceas según las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp.....	56
<b>Figura 18.</b> Prueba de Tukey de las longitudes de las raíces de las plántulas inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. ....	61
<b>Figura 19.</b> Prueba de Tukey de las longitudes de las raíces de las plántulas inoculadas con tres concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp. ....	62
<b>Figura 20.</b> Prueba de Tukey de las longitudes de los tallos de las plántulas inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. ....	65



<b>Figura 21.</b> Prueba de Tukey de las longitudes de tallos de las plántulas inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. ....	66
<b>Figura 22.</b> Zona de muestreo de nódulos, comunidad de Sacasco. ....	84
<b>Figura 23.</b> Zona de muestreo de nódulos, zona Ramis. ....	85
<b>Figura 24.</b> Toma de muestra y almacenamiento de nódulos. ....	85



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Plantas hospedadoras de <i>Rhizobium</i> . .....	30
<b>Tabla 2.</b> Características morfológicas diferenciales de las colonias de <i>Rhizobium</i> sp sobre medios de cultivos LMA – RC y LMA – ABT. ....	44
<b>Tabla 3.</b> Recuentos de <i>Rhizobium</i> sp (UFC/g) en muestras de suelo de las localidades de Jasa Pacsellin, Sacasco y Ramis. ....	46
<b>Tabla 4.</b> Germinación de semillas de fabáceas inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp.....	51
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp y el tratamiento control en la germinación de semillas de tres fabáceas (datos transformados a Log10). ....	52
<b>Tabla 6.</b> Pesos totales de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculados con bacterias <i>Rhizobium</i> sp.....	55
<b>Tabla 7.</b> Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp y el tratamiento control en el peso total de las plantas fabáceas	56
<b>Tabla 8.</b> Longitud de raíces de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculados con bacterias <i>Rhizobium</i> sp .....	60
<b>Tabla 9.</b> Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de <i>Rhizobium</i> sp y el tratamiento control en las longitudes de las raíces de fabáceas (datos transformados a Log10) .....	61
<b>Tabla 10.</b> Longitudes de tallos de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculadas con bacterias <i>Rhizobium</i> sp .....	64
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de los recuentos de <i>Rhizobium</i> en nódulos procedentes de las localidades de muestreo.....	82
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de la germinación según las plantas inoculadas. ....	82
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de la germinación según la concentración de bacterias inoculadas.....	82
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey del peso total de la plántula según la planta inoculada. ....	83
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de la longitud de la raíz según la planta inoculada. ....	83
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de la longitud de la raíz según la concentración bacteriana inoculada.....	83



<b>Tabla 17.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de los tallos según la planta inoculada.....	84
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza y prueba de Tukey de los tallos según la concentración bacteriana inoculada. ....	84



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%	: porcentaje.
°C	: grados centígrados.
ABT	: azul de bromo timol.
ANVA	: análisis de varianza.
CIAT	: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
cm	: centímetros.
g/L	: gramos por litro.
Km <sup>2</sup>	: kilómetros cuadrados.
LMA	: Agar levadura manitol.
n	: tamaño de muestra.
RC	: rojo Congo.
sp	: especie.
UFC/g	: unidades formadoras de colonias por gramo.
UFC/mL	: unidades formadoras de colonias por mililitro.
UTM	: Universal Transverse Mercator.



## RESUMEN

La carencia de nitrógeno en suelos de la región Puno, y el uso de agroquímicos trae consigo la pérdida de fertilidad, la acidificación, la salinización y la toxicidad vegetal. *Rhizobium* sp se constituye en una alternativa ecológica para incrementar la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de fabáceas debido a la fijación biológica de nitrógeno. Los objetivos fueron: caracterizar el crecimiento morfológico diferencial de *Rhizobium* sp a partir de nódulos de alfalfa cultivadas en las localidades de Jasa Pacsellim, Sacasco y Ramis del distrito de Taraco, región de Puno y determinar el efecto de tres concentraciones de *Rhizobium* sp en la germinación de semillas, el peso total de la planta, la longitud total de las raíces y tallos de arveja, habas y tarwi cultivadas en laboratorio. La metodología inició con la recolección de los nódulos de alfalfa según el manual del CIAT (1988), de cada nódulo se aislaron y caracterizaron las colonias de *Rhizobium* sp mediante la observación directa, luego se realizó el conteo bacteriano mediante el método de recuento en placa (Zúñiga, 2012) en medio agar levadura manitol (LMA). Las bacterias en concentraciones de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL,  $15 \times 10^8$  UFC/mL y  $30 \times 10^8$  UFC/mL fueron inoculadas en semillas de arvejas, habas y tarwi, según la metodología de Palate (2012). La germinación se evaluó a los 7 días y los pesos y longitudes luego de 45 días. Las características de *Rhizobium* sp fueron colonias rosadas, textura cremosa, apariencia opaca semi translúcida, bordes irregulares y altura plana, presentaron recuentos promedios de  $180 \times 10^2$  UFC/g en Jasa Pacsellin,  $186.67 \times 10^2$  UFC/g en Sacasco y  $231.67 \times 10^2$  UFC/g en Ramis. La concentración de  $15 \times 10^8$  UFC/mL influyó mejor en habas con el mayor porcentaje de germinación de semillas (60%), y en el crecimiento de plántulas en peso total (2.83 g), longitud de raíces (6.63 cm) y tallos (7.37 cm). Se concluye que los suelos del distrito de Taraco, los suelos de Ramis presentaron los mayores recuentos de *Rhizobium* sp con  $231.37 \times 10^2$  UFC/g y la concentración de  $15 \times 10^8$  UFC/mL lograron la mejor influencia en la germinación y crecimiento vegetal de las habas.

**Palabras clave:** Bacterias, cultivo *in vitro*, Fabaceae, Puno, *Rhizobium*, suelos.



## ABSTRACT

The lack of nitrogen in soils in the Puno region, and the use of agrochemicals brings with it the loss of fertility, acidification, salinization and plant toxicity. *Rhizobium* sp constitutes an ecological alternative to increase seed germination and growth of fabaceae seedlings due to biological nitrogen fixation. The objectives were: to characterize the differential morphological growth of *Rhizobium* sp from alfalfa nodules cultivated in the Jasa Pacsellim, Sacasco and Ramis localities of the Taraco district, Puno region and to determine the effect of three concentrations of *Rhizobium* sp on germination. of seeds, the total weight of the plant, the total length of the roots and stems of peas, broad beans and tarwi grown in the laboratory. The methodology began with the collection of alfalfa nodules according to the CIAT manual (1988), *Rhizobium* sp colonies were isolated and characterized from each nodule by direct observation, then the bacterial count was performed using the plate count method. (Zúñiga, 2012) in mannitol yeast agar (LMA) medium. Bacteria in concentrations of  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL,  $15 \times 10^8$  CFU/mL and  $30 \times 10^8$  CFU/mL were inoculated into pea, broad bean and tarwi seeds, according to the Palate (2012) methodology. Germination was evaluated after 7 days and weights and lengths after 45 days. The characteristics of *Rhizobium* sp were pink colonies, creamy texture, semi-translucent opaque appearance, irregular edges and flat height, they presented average counts of  $180 \times 10^2$  CFU/g in Jasa Pacsellin,  $186.67 \times 10^2$  CFU/g in Sacasco and  $231.67 \times 10^2$  CFU /g in Ramis. The concentration of  $15 \times 10^8$  CFU/mL had a better influence on broad beans with the highest percentage of seed germination (60%), and on seedling growth in total weight (2.83 g), root length (6.63 cm) and stems (7.37 cm). It is concluded that the soils of the Taraco district, the Ramis soils presented the highest counts of *Rhizobium* sp with  $231.37 \times 10^2$  CFU/g and the concentration of  $15 \times 10^8$  CFU/mL achieved the best influence on the germination and plant growth of the broad beans.

**Key words:** Bacteria, *in vitro* culture, Fabaceae, Puno, *Rhizobium*, soils.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Las fabáceas (chocho, haba, arvejas y fréjol), poseen un alto contenido de proteínas, energía (grasa) y minerales (Suquilanda, 2017), su incremento en la producción y posterior consumo disminuiría los altos rangos de desnutrición y anemia en nuestra región, su producción en los campos de cultivo de la región Puno, biofertilizarían los suelos incrementando los niveles de nitrógeno debido a que poseen en sus raíces la simbiosis con *Rhizobium* sp.

Son escasos los estudios de cuantificación bacteriana de microorganismos benéficos para el crecimiento vegetal, en la presente investigación se eligió evaluar los recuentos de *Rhizobium* sp de nódulos radiculares de alfalfa (*Medicago sativa*) en tres comunidades del distrito de Taraco, provincia de Huancané, región Puno, el cual presentó una producción mayormente ecológica a base de fertilización con abonos naturales y uso minoritario de agroquímicos.

La caracterización morfológica de las colonias bacterianas fue propia de la bacteria en estudio, sus recuentos bacterianos manifiestan que son suelos no erosionados por agroquímicos ya que tuvieron buenos recuentos de *Rhizobium* sp. La inoculación de tres concentraciones bacterianas a las semillas y posteriormente en el crecimiento de las plántulas de arvejas (*Pisum sativum*), habas (*Vicia faba*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*), con mejores resultados en las habas, trae consigo una alternativa bacteriana aplicable en la región Puno, gracias a sus múltiples beneficios con los productos vegetales de consumo humano y la conservación de los suelos.

Esta tecnología bacteriana, a pesar de los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio como una primera etapa de investigación, requiere de realizar más evaluaciones en condiciones de campo, donde las condiciones no solo ambientales sino



también las edafológicas podrían influir en la persistencia de *Rhizobium* sp en los campos de cultivo, por otra parte, queda pendiente la investigación de las especies bacterianas mediante pruebas moleculares.

En tal sentido, se plantearon los siguientes objetivos de investigación:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar las características culturales, los recuentos bacterianos y el efecto de *Rhizobium* sp sobre tres fabáceas cultivadas en la región Puno en condiciones de laboratorio.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar el crecimiento morfológico diferencial y recuentos de *Rhizobium* sp a partir de nódulos de alfalfa cultivadas en las localidades de Jasa Pacsellim, Sacasco y Ramis del distrito de Taraco, región de Puno.
- Determinar el efecto de las concentraciones  $1.5 \times 10^8$ ,  $15 \times 10^8$  y  $30 \times 10^8$  UFC/mL de *Rhizobium* sp en la germinación de semillas, el peso total de la planta, la longitud total de las raíces y tallos de arveja, habas y tarwi cultivadas en condiciones de laboratorio.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

Ballesteros & Lozano (2001), estudiaron cepas de *Rhizobium* mediante ensayos de invernadero en solución nutritiva, con cinco variedades de fríjol (ICA CITARA, ICA PIJAO, DIACOL CATIO, ANDINO y PVA 916), determinándose en floración el peso seco de la parte aérea, peso seco de nódulos y nitrógeno total en la planta por el método de Microkjeldahl, por otro lado, Arellano *et al.* (2005), evaluaron el efecto de 19 cepas de *Rhizobium* en la germinación y el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), inoculando en las semillas suspensiones densas de *Rhizobium* y dejándolas germinar en arena esterilizada, con pH 7.3 y cuatro repeticiones y Huanca (2001), estableció la infectividad y efectividad de las cepas de los inoculantes BIAGRO (B339) y RHIZOLAM (ID36) en micro parcelas y para determinar el efecto sobre el poder germinativo, se efectuó un recuento de plantas por m<sup>2</sup> en dos momentos, a los 70 y 120 días.

Arellano *et al.* (2005), afirman que las cepas de *Rhizobium* PEVF02 y PEVF08 tuvieron un efecto significativamente positivo en la germinación y en el crecimiento de las plantas de tomate, por lo cual podrían recomendarse como potenciales rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en este cultivo, como alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos, Ballesteros & Lozano (2001), afirman que las cepas de mejor comportamiento en cuanto a nitrógeno fijado fueron CIAT 144, CIAT 899 y CIAT 2, encontrándose correlación altamente significativa entre el rendimiento en peso seco y el nitrógeno fijado para todas las variedades de fríjol y Huanca (2001), afirman que la infectividad presenta diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre las plantas de alfalfa del testigo y las inoculadas con cepas de *Rhizobium* B339 y ID36, donde el



tratamiento que fijó la mayor cantidad de nitrógeno fue el cultivar Trinidad inoculado con el biofertilizante RHIZOLAM.

Cuadrado *et al.* (2009), caracterizaron 52 cepas de rizobios (basados en sus características morfológicas, requerimientos de cultivo, metabólicas, entre otros), según sus propiedades de crecimiento, el 63.5% fueron de cepas de lento crecimiento, mientras que el 36.5%, de rápido crecimiento. De acuerdo con sus patrones de asimilación de carbohidratos, se identificaron a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* como potenciales bioinoculantes, paralelamente Pérez *et al.* (2008), caracterizaron cepas de *Rhizobium* aislando 19 cepas de *Rhizobium* a partir de los nódulos de las fabaceas *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle*, *Pueraria phaseoloides* y *Macroptilium atropurpureum*, dichos aislados pertenecieron a los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*, asimismo, Tang (2004), estudió el efecto de la inoculación con *Rhizobium* sp sobre *Leucaena leucocephala*, mostrando buenos resultados, presentando abundante nodulación, predominante en la raíz principal y de coloración interna roja.

Díaz (2010), afirma que *Phaseolus vulgaris* establece simbiosis con rizobia de crecimiento rápido del género *Rhizobium*, donde las especies *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium etli*, son microsimbiontes típicos de *Phaseolus vulgaris* nodulandolo, la efectividad simbiótica de los aislados fue muy variable, alcanzando el 40 % en el más efectivo, por otro lado, Soriano y González (2012), evaluaron el efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre el crecimiento vegetal de páprika (*Capsicum annuum* L. var. Longum) y lechuga (*Lactuca sativa*) en condiciones de laboratorio y encontraron que la inoculación de *Rhizobium etli* tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de plántulas de páprika y lechuga a los 20 días de evaluación en condiciones de laboratorio.



Acuña *et al.* (2001), inocularon frijol con cepas de *Rhizobium* eficientes, los resultados mostraron que la respuesta del frijol a la inoculación varió de un sitio a otro, donde el uso del fertilizante recomendado más inoculación, fue superior al tratamiento con sólo inoculante, sin embargo Díaz (2010), afirma que la efectividad simbiótica es muy variable, el porcentaje de nitrógeno que deriva de la fijación varió entre el 73 y el 13%, las cepas de *Rhizobium* OAC1020 y VRI2090 produjeron un 22% más de biomasa aérea y un 19% más de rendimiento de grano, asimismo Granda *et al.* (2014), determinaron que las cepas nativas de *Rhizobium* sobre dos variedades de fréjol en condiciones de campo, demostraron que la inoculación con cepas de *R. etli* bv. mimosae y *R. leguminosarum* incrementaron el número de nódulos totales y el peso seco y la biomasa para ambos genotipos.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Las fabáceas (Familia Fabaceae)

Las fabáceas son plantas incluidas en la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsidae, y Orden Fabales y su nombre deriva del latín legumen (semillas con vaina), actualmente pertenecen a la familia Fabaceae, la mayoría de las especies de las subfamilias Faboideae y Mimosoideae en las que se ha estudiado la capacidad de nodulación, son capaces de establecer simbiosis con *Rhizobium* (Díaz, 2010), muchas especies de la familia Fabaceae tienen una gran importancia económica sobre todo por su interés en alimentación humana y animal (Alvarado & Blanco, 2008), desde el punto de vista agrícola, las fabáceas se cultivan bien en terrenos pobres en nitrógeno y son empleados como abonos verdes, así como también tiene un elevado valor alimenticio por su contenido proteico y glucídico (Benzing, 2001).



### 2.2.1.1 Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

#### a. Características botánicas

La alfalfa es una planta que se utiliza ampliamente como forraje y se cultiva intensivamente en el mundo entero, tiene un ciclo vital entre cinco y doce años, dependiendo de la variedad y el clima, su nombre científico es *Medicago sativa*, es una planta herbácea perteneciente a la familia de la Fabaceae (INFOAGRO, 2017) y posee la siguiente clasificación taxonómica (Condori, 2002):

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Rosales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae (Papilionoideae)
Tribu	: Trifolieae
Género	: <i>Medicago</i>
Especie	: <i>Medicago sativa</i> L.

Nombre vulgar : Alfalfa

Es una fabácea (leguminosa) cultivada, perenne, forrajera de larga vida, cultivada extensamente en las zonas templadas, semejante al trébol. Asimismo, posee las siguientes características (INFOAGRO, 2017).

- **Raíz:** Posee una raíz pivotante principal, muy desarrollada y robusta, que podría llegar a los 5 m de longitud, asimismo presenta numerosas raíces secundarias.
- **Tallos:** Son erectos y delgados, soportan el peso de hojas e inflorescencias, son muy consistentes, por tanto, favorables para realizar el segamiento de la planta.
- **Hojas:** Son de clasificación compuestas y trifoliadas, las primeras hojas verdaderas son unifoliadas, sus márgenes son lisos, con bordes superiores algo dentadas.



- **Flores:** Las flores por su simetría son zigomorfas y es una característica de esta familia, son de coloración azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que inician desde las regiones axilares de las hojas.
- **Fruto:** Es una legumbre de tipo espiralada helicoidal e indehisciente sin espinas, que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud.
- **Semillas:** El fruto contiene de 2 a 6 semillas de forma arriñonada de 2 o 3 mm de longitud.

#### **b. Importancia**

La alfalfa, es un recurso fundamental por su calidad nutritiva, producción de forraje, hábito de crecimiento, perennidad, plasticidad y capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico, la convierten en una especie esencial para muchos sistemas de producción agropecuaria, que permite aumentar la carga animal, mantener el stock, mejorar la ganancia en peso o el rendimiento en producción individual de leche, no limita los sistemas de alta productividad, reduce costos variables, aumenta la estabilidad de producción, ya que incorpora materia orgánica y recupera fertilidad del suelo (DRA, 2012), esta planta es un cultivo muy extendido en los países de clima templado, su interés se basa como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales, así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna (INFOAGRO, 2017).

#### **c. Características del crecimiento de la alfalfa**

La parte aérea vegetal fotosintetiza los componentes para el desarrollo de sus raíces, tallos y hojas, los cortes o pastoreos en momentos inoportunos afectan no sólo la producción sino también la permanencia de la alfalfa, con un adecuado manejo conociendo las características de su crecimiento y el mecanismo de reservas en las raíces, permite la presencia de plantas vivas y vigorosas durante muchos años (Romero *et al.*,



1995), en la parte superior de la raíz, debajo de la superficie del suelo se desarrolla una estructura denominada la corona, en ella se encuentran las yemas que formarán los rebrotes basales, con la emisión de tallos principales, junto con los secundarios, son los responsables del rebrote vegetal, en plantas adultas, los rebrotes se originan a partir de la corona, dando lugar a tallos vigorosos, asimismo el crecimiento continúa desde las yemas de los tallos (Rebuffo, 2005).

La energía que necesita la alfalfa para reiniciar el crecimiento después de la defoliación hasta que genere una conveniente área foliar, procede de los carbohidratos de reserva o no estructurales (como los azúcares, el almidón y otros compuestos orgánicos), almacenados en las raíces y en la corona (Romero *et al.*, 1995), los cuales son redistribuidos cuando los requieran, los carbohidratos conforman reservas que son utilizados para iniciar el crecimiento vegetal luego de cada pastoreo y así sobrevivir a las condiciones de estrés, el nuevo crecimiento alcanza a los 15 y 20 cm, que es el momento donde se da el mínimo de reservas, en éste momento el crecimiento vigoroso de los tallos y hojas producen la energía para continuar con el crecimiento y comenzar nuevamente el almacenaje de reservas (Rebuffo, 2005).

### **2.2.1.2 Arveja (*Pisum sativum*)**

#### **a. Características botánicas**

Es una legumbre, herbácea, de característica rastrera o trepadora, con morfologías distinguibles. Posee una raíz Pivotante y numerosas raicillas secundarias y terciarias, tiene nódulos que contienen bacterias nitrificantes, con la función de fijar el nitrógeno atmosférico y servir de nutrimento para la planta; su tallo según la variedad, puede ser corto, mediano o largo, pero todos huecos, provistos de nudos y de color verde claro, sus hojas son compuestas e imparipinadas, posee folíolos elípticos, con bordes onduladas; sus hojas superiores poseen folíolos transformados en zarcillos, utilizados para sostenerse;



sus flores son de color blancas o moradas individuales o en racimos, con una o dos flores en las regiones axilares; el fruto es dehiscente cuyas vainas encierran a las semillas lisas o arrugadas que poseen dos cotiledones, sin endospermo, son harinosas y con germinación hipogea (INFOAGRO, 2017).

#### **b. Clasificación taxonómica**

Las arvejas, poseen la siguiente clasificación taxonómica (Condori, 2002)

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae ( <u>Papilionoideae</u> )
Tribu	: Fabeae
Género	: <i>Pisum</i>
Especie	: <i>Pisum sativum</i> L.
Nombre vulgar	: Arvejas

#### **c. Importancia y usos**

La arveja posee múltiples usos y fines, es consumida en grano fresco, enlatado, congelado, grano seco entero o partidos, en harina de arveja, remojado, abono verde, entre otros. Constituye un excelente cultivo de rotación ya que mejora la estructura del suelo, agregando inmensas cantidades de nitrógeno atmosférico al suelo en forma de simbiosis con *Rhizobium*. También es utilizado como forraje para el consumo directo y luego de la trilla para los ensilados (muchas veces junto con avena) en fardos. Los residuos de paja son utilizados en la alimentación de los animales (Subía, 2001).

#### **d. Condiciones de cultivo**

Habita en climas templado y templado – frío, pose adaptación a períodos de bajas temperaturas en la germinación y en los primeros estados de la planta, favoreciendo su



enraizamiento y macollaje. Su temperatura óptima es entre 16 y 20 °C, necesita ventilación y luminosidad para que desarrolle bien. Requiere suelos de buena estructura, profundos, bien drenados, ricos en nutrimentos asimilables y de reacción levemente acida a neutra, si presentara un drenaje deficiente y encharcamiento, puede provocar un reducido desarrollo y el ataque de enfermedades (Prado, 2008).

#### **e. Rendimiento**

FENALCE (2006), afirma que las variedades Puqinegra presenta rendimientos de 2000 a 4500 Kg de vainas verdes y 900 a 1100 Kg de grano seco por Ha. La variedad Santa Isabel tuvo rendimientos de 4000 a 5600 Kg de vaina verde y 900 a 1100 Kg de grano seco por Ha. La variedad Guatecana Presenta rendimientos de 3000 a 5000 Kg de vainas verdes y 800 a 1100 Kg de grano seco, por Ha.

#### **2.2.1.3 Habas (*Vicia faba*)**

Son originarias como cultivo del Oriente Próximo, extendiéndose pronto por toda la cuenca mediterránea, casi desde el mismo comienzo de la agricultura. Los romanos fueron los que seleccionaron el tipo de haba de grano grande y aplanado que es el que actualmente se emplea para consumo en verde, extendiéndose a través de la Ruta de la Seda hasta China, e introducido en América, tras el descubrimiento del Nuevo Mundo (AgroEs, 2017).

#### **a. Características botánicas**

Las habas son plantas anuales de porte recto, poseen un sistema radicular muy desarrollado, sus tallos son de coloración verde, son fuertes, angulosos y huecos, ramificados, de hasta 1.5 m de altura, variando según el ahijamiento de la planta en el número de tallos. Sus hojas, son alternas, compuestas y paripinnadas, con folíolos anchos ovales y redondeados, son de color verde. Sus flores son axilares, agrupadas en racimos cortos de 2 a 8 flores, presentando manchas grandes de color negro o violeta en



los pétalos. Su fruto es de forma legumbre de longitud variable, logrando alcanzar valores superiores a los 35 cm. Los granos que poseen de habas por legumbres oscilan entre 2 y 9. El color de sus semillas semilla son verde amarillento, aunque hay de otras coloraciones más oscuras (AgroEs, 2017).

#### **b. Clasificación taxonómica**

Las habas, poseen la siguiente clasificación taxonómica (Condori, 2002)

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae ( <u>Papilionoideae</u> )
Tribu	: Fabeae
Género	: <i>Vicia</i>
Especie	: <i>Vicia faba</i> L.
Nombre vulgar	: Habas

#### **c. Importancia y usos**

En Europa cobra importancia por su uso en alimentación animal, para consumo humano, las habas secas se utilizan en la obtención de harina para la fabricación de pan y en la elaboración de aperitivos (granos tostados y salados), en la gastronomía peruana se consume sancochado, en sopas y segundos. El haba también se utiliza, en baja proporción, para la obtención de forraje y como abono verde o cultivo cobertor de suelo (Faiguenbaum, 2003). La producción del haba tiene un creciente interés en el aprovechamiento de sus granos, así como también en la medicina, la industria, y es utilizado como abono verde, forraje y la obtención de bioetanol y biogás (Siem *et al.*, 2012), asimismo como bioindicadora de agua contaminada con mercurio (Álvarez *et al.*, 2006).



#### **d. Condiciones de cultivo**

El cultivo de habas se practica con dos tipos de abonamiento, como son las orgánicas o minerales, mediante la aplicación de estiércol para obtener buenos rendimientos, se recomienda incorporar hasta los 200 quintales de estiércol por Ha, a pesar de incorporar nitrógeno del aire al suelo, por medio de bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas* y *Rhizobium*, entre otros) que forman nódulos en las plantas, pero responde bien también a la fertilización mineral. Según los productores, los campos de cultivo se abonan con 100 Kg/Ha de fosfato diamónico (18 – 46 - 00 / abono), colocándose en el surco, al momento de sembrar. Sin exagerar en la fertilización, ya que nos daría plantas de mucha altura y susceptibles el acame o volcamiento del maíz, causando pérdidas a los productores (INIAF, 2017).

#### **e. Rendimiento**

Varía según la influencia ambiental (Allard, 1999), obedeciendo al potencial genético, siendo crucial en un programa de mejoramiento genético identificar las características de interés y de mayor heredabilidad (López *et al.*, 2005). En España, Nadal *et al.* (2006), reporta que la variedad Retaca fue el que logró los más altos rendimientos con 7000 Kg/Ha, luego fue Verde Bonita con 6000 Kg/Ha y finalmente Alargá con 5000 Kg/Ha.

##### **2.2.1.4 Tarwi o chocho (*Lupinus mutabilis*)**

#### **a. Características botánicas**

Su raíz es de clase pivotante, presenta nudos nitrificantes para la fijación de nitrógeno atmosférico. El tallo es semileñoso, cilíndrico, en cuyo interior presenta un tejido esponjoso con abundante ramificación, cuya altura, dependiendo del ecotipo oscila entre 50 y 280 cm (Tapia, 1996). Las hojas son compuestas, digitadas, con peciolos de cinco o más folíolos. Las flores tienen la típica forma de papilionáceas; la corola está



formada por 5 pétalos y la quilla envuelve el pistilo y a los diez estambres. El tarwi es una especie autógena y de polinización cruzada, pudiendo alcanzar hasta el 40% de alogamia; según las condiciones ecológicas donde crece la planta (Caicedo & Peralta, 2001). El fruto es una vaina alargada de 5 a 12 cm, pubescente y contiene de 3 a 8 granos, éstos son ovalados, comprimidos en la superficie y con una amplia variabilidad en cuanto al color, el mismo que va desde blanco hasta el negro (Caicedo & Peralta, 2000).

### **b. Clasificación taxonómica**

El tarwi, posee la siguiente clasificación taxonómica (Condori, 2002)

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae ( <u>Papilionoideae</u> )
Tribu	: Genisteae
Género	: <i>Lupinus</i>
Especie	: <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.
Nombre vulgar	: Tarwi o chocho

### **c. Importancia**

Es una fabácea con un alto contenido de alcaloides que le confieren un sabor amargo y afectando su biodisponibilidad de nutrientes al consumirlo directamente sin extraer los alcaloides. El grano de tarwi es rico en proteínas y grasa, con la presencia de las concentraciones de los aminoácidos azufrados (metionina + cisteína) (Brack, 1999), al igual que otras fabáceas, fijan nitrógeno (N), y se constituye en un abono verde excelente, con capacidad de fijar 400 Kg de N por Ha/ciclo de cultivo, asimismo, contribuye al manejo de plagas en los cultivos, como barrera ante el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), la plaga más dañina de la papa (Suquilanda, 2017).



#### **d. Usos**

El consumo de tarwi es de manera fresca en sopas, ajíes y como leche vegetal, sustituye fácilmente a la leche, carne y huevos, muchos no la prefieren por el contenido de alcaloides en los granos. En el mercado internacional se plantea expender chocho orgánico procesado, en tal sentido, se requiere establecer muchos estudios de mercado y estrategias para lograr su certificación orgánica, este producto tiene como potenciales compradores a España, Estados Unidos, Alemania, Italia, China, Alemania y Japón (Suquilanda, 2017).

#### **e. Condiciones de cultivo**

Es propio de suelos pobres y rurales, donde su producción depende del suelo en el que se cultive, si existiera una adecuada humedad, es ideal que desarrolle en suelos francos y francos arenosos, con valores de pH que oscila entre 5.5 a 7 unidades, no necesitan de mucha fertilización con nitrógeno, pero deben contar con la presencia de potasio y fósforo, no soportando suelos con humedad en exceso. En cuanto a su temperatura, son cultivados en áreas moderadamente frías (de 7 – 14 °C). En la fase de formación de granos, inmediatamente después de la primera y segunda floración, tolera muy bien a las heladas, cuando inicia la ramificación posee alguna tolerancia, pero es susceptible durante la fase de formación del eje floral. Los requerimientos de agua varían según las variedades cultivadas; sin embargo, y debido a que se cultiva sobre todo bajo seco, la precipitación debe oscilar entre 300 a 600 mm. Esta planta es susceptible a sequías durante la fase de floración y formación de frutos, afectando seriamente su producción (Suquilanda, 2017).



## f. Rendimiento

En cuanto a su producción, el rendimiento promedio, por un tamaño de chacra de 0.97 Ha, es de 317 Kg/Ha, el rendimiento varía según el ataque de plagas (insectos y enfermedades) y la carencia de semillas de calidad (Suquilanda, 2017).

### 2.2.2 Fijación biológica del nitrógeno

#### a. Bacterias simbióticas

Son las bacterias que se asocian a una planta en un nódulo de fijación del nitrógeno, incluyen distintos géneros de *Rhizobium* y otras pocas bacterias (*Burkholderia tuberum*, *Methylobacterium nodulans* y *Ralstonia taiwanensis*, entre otros) que nodulan con fabáceas (Carrillo, 2005), en cuyo interior se multiplican las bacterias y transforman el nitrógeno (N) del aire en amonio, siendo asimilado por las plantas y les permite crecer en suelos pobres en N, previamente las raíces excretan un exudado de flavonoides atrayentes de *Rhizobium* (quimiotactismo), que activan la expresión de genes para producir moléculas de reconocimiento e infección de la planta, adhiriéndose mediante proteínas específicas, a los pelos absorbentes, induciendo la curvatura del extremo, mediante la liberación de lipooligosacáridos conocidos como los factores de nodulación (*Nod*) (CIAT, 1988).

*Rhizobium* sp, son Gram negativos, al microscopio se observan como bacilos aerobios rectos, poseen dimensiones de una longitud de 1.2 a 3  $\mu\text{m}$ , un diámetro de 0.5 – 0.9  $\mu\text{m}$ , son móviles gracias al flagelo polar o subpolar que presenta, asimismo se reporta que posee entre 2 a 6 flagelos peritricos, carece de esporas y formación de quistes, crecen de manera óptima a temperaturas entre 25 y 30 °C y el coeficiente de G + C que presenta es del 59 – 64% (Jordan, 1984). Las células jóvenes presentan una morfología de bacilos cortos; mientras que los cultivos envejecidos o en condiciones adversas se visualizan como células pleomórficas. En medio de cultivo agar levadura manitol (LMA), se observa



la producción de acidez moderada, sus colonias son circulares, elevadas, convexas, mucilaginosas y semitranslúcidas, luego de 5 días de incubación tienen diámetros de 2 a 4 mm, algunos aislamientos son encapsuladas y casi todos sintetizan expolisacáridos que se disuelven en el agua, asimismo son quimioorganotrofos donde el oxígeno es el aceptor final de electrones (Mora, 2005).

La taxonomía de *Rhizobium* sp es la siguiente (Ramírez *et al.*, 1988):

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Proteobacteria alfa
Orden	: Rhizobiales
Familia	: Rhizobiaceae
Género	: <i>Rhizobium</i>
Especie	: <i>Rhizobium meliloti</i>

Las bacterias son aerobias, tienen su temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C, algunas especies crecen a temperaturas de 40 °C, el pH óptimo entre 6.0 y 7.0, pero pueden predominar entre 4.0 a 10.0, el tiempo de generación de cepas *Rhizobium* sp es entre 1.5 a 5.0 horas, son quimioorganoheterótrofo y utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como fuente de carbono, sin formar gas, no son capaces de metabolizar celulosa, almidón, caseína, quitina y agar, algunas cepas requieren de biotina, pantotenato o ácido nicotínico (Kuykendall *et al.*, 2005).

Los nódulos se originan a partir de la división de las células vegetales ubicadas en la corteza interna de las raíces, estos nódulos son órganos especializados encargados del intercambio metabólico entre la bacteria y las raíces, donde la simbiosis entre *Rhizobium* y las diversas fabáceas son de carácter específicos, tal como sucede con *Rhizobium*

*leguminosarum* bv. *phaseoli* quien logra la nodulación solo del frejol, pero no en alfalfa (Truchet, 1993), en la Tabla 1 se muestran algunas simbiosis específicas.

**Tabla 1.** Plantas hospedadoras de *Rhizobium*.

<b>Rizobacteria</b>	<b>Plantas hospedadoras</b>
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia</i> spp, <i>Lotus arabicus</i> , <i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp (nódulos del tallo)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza cuneata</i>
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> spp
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp, <i>Macroptilium</i> spp
<i>Sinorhizobium</i> sp.	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> spp
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Parasponia</i> spp (no legumbre)

**Fuente:** Carrillo (2005).

Las bacterias se mantienen confinadas en los simbiosomas (vesículas protegidas por membranas), que actúan como barrera y controla el flujo de ácidos carboxílicos (malato, succinato, fumarato), los cuales se constituyen en fuente de carbono, tales ácidos proceden de la oxidación de carbohidratos biosintetizados en las hojas mediante la fotosíntesis, a continuación las bacterias se van transformando en bacteroides, grandes e



irregulares, generando proteínas específicas como la nitrogenasa y algunos citocromos (Carrillo, 2005), para que los nódulos fijen N, deben contener leghemoglobina, que transporta el oxígeno a bajas concentraciones pero en forma estable, permitiendo una elevada actividad respiratoria sin afectar a la nitrogenasa, pues se inactiva ante la presencia de oxígeno, asimismo acumulan poli -  $\beta$  - hidroxibutirato (Madigan *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de nódulos, uno indeterminado y alargado (en arveja y alfalfa) y otros determinados y globosos, los indeterminados se alargan por la presencia de un meristemo persistente localizado en el ápice, por otra parte, los nódulos determinados son globosos, debido a la presencia de meristemos esféricos (Patriarca, 2002), los genes esenciales para la nodulación, incluyen los implicados con la formación de la pared celular bacteriana que expresan la síntesis de exo y lipopolisacáridos, el otro gen es de nodulación (*nod*), que reside en el plásmido *Sym* junto a los genes de fijación (*nif*), los genes *nod* son inducidos por la presencia del hospedador, su principal función es la biosíntesis de proteínas de reconocimiento de flavonoides (Ballati, 1996).

### **2.2.3 Fijación simbiótica de nitrógeno en fabáceas**

La fijación biológica de N la llevan a cabo entre procariotas del suelo en simbiosis con las raíces de las plantas, fijando aproximadamente entre 140 y 175 millones de toneladas de N, y *Rhizobium* contribuye entre 35 a 75 millones de toneladas de nitrógeno fijado (Ferrera & Alarcón, 2010), por tanto las fabáceas aumentan la fertilidad de los suelos, dependiendo de la relación bacteria – planta – ambiente, asimismo, la selección de variedades de fabáceas con mayor capacidad para fijar nitrógeno y adaptadas a diversos ambientes incrementaría el aporte de nitrógeno a los cultivos (CIAT, 1988).

Las fabáceas silvestres como cultivadas son noduladas por las cepas *Rhizobium* nativos del suelo, no siendo siempre efectivos, por lo que debe de realizarse la selección



de cepas sobresalientes, también cada cepa debe ser capaz de adaptarse a distintas condiciones de suelo y nodular efectivamente muchos cultivos de fabáceas (Soto & García, 2004), cuando una fabácea es introducida por primera vez, no presenta nodulación o es muy baja e inefectiva, porque su simbionte no se encuentra en el suelo y no tiene competencia de otras cepas del suelo, lo contrario sucede en fabáceas cultivadas por muchos años, ya que los *Rhizobium* nativos específicos siempre están presentes y persisten en el suelo, como sucede en suelos de México, donde los *Rhizobium* de frijol al inicio en temporada de lluvias presentan un número más probable (NMP) de 1000 a 8000 células por g de suelo, y al cultivar la fabácea, la población bacteriana alcanza los 50000 células por g de suelo (Ferrera & Alarcón, 2010).

En el cultivo de la soya, más del 40% de los suelos no presentan a *Rhizobium* para esta fabácea; sin embargo, *Rhizobium* en el cultivo del caupí presenta recuentos de 1000 UFC/g. Muchas cepas de *Rhizobium* aislados de suelos tienen baja efectividad, pero abundan en los mismos con altos recuentos, a pesar de que originan nodulación, fijan nitrógeno en bajas cantidades; pero, la competencia es un factor crítico para llegar al éxito de la inoculación de fabáceas, en razón de que las poblaciones de *Rhizobium* sp que no son efectivas, se constituyen en una barrera para establecerse y nodular (Ferrera & Alarcón, 2010). Otro aspecto importante es que la fijación de nitrógeno inicia luego de los primeros 15 a 20 días, a continuación de la emergencia, al observarse los primeros nódulos que se vienen formando (Elkan, 1992). La sacarosa, que procede de la zona aérea de la fabácea es la principal fuente de carbono necesario para los nódulos; sin embargo, *Rhizobium* sp no puede utilizar mono o disacáridos ante la carencia de transportadores o vías glicolíticas necesarias para el metabolismo de los azúcares (Ferrera & Alarcón, 2010).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras de nódulos radiculares fueron recolectadas a partir de plantas de alfalfa procedentes de las localidades de Jasa Pacsellim (zona 1) cuyas coordenadas UTM fueron -15.291485 y -69.985985, Sacasco (zona 2) en las coordenadas UTM -15.295966, -69.964494 y Ramis (zona 3) ubicada en las coordenadas UTM -15.290251 y -69.958789, todas pertenecientes al distrito de Taraco (Figura 1), según el INEI, este distrito tiene una superficie total de 198.02 Km<sup>2</sup> y una población de 14657, este distrito está ubicado en la provincia de Huancané, región de Puno (INEI - Perú, 2011).



**Figura 1.** Zonas de recolección de nódulos de alfalfa en tres localidades del distrito de Taraco. 1 = Sacasco; 2 = Jasa Pacsellim; y 3 = Ramis.

**Fuente:** Google Eart (2017).

#### 3.2 TIPO DE ESTUDIO

Fue un estudio de tipo descriptivo y explicativo, porque se pretendió describir y explicar los mecanismos que posee *Rhizobium* en la estimulación del crecimiento de las

fabáceas (Hernández *et al.*, 2014); experimental de corte transversal, ya que, en base a lo descrito y explicado, se afirmó si la aplicación de *Rhizobium* sp estimuló o no el crecimiento de las fabáceas (Caballero, 2005), y de corte transversal, porque se realizó durante los meses de agosto – diciembre del año 2021.

### 3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población estuvo constituida por todas las plantas cultivadas del campo de las tres zonas productoras de alfalfa de la región de Puno, específicamente Jasa Pacsellim, Sacasco y Ramis, localidades pertenecientes al distrito de Taraco. El tamaño de la muestra fue calculado según la siguiente ecuación estadística:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{i^2}$$

**Donde:** n= tamaño muestral; Z= valor correspondiente a la distribución de Gauss,  $Z_{\alpha=0.05}=1.96$ ; p= prevalencia esperada de plantas con nódulos radiculares; q= 1-p; i= error que se prevé cometer es del 10%,  $i=0.1$  (Murray & Larry,2005).

Reemplazando valores se determinó:

$$n = \frac{(1.96)^2 \cdot (0.25) \cdot (0.75)}{0.05^2} = 288.12$$

$$n = 288 \text{ plantas de alfalfa}$$

El tamaño de muestra estuvo constituido por 288 plantas, de las cuales 96 fueron colectadas de cada zona productora, haciendo recorridos en zigzag y aleatoriamente, según lo recomendado por Morales *et al.* (2010).

### 3.4 METODOLOGÍA

La investigación se realizó en el Laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno.

### 3.4.1 Caracterización del crecimiento morfológico diferencial y recuentos de *Rhizobium* sp a partir de nódulos de alfalfa

#### a. Recolección de nódulos de *Rhizobium* sp en plantas de alfalfa

Esta metodología se realizó de acuerdo al manual de Zúñiga (2012) y CIAT (1988).

- 1) Con ayuda de una pala, se extrajeron las plantas que presentaron las mejores características vegetales, luego se colectaron sus nódulos desde sus raíces.
- 2) Los nódulos fueron seleccionados según su color interno de cada uno de ellos, los elegidos fueron aquellos que presentaron una coloración entre rojo claro y rojo oscuro, así como una consistencia firme; en contraste los nódulos descartados fueron aquellos que presentaron consistencia esponjosa y coloración interna oscura o negra.
- 3) Los nódulos seleccionados se colocaron en frascos con silica gel y algodón para su posterior conservación, asignándoles a cada muestra un código de acuerdo al lugar de muestreo y número de planta, posteriormente se trasladaron al laboratorio para su tratamiento y procesamiento respectivo.



**Figura 1.** Raíces de alfalfa mostrando los nódulos (flecha roja), colectadas en el distrito de Taraco.

#### b. Aislamiento de *Rhizobium* sp a partir de nódulos de alfalfa

El aislamiento se realizó según lo recomendado por Zúñiga (2012), el cual se detalla a continuación:

- 1) Tratamiento de los nódulos:** se seleccionaron 3 nódulos de cada frasco con silica gel, a continuación, se colocaron en sobres de papel de filtro estéril y se hidrataron en agua destilada estéril durante 30 minutos, seguidamente se desinfectaron con alcohol al 70% por 1 minuto en una placa Petri estéril, luego se trasladaron a otra placa Petri que contenía hipoclorito de sodio (lejía) al 3%, donde se dejó reposar por 3 minutos, para finalizar esta etapa se enjuagó con agua destilada estéril durante 6 veces, hasta no percibir el olor a lejía.

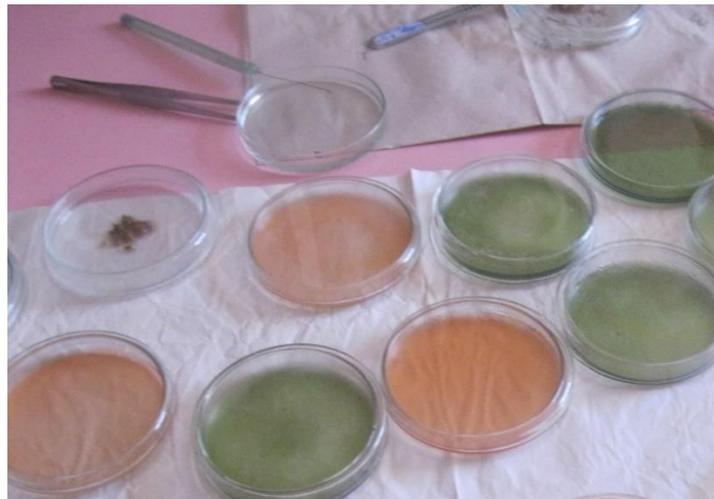


**Figura 2.** Nódulos recolectados de las raíces de alfalfa colectadas de las localidades de Jasa Pacsellim (izquierda), Sacasco (centro) y Ramis (derecha).

- 2) Aislamiento de *Rhizobium* sp a partir de nódulos:** con pinzas estériles, se abrieron los sobres que contenían los nódulos, luego fueron colocados en placas Petri estériles y con una pipeta se agregó una gota de agua destilada estéril a cada uno, con ayuda de una bagueta de vidrio se trituraron los nódulos, de esta manera se obtuvieron los macerados de los nódulos, a continuación, los macerados fueron sembrados mediante estrías paralelas con un asa de siembra en medio Agar Levadura Manitol con rojo Congo (LMA – RC) y con azul de bromotimol (LMA – ABT), posteriormente, se incubaron las placas Petri a 28 °C por 72 horas.



**Figura 3.** Desinfección de nódulos radiculares de alfalfa.



**Figura 4.** Medios de cultivo para el aislamiento de *Rhizobium* sp, LMA – RC (color rojo) y LMA – ABT (color azul verdoso).

**3) Caracterización de los aislamientos de *Rhizobium* sp:** una vez observado el crecimiento de colonias, las que pertenecían a *Rhizobium* sp, fueron aquellas con un tiempo de crecimiento de 5 días, un diámetro de 2 y 4 mm, una textura entre ligoso y cremoso, una apariencia semitranslúcida u opacas, una coloración rosada en LMA – RC, la presencia de goma abundante y el medio de cultivo amarillo en LMA – ABT (indicando reacción ácida) (Zúñiga, 2012). Se descartaron a las colonias de coloración roja, en razón de que pertenecerían al género *Agrobacterium* sp. A la tinción Gram, *Rhizobium* fue una Gram negativa, con forma entre bacilar y pleomórficas y en una lámina portaobjetos al contacto con una solución al 1% de azul de bromotimol, éste cambió a color amarillo.



**Figura 5.** Frotices de *Rhizobium* sp.



**Figura 6.** Recuento de colonias de *Rhizobium* sp en placa.

### c. Análisis estadístico

La variable respuesta fue la caracterización de las colonias de *Rhizobium* sp, y fueron presentadas en tablas por ser descriptivas; por otro lado, los recuentos bacterianos evaluados entre localidades y los meses de muestreo considerados como las repeticiones, fueron evaluados mediante pruebas de análisis de varianza y contraste de Tukey, con un nivel de confianza de 95%, donde el modelo matemático fue el siguiente (Celis & Labrada, 2014):

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$  = observación del tratamiento (meses y localidades);  $\mu$  = promedio general;  $t_i$  = efecto de tratamiento  $i$ ;  $\varepsilon_{ij}$  = Término de error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$ .

### 3.4.2 Determinación del efecto de las concentraciones $1.5 \times 10^8$ , $15 \times 10^8$ y $30 \times 10^8$ UFC/mL de *Rhizobium* sp en la germinación de semillas y el crecimiento vegetal de fabáceas

Para evaluar el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sp *in vitro* para el crecimiento de fabáceas, se realizó los procedimientos recomendados por Schoebitz (2006) y Zúñiga (2012), los cuáles se detallan a continuación:

- a. **Preparación de las concentraciones bacterianas:** las colonias de *Rhizobium* sp aisladas en el agar LMA y conservadas en refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), fueron inoculadas mediante un asa de siembra, a tubos de ensayo de agua destilada caldo levadura manitol, posteriormente se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 7 días, con la finalidad de obtener poblaciones de *Rhizobium* sp de  $1.5 \times 10^8$ ,  $15 \times 10^8$  y  $30 \times 10^8$  UFC/ml, la cual fue contrastada con la escala de turbidez 0.5, 5 y 10, obtenidos mezclando 0.05, 0.5 y 1 mL de  $\text{BaCl}_2$  0.048 M y 9.95, 9.5 y 9 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.36 M, respectivamente (Rojas, 2011), que se constituyeron en las concentraciones bacterianas utilizadas para la inoculación de las semillas. Dichas diluciones fueron conservadas en fioles de 100 mL.



**Figura 7.** Preparación de concentraciones de *Rhizobium* sp.

**b. Desinfección e inoculación de las semillas de las fabáceas con *Rhizobium* sp:**

Las semillas fueron previamente lavadas con agua de caño, para eliminar restos de tierra y/o productos químicos impregnados, a continuación se lavaron diez veces con agua destilada y desionizada estéril para eliminar las trazas residuales del agua de caño, luego fueron desinfectadas por inmersión en etanol al 80% durante tres minutos, enjuagándose cinco veces con agua destilada y desionizada estéril, seguidamente se le agregó una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% por 15 minutos, y se lavaron diez veces consecutivas con agua destilada y desionizada estéril, por último se dejó escurrir en condiciones de esterilidad sobre papel toalla en medio de mecheros de alcohol (Reyes *et al.*, 2008).



**Figura 8.** Desinfección de semillas de fabáceas.

Las semillas desinfectadas se inocularon utilizando una solución azucarada (sacarosa) al 15% (INIAP – Ecuador, 2002), como adherente, es decir a cada fiola de 100 ml el cual contenía la concentración de *Rhizobium* sp, se le agregó 15 g de sacarosa, la cual se disolvió completamente, en ella se colocaron 30 semillas previamente desinfectadas, agitándose vigorosamente durante una hora, a continuación, las semillas fueron coladas en gasa estéril y se dispusieron sobre papel toalla para el secado a temperatura ambiente, en un área desinfectada por mecheros de alcohol (Reyes *et al.*, 2008).

**c. Evaluación del efecto en la germinación de arveja, habas y tarwi:** las semillas de las fabáceas fueron transferidas a placas Petri, conteniendo papel filtro en la base de

la placa, previamente embebida en solución de macronutrientes (en g/L: nitrato de potasio 550.0; nitrato de amonio 350.0; superfosfato triple 180.0; sulfato de magnesio 220.0; quelato de hierro 6% 17.0) y micronutrientes (g/L: sulfato de manganeso 5.0; ácido bórico 3.0; sulfato de zinc 1.7; sulfato de cobre 1.0 y molibdato de amonio 0.2) para cultivos hidropónicos, asimismo las placas Petri fueron envueltas en papel aluminio, para generar oscuridad. La manipulación de las semillas, se realizaron con pinzas estériles. El número de semillas inoculadas y transferidas a cada una de las placas Petri fue de 100 unidades por cada fabácea y cultivadas a temperatura ambiente ( $13 \pm 3$  °C). Luego de 7 días de inoculadas las semillas, se cuantificó el número de semillas germinadas y así determinar el porcentaje de germinación.



**Figura 9.** Germinación de semillas de fabáceas.

**d. Evaluación del efecto de la inoculación de semillas de fabáceas con *Rhizobium* sp, en el peso total de la planta y la longitud total de raíces y tallos.**

Diez de las semillas previamente germinadas, fueron elegidas al azar para ser trasferidas a bolsas de polietileno marca Zifloc, al transcurrir los 45 días, se determinaron el peso total de las plántulas en una balanza analítica de precisión, las longitudes de las raíces y de los tallos, se determinaron con vernieres manuales, respectivamente (Moreno & Galvis, 2013).



**Figura 10.** Crecimiento de raíces y tallos inoculados con *Rhizobium* sp.

**e. Análisis estadístico**

Se aplicó el análisis de varianza (ANVA) en arreglo factorial bajo un diseño completamente al azar, de 3 x 3 x 3 (3 localidades de estudio, 3 plantas inoculadas y 3 concentraciones bacterianas). El número de repeticiones fue de tres por cada fabácea, dando un total de 27 unidades experimentales por *Rhizobium*, cada semilla inoculada presentó su tratamiento control (agua destilada). Se realizó pruebas de tendencia central y dispersión (promedio y coeficiente de variación) y el análisis factorial se desarrolló con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

**Donde:**  $Y_{ijkl}$  = fue la variable respuesta de la  $i$ -ésima observación bajo el  $k$ -ésimo nivel de factor C, en el  $j$ -ésimo nivel del factor B, sujeto al  $i$ -ésimo nivel del tratamiento A;  $\mu$  = constante, media de la población a la cual pertenece las observaciones;  $\alpha_i$  = efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor A (zonas de estudio);  $\beta_j$  = efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor B (plantas inoculadas);  $\gamma_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo nivel del factor C (diluciones inoculadas);  $(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor A, con el  $j$ -ésimo nivel del factor B;  $(\alpha\gamma)_{ik}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor A, en el  $k$ -ésimo nivel del factor C;  $(\beta\gamma)_{jk}$  = Efecto de la interacción del  $j$ -ésimo nivel del factor B, en el  $k$ -ésimo nivel del factor C;  $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo nivel del factor A,



en el j-ésimo nivel del factor B, sujeto al k-ésimo nivel del factor C;  $\varepsilon_{ijkl}$  = Efecto del error experimental (Ibáñez, 2009).

Antes de realizar el análisis estadístico, los datos fueron evaluados mediante pruebas de normalidad de Shapiro – Wilks y si en caso no hubiera normalidad fueron transformados a Log10. Asimismo, se realizaron pruebas de Dunnett, con la finalidad de realizar las comparaciones de los porcentajes de germinación de las semillas, el peso total de las plantas y las longitudes de tallos y raíces con sus correspondientes tratamientos controles. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

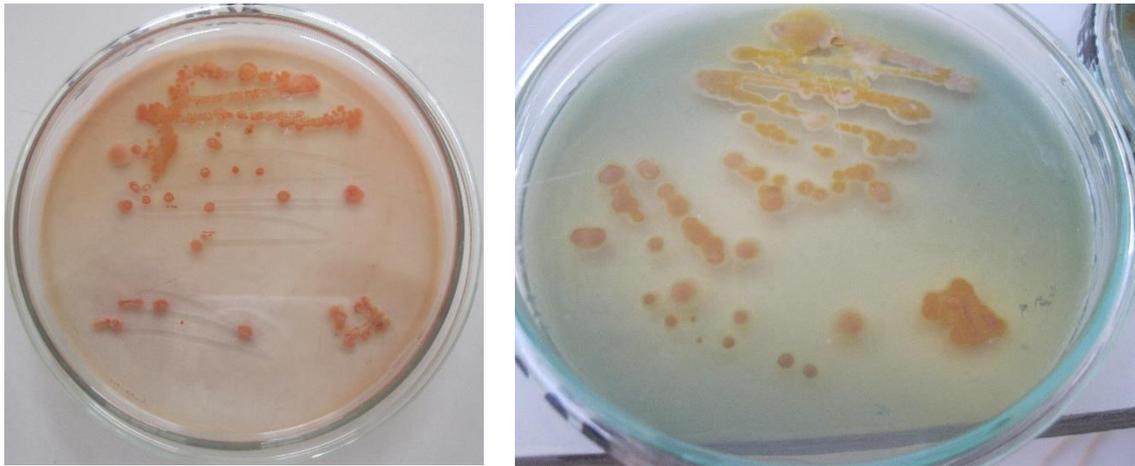
#### 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO MORFOLÓGICO DIFERENCIAL Y RECUENTOS DE *Rhizobium* sp A PARTIR DE NÓDULOS DE ALFALFA

**Tabla 2.** Características morfológicas diferenciales de colonias de *Rhizobium* sp sobre medios de cultivo LMA – RC y LMA – ABT.

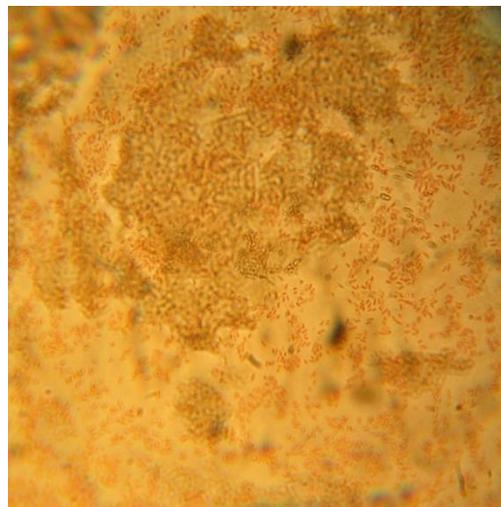
Zona	Aislamiento	Diámetro	Goma	Color LMA-RC	Color LMA-ABT
Jasa Pacsellin	1	<2 mm	Regular	Rosadas	Amarillo verdosas
	2	≤ 2mm	Regular	Rosadas	Amarillas
	3	<2 mm	Poco regular	Rosadas	Amarillo verdosas
Sacasco	1	<2 mm	Poco regular	Rosadas	Verdosas
	2	<2 mm	Regular	Rosadas	Amarillo verdosas
	3	<2 mm	Regular	Rosadas	Amarillo verdosas
Ramis	1	<2 mm	Abundante	Rosadas	Verdosas
	2	<3 mm	Abundante	Rosadas	Amarillo verdosas
	3	<2 mm	Regular	Rosadas	Verdosas

**Donde:** LMA-RC = medio levadura manitol con rojo Congo; LMA-ABT = medio levadura manitol con azul de bromo timol.

El crecimiento de colonias de *Rhizobium* sp, luego de siete días de cultivo, en el medio LMA – RC, se caracterizaron presentando colonias rosadas, su textura fue cremosa, una apariencia opaca semi translúcida, bordes irregulares y altura plana; mientras que en el medio LMA – ABT (Figura 11), las colonias variaban de coloración entre amarillas, amarillo verdosas y verdosas, en ambos medios los diámetros de las colonias fueron inferiores a 3 mm (Tabla 2), asimismo todas las bacterias resultaron Gram negativas a la visualización en el microscopio óptico compuesto (Figura 12).



**Figura 11.** Crecimiento de colonias de *Rhizobium* sp en LMA – RC (izquierda) y LMA – ABT (derecha).



**Figura 12.** Coloración Gram de *Rhizobium* sp, observada en el microscopio óptico compuesto a 1000X.

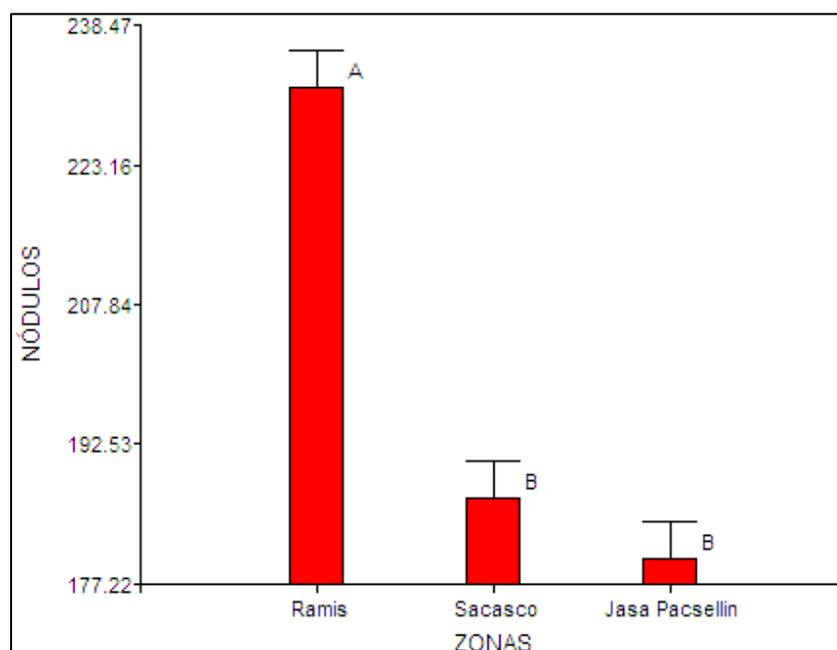
El recuento de *Rhizobium* sp, presente en los nódulos de plantas de alfalfa en las tres localidades del distrito de Taraco, oscilaron entre los promedios de  $180 \times 10^2$  y  $231.67 \times 10^2$  UFC/g; los mayores recuentos se determinaron en la localidad de Ramis, los cuales variaron entre 225 y 238 UFC/g, seguido de la localidad de Sacasco entre 183 y 193 UFC/g, mientras que en la localidad de Jasa Pacsellin osciló entre 172 y 189 UFC/g, estos datos presentaron bajos índices de dispersión, con coeficientes de variabilidad que fluctuaron entre 2.81% en la comunidad de Ramis y el mayor con 4.75% en la comunidad de Jasa Pacsellin (Tabla 3), entre las localidades, los recuentos de *Rhizobium* sp

presentaron diferencia estadística significativa ( $F_c=48.80$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0002$ ) (Anexo 1), más no entre meses de muestreo ( $F_c=0.02$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.9774$ ), siendo mayor en Ramis y menor en Sacasco y Jasa Pacsellin, entre éstos últimos no existió diferencia significativa (Figura 13).

**Tabla 3.** Recuento de *Rhizobium* sp ( $\times 10^2$  UFC/g) en muestras de suelo de las localidades de Jasa Pacsellin, Sacasco y Ramis.

Localidad productora de alfalfa	Meses de evaluación			Prom	CV (%)
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		
Jasa Pacsellin	189	172	179	180.00	4.75
Sacasco	193	183	184	186.67	2.95
Ramis	225	238	232	231.67	2.81

**Donde:** Rep = repetición; Prom = promedio; CV = coeficiente de variabilidad.



**Figura 13.** Prueba de Tukey para los recuentos de *Rhizobium* sp ( $\times 10^2$  UFC/g) en nódulos de alfalfa, procedentes del distrito de Taraco.

Los recuentos de *Rhizobium* sp, oscilaron entre  $180 \times 10^2$  y  $231.67 \times 10^2$  UFC/g, estos resultados fueron inferiores a los reportados por Pérez *et al.* (2011), quienes reportan una densidad poblacional de *Rhizobium* entre  $15 \times 10^8$  UFC/g y  $22 \times 10^8$  UFC/g en las



zonas de Santa Lucía y Pita Abajo, departamento de Sucre (Colombia), esto se debería probablemente a que los suelos colombianos presentaron niveles de acidez moderada lo que permitiría el desarrollo de *Rhizobium*, ya que los suelos muy ácidos originan problemas de nutrición mineral como la deficiencia de calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K), tanto para *Rhizobium* como para la fabácea hospedante (Jiménez & Lamo, 1998).

Por otro lado, la deficiencia de fósforo (P) y nitrógeno (N), causa la reducción de la fijación de nitrógeno, por efectos específicos en la iniciación y crecimiento del nódulo y la enzima nitrogenasa, presente en la célula de especies de *Rhizobium* (Montes, 1999), así como por la reducida absorción de molibdeno (Mo) que disminuye el crecimiento de las fabáceas, sin embargo, la presencia de nódulos con pigmentación interna roja, se debe por la abundancia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ), quienes se encuentran en niveles altos y no permiten una mala viabilidad nodular (Mayea *et al.*, 1998).

Los nódulos de las localidades de Jasa Pacelli y Sacasco, presentaron planas de alfalfa con menores nódulos y reducidos recuentos de *Rhizobium* sp, debiéndose probablemente a que las plantas controlan principalmente el número de nódulos, mediante mecanismos de autorregulación, controlados por factores externos como la presencia de nitratos en sus suelos, las raíces de fabáceas poco noduladas pueden deberse a la abundancia de nitrógeno en el suelo, inhibiendo la nodulación (Caba *et al.*, 2001), asimismo Coyne (2000) indica que el número de nódulos dependerá de la presencia de fósforo, potasio, magnesio y calcio, presentes en el suelo, adicionalmente, los niveles altos de fósforo (P), incrementa la absorción de manganeso (Mn), induciendo al descenso en el número y el volumen de nódulos, contrarrestado por la presencia de calcio (Pérez & Torralba, 1997).



Las colonias de *Rhizobium* sp presentaron una textura cremosa, lo cual concuerdan con los reportados por Spaink (2000) y Coyne (2000), ya que afirman que las colonias de *Rhizobium* presentan una consistencia mucosa por los lipopolisacáridos y las formas bacterianas variaron desde esferoidales a bacilares alargadas, incluyendo irregulares.

Las características de las colonias obtenidas en el medio LMA - ABT fueron similares a los reportados por Carranza (2004), quien también reporta que colonias amarillas y mucosas, Gram negativas móviles, todo bacilos y 2 cepas aisladas con morfología de cocobacilo; mientras tanto, fueron diferentes ya que obtuvo colonias mayores a 3 mm de diámetro, los bordes regulares y elevadas, indicando compatibilidad con *Rhizobium*. Por otro lado, Morales (1992) reporta similares resultados de aislamiento de *Rhizobium* en LMA – ABT, obteniendo colonias convexas – cónicas, algunas más aplanadas, textura húmeda y elástica, Gram negativos, y produciendo notable acidez, cambiando el medio de verde a amarillo en 48 horas; asimismo difiere, ya que las colonias fueron de color blanco lechoso de aspecto brillante y el tamaño de colonias fueron mayores a 4 mm.

En la investigación se utilizó los medios de cultivo Agar Levadura Manitol con Roja Congo (LMA – RC) y Agar Levadura Manitol con Azul de Bromotimol (LMA – ABT) para el aislamiento de *Rhizobium* sp, esta afirmación coincide con Hernández *et al.* (2012), quienes recomiendan que para lograr el aislamiento efectivo de *Rhizobium* nativo de la zona, realizar la extracción directa de los nódulos de las plantas en estudio, utilizando medios de cultivo específicos para la diferenciación bioquímica de las especies, entre los más conocidos y utilizados se mencionan al medio Levadura Manitol Agar (YMA), la cual obtuvieron en siete días (Vásquez & Guevara, 2015), agar XLD y Hektoen, específicos para determinar el crecimiento de bacterias Gram negativas, además



de evaluar su crecimiento en Levadura Lactosa Agar (LLA), con producción de cetolactosa.

Los nódulos de las raíces de la alfalfa, variaron según la localidad de procedencia, lo cual concuerda con lo manifestado por Somasegaran & Hoben (1994), quienes afirman haber encontrado los mayores porcentajes de *Rhizobium* en los Municipios de Santa Rosa y Villanueva en Colombia, y podría deberse a la mayor actividad de siembra de fabáceas, en especial la planta de donde se aisló la bacteria (fríjol caupí) y por la ausencia de iones de  $Al^{3+}$  reprimiendo la expresión del gen *nod* (Richardson *et al.*, 1988), y  $Co^{+2}$ , que son metales perjudiciales para el crecimiento de las plantas.

Las colonias de *Rhizobium* presentaron una coloración translúcida y rosada, lo cual coincide con lo reportado por Sosa *et al.* (2004), quienes establecen que, para seleccionar colonias típicas de estas bacterias, el elemento esencial es la falta de absorción del colorante Rojo Congo, visualizándolas como colonias blancas o ligeramente rosadas, debido a que no absorben este colorante; a su vez concuerdan con Pérez *et al.* (2008), quienes manifiestan que las colonias de *Rhizobium*, son de blanco o rosado, debido a que no absorben el colorante (Rojo Congo); por otro lado, Rojas *et al.* (2009) señalan que se tornan de color rojo intenso, luego de 8 días de incubación, en tiempos breves de cultivo, la absorción de Rojo Congo es característico del género *Agrobacterium* sp a diferencia de *Rhizobium* sp, que no absorbe.

Al finalizar el análisis del crecimiento *in vitro* de *Rhizobium*, se acepta la hipótesis planteada, ya que *Rhizobium* aisladas de las tres localidades del distrito de Taraco, presentaron diferentes crecimientos en el medio de cultivo agar LM con rojo Congo, siendo mayor en nódulos de la localidad de Ramis y menores en Sacasco y Jasa Pacsellin.

Después de haber realizado el análisis y la interpretación de la caracterización morfológico diferencial y los recuentos de *Rhizobium* sp, los medios LMA – RC y LMA



– ABT son apropiados para el crecimiento microbiano, siendo más uniforme en el medio de cultivo LMA – RC con el crecimiento de colonias rosadas. Por otro lado, los recuentos de *Rhizobium* sp variaron entre zonas, siendo mayor en Ramis, la mayor persistencia de la bacteria en estudio se debería a la baja disponibilidad de agroquímicos usados en el proceso de cultivo, así como un mayor contenido de materia orgánica, entre otras características edafológicas.

## **4.2 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE *Rhizobium* sp SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS, EL PESO TOTAL DE LAS PLÁNTULAS, LA LONGITUD DE RAÍCES Y TALLOS DE LAS FABÁCEAS**

### **4.2.1 Porcentaje de germinación**

Los mayores porcentajes de germinación se determinó en arvejas con un promedio del 47% y en habas con el 67%, en ambos al inocular una concentración de *Rhizobium* de  $15 \times 10^8$  UFC/mL; mientras que la mayor germinación en tarwi se obtuvo el 25% al inocular una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (Tabla 4), siendo ésta la germinación menor, entre las tres fabáceas.

**Tabla 4.** Germinación de semillas (%) de fabáceas inoculadas con *Rhizobium* sp.

Semillas inoculadas	Concentración					
	bacteriana (UFC/mL)	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Prom	CV (%)
Arveja	Control	11	9	12	10.67	14.32
	30 x 10 <sup>8</sup>	23	28	30	27.00	13.35
	15 x 10 <sup>8</sup>	53	46	42	47.00	11.85
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	23	26	28	25.67	9.80
Habas	Control	20	18	23	20.33	12.38
	30 x 10 <sup>8</sup>	38	28	31	32.33	15.87
	15 x 10 <sup>8</sup>	74	65	62	67.00	9.32
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	42	44	35	40.33	11.72
Tarwi	Control	24	25	19	22.67	14.18
	30 x 10 <sup>8</sup>	18	24	19	20.33	15.81
	15 x 10 <sup>8</sup>	23	24	18	21.67	14.84
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	20	26	29	25.00	18.33

**Donde:** Rep = repetición; Prom = promedio; CV = coeficiente de variabilidad.

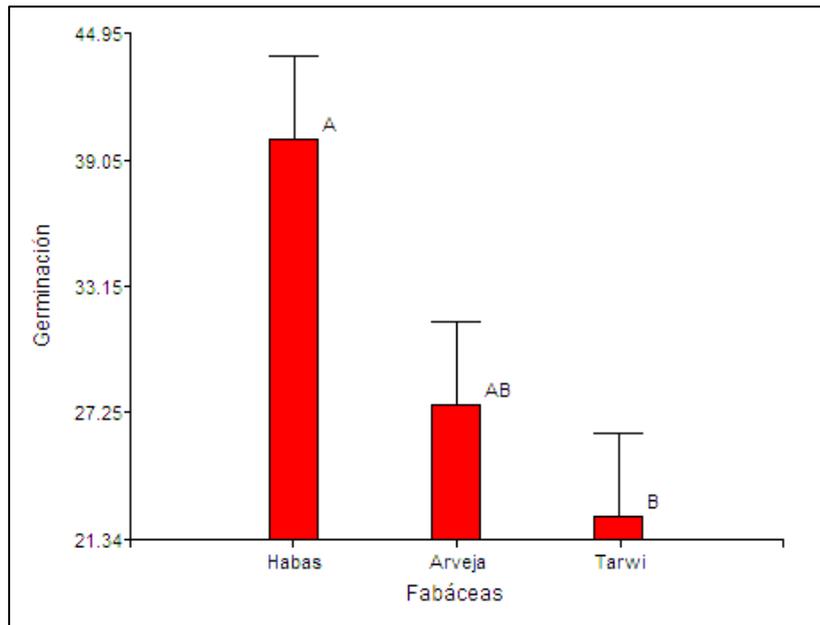
Las semillas de habas presentaron los mejores promedios de germinación (67.00%), seguidos de arveja (47.00%) y tarwi (25.00%), con inoculaciones de 15 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, 15 x 10<sup>8</sup> UFC/mL y 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL respectivamente en cada fabacea, presentando diferencia significativa entre los porcentajes de germinación (F<sub>c</sub>=4.49; gl=2; P=0.0188) (Figura 14), así como también la concentración bacteriana de 15 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, fue la que generó los mayores promedios de porcentajes de germinación (45.22%), seguido de las concentraciones 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (30.33%) y 30 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (26.56%) (F<sub>c</sub>=8.51; gl=2; P=0.0003), todos los tratamientos superaron estadísticamente a la germinación con el tratamiento control (17.89%) (Figura 15). Por otro lado, la germinación de semillas del tratamiento control y la concentración bacteriana de 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, no presentaron diferencia estadística significativa (P = 0.082);

mientras tanto, si presentaron diferencia estadística significativa entre las concentraciones de *Rhizobium* sp de  $15 \times 10^8$  UFC/mL ( $P = 0.002$ ) y  $30 \times 10^8$  UFC/mL ( $P = 0.029$ ) con respecto a los tratamientos controles (Tabla 5).

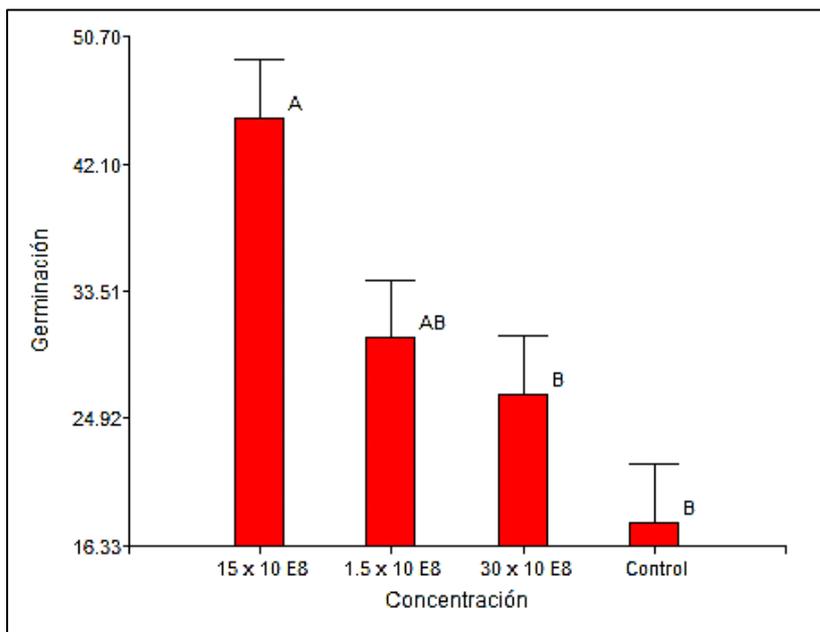
**Tabla 5.** Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp y el tratamiento control en la germinación de semillas (%) de tres fabáceas (datos transformados a Log10).

Comparaciones	Error estándar	Significancia
$1.5 \times 10^8$ – Control	16.87074	0.082
$15 \times 10^8$ – Control	16.87074	0.002
$30 \times 10^8$ – Control	16.87074	0.029

*Rhizobium* sp presentó un efecto estimulador de la germinación de semillas principalmente de habas, logrando hasta el 47%, lo cual concuerda con lo reportado por Dey *et al.* (2004), quienes indican que el 47% de las cepas de *Rhizobium* presentaron efecto estimulante sobre las semillas de tomate, pero diferentes a los registrados por Santillana *et al.* (2005), quienes obtuvieron el 100% de germinación en semillas de tomate con respecto al 80% en el tratamiento control, pudiendo estimular la germinación de semillas de tomate y promover su crecimiento, en la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima – Perú).



**Figura 14.** Prueba de Tukey de la germinación de semillas (%) de tres fabáceas.



**Figura 15.** Prueba de Tukey de la germinación de semillas (%) inoculadas con tres concentraciones bacterianas.

La germinación de semillas de habas (67%) inoculadas con *Rhizobium* sp, fueron mayores a los investigados en *Phaseolus vulgaris* var. *canario camanejo*, quienes incrementaron su germinación en un 33.3% con respecto al control. En la investigación no se logró el 100% de germinación, debido a que probablemente no sea la dosis bacteriana ni de metabolitos secundarios suficientes para la estimulación del proceso de



la germinación de sus semillas (Díaz *et al.*, 2001), ya que los reguladores del crecimiento vegetal, tienen una influencia importante en el crecimiento de la planta (Simpson, 1986), los efectos en el proceso fisiológico de la germinación en semillas, se debería probablemente a que las bacterias son atraídas por las plantas mediante el exudado radicular con flavonoides (quimiotactismo), activando la expresión de ciertos genes para el reconocimiento y la infección de la planta, adhiriéndose mediante proteínas específicas, a los pelos absorbentes, induciendo a la curvatura de su extremo mediante la liberación de lipooligosacáridos como factores de nodulación (*nod*) (Carrillo, 2005).

*Rhizobium* sp aisladas en la investigación, estimularon la germinación en habas, esto se debería probablemente a que los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* son cepas capaces de afectar a la germinación, produciendo giberelinas (Bottini *et al.*, 1989), la producción de giberelinas establece una relación causa – efecto muy directo, sin embargo, también pueden afectar otros metabolitos como agentes quelantes, otras hormonas, entre otros (Glick, 1995).

#### **4.2.2 Peso total de la plántula**

Los mayores pesos de las plántulas en arvejas y habas se obtuvieron al inocular sus semillas con *Rhizobium* sp en concentraciones de  $15 \times 10^8$  UFC/mL con 2.33 y 2.83 g respectivamente; mientras tanto en plántulas de tarwi, el mayor peso se obtuvo con una inoculación de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, con 1.47 g, todos los tratamientos con inoculación bacteriana fueron superiores numéricamente frente al tratamiento control (Tabla 5).

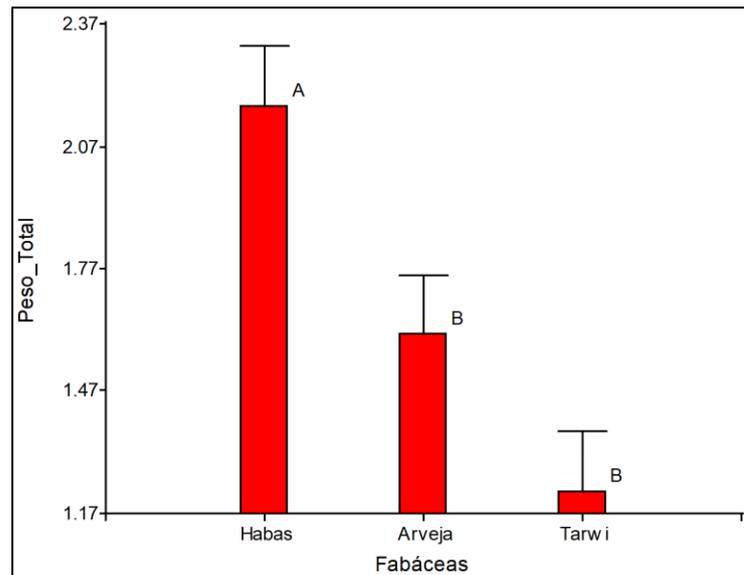
**Tabla 6.** Pesos totales (g) de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculados con *Rhizobium* sp.

Semillas inoculadas	Concentración	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Prom	CV (%)
Arveja	Control	0.8	0.9	0.8	0.83	6.93
	30 x 10 <sup>8</sup>	1.2	1.3	1.5	1.33	11.46
	15 x 10 <sup>8</sup>	2.2	2.4	2.4	2.33	4.95
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	2.1	1.8	1.9	1.93	7.90
Habas	Control	1.4	1.6	1.4	1.47	7.87
	30 x 10 <sup>8</sup>	2.3	2.6	2.4	2.43	6.28
	15 x 10 <sup>8</sup>	2.9	2.8	2.8	2.83	2.04
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.8	1.9	2.1	1.93	7.90
Tarwi	Control	0.8	0.9	0.8	0.83	6.93
	30 x 10 <sup>8</sup>	1.5	1.3	1.1	1.30	15.38
	15 x 10 <sup>8</sup>	1.4	1.2	1.3	1.30	7.69
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.7	1.5	1.2	1.47	17.16

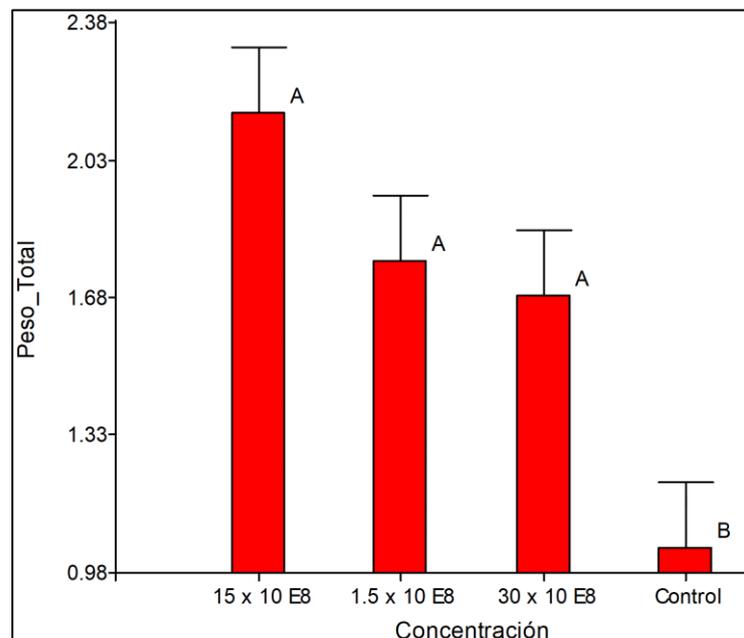
Las plántulas de habas presentaron los mejores promedios de peso total, seguidos de arveja y tarwi, existiendo diferencia significativa entre las plántulas ( $F_c=10.75$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0003$ ) (Figura 16). La concentración bacteriana de  $15 \times 10^8$  UFC/mL de *Rhizobium* sp, fue la que originaron los más altos promedios de pesos de las plántulas, superando al tratamiento control (1.04 cm) (Figura 17). Por otro lado, el peso total de las plántulas de las tres fabáceas inoculadas con *Rhizobium* sp, presentaron diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento control, vale decir que el peso total de las plántulas inoculadas  $1.5 \times 10^8$ ,  $15 \times 10^8$  y  $30 \times 10^8$  UFC/mL, presentaron diferencia estadística con respecto a los tratamientos controles con valores de  $P = 0.010$ ,  $P < 0.001$  y  $P = 0.026$  respectivamente (Tabla 7).

**Tabla 7.** Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp y el tratamiento control en el peso total de las plantas fabáceas.

Comparaciones	Error estándar	Significancia
1.5 x 10 <sup>8</sup> – Control	2.34060	0.010
15 x 10 <sup>8</sup> – Control	2.34060	<0.001
30 x 10 <sup>8</sup> – Control	2.34060	0.026



**Figura 16.** Prueba de Tukey de los pesos totales de las plántulas (g) de fabáceas inoculadas con *Rhizobium* sp.



**Figura 17.** Prueba de Tukey de los pesos totales de las plántulas (g) de fabáceas según las concentraciones de *Rhizobium* sp.



*Rhizobium* sp, estimuló los mejores pesos totales de las plántulas de habas, esto se debería que está considerado dentro de las bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos, siendo aplicado a semillas, tubérculos o raíces, ya que poseen la capacidad de colonizar raíces de las plantas y así lograr estimular el crecimiento y rendimiento del cultivo (Soriano & Gonzáles, 2012).

Los mecanismos que poseen estas bacterias, como promotoras del crecimiento no están bien comprendidos; por lo que se sugiere un amplio rango de posibilidades directos o indirectos (Díaz *et al.*, 2001), tales como su participación directa en la fijación de nitrógeno (Rojas *et al.*, 2009), la producción de enzimas de sideróforos (Santillana *et al.*, 2005), la solubilización del fósforo (Loredo *et al.*, 2004), la síntesis y producción de fitohormonas como las auxinas, citoquininas y giberelinas, la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fumárico y cítrico) (Lloret *et al.*, 2005) y disminuir la concentración del etileno (Karnwal, 2009); entre los efectos indirectos incluyen el incremento de fijación de nitrógeno, al aumentar el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa, induciendo resistencia sistémica a la planta (Ardakani *et al.*, 2010).

El más bajo promedio del peso total de las plántulas se determinó en tarwi, en la actualidad no existen trabajos previos que aborden a la diversidad bacteriana en las etapas vegetativa y reproductiva de la rizósfera de *Lupinus* sp, probablemente debido a que se encuentra en diferentes altitudes, y crece en suelos pobres de sustancias nutrientes; esta capacidad de tolerancia a las adversidades, se confieren a las rizósferas, por lo que resulta importante conocer la diversidad de bacterias rizosféricas de esta especie.

Nogales (2005), afirma que las rizobacterias tienen un rol importante en los ciclos biogeoquímicos, incrementando la descomposición de materia orgánica que también sirve de alimento para las plantas, así como la producción de fitohormonas (Ferrera & Alarcón,



2001), como el ácido indol acético capaz de acelerar y potenciar el crecimiento, mejoran la fertilidad de los suelos fijando nitrógeno libre y podrían ser utilizadas como potencial benéfico contra plagas y enfermedades (Franco, 2009); sin embargo, la densidad de la población de bacterias es afectada por la profundidad de suelo (Toro, 2004), debido a que a mayor profundidad la concentración de materia orgánica disminuye y la concentración de oxígeno se encuentra ilimitada, por lo que las bacterias a mayores profundidades son anaerobias.

En esta investigación el efecto ejercido por *Rhizobium* en el peso total de tarwi y arveja fue baja, lo que hace suponer que no habría estímulo en el crecimiento de las plantas; pero las referencias científicas afirman que las plantas del género *Lupinus* se asocian con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, las cuales poseen capacidad de fijar nitrógeno, por lo que son sugeridas para ser usadas en la rotación de cultivos y así mantener la fertilidad de los suelos (Stepkowski *et al.*, 2011), también están relacionadas con la restauración de suelos forestales, después de incendios. Por otro lado, las plantas silvestres del género *Lupinus* fueron utilizados como abono verde, incrementando la fertilidad del suelo, acidificando el suelo y solubilizando nutrientes.

Estas asociaciones bacterianas le permite a las plantas de *Lupinus* adaptarse a suelos pobres de nutrientes o suelos ácidos (Zamora & Terrazas, 2012); sin embargo, *Lupinus angustifolius* viendo siendo utilizado en remediación de suelos contaminados de metales pesados, incrementando su efecto cuando se co-inocula con *Bradyrhizobium* (Dary *et al.*, 2010), por otro lado, *Lupinus montanus* fue utilizado como planta nodriza para la reforestación con *Pinus hartwegii* (Ramírez & Rodríguez, 2009), en tal sentido queda abierta la posibilidad de realizar investigaciones en bacterias rizosféricas que promuevan el crecimiento vegetal en tarwi.



Las habas fueron las plantas más estimuladas por *Rhizobium* sp, debiendo probablemente a su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de sus raíces y del follaje de las mismas, la estimulación indirecta incluye los mecanismos por los cuales la bacteria inhiben la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Essalmani & Lahlou, 2003), la estimulación directa incluye la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002), la producción de fitohormonas (Perrine *et al.*, 2004), de enzimas (Mayak *et al.*, 2004) de sideróforos (Carson *et al.*, 2000) y la capacidad de solubilización de fosfatos (Rodríguez & Fraga, 1999).

La estimulación directa podría variar de planta a planta, según sus condiciones ambientales en el que se encuentran afectando el metabolismo bacteriano, tales como el tipo de sustrato orgánico, la textura del suelo y la distribución de nutrientes y oxígeno, la competencia con otros organismos, entre otros (Lucas, 1998).

#### **4.2.3 Longitud de raíces**

El mayor promedio de las longitudes de raíces de arveja fue de 3.43 cm con concentraciones bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL; en habas el más alto promedio fue de 6.63 cm con concentraciones de  $15 \times 10^8$  UFC/mL; y en tarwi el más alto promedio de longitudes de raíces se obtuvo con concentraciones de  $15 \times 10^8$  UFC/mL con 3.27 cm (Tabla 8).

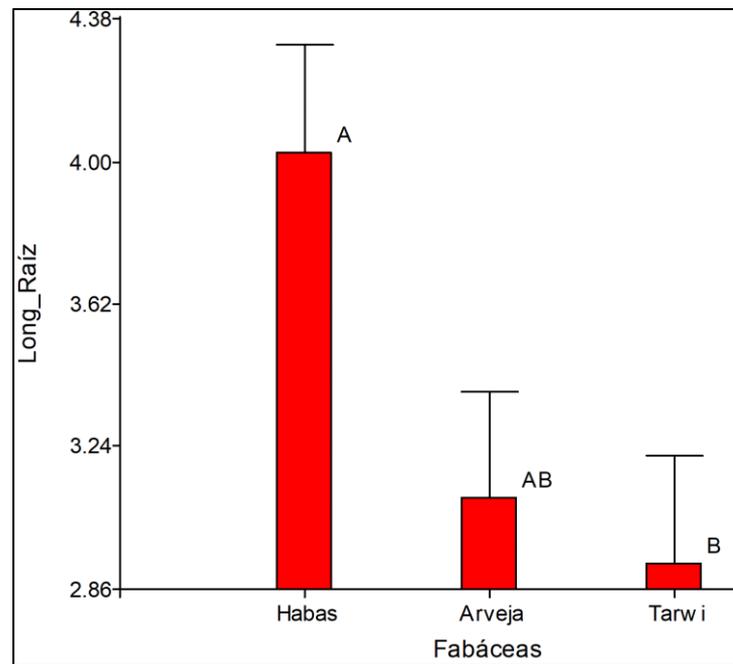
**Tabla 8.** Longitud de raíces (cm) de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculados con *Rhizobium* spa.

<b>Semillas inoculadas</b>	<b>Concentración</b>	<b>Rep 1</b>	<b>Rep 2</b>	<b>Rep 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>CV (%)</b>
Arveja	Control	2.7	2.6	2.3	2.53	8.22
	30 x 10 <sup>8</sup>	2.9	3.1	3.2	3.07	4.98
	15 x 10 <sup>8</sup>	3.4	3.5	3.2	3.37	4.54
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	3.2	3.4	3.7	3.43	7.33
Habas	Control	2.4	2.8	2.5	2.57	8.11
	30 x 10 <sup>8</sup>	3.7	3.8	3.4	3.63	5.73
	15 x 10 <sup>8</sup>	6.5	6.8	6.6	6.63	2.30
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	3.1	3.4	3.3	3.27	4.68
Tarwi	Control	2.3	2.8	2.5	2.53	9.93
	30 x 10 <sup>8</sup>	2.9	2.6	2.8	2.77	5.52
	15 x 10 <sup>8</sup>	3.1	3.4	3.3	3.27	4.68
	1.5 x 10 <sup>8</sup>	2.9	3.4	3.1	3.13	8.03

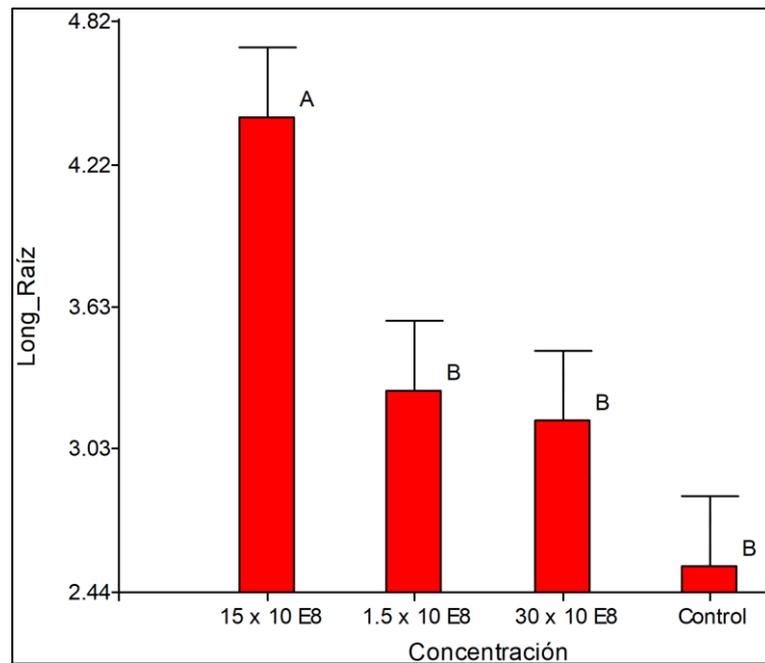
Las plántulas de habas presentaron los mayores promedios de longitudes de raíces, seguidos de arveja y tarwi con 4.03, 3.10 y 2.93 cm (Tabla 9), presentando diferencia significativa entre las semillas ( $F_c=4.27$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0225$ ) (Figura 18). La concentración bacteriana de 15 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, fue la que estimuló el mejor crecimiento de las raíces (4.42 cm), siendo superior a los tratamientos de 30 x 10<sup>8</sup> y 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL ( $F_c=7.29$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0007$ ), con promedios de 3.28 y 3.16 cm (Figura 19).

**Tabla 9.** Prueba de Dunnett comparando el efecto de las concentraciones de *Rhizobium* sp y el tratamiento control en las longitudes de las raíces de fabáceas (datos transformados a Log10).

Comparaciones	Error estándar	Significancia
$1.5 \times 10^8$ – Control	4.10247	0.198
$15 \times 10^8$ – Control	4.10247	<0.001
$30 \times 10^8$ – Control	4.10247	0.327



**Figura 18.** Prueba de Tukey de las longitudes de las raíces de las plántulas inoculadas con *Rhizobium* sp.



**Figura 19.** Prueba de Tukey de las longitudes de las raíces de las plántulas inoculadas con *Rhizobium* sp.

En la investigación, *Rhizobium* sp estimuló el mayor crecimiento de raíces en habas, dichos resultados concuerdan con Mayak *et al.* (2004) quienes mencionan la habilidad de las cepas de *Rhizobium* para producir ACC (ácido 1 – aminociclopropano – 1 – carboxílico) diaminasa, compuesto enzimático que reduce los niveles de etileno en las raíces de las plantas, incrementándose así la longitud y el crecimiento de las raíces de las plantas; mientras que Chabot *et al.* (1996), Yanni *et al.* (2001) y Perrine *et al.* (2004), sostienen que las moléculas promotoras del crecimiento vegetal como el ácido indol acético, las giberelinas y las citoquininas son producidas por bacterias del género *Rhizobium*, y se ubican en la rizósfera o en tejidos vegetales, estimulando el mayor desarrollo de sus raíces y de esta manera realizan la absorción de nutrientes de la raíz en beneficio de la planta no leguminosa, asimismo concuerda con Gutiérrez & Martínez (2001), quienes encontraron incrementos hasta un 42% de materia seca de la parte aérea y del 49% de materia seca de las raíces en plantas de maíz que fueron inoculadas con *Rhizobium etli*.



En esta investigación se observó que la inoculación de *Rhizobium* sp resultó con el mejor crecimiento de raíces de habas, seguido de arveja y tarwi, estos resultados concuerdan con lo mencionado por Soriano & Gonzáles (2012), quienes determinaron que las plántulas de *Capsicum annuum* L. var. Longum “páprika” y *Lactuca sativa* “lechuga” inoculadas con *Rhizobium etli* incrementaron significativamente la altura de las plántulas y las longitudes de sus hojas, y por ende de su peso total, debido a que son los parámetros morfológicos que se visualizan con mayor claridad del efecto del tratamiento bacteriano; sin embargo, Schloter *et al.* (1997), observaron que *Rhizobium*, no sólo colonizan las superficies de la raíz, sino también las células lisadas de la corteza radicular y en el espacio intracelular del centro de células de la raíz del cilindro.

La promoción del crecimiento de las raíces de las plántulas de fabáceas inoculadas con *Rhizobium* sp, se debería probablemente a la interacción de los simbioses y el hospedante, así como posiblemente la mayor fijación de nitrógeno, que asegura el mayor desarrollo radicular de las plantas, mejorando así la respuesta vegetal ante el estrés o sequía, estimulando el crecimiento general de las plántulas (Domit *et al.*, 1990), evidenciando la altura y el peso total de las plántulas, por otro lado, se menciona la producción de sideróforos microbianos, que juegan un rol importante en el biocontrol de algunas enfermedades vegetales transmitidas por el suelo y en nutrición de las plantas de hierro (Loper & Buyer, 1991).

Una carencia de hierro, puede originar la falta de estimulación de la bacteria en el crecimiento de las raíces de las plantas, para superar esta necesidad, las bacterias de la especie *Bradyrhizobium japonicum*, utilizan sus propios sideróforos y los que son producidos por otros organismos (Plessner *et al.*, 1993) y gracias a ello sobreviven en plantas no leguminosas (Antoun *et al.*, 1998), también se debería posiblemente a la capacidad de solubilización del fosfato (Halder & Chakrabarty, 1993), en donde un gran

número de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son capaces de solubilizar fosfatos y la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) (Wang *et al.*, 1982).

#### 4.2.4 Longitud de tallos

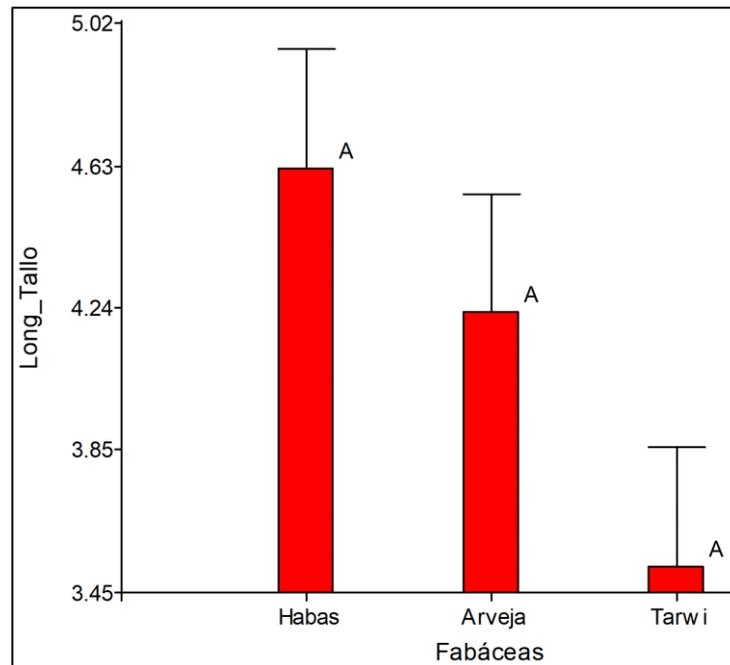
El mayor promedio de las longitudes de tallos de arveja (4.57 cm) se obtuvieron al inocular una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, por otro lado, los tallos de las habas presentaron el mejor crecimiento (7.37 cm) al inocularles concentraciones de  $15 \times 10^8$  UFC/mL, mientras tanto que en tarwi, el mejor crecimiento (4.13 cm) se obtuvo luego de la inoculación de una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (Tabla 10). Todos los tratamientos aplicando bacterias fueron superiores a los tratamientos controles.

**Tabla 10.** Longitudes de tallos (cm) de plántulas de arveja, habas y tarwi inoculadas con *Rhizobium* sp.

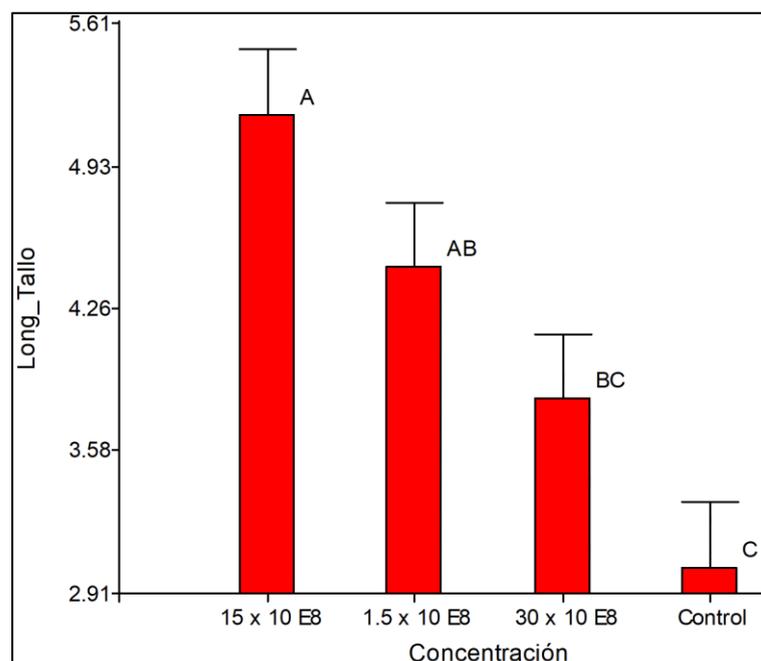
Semillas inoculadas	Concentración	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Promedio	CV (%)
Arveja	Control	3.6	3.5	3.2	3.43	6.06
	$30 \times 10^8$	4.3	4.7	4.5	4.50	4.44
	$15 \times 10^8$	4.3	4.1	4.8	4.40	8.19
	$1.5 \times 10^8$	4.3	4.6	4.8	4.57	5.51
Habas	Control	3	2.9	3.4	3.10	8.53
	$30 \times 10^8$	3.4	3.6	3.1	3.37	7.48
	$15 \times 10^8$	7.4	7.2	7.5	7.37	2.07
	$1.5 \times 10^8$	4.5	4.7	4.8	4.67	3.27
Tarwi	Control	2.8	2.3	2.6	2.57	9.80
	$30 \times 10^8$	3.4	3.8	3.7	3.63	5.73
	$15 \times 10^8$	3.8	3.6	3.9	3.77	4.06
	$1.5 \times 10^8$	3.9	4.1	4.4	4.13	6.09

Las plántulas de habas presentaron los mejores promedios en longitudes de tallos post inoculación bacteriana, seguidos de arveja y tarwi, no presentando diferencia significativa entre las semillas ( $F_c = 2.91$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.06.36$ ) (Figura 20). La

concentración bacteriana que mejor influyó en el crecimiento de los tallos fue  $15 \times 10^8$  UFC/mL, con un promedio de 5.18 cm, no presentando diferencia estadística con la concentración  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL ( $F_c=2.91$ ;  $g_l=2$ ;  $P=0.0636$ ) (Figura 21). Según la prueba de Dunnett, los crecimientos de los tallos no presentaron diferencia estadística significativa frente a los tratamientos controles.



**Figura 20.** Prueba de Tukey de las longitudes de los tallos de las plántulas inoculadas con *Rhizobium* sp.



**Figura 21.** Prueba de Tukey de las longitudes de tallos de las plántulas inoculadas con *Rhizobium* sp.

*Rhizobium* sp, fue aislada de la rizósfera de la alfalfa, esto se debería a que ésta es cepa nativa de zonas tropicales, está adaptada a las condiciones adversas de temperatura ambiental y la presencia de los exudados diferentes liberados por las plantas, su establecimiento eficiente de la bacteria en la rizósfera vegetal, puede variar debido al daño foliar, producto de la toxicidad por microelementos causado en las plántulas, convirtiéndolos en más susceptibles a los factores climáticos, motivo por el cual el porcentaje de sobrevivencia es muy bajo en algunas plantas, disminuyendo su crecimiento, siendo uno de los factores que afecta a los microorganismos rizosféricos el estadio fisiológico de las hojas de la planta, debido a que las hojas sintetizan aminoácidos, azúcares y flavonoides que se movilizan a la raíz, siendo excretados por ésta, promoviendo el desarrollo microbiano rizosférico (Cleveland *et al.*, 2004).

El aumento en altura y la longitud del tallo, se debería probablemente a la mayor producción de auxinas, lo cual coincide con lo indicado por Perrine *et al.* (2004), quienes afirman que los rizobios poseen un metabolismo que favorece la síntesis de moléculas promotoras del crecimiento como el ácido indol acético, las giberelinas y las citoquininas, que son secretadas en la rizósfera o en los tejidos de las plantas, estimulando el desarrollo de la raíz y la absorción de nutrientes en beneficio de la planta. Adriano *et al.* (2011), consideran que la inoculación microbiana necesita de condiciones apropiadas para el establecimiento e interacción que conduzca a la efectividad de la simbiosis bacteriana, a su vez ésta garantice la absorción de nutrientes para satisfacer las exigencias de la estimulación, estas condiciones pueden derivarse del microhábitat que implica tipo de suelo, influido por la especie y variedad del cultivo.



Cortes *et al.*, (2009) en el estudio de los microorganismos de la rizósfera de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), encontraron que las unidades formadoras de colonia de las bacterias totales, solubilizadoras de fosfatos y las fijadoras de nitrógeno de vida libre fueron más abundantes en las rizósferas de plantas con hojas completas y no en defoliadas, por tanto se afirman que la colonización microbiana son influenciadas por diversos factores como las condiciones ambientales (humedad y temperatura del suelo), la fenología, el estadio fisiológico de las plantas hospederas y la tasa de crecimiento radical (Brundrett, 2002), asimismo Cortes *et al.* (2009), aseveran que las poblaciones microbianas rizosféricas varían la estacionalidad y la edad de las plantas.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se rechaza la hipótesis planteada en el proyecto de investigación, en razón de que afirmaba que “*Rhizobium* sp a una concentración de  $30 \times 10^8$  UFC/ml, estimula mejor la germinación de semillas e incrementa el peso total de la planta, la longitud total de las raíces y la longitud de tallos de fabáceas (arveja, habas y tarwi) cultivadas en condiciones de laboratorio”, pero en la investigación se determinó que la concentración de *Rhizobium* sp que mejor estimuló la germinación, el peso y las longitudes de raíces y tallos fue  $15 \times 10^8$  UFC/ml.

En la presente investigación se puede afirmar que los aislamientos de *Rhizobium* sp aislados en los suelos del distrito de Taraco, provincia de Huancané, región Puno, presentaron mejores efectos en las habas (*Vicia faba*), esto probablemente a que genéticamente tendría mayor afinidad entre ellos, logrando una simbiosis óptima, por lo que sería apropiado recomendarlo como inoculante. Por otro lado, los mejores efectos en los procesos de germinación, el peso de las plántulas y longitudes de raíces y tallos, se obtuvieron inoculando plántulas de fabáceas con concentraciones de *Rhizobium* sp de  $15 \times 10^8$  UFC/ml, esto se debería probablemente a que un mayor número de bacterias no generaría metabolitos secundarios suficientes para la estimulación de la germinación de



sus semillas, ya que los reguladores del crecimiento vegetal, tienen una influencia importante en el crecimiento de la planta.



## V. CONCLUSIONES

- Las colonias de *Rhizobium* sp, fueron de color rosadas, textura cremosa, apariencia translúcida, bordes irregulares y altura plana en LMA – RC y colonias amarillas, amarillas verdosas y verdosas, con diámetros menores a 3 mm en LMA - ABT, todas fueron Gram negativas, los recuentos de *Rhizobium* sp fueron mayores en la localidad de Ramis, los que oscilaron entre  $225 \times 10^2$  y  $238 \times 10^2$  UFC/g, seguido de Sacasco con recuentos bacterianos de  $183 \times 10^2$  y  $193 \times 10^2$  UFC/g.
- *Rhizobium* sp, aislado a partir de nódulos de alfalfa, estimularon el mejor porcentaje de germinación, el peso total de las plántulas, el crecimiento de raíces y tallos en semillas de arvejas y en habas mayoritariamente, las concentraciones de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y  $15 \times 10^8$  UFC/mL fueron las que resultaron mejor en la estimulación e incrementos de sus longitudes y pesos.



## VI. RECOMENDACIONES

- A los investigadores y egresados de la Facultad de Ciencias Biológicas y ramas afines, realizar la identificación molecular de las especies de *Rhizobium* sp aisladas en suelos del Altiplano Peruano.
- A los investigadores de pre y posgrado, realizar inoculaciones experimentales en diferentes concentraciones y diversas semillas de fabáceass con la finalidad de obtener bioinoculantes propios del Altiplano Peruano.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña O., Rodríguez E., Llano A., Calderón V., Flores G., Viana A. & Lépiz R. 2001. *Validación técnica de inoculantes en frijol con cepas de Rhizobium eficientes en fijación de nitrógeno en Centro América*. Rev. Agronomía Mesoamericana. Vol. 12 (19): 25 – 32.
- Adriano M., Jarquín R., Hernández C., Salvador M. & Monreal T. 2011. *Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Texcoco – México. Vol. 2 (3).
- AGROBANCO, Banco Agropecuario del Perú. 2013. Memoria Anual Agrobanco 2012. Página Web: [http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/memorias/Memoria\\_2012.pdf](http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/memorias/Memoria_2012.pdf). Fecha de revisión 20 de setiembre del 2017.
- AgroEs. 2017. Haba, taxonomía, y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico. Página web: <http://www.agroes.es/cultivos-agricultura/cultivos-huerta-horticultura/haba/357-habas-descripcion-morfologia-y-ciclo>. Fecha de revisión 22 de setiembre del 2017.
- Alarcón E., Lozano A. & Chaparro H. 1997. *Caracterización fenotípica de los aislamientos rizobianos de Acacia (Acacia sp) y Retamo (Teline monpessulana)*. Rev. Colomb. Quím. Vol. 26: 27.
- Allard, R.W. 1999. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, New York, EUA. 254 p.
- Almarás J. & Ferrera R. 2010. *Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas*. En Ferrera R. & Alarcón A. (Edit.). Microbiología Agrícola, hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo. Editorial Trillas. México. pp. 225 – 238.
- Almaraz S. 2007. *Empleo de la técnica de raíz dividida en el estudio ecológico de la simbiosis Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris L. bajo sequía, México*.
- Alvarado C. & Blanco T. 2008. *Alimentos. Bromatología*. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Lima – Perú. 495 p.
- Álvarez D., Mateos J., Peinado V., Capó A. 2006. *Vicia faba L.: Capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metilmercurio*. Observatorio Medioambiental. Vol. 9: 111 – 123.



- Antoun H. Beauchamp Ch. & Goussard N. 1998. *Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non legumes. Effect on radishes (Raphanus sativus L.)*. Plant and Soil. 204: 57 – 67.
- Ardakani S., Heydari A., Tayebi L. & Mohammadi M. 2010. *Promotion of Cotton Seedlings Growth Characteristics by Development and use of New Bioformulations*. Int J Bot. 6(2):95-100.
- Arellano C., Santillana N. & Zúñiga D. 2005. *Capacidad Del Rhizobium De Promover El Crecimiento en Plantas de Tomate (Lycopersicon esculentum Miller)*. Ecología Aplicada. 5 p.
- Atlas R. & Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Cuarta edición. Editorial Addison Wesley. Madrid – España. 677 p.
- Baca B., Soto, L., & Pardo, M. 2000. *Fijación biológica de nitrógeno*. Elementos. 38:39-49.
- Ballati P. 1996. *Legume Inoculants*. Kingraf, La Plata, cap. 3, 6, 10.
- Ballesteros M. & Lozano A. 1994. *Evaluación de la fijación de nitrógeno por cepas de Rhizobium que nodulan frijol (Phaseolus vulgaris)*. Revista Colombiana de química. Bogota-Colombia. 12 p.
- Basham Y. 1995. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1938-1945.
- Benzing A. 2001. *Agricultura orgánica – fundamentos para la region andina*. Editorial Neckar – Verlag, Villingen – Schwenningen. Alemania. 682 p.
- Bottini R., Fulchieri M., Pearce D. & Pharis R. 1989. *Identification of gibberelinas A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> and ISO – A<sub>3</sub>, in cultures of Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. Vol. 90: 45 – 47.
- Bouton H. 2001. *Alfalfa*. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil. P. 545 – 547.
- Brack A. 1999. *Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú*. Editorial Bartolomé de las Casas. Cuzco – Perú. 550 p.
- Brockwell J. 1982. *Inoculation methods for field experimenters and farmers*. In Nitrogen Fixation in Legumes (J. M. Vincent, Ed.), pp. 211-227. Academic Press, Sydney.
- Brockwell J., Bottomley & Thies E. 1995. *Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment*. Plant and Soil. Vol. 174: 143-180.
- Brundrett M. 2002. *Co – evolution of roots and mycorrhizas of land plants*. New Phytol. Vol. 154: 275.



- Burns C. & Hardy F. 1975. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*.
- Caba M., Poveda L. & Ligeró F. 2001. *Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas*, disponible en: <http://193.146.205.198/sefin/Ligeró.html>.
- Caballero A. 2005. *Guías metodológicas para los planes y tesis de maestría y doctorado*. Editorial Ugraph SAC. Lima – Perú. 672 p.
- Caicedo C. & Peralta E. 2000. Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet.) en Ecuador: Quito, EC, Estación Experimental Santa Catalina. Boletín Técnico No. 89. p. 1 – 18.
- Caicedo C. & Peralta E. 2001. El cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet.) Fitonutrición, Enfermedades y Plagas en el Ecuador: Quito, EC, Estación Experimental Santa Catalina. Boletín Técnico No. 89. 180 p.
- Carranza Cl. 2004. *Aislamiento e identificación de cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, de frijol común (Phaseolus vulgaris) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango*. Tesis de Licenciatura de Química Bióloga. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 59 p.
- Carrillo L. 2005. *Manual de Microbiología Agrícola*. Editorial UNs. Argentina. 175 pgs.
- Carson K., Meyer J.M. & Dilworth M. 2000. *Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria*. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 32: 11-21.
- Celis A. & Labrada V. 2014. Bioestadística. 3ra Edición. Editorial El Manual 2365 Moderno. México, D.F. 337 p.
- Chabot R., Antoun H., Kloepper W. & Beauchamp J. 1996. *Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2767-2772.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. *Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. Colombia.
- Cleveland C., Townsend R., Schmidt K. & Constance C. 2004. *Soil microbial dynamics in Costa Rica: seasonal and biogeochemical constraints*. Biotropica. Vol. 36: 184 – 195.
- Condori E. 2002. *Sistemática de fanerógamas*. Ediciones Biología Editorial Universitaria. Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 388 p.



- Cortes J., Pérez J., Delgadillo J., Ferrera R. & Ballesteros G. 2009. *Estacionalidad y microorganismos rizosféricos de ilama (Annona diversifolia Saff.) en huertos naturales del trópico seco*. Terra Latinoamericana. Vol. 27 (1): 27 – 34.
- Coyne M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Editorial Paraninfo. España.
- Cuadrado B., Rubio G. & Santos W. 2009. *Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (Vigna unguiculata) como potenciales bioinóculos*. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm. Vol. 38 (1): 78 – 104.
- Dary M., Chamber M., Palomare A. & Pajuelo E. 2010. *“In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant – growth promoting rhizobacteria*. Journal of Hazardous Materials. Vol. 177: 323 – 330.
- Dey R., Pal K., Bhatt M. & Chauhan M. 2004. *Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachis hypogaea L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria*. Microbiological Research. 159: 371 – 394.
- Di Rienzo A., Casanoves F., Balzarini G., González L., Tablada M. & Robledo W. 2008. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz C. 2010. *Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.)*. Tesis doctoral. República Dominicana. 121 p.
- Díaz P, Ferrera R, Almaraz J. & Alcántar G. 2001. *Inoculación de Bacterias Promotoras de Crecimiento en Lechuga*. Terra Vol. 19 (4): 327-335.
- Domit L., Costa A., Vidor C. & Pereira S. 1990. *Inoculation of cereal seeds with Bradyrhizobium japonicum and its effect on soybeans grown in succession*. R Bras Ci Solo. Vol. 14: 313–320.
- Dommergues Y. 1985. *Mundo Científico*. Vol. 45: 276–285.
- Donaires T., Zamalloa W. & Salas del Pino M. 2001. *El lago Titicaca: Síntesis del conocimiento actual*. 35 pgs.
- DRA, Dirección Regional Agraria Puno. 2012. *Alfalfa reina de las forrajeras*. Boletín Informativo No. 7. 4 p.
- Elkan H. 1992. *Biological nitrogen fixation systems in tropical ecosystems*. Inglaterra, pp. 27-40.



- Essalmani H. & Lahlou H. 2003. *Mécanismes de bioprotection des plantes de lentile par Rhizobium leguminosarum contre Fusarium oxysporum sp. Lentis*. C.R. Biologies. Vol. 326: 1163 – 1173.
- Faiguenbaum, H. 2003. Haba. In: Labranza, Siembra y Producción de los principales cultivos de Chile. Ediciones Vivaldi y Asociados, Santiago, Chile. 760 p.
- FENALCE, Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas. 2006. El cultivo de la arveja en Colombia. Revista Produmedios. Bogotá - Colombia. 83 p.
- Ferrera R. & Alarcón A. 2010. *Microbiología Agrícola; hongos, bacterias, micro y macro fauna, control biológico y planta-microorganismo*. Editorial Trillas. Primera edición. México D.F. 568 p.
- Franco M. 2009. *Use of actinomycetes in processes biofertilization*. Rev. Perú. Biol. Vol. 16 (2): 239 – 242.
- Frink R., Waggoner E. & Ausubel H. 1999. *Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96: 1175 – 1180.
- Glick B. 1995. *The enhancement of plant growth by free – living bacteria*. Can. J. Microbiol. Vol. 41: 109 – 117.
- Granda K., Ochoa M., Ruilova V., Guamán F. & Torres R. 2014. *Evaluación de cepas nativas de Rhizobium sobre parámetros fenotípicos en fréjol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Revista del Centro de Biotecnología. Ecuador. Vol. 3 (1): 25 – 37.
- Gutiérrez A. & Martínez E. 2001. *Natural endophytic association between Rhizobium etli and maize (Zea mays L.)*. Journal of Biotechnology. Vol. 91: 117 – 126.
- Halder A. & Chakrabartty K. 1993. *Solubilization of inorganic phosphate by Rhizobium*. Folia Microbiol. Vol. 38: 325 – 330.
- Hernández E. 2014. *Efecto de Rhizobium spp y Boletus frostii en el crecimiento de plántulas de Quercus resinosa*. Tesis de Ingeniería. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Hernández R., Fernández C. & Baptista M. 2014. *Metodología de la Investigación*. Sexta edición. Editorial McGraw Hill Education. México. 600 p.
- Herridge F. 2008. *Inoculation technology for legumes*. In: Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E. (Eds.), *Leguminous Nitrogen-fixing Symbioses*. Kluwer, Netherlands, pp. 77 – 115.
- Herridge F., Peoples B. & Boddey M. 2008. *Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems*. Plant Soil. Vol. 311: 1 – 18.



- Huanca L. 2001. *Evaluación de dos cepas de Rhizobium meliloti con inoculación simple y peleteada en cultivos de alfalfa (Medicago sativa)*. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 61 p.
- Ibañez V. 2009. *Estadística aplicada*. Editorial Universitaria. Puno – Perú. 392 p.
- INEI – Perú, Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2011. *Puno compendio estadístico 2011*. Sistema Estadístico Regional. Oficina Departamental de Estadística e Informática. ODEI – Puno. 709 p.
- INIAF. Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal – Bolivia. 2017. Manual del Cultivo de Haba. Página web: <http://www.amdeco.org.bo/archivos/manualdelcultivodelhaba.pdf>. Fecha de revisión: 26 de setiembre del 2017.
- Jarvis B., van Berkum P., Chen W., Nour S., Fernández M., Cleyet J. & Gillis M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 47: 895.
- Jiménez R. & Lamo J. 1998. *Agricultura Sostenible*. Condición Agrofuturo Life. Ediciones Mundi – Prensa. España.
- Jordan D. 1984. *Gram – negative aerobic rods and cocci. Family III Rhizobiaceae*. En N. Krieg y J. Holt (edit.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co. Baltimores, USA. Vol. 1: 234 – 244.
- Karnwal A. 2009. *Production of Indole ACETIC Acid by Fluorescent Pseudomonas in the presence of L Tryptophan and rice Root Exudates*. J Plant Pathol. Vol. 91 (1): 61-63.
- Kuykendall D., Young J., Martínez E., Kerr A. & Sawada H. 2005. *Rhizobium*. Frank, 1889, 338. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. Editorial Springer US. p. 325-340.
- Lloret L. & Martínez E. 2005. *Evolución y Filogenia de Rhizobium*. Rev Latinoam Microbiol Vol. 47(1-2) 43 – 60.
- Loper E. & Buyer J. 1991. *Siderophores in microbial interactions on plant surfaces*. Mol. Plant – Microbe Int. Vol. 4: 5–13.
- López-Bellido, F.J., L. López-Bellido and R.J. López-Bellido. 2005. Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L). Europ. J. Agronomy 23: 359–378.



- Loredo C., Reyes L. & Espinosa D. 2004. *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal Asociadas con Gramíneas: Una Revisión*. Terra Latinoam. Vol. 22 (2): 225 – 239.
- Lucas J. 1998. *Estudio de la interacción planta – suelo – microorganismo y su aplicación en la mejora de la producción primaria de Lupinus sp.* Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad San Pablo CEU. España.
- Madigan M., Martinko J., Dunlap P. & Clark D. 2003. *Brock-Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, cap. 2, 4-6, 9, 10, 12-14, 17-20.
- Martínez, E., Palacios, R. & Mora J. 1998. *Cepas mejoradas de Rhizobium*. Investigación y Ciencia, Edición en español de Scientific American. Vol. 265: 14 – 19.
- Mayak S., Tirosh T. & Glick B. 2004. *Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress*. Plant Physiology and Biochemistry. 42: 565572.
- Mayea S., Caraone M., Novo R., Silveria E., Soria M., Morales Y. & Valiño A. 1998. *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana.
- Minamisawa K. 2004. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3096-3102.
- Montes L. 1999. *Efecto del fósforo en la nutrición nitrogenada del fríjol común (P. vulgaris)*. Disponible en: <http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nutricion/s.3-6.html>.
- Mora L. 2005. *Caracterización a nivel genético y molecular de la producción de bacteriocina por Rhizobium leguminosarum bv. viciae cepa Z25*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. España. 364 p.
- Morales I., Miranda G., Méndez V. & Morales C. 2010. *Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de suelos de zonas productoras de quinua*. La Paz-Bolivia. 8 p.
- Morales R. 1992. *Atrapamiento y caracterización de cepas de rizobios procedentes de suelos del algarrobal del monte*. Revista Multequina. Vol. 1: 181 – 188.
- Moreno L. & Galvis F. 2013. *Potencial biofertilizantes de bacterias diazótropas aisladas de muestras de suelo rizosférico*. Revista Pastos y Forrajes. Vol. 36 (1): 33 – 37.
- Murray S. & Larry S. 2009. *Estadística*. Editorial Mc Graw-Hill. México D.F. 595 pgs.
- Muslera E. & Ratera G. 1991. *Praderas y Forrajes, Producción y Aprovechamiento*. 2a Edición. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid – España. 674 p.



- Nadal, S. and M.T. Moreno. 2006. Optimal population density on determinate growth habit faba bean for immature green pod production. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 71(1): 37-39.
- Nogales B. 2005. *La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Ecosistemas*. Vol. 14 (2): 41 – 51.
- Patriarca E. 2002. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.
- Peñaloza A. & Márquez R. 1988. *Estudios bioquímicos y fisiológicos de cepas de Rhizobium loti aislados de Leucaena leucocephala*. *Rev. Lat. amer. Microbiol.*, 30:341-350.
- Pérez A., Grisales T. & Fuente J. 2011. *Determinación de morfotipos nativos de Rhizobium asociados a la leguminosa Teramnus volubilis Sw fincas ganaderas del municipio de Tolú en el Departamento de Sucre*. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.* Vol. 3(1): 62 – 89.
- 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*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 10 p.
- Pérez S. & Torralba A. 1997. *La fijación del nitrógeno por los seres vivos*. *Scriptus Naturae. Seminario*. Vol. 21 (01): 21 p.
- Perrine F., Rolfe B., Hynes M. & Hocart C. 2004. *Gas chromatography – mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of Rhizobium exudates*. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 42: 723 – 729.
- Plessner O., Klapatch T., Guerinot M. 1993. *Siderophore utilization by Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* Vol. 59: 1688 – 1690.
- Prado L. 2008. *Evaluación agronómica de dos líneas de arveja (Pisum sativum L) y su efecto a la fertilización química y orgánica, en el Cantón Chimbo*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad Estatal de Bolívar. Bolívar – Ecuador.
- Ramirez A. & Rodríguez D. 2009. *Plantas nodriza en la reforestación con Pinus hartwegii Lindl*. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. Vol. 15 (1): 43 – 48.
- Rebuffo M. 2005. *Programa Nacional de Plantas Forrajeras*. *Revista INIA - No 5. ALFALFA: Principios de manejo del pastoreo*.



- Reyes I., Alvarez L., El-Ayoubi H. & Valery A. 2008. *Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz*. Revista Bioagro. Vol. 20 (1): 37 – 48.
- Richardson A., Simpson R., Djordjevic M. & Rolfe B. 1988. *Expression of nodulation genes in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii is affected by low pH and by Ca and Al ions*, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54: 2541.
- Rodríguez H. & Fraga R. 1999. *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion*. Biotechnology Advances. Vol. 17: 319 – 339.
- Rojas D., Garrido M. & Bonilla R. 2009. *Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de Rhizobium sp.* Cien Tecn Agropec. Vol. 10 (1): 70-80.
- Rojas, A. 2011. *Manual de Microbiología: Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Taller de Publicaciones. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Colombia. 161 p.
- Romero N., Comerón E. & Ustarroz E. 1995. *La Alfalfa en la Argentina, manejo y utilización*. INTA Cuyo. pp. 150 – 170.
- Santillana N., Arellano C. & Zúñiga D. 2005. *Capacidad del Rhizobium de promover el crecimiento en plantas de tomate (Lycopersicon esculentum Miller)*. Rev. Ecología Aplicada. Lima – Perú. Vol. 4 (1,2): 47 – 51.
- Schlöter M., Wiehe W., Assmus B., Steindl H., Becke H., Höflich G. & Hartmann A. 1997. *Root colonization of different plants by plant-growth-promoting Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera*. Appl Environ Microbiol. Vol. 63: 2038 – 2046.
- Schoebitz M. 2006. *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp)*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 77 p.
- Sessitsch J., Howieson X., Perret H., Antoun H. & Martinez E. 2002. *Advances in Rhizobium Research*. Critical Reviews in Plant Sciences. Vol. 21 (4,1): 323 – 378.
- Sherman J., Camerom G. & Riveros F. 1991. *Leguminosas Forrajeras Tropicales*. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y alimentación (FAO). Colección FAO; Producción y Protección Vegetal No. 2. Roma.



- Siem D., Konczak I., Agboola S., Wood A. & Blanchard L. 2012. *In vitro* investigations of the potential health benefits of Australian-grown faba beans (*Vicia faba* L.): chemopreventative capacity and inhibitory effects on the angiotensin-converting enzyme,  $\alpha$ -glucosidase and lipase. *British Journal of Nutrition*. Vol. 108: 123 – 134.
- Simpson G. 1986. *Auxin stimulates lateral root formation of container-grown interior Douglas-fir seedlings*. *Can. J. For. Res.* Vol. 16: 1135 – 1139.
- Somasegaran P. & Hoben H. 1994. *Handbook of rhizobia: methods in legume – Rhizobium technology*. Springer – Verlag Eds. New York. 450 p.
- Soriano B. & Gonzáles A. 2012. *Efecto de la inoculación de Rhizobium etli sobre el crecimiento vegetal de páprika, Capsicum annuum var. Longum, y lechuga, Lactuca sativa*. *Rev. REBIOL. Trujillo – Perú. Vol. 32 (1): 31 – 41.*
- Sosa A., Elías A., García A. & Sarmiento M. 2004. *Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras*. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 38: 197 – 201.
- Soto J. & Gaca A. 2004. *Recolección, aislamiento e identificación de cepas de bacterias nativas de Jutiapa y Chimaltenango, del género Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, para el aprovechamiento de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol*. Informe Final Proyecto 14-01. Concyt, Fonacyt e Icta, Guatemala. 29 p.
- Spaink P. 2000. *Root Nodulation and Infections Factors Produced by Rhizobial Bacteria*. *Annual Review of Microbiology* 54:257-288. [http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/BVE684/htms/pdfs\\_revisao/estresse/infectionfactors.pdf](http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/BVE684/htms/pdfs_revisao/estresse/infectionfactors.pdf).
- Stepkowski T., Hughes C., Law I., Markiewiez L., Gurda D., Chibicka A. & Moulin L. 2007. *Diversification of Lupine Bradyrhizobium strains: Evidence from nodulation gene tres*. *Applied and Environmental microbiology*. Vol. 73 (10): 3254 – 3264.
- Subia R. 2001. *Evaluación de tres cepas introducidas de Rhizobium leguminosarum en cuatro variedades de arveja Pisum sativum L. para la zona interandina*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela Politcnica del Ejército. Sangolqui – Ecuador.
- Suquilanda M. (Edit.). 2017. *Producción Orgánica de Cultivos Andinos. Manual Técnico*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. FAO. 199 p. Página



- werb: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/mountain\\_partnership/docs/1\\_produccion\\_organica\\_de\\_cultivos\\_andinos.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf). Revisado el 20 de setiembre del 2017.
- Tang M. 2004. *Efecto de la inoculación con Rhizobium en el rendimiento de materia seca, contenido de nitrógeno y nodulación en Leucaena leucocephala*. Pastos y Forrajes, Vol. 17 (2): 5 p.
- Tapia C., Castillo R. & Mazon N. 1996. Catálogo de Recursos genéticos de Raíces y Tubérculos Andinos en Ecuador. Quito. EC. Estación Experimental Santa Catalina. 180 p.
- Toro D. 2004. *La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir*. Revista Luna Azul.
- Truchet G. 1993. *Mundo Científico* Vol. 133: 267-269.
- Vasquez E. & Guevara Z. 2015. *Aislamiento y caracterización de cepas de Rhizobium de pajuro (Erythrina edulis)*. Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería. Vol. 1 (1): 21 – 27.
- Wang T., Martinez J. & López I. 2002. *Rhizobium y su simbiosis con plantas*. Monografía. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wang T., Wood E. & Brewin J. 1982. *Growth regulators, Rhizobium and nodulation in peas. Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strains of R. leguminosarum*. Planta. Vol. 155: 343–349.
- Wright A. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6464-6474.
- Yanni Y., Rizk R., Fattah K. & Squartine A. 2001. *The beneficial plant growth-promoting association of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii with rice root*. Australian Journal of Plant Physiology. Vol. 28: 845 – 870.
- Young P. 1996. *Diversity and phylogeny of rhizobia*. Vol. 133: 87 – 94.
- Zarmora J. & Terrazas T. 2012. *Foliar and petiole anatomy of four species of Lupinus (Fabaceae)*. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 83: 687 – 697.
- Zuñiga D. 2012. *Manual de Microbiología agrícola*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima – Perú. 112 p.

## ANEXOS

**Tabla 11.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de los recuentos de *Rhizobium* en nódulos procedentes de las localidades de muestreo.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Recuento bacteriano (UFC/g..	9	0.94	0.92	3.49

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4738.89	2	2369.44	48.80	0.0002
Localidad	4738.89	2	2369.44	48.80	0.0002
Error	291.33	6	48.56		
Total	5030.22	8			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=17.45694**  
Error: 48.5556 gl: 6

Localidad	Medias n	E.E.
Ramis	231.67	3 4.02 A
Sacasco	186.67	3 4.02 B
Jasa Pacsellin	180.00	3 4.02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 12.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la germinación según las plantas inoculadas.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LOG10 Germinación de semil..	36	0.21	0.17	13.11

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.32	2	0.16	4.49	0.0188
Plantas inoculadas con Rhi..	0.32	2	0.16	4.49	0.0188
Error	1.16	33	0.04		
Total	1.47	35			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.18769**  
Error: 0.0351 gl: 33

Plantas inoculadas con Rhi.. Medias n E.E.

	Medias n	E.E.
Habas	1.56	12 0.05 A
Arveja	1.38	12 0.05 A B
Tarwi	1.35	12 0.05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 13.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la germinación según la concentración de bacterias inoculadas.

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3513.33	3	1171.11	8.51	0.0003
Número de células bacteria..	3513.33	3	1171.11	8.51	0.0003
Error	4404.67	32	137.65		
Total	7918.00	35			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.98450**  
Error: 137.6458 gl: 32

Número de células bacteria.. Medias n E.E.

	Medias n	E.E.
15 x 10 E8	45.22	9 3.91 A
1.5 x 10 E8	30.33	9 3.91 A B
30 x 10 E8	26.56	9 3.91 B
Control	17.89	9 3.91 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 14.** Análisis de varianza y prueba de Tukey del peso total de la plántula según la planta inoculada.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso total de la plántula ..	36	0.39	0.36	30.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5.38	2	2.69	10.75	0.0003
Plantas inoculadas con Rhi..	5.38	2	2.69	10.75	0.0003
Error	8.26	33	0.25		
Total	13.64	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.50113

Error: 0.2503 gl: 33

Plantas inoculadas con Rhi..	Medias	n	E.E.
Habas	2.17	12	0.14 A
Arveja	1.61	12	0.14 B
Tarwi	1.23	12	0.14 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 15.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la longitud de la raíz según la planta inoculada.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud de la raíz (cm)	36	0.21	0.16	29.59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.39	2	4.19	4.27	0.0225
Plantas inoculadas con Rhi..	8.39	2	4.19	4.27	0.0225
Error	32.43	33	0.98		
Total	40.81	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.99299

Error: 0.9826 gl: 33

Plantas inoculadas con Rhi..	Medias	n	E.E.
Habas	4.03	12	0.29 A
Arveja	3.10	12	0.29 A B
Tarwi	2.93	12	0.29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 16.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la longitud de la raíz según la concentración bacteriana inoculada.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud de la raíz (cm)	36	0.41	0.35	25.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16.57	3	5.52	7.29	0.0007
Número de células bacteria..	16.57	3	5.52	7.29	0.0007
Error	24.24	32	0.76		
Total	40.81	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.11151

Error: 0.7574 gl: 32

Número de células bacteria..	Medias	n	E.E.
15 x 10 E8	4.42	9	0.29 A
1.5 x 10 E8	3.28	9	0.29 B
30 x 10 E8	3.16	9	0.29 B
Control	2.54	9	0.29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 17.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de los tallos según la planta inoculada.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud del tallo (cm)	36	0.15	0.10	27.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.44	2	3.72	2.91	0.0686
Plantas inoculadas con Rhi..	7.44	2	3.72	2.91	0.0686
Error	42.21	33	1.28		
Total	49.65	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.13292

Error: 1.2790 gl: 33

Plantas inoculadas con Rhi.. Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.
Habas	4.63	12	0.33 A
Arveja	4.23	12	0.33 A
Tarwi	3.53	12	0.33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 18.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de los tallos según la concentración bacteriana inoculada.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud del tallo (cm)	36	0.15	0.10	27.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.44	2	3.72	2.91	0.0686
Plantas inoculadas con Rhi..	7.44	2	3.72	2.91	0.0686
Error	42.21	33	1.28		
Total	49.65	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.13292

Error: 1.2790 gl: 33

Plantas inoculadas con Rhi.. Medias n E.E.

	Medias	n	E.E.
Habas	4.63	12	0.33 A
Arveja	4.23	12	0.33 A
Tarwi	3.53	12	0.33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Fotografías de los campos de cultivo de alfalfa**



**Figura 22.** Zona de muestreo de nódulos, comunidad de Sacasco.



**Figura 23.** Zona de muestreo de nódulos, zona Ramis.



**Figura 24.** Toma de muestra y almacenamiento de nódulos.



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



**Registro: 014-2022**

## **CONSTANCIA**

EL QUE SUSCRIBE, **DOCENTE RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE BOTÁNICA Y BIOTECNOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.

### **HACE CONSTAR:**

Que el (la) Bachiller **WILLIAM ELBIS HILASACA YUJRA**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **“CARACTERÍSTICAS CULTURALES, RECUENTOS BACTERIANOS Y EFECTO DE RHIZOBIUM SP EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TRES LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN LA REGIÓN PUNO EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de agosto a diciembre del año 2021.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del (a) interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 18 de abril del 2022.

  
**JUAN JOSÉ PAURO ROQUE, Dr. Sc.**  
Responsable del Laboratorio de Botánica y Biotecnología  
FCCBB – UNA Puno



## AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo WILLIAM ELBIS KILASACA YUJRA  
, identificado con DNI 44969675 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

BIOLOGIA

, informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación para la obtención de  Grado

Título Profesional denominado:

"CARACTERÍSTICAS CULTURALES, RECUELTOS BACTERIANOS Y EFECTO DE *Rhizobium sp.* EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TRES LEGUMINOSAS EN CONDI. LABOR.

" Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 06 de JULIO del 2023

FIRMA (obligatoria)



Huella



## DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo WILLIAM ELBIS HILASACA YUJRA  
identificado con DNI 44969675 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

BIOLOGÍA

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación para la obtención de  Grado

Título Profesional denominado:

"CARACTERÍSTICAS CULTURALES, RECIENTOS BACTERIANOS Y EFECTO DE Rhizobium sp. EN LA GERMINACIÓN

DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TRES LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN LA REGIÓN PUNO EN

" Es un tema original.

CONDICIONES DE LABORATORIO

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 06 de JULIO del 2023

  
FIRMA (obligatoria)



Huella