



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

Tema: Caracterización de *Rhizobium* spp. a partir de haba (*Vicia faba* L.) en cuatro localidades del cantón Tisaleo

Informe final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Cynthia Monserrath Morales Miranda

TUTOR: Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

Ambato – Ecuador

Marzo 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de febrero 2023

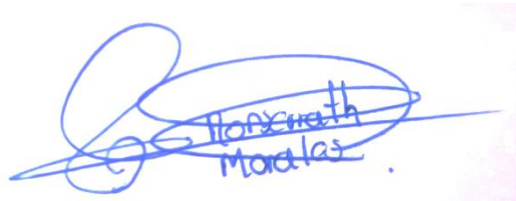
Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1802726628

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Cynthia Monserrath Morales Miranda, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Cynthia Monserrath Morales Miranda

C.I. 1805455738

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

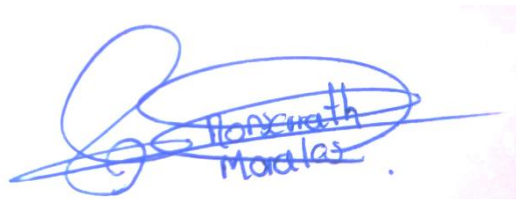
C.I. 180357158-5

Ambato, 09 de marzo del 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Cynthia Monserrath Morales Miranda

C.I. 1805455738

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres, Eduardo Morales y Karina Miranda

A mis hermanos Carol, Valentina y Sebas

A mi abuelita Esmeralda Muñoz

A mi fiel compañero Cheester

A mi compañero de vida Christian Romero

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien me enseñó que sus tiempos siempre son perfectos.

A mis padres, quienes fueron el pilar más importante en cada etapa de mi vida y sin duda, gracias a su apoyo incondicional estoy cumpliendo una de las metas más importantes.

A mi abuelita Esmeralda, quien ha estado muy pendiente de mi en este largo camino.

A mi compañero de vida que siempre estuvo dispuesto ayudarme en todo lo que necesité, gracias por todo Chris.

A mi tutora Mg. Ruth Pérez, por confiar en mí y ayudarme durante todo este proceso.

A la Dra. Helena de la Torre y a la Mg. Alejandra Sánchez por ser parte de este equipo y apoyarme en todo lo que necesité.

A mis compañeros de la universidad quienes siempre estuvieron para sacarme una sonrisa, especialmente a Joyce y Cinthya por su amistad incondicional y a Jenny por no soltarme en este duro proceso.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Problemática ambiental causada por fertilizantes químicos.....	1
1.1.2. Proceso de simbiosis leguminosa- rizobio	5
1.1.3. Planta leguminosa: Haba (<i>Vicia faba</i>).....	8
1.2. Objetivos.....	12
1.2.1. Objetivo general	12
1.2.2. Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO II	13
2. METODOLOGÍA.....	13
2.1. Materiales	14
2.2. Métodos	18
2.2.1. Localización del área de muestreo	18
2.2.2. Recolección de muestras	19

2.2.3. Prospección de la búsqueda de nódulos	20
2.2.4. Procesamiento de los nódulos en el laboratorio	21
2.2.5. Aislamiento primario de <i>Rhizobium</i>	22
2.2.6. Aislamiento secundario	23
2.2.7. Tinción de Gram.....	24
2.2.8. Caracterización microscópica de <i>Rhizobium</i> spp.	25
2.2.9. Caracterización morfológica de <i>Rhizobium</i> spp.	25
2.2.10. Pruebas Bioquímicas para la identificación del género <i>Rhizobium</i>	25
2.2.11. Aislamiento de ADN y BOX-PCR fingerprinting.....	31
2.2.12. Desarrollo de PCR y electroforesis para comprobar el género <i>Rhizobium</i>	34
CAPÍTULO III.....	37
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1. RESULTADOS	37
3.1.1. Recolección de nódulos.....	37
3.1.2. Aislamiento primario y secundario	42
3.1.3. Pruebas bioquímicas.....	49
3.1.4. Distancia genética BOX-PCR	65
3.1.6. PCR y gel de electroforesis	67
3.2. Verificación de hipótesis	68
CAPÍTULO IV	69
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
4.1. Conclusiones.....	69
4.2. Recomendaciones	70
MATERIAL DE REFERENCIA.....	71
ANEXOS	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la planta leguminosa V. faba	10
Tabla 2. Equipos de laboratorio	14
Tabla 3. Materiales de laboratorio.....	15
Tabla 4. Reactivos de laboratorio.....	16
Tabla 5. Insumos y materiales de escritorio	17
Tabla 6. Sectores del cantón Tisaleo donde se obtuvieron los nódulos de V. faba... 18	
Tabla 7. Cebador que se va a utilizar en esta investigación.	32
Tabla 8. Condiciones de la PCR.....	35
Tabla 9. Características para la selección de nódulos en la localidad 1	39
Tabla 10. Características para la selección de nódulos en la localidad 2	40
Tabla 11. Características para la selección de nódulos en la localidad 3	40
Tabla 12. Características para la selección de nódulos en la localidad 4	41
Tabla 13. Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 1 145	
Tabla 14. Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 2 46	
Tabla 15. Características morfológicas de las 8 muestras en la localidad 3.....	47
Tabla 16. Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 4 48	
Tabla 17. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 1	52
Tabla 18. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 2	54
Tabla 19. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 3	56
Tabla 20. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 4.....	58
Tabla 21. Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol.....	61
Tabla 22. Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol.....	62
Tabla 23. Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol.....	63

Tabla 24. Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol.....	64
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nódulos de <i>V. faba</i>	7
Figura 2. Planta de <i>V. faba</i>	8
Figura 3. Zona de muestreo.....	19
Figura 4. Procedimiento del muestreo.....	21
Figura 5. Protocolo de desinfección de nódulos en el laboratorio	22
Figura 6. Proceso de aislamiento primario de <i>Rhizobium</i> spp.	23
Figura 7. Procedimiento de aislamiento secundario	24
Figura 8. Metodología para Tinción de Gram.....	25
Figura 9. Proceso para analizar la prueba Rojo de metilo y Voges Proskauer	27
Figura 10. Protocolo que siguió para la prueba de catalasa	28
Figura 11. Protocolo para realizar la prueba Hidrólisis de almidón	29
Figura 12. Metodología que se siguió para realizar la prueba sulfuro de hidrógeno.....	30
Figura 13. Protocolo para la realización de la prueba TSI	31
Figura 14. Protocolo para obtener el sedimento bacteriano	33
Figura 15. Protocolo de extracción de ADN	34
Figura 16. Protocolo de PCR y electroforesis en gel de agarosa	36
Figura 17. Árbol filogenético de las cepas obtenidas.....	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Planta de haba.....	87
Anexo 2. Transporte de muestras.....	87
Anexo 3. Muestras etiquetadas en bolsas de papel	87
Anexo 4. Recolección de muestras	87
Anexo 5. Desinfección de nódulos	88
Anexo 6. Medio de cultivo YMA	89
Anexo 7. Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de V. faba	89
Anexo 8. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados.....	90
Anexo 9. Pruebas de autenticidad con púrpura de bromocresol	91
Anexo 10. Bandas corridas en electroforesis en gel de agarosa	91
Anexo 11. Análisis en el programa GelAnalyzer	92
Anexo 12. Análisis de las bandas en PyElph	92
Anexo 13. Análisis en el programa NTSYpc.....	92
Anexo 14. Permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente para trabajar con una especie comercial.	94

RESUMEN

La productividad agrícola se ve limitada por los nutrientes disponibles en el suelo, especialmente el nitrógeno. Actualmente, se utiliza fertilizantes químicos para mejorar la producción, pese a la contaminación que estos generan. Las alternativas biotecnológicas dan un nuevo enfoque mediante la fijación de nitrógeno en leguminosas. En esta investigación se utilizó nódulos a partir de haba (*V. faba*) una leguminosa comercial y esencial por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales; capaz de fijar nitrógeno a través de *Rhizobium* spp. Se recolectaron 32 muestras en 4 localidades del cantón Tisaleo que se caracterizaron morfológicamente donde el 90 por ciento de estas presentaron características similares a *Rhizobium* spp. Se realizaron pruebas bioquímicas en donde el 100 por ciento de estas fueron positivas para rojo de metilo, Voges Proskauer, hidrólisis de almidón y catalasa, sin embargo, el 98 por ciento de estas fueron negativas para sulfuro de hidrógeno y TSI. Se desarrolló una BOX-PCR, para identificar la distancia genética existente entre las mismas, a partir de muestras compuestas (16), se evidencio gran variabilidad genética, con la formación 2 grupos a partir de un coeficiente de similitud del 51 por ciento, siendo la muestra que más similitud presentó en relación con las demás QLU56 perteneciente a la localidad 4 y las muestras que tuvieron un 95 por ciento del coeficiente de similitud fueron ATS 78 y ATS12, pertenecientes a la localidad 2. Los resultados obtenidos son de relevancia para futuras investigaciones que involucran la elaboración de biofertilizantes como una alternativa a disminuir la contaminación.

Palabras clave: *Rhizobium* spp., leguminosa, Tisaleo, variabilidad genética, biotecnología agrícola

ABSTRACT

Agricultural productivity depends on the nutrients available in the soil, especially nitrogen. Currently, chemical fertilizers are used to improve production, without considering the pollution they generate. Biotechnological alternatives give a new approach to nitrogen fixation in legumes. In this research, nodules from broad bean (*V. faba*) were used, a commercial and essential legume due to its high content of proteins, vitamins and minerals; capable of fixing nitrogen through *Rhizobium* spp. 32 samples were collected in 4 locations of Tisaleo that were morphologically characterized, where 90 percent of them presented characteristics similar to *Rhizobium* spp. Biochemical tests were performed where 100 percent of these were positive for methyl red, Voges Proskauer, starch hydrolysis, and catalase, however, 98 percent of these were negative for hydrogen sulfide and TSI. A BOX-PCR was developed, to identify the existing genetic distance between them, from composite samples (16), great genetic variability was evidenced, with the formation of 2 groups from a similarity coefficient of 51 percent, being the sample that presented the most similarity in relation to the other QLU56 belonging to locality 4 and the samples that had a 95 percent similarity coefficient were ATS 78 and ATS12, belonging to locality 2. The results obtained are important for future research that involve the elaboration of biofertilizers as a friendly alternative to the environment.

Keywords: *Rhizobium* spp., legume, Tisaleo, genetic variability, agricultural biotechnology

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Problemática ambiental causada por fertilizantes químicos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estima que para el año 2030 la demanda total de productos agrícolas será un 60% mayor que en la actualidad (FAO, 2017). El mundo en la última mitad del siglo se ha enfocado en el aumento de los rendimientos de los cultivos para satisfacer una demanda cada vez mayor de alimentos (FAO, 2018). El suelo juega un papel importante dentro de esta problemática ya que depende del mismo la determinación de una productividad sostenible que pueda abarcar la cantidad de alimentos necesarios (Motta et al., 2019). La productividad sostenible de un suelo depende principalmente de su capacidad para abastecer nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y potasio a las plantas en periodo de crecimiento. La deficiencia de estos nutrientes se ha convertido en una barrera considerable para la productividad, la sostenibilidad y la estabilidad de los suelos (Esquivel, 2018).

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento de las plantas, sin embargo, el mismo no está presente de manera natural en el suelo a pesar de que el contenido de éste en la atmósfera es el más alto entre todos los gases atmosféricos (79%) (Artz et al., 2018). La entrada de nitrógeno se produce a través de la raíz de la planta para su nutrición y la productividad de los cultivos, este proceso depende de la degradación de la materia orgánica, las aplicaciones de fertilizantes sintéticos y la fijación biológica de nitrógeno a través de la actividad de la enzima nitrogenasa (Ney et al., 2019).

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU) existe una demanda emergente para disminuir la utilización de los fertilizantes químicos y aumentar la sostenibilidad de la agricultura (ONU, 2020). Debido a que el uso de fertilizantes nitrogenados representa un gasto considerable para los agricultores, además de que únicamente el 50% de este producto es recibido por la planta y lo demás está sujeto a pérdidas debido a los diferentes cambios climáticos, sobre todo cuando existen fuertes lluvias; causando graves problemas de contaminación en lagos y lagunas (Santi et al., 2019).

Es importante encontrar una alternativa biotecnológica capaz de fijar nitrógeno a las plantas que sea óptima, eficiente, ecológica y económica; con la finalidad de abarcar la producción de alimentos suficientes que demandará la población en un futuro, evitando de esta manera problemas graves de desnutrición. Además, también es fundamental disminuir la contaminación ambiental causada por los diferentes fertilizantes y los sobrepagos que demandan los mismos (Tortora et al., 2019).

1.1.1.2. Fijación del nitrógeno

El nitrógeno cumple con una función primordial dentro del crecimiento de las plantas, debido a que es un componente importante de la clorofila en donde se realiza el proceso de fotosíntesis, además interviene en la producción de enzimas, vitaminas, ácidos nucleicos y proteínas; los cuales participan directamente en el metabolismo celular y su estructura (Orchardson, 2020). Las plantas asimilan el nitrógeno únicamente cuando éste se encuentra combinado, es decir, cuando se produce una transformación previa de nitrógeno gaseoso (N_2) a amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-) o nitratos (NO_3^-); para esto, existen dos maneras de fijar nitrógeno: no biológica y biológica (Silva et al., 2017).

1.1.1.3. Fijación no biológica del nitrógeno

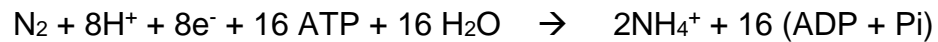
Esta fijación también conocida como fijación abiótica se produce de manera natural cuando existen tormentas eléctricas, incendios, combustiones automovilísticas o combustiones producidas en fábricas; estos procesos químicos espontáneos al mezclarse con el oxígeno presente en la atmósfera se disuelven en la lluvia formando óxidos de nitrógeno como nitritos (NO_2^-) o nitratos (NO_3^-) (**Barrera & Sáenz, 2016**). La cantidad de nitrógeno fijado en las plantas a través de este procedimiento contribuye aproximadamente con un 10% del total de nitrógeno anual fijado (**Blesh, 2018**).

Otra manera de fijar el nitrógeno de forma no biológica es mediante la utilización de fertilizantes nitrogenados, en donde se transforma el nitrógeno de la atmósfera (N_2) en amoníaco (NH_3) (**Barrera & Sáenz, 2016**). Este procedimiento de fijación demanda algunas limitaciones como el uso de instalaciones sofisticadas en donde haya una temperatura aproximadamente de $500\text{ }^\circ\text{C}$ y una presión de 300 atm; emplea combustibles poco durables, para obtener 1 kilogramo de nitrógeno se necesitan 85 litros de gas más 2 litros de petróleo y requiere de catalizadores inorgánicos en donde se involucran altos costos de producción (**Alemayehu et al., 2018**). Estos fertilizantes han aumentado su precio a lo largo del 2021, el más común en la agricultura es la urea, ya que contiene altas cantidades de nitrógeno y presenta estabilidad, por ello, el precio del mismo se ha triplicado en los últimos 12 meses (**FAO, 2022**). Esta manera de fijar nitrógeno en la planta aporta aproximadamente con un 25% del total de nitrógeno fijado durante todo el año (**Yoneyama et al., 2019**).

1.1.1.4. Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno se encuentra en la naturaleza como N_2 , sin embargo, la planta es incapaz de adquirir el nitrógeno de esta manera, por ello, gran parte del nitrógeno que absorben las plantas es gracias al proceso de fijación simbiótica que se lleva a cabo mediante

microorganismos diazótrofos, dentro de los cuales se encuentra el género *Rhizobium* spp. (Mahmud et al., 2020). Estas bacterias convierten el nitrógeno atmosférico en amonio para que la planta pueda abastecerse de este nutriente y crezca en óptimas condiciones, durante este procedimiento ocurre la siguiente reacción:



Fuente: (Wen et al., 2021)

Dicha reacción está catalizada mediante un complejo enzimático que se llama nitrogenasa, un complejo proteico que se encuentra compuesto por enzimas con cofactores metálicos, el cual hace posible la fijación de nitrógeno en las plantas (Torabian et al., 2019). Esta proteína consta de dos componentes: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa (Dong & Song, 2020).

De acuerdo con el metal de unión del cofactor en el sitio activo se encuentran tres tipos de dinitrogenasa: nitrogenasa de molibdeno (Mo), la cual es la más abundante debido a que permite el crecimiento de bacterias y arqueas que fijan nitrógeno; nitrogenasas de vanadio (V) y hierro (Fe) (Angeles & Cruz, 2017). Este tipo de nitrogenasa está codificada por los genes *nifD* y *nifK* y la dinitrogenasa reductasa es un homodímero codificada por el gen *nifH* (Nag et al., 2020).

El proceso de transformación de nitrógeno atmosférico a amonio inicia una vez que los electrones utilizados en la reducción se unen con la dinitrogenasa a través de una ferredoxina con la finalidad de que los electrones lleguen a la dinitrogenasa reductasa, de esta manera comienza el proceso de reducción ya que cada dos electrones transferidos se comienza a hidrolizar una molécula de ATP (Luo et al., 2019); la dinitrogenasa reductasa reducida empieza a trabajar en conjunto con la dinitrogenasa para transferirle los suficientes electrones (Bianco & Cenzano, 2018). Cuando la dinitrogenasa de molibdeno se encuentra reducida, los protones y electrones

comienzan a dirigirse al nitrógeno atmosférico para finalmente transformarlo y obtener como resultado dos moléculas de amonio (Mus et al., 2018).

Es importante mencionar que la dinitrogenasa es sensible al oxígeno, ésta durante este procedimiento resulta ser inactivada, por ello, los bacteroides deben evitar contener oxígeno en altas concentraciones (Salgado & Largo, 2017), sin embargo, durante este proceso debe existir oxígeno en una concentración adecuada para que la fosforilación oxidativa se lleve sin ningún inconveniente y la misma pueda abastecer ATP a la dinitrogenasa (Darnajoux et al., 2017). Debido a estas circunstancias, la simbiosis existente entre rizobio y leguminosa ha generado mecanismos para proteger a la dinitrogenasa, una de ellas es el desarrollo de nódulos, los cuales se encuentran cubiertos por una capa de células con el fin de proporcionar adecuadas concentraciones de oxígeno. Finalmente, el amonio obtenido es asimilado por la planta cuando el mismo desarrolla glutamato, glutamina y flavonoides (Signorelli et al., 2020).

1.1.2. Proceso de simbiosis leguminosa- rizobio

Las leguminosas son una gran fuente de alimento dentro de la agricultura se encuentran en el segundo grupo de cultivos más importantes después de los cereales, aportando con un 26% de la producción mundial de cultivos (Concha et al., 2020). Las plantas leguminosas son capaces de interactuar con las bacterias que crecen el suelo, las cuales se conocen como rizobios, mediante esta interacción se establece la simbiosis leguminosa- *Rhizobium* spp. (Encarna & Ramírez, 2016). Este tipo de plantas almacenan estas bacterias en sus raíces, específicamente en los nódulos, estructura en donde se fija el nitrógeno atmosférico (Buhian & Bensmihen, 2018).

Esta simbiosis ofrece a la planta amonio y la planta ayuda a que las bacterias se alimenten a través de fuentes de carbono (Nápoles et al., 2016). La eficacia de esta interacción depende de la infección de estas bacterias a la planta y de la estructura protectora del nódulo, además la planta leguminosa durante este proceso debe invertir

una gran cantidad de energía para poder albergar y contribuir con el desarrollo de estas bacterias (**Rutten et al., 2021**). Se ha estimado que esta simbiosis aporta aproximadamente con un 80% de nitrógeno asumible por cultivos agrícolas (**Mendoza et al., 2020**).

Durante el proceso de simbiosis se puede identificar dos procesos, la infección causada por las bacterias y la formación de nódulos en la raíz (**Brenes & Peña, 2022**). Para la formación de este nuevo órgano existe un intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria, el cual se conoce como diálogo molecular, en donde la planta expone por los radicales los cuales contienen aminoácidos, azúcares y compuestos flavonoides; estos últimos son los encargados de la transcripción de los genes *nod* necesarios para el proceso de nodulación (**Gourion et al., 2015**). Esta transcripción es regulada por el gen *nodD* y los compuestos flavonoides que se encuentran en la planta activan la proteína NodD, la cual induce la transcripción de los genes de nodulación *nodABC* y estabiliza la síntesis de los factores Nod (**Garrido et al., 2018**). Los rizobios son microorganismos genéticamente diversos que pueden infectar al huésped a través del pelo radical, de células epidérmicas y de cualquier tipo de heridas que sufra la raíz; siendo la primera la más común (**Quilbé et al., 2021**).

Cuando se ha establecido el reconocimiento químico entre la planta y el rizobio se desarrolla un bulto en el ápice del pelo radicular, desencadenando una infección causada por las bacterias (**Schulte et al., 2021**). Esta infección llega a la raíz produciendo un cambio hormonal el cual se desarrolla en las células del córtex, el canal de infección se divide y se une a las células de división, las células del córtex se rompen y comienzan a producir la estructura nodular (**Wang et al., 2021**). Las bacterias se liberan al citoplasma celular a través de endocitosis mediante una estructura denominada gota de infección, una vez liberadas dejan de ser bacterias y se transforman en bacteroides, estas se unen a la membrana peribacteroidal y mediante el fluido del mismo da lugar al simbiosoma, la unidad fijadora de nitrógeno (**Huang et al., 2018**). Después de este procedimiento el nódulo se encuentra totalmente activo siendo capaz de fijar nitrógeno activando el gen *nif* el cual codifica la dinitrogenasa

que transforma el nitrógeno atmosférico a amonio, éste es asimilado por la planta en forma de amidas o ureidos (Goyal et al., 2021).

1.1.2.1. Tipos de nódulos

Los nódulos de leguminosas se diferencian en dos tipos: indeterminados producidos generalmente por guisantes y tréboles y determinados formados por soja y frijol común, este tipo de nódulos se encuentran presentes en la raíz de *Vicia faba* (Figura 1) (Wang et al., 2018). Este tipo de nódulos se originan a partir de divisiones celulares que inician en la corteza interna además poseen un meristema apical resistente, tienen una estructura cilíndrica formando un gradiente desde el ápice hasta la base del nódulo (Liu et al., 2018). Los nódulos determinados son el resultado de divisiones celulares que se producen en la corteza media externa de la raíz, no poseen meristema persistente y su forma es esférica. Las divisiones celulares de esta clase de nódulo terminan en las primeras etapas de desarrollo y el nódulo maduro crece a través del agrandamiento celular, este proceso ocurre cuando las células infectadas se desarrollan al mismo tiempo que el proceso de fijación de nitrógeno (Etesami, 2022).

Figura 1.

Nódulos de V. faba



Nota: Esta figura muestra la estructura y la coloración respectiva de los nódulos formados en la raíz principal como en raíces secundarias, esta muestra fue tomada de *Vicia faba*.

1.1.3. Planta leguminosa: Haba (*Vicia faba*)

Figura 2.

Planta de V. faba



Las leguminosas son alimentos importantes por su alto valor nutritivo, facilidad de conservación y su bajo costo de producción, *V. faba*, una planta leguminosa que comúnmente se conoce como haba, es la cuarta leguminosa de estación fría más cultivada después del guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) y la lenteja (*Lens culinaris*) (Tobar, 2018). El cultivo de habas se remonta a los comienzos de la agricultura, sin embargo, sigue siendo un cultivo importante en la actualidad debido a su alto potencial de rendimiento, ya que ofrece un alimento de gran nutrición,

que es fuente de proteína, almidón, celulosa y minerales. Su alto rendimiento y gran adaptación a diferentes ambientes además de servir como un cultivo de cobertura ha hecho que esta planta sea de gran interés para los agricultores (Cooper et al., 2017). Al igual que otros cultivos de leguminosas, las habas juegan un papel fundamental para mejorar cultivos de cereales y mejorar la fertilidad del suelo (Maalouf et al., 2019).

Esta planta es una de las fuentes de proteína más baratas en la mayoría de los países en desarrollo como África, América Latina y Asia (Zhao et al., 2021). En Ecuador el cultivo de habas se desarrolla en las provincias de la Sierra específicamente en Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja; aproximadamente existe 26.000 hectáreas cultivadas con esta leguminosa en todo el país (Añino et al., 2020). La época de siembra es de febrero hasta octubre, sin embargo, en el caso de que existiera condiciones adecuadas como la disponibilidad de riego se puede sembrar en cualquier época del año (Khazaei et al., 2018).

La planta de haba presenta una gran capacidad para fijar nitrógeno aporta aproximadamente entre 150 a 500 kg N/ha (kilogramo nitrógeno/ hectárea), a pesar de que, durante este procedimiento influye de una manera considerable la acidez del suelo en la formación de nódulos, en la evolución del rizobio en el suelo, en la infección de la bacteria y en la fijación de nitrógeno (Rahate et al., 2021). La nodulación de estas plantas es gracias a la infección de bacterias del género *Rhizobium* spp., en donde se han determinado las especies *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium fabae* sp. nov, *Rhizobium anhuiense*, *Rhizobium vallis* y *Rhizobium sophorae* (Chen et al., 2018).

1.1.3.1. Taxonomía de *Vicia Faba*

Tabla 1.

Taxonomía de la planta leguminosa V. faba

Jerarquía taxonómica	
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embriofita
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Rosanae
Orden	Fabales (Leguminosas)
Familia	Fabaceae (Papilionaceae)
Género	<i>Vicia</i>
Especie	<i>Vicia faba</i> L.

Nota: La información de esta tabla se obtuvo de (ITIS, 2022).

1.1.4. Bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* spp.

Rhizobia es un nombre genérico que engloba a bacterias Gram-negativas de *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* que pueden formar nódulos en la raíz, o en algunos casos en los tallos, de sus hospedantes y fijar nitrógeno en simbiosis con las leguminosas como sus plantas hospedantes (Walker et al., 2020). El género *Rhizobium* spp. fue el primer grupo descrito de estas bacterias, esta especie se ha utilizado con frecuencia para las bacterias fijadoras de nitrógeno en las leguminosas (Lindström & Mousavi, 2020). Se encuentran entre las bacterias del suelo más beneficiosas, se conocen como fertilizantes biológicos, son más conocidas por su alto

nivel de fijación de N₂ y su capacidad para generar sustancias que promueven el crecimiento de las plantas (**Heath et al., 2020**), además a través de herramientas biotecnológicas se puede producir cualquier cantidad de cepas de la misma con la finalidad de investigar y contribuir con los problemas agrícolas que existen en la actualidad (**Oliveira et al., 2017**).

Cabe mencionar que en Ecuador se ha realizado investigación sobre rizobios en cultivos de fréjol, arveja, alfalfa, trébol, soya y maní, en donde han realizado caracterización fenotípica y genotípica del rizobio de fréjol y maní (**Carpio, 2014**). Con respecto a rizobios asociados al cultivo de *V. faba*, no se han realizado investigaciones ni mucho menos se han utilizado técnicas moleculares como PCR.

1.1.5. Importancia de BOX-PCR

En la actualidad existen técnicas moleculares que permiten identificar a que especie corresponde el microorganismo en estudio, a través de la secuenciación del genoma (**Bilung et al., 2018**). Una de las más utilizadas es BOX-PCR debido a su sencillez, eficacia y bajo costo; es un método potencialmente capaz de examinar simultáneamente muchas regiones de ADN dispersas en el genoma bacteriano a través del cebador BOX-A1R. Los patrones de esta técnica no se ven afectados por la edad del cultivo de la cepa que se va a analizar y los resultados de las huellas dactilares se pueden verificar fácilmente mediante programas bioinformáticos (**Lopes et al., 2019**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar *Rhizobium* spp. a partir de haba (*Vicia faba* L.) en cuatro localidades del cantón Tisaleo.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Rhizobium* spp. que nodulan en la especie *V. faba* mediante técnicas microbiológicas basadas en cultivo.
- Identificar a los aislados por medio de pruebas bioquímicas.
- Evaluar la distancia genética entre los aislamientos por medio de PCR fingerprinting.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación es de tipo cualitativa, ya que se realizan los experimentos necesarios para caracterizar cualitativamente la presencia de *Rhizobium* spp. en los aislados de *V. faba* a través de pruebas bioquímicas y de la realización de una PCR fingerprinting y una electroforesis en gel. La variable independiente del estudio serán los nódulos presentes en las plantas de *V. faba* y la variable dependiente serán que las cepas obtenidas presenten características similares al género *Rhizobium* spp.

Las hipótesis para comprobar en esta investigación son:

Hipótesis nula:

Las cepas aisladas a partir de nódulos de *V. faba* presentan características morfológicas, bioquímicas y diversidad genética que no pertenecen al género *Rhizobium* spp.

Hipótesis alternativa:

Las cepas aisladas a partir de nódulos de *V. faba* presentan características morfológicas, bioquímicas y diversidad genérica que pertenecen al género *Rhizobium* spp.

2.1. Materiales

Tabla 2.

Equipos de laboratorio

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave (Triden)	1
Balanza analítica (SCIENTECH)	1
Termociclador (Biorad)	1
Cámara de electroforesis (Biorad)	1
Fuente de poder	1
Nevera (4 °C) (LG)	1
Congelador (-20 °C) (Binder)	1
Ultra congelador (-80 °C) (Binder)	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2 ((OptiMAIRR)	1
Microcentrífuga	1
Vórtex (Labnet/Mixer/VX200)	1
Microscopio óptico	1
Incubadora (memmert)	1
Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)	1
Plancha de calentamiento (Labnet)	1

Tabla 3.*Materiales de laboratorio*

MATERIALES	CANTIDAD
Espátula	2
Mechero de alcohol	2
Tubos de ensayo	40
Tubos falcon	25
Tubos de ensayo con tapa	40
Vasos de precipitación 100 ml	5
Varilla de vidrio	1
Asa de inoculación	4
Asa de siembra Drigalski	2
Matraz de 100 ml	3
Cajas mono Petri plásticas	100
Pipetas x 10 ml	5
Gradilla	3
Aguja de inoculación	2
Portaobjetos	1 caja
Cubreobjetos	1 caja
Juego de micropipetas	2
Tubos para microcentrífuga	100
Tubos 0.2 mL para PCR	100
Bisturí	4
Puntas de micropipeta 200 µl	100
Puntas de micropipeta 20 µl	100
Puntas de micropipeta 10 µl	100

Tabla 4.*Reactivos de laboratorio*

REACTIVOS	CANTIDAD
Caldo MR-VP	500 mL
Cristal Violeta	10 ml
Rojo Congo	500 g
Manitol (5%)	100 g
Medio LB	37 g
Agar levadura manitol YMA	500 g
Safranina	10 ml
Alcohol cetona	10 ml
Agua destilada	5 L
Agua ultrapura estéril	500 ml
Etanol 95%	1 L
Etanol 70%	1 L
Agua oxigenada 30%	150 ml
Agar TSI	15 g
Agar SIM	15 g
Hipoclorito de sodio	1 L
Medio Agar almidón	15 g
Rojo de metilo	10 ml
α - naftol	10 g
KOH	25 ml
Lugol	10 ml
GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT. 50 RX. THERMO SCIENTIFIC	1
DREAMTAQ GREEN PCR MASTER MIX 200 RX THERMO SCIENTIFIC	1
Buffer TAE	275 ml

REACTIVOS	CANTIDAD
Escalera de peso molecular (GENERULER 1kb DNA LADDER, READY TO USE. 50 µg THERMO SCIENTIFIC)	1
Agarosa	500 mg
Sybr Safe DNA Gel Stain	1

Tabla 5.

Insumos y materiales de escritorio

INSUMOS Y MATERIALES	CANTIDAD
Cofias	caja x 100 unidades
Papel aluminio	3 rollos
Papel film	4 rollos
Mascarillas	caja x 100 unidades
Guantes de examinación	2 cajas x 50 pares
Tijeras	2
Etiquetas	20
Rotulador	2
Palas	2
Azadón	2
Fundas de papel	20
Alcohol antiséptico	1 litro
Gel antibacterial	1 litro
Jabón líquido	1 litro
Cloro	1 galón
Gasas	30
Algodón	2 fundas
Computadora	2
Cámara fotográfica	1

2.2. Métodos

Para cumplir con el aislamiento de las cepas de *Rhizobium* spp. que nodulan en la especie *V. faba* mediante técnicas microbiológicas basadas en cultivo se desarrolló a través de la siguiente metodología:

2.2.1. Localización del área de muestreo

Para el muestreo de los nódulos en *V. faba* se seleccionaron 4 zonas pertenecientes al cantón Tisaleo la primera localidad fue en el centro de Tisaleo Barrio “El paraíso”, la segunda en Alobamba Barrio “Troncal de la Sierra”, la tercera en Santa Lucía Barrio “Cuatro Esquinas” y la última en Quinchicoto Barrio “La Unión”. Como se puede observar en la figura 3 cada una de las localidades se ubicaron en diferentes zonas geográficas, con la finalidad de encontrar distintas características de clima, de altura, de suelo y de cultivo.

Tabla 6.

Sectores del cantón Tisaleo donde se obtuvieron los nódulos de V. faba

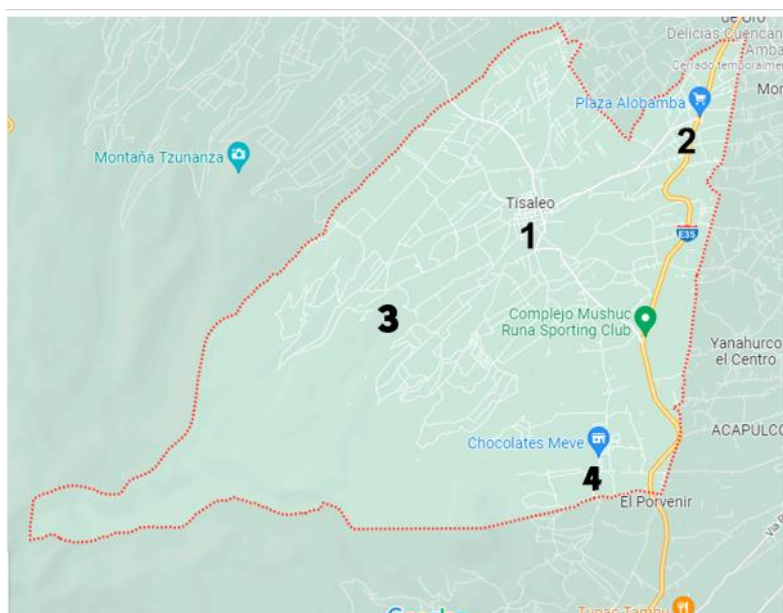
Número de localidad	Parroquia	Barrio	Coordenadas	Código	Número de muestras por localidad
1	Centro de Tisaleo	“El paraíso”	1°21'00"S 78°40'00"O	CTP	8
2	Alobamba	“Troncal de la sierra”	1°22'0" S, 78°37'60" W	ATS	8

3	Santa Lucia	“Cuatro Esquinas”	-1.36667 - 78.6667	SLCE	8
4	Quinchicoto	“La Unión”	1°23'11.90"S y 78°39'26.97"O	QLU	8

Nota: Identificación de las 4 localidades del cantón Tisaleo con sus respectivos barrios y códigos.

Figura 3.

Zona de muestreo



Nota: Los números que se encuentran en el mapa geográfico corresponden a las localidades que se encuentran en la tabla 8.

2.2.2. Recolección de muestras

Para la presente investigación, las muestras fueron compradas, teniendo en cuenta la disposición del agricultor, puesto que el haba es una especie comercial en base al anexo 14.

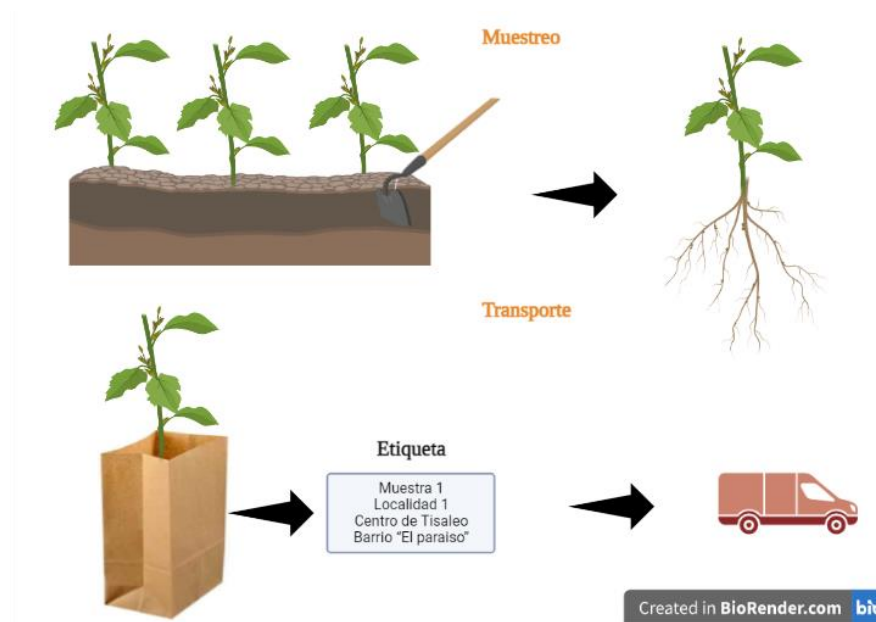
2.2.3. Prospección de la búsqueda de nódulos

Una vez definidas las 4 localidades, se procedió a la toma de muestra, en donde se seleccionaron 8 plantas por cada punto de muestreo con un total de 32 plantas de *V. faba*, en este punto se tomó muy en cuenta la disponibilidad del agricultor, se escogieron plantas jóvenes y vigorosas en floración debido a que durante el proceso de floración existe una simbiosis mucho más evidente. El tipo de muestreo que se realizó en las 4 localidades fue en Zig zag, para evitar que el fertilizante que se haya utilizado en el cultivo no se encuentre justamente en una misma línea de cultivo y además porque los terrenos eran planos (**Espinoza & Mendoza, 2017**).

El proceso de cada muestra inició con la limpieza de las zonas cercanas a la planta, posteriormente se retiró la tierra con ayuda de palas y azadones evitando daños en el sistema radicular donde se encuentran los nódulos, luego se recogió la planta completa, se guardó en fundas de papel y se cubrió la raíz con una pequeña cantidad de la misma tierra en donde se encontraba la planta para evitar que las bacterias se pierdan o se mueran hasta transportarlas al laboratorio, ya que por lo general esta bacteria es susceptible al oxígeno (**Primieri et al., 2022**). Se colocó una etiqueta en las fundas de papel para identificar el número de muestra y la localidad de la misma (anexo 4); con la finalidad de evitar confusiones entre muestras (**Pérez, 2021**).

Figura 4.

Procedimiento del muestreo



2.2.4. Procesamiento de los nódulos en el laboratorio

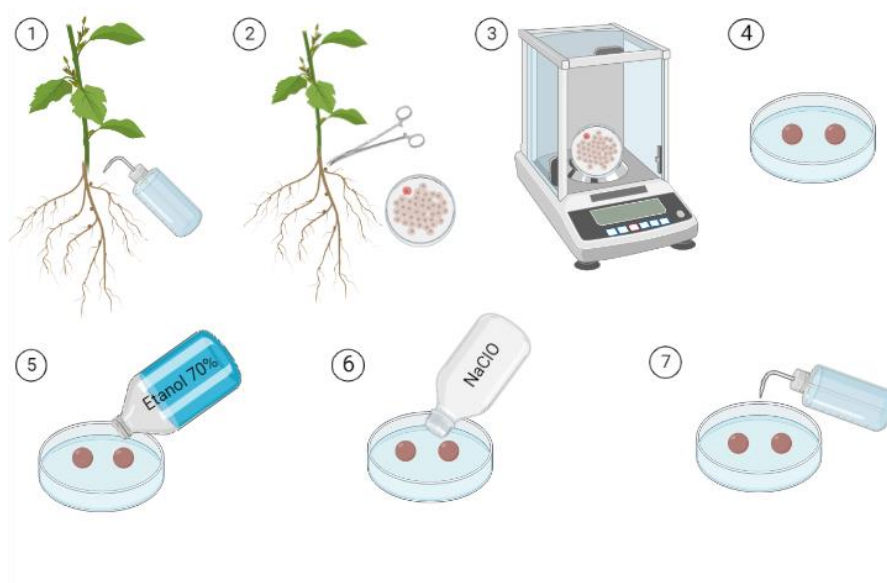
Una vez que las muestras se encuentran en el laboratorio se retiró toda la tierra adherida a las raíces y se lavó con agua destilada por 6 veces durante 1 min por cada lavado, se separaron las raíces de los tallos utilizando bisturí o tijeras que fueron previamente desinfectadas. Se procedió a cortar con bisturí o tijeras esterilizadas todos los nódulos que se encontraban en la raíz principal y se pesó utilizando una balanza analítica con la finalidad de obtener el peso fresco de los nódulos ya que es un indicador confiable de la capacidad de fijación de nitrógeno (Coelho, 2021).

Se seleccionaron dos nódulos teniendo en cuenta que exista una buena nodulación, es decir, que los nódulos sean grandes, que de preferencia se encuentren en la raíz principal y que tengan un color rojo intenso (García & Sato, 2019). Los nódulos se

desinfectaron 6 veces por inmersión sucesiva superficialmente en etanol al 70 % durante 60 s, seguidamente de una solución de hipoclorito de sodio al 3 – 5 % (v/v) de 2 a 4 min y se lavaron 6 veces con agua destilada (**Hernández et al., 2018**).

Figura 5.

Protocolo de desinfección de nódulos en el laboratorio



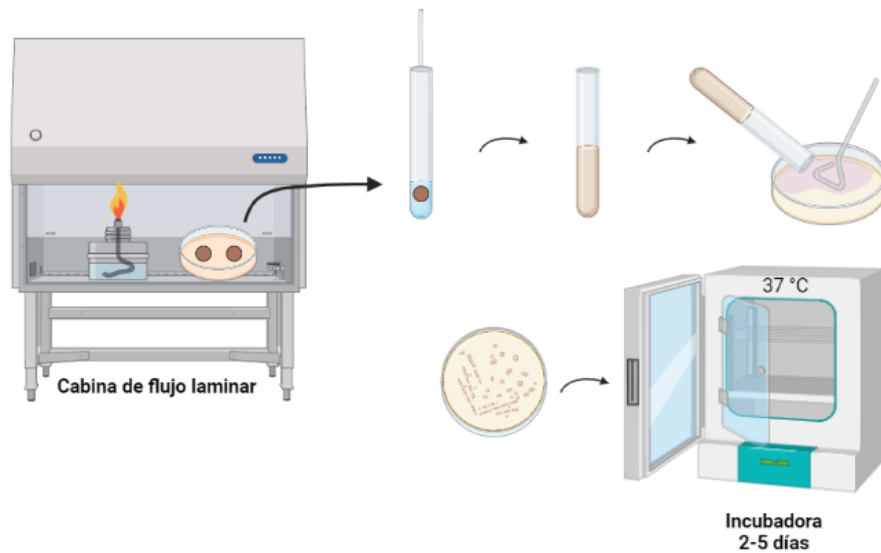
2.2.5. Aislamiento primario de *Rhizobium*

Los nódulos estériles se colocaron dentro de la cámara de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación donde se encontraba un mechero de alcohol encendido con la finalidad de esterilizar cualquier tipo de material a utilizar, los nódulos se colocaron en tubos de ensayo que contenían 1 gota de agua destilada estéril y con ayuda de una varilla de vidrio se procedió a triturarlos hasta conseguir una secreción lechosa. Para el proceso de siembra se utilizó agar levadura-manitol (YMA: manitol 7 g/L, extracto de levadura 2 g/L, K_2HPO_4 0,4 g/L y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L),

se sembró empleando un asa de Drigalsky sobre una caja Petri que contenía 25 ml del mismo y se incubó a 37 °C durante 2 a 5 días (Efstathiadou et al., 2021).

Figura 6.

Proceso de aislamiento primario de Rhizobium spp.

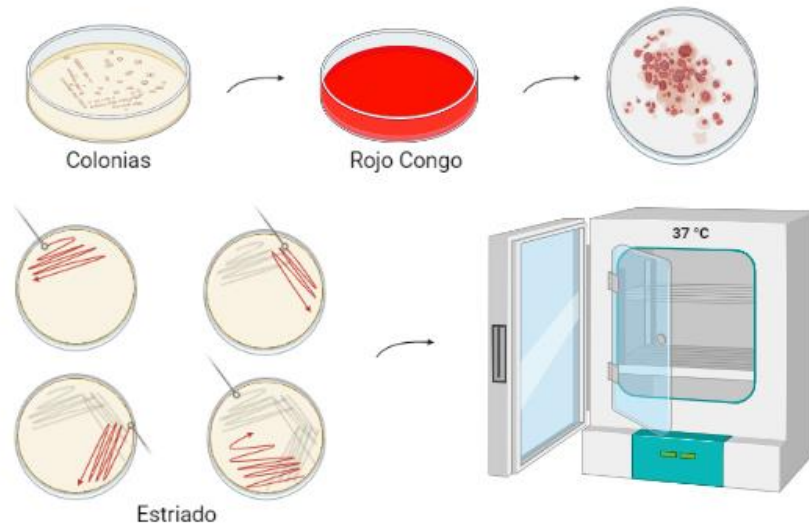


2.2.6. Aislamiento secundario

Las colonias individuales obtenidas se purificaron mediante estrías repetidas en medio YMA suplementado con 25 mg/l de rojo Congo, se procedió a incubar durante 2-5 días a 37 °C hasta la obtención de cultivos puros. Se procedió a criopreservar para realizar pruebas bioquímicas y moleculares en donde se tomó 1 colonia perteneciente a cada muestra y se sembró en tubos eppendorf que contenían 750 μ L de caldo YMA y se procedió a incubar durante 24 horas a 37 °C, finalmente se añadió 300 μ L de glicerol al 20% y se almacenó en -80 °C (Primieri et al., 2022).

Figura 7.

Procedimiento de aislamiento secundario



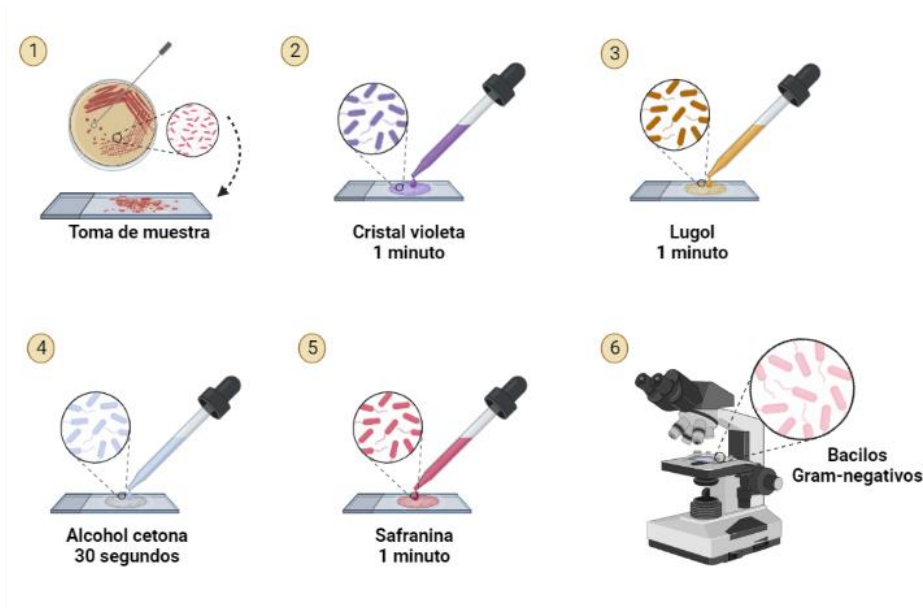
Para la identificación de los aislados por medio de pruebas bioquímicas se siguió la siguiente metodología:

2.2.7. Tinción de Gram

Se colocó una gota de agua destilada y con un asa de siembra se tomó una colonia y se extendió en un portaobjetos con la finalidad de preparar el frotis, con la ayuda de un mechero de alcohol la muestra se fijó durante unos segundos, con precaución, se añadió 1 gota de cristal violeta sobre la muestra durante 1 min, el exceso se retiró con agua destilada, se añadió 1 gota de Lugol durante 1 min retirando el exceso con agua destilada, se añadió 1 gota de alcohol-cetona durante 30 s para decolorar y se retiró el exceso con agua destilada, se añadió safranina durante 1 min y el exceso se retiró con agua destilada, finalmente se observó en el microscopio óptico (**Rodríguez, 2017**).

Figura 8.

Metodología para Tinción de Gram



2.2.8. Caracterización microscópica de *Rhizobium* spp.

Se observaron las características como el tamaño, la forma y el color de cada aislado luego de realizar tinción de Gram a través de un microscopio óptico (Mir et al., 2020).

2.2.9. Caracterización morfológica de *Rhizobium* spp.

Se identificó las características de cada cepa que se aisló en donde se tomó en cuenta la forma, el color, el aspecto y el borde propios de *Rhizobium* spp. (Fathy et al., 2021).

2.2.10. Pruebas Bioquímicas para la identificación del género *Rhizobium*

Los cultivos aislados puros se sembraron en medios de cultivos específicos para cada una de las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de *Rhizobium* spp. entre las que se encontraron prueba de rojo de metilo, prueba de Voges Proskauer, prueba de catalasa, hidrólisis de almidón, producción de sulfuro de hidrógeno y prueba de triple azúcar (Díez, 2019).

2.2.10.1. Rojo de metilo

Para la realización de esta prueba se empleó un caldo de cultivo R.M.V.P (polipeptona 7 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g y agua destilada 1000 ml; pH 6,9). Se preparó una solución indicadora de rojo de metilo, se disolvió 0,1 g de rojo de metilo en 300 mL de etanol al 95%, se diluyó luego con agua destilada hasta 500 mL y se incubó a 37 °C durante un periodo 24-48 horas. Se inoculó utilizando el asa de siembra transfiriendo una colonia de cultivo puro a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo, se incubó a 37 °C por 24 a 48 horas. Finalmente, se transfirió 5 mL del cultivo a un tubo de ensayo y se añadió 5 gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo. Para la interpretación de resultados una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo, una coloración amarilla constituye una reacción negativa (Gil, 2019).

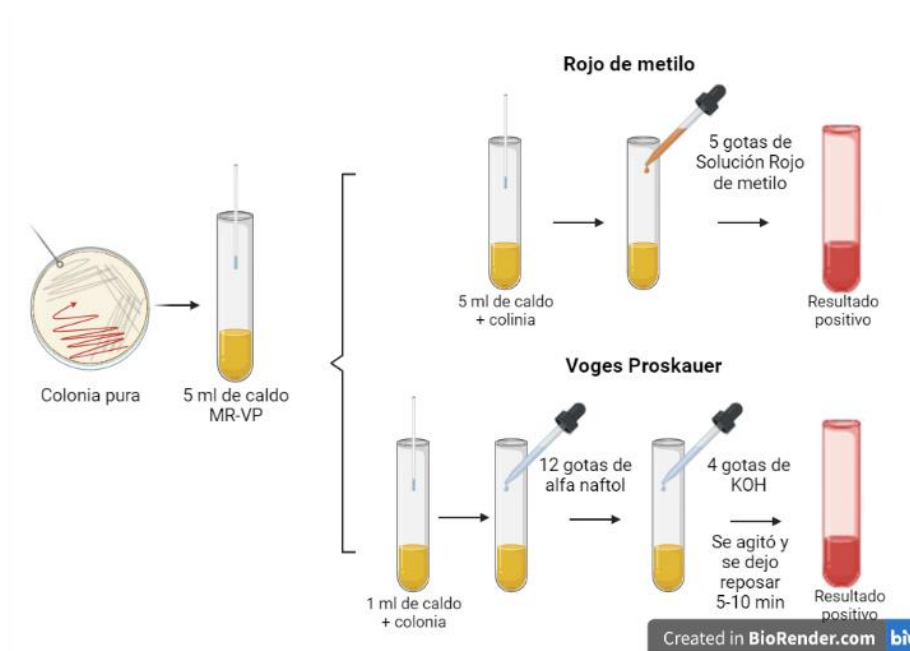
2.2.10.2. Prueba Voges Proskauer

En esta prueba se empleó caldo de cultivo R.M.V.P (polipeptona 7 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g y agua destilada 1000 ml; pH 6,9). Se inoculó utilizando el asa de siembra transfiriendo una colonia de cultivo puro a un tubo de ensayo que contenía 5 ml de caldo, se incubó a 35 °C por 24 a 48 horas. Para esta prueba se necesitaron dos reactivos el primero consistió en disolver 0,8 g de α - naftol al 5% en 160 mL de etanol al 95% y para el segundo reactivo se disolvió 64 g de KOH al 40% en 160 ml de agua

destilada. Finalmente, a 1 mL de cultivo se añadió 12 gotas ($\pm 0,6$ mL) de α - naftol y 4 gotas ($\pm 0,2$ mL) de KOH, se agitó y se dejó reposar durante 5 a 10 min. Para interpretar estos resultados la aparición de un color rosado constituye una reacción positiva indicadora de la presencia de acetoína, producto de la fermentación de la glucosa y si no cambio de color se considera un resultado negativo (Aryal, 2018).

Figura 9.

Proceso para analizar la prueba Rojo de metilo y Voges Proskauer

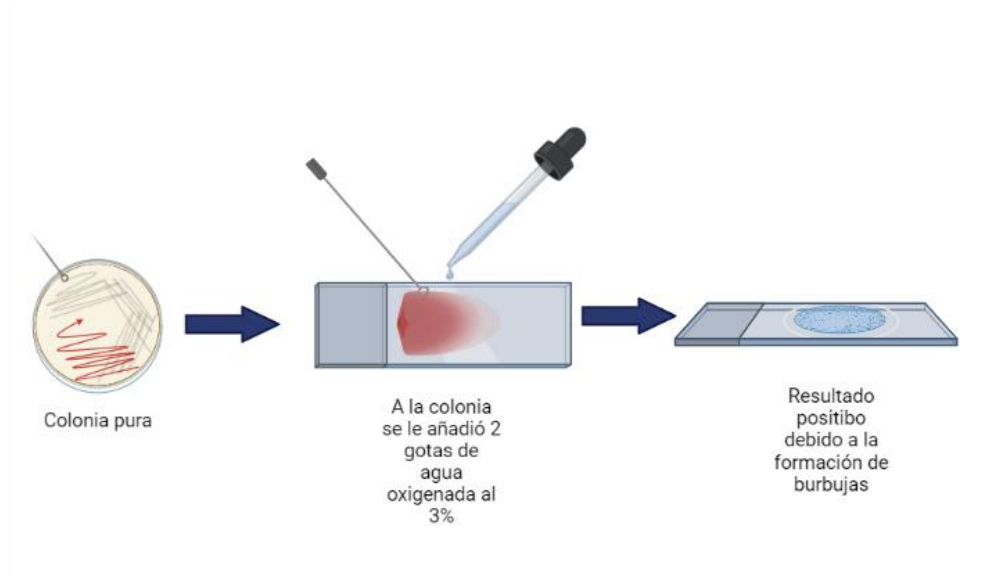


2.2.10.3. Prueba de catalasa

Para la realización de esta prueba, a través de un asa estéril se transfirió una pequeña cantidad de crecimiento de colonias a la superficie de un portaobjetos de vidrio limpio y seco y se añadió una o dos gotas de agua oxigenada al 3%, finalmente se detectó la formación de burbujas para un resultado positivo (Gil, 2019).

Figura 10.

Protocolo que siguió para la prueba de catalasa

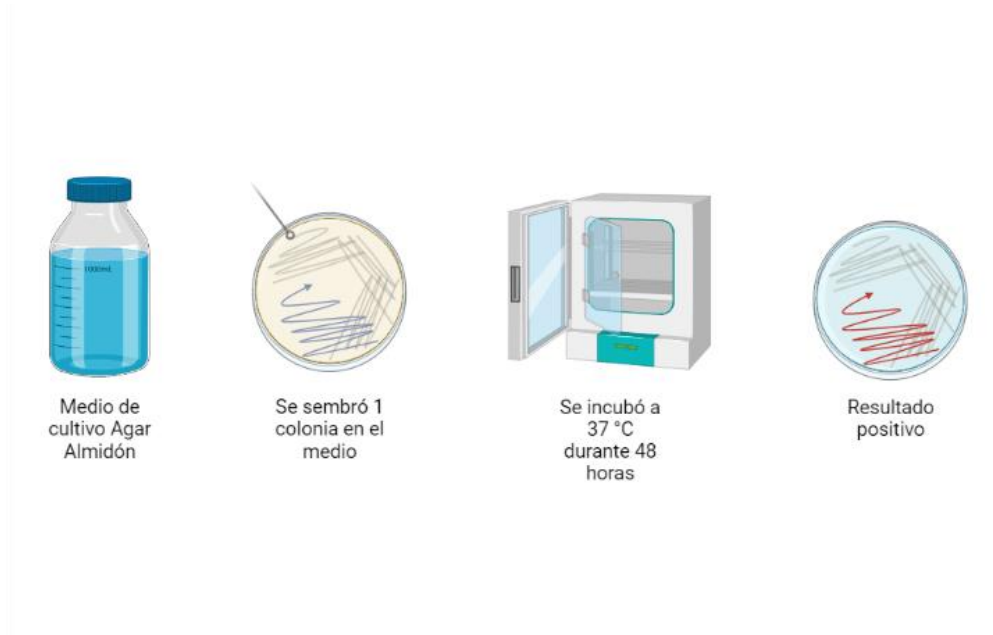


2.2.10.4. Hidrolisis de almidón

Se inoculó una colonia de cultivo puro en medio de agar almidón (agar nutritivo, almidón soluble y agua), para preparar este medio de cultivo se disolvió 24,8 g de medio en 800 ml de agua destilado y se ajustó el pH entre 6.8 – 7.2 a 37 °C por 48 h, luego se añadió una gota Lugol, donde el yodo (yodato – yoduro) va a generar una coloración azul, la prueba en este caso fue positiva debido a que pudo observar halos transparentes rodeando las bacteria (**Wekesa et al., 2021**).

Figura 11.

Protocolo para realizar la prueba Hidrólisis de almidón

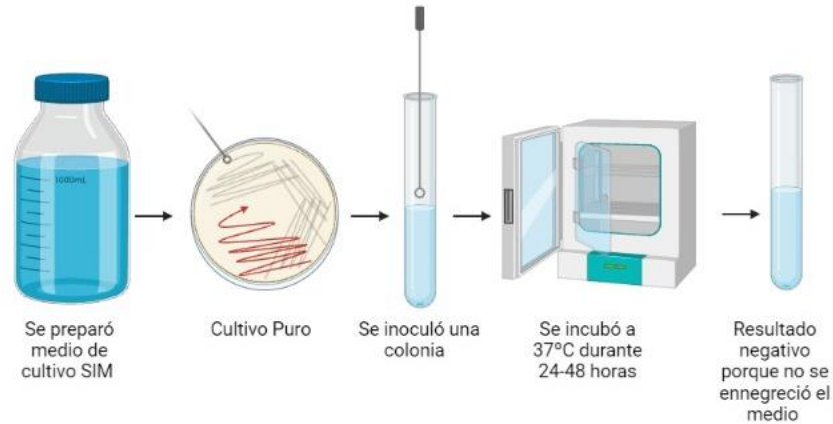


2.2.10.5. Sulfuro de hidrógeno

Para la realización de esta prueba se preparó el medio de cultivo SIM (triptona, peptona, sulfato amónico ferroso, tiosulfato sódico y agar - agar), para lo cual se pesó 24 g del medio y se aforó en 800 ml de agua destilada. Se inoculó 1 colonia pura en un tubo de ensayo rotulado, se incubó a 37 °C durante 24 a 48 h, el resultado será positivo si se observa un ennegrecimiento del medio (**Bou et al., 2018**).

Figura 12.

Metodología que se siguió para realizar la prueba sulfuro de hidrógeno.



2.2.10.6. Prueba Triple azúcar hierro (TSI)

Se preparó el medio de cultivo TSI en donde se pesó 50 g del medio y en un matraz de 1000 ml se aforó hasta 800 mL. Se calentó con agitación constante en una plancha de calentamiento y se dejó hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. En 1 tubo de ensayo se distribuyó, llenándolo con un volumen que ocupó hasta la tercera parte de estos. Se dejó enfriar hasta que se solidifique formando un pico similar al de una flauta. A partir de una colonia pura de *Rhizobium*, y con la ayuda de una aguja de inoculación, se inoculó el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie de este. Se incubó en aerobiosis a 37 °C durante 18 a 24 horas a un pH de 7.3 (Das et al., 2018).

Para la interpretación de los resultados si el microorganismo no es fermentador de azúcar se espera observar un pico rojo y fondo rojo; en el caso que el microorganismo fermenta solo glucosa se espera observar un pico rojo y fondo amarillo; si el microorganismo fermenta los tres azúcares presentará un pico amarillo y fondo

amarillo; si el microorganismo produce ácido sulfúrico se presentará ennegrecimiento del medio y en el caso que el microorganismo produzca gas se presentará rupturas o burbujas (Wekesa et al., 2021).

Figura 13.

Protocolo para la realización de la prueba TSI



Para la evaluación de la distancia genética entre los aislamientos por medio de PCR fingerprinting se realizó la siguiente metodología:

2.2.11. Aislamiento de ADN y BOX-PCR fingerprinting

El ADN molde se extrajo de cada aislado utilizando un kit de purificación de ADN genómico llamado GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT. THERMO SCIENTIFIC, de acuerdo con las instrucciones realizadas por el fabricante. El análisis

BOX-PCR fingerprinting se realizó empleando el cebador BOX A1R (Tabla 1). (Efstathiadou et al., 2021).

Tabla 7.

Cebador que se va a utilizar en esta investigación.

Nombre del Oligonucleotido	Secuencia del Oligonucleotido (5' - 3')	Gen	Tamaño de la amplificación (bp)	PCR Condiciones
BOX A1R	CTACGGCAAG GCGACGCTGA CG	BOX- secuen cia	Tamaños variable	Para la desnaturalización se requiere de una temperatura de 95 °C durante 5 minutos, seguidamente se realizarán 30 ciclos a una temperatura de 95 °C durante 1 minuto, a 56 °C durante 1 minuto y a una temperatura de 72 °C durante 1 minuto y la extensión final se realizará a 72 °C durante 10 minutos.

Fuente: (Versalovic et al., 1994; Efstathiadou et al., 2021).

Cabe destacar que el tamaño de amplificación del cebador fue variado debido a las diferentes especies de *Rhizobium*, por lo que el cebador buscó regiones continuas y dependiendo de la especie algunas coincidirán y otras no (Versalovic et al., 1994).

Para la obtención del sedimento bacteriano para poder realizar la extracción del ADN se procedió a preparar medio LB y se colocó 6 ml de este medio en tubos falcon y en cada uno se añadió 1 colonia de cultivo, se incubó durante 24 horas a 37 °C, se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm y finalmente se desechó el líquido sobrante (Espinal et al., 2019).

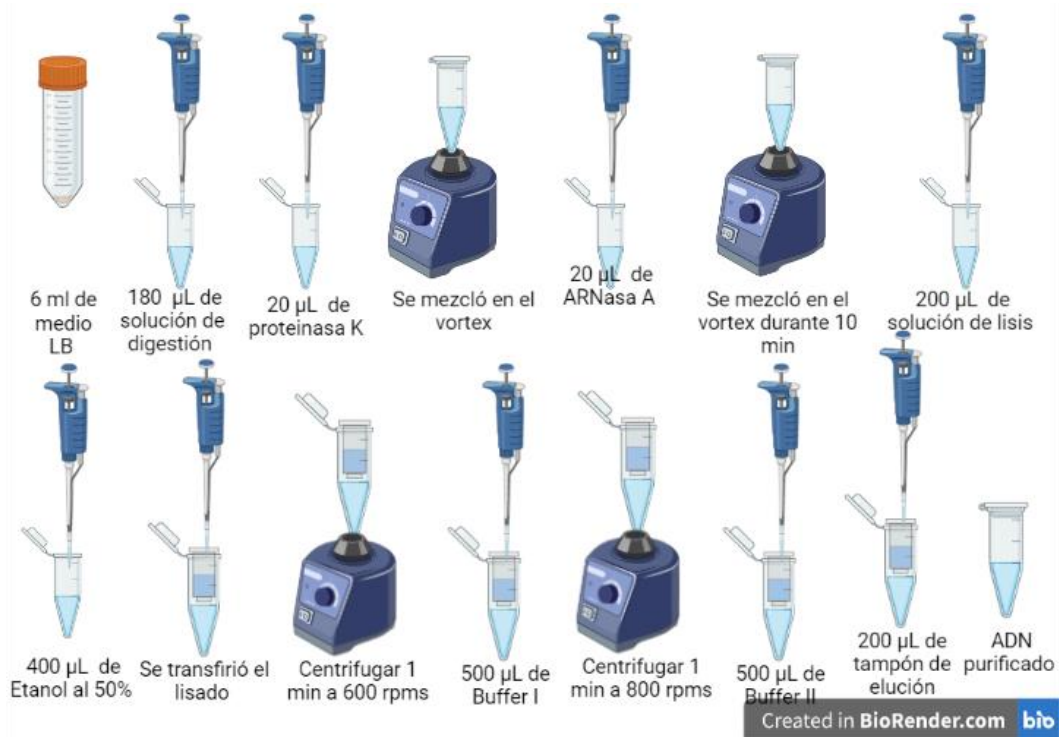
Figura 14.

Protocolo para obtener el sedimento bacteriano.



Figura 15.

Protocolo de extracción de ADN



2.2.12. Desarrollo de PCR y electroforesis para comprobar el género *Rhizobium*

Las reacciones de PCR se realizarán utilizando un kit DREAMTAQ GREEN PCR MASTER MIX 200 RX (50 μL) THERMO SCIENTIFIC empleando un volumen final de 50 μL que va a contener 100 ng de ADN molde genómico, tampón de reacción 1X (DreamTaq, DNA polymerase, 2X DreamTaq Green buffer, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0.4 mM each, and 4 mM MgCl_2 , DreamTaq Green buffer), es una formulación patentada optimizada para un rendimiento sólido en PCR (Efstathiadou et al., 2021).

El proceso de amplificación del cebador (tabla 8) consistió en 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 7 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridar a 50 °C por 1 min y extensión de 65 °C por 8 min, las reacciones de PCR terminaron con una extensión final a 65 °C durante 16 min (*Tabla 3*). La PCR fue corrida en un termociclador y los fragmentos fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % a 60 V durante 1 h para verificar que exista una amplificación resultante de la PCR, una vez comprobada la amplificación se realizó una segunda electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % a 60 V durante 3 h, a la izquierda se incluyó un marcador molecular de escalera de ADN denominada GENERULER 1kb DNA LADDER, THERMO SCIENTIFIC (**Efstathiadou et al., 2021**). El control positivo fue donado por la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). Finalmente, los geles se escanearon con el sistema GelDoc (Bio-Rad) de la facultad.

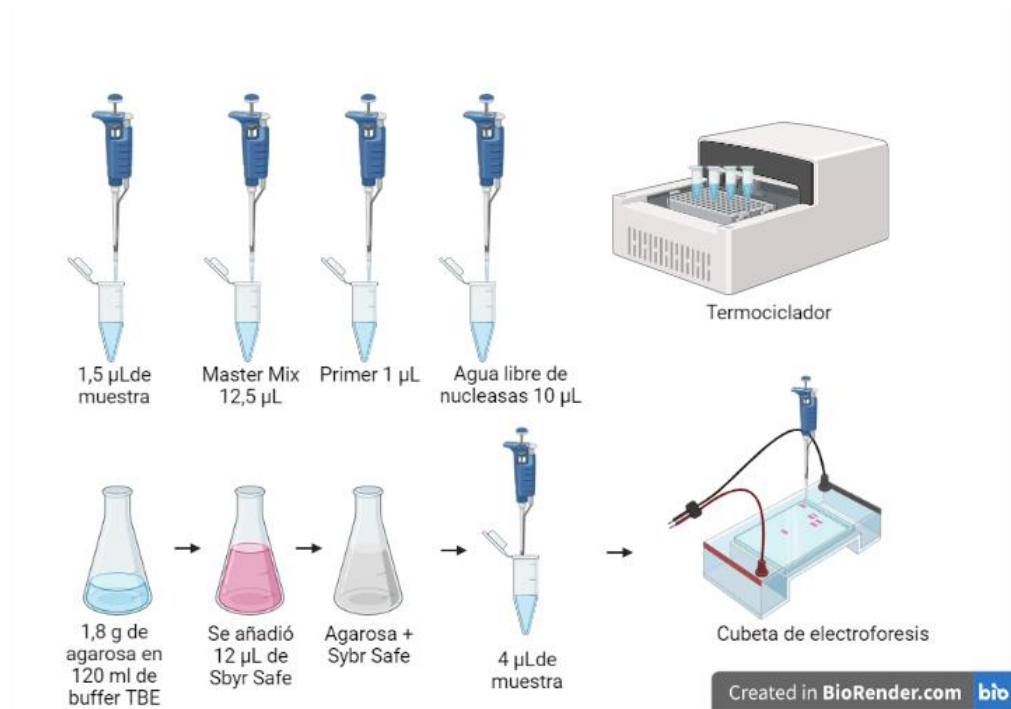
Tabla 8.

Condiciones de la PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	7 min
30 ciclos	94 °C	1 min
Hibridación	50 °C	1 min
Extensión	65 °C	8 min
Extensión final	65 °C	16 min

Figura 16.

Protocolo de PCR y electroforesis en gel de agarosa



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Recolección de nódulos

Según el Censo Nacional Agropecuario realizado en el año 2000 (**INEC, 2022**), el suelo cultivado en el Cantón Tisaleo corresponde a un área de 5.204 hectáreas (ha), distribuidas en parcelas de cultivos permanentes, transitorios, pastos cultivados y naturales, páramos, montes, bosques y otros usos.; sobresaliendo el área cultivada destinada a productos permanentes y transitorios, con 1.309 y 1.267 ha respectivamente. Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (**MAGAP, 2022**) dentro de los cultivos que más resalta en el cantón Tisaleo es el de haba con 112,30 ha cultivables, por su contenido nutricional y aporte económico al sector.

En cada localidad se tomaron 8 plantas con un total de 32 muestras, para este proceso se tomó muy en cuenta que las plantas sean jóvenes debido a que los nódulos comienzan a crecer de 4 a 6 semanas después de la siembra, un indicador de que el nódulo se encuentra fijando nitrógeno es cuando las plantas están floreciendo, en el caso de que la toma de muestra se haya realizado en plantas maduras, luego del proceso de floración los nódulos ya no tienen la misma actividad de fijación y comienzan a descomponerse (**Ferguson et al., 2019**).

El número total de nódulos recolectados fue mayor en la localidad 2 (Alobamba) (tabla 10) en donde se obtuvo 139 nódulos, seguido de la localidad 3 (Santa Lucía)

(tabla 11) en donde se contaron 96 nódulos, en la localidad 1 (zona centro) se recolectaron 72 nódulos (tabla 9) y finalmente la localidad 4 (Quinchicoto) fue la zona en donde menos nódulos se encontraron con un total de 24 (tabla 12). La cantidad de nódulos que crece en una planta, según **Lambert et al. (2020)**, depende de la poca o mucha actividad de siembra a la que se encuentre expuesto el cultivo, también es importante la presencia de nutrientes y elementos, ya que la deficiencia de nitrógeno y fósforo podría afectar al desarrollo de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* y por ende al crecimiento de nódulos.

Para la extracción de nódulos de la planta, se tomaron en cuenta los nódulos que se encontraban únicamente en la raíz principal, respecto a esto **Crosbie et al. (2021)**, afirma que los nódulos que se forman en la raíz principal se encuentran mucho más activos en comparación a los que se forman en las raíces secundarias. Los nódulos que se seleccionaron para la investigación eran los que tenían un color rojo intenso en su interior, esto indica que el nódulo se encuentra activo fijando nitrógeno (**Mowafy et al., 2022**). Esto se debe a que durante este proceso el nódulo produce una proteína pigmentada llamada leghemoglobina la cual controla la cantidad de oxígeno dentro del nódulo y esto indica que las bacterias se encuentran vivas, sin embargo, cuando el nódulo se encuentra inactivado o muerto presenta un color verdoso y cuando el nódulo está vivo pero aún no se encuentra fijando nitrógeno o recién está iniciando este proceso su color es blanco (**Mergaert et al., 2020**).

El tamaño y el peso de los nódulos también es un indicador importante para saber si hay fijación de nitrógeno ya que mientras más grande sea el mismo existe una mayor fijación de nitrógeno, sin embargo, hay que tener en cuenta que este parámetro puede variar dependiendo de la especie de la planta, en las habas (*V. faba*) generalmente los nódulos son grandes y redondos; y en el trébol (*Trifolium* spp.) los nódulos son de tamaño pequeño y alargado (**Pommeresche & Hansen, 2017**). La temperatura óptima para la mayoría de cepas de bacterias *Rhizobium* es de 20 °C, no obstante, en la mayoría de leguminosas se ha evidenciado fijación de nitrógeno a temperaturas bajas; esto es posible debido a que durante este proceso intervienen algunos factores ambientales

(Mondal et al., 2020). La localidad que presentó un peso promedio mayor de nódulos fue la localidad 2 con 0,9069 g, esta zona (Alobamba) como se observa en la tabla 10, durante el proceso de toma de muestra se encontraba a 16 °C, la temperatura más alta entre todas las localidades y a 3087 metros sobre el nivel del mar (msnm), por ello, la cantidad de nódulos fue mayor en comparación a las demás zonas. En la localidad 4 el peso promedio de nódulos fue de 0,1301 g como se observa en la tabla 12, el más bajo entre todos los lugares, debido a que esta zona (Quinchicoto) se encontraba a un extremo de Tisaleo (figura 3), con una temperatura de 12 °C y una altura de 3368 msnm (Sanchez, 2019).

Tabla 9.

Características para la selección de nódulos en la localidad 1

Código de muestra	Número de nódulos recolectados	Peso total de nódulos (g)	Número de nódulos seleccionados	Coloración de nódulos seleccionados
CTP1	3	0,1124	2	Rojo
CTP2	9	0,4790	2	Rojo intenso
CTP3	12	0,6665	2	Rojo intenso
CTP4	15	0,7808	2	Rojo intenso
CTP5	13	0,6124	2	Rojo intenso
CTP6	4	0,1541	2	Rojo
CTP7	6	0,3111	2	Rojo
CTP8	10	0,4951	2	Rojo intenso

Nota: **Número total de nódulos recolectados:** 72; **Peso promedio de nódulos (g):** 0,4514; **Número de nódulos seleccionados:** en todas las localidades se seleccionaron 2 nódulos; **Coloración de nódulos seleccionados:** la mayoría de nódulos presentaron un color rojo intenso.

Tabla 10.*Características para la selección de nódulos en la localidad 2*

Código de muestra	Número de nódulos recolectados	Peso total de nódulos (g)	Número de nódulos seleccionados	Coloración de nódulos seleccionados
ATS1	5	0,2873	2	Rojo
ATS2	3	0,1729	2	Rojo
ATS3	23	1,1840	2	Rojo intenso
ATS4	4	0,2339	2	Rojo
ATS5	30	1,5410	2	Rojo intenso
ATS6	51	2,6236	2	Rojo intenso
ATS7	5	0,2612	2	Rojo
ATS8	18	0,9514	2	Rojo intenso

Nota: **Número total de nódulos recolectados:** 139; **Peso promedio de nódulos (g):** 0,9069; **Número de nódulos seleccionados:** en todas las localidades se seleccionaron 2 nódulos; **Coloración de nódulos seleccionados:** la mitad de nódulos presentaron un color rojo intenso y la otra mitad un color rojo.

Tabla 11.*Características para la selección de nódulos en la localidad 3*

Código de muestra	Número de nódulos recolectados	Peso total de nódulos (g)	Número de nódulos seleccionados	Coloración de nódulos seleccionados
SLCE1	19	0,9557	2	Rojo intenso

SLCE2	20	1,0115	2	Rojo intenso
SLCE3	2	0,1159	2	Rojo
SLCE4	5	0,2593	2	Rojo
SLCE5	10	0,5352	2	Rojo intenso
SLCE6	14	0,7222	2	Rojo intenso
SLCE7	20	1,0168	2	Rojo intenso
SLCE8	6	0,2869	2	Rojo

Nota: **Número total de nódulos recolectados:** 96; **Peso promedio de nódulos (g):** 0,6129; **Número de nódulos seleccionados:** en todas las localidades se seleccionaron 2 nódulos; **Coloración de nódulos seleccionados:** la mayoría de nódulos presentaron un color rojo intenso

Tabla 12.

Características para la selección de nódulos en la localidad 4

Código de muestra	Número de nódulos recolectados	Peso total de nódulos (g)	Número de nódulos seleccionados	Coloración de nódulos seleccionados
QLU1	1	0,0454	2	Rojo
QLU2	6	0,3074	2	Rojo intenso
QLU3	2	0,0789	2	Rojo intenso
QLU4	2	0,0670	2	Rojo intenso
QLU5	4	0,2047	2	Rojo intenso
QLU6	3	0,0956	2	Rojo
QLU7	3	0,1469	2	Rojo intenso
QLU8	3	0,0950	2	Rojo

Nota: **Número total de nódulos recolectados:** 24; **Peso promedio de nódulos (g):** 0,1301; **Número de nódulos seleccionados:** en todas las localidades se seleccionaron 2 nódulos; **Coloración de nódulos seleccionados:** la mayoría de nódulos presentaron un color rojo

3.1.2. Aislamiento primario y secundario

Para identificar cada muestra de cada localidad a cada aislado se le asignó un código compuesto por la letra R haciendo referencia a *Rhizobium* spp., seguido de letras iniciales según el nombre de la localidad y finalmente el número de muestra. En el aislamiento primario se sembraron los nódulos en medio YMA + rojo congo, se utilizó este colorante como un indicador de crecimiento de colonias pertenecientes al género *Rhizobium* spp., conforme a lo que indica **Yesmin et al. (2021)** este grupo de bacterias al momento de crecer en este medio de cultivo suplementado con rojo congo no es capaz de absorber el color del colorante. **Delamuta et al., (2020)** afirma que las bacterias que son capaces de absorber el colorante podrían pertenecer al género *Agrobacterium* o podrían ser cualquier tipo de bacterias contaminantes.

Como se puede observar en las tablas 13,14,15 y 16, y en el anexo 7 el color de todas las colonias fue blanco rosado. Sin embargo, en el estudio realizado por **López et al. (2017)** las colonias pertenecientes a *Rhizobium* spp. presentaron un color blanco, cabe mencionar, que a pesar de que la característica de esta bacteria sea no absorber la coloración del indicador, en algunos casos puede variar, ya que depende de la exposición de las placas a la luz, y de la calidad, la concentración y la cantidad de la solución de rojo congo que se haya utilizado en el medio de cultivo, además con el paso del tiempo del cultivo después de alrededor de 10 días de incubación las colonias podrían ir tomando un color rojo intenso (**Purwaningsih et al., 2021**). Estos resultados obtenidos son similares a los de la investigación de **Saldaña (2017)**, en donde se reporta que el color de las colonias fueron blanco rosado.

El tiempo de crecimiento varió dependiendo la localidad, para la zona CTP el tiempo de crecimiento de todas las colonias fue de 2 días, en la zona ATS y SLCE se reflejó una variación entre 1 y 2 días, pero en la localidad QLU se pudo presenciar crecimiento en 1 solo día. En cuanto a la forma de las colonias 19 de las 32 cepas presentaron una forma irregular mientras que las 13 restantes fueron circulares, respecto al aspecto 3 muestras de la localidad ATS fueron semitraslúcidas y las 29 restantes fueron opacas, mientras que el borde de todas las cepas fue liso. El olor durante el crecimiento bacteriano fue fuerte.

Estos resultados obtenidos son similares a los reportados por **Xu et al. (2020)** y **Chekanai et al. (2018)** en donde las colonias aisladas de *Rhizobium* spp. crecieron entre 1 a 2 días, tenían una forma circular, un borde liso y de aspecto opaco, semitraslúcido y translúcido. Respecto al tiempo una característica distintiva de las bacterias que pertenecen a este género es que crecen de manera rápida entre 1 a 2 días produciendo durante este tiempo metabolitos ácidos a diferencia del género *Bradyrhizobium* spp. los cuales también pertenecen a la familia de rizobios que demandan un crecimiento lento alrededor de 5 a 7 días y los cuales producen metabolitos alcalinos (**Korir et al., 2017**).

La forma que presentaron estas bacterias coinciden con los resultados reportados en la investigación de **Ondieki et al., (2017)**, en donde indica que la mayoría de las colonias eran redondas y las demás presentaron una forma irregular.

Una cualidad bastante contradictoria dentro de estas investigaciones en donde caracterizan morfológicamente a cepas de *Rhizobium* spp. es el aspecto de la bacteria ya que en la mayoría de artículos científicos se presentan traslúcidas o semitraslúcidas (**Astuti et al., 2021; López et al., 2017**) y a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación únicamente el 9% de las 32 muestras se evidenciaron semitraslúcidas, sin embargo, **Guamán et al. (2016)** en su investigación indica que todas las cepas aisladas de *Rhizobium* a partir de *Crotalaria* sp. fueron opacas al igual que en esta investigación. Conforme a esto la apariencia translúcida de la bacteria es

gracias a la monocapa de lipopolisacáridos que producen los rizobios (**Zavaleta et al., 2020**). De acuerdo con **Hernández & Nápoles (2018)**, los aislamientos pueden producir menos lipopolisacáridos que otros, debido a la cantidad y concentración de manitol el cual se utiliza como fuente de carbono en el medio de cultivo, ya que el mismo estimula el crecimiento de esta monocapa teniendo como consecuencia una apariencia distinta que puede variar de opaca hasta translúcida.

Tabla 13.*Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 1*

Código de muestra	Velocidad de crecimiento (días)	Características			
		Forma	Color	Aspecto	Borde
RCTP1	2	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP2	2	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP3	2	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP4	2	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP5	2	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP6	2	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP7	2	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RCTP8	2	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso

Nota: **La velocidad de crecimiento** fue de 2 días en todas las muestras, **la forma** que presentaron estas colonias eran circulares y otras irregulares, **el color** todas presentaron un color blanco rosado, **el aspecto** fue opaco en todas las colonias y **el borde** fue liso en todas las colonias de esta zona.

Tabla 14.*Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 2*

Código de muestra	Velocidad de crecimiento (días)	Características			
		Forma	Color	Aspecto	Borde
RATS1	2	Circular	Blanco rosado	Semitranslúcido	Liso
RATS2	1	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RATS3	2	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RATS4	1	Circular	Blanco rosado	Semitranslúcido	Liso
RATS5	2	Irregular	Blanco rosado	Semitranslúcido	Liso
RATS6	1	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RATS7	1	Irregular	Blanco rosado	Opaco	Liso
RATS8	2	Circular	Blanco rosado	Opaco	Liso

Nota: **La velocidad de crecimiento** en las muestras de esta localidad vario entre 1 y 2 días, **la forma** que presentaron estas colonias eran circulares y otras irregulares, **el color** todas presentaron un color blanco rosado, **el aspecto** de las colonias de la muestra 1,4 y 5 fue semitraslúcida, mientras que las demás muestras se presentaron opacas y **el borde** fue liso en todas las colonias de esta zona

Tabla 15.*Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 3*

Código de muestra	Velocidad de crecimiento (días)	Características			
		Forma	Color	Aspecto	Borde
RSLCE1	1	Circular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE2	2	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE3	2	Circular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE4	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE5	1	Circular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE6	2	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE7	2	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RSLCE8	2	Circular	Blanco rosado	Opaca	Liso

Nota: **La velocidad de crecimiento** en las muestras de esta localidad vario entre 1 y 2 días, **la forma** que presentaron estas colonias eran circulares y otras irregulares, **el color** todas presentaron un color blanco rosado, **el aspecto** fue opaco en todas las colonias y **el borde** fue liso en todas las colonias de esta zona.

Tabla 16.*Características morfológicas de las 8 muestras tomadas en la localidad 4*

Código de muestra	Velocidad de crecimiento (días)	Características			
		Forma	Color	Aspecto	Borde
RQLU1	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU2	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU3	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU4	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU5	1	Circular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU6	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU7	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso
RQLU8	1	Irregular	Blanco rosado	Opaca	Liso

Nota: **La velocidad de crecimiento** en las muestras fue de 1 día, **la forma** que presentaron casi todas las colonias era irregular a excepción de la muestra 5 que fue circular, **el color** todas presentaron un color blanco rosado, **el aspecto** fue opaco en todas las colonias y **el borde** fue liso en todas las colonias de esta zona.

3.1.3. Pruebas bioquímicas

Para corroborar el género de las bacterias se realizaron diferentes pruebas bioquímicas, como se observa en las tablas 17,18,19 y 20. La prueba rojo de metilo mide la capacidad que tiene la bacteria para consumir glucosa y transformarla en un ácido estable (Aryal, 2018), para esta prueba el 100% de aislados fueron positivos, cambiando el color de amarillo a rojo como se puede presenciar en el anexo 8. La prueba Voges Proskauer se utiliza para determinar si la bacteria es capaz de producir acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de la glucosa (Aryal, 2018), los resultados que se obtuvieron fue que el 100% de los aislados cambiaron de color amarillo a color rosa rojo (anexo 8).

La prueba de catalasa indico que efectivamente en todas las muestras crecía una bacteria capaz de producir catalasa, una enzima que es la encargada de la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua formando burbujas (anexo 8) (Sagar, 2021). La prueba hidrolisis de almidón determina la capacidad de un organismo para hidrolizar el almidón, esta prueba se considera positiva cuando se puede observar que la colonia se torna brillante después de añadir solución de yodo (Rijal, 2018), esto se pudo evidenciar en todas las muestras dando resultados positivos (anexo 8).

Estos resultados que se obtuvieron se pueden comparar con la investigación realizada por Ortiz, (2017), en donde se aplicaron las pruebas bioquímicas rojo de metilo, Voges Proskauer y catalasa a rhizobios pertenecientes a nódulos de *Onobrychis viciifolia* y *Medicago sativa* L. ambas leguminosas, para las 3 pruebas mencionadas se reflejaron resultados positivos al igual que en esta investigación. La prueba de hidrolisis de almidón en este caso en el 100% de los aislados se presencié un rendimiento positivo y estos son similares a la investigación de Datta et al., (2015), en el cual caracterizaron cepas de *Rhizobium* spp. las cuales dieron positivo para la prueba hidrolisis de almidón.

En la prueba de sulfuro de hidrógeno el 86% de los aislados presentaron un resultado negativo, esta prueba cuando el microorganismo es capaz de producir sulfuro de hidrógeno produce un color negro en el medio de cultivo en donde se encuentra la siembra (Cedeño, 2015), y esto no sucedió. El resultado negativo se puede explicar debido a que esta prueba es específica para la identificación de *Salmonella* y *Shigella* (Guesh, 2017). Sin embargo, si se aplica para identificar *Rhizobium* spp. debido a que el sulfuro de hidrógeno actúa como una molécula de señalización importante que regula el crecimiento de las plantas y las respuestas al estrés abiótico (Zou et al., 2020). No obstante, no se han caracterizado las funciones del H₂S en la asimilación y removilización del nitrógeno simbiótico, por ello, esta prueba resulta ser negativa para *Rhizobium* spp. (Zhang et al., 2020). Esto se puede evidenciar en la investigación realizada por Dhiman et al., (2019) en donde caracterizaron a esta bacteria a partir de nódulos de *Dalbergia sissoo* y estos aislamiento al ser sometidos a esta prueba se obtuvieron resultados negativos al igual que en esta investigación.

La prueba TSI es una prueba concreta para enterobacterias las cuales pertenecen a la familia de Enterobacteriaceae, mientras que *Rhizobium* una proteobacteria pertenece a la familia Rhizobiaceae (Kuzmanović et al., 2022), con este fundamento se puede respaldar el resultado negativo que se obtuvo en el 100% de los aislados. No obstante, esta prueba se ha realizado en algunas investigaciones de aislados *Rhizobium* spp. en donde se han obtenido resultados positivos, como se puede presenciar en el proyecto ejecutado por Das & Dash, (2018) el cual identificó esta bacteria a través de la prueba TSI demostrando que se produjo fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa. Realizando una comparación entre estos resultados y los de esta investigación se podría decir que esta prueba varía dependiendo la especie de la bacteria ya que por lo general en la mayoría de investigación en donde aplican esta prueba se trata de *Rhizobium* spp. y generalmente en *V. faba* esta especie no es tan común (Chen et al., 2018).

Estos resultados negativos que se obtuvieron en ambas pruebas se pueden contrastar con los resultados obtenidos en la investigación de Tian et al., (2008) en donde

caracterizaron bioquímica y molecularmente a una bacteria específica que nodula en *V. faba* llamada *Rhizobium fabae* sp. nov. y los resultados para las pruebas de sulfuro de hidrógeno fueron negativos.

La Tinción de Gram en estas bacterias se observó de color rosado, de tamaño pequeño y de forma fina indicando que son Gram negativos, estos resultados fueron similares a la investigación realizada por **Malvarez et al. (2017)**, en donde caracteriza rizobios a partir de *Vigna unguiculata*.

Tabla 17.*Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 1*

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Pruebas bioquímicas						
		Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa	Hidrólisis de almidón	Sulfuro de hidrógeno	TSI	Tinción de Gram
RCTP1	RCTPC1	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RCTP2	RCTPC2	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RCTP3	RCTPC3	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RCTP4	RCTPC4	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RCTP5	RCTPC5	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

RCTP6	RCTPC6	+	+	+	+	+	N/N	Bacilos rosados
RCTP7	RCTPC7	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RCTP8	RCTPC8	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

Nota: **Rojo de metilo:** +, positivo para producir productos finales a través de la fermentación ácida mixta de glucosa; **Voges Proskauer:** +, positivo para producir acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de glucosa; **Catalasa:** +, positivo para la presencia de la enzima catalasa; **Hidrólisis de almidón:** +, positivo para hidrolizar almidón; **Sulfuro de hidrógeno:** -, negativo para producir sulfuro de hidrógeno; **TSI:** N/N, negativa no fermenta ninguno de los 3 azúcares ni tampoco produce gas; **Tinción de Gram:** Bacilo Gram negativo.

Tabla 18.*Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 2*

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Pruebas bioquímicas						
		Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa	Hidrólisis de almidón	Sulfuro de hidrógeno	TSI	Tinción de Gram
RATS1	RATSC1	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RATS2	RATSC2	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RATS3	RATSC3	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RATS4	RATSC4	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RATS5	RATSC5	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

RATS6	RATSC6	+	+	+	+	+	N/N	Bacilos rosados
RATS7	RATSC7	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RATS8	RATSC8	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

Nota: **Rojo de metilo:** +, positivo para producir productos finales a través de la fermentación ácida mixta de glucosa; **Voges Proskauer:** +, positivo para producir acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de glucosa; **Catalasa:** +, positivo para la presencia de la enzima catalasa; **Hidrólisis de almidón:** +, positivo para hidrolizar almidón; **Sulfuro de hidrógeno:** -, negativo para producir sulfuro de hidrógeno; **TSI:** N/N, negativa no fermenta ninguno de los 3 azúcares ni tampoco produce gas; **Tinción de Gram:** Bacilo Gram negativo.

Tabla 19.*Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 3*

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Pruebas bioquímicas						
		Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa	Hidrólisis de almidón	Sulfuro de hidrógeno	TSI	Tinción de Gram
RSLCE1	RSLCEC1	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE2	RSLCEC2	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE3	RSLCEC3	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE4	RSLCEC4	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE5	RSLCEC5	+	+	+	+	+	N/N	Bacilos rosados

RSLCE6	RSLCEC6	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE7	RSLCEC7	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RSLCE8	RSLCEC8	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

Nota: **Rojo de metilo:** +, positivo para producir productos finales a través de la fermentación ácida mixta de glucosa; **Voges Proskauer:** +, positivo para producir acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de glucosa; **Catalasa:** +, positivo para la presencia de la enzima catalasa; **Hidrólisis de almidón:** +, positivo para hidrolizar almidón; **Sulfuro de hidrógeno:** -, negativo para producir sulfuro de hidrógeno; **TSI:** N/N, negativa no fermenta ninguno de los 3 azúcares ni tampoco produce gas; **Tinción de Gram:** Bacilo Gram negativo.

Tabla 20.*Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las 8 muestras de la localidad 4*

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Pruebas bioquímicas						
		Rojo de metilo	Voges Proskauer	Catalasa	Hidrólisis de almidón	Sulfuro de hidrógeno	TSI	Tinción de Gram
RQLU1	RQLUC1	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RQLU2	RQLUC2	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RQLU3	RQLUC3	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RQLU4	RQLUC4	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados
RQLU5	RQLUC5	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

RQLU6	RQLUC6	+	+	+	+	+	N/N	Bacilos rosados
RQLU7	RQLUC7	+	+	+	+	+	N/N	Bacilos rosados
RQLU8	RQLUC8	+	+	+	+	-	N/N	Bacilos rosados

Nota: **Rojo de metilo:** +ve, positivo para producir productos finales a través de la fermentación ácida mixta de glucosa; **Voges Proskauer:** +, positivo para producir acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de glucosa; **Catalasa:** +, positivo para la presencia de la enzima catalasa; **Hidrólisis de almidón:** +, positivo para hidrolizar almidón; **Sulfuro de hidrógeno:** -, negativo para producir sulfuro de hidrógeno; **TSI:** N/N, negativa no fermenta ninguno de los 3 azúcares ni tampoco produce gas; **Tinción de Gram:** Bacilo Gram negativo.

Dentro de la familia de rizobios existen ciertas características que las pueden diferenciar unas de otras, entre las más importantes están el tiempo de crecimiento y la producción de acidez o alcalinidad. De acuerdo con **Koskey et al. (2018)** los géneros *Rhizobium* spp. y *Sinorhizobium* spp. presentan crecimiento rápido entre 2 a 5 días y producen metabolitos ácidos, por lo contrario, el género *Bradyrhizobium* spp. crece de manera lenta dando como resultados metabolitos alcalinos, mientras que el género *Mesorhizobium* spp. presenta un crecimiento equilibrado ni tan rápido ni tan lento, pero, es acidificante y el género *Azorhizobium* spp. crece de manera rápida pero sus metabolitos son alcalinos.

En esta investigación se realizó una prueba de autenticidad propia de rizobios como se puede evidenciar en las tablas 21, 22, 23 y 24, para esto, las bacterias se cultivaron en medio YMA + púrpura de bromocresol, un indicador que permite conocer si la bacteria produce compuestos ácidos o compuestos alcalinos (**Venkatachalam et al., 2014**). Los resultados obtenidos en esta investigación es que de las 32 cepas obtenidas 20 de ellas fueron de crecimiento rápido tornándose un color amarillo indicando que podrían ser *Rhizobium* spp., mientras que los 12 restantes tuvieron un crecimiento lento y presentaron un color púrpura, insinuando que estas pertenecen a *Bradyrhizobium* spp. Hay que tener en cuenta que esto puede variar dependiendo de la capacidad que tiene la bacteria para acidificar o no el medio, para esto es importante el consumo y la concentración de azúcares que se encuentran como fuente de carbono en el medio de cultivo (**Purwaningsih et al., 2020**).

Estos resultados se pueden comparar con la investigación de **Ondieki et al., (2017)**, en donde los aislamientos que tornaron amarillo el medio fueron productores de ácido y se clasificaron como de crecimiento rápido y los aislamientos que tornaron el medio púrpura se consideraron productores alcalinos y se clasificaron como de crecimiento lento.

Tabla 21.

Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Crecimiento rápido (medio color amarillo)	Crecimiento lento (medio color púrpura)
RCTP1	RCTPC1		+
RCTP2	RCTPC2	+	
RCTP3	RCTPC3	+	
RCTP4	RCTPC4	+	
RCTP5	RCTPC5	+	
RCTP6	RCTPC6		+
RCTP7	RCTPC7	+	
RCTP8	RCTPC8		+

Nota: 5 de los aislados de esta localidad presentaron un crecimiento rápido y 3 de ellos un crecimiento lento.

Tabla 22.

Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Crecimiento rápido (medio color amarillo)	Crecimiento lento (medio color púrpura)
RATS1	RATSC1	+	
RATS2	RATSC2		+
RATS3	RATSC3	+	
RATS4	RATSC4	+	
RATS5	RATSC5		+
RATS6	RATSC6	+	
RATS7	RATSC7		+
RATS8	RATSC8	+	

Nota: 5 de los aislados de esta localidad presentaron un crecimiento rápido y 3 de ellos un crecimiento lento

Tabla 23.

Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Crecimiento rápido (medio color amarillo)	Crecimiento lento (medio color púrpura)
RSLCE1	RSLCEC1	+	
RSLCE2	RSLCEC2	+	
RSLCE3	RSLCEC3	+	
RSLCE4	RSLCEC4		+
RSLCE5	RSLCEC5	+	
RSLCE6	RSLCEC6	+	
RSLCE7	RSLCEC7		+
RSLCE8	RSLCEC8		+

Nota: 5 de los aislados de esta localidad presentaron un crecimiento rápido y 3 de ellos un crecimiento lento

Tabla 24.

Resultados del crecimiento de la bacteria en cultivo en medio YMA + púrpura de bromocresol

Número de aislamiento	Código de criopreservación	Crecimiento rápido (medio color amarillo)	Crecimiento lento (medio color púrpura)
RQLU1	RQLUC1		+
RQLU2	RQLUC2	+	
RQLU3	RQLUC3		+
RQLU4	RQLUC4	+	
RQLU5	RQLUC5	+	
RQLU6	RQLUC6	+	
RQLU7	RQLUC7		+
RQLU8	RQLUC8	+	

Nota: 5 de los aislados de esta localidad presentaron un crecimiento rápido y 3 de ellos un crecimiento lento

3.1.4. Distancia genética BOX-PCR

El árbol filogenético presentado en la figura 17, muestra las distancias genéticas que existe entre cada cepa, a un coeficiente de 51% de similitud se observa la formación de dos grupos A y B. En el primer grupo (A) las cepas tuvieron una diferencia significativa en el coeficiente de similitud de un 55% entre QLU12 y SLCE12, indicando que con el paso del tiempo no evolucionaron, esto podría deberse a que geográficamente estas 2 localidades se encuentran distantes como se puede observar en el gráfico 3, además las plantas están expuestas a diferentes temperaturas ya que por lo general Quinchicoto se encuentra a una temperatura entre 2 °C y 14 °C; mientras que en Santa Lucia la temperatura varía entre 3 °C y 16 °C, cabe mencionar que el tamaño de las plantas en las dos localidades variaba, esto concuerda a lo indicado por **Rimieri (2017)**, ya que manifiesta que la diversidad genética depende de una serie de factores como el tamaño de la planta, los fertilizantes utilizados durante el proceso de crecimiento, la temperatura a la que crece y la ubicación.

En el grupo 2 (B) se formaron dos subgrupos B1 y B2, (figura 17) el subgrupo B1 conforme el tiempo ha ido evolucionando, mientras que el subgrupo B2 no ha presentado ningún cambio genético. Respecto a B1, uno de los coeficientes más altos entre todas las muestras se pudo evidenciar en la localidad 2, con el 95% de similitud entre las cepas ATS78 y ATS12, seguido a estas con un porcentaje de 92 se encuentra la cepa ATS34, esto podría argumentarse con que todas estas cepas pertenecen a la misma localidad, teniendo en cuenta que crecieron a una misma temperatura entre 3 °C y 16 °C y se desarrollaron a las mismas condiciones (agua, luz, aire y nutrientes) (**Lipa & Janczarek, 2020**). Las condiciones ambientales que intervienen o afectan en la diversidad genética de las plantas incluyen la interacción con patógenos y factores como el estrés hídrico, la luz, la temperatura y el exceso o la falta de nutrientes, cuando la planta crece a las mismas condiciones presenta más características genéticas similares (**Pacheco et al., 2021**).

En el anexo 13 se puede observar los valores de las distancias genéticas que hay entre cada cepa, la cepa que más similitud presenta en relación con las demás es QLU56 representando a la localidad 4 (Quinchicoto) ya que tiene un porcentaje de 0,9286 de similitud en comparación con la cepa QLU78, con la cepa ATS56 presenta un valor de 0,9048; con la cepa SLCE78 presenta un coeficiente de 0,9040%; con CTP12 y ATS34 un valor de 0,8571; con QLU34 y CTP78 un valor de 0,7857; con CTP34 un porcentaje de 0,7619 y con SLCE34 un coeficiente de similitud de 0,6667%.

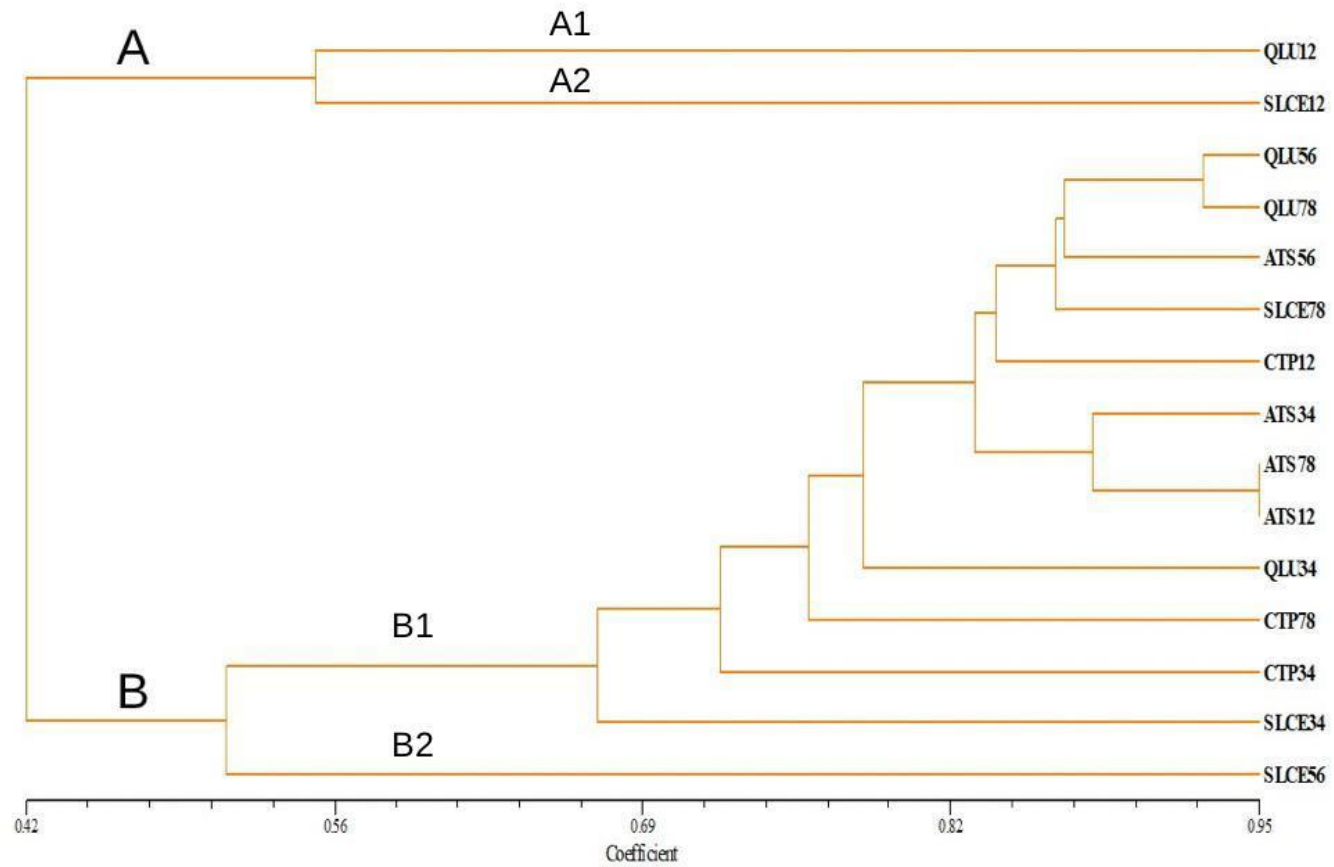
Todos estos valores que indican la distancia genética entre cada cepa dependen del lugar en donde haya crecido la planta y de las condiciones. El rol que cumplen los factores ambientales dentro de la variedad genética en las plantas permite la generación y el mantenimiento de la diversidad biológica (**Wu et al., 2019**). A lo largo de múltiples generaciones los factores ambientales como el clima y el suelo pueden desarrollar un proceso de adaptación dependiendo en el lugar y las condiciones que tenga la planta teniendo como consecuencia cambios en la composición genética. La divergencia genética también puede presentarse a partir de una restricción del flujo de genes entre poblaciones provocada por la distancia geográfica (**Buzatti et al., 2019**).

La planta de haba (*V. faba*) y otras especies de *Vicia*, *Pisum*, *Lathyrus* y *Lens* forman nódulos con *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*. Diferentes estudios han revelado que los rizobios aislados de nódulos a partir de esta planta en diferentes ubicaciones geográficas eran diversos en su fondo cromosómico y contenido de plásmidos (**Benidire et al., 2018**). Las cepas de rizobios de esta planta se distinguen de las cepas de rizobios de *Pisum sativum*, por los genotipos de nodulación (**Chen et al., 2018**).

3.1.6. PCR y gel de electroforesis

Figura 17.

Árbol filogenético de las cepas obtenidas



3.2. Verificación de hipótesis

Hipótesis nula rechazada.

Las cepas aisladas a partir de nódulos de *V. faba* presentan características morfológicas, bioquímicas y diversidad genética pertenecientes al género *Rhizobium* spp.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se aislaron 32 cepas originales a partir de nódulos de *V. faba*, según las características morfológicas de velocidad de crecimiento, color, forma, aspecto y borde que presentaron los aislados pertenecen al género *Rhizobium* spp.
- Se identificaron estas bacterias a través de pruebas bioquímicas en donde se evidencio resultados positivos en el 100% de los aislados para las pruebas rojo de metilo, Voges Proskauer, catalasa e hidrolisis de almidón, mientras que para las pruebas sulfuro de hidrogeno y TSI, en el 93% de las cepas se presenció un resultado negativo. Además, se realizó una prueba de autenticidad en donde 20 de las 30 cepas fueron de crecimiento rápido acidificando el medio demostrando ser *Rhizobium* spp.
- Se evaluó la distancia genética de 16 aislados a través de BOX-PCR, mediante la realización de un árbol filogenético en donde las bandas obtenidas por el gel de electroforesis se interpretaron a través de 3 programas bioinformáticos: NTSYSpc, GelAnalyzer y PyElph; la distancia se midió a través de dos grupos, los cuales tuvieron un coeficiente de similitud del 51%, en el grupo A las cepas QLU12 y SLCE12 presentaron una similitud de 55% siendo la más baja entre todas, mientras que la más alta se presentó entre las cepas ATS78 y ATS12 con un porcentaje de 95 en el grupo B, además todas las demás cepas tenían coeficientes de similitud altos en referencia a la cepa QLU56; demostrando que *Rhizobium* spp. presenta una gran variabilidad genética.

- A través de la biotecnología se puede aprovechar todos los recursos naturales con la finalidad de beneficiar y mejorar el medio ambiente, como esta investigación que podría tener un gran aporte dentro del campo agrícola, ya que el aislamiento de cepas puras de *Rhizobium* spp. a partir de *V. faba* podrían contribuir con la realización de biofertilizantes para mejorar la productividad de los cultivos, disminuyendo la contaminación ambiental y beneficiando a los agricultores.

4.2. Recomendaciones

- Desarrollar pruebas moleculares específicas como la secuenciación del ARNr 16S para identificar que especie exactamente se produce en *V. faba* y poder investigar los beneficios que ofrece la misma.
- Realizar un biofertilizante a partir de rizobios obtenidos en *V. faba* para demostrar los beneficios que podrían ofrecer los mismos en campo.
- Ejecutar más pruebas bioquímicas que sean propios de rizobios para comprobar la identidad de estos.

MATERIAL DE REFERENCIA

- Alemayehu, D., Zerihun, A., y Solomon, B. (2018). Limitations and strategies to enhance biological nitrogen fixation in sub-humid tropics of Western Ethiopia. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 10(7). <https://doi.org/10.5897/jabsd2018.0318>
- Angeles, J., y Cruz, T. (2017). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5). <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i5.588>
- Añino, Y., Sumba, M., Naranjo, J., Rodríguez, R., Santos, A., y Zachrisson, B. (2020). First report by brachyplatys subaeneus (Westwood) (heteroptera: Plataspidae) for ecuador and the synoptic list of its host plants. *Idesia*, 38(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000100113>
- Artz, H., Zadvornyy, O., Mulder, D., King, P., & Peters, J. (2018). Structural Characterization of Poised States in the Oxygen Sensitive Hydrogenases and Nitrogenases. In *Methods in Enzymology*, 595. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.07.005>
- Aryal, S. (2018). Methyl Red (MR) Test- Principle, Procedure and Result Interpretation. *Microbe Notes*. <https://microbiologyinfo.com/methyl-red-mr-test-principle>.
- Aryal, S. (2018). Voges Proskauer (VP) Test. Microbe, Procedure and Result Interpretation. *Microbe Notes*. <https://microbiologyinfo.com/voges-proskauer-mr-test-principle>.
- Astuti, A., Mulyono, S y Fauzi, R. (2021). Characterization of *Rhizobium* Indigenous Isolates and Their Compatibility with Edamame Soybean. *Earth and Environmental Science*, 752(1). <https://doi.org/10.1088/1755->

1315/752/1/012001

- Barrera, O., y Sáenz, M. (2016, December). *El aprovechamiento del nitrógeno por la planta con tecnología*.
<https://revistas.ufps.edu.co/index.php/ingenio/article/view/2127/3107>
- Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., Fatemi, Z., Gomez, R., Göttfert, M., y Oufdou, K. (2018). Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1).
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.003>
- Bianco, L., y Cenzano, A. (2018). Leguminosas nativas: estrategias adaptativas y capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Implicancia ecológica. *Idesia (Arica), ahead*. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292018005002601>
- Bilung, L., Pui, C., Su'ut, L., y Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. *Disease Markers*.
<https://doi.org/10.1155/2018/1351634>
- Blesh, J. (2018). Functional traits in cover crop mixtures: Biological nitrogen fixation and multifunctionality. *Journal of Applied Ecology*, 55(1).
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.13011>
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2018). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.
<https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.03.012>
- Brenes, P., y Peña, W. (2022). Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la nodulación de arveja en un suelo andisol de La Angelina, Cartago. *Repertorio Científico*, 24(2). <https://doi.org/10.22458/rc.v24i2.3888>
- Buhian, P., y Bensmihen, S. (2018). Mini-review: nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 9, (1247).
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01247/BIBTEX>

- Buzatti, R., Pfeilsticker, T., Muniz, A., Ellis, V., Souza, R., Lemos, J., y Lovato, M. (2019). Disentangling the Environmental Factors That Shape Genetic and Phenotypic Leaf Trait Variation in the Tree *Qualea grandiflora* Across the Brazilian Savanna. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1580. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01580/BIBTEX>
- Carpio, M. (2014). *Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rizobio asociadas a cultivos de guisante (Pisum sativum L.), cultivos (Lupinus mutabilis s.), frijol (Phaseolus vulgaris L.), frijol (Vicia faba L.) y vicia (Vicia sp.) En suelos de la provincia de imbabura y obtención de un banco de cepas*. Repositorio institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8035/1/T-ESPE-047727.pdf>
- Cedeño, J. (2015). Agar SIM Medio de cultivo SIM. *Especificaciones de Producto Terminado, I*. <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets>
- Chekanai, V., Chikowo, R., y Vanlauwe, B. (2018). Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across variable soils in Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *266*. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.010>
- Chen, Y., Zou, L., Penttinen, P., Chen, Q., Li, Q., Wang, C., y Xu, K. (2018). Faba bean (*Vicia faba* L.) nodulating rhizobia in Panxi, China, are diverse at species, plant growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1338. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01338/BIBTEX>
- Coelho, L. (2021). *Inoculação e coinoculação suplementar tardia com Rhizobium tropici e Azospirillum brasilense como estratégias para aumento da nodulação e produtividade do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.)*. Universidad de Brasilia. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/42618>
- Concha, C., Doerner, P., y Gutiérrez, R. (2020). The impact of the rhizobia–legume symbiosis on host root system architecture. *Journal of Experimental Botany*, *71*(13), 3902–3921. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA198>
- Cooper, J., Wilson, M., Derks, M., Smit, S., Kunert, K., Cullis, C., y Foyer, C. (2017). Enhancing faba bean (*Vicia faba* L.) genome resources. *Journal of Experimental*

Botany, 68(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERX117>

- Crosbie, D., Mahmoudi, M., Radl, V., Brachmann, A., Schloter, M., Kemen, E., y Marín, M. (2021). The microbiome of Lotus nodules varies with plant health in a species-specific manner. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.19.441130>
- Silva, A., Franzini, V., Piccolla, C., y Muraoka, T. (2017). Molybdenum supply and biological fixation of nitrogen by two Brazilian common bean cultivars. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21(2). <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n2p100-105>
- Darnajoux, R., Zhang, X., McRose, L., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Kraepiel, L., y Bellenger, J. P. (2017). Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in boreal cyanolichens: importance of molybdenum availability and implications for current biological nitrogen fixation estimates. *New Phytologist*, 213(2), 680–689. <https://doi.org/10.1111/NPH.14166>
- Das, S., y Dash, D. (2018). Study of Characterization of Tamarind Associated Rhizobium spp. and Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Potency for Germination of Tamarind Seeds. *Thepharmajournal.Com*, 7(11), 282–286. <https://www.mendeley.com/catalogue/18d570b7-2178-34f9-a1e5-e18038efd158/>
- Datta, A., Singh, R., & Tabassum, S. (2015). Isolation, characterization and growth of *Rhizobium* strains under optimum conditions for effective biofertilizer production. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 32(1), 199–208.
- Delamuta, J., Scherer, A., Ribeiro, R., y Hungria, M. (2020). Genetic diversity of agrobacterium species isolated from nodules of common bean and soybean in Brazil, Mexico, Ecuador and Mozambique, and description of the new species agrobacterium fabacearum sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(7). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004278>
- Dhiman, M., Dhiman, V., Rana, N., Dipta, B., y Singh, Y. (2019). Isolation and Characterization of *Rhizobium* Associated with Root Nodules of Dalbergia sissoo. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 8(3), 1910–1918.

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.227>

- Díez, A. (2019). *Como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón celabc en la biosíntesis de celulosa bacteriana*. 17–22. <https://doi.org/10.14201/gredos.140394>
- Dong, W., y Song, Y. (2020). The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *In International Journal of Molecular Sciences*, 21 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165926>
- Efstathiadou, E., Ntatsi, G., Savvas, D., y Tampakaki, A. (2021). Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>
- Encarna, A., y Ramírez, M. (2016). Historia De La Investigación En La Simbiosis Leguminosa- Legume-Rhizobia Symbiosis: *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 192–779.
- Espinal, D., Zuñiga, A., Castillo, D., y Castellanos, R. (2019). Producción de amilasas de *Geobacillus themoparaffinivorans* (CB-13) aisladas de los Géiseres de Candarave, Tacna. *Ciencia & Desarrollo*, 24. <https://doi.org/10.33326/26176033.2019.24.783>
- Espinoza, A., & Mendoza, R. (2017). *Guía Técnica para Muestreo de Suelos*. Repositorio institucional Universidad Nacional Agraria <https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>
- Esquivel, G. (2018). Nutrientes Esenciales Para Las Plantas. *Brokosa Peru*. http://www.drokasa.pe/application/webroot/imgs/notas/Nutrientes_Esenciales_para_las_Plantas.pdf
- Etesami, H. (2022). Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, 4, 78–86. <https://doi.org/10.1016/J.CRBIOT.2022.01.003>
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura*.

<https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2018). Seguimiento del mercado del arroz de la FAO. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura, XXI*. <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/rice/>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2022). *El mercado mundial de fertilizantes: balance de la situación de un mercado en dificultades*. <https://www.fao.org/3/ni280es/ni280es.pdf>
- Fathy, D., Eldomiaty, A., El-Fattah, H., Mahgoub, E., y Hassanin, A. (2021). Morphological, biochemical and molecular characterization of rhizobia of faba bean plants grown in north Nile delta Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.672.679>
- Ferguson, B., Mens, C., Hastwell, A., Zhang, M., Su, H., Jones, C., Chu, X., y Gresshoff, P. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. In *Plant Cell and Environment* 42(1). <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- García, C., y Sato, M. (2019). *Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepa de Rhizobium Azospirillum y producción de inoculantes*. Repositorio de Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga <http://revistas.unsch.edu.pe/index.php/investigacion/article/view/119/115>
- Garrido, R., Nakano, R., Dombrowski, N., Ma, W., McHardy, C., y Schulze, P. (2018). Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. *Cell Host and Microbe*, 24(1). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.006>
- Gil, M. (2019). *Prueba de la catalasa: fundamento, técnica y usos*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/>
- Gil, M. (2019). *Rojo de metilo: características, preparación y aplicaciones*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/rojo-metilo/>
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., y Stacey, G. (2015). *Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity*. In *Trends in Plant Science* 20(3).

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>

- Goyal, R., Mattoo, A., y Schmidt, M. (2021). Rhizobial–Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability. In *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669404>
- Guamán, F., Granda, K., Torres, R., y Nápoles, M. (2016). Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. En el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 40–47. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193245041006.pdf>
- Guesh, M. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella species from lactating cows in dairy farm of Bahir Dar Town, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 11(43). <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8692>
- Heath, K., Podowski, J., Heniff, S., Klinger, C., Burke, P., Weese, D., Yang, W., y Lau, J. (2020). Light availability and *Rhizobium* variation interactively mediate the outcomes of legume–*Rhizobium* symbiosis. *American Journal of Botany*, 107(2). <https://doi.org/10.1002/ajb2.1435>
- Hernández, I., y Nápoles, M. (2018). Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de rizobio. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 316, 111–158. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Hernández, J., Cubillos-Hinojosa, J., y Milian, P. (2018). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe Isolation of *Rhizobium* spp., associated two forage leguminous in the Caribbean Biotechnological Center. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2). https://www.researchgate.net/profile/Juan-CubillosHinojosa/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobium_spp
- Huang, C., Liu, C., y Kao, W. (2018). Rhizobia symbiosis of seven leguminous species growing along Xindian riverbank of Northern Taiwan. *Taiwania*, 63(1). <https://doi.org/10.6165/tai.2018.63.7>
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) (2022). *Censo Nacional Agropecuario*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>

- ITIS (Integrated Taxonomic Information System) (2022). Report: *Vicia faba*.
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26339#null
- Khazaei, H., Link, W., Street, K., y Stoddard, F. (2018). A valuable faba bean (*Vicia faba* L.) accession. *Plant Genetic Resources*, 16(5), 478–482.
<https://doi.org/10.1017/S1479262118000205>
- Korir, H., Mungai, N., Thuita, M., Hamba, Y., y Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Frontiers in Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>
- Koskey, G., Mburu, S., Kimiti, J., Ombori, O., Maingi, J., y Njeru, E. (2018). Genetic Characterization and Diversity of *Rhizobium* Isolated From Root Nodules of Mid-Altitude Climbing Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00968>
- Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., y Dicenzo, G. (2022). Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(3). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005243>
- Lambert, I., Pervent, M., Le Queré, A., Clément, G., Tauzin, M., Severac, D., Benezech, C., Tillard, P., Magniett, L., Colella, S., y Lepetit, M. (2020). Responses of mature symbiotic nodules to the whole-plant systemic nitrogen signaling. *Journal of Experimental Botany*, 71(16).
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa221>
- Lindström, K., y Mousavi, S. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Lipa, P., y Janczarek, M. (2020). Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
- Liu, A., Contador, C., Fan, K., y Lam, H. (2018). Interaction and regulation of carbon,

- nitrogen, and phosphorus metabolisms in root nodules of legumes. *Frontiers in Plant Science*, 871(1860). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01860/BIBTEX>
- Lopes, L., Dórea, C., Fortes, C., Alves, S., y Alves, S. (2019). Differentiation of lineages within “*Colletotrichum gloeosporioides* s.l.” associated with cassava anthracnose disease by BOX- and ERIC-PCRs. *Journal of Phytopathology*, 167(4). <https://doi.org/10.1111/jph.12789>
- López, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., López, E., y Olalde, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1).
- López, J., López, E., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., & Olalde, V. (2017). Morphological and biochemical characterization of *Rhizobium* strains collected from wild and domesticated common bean. *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex.*, 40(1), 73–81. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-1/8a.pdf>
- Luo, Y., Mo, J., Zhao, P., Zheng, M., y Zhou, Z. (2019). Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 25(9), 3018–3030. <https://doi.org/10.1111/gcb.14705>
- Maalouf, F., Hu, J., O’Sullivan, D., Zong, X., Hamwieh, A., Kumar, S., y Baum, M. (2019). Breeding and genomics status in faba bean (*Vicia faba*). *Plant Breeding*, 138(4), 465–473. <https://doi.org/10.1111/PBR.12644>
- MAGAP (Ministerio de Agricultura y Ganadería) (2022). *En Tisaleo, Tungurahua, emprenden el cultivo de maca andina – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. <https://www.agricultura.gob.ec/en-tisaleo-tungurahua-emprenden-el-cultivo-de-maca-andina/>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., y Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Malvarez, A., Cossoli, R., Romero, E., y Iglesias, C. (2017). Inoculación de *Prosopis alba* con rizobios aislados a partir de plantas trampa de *Vigna unguiculata*. *Agrotecnia*, 25. <https://doi.org/10.30972/agr.0252487>

- Mendoza, M., Geddes, A., Sánchez, C., Ramírez, R., Kirchhelle, C., Jorin, B., y Poole, S. (2020). Optimizing *Rhizobium*-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(18), 9822–9831. https://doi.org/10.1073/PNAS.1921225117/SUPPL_FILE/PNAS.1921225117.SM01.GIF
- Mergaert, P., Kereszt, A., y Kondorosi, E. (2020). Gene Expression in Nitrogen-Fixing Symbiotic Nodule Cells in *Medicago truncatula* and Other Nodulating Plants. In *The Plant cell*, 32(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00494>
- Mir, I., Nagabhushanam, B., Quadriya, H., Kiran, B., y Hameeda, B. (2020). Morphological, biochemical and intrinsic antibiotic resistance of rhizobia isolated from root and stem nodules of various leguminous plants. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(71–72).
- Mondal, M., Skalicky, M., Garai, S., Hossain, A., Sarkar, S., Banerjee, H., Kundu, R., Brestic, M., Barutcular, C., Erman, M., El Sabagh, A., y Laing, M. (2020). Supplementing nitrogen in combination with *Rhizobium* inoculation and soil mulch in peanut (*Arachis hypogaea* L.) production system: Part II. effect on phenology, growth, yield attributes, pod quality, profitability and nitrogen use efficiency. *Agronomy*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy10101513>
- Motta, P., Ocaña, H., y Rojas, E. (2019). Indicadores asociados a la sostenibilidad de pasturas: una revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(2). https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num2_art:1464
- Mowafy, A., Agha, M., Haroun, S., Abbas, M., y Elbalkini, M. (2022). Insights in nodule-inhabiting plant growth promoting bacteria and their ability to stimulate *Vicia faba* growth. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2314808X.2021.2019418>
- Mus, F., Alleman, B., Pence, N., Seefeldt, C., y Peters, W. (2018). Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics*, 10(4), 523–538. <https://doi.org/10.1039/C8MT00038G>

- Nag, P., Shriti, S., y Das, S. (2020). Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. In *Journal of Applied Microbiology* 129(2). <https://doi.org/10.1111/jam.14557>
- Nápoles, M., Cabrera, J., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández, I., Martínez, L., y Núñez, M. (2016). Signals produced by *Rhizobium leguminosarum* in the interaction with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2).
- Ney, L., Franklin, D., Mahmud, K., Cabrera, M., Hancock, D., Habteselassie, M., Newcomer, Q., y Fatzinger, B. (2019). Rebuilding Soil Ecosystems for Improved Productivity in Biosolarized Soils. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5827585>
- Oliveira, D., Figueiredo, M., Soares, B., Stivanin, O., Dias, F., Rufini, M., Peixoto, C., Pereira, R., Ramalh, A., Moreira, F., y Bastos, M. (2017). Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 922–933. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400007>
- Ondieki, D., Nyaboga, E., Wagacha, M., y Mwaura, F. (2017). Morphological and Genetic Diversity of *Rhizobia* Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from Agricultural Soils of Lower Eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2017/8684921>
- ONU (Organización de las Naciones Unidas) (2020, November 9). *Fertilizantes: desafíos y soluciones para proteger nuestro planeta*. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/fertilizantes-desafios-y-soluciones-para-proteger-nuestro-planeta>
- Orchardson, E. (2020, December 4). *El nitrógeno en la agricultura* . <https://www.cimmyt.org/es/noticias/el-nitrogeno-en-la-agricultura/>
- Ortiz, S. (2017). "Puesta a punto de un método de aislamiento de los rizobios". [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/89037/ORTIZ-VILLAJOS - Puesta a punto de un método de aislamiento de los Rhizobium simbiontes radicular....pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/89037/ORTIZ-VILLAJOS%20-%20Puesta%20a%20punto%20de%20un%20m%C3%A9todo%20de%20aislamiento%20de%20los%20Rhizobium%20simbiontes%20radicular....pdf?sequence=1)

- Pacheco, Y., Villa, N., Lozoya, E., Barrales, C., Jiménez, F., y Cruz, M. (2021). Influence of Environmental Factors on the Genetic and Chemical Diversity of *Brickellia veronicifolia* Populations Growing in Fragmented Shrublands from Mexico. *Plants*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020325>
- Pérez, R. (2021). *Aislamiento caracterización y efecto de dos cepas de Rhizobium sobre el crecimiento en Lupinus mutabilis bajo condiciones semicontroladas en suelos agrestes*. Repositorio Universidad Tecnica Particular de Loja <http://dspace.utpl.edu.ec/jspui/handle/20.500.11962/29348>
- Pommeresche, R., & Hansen, S. (2017). Examen de la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas. *FertilCrop*. 8(4). <https://orprints.org/id/eprint/31344/7/pommeresche-hansen-2017-root-nodules-spanish.pdf>
- Primieri, S., Magnoli, S., Koffel, T., Stürmer, S., y Bever, J. (2022). Perennial, but not annual legumes synergistically benefit from infection with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia: a meta-analysis. *New Phytologist*, 233(1). <https://doi.org/10.1111/nph.17787>
- Purwaningsih, S, Agustiyani, D., y Antonius, S. (2020). Characterization and symbiotic evaluation of rhizobium bacteria from various plants on soybean (*Glycine Max* L) plants in green house. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/572/1/012011>
- Purwaningsih, S, Agustiyani, D., y Antonius, S. (2021). Diversity, activity, and effectiveness of rhizobium bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (Pgpr) isolated from dieng, central java. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504>
- Quilbé, J., Lamy, L., Brottier, L., Leleux, P., Fardoux, J., Rivallan, R., Benichou, T., Guyonnet, R., Becana, M., Villar, I., Garsmeur, O., Hufnagel, B., Delteil, A., Gully, D., Chaintreuil, C., Pervent, M., Cartieaux, F., Bourge, M., Valentin, N. y Arrighi, F. (2021). Genetics of nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Nature Communications* 2021 , 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21094-7>

- Rahate, K., Madhumita, M., y Prabhakar, P. (2021). Nutritional composition, anti-nutritional factors, pretreatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.). *A comprehensive review*, 138, 110796. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110796>
- Rijal, N. (2018). Starch Hydrolysis Test: *Learn Microbiology Online*. <https://microbeonline.com/starch-hydrolysis-test/>
- Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal* genetic diversity and genetic variability: two different concepts associated to plant germplasm and breeding. *Journal of Basic and Applied Genetics*, (2), 7–13. https://sag.org.ar/jbag/wp-content/uploads/2019/11/A1_7-13-2.pdf
- Rodríguez, F. (2017). Tinción de Gram - Blog de Laboratorio Clínico y Biomédico. *Investigación En Discapacidad Medigraphic*, 3. <https://www.labtestsonline.es/tests/tincion-de-gram>
- Rutten, J., Steel, H., Hood, A., Ramachandran, K., McMurtry, L., Geddes, B., Papachristodoulou, A., y Poole, S. (2021). Multiple sensors provide spatiotemporal oxygen regulation of gene expression in a *Rhizobium*-legume symbiosis. *PLOS Genetics*, 17(2), . <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009099>
- Sagar, A. (2021). *Catalase Test- Principle, Procedure, Types, Results, Uses*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/catalase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/>
- Saldaña, J. (2017). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* en suelo de la presa de la Juventud de Marín. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4(7), 1–22.
- Salgado, C., y Largo, J. (2017). Proyecto biotecnológico para buscar alternativas al proceso fisicoquímico de fijación de nitrógeno. *Simposio Internacional de Estadística*, 2. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/152972>
- Sanchez, P. (2019). Proyecto integral para agricultores de fresa y mora: caso tisaleo. *Revista Vínculos*, 4(3). <https://doi.org/10.24133/vinculosespe.v4i3.1560>

- Santi, C., Bogusz, D., y Franche, C. (2019). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743–767. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCT048>
- Schulte, M., Borah, K., Wheatley, M., Terpolilli, J., Saalbach, G., Crang, N., De Groot, H., Ratcliffe, G., Kruger, J., Papachristodoulou, A., y Poole, S. (2021). Metabolic control of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbioses. *Science Advances*, 7(31). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2433>
- Signorelli, S., Sainz, M., Tabares, S., y Monza, J. (2020). The Role of Nitric Oxide in Nitrogen Fixation by Legumes. In *Frontiers in Plant Science 11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00521>
- Tian, C., Wang, T., Wu, L., Han, T., Chen, W., Gu, C., Gu, J., y Chen, W. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2871–2875. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.2008/000703-0>
- Tobar, S. (2018). Innovación en legumbres. In *Revista Chilena de Nutricion*, 45. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182018000200050>
- Torabian, S., Farhangi, S., y Denton, M. (2019). Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. In *Soil and Tillage Research*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.006>
- Tortora, M., Vera, L., Naval, N., Dantur, K., Núñez, M., Alderete, M., y Romero, E. (2019). Aislamiento, caracterización y actividad de cepas de *Azospirillum brasilense* asociadas a la caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*, 40(1).
- Venkatachalam, G., Nandakumar, V., Suresh, G., y Doble, M. (2014). Characterization and applications of cyclic β -(1,2)-glucan produced from *R. Meliloti*. *RSC Advances*, 4(22). <https://doi.org/10.1039/c3ra47073c>
- Versalovic, J., Schneider, M., y Lupski, J. (1994). Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *Article in Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199-207.2005>
- Walker, L., Lagunas, B., y Gifford, M. (2020). Determinants of Host Range

- Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. In *Frontiers in Microbiology* , 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585749>
- Wang, Q., Liu, J., y Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-*Rhizobium* interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9(313). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00313/BIBTEX>
- Wang, X., Feng, H., Wang, Y., Wang, M., Xie, X., Chang, H., Wang, L., Qu, J., Sun, K., Wang, C., Dai, C., Chu, Z., Tian, C., Yu, N., Zhang, X., Liu, H., y Wang, E. (2021). Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Molecular Plant*, 14(3). <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.002>
- Wekesa, C., Furch, A., y Oelmüller, R. (2021). Isolation and Characterization of High-Efficiency Rhizobia From Western Kenya Nodulating With Common Bean. *Frontiers in Microbiology*, 12, 2548. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.697567/BIBTEX>
- Wen, A., Havens, K. L., Bloch, S. E., Shah, N., Higgins, D. A., Davis-Richardson, A. G., Sharon, J., Rezaei, F., Mohiti-Asli, M., Johnson, A., Abud, G., Ane, J. M., Maeda, J., Infante, V., Gottlieb, S. S., Lorigan, J. G., Williams, L., Horton, A., McKellar, M., ... Temme, K. (2021). Enabling Biological Nitrogen Fixation for Cereal Crops in Fertilized Fields. *ACS Synthetic Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00049>
- Wu, Z., Xu, X., Zhang, J., Wiegand, G., y Hou, H. (2019). Influence of environmental factors on the genetic variation of the aquatic macrophyte *Ranunculus subrigidus* on the Qinghai-Tibetan Plateau. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12862-019-1559-0/TABLES/5>
- Xu, H., Yang, Y., Tian, Y., Xu, R., Zhong, Y., y Liao, H. (2020). Rhizobium Inoculation Drives the Shifting of Rhizosphere Fungal Community in a Host Genotype Dependent Manner. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03135>
- Yesmin, M., Rashid, M., Prosun, T., Ali, M., Haider, M., y Paul, S. (2021). Isolation and characterization of rhizobium strains from root nodules of faba bean (*Vicia*

faba L.). *Journal of Bangladesh Agricultural University*, 19(3), 302.
<https://doi.org/10.5455/jbau.86499>

Yoneyama, T., Terakado-Tonooka, J., Bao, Z., y Minamisawa, K. (2019). Molecular analyses of the distribution and function of diazotrophic rhizobia and methanotrophs in the tissues and rhizosphere of non-leguminous plants. *Plants*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/plants8100408>

Zavaleta, D., Soriano, B., y López, M. (2020). Inoculant constituted by *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* and *Trichoderma harzianum* increases the number of active sites for nodulation of *Pisum sativum*. *Manglar*, 17(1), 95–99. <https://doi.org/10.17268/MANGLAR.2020.015>

Zhang, N., Zou, H., Lin, Y., Pan, Q., Zhang, Q., Zhang, H., Wei, H., Shangguan, P., y Chen, J. (2020). Hydrogen sulfide and rhizobia synergistically regulate nitrogen (N) assimilation and remobilization during N deficiency-induced senescence in soybean. *Plant Cell and Environment*, 43(5). <https://doi.org/10.1111/pce.13736>

Zhao, Q., Cherkasov, S., Avdeenko, A., Kondratenko, L., y Mikhaylov, A. (2021). Integral Estimate of the Added Value of Agricultural Crops in the Synergetic Agriculture on the Example of *Vicia Faba* (*Vicia faba* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(5), 4379–4387. <https://doi.org/10.15244/PJOES/131949>

Zou, H., Zhang, N., Lin, Y., Zhang, Q., Zhang, H., Chen, J., y Wei, H. (2020). Hydrogen sulfide is a crucial element of the antioxidant defense system in *Glycine max*–*Sinorhizobium fredii* symbiotic root nodules. *Plant and Soil*, 449(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04465-9>

ANEXOS

Recolección de muestras

Anexo 1.

Planta de haba



Anexo2.

Transporte de muestras



Anexo 4.

Recolección de muestras



Anexo 3.

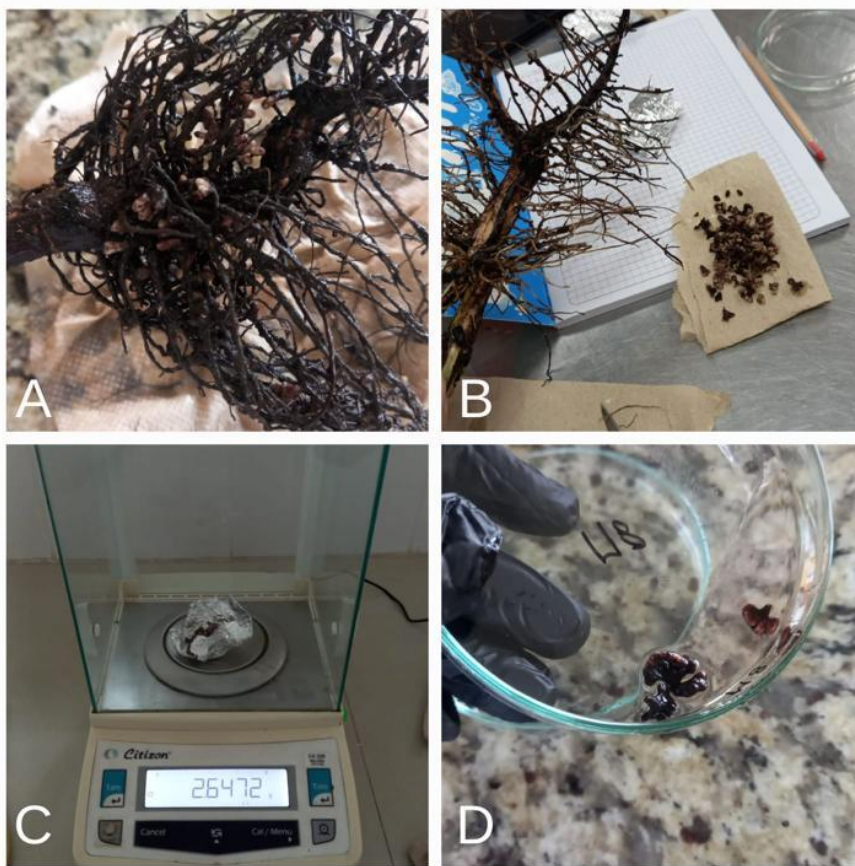
Muestras etiquetadas en bolsas de papel



Procesamiento de nódulos en el laboratorio

Anexo 5.

Desinfección de nódulos

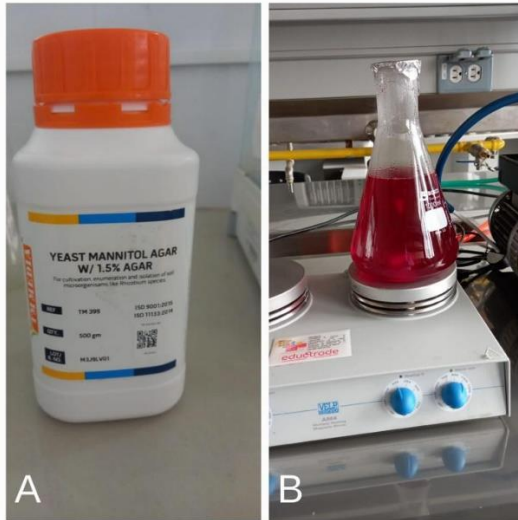


Nota: A) Raíz de *V. faba*; B) Extracción de nódulos; C) Peso de los nódulos; D) Desinfección de nódulos

Aislamiento primario y secundario de *Rhizobium* spp.

Anexo 6.

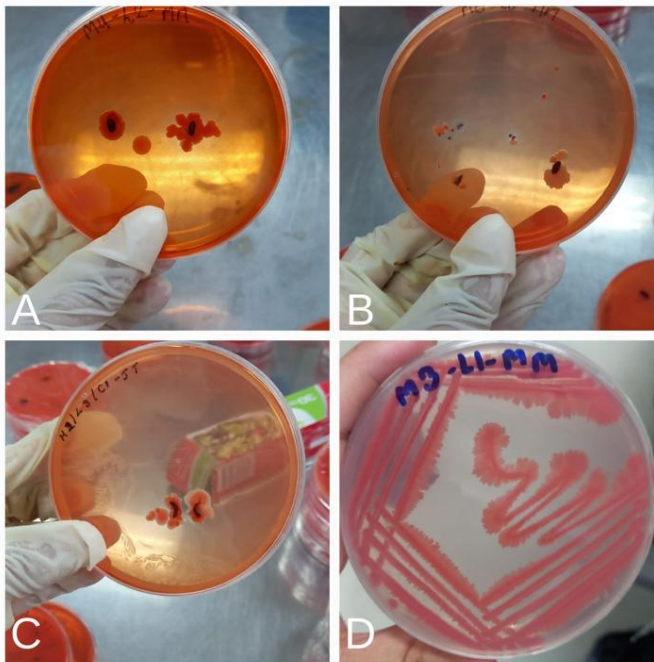
Medio de cultivo YMA



Nota: A) Medio de cultivo YMA; B) Preparación del medio de cultivo

Anexo 7.

Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de V. faba

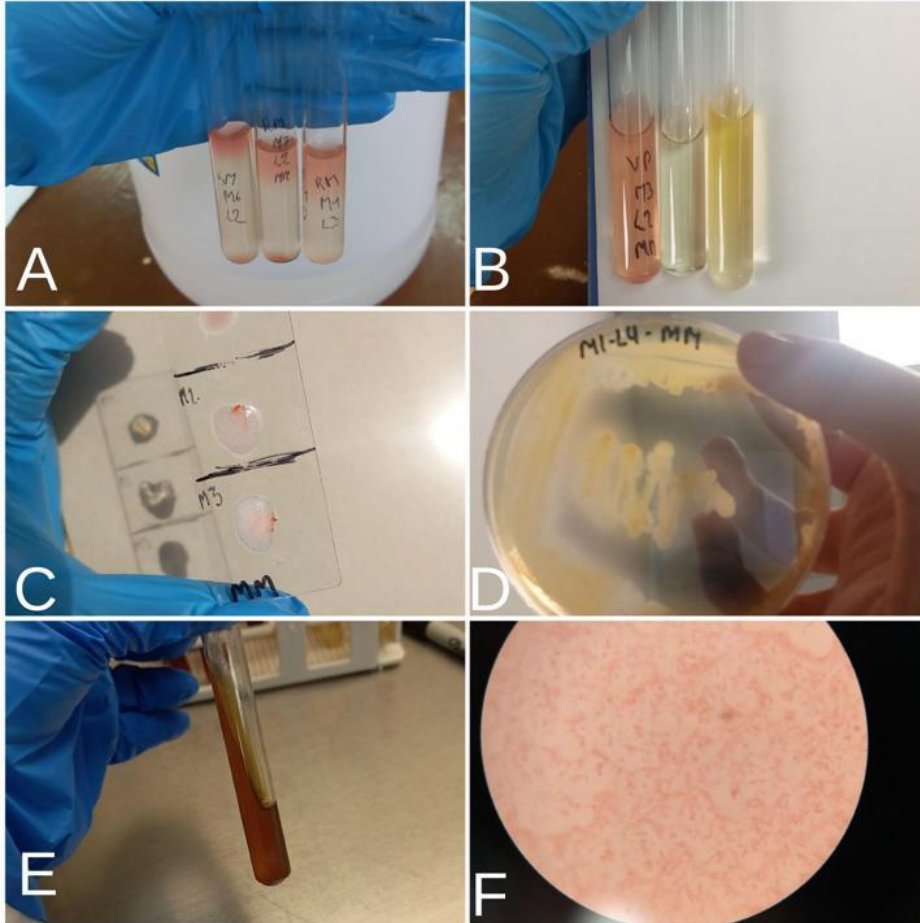


Nota: A) B) y C) colonias que pertenecen al aislamiento primario y D) aislamiento secundario

Pruebas bioquímicas

Anexo 8.

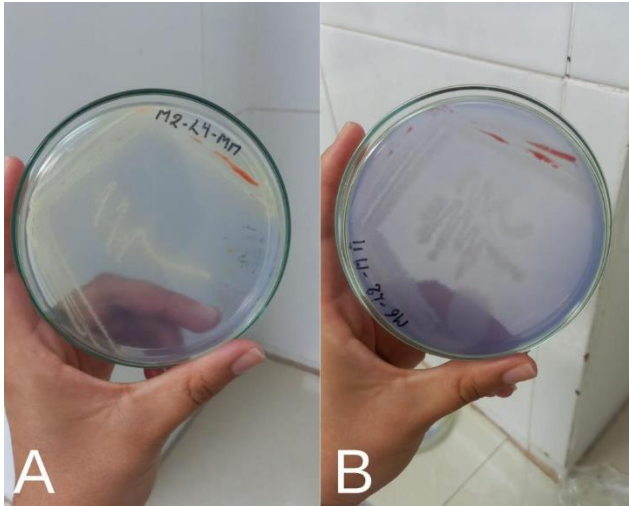
Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados



Nota: A) rojo de metilo prueba + ; B) Voges Proskauer prueba +; C) catalasa prueba +; D) hidrólisis de almidón prueba +; E) TSI prueba -; F) Tinción de Gram bacilos color rosado.

Anexo 9.

Pruebas de autenticidad con púrpura de bromocresol

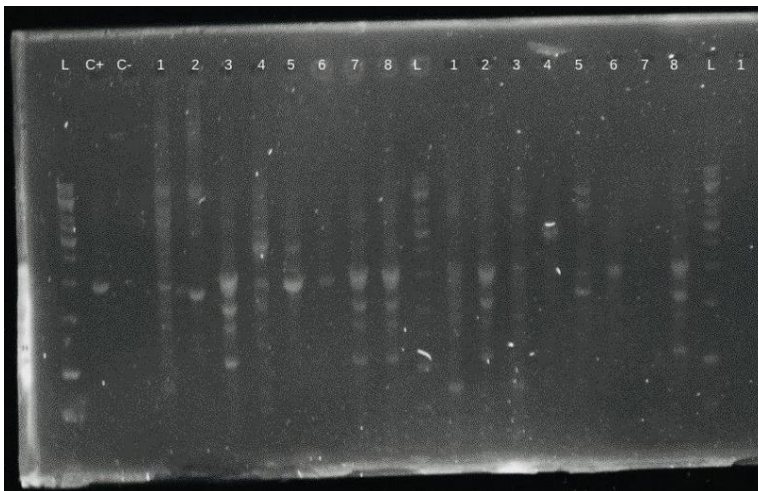


Nota: A) rizobio de crecimiento rápido acidificando el medio y B) rizobio de crecimiento lento alcalinizando el medio.

BOX-PCR

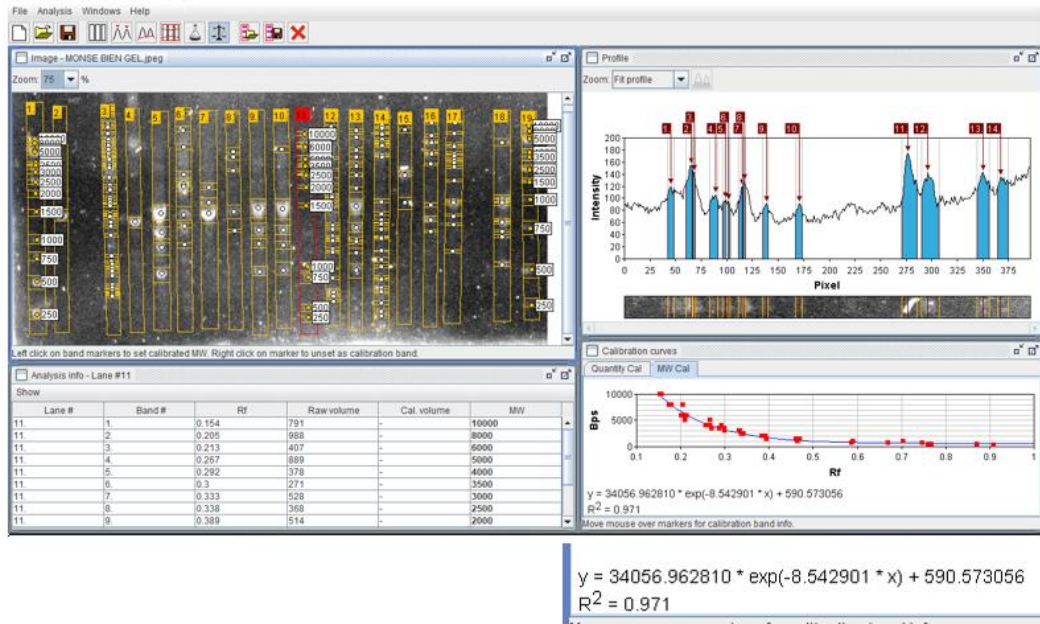
Anexo 10.

Bandas corridas en electroforesis en gel de agarosa



Anexo 11.

Análisis en el programa GelAnalyzer



Nota: El análisis de las bandas en el gel de agarosa en donde se evidenció un R^2 de 0,971 demostró la exactitud de los resultados.

Anexo 12.

Análisis de las bandas en PyElph

Anexo 13.

Análisis en el programa NTSYpc

Page width: 80

Comments:

SIMQUAL: input=C:\Users\LENOVO I7\Documents\MONSE BIEN.NTS, coeff=SM
by Cols

Matrix type = 3, size = 15 by 15, missing value code = "none" (similarity)

	QLU12	QLU56	QLU78	QLU34	ATS56	ATS34	ATS78	ATS12
QLU12	1.0000							
QLU56	0.2619	1.0000						
QLU78	0.2857	0.9286	1.0000					
QLU34	0.3810	0.7857	0.7619	1.0000				
ATS56	0.2619	0.9048	0.8333	0.7857	1.0000			
ATS34	0.3095	0.8571	0.7857	0.7857	0.8095	1.0000		
ATS78	0.2381	0.8810	0.8571	0.8095	0.8333	0.8810	1.0000	
ATS12	0.2381	0.8810	0.8571	0.8095	0.8333	0.8810	0.9524	1.0000
SLCE12	0.5476	0.5238	0.5952	0.5000	0.4286	0.5714	0.5476	0.5000
SLCE34	0.4048	0.6667	0.6429	0.6905	0.6190	0.7619	0.7857	0.7381
SLCE56	0.3810	0.5952	0.6190	0.4762	0.5952	0.4524	0.5238	0.5714
SLCE78	0.3095	0.9048	0.8333	0.7857	0.8571	0.8095	0.8333	0.8333
CTP12	0.3571	0.8571	0.8333	0.7381	0.8095	0.8095	0.7857	0.7857
CTP34	0.3571	0.7619	0.6905	0.6905	0.7143	0.8095	0.7381	0.7381
CTP78	0.3810	0.7857	0.7619	0.6190	0.7857	0.7381	0.7619	0.7619

	SLCE12	SLCE34	SLCE56	SLCE78	CTP12	CTP34	CTP78
SLCE12	1.0000						
SLCE34	0.6190	1.0000					
SLCE56	0.4524	0.3571	1.0000				
SLCE78	0.4762	0.6667	0.5000	1.0000			
CTP12	0.5714	0.5714	0.5000	0.8571	1.0000		
CTP34	0.4762	0.6190	0.4048	0.7143	0.7143	1.0000	
CTP78	0.5952	0.5952	0.5238	0.7857	0.8333	0.6429	1.0000

Ending date & time: 1/30/2023 3:29:20 PM

Anexo 14.

Permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente para trabajar con una especie comercial.



Oficio Nro. MAATE-OTAM-DZ3-2022-0549-O

Ambato, 13 de diciembre de 2022

Asunto: Respuesta a la autorización de recolección de especies de la diversidad biológica

Cynthia Monserrath Morales Miranda
En su Despacho

De mi consideración:

En atención al oficio S/N de fecha 23 de noviembre de 2022, mediante el cual solicita se le extienda una certificación correspondiente a la autorización de recolección de especies de la diversidad biológica, con los artículos de la legislación sobre recolección de muestras de plantas con fines de investigación bajo el tema "Caracterización de Rhizobium spp. a partir del Haba (*Vicia faba* L.) en cuatro localidades del cantón Tisaleo - Tungurahua,

Al respecto me permito comunicar que no es procedente la emisión de la certificación solicitada, en virtud que no es competencia de esta Cartera de Estado, ya que solo se emite permisos de investigación para fauna y flora silvestre; y el Haba (*Vicia faba* L.) corresponde a una especie comercial.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Dr. Pablo Xavier Lema Lara
RESPONSABLE DE LA OFICINA TECNICA AMBATO

Referencias:
- MAATE-UAA-DZ3-2022-3639-E

Anexos:
- ción_correspondiente_a_la_autorización_de_recolección_de_especies_de_la_diversidad_biológica.pdf

Copia:
Señor Ingeniero
Rommel Israel Chicaiza Vargas
Asistente de Calidad Ambiental Provincial



Firmado electrónicamente por:
PABLO
XAVIER LEMA

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica
Dirección: Calle Antonio José de Sucre y Guayaquil Edificio de la Ex Corte de Justicia
Código Postal 180212 / Ambato - Ecuador • Teléfono: (593) 35 243-0088 / 243-0468 Ext. 101
www.mamta.gub.ec

