

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCVELICA

(Creada por Ley Nro. 25265)

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**“IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS AISLADOS DE
NÓDULOS DE *Lupinus alopecuroides* CRECIDAS EN
ZONAS ALTO ANDINA DE CASTROVIRREYNA -
HUANCAVELICA”**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

SUELOS

PRESENTADO POR:

Bach. Viane Marytrini MEJIA HUARANCA,

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

HUANCAVELICA-PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA
(Creada por ley N°25625)
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la Ciudad Universitaria de "Común Era"; auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, a los 10 días del mes de diciembre del año 2019, a horas 09:00 a.m., se reunieron los miembros del jurado calificador, conformado de la siguiente manera:

PRESIDENTE : Ph. D. Agustín, PERALES ANGOMA
SECRETARIO : Mtro. Jesús Antonio, JAIME PIÑAS
VOCAL : Mtro. Salomón, VIVANCO AGUILAR
ACCESITARIO : Ing. Santiago Oscar, PUENTE SEGURA

Designados con resolución N° 340-2019-D-FCA-UNH; del proyecto de investigación titulado:

"IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS AISLADOS DE NÓDULOS DE *Lupinus alopecuroides* CRECIDAS EN ZONAS ALTO ANDINA DE CASTROVIRREYNA - HUANCAVELICA" Cuyo autor es la graduada:

BACHILLER: Viane Marytrini, MEJIA HUARANCA

ASESORADO POR: Dr. Ruggerths Neil, DE LA CRUZ MARCOS.

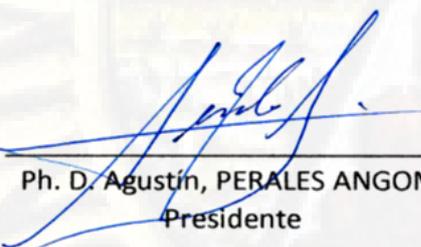
A fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del proyecto de investigación, antes citado.

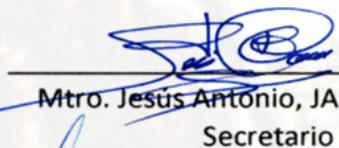
Finalizando la evaluación; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto; y luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al siguiente resultado.

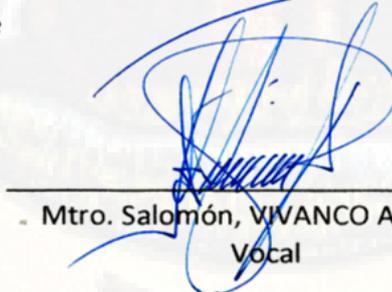
APROBADO **POR.....UNANIMIDAD.....**

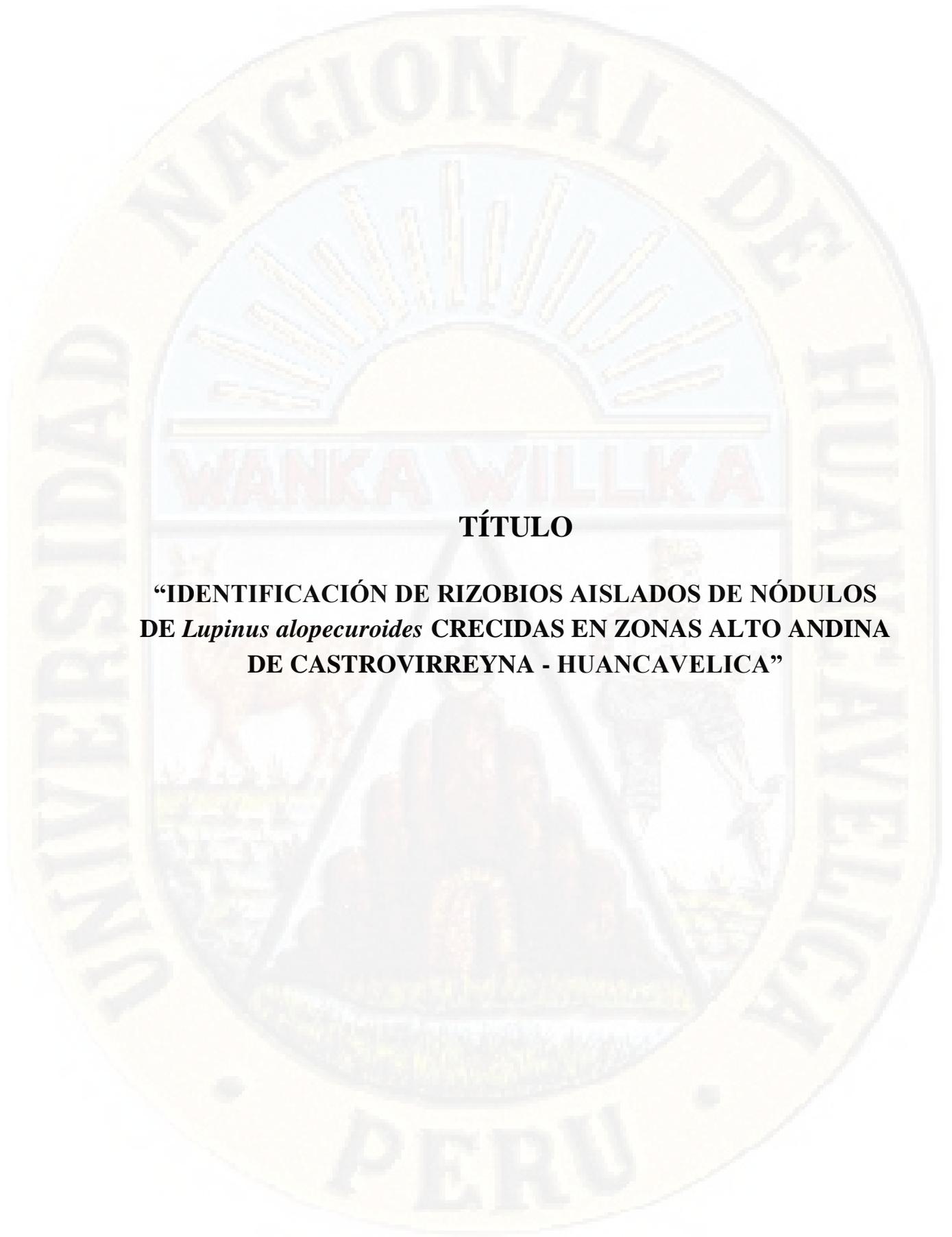
DESAPROBADO

En conformidad a lo actuado firmamos al pie.


Ph. D. Agustín, PERALES ANGOMA
Presidente

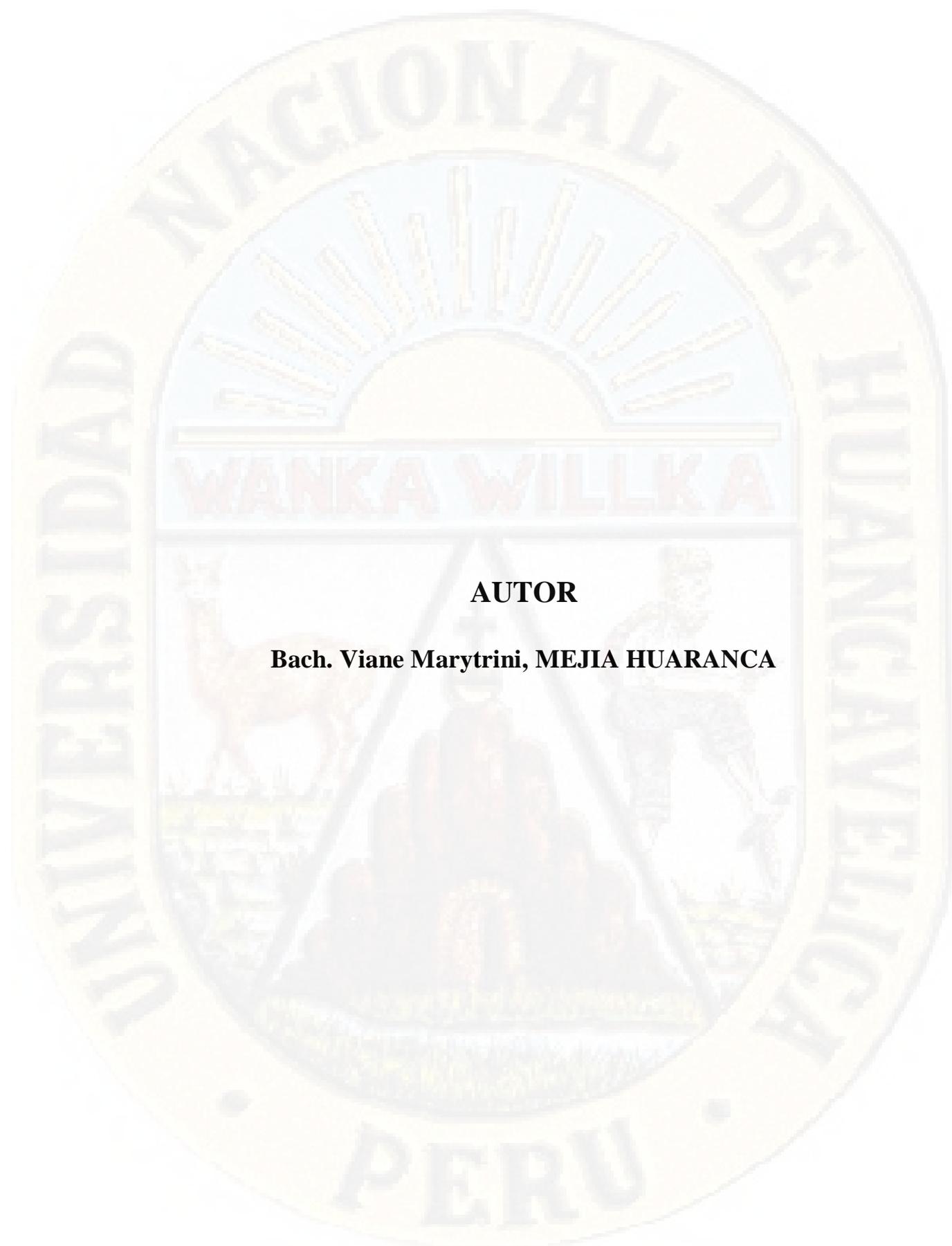

Mtro. Jesús Antonio, JAIME PIÑAS
Secretario


Mtro. Salomón, VIVANCO AGUILAR
Vocal



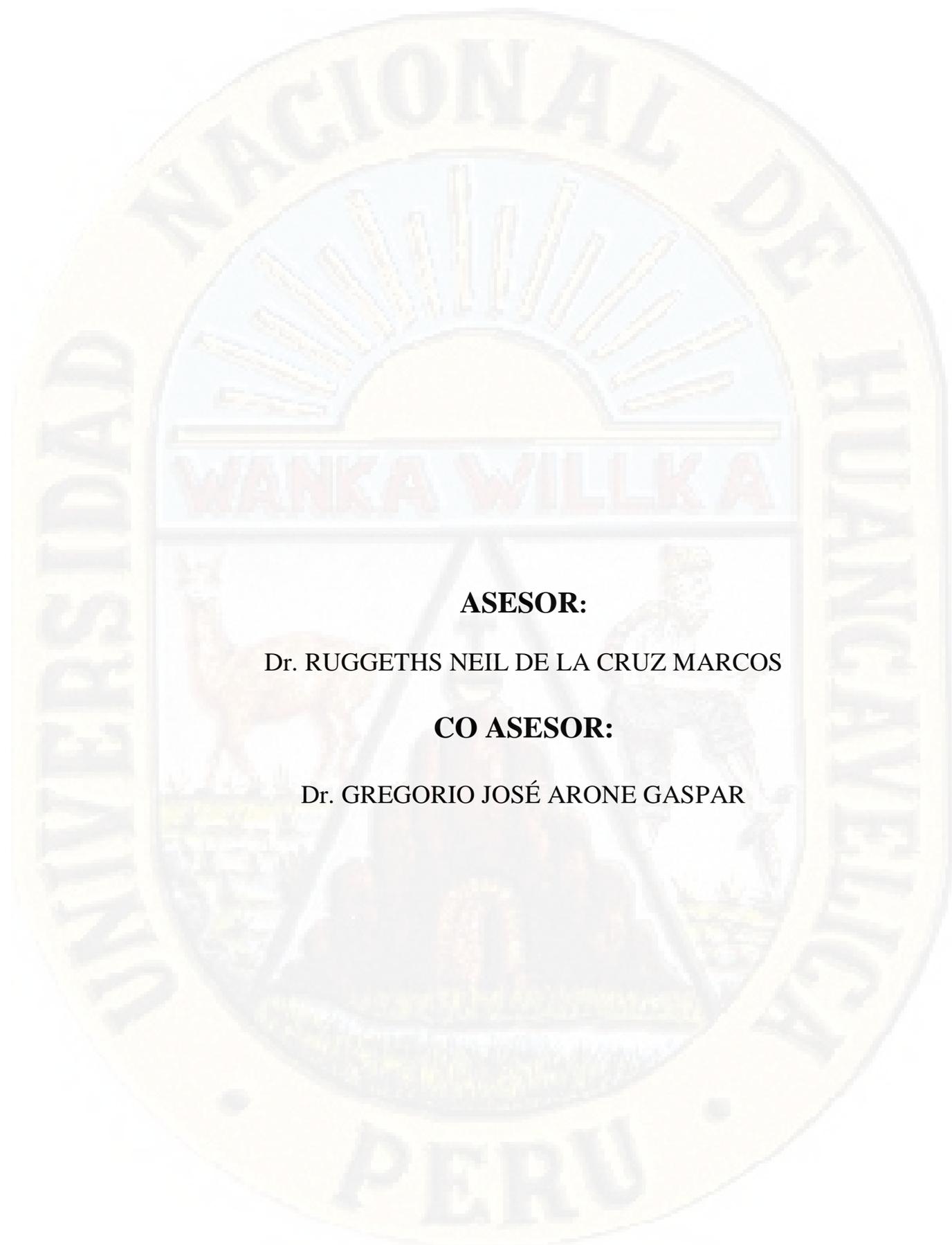
TÍTULO

**“IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS AISLADOS DE NÓDULOS
DE *Lupinus alopecuroides* CRECIDAS EN ZONAS ALTO ANDINA
DE CASTROVIRREYNA - HUANCAVELICA”**



AUTOR

Bach. Viane Marytrini, MEJIA HUARANCA

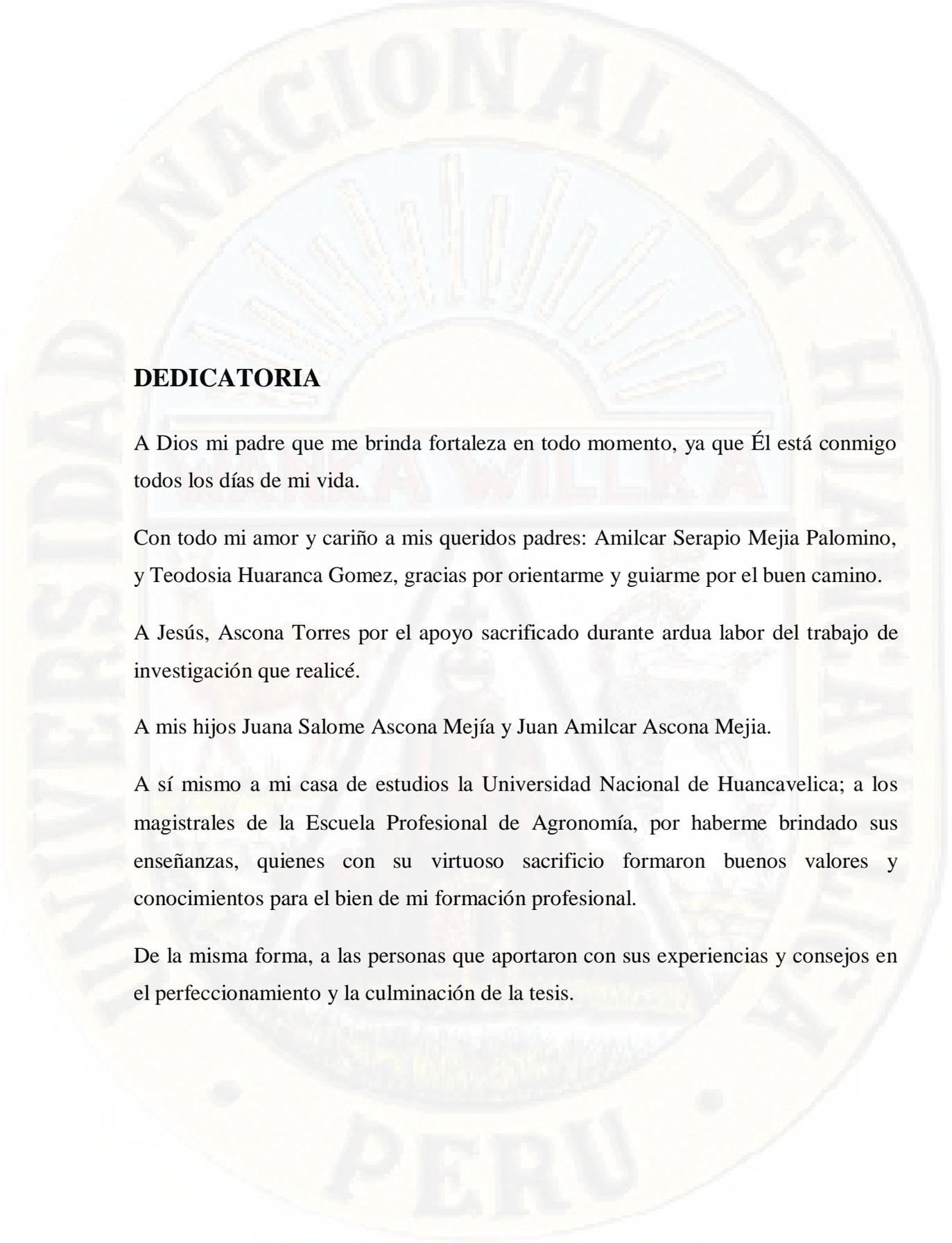


ASESOR:

Dr. RUGGETHS NEIL DE LA CRUZ MARCOS

CO ASESOR:

Dr. GREGORIO JOSÉ ARONE GASPAR



DEDICATORIA

A Dios mi padre que me brinda fortaleza en todo momento, ya que Él está conmigo todos los días de mi vida.

Con todo mi amor y cariño a mis queridos padres: Amilcar Serapio Mejia Palomino, y Teodosia Huaranca Gomez, gracias por orientarme y guiarme por el buen camino.

A Jesús, Ascona Torres por el apoyo sacrificado durante ardua labor del trabajo de investigación que realicé.

A mis hijos Juana Salome Ascona Mejía y Juan Amilcar Ascona Mejia.

A sí mismo a mi casa de estudios la Universidad Nacional de Huancavelica; a los magistrales de la Escuela Profesional de Agronomía, por haberme brindado sus enseñanzas, quienes con su virtuoso sacrificio formaron buenos valores y conocimientos para el bien de mi formación profesional.

De la misma forma, a las personas que aportaron con sus experiencias y consejos en el perfeccionamiento y la culminación de la tesis.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Gregorio José, Arone Gaspar, director de la tesis, amigo y maestro, ya que constantemente estuviste pendiente en todo tiempo de mi formación y hasta en momentos críticos que siempre estuviste encaminando que siempre saliera bien. Lo cual en mi quedarán recuerdos, enseñanza de sus clases. Finalmente, te agradezco por encaminarme a entender todo sobre la identificación de rizobios aislados de nódulos.

Al Dr. Ruggeths Neil, De La Cruz Marcos. Gracias por las inquebrantables indicaciones en la culminación de la tesis, y el ánimo que me diste en todo momento en el informe final de la tesis.

A mi familia, que estuvieron en todo momento, en alegrías y en tristezas, siempre estuvieron presente. Y a mis amigos, Leonor Neda y Juan Luis, por el ánimo perseverante, de haber compartido muchos conocimientos y también permitirme aprender de ustedes amigos míos.

Finalmente, a nuestra casa de estudios la Universidad Nacional de Huancavelica, al Programa 066 por el apoyo económico, y al Laboratorio de Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo

ÍNDICE

ASESOR:	5
DEDICATORIA.....	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
CAPITULO I.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.1. Descripción del problema	17
1.2. Formulación del problema	18
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo general.....	18
1.3.2. Objetivo específico:.....	19
1.4. Justificación.....	19
1.5. Limitaciones	20
CAPÍTULO II.....	21
MARCO TEÓRICO	21
2.1. Antecedentes	21
2.2. Bases teóricas	22
2.2.1. El <i>Lupinus</i>	22
2.2.2. <i>Lupinus alopecuroides</i>	25
2.2.3. Simbiosis de rizobio-leguminosa y su aporte de N ₂	26
2.2.4. Comunidades microbianas que se encuentran el suelo	27
2.2.5. Importancia de los microorganismos que se encuentran en el suelo ...	30
2.2.6. Bacterias endófitas.....	31
2.2.7. Diversidad bacteriana del suelo y sistemas de estudios.....	33
2.2.8. El Gen 16S rRNA.....	35
2.2.9. La Metagenómica	36
2.3. Bases conceptuales	38
2.3.1. Nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i>	38
2.3.2. <i>Lupinus alopecuroides</i> crecidas en zonas alto andinas.....	38
2.3.3. Rizobios en los nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i>	39
2.3.4. Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el <i>Lupinus alopecuroides</i>	40

2.4.	Definición de términos.....	41
2.5.	Hipótesis.....	43
2.6.	Variables	43
2.6.1.	Variable N° 1.....	43
2.6.2.	Variable N° 2.....	43
2.6.3.	Variable intervinientes	43
2.6.4.	Variables evaluadas	44
2.7.	Operacionalización de variables.....	45
CAPITULO III		46
METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN		46
3.1.	Ámbito temporal y espacial.....	46
3.2.	Tipo de investigación.....	47
3.4.	Población, muestra y muestreo.....	48
3.4.1.	Población.....	48
3.4.2.	Muestra	48
3.4.3.	Muestreo.....	48
3.5.	Método de investigación	48
3.6.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	55
3.7.	Técnicas y procedimiento de análisis de datos.....	55
CAPITULO IV		56
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS		56
4.1.	Análisis de información	56
4.2.	Prueba de hipótesis.	71
4.3.	Discusión de resultados.....	72
Conclusiones		73
Recomendaciones.....		74
Referencias bibliográficas		75
Apéndice		91

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Localización de Chocra Pucro lugar donde crece la Ccera.....	48
Tabla 2. Análisis físico-químico del suelo de Chocara Pucro, Castrovirreyna.	57
Tabla 3. Análisis foliar de <i>L. alopecuroides</i> crecida en Chocara Pucro, Castrovirreyna.	58
Tabla 4. Identificación de cepas aisladas de nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i> crecidas en Chocara Pucro, Castrovirreyna.	60
Tabla 5. Clasificación taxonómica de secuencias de ADN procedente de nódulos de <i>L. alopecuroides</i>	62
Tabla 6. Géneros bacterianos endosimbiontes de nódulos de <i>L. alopecuroides</i> y número de secuencias determinado por el método independiente de cultivo celular.	62
Tabla 7 Géneros bacterianos implicados en biocontrol.	67
Tabla 8. Géneros bacterianos implicadas en fijación biológica de nitrógeno	68
Tabla 9. Géneros bacterianos implicados como solubilizadoras de fosfatos.	68
Tabla 10. Géneros bacterianos implicadas como productoras de fitohormonas.	69
Tabla 11. Géneros bacterianos implicadas como productoras de sideróforos.....	70
Tabla 12. Géneros bacterianos implicadas en la actividad ACC-Deaminasa.....	70
Tabla 13. Géneros bacterianos implicados como inductoras de resistencia sistémica.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Red alimenticia en el suelo.	30
Ilustración 2. Tipos de endófitos. Color rojo: Endófitos casuales, los colonizan en las heridas producidas naturalmente. El Color azul: Endófitos oportunistas, que colonizan la rizoplanea. Color amarillo: Endófitos convenientes, los cuales invaden al tejido vegetal (Hardoim et al., 2008).	32
Ilustración 3. Localización del distrito y provincia de Castrovirreyna-Huancavelica.	46
Ilustración 4. Representación gráfica del porcentaje de bacterias aisladas de nódulos de <i>lupinus alopecuroides</i> crecidas en Choccará Pucro.	59
Ilustración 5. Plantas de <i>L. alopecuroides</i> inoculadas con los aislados V18, V21 y V26.	61
Ilustración 6. Planta de <i>L. alopecuroides</i> inoculada con el aislado V26.	61

ÍNDICE DE APÉNDICE

Anexo 1. Phylas identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del <i>Lupinus alopecuroides</i>	92
Anexo 2. clases identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del <i>Lupinus alopecuroides</i>	92
Anexo 3. Orden identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del <i>Lupinus alopecuroides</i>	93
Anexo 4. Familias identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del <i>Lupinus alopecuroides</i>	95
Anexo 5. Géneros identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del <i>Lupinus alopecuroides</i>	97
Anexo 6 Análisis de suelos, caracterización del suelo alto andinos donde crecen la Ccera (<i>Lupinus alopecuroides</i>).	103
Anexo 7. Análisis foliar de la Ccera (<i>Lupinus alopecuroides</i>).	104
Anexo 8. Esterilización de nódulos y aislamiento de sus endosimbiontes.	105
Anexo 9. Proceso de purificación de aislados bacterianos.	106
Anexo 10. Bradyrhizobium sp. Aislados del <i>Lupinus alopecuroides</i>	107
Anexo 11 Matriz de consistencia.	108

RESUMEN

El *Lupinus alopecuroides* es una leguminosa nativa de zonas alto andinas, de gran importancia. Este cultivo tiene características ventajosas en el sector agrícola, debido a la microflora asociada con él. Hay pocos estudios que aborden la interrelación microorganismo - planta en la Ccera. En el presente trabajo se planteó, en primer lugar, con el aislamiento de los rizobios de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* crecida en la zona alta andina de Castrovireyna – Huancavelica. Y la identificación de las bacterias endosimbióticas de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* mediante el gen 16S Rrna, se llevado a cabo mediante las técnicas moleculares, de modo que la amplificación y secuenciación esencial gen 16S rRNA, ha permitido establecer que *Bradyrhizobium* sp. corresponde a los Alphaproteobacteria comprometido en la formación de los nódulos radicales en *Lupinus alopecuroides*. Finalmente, se realizó un esfuerzo extraordinario para tratar sobre la diversidad de bacterias en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*, se analizó la diversidad utilizando métodos dependientes del cultivo y mediante metagenómica. Mientras que sólo se aíslan 14 géneros diferentes con el primer método, la metagenómica permitió identificar 200 géneros, el trabajo de investigación realizado tiene una continuación social que les interesara de gran manera a los campesinos de los Andes. Es previsible que la labor realizada sirva para mejorar las situaciones económicas y sobre todo alimentarias de las comunidades. Con los datos obtenidos podrían definirse diferentes formulaciones de muchos bioinoculantes para poder empleos en la reparación de suelos de escasa fertilidad o reparar aquellos que persistido en descanso.

Palabras clave: *Lupinus alopecuroides*, rizobios, endosimbióticas, 16S rRNA, metagenómica, *Bradyrhizobium* sp.

ABSTRACT

Lupinus alopecuroides is a legume native to high Andean areas, of great importance. This crop has advantageous characteristics in the agricultural sector, due to the microflora associated with it. There are few studies that address the microorganism - plant interrelation in the Ccera. In the present work it was proposed, first, with the isolation of the rhizobia from radical nodules of *Lupinus alopecuroides* grown in the high Andean zone of Castrovireyna - Huancavelica. And the identification of endosymbiotic bacteria of radical nodules of *Lupinus alopecuroides* by means of the 16S Rrna gene, was carried out by molecular techniques, so that the essential amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, has allowed *Bradyrhizobium* sp. corresponds to the Alphaproteobacteria involved in the formation of radical nodules in *Lupinus alopecuroides*. Finally, an extraordinary effort was made to deal with the diversity of bacteria in the radical nodules of *Lupinus alopecuroides*, diversity was analyzed using culture-dependent methods and by metagenomics. While only 14 different genders are isolated with the first method, the metagenomics allowed 200 genders to be identified, the research work carried out has a social continuation that will be of great interest to the peasants of the Andes. It is foreseeable that the work carried out serves to improve the economic and especially food situations of the communities. With the data obtained, different formulations of many bioinoculants could be defined to be able to use jobs to repair low fertility soils or repair those that persisted at rest.

Key words: *Lupinus alopecuroides*, rhizobia, endosymbiotics, 16S rRNA, metagenomics, *Bradyrhizobium* sp.

INTRODUCCIÓN

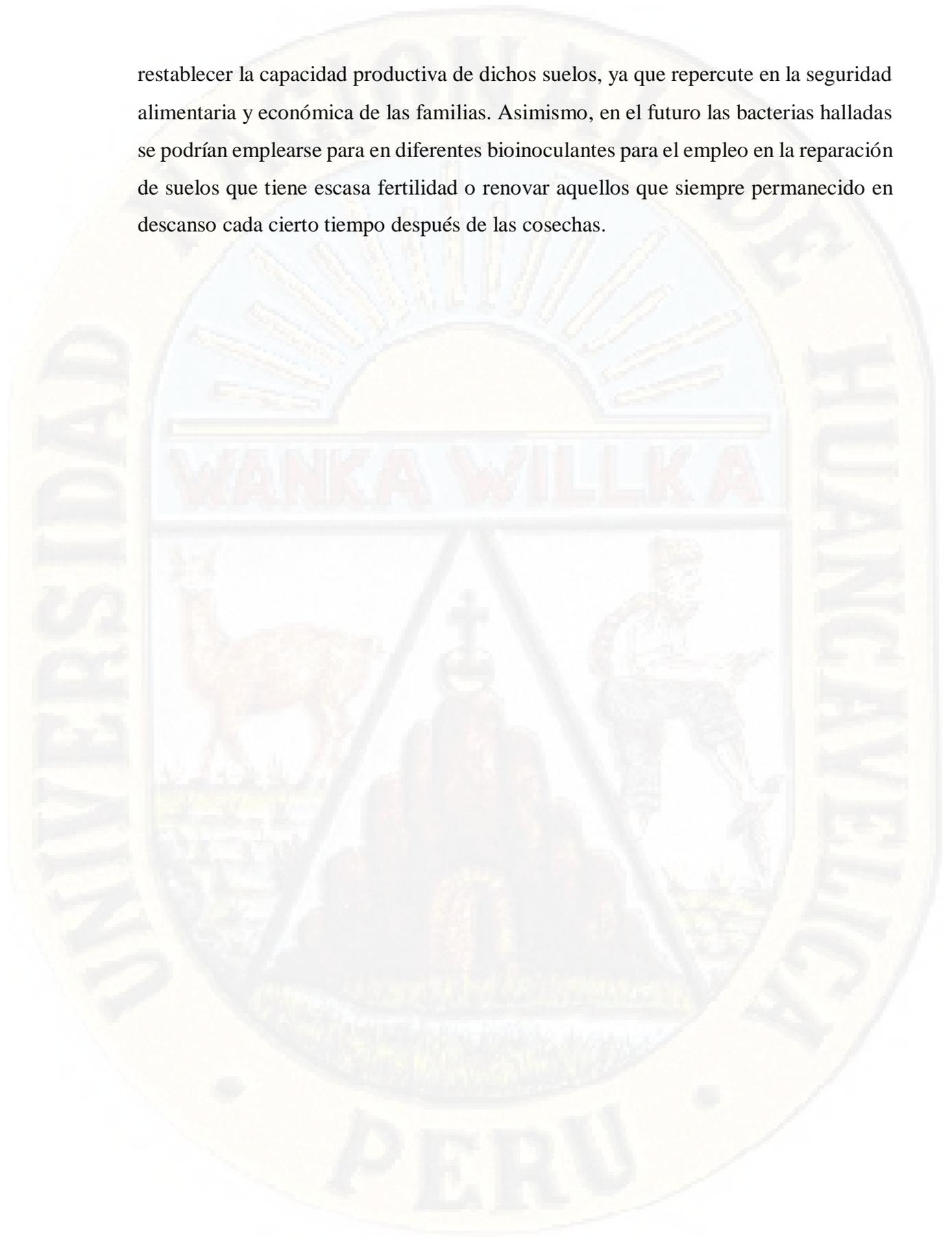
En la región Suni o Jalca de los Andes peruanos, localizada entre los 3500 y 4100 m sobre el nivel del mar, los campesinos continúan con sus prácticas agrícolas heredadas de sus antepasados para sus diferentes cultivos agrícolas que teniendo pequeñas y también dispersas chacras. Cuyas extensiones de sus chacras son pequeñas (80 - 1000 m²) que, por lo general, se afirman en suelos superficiales, en donde la sostenibilidad y la dinámica de su fertilidad natural es muy débil. Los campesinos suelen sembrar con semillas propias de su comunidad, y se también abonan con estiércol de sus ganados, especialmente el del ovino, y no utilizan riego tecnificado en casos mayoritarios.

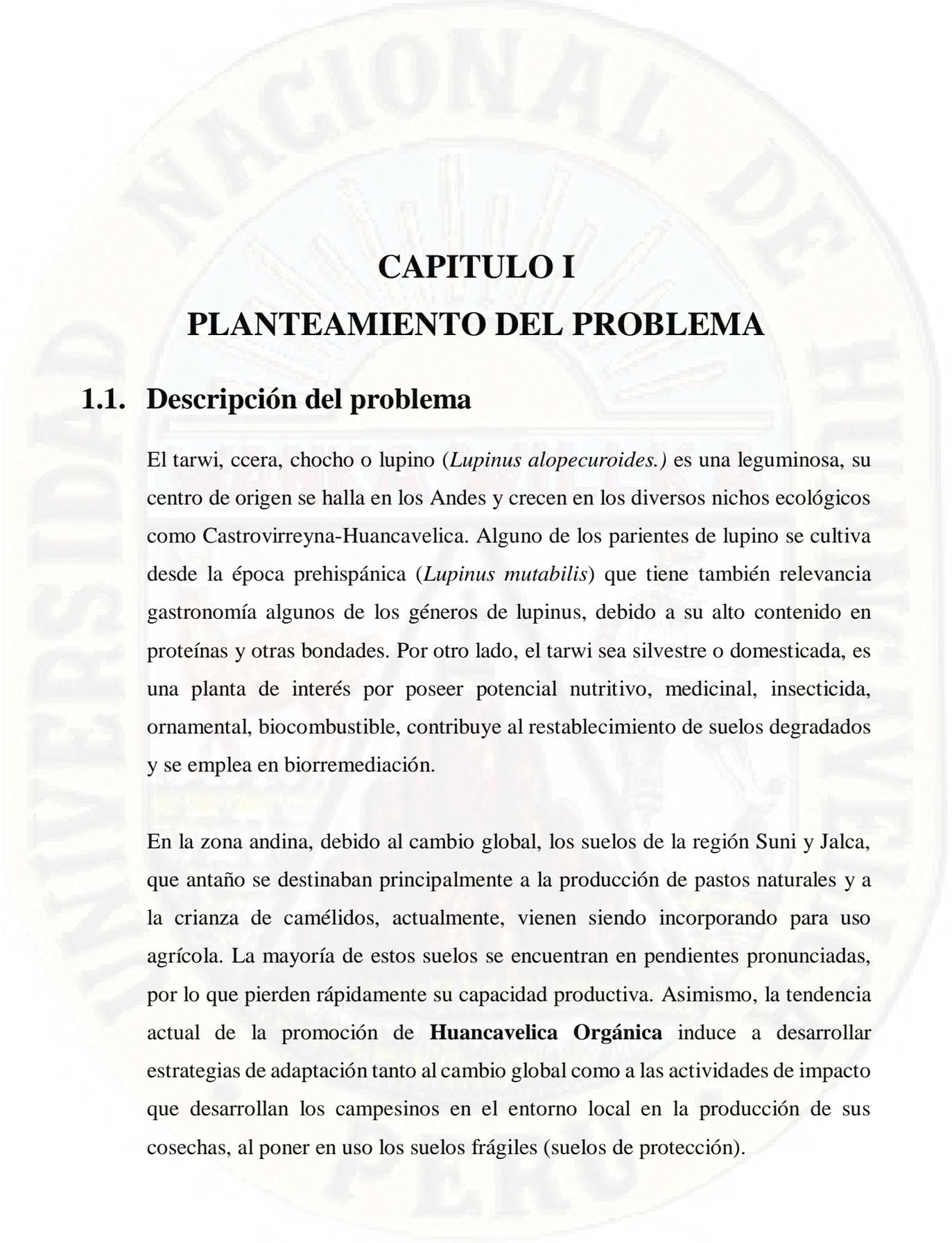
Generalmente estos suelos se encuentran en pendientes pronunciadas y son de baja fertilidad, lo que hace que los campesinos realizan rotación de sectores de siembra, porque los suelos pierden rápidamente su capacidad productiva; lo que nos induce buscar estrategias que permitan restablecer la fertilidad del suelo y seguir logrando cosechas para la seguridad alimentaria de las familias campesinas.

Las leguminosas como el *Lupinus* spp. son los mejores aliados para restablecer la capacidad productiva de los suelos. Dada su abundancia de *Lupinus alopecuroides* en la región Suni y Jalca de Castrovirreyna, nos propusimos a conocer el endosimbionte de la planta que permite la formación de nódulos y fijación del N atmosférico.

En esta Memoria de ingeniero, en primer lugar, se presenta las bacterias endosimbióticas aisladas de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* obtenidas con cultivo dependiente y en segundo lugar se presenta la lista de bacterias endosimbióticas obtenidas mediante el método independiente de cultivo celular, obtenidos mediante técnicas moleculares, de manera que la amplificación y secuenciación del gen esencial 16S rRNA, ha permitido establecer que *Bradyrhizobium* sp. es la Alphaproteobacteria responsable de la formación de nódulos en *Lupinus alopecuroides* y que por limitaciones económicas no se ha llegado completar a identificar a nivel de especie. Sin embargo, tiene una prolongación social de gran interés para los campesinos de Castrovirreyna, porque *Lupinus alopecuroides* sería la fuente más barata para

restablecer la capacidad productiva de dichos suelos, ya que repercute en la seguridad alimentaria y económica de las familias. Asimismo, en el futuro las bacterias halladas se podrían emplearse para en diferentes bioinoculantes para el empleo en la reparación de suelos que tiene escasa fertilidad o renovar aquellos que siempre permanecido en descanso cada cierto tiempo después de las cosechas.





CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

El tarwi, ccera, chocho o lupino (*Lupinus alopecuroides.*) es una leguminosa, su centro de origen se halla en los Andes y crecen en los diversos nichos ecológicos como Castrovirreyna-Huancavelica. Alguno de los parientes de lupino se cultiva desde la época prehispánica (*Lupinus mutabilis*) que tiene también relevancia gastronomía algunos de los géneros de lupinus, debido a su alto contenido en proteínas y otras bondades. Por otro lado, el tarwi sea silvestre o domesticada, es una planta de interés por poseer potencial nutritivo, medicinal, insecticida, ornamental, biocombustible, contribuye al restablecimiento de suelos degradados y se emplea en biorremediación.

En la zona andina, debido al cambio global, los suelos de la región Suni y Jalca, que antaño se destinaban principalmente a la producción de pastos naturales y a la crianza de camélidos, actualmente, vienen siendo incorporando para uso agrícola. La mayoría de estos suelos se encuentran en pendientes pronunciadas, por lo que pierden rápidamente su capacidad productiva. Asimismo, la tendencia actual de la promoción de **Huancavelica Orgánica** induce a desarrollar estrategias de adaptación tanto al cambio global como a las actividades de impacto que desarrollan los campesinos en el entorno local en la producción de sus cosechas, al poner en uso los suelos frágiles (suelos de protección).

Las experiencias sobre restablecimiento de suelos indican que las leguminosas como *Lupinus* spp. son los mejores aliados para el restablecimiento de la capacidad productiva de los suelos, debido a sus diversas bondades: mejor adaptadas para la revegetación de suelos degradados, poseen capacidad para fijar nitrógeno atmosférico mediante simbiosis *Bradyrhizobium* - *Lupinus*. Además, son tolerantes al estrés abiótico como: sequía, suelos ácidos, nitratos, salinidad y metales pesados.

Los rizobios que nodulan al lupino como simbionte común y grupo dominante corresponden al género *Bradyrhizobium*; sin embargo, se han encontrado otros géneros bacterianos como simbiontes, tales como: *Microvirga*, *Rhizobium*, *Brevibacillus* y *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*. Cabe indicar, que *Lupinus alopecuroides* es una de las especies de leguminosas mejor adaptadas a las condiciones de la región Suni y Jalca (sobre los 4000 msnm), pero, aún se desconoce su simbionte.

Por otro lado, esta planta tiene un potencial para su uso en el futuro, sea como planta medicinal, insecticida, ornamental, biocombustible, restablecimiento de suelos degradados y en la biorremediación, de allí el interés por conocer el endosimbionte mediante técnicas moleculares.

1.2. Formulación del problema

¿Qué especie de rizobios es el endosimbionte de *Lupinus alopecuroides* crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica?

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo general

Evaluar los rizobios de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica

1.3.2. Objetivo específico:

- Aislar los rizobios de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides*.
- Identificar las bacterias endosimbióticas de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* mediante el gen 16S rRNA empleando el método dependiente e independiente de cultivo celular.

1.4. Justificación

Científico

La presente investigación permitió, además de conocer el endosimbionte de *Lupinus alopecuroides*, generar protocolos validados para estudios de diversidad de rizobios en otras leguminosas de interés agropecuario.

Socioeconómico

Actualmente, la población requiere con urgencia alimentos producidos ecológicamente, porque se ha desvirtuado la producción de alimentos a base de sobre uso de agrotóxicos, posiblemente ante esta necesidad desde las oficinas del Gobierno Regional de Huancavelica, se promueve convertir a Huancavelica como primera región orgánica del Perú Orgánica, cuyas bases de producción se encuentra en las chacras andinas, por lo que es de urgencia contribuir en generar propuestas sostenibles a fin de lograr mejores ingresos por la venta de las cosechas saludables y además de reducir los gastos que ocasionan al agricultor por la compra de los fertilizantes sintéticos y pesticidas.

Ambiental

El lupino, como abono verde, se convierte en una especie con grandes cualidades para el restablecimiento de la fertilidad natural de los suelos de las chacras campesinas de la región, por tanto, contribuirá en el ahorro de energía fósil (petróleo) y pesticidas, así como también en la reducción de la contaminación del ambiente.

1.5. Limitaciones

En el transcurso de la ejecución del proyecto de tesis se presentaron limitaciones:

- La falta de recursos económicos. El apoyo del programa 066 de nuestra casa superior de estudios, no fue suficiente.
- La falta de programas bioinformáticas para el procesamiento de datos.
- La calidad del internet con que cuenta nuestra Universidad es limitante para procesar datos de secuencias numerosas

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Lupinus es una planta con alto potencial nutritivo, ornamental, insecticida y medicinal. Por estas y otras bondades fueron empleadas desde nuestros ancestros como parte de su dieta diaria y usos en la vivencia campesina (Gladstones, 1984; Gladstones, 1998; Camarena *et al.*, 2012; Chirinos-Arias, 2015).

El lupino establecido como abono verde incorporada al suelo al estado de floración, aporta entre 36 a 66 t/ha de abono verde, o 7 a 11,69 t/ha de materia seca y, aporta entre 288,4 a 501,12 kg de N por ha. Convirtiéndose de esta manera en una alternativa agroecológica (Barrera, 2015).

Las leguminosas del género *Lupinus* tienen como simbionte común al grupo dominante del género *Bradyrhizobium* (Barrera *et al.*, 1997), sin embargo, utilizando secuencias del gen 16S rRNA se han encontrado otros géneros bacterianos como simbiontes de *Lupinus*, con una identidad del 99%, entre ellos: *Microvirga zambiensis strain WSM3693* (Banasiewicz *et al.*, 2016). Asimismo, en nódulos de *Lupinus montanus* se han identificado tres géneros de bacterias: *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* ssp. y *Brevibacillus* sp. y no se identificaron al género *Bradyrhizobium* sp (Corona *et al.*, 2006); igualmente, se ha confirmado la nodulación y *Ochrobactrum lupini* en el *Lupinus albus* (Trujillo *et al.*, 2005) y *Lupinus albus*, *Trifolium repens* por *Phyllobacterium trifolii* (Valverde *et al.*, 2005).

En el distrito de Corongo - Ancash, en diez especies del género *Lupinus* L. *subtomentosus* C.P. Sm, *L. mutabilis* Sweet., *L. brachypremnon* C.P Sm, *L. carazensis* Ulbr., *L. lindleyanus* J. Agardh, *L. affmutabilis*, *L. eriocladus* Ulbr, *L. aridulus* C.P. Sm, *L. weberbaueri* Ulbr., *L. paniculatus* Desr, (Lezama, 2010) reportó sus correspondientes bacterias simbióticas, siete de las cuales pertenecen al género *Bradyrhizobium* y tres a *Mesorhizobium*.

Igualmente (Arone *et al.*, 2013), al evaluar las bacterias endosimbiontes en nódulos radiculares de *Medicago hispida* mediante el gen 16S rRNA y otros, genes como *atpD*, *glnII*, *recA* y *nodC* encontró como endófitos a los géneros *Kaistia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Sphingopyxis*, *Duganella* y *Rheinheimera*. Estos resultados muestran que el análisis de la comunidad bacteriana dentro de los nódulos es esencial para mejorar nuestro conocimiento sobre las poblaciones bacterianas endófitas como un paso previo para estudiar las actividades y aplicaciones de endófitos en la agricultura, la protección del medio ambiente y la biotecnología.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. El Lupinus

El género *Lupinus* es diverso, se distribuye en diferentes partes del mundo incluyendo América del Sur, Europa y Australia (Coloma, 2009; FAO, 2010) y comprende alrededor de 200 especies que crecen en un amplio rango de condiciones ecológicas, tales como en suelos ácidos pobre de nutrientes y en climas áridos (Gladstones, 1984; Gladstones, 1998). Por su amplia distribución, el tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es conocida comúnmente en las distintas lenguas y culturas. En Aymara: tauri (Bolivia); quechua: tarwi, tarhui (Bolivia, Perú), chuchusmuti (Bolivia), chocho, chochito (Ecuador y Norte del Perú), chuchus (Bolivia), ccequella (Azangaro Perú); Castellano: altramuz, lupino, chocho; inglés: Andean lupine, Pearl lupin (Jacobsen y Mujica., 2006).

2.2.1.1. El Lupinus como abono verde

La influencia y exigencia del mercado a la vida de los campesinos andinos, vienen induciendo producir cosechas apartadas de su propia cosmovisión y en su afán de producir más, vienen descuidando las prácticas agronómicas tradicionales, pasando a la sobreexplotación de las chacras empleando tecnologías importadas e inadecuadas, causando con el correr del tiempo el deterioro y empobrecimiento del suelo, lo que se ha traducido en la baja fertilidad y escasa producción de cosechas (Hernández *et al.*, 1996). Frente a los suelos degradados, es necesario encontrar alternativas sostenibles a fin de restablecer la capacidad productiva de las chacras, siendo una de ellas el empleo de los abonos verdes (García-Hernández, 2010).

La planta de tarwi, como abono verde, se emplea en plena floración para recuperar suelos pobres, cansados, esquilados, carentes de nutrientes y de materia orgánica, y tiene buenos resultados en las cosechas, porque mejoran considerablemente la cantidad de materia orgánica, estructura y retención de humedad del suelo; además, aporta cantidades superiores a 100 kg de N por ha (Barrera *et al.*, 1997). Además, debido a sus raíces pivotantes el tarwi incrementa la infiltración del agua en el suelo y disminuye la velocidad de escurrimiento en terrenos en pendiente (Saravia, 2015). En el caso del tarwi silvestre, cuando las plantas llegan a la madurez, las hojas se secan y caen al suelo, éstas al ser incorporadas se descomponen con la humedad, formando un mantillo café oscuro, que servirá como nutrientes para la próxima campaña agrícola, práctica empleada desde épocas preincaicas (Jacobsen y Mujica, 2006).

2.2.1.2. El Lupinus como biocombustible

Los troncos secos del Lupinus sean cultivadas o silvestres se emplean como leña desde tiempos antiguos. Las familias

campesinas trasladan estos tallos de la chacra a la vivienda y lo emplean como leña. El tallo seco, posee gran cantidad de celulosa y alto poder calorífico, por lo que se emplea como biocombustible (Jacobsen y Mujica, 2006; Sato *et al.*, 2010). Asimismo, las cenizas producto del quemado de los tallos secos de tarwi constituyen un excelente repelente de insectos chupadores, rapadores, perforadores y cortadores de plantas tiernas en los cultivos andinos (Jacobsen y Mujica, 2006).

2.2.1.3. Lupinus en la biorremediación

Las diferentes especies de *Lupinus* se pueden emplear en la fitorremediación, porque tienen la capacidad de extraer y secuestrar metales pesados. Igualmente, el *Lupinus* se emplean en la fitoestabilización (Vázquez *et al.* 2006; Dary *et al.*, 2010), así como también en la fitoextracción y fitoacumulación de metales pesados (Pastor *et al.*, 2003; Vara Prasad y de Oliveira Freitas 2003; Zornoza *et al.*, 2010), se han reportado también que el *Lupinus* se puede emplear en la captación del Hg (Paisio *et al.*, 2012).

2.2.1.4. El *Lupinus* y su uso en la sanidad

La planta de lupino (*Ccera*) en la vivencia campesina es medicinal, porque presenta compuestos fitoestrógenos no esteroídicos como las isoflavonas, las cuales poseen anillos fenólicos que se unen a los receptores de estrógeno (Gálvez *et al.*, 2008), como tamoxifen, usado para el tratamiento de cáncer de mama (Davies *et al.*, 2013), por lo que ayudaría a la prevención de cáncer. Así como de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas menopáusicos (Gálvez *et al.*, 2008). En las hojas como en las semillas de tarwi se han probado la actividad del extracto acuoso y etanólico observándose la actividad antileishmanial (*Leishmania* sp.) y antitripanosomal (*Trypanosoma cruzi*) (Huamán *et al.*, 2013).

Por otro lado, debido a su contenido en alcaloides, el tarwi se siembra a menudo como cerco vivo o para separar parcelas de diferentes cultivos, aspecto que actúa como repelente o evita el daño que pudieran causar los animales. Asimismo, los suelos que en la campaña anterior hayan sido sembrados con tarwi e incorporados, disminuyen significativamente el número de nódulos de nematodos (*Nacobus*, *Globodera*) en el cultivo de la papa, esto debido a la presencia de alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina, etc.) que contiene el tarwi, los que controlan la sanidad de las plantas (Jacobsen y Mujica, 2006; Saravia, 2015). Igualmente, los alcaloides (esparteína, lupinina, ácido lupínico, lupinidina, entre otros), son tóxicos y otorgan un sabor amargo a la planta y dificultan su consumo directo por los humanos (Jacobsen *et al.*, 2006), pero se emplean estos alcaloides para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de animales domésticos. Ocasionalmente, los agricultores utilizan el agua de cocción del tarwi como laxante y como biocida en el control de plagas de las plantas (Gross y Tuesta, 1977).

2.2.2. *Lupinus alopecuroides*

Lupinus alopecuroides llamado chocho, sachá o rabo de zorro; es un arbusto pubescente con inflorescencia grande y vistosa, crece sobre los 4000 m en zonas húmedas y frías (Barney, 2011). Es una planta perenne, herbácea, de 60-100 cm de altura, erecta no ramosa; tallo muy corto, grueso, fistuloso, lanoso-pubescente y veloso, pelos de 3-8 mm de largo. Hojas densamente reunidas en la base, largamente pecioladas, abundante y densamente vellosas por ambas caras; estípulas lanceolado-lineares, de 40-50 mm de largo. Presenta inflorescencias en racimos de 20-30 flores, muy densamente dispuestas en el eje de un solo internudo, de 10-30 mm de grosor. Su fruto en legumbre mide 45 mm de longitud y 7 mm de anchura, de color pálido-rojizo, densamente lanoso-veloso, con pelos de

color blanco lechoso; cuatro o cinco óvulos; semillas de 3 mm de longitud y 2 mm de anchura, rojo-negruzcas, sin manchas (Jussie, 1792).

EL *Lupinus alopecuroides* pertenece al género *Lupinus* de la subfamilia Faboideae y de la familia Fabaceae que corresponden al orden Fabales, clase Magnoliopsida y a la división: Magnoliophyta (Coloma, 2009; FAO, 2010).

2.2.3. Simbiosis de rizobio-leguminosa y su aporte de N₂

La fijación biológica del Nitrógeno (FBN) es el proceso responsable para la reducción del N₂ a amonio (NH₃) (Franche *et al.*, 2009), y es llevado a cabo por microorganismos diazotófos, particularmente por bacteria y arquea (Dixon y Kahn, 2004). La enzima encargada de la fijación del N₂ es la nitrogenasa que constituye, típicamente, de la ferroproteína (Fe-proteína nitrogenasa reductasa,) así como también de molibdoferroproteína (MoFe-proteína, nitrogenasa). Cuando no se encuentra la disponibilidad del molibdeno en el medio, las bacterias como *Rhodobacter capsulatus* o *Azotobacter vinelandii* incitan a la síntesis de las nitrogenasas alternativas los cuales contienen hierro o vanadio en remplazándole al molibdeno (Rubio y Ludden, 2008; Dixon y Kahn, 2004; Bellenger *et al.*, 2008;).

También se estima que el importe total del N que se añade al suelo es de unos 275 millones de toneladas métricas por año, por lo cual 30 son de causadas por la naturaleza, como erupciones volcánicas o también las descargas eléctricas, 70 provienen de síntesis industrial debido a que producen muchos fertilizantes nitrogenados por el proceso Haber-Bosch, y 175 es causan de la fijación biológica del N₂ (Galloway *et al.*, 2008, De Felipe, 2006). La fijación biológica de N₂ es, por tanto, un proceso de enorme interés en el ciclo biogeoquímico del N en la naturaleza a si repone el contenido de N total en la biosfera y así indemniza las que se pierden por causa de la desnitrificación (Philippot *et al.*, 2007). Como ejemplo, baste decir que el empleo de alfalfa como cultivo en rotación incorpora al suelo entre 127 y 500 kg de N/ha/año (Altieri y Nicholls, 2000). El manejo de

leguminosas constituye, por lo tanto, una forma de disminuir la utilización de los fertilizantes nitrogenados, lo que provoca una disminución reveladora en los términos económicos como también en la contaminación ambiental. Las bacterias del orden *Rhizobiales*, conocidas genéricamente como rizobios, son α -Proteobacterias, Gram-negativas, que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* (Sawada *et al.*, 2003; Willems, 2006; Zakhia y de Lajudie, 2006; Velázquez *et al.*, 2006; Graham 2008). Estos rizobios estimulan en las raíces de las plantas hospedadoras en la formación de los nódulos, que son los órganos donde tiene lugar el proceso de fijación de N_2 . La mayoría de los rizobios forman los nódulos en las raíces, aunque en caso del *Azorhizobium* los origina tanto en las raíces como también en los tallos del *Sesbaniarostrata*, y *Phyllobacterium* forman las hojas generalmente en plantas que pertenecen a las familias Rubiaceae y Myrsinaceae. Además de los rizobios, existen otras bacterias capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas, como son las β -Proteobacterias de los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* (Velázquez *et al.*, 2006, Bontemps *et al.*, 2010, Elliot *et al.*, 2010). En el interior de los nódulos, los rizobios se transforman en células especializadas, los bacteroides, que se caracterizan por sintetizar la enzima nitrogenasa que es la que reduce el N_2 a amonio (NH_4^+). Estudios de campo han demostrado que *L. mutabilis* es capaz de fijar alrededor de 200 kg de nitrógeno por hectárea (Altieri y Merrick, 1994).

2.2.4. Comunidades microbianas que se encuentran el suelo

El suelo es una entidad vivo, ininteligible como también heterogéneo, que su variedad se convierte en distintos microhábitats que colonizan los microorganismos en una estrecha asociación que son las partículas del suelo como otros mecanismos del mismo (Daniel, 2005; Foster, 1988; Mocali y Benedetti, 2010). En el suelo encontramos el hábitat de la mayor riqueza en

especies como el de los hongos, algas, protozoos y bacterias (Siciliano, 2001; Buée *et al.*, 2009; Usher *et al.*, 1979; Giller, 1996; Germida y Anderson, 1975). Estas algas como las bacterias son más abundantes y muy diversas, probablemente por su capacidad de crecer rápidamente ya que poden utilizar una mayor variedad de los compuestos como lo son las fuentes nitrógeno y carbono. El dinamismo y ecología de las poblaciones microbianas que conforman las comunidades edáficas se conmueven por las características físicas y químicas del suelo por los mismos organismos (Hinsinger *et al.*, 2009; Stotzky, 1989).

La fase sólida y el volumen, del suelo ocupa un aproximado del 50%, y lo restante es ocupado por las fases gaseosa como también la fase líquida (Jordan, 2005). Por lo cual la fase sólida lo conforman las partículas de arena, limo y arcilla de distintos tamaños, y la materia orgánica originario de los residuos vegetales, animales y los microorganismos que se encuentran en diferentes fases en descomposición, y también la microbiota viva (Dennis *et al.*, 2008; van Elsas *et al.*, 1998). En caso de la fase acuosa, encontramos las sustancias orgánicas y como también las inorgánicas que se aprovechan como nutrientes o pueden ser inhibidores de microorganismos, está diluida y se encuentra disponible de forma interrumpida en el suelo, exclusive se encuentra saturado. Y los espacios que, no ocupado la fase acuosa, se satura con aire y otros gases (O_2 , CO_2 , CH_4 , CO , NO_x), los ácidos grasos con cadena corta, aldehídos, alcoholes o también compuestos aromáticos, que son unos desplazados por otros, dañando a la estructura y el dinamismo de los microorganismos. Las concentraciones del O_2 como del CO_2 es variable en el suelo ya que dependen de la temperatura como de la humedad (He Singer *et al.*, 2009), también el contenido de la materia orgánica (Revut, 1964y Abrosimova), lo mismo en la profundidad del suelo y el tipo de cultivo (Buyanovsky y Wagner, 1983).

Las diversidades de comunidades bacterianas edáficas son enormes por lo que en un gramo de suelo se podría contener entre 1×10^3 y 1×10^6 muchas

especies únicas de bacterias (Gans *et al.*, 2005, Torsvik *et al.*, 2002, Tringe *et al.*, 2005, Fierer *et al.*, 2007). La Microbiología actual se encuentra en un desafío para estudios de diversidad de la vida microbiana y el papel que juegan los microbios en el suelo son todavía muy poco conocido.

Los factores que afectan su desarrollo de la comunidad bacteriana edáfica (Stotzky, 1989)

Factores	Medidas
Biológicos y nutricionales	Carbono y nitrógeno. Genética de los microorganismos. Factores de crecimiento. Nutrientes minerales Interacciones entre los microorganismos.
Físico-químicos	pH. Temperatura. Composición atmosférica. Radiación electromagnética, Presión. Potencial rédox.
Químicos	Conductividad. Composición iónica.
Físicos	Disponibilidad hídrica. Superficie. Relaciones espaciales.

Empleando los métodos dependientes de cultivos se han descrito entre 0,001-0,1% de los microorganismos del agua de mar, 0,25% de las aguas dulce, 0,25% de sedimentos y por ultimo 0,3% de microorganismos de los suelos (Singh, *et al.*, 2008; Amann, *et al.*, 1995). Esto involucra que la gran mayoría de bacterias no se pueden cultivar y por consecuentemente, pocas conocidas para el hombre. Por ello se deba al desconocimiento de sus requerimientos nutricionales y también fisiológicos para su buen crecimiento que no permita fácil cultivo en los medios usuales que se utilizan en el laboratorio (Rondon *et al.* 1999; Ovreas y Torsvik, 1998; Peix *et al.*, 2011).

2.2.5. Importancia de los microorganismos que se encuentran en el suelo

Bacterias y hongos son esenciales para el funcionamiento fundamental de los ciclos biogeoquímicos y como también la transferencia de la energía a los niveles principales de las cadenas tróficas (Ilustración 1). Tanto en el suelo natural lo mismo en el agrícola, son imprescindibles los microorganismos para su mantenimiento y su empleo ya que están implicados en los ciclos del C, S, P y, N e intervienen en procesos principales como es la formación estructural del suelo, descomposición de la materia orgánica y la supresión de toxinas (van Elsas y Trevors. 1998).



Ilustración 1. Red alimenticia en el suelo.

Fuente: http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/images/A-3.jpg.

Los microorganismos, tienen una función definitiva para defender de las enfermedades, en desarrollar el crecimiento de las plantas, y en cambios de la vegetación (Doran *et al.*, 1996), el cual ayudan al sustento de la calidad del suelo en los sistemas agrícolas (Kennedy *et al.*, 1995). Las características microbianas del suelo mostrar cambios en la degradación de los recursos, pérdida del suelo, y contaminación pueden representar cifras importantes que se conocería de impacto ambientales y antropogénicos (DeLong y Pace, 2001, Pankhurst *et al.*, 1996, Tiedje *et al.*, 1999).

2.2.6. Bacterias endófitas

Tomada literalmente, la palabra endófito significa: (adentro de la planta) (*endon*, en griego, adentro de; *phyton*, planta) como (Bacon y White, 2000), ya que endófito es un microorganismo, aquellos que colonizan en los tejidos vivos internos de algunas plantas, sin ocasionar ningún daño negativo inmediato ni efecto opuesto. De esta manera, dichas bacterias endófitas se les consideran como aquellas aisladas de tejidos de las plantas esterilizadas superficialmente, también se extrae del tejido interno de las plantas, y que no muestran síntomas perceptibles de enfermedades en dichas plantas (Hallmann *et al.*, 1997 y Kloepper *et al.*, 1992). Estas bacterias se hallan primariamente en los espacios intercelulares de tejidos y, en poca frecuencia, intracelularmente y en los tejidos vasculares, lo que no causan síntomas de las enfermedades (Hurek *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1995).

Bacterias como las endófitas proceden de semillas (McInory y Kloepper, 1995), material vegetativo de la siembra (Sturz, 1995), en los tubérculos (Trevet y Hollis, 1948), también en raíces (Philipson y Blair, 1957), de igual modo en tallos y las hojas (Henning y Villforth, 1940), se hallan en frutos (Samish *et al.*, 1961; Sharrock *et al.*, 1991), en suelos rizosferico (Patriquin *et al.*, 1983) en la filosfera (Beattie y Lindow, 1995). Con la singularidad de las bacterias que se transmiten por las semillas (McInory y Kloepper, 1995), que se encuentran dentro de la planta, los permisibles endofitos localizan a su hospedador por electrotaxis, quimiotaxis, o encuentro accidental, y deben establecerse primero la superficie de la raíz antes de enterarse a la planta. En lo general, la introducción al interior de la planta se ejecuta a través de grietas naturales como son las de las estomas de hoja o las lenticelas que se encuentran en los tallos (Kluepfel, 1993), en las flores (Sharrock *et al.*, 1991), en heridas, en las uniones epidermales, también en puntos de emergencia de raíces laterales o por aberturas provocadas en la emergencia de las raíces. Las heridas de las plantas, producidas por los factores bióticos o abióticos, son posiblemente un factor muy importante el ingreso de las bacterias endófitas. Las heridas en las raíces, además de facilitar una vía de

entrada, también ocasionan favorables condiciones al liberar los exudados radicales a la superficie, lo cual sirven como fuente energética para las bacterias (Hallmann *et al.*, 1997).

Se definen diversos tipos de endófitos (Ilustración 2.). Los endófitos por casualidad, también llamados endófitos temporales, llegan a colonizar en heridas producidas naturalmente. En cambio, los endófitos oportunistas colonizan en el rizoplasma consecutivamente, penetran a los tejidos internos través de grietas formadas por emergencia en raíces laterales de la planta y también en el ápice radical. Igual a los endófitos pasajeros, los endófitos oportunistas se definen a invadir los tejidos de la corteza de la raíz. Los endófitos competentes atacan al tejido vegetal, se adecuan al entorno ambiental de la planta, pueden también colonizar diversas partes de la misma forma y, mantienen el equilibrio integral con la planta hospedante, incluso cuando se encuentran en abundancia (Hardoim *et al.*, 2008).

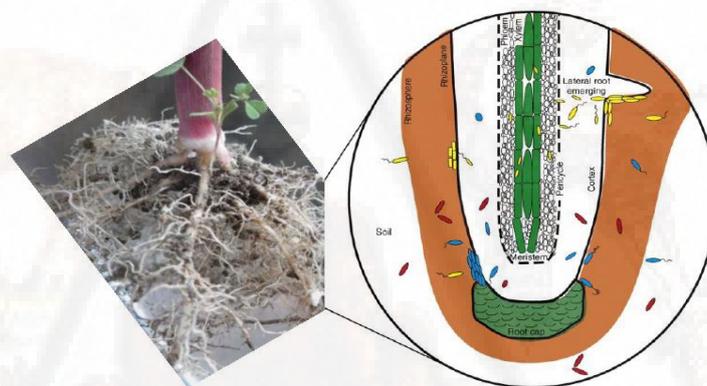


Ilustración 2. Tipos de endófitos. Color rojo: Endófitos casuales, los colonizan en las heridas producidas naturalmente. El Color azul: Endófitos oportunistas, que colonizan la rizoplasma. Color amarillo: Endófitos competentes, los cuales invaden al tejido vegetal (Hardoim *et al.*, 2008).

En la consistencia de las poblaciones de bacterias endófitas son variable el cual depende de especies bacterianas, las planta hospederas en su estado de desarrollo y de sus condiciones medioambientales (Ladygina y Hedlund 2010, Hallmann *et al.*, 1997). Por lo habitual, poblaciones bacterias son las más cuantiosos no en los tallos y hojas como en las raíces (Hallmann y Berg, 2006). Las poblaciones de endófitos que están en el mismo tejido se

modifican con el tipo planta. (Kobayashi y Palumbo, 2000) hallaron diferenciaciones entre 10^2 y 10^6 unidades formadoras de colonia por gramos de raíz en la alfalfa, remolacha, maíz dulce, algodón, papa y calabaza.

2.2.7. Diversidad bacteriana del suelo y sistemas de estudios

En cuanto a la diversidad en poblaciones de bacterias edáficas son enorme, que en un gramo de suelo se puede encontrar entre 1×10^3 y 1×10^6 únicas especies bacterianas (Gans *et al.*, 2005, Torsvik *et al.*, 2002, Fierer *et al.* 2007, Tringe *et al.* 2005).

Disertación de diversidades bacterianas fundamentada en el método dependientes de cultivo

constituye de diversos medios de cultivo de laboratorios para cultivar y aislar bacterias (van Elsas *et al.* 1998). Se han prescrito una amplia diversidad de medios de cultivo de tal forma que se puedan conseguir el mayor número de diferentes unidades formadoras de colonias. Para un ambiente determinado, pero, se ha apreciado en números bacterianos que se pueden aislarse de muestras ambientales no ha superado el 10% de los que, en la realidad, conseguirse en ese entorno (Singh *et al.* 2008, Torsvik y Ovreas 2002, Peix *et al.*, 2011). En estas condiciones se han asociado a la necesidad de reproducir, en el laboratorio, con las exigencias nutricionales y condiciones físico y químicas que suceden en condiciones naturales. Las permisibles toxicidades del medio, como la auxotrofia producida por la pérdida de los nutrientes, el bajo crecimiento de las bacterias y lento por las que crecen más rápido, es un problema al reproducirlas en condiciones del laboratorio por la ausencia de sus ambientes habituales que se encuentran en la naturaleza también se han apreciado como factores que delimitan el cultivo bacteriano en condiciones de laboratorio (Stams *et al.*, 2006, Schink, 2002, Water y Bassler, 2005). Las condiciones naturales, de comunidades bacterianas evolucionaron en millones de años de la selección natural y se han determinado, de las múltiples interacciones, numerosos consorcios microbianos dificultosos de representar en manera artificial (Giovannoni *et*

al., 2007, Keller y Zengler, 2004). Ya aisladas las bacterias en las condiciones de laboratorio, su caracterización y su clasificación taxonómica se realizan con diversas técnicas, como son fenotípicas y genotípicas, posteriormente, se procede a su conservación y almacenamiento (Winters y Winn 2010, Morales-García *et al.*, 2010).

Aun habiendo limitaciones, la utilización en medios de cultivo para el aislamiento bacteriano es un instrumento útil e incrementada los métodos independientes de cultivo para estudiar la fisiología, genética microbiana y bioquímica (Ben-Dov *et al.*, 2009). Este método también sirve para ratificar los datos procedentes de la observación de técnicas ecológicas y para justipreciar hipótesis originadas de estudios genómicos y también metagenómica (Giovannoni *et al.*, 2007).

Métodos independientes de cultivo para el estudio de la diversidad bacteriana

La severa resistencia de la cadena de polimerasa, (PCR), es un método de Biología Molecular descrito por K. B. Mullis en los 1983 y 1986 siendo su objetivo la obtención de grandes números de copias de determinado fragmento de ADN dividiendo, única la copia de ese ADN (Mullis, 1990). Ya que le interesaba la Ciencias Forenses, Medicina, Biotecnología, Biología, entre otros K. B. Mullis ganó el premio Nóbel en Química el 1993. En sus variados estudios acentúan la clonación de ADN para su secuenciación, el estudio funcional de genes, la filogenia de ADN, el análisis de los trastornos hereditarios, la identidad de huellas genéticas utilizados en las técnicas forenses y la prueba de paternidad, el descubrimiento y determinación de enfermedades infecciosas. Usando el termociclador, imprescindible para transportar a la PCR. La secuenciación de ADN, la función de polimerasas resistentes a altas temperaturas, también los programas informáticos que aprueban las lecturas y manejos de datos que suministra la secuenciación, es fundamental para el empleo que se realiza actualmente con la PCR. Es importancia para la realización de esta práctica el uso de cebadores (primers), oligonucleótidos sintetizados que

hibridan en regiones incrementada al ADN modelo que desea amplificar e inician en la reacción de la extensión del ADN reemplazando ADN polimerasa.

2.2.8. El Gen 16S rRNA

El ARN ribosomal 16S (o 16S rRNA) es el componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes que se une a la secuencia de Shine-Dalgarno. Los genes que lo codifican son conocidos como genes del 16SrRNA, y se utilizan para la reconstrucción de filogenias debido a sus bajas tasas de evolución (Woese, 1987).

Pequeña subunidad que compone los ribosomas, está codifica al gen 16S rRNA (*rrn16S*), polirribonucleótido con aproximadamente 1500 pares de bases (Woese y Fox, 1977; Woese, 1987; Amaral-Zettlera *et al.*, 2008). El gen conserva una serie de las características que lo hace excelente para emplearlo en identificación bacteriana, como son:

- 1) La mantienen todas las bacterias, lo cual tiene una ocupación común en todas ellas.
- 2) En su secuencia presentan distinto grado de versatilidad en diferentes regiones de moléculas de ADN, lo cual permite asimilaciones con desemejantes niveles de la resolución.
- 3) Se Traslada de forma vertical.
- 4) Y su longitud de secuencia permite su fácil manipulación “in silico”

Millones de secuencias de ADN se depósitosan de los genes 16S rRNA que permite el análisis comparativo en la Bases de Datos de este tipo de secuencias. (Weisburg *et al.*, 1991) son los primeros en diseñar el par de cebadores con capacidad de amplificar en la secuencia completada del gen 16S rRNA en un extenso número de las bacterias filogenéticamente apartadas.

Hoy por hoy, se hallan una amplia colección de cebadores que permiten la amplificación de distintos fragmentos del ADN del gen 16S rADN (; Kumar *et al.*, 2011, Guo y Milewicz 2003, Nossa *et al.*, 2010).

Asimismo, el gen *rrn16S*, el operón *rrn* está formado por los otros dos genes, *rrn23S* y *rrn5S* que recopilan las subunidades 23S y 5S de los ribosomas, individualmente. En forma equivalente al gen *rrn16S*, el *rrn23S* tiene regiones almacenadas que se pueden utilizarse para la identificación de procariotas (Hunt et al. 2006). En los estudios del ADN intergénico entre ellos los genes *rrn16S* y *rrn23S* (ITS) empleados ampliamente en la taxonomía y filogenia molecular íntegro a su elevado grado de diferencias incluso en especies coherentes, posiblemente debido a la escasa evolución que se ejercen sobre sus secuencias no utilizables.

Los ITS muestran una dominante heterogeneidad en tamaño y en sucesión de su análisis compone una técnica es con alta resolución que permite determinar filogenéticamente a los segmentos de la comunidad o en una población bacteriana a las subespecies (Peix *et al.*, 2011)

El ADN aislado de las muestras ambientales se han perfeccionado una serie de técnicas moleculares para poder identificar los microorganismos y sus estudios de biodiversidad. La electroforesis y los geles desnaturalizantes (Muyzer *et al.*, 1993) o pendiente temperatura (Muyzer y Smalla, 1998), observaciones del polimorfismo de longitud de fragmentos de limitación (RFLP), lo mismo en el polimorfismo del fragmento terminal (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997) fueron utilizados en cuantiosos estudios de biodiversidad. Demás otra metodología, de análisis del polimorfismo de la clasificación de las cadenas sencillas de ADN (Schwieger y Tebbe, 1998) genes determinados amplificado mediante la PCR proporcionan excelentes consecuencias en los ADN analizados de los aislado a partir de muestras ambientales (Smalla *et al.*, 2007).

2.2.9. La Metagenómica

Ha cambiado radicalmente nuestro conocimiento la PCR, del mundo microbiano por lo que ha reconocido el estudio de poblaciones bacterianas gracias la obtención del ADN de las muestras ambientales, fuera de la necesidad de aislarlas y cultivarlas. La metagenómica se utiliza por primera

vez en una investigación que publicó Handlesman et al. (1998), para relatar un método que trataba de analizar una recopilación de genes secuenciados de un ambiente muestreado como si se fuera de un solo genoma. Consecutivamente, Handlesman (2004) con Riesenfeld *et al.* (2004) concretaron que la metagenoma como todo ADN que se pudiera hallar en ambientes muestreados cualquiera que el ecosistema del que se trate. Posteriormente, Chen con Pachter (2005) definen que la metagenómica como el empleo de metodologías genómicas modernas para su estudio espontáneo de las asociaciones de microorganismos en el entorno natural donde se encuentren, impidiendo así la necesidad de aislar y cultivarlas una por una de las variedades de especies que forman la comunidad.

16S rRNA es el gen marcador molecular utilizado más en los estudios de la metagenómica para la identificación de microorganismos. Llegan a ocupar un ambiente definitivo. El problema que muestra el estudio de la metagenoma es el aislamiento del ADN de muestras medioambientales. Esto se debe a la presencia de compuestos que inhiben la combinación de los cebadores con el ADN modelo, el dinamismo de la polimerasa, entre otros. Entre los cuales los ácidos húmicos, nucleasas y metales pesados, conviene eliminarlos durante este proceso de aislamiento y la purificación. Por ello, desarrollaron muchos protocolos que han permitido la obtención del ADN utilizando, en la mayoría de casos, los kits comerciales. De tal forma, la metagenómica permitió conocer al metagenoma de las muestras ambientales como numerosos el de los ambientes marinos (Jensen y Lauro, 2008, Sogin *et al.*, 2006), superficies mineras (Edwards *et al.*, 2006), endofitos de la papa (Manter *et al.*, 2010), los suelos de forestación (Uroz *et al.*, 2010) y también la rizosfera del maíz (Pereira *et al.*, 2011). Asimismo, es posible saber el metagenoma de la Buchnera, que es un endosimbionte de los áfidos (Pérez-Brocá *et al.*, 2006) y así como también bacterias intestinales (Gill *et al.*, 2006) también en la dentadura humana (Rudney *et al.*, 2010).

Con relación al sector agrícola, la metagenómica permite explicar cómo, a un con la presencia de patógenos en el suelo, no desarrollan enfermedades. También se contrasta en conceptos de suelos supresores, el cual se concreta

como si el que no permite el progreso de las enfermedades por su presencia de los microorganismos favorables que anulan la emanación del patógeno (Van Elsas *et al.*, 2008). El resultado puede variar de acuerdo a compuestos inhibitorios implicados en el crecimiento, antibióticos, y otros. El cual sintetizan los microorganismos en el suelo (Van Elsas *et al.*, 2008).

2.3. Bases conceptuales

2.3.1. Nódulos de *Lupinus alopecuroides*.

Los nódulos de *Lupinus alopecuroides* son un desarrollo indeterminado, y el por lo cual mantienen uno de los meristemos activos. Pero, sin embargo, no exponen las características propias de nódulos indeterminados son de: carácter cilíndrico, de un meristemo apical, y en el lugar de infección, muestra un gradiente con dirección desde el inicio del meristemo hasta el pie del nódulo. Por este conocimiento, clasifican como un subtipo específico y único designado nódulo lupinoide (González-Sama, *et. al.*, 2006).

En los nódulos jóvenes los meristemos, compuesto por células enquistadas y no enquistadas, se localiza envolviendo a la zona enquistada. Conforme los nódulos maduran el lugar meristemático queda reducida a la región basal-lateral, y el nódulo sigue con su creciendo, rodeando totalmente a la raíz, tiempo en que decae su desarrollo. El nódulo maduro del lupino está formado por zonas infectadas. la corteza presenta características estructurales únicas. La zona central nodular corresponde a la región infectada y, a discrepancia de mayoría de nódulos de leguminosas, constituyen únicamente por células infectadas (González-Sama, *et. al.*, 2006).

2.3.2. *Lupinus alopecuroides* crecidas en zonas alto andinas

Es una planta propia de tierra fría y subpáramo. En Castrovirreyna lo encontramos superior a los 3950 m sobre el nivel del mar, Se dice que es la reina de los "*Lupinus*" en la alta montaña. En las zonas alto andinas en

las regiones jalca y puna crece el *Lupinus alopecuroides*, siempre lo pude ver desde mi infancia has hasta ahora; crecer, echar flores, formar frutos y hasta recoger como combustible cuando se seca. Al respecto, Hurtado (2012), sugiere que son dos géneros los "*verjonensis*" y los "*alopecuroides*" porque son tan distintos en las hojas y sobre todo en la inflorescencia. La flor del "*alopecuroides*" es una mazorca alargada y puede alcanzar medio metro. De la mazorca brotan unas florecitas azules que se convierten en una especie de algodón blanco que cubre todo el cuerpo de la flor; de esta manera la mazorca queda convertida en un copo blanquísimo. Y si este "*Lupinus*" crece en medio de las formaciones redondas y duras que son los cojines, el espectáculo vegetal puede ser, lo aseguro, el más bello del mundo (Hurtado, 2012).

2.3.3. Rizobios en los nódulos de *Lupinus alopecuroides*

El género de las leguminosas como el del *Lupinus* forman simbiosis con bacterias con los del género *Bradyrhizobium* en los nódulos indeterminados de forma lupinoide. La infección tiene lugar vía intercelular (González-Sama *et al.*, 2006). Las raíces de la planta se comunican intrincadamente con las bacterias en su estadio de vida libre, produciéndose la nodulación de las raíces, en las cuales la bacteria se multiplica. En los nódulos de las raíces de leguminosas la bacteria inicia la conversión biológica del nitrógeno inerte del aire (N₂) a amoniaco y aminoácidos dentro de los nódulos. Este proceso requiere de energía que obtiene de la planta (Pommeresche & Hansen, 2017). Invaden la célula subepidérmica despreciable del pelo radical las bacterias, y mediante sucesivas segmentaciones de células infectadas y no infectadas que las rodean se forman los primordio nodulares. La repartición de las células enquistadas son peculiaridad de estos nódulos. MAP-quinasas, Glicoproteínas, citoesqueleto y aldehído oxidasas, genes inhibidores mitótico *ccs52A* están comprometidos a etapas iniciales de la nodulación y en el proceso de los nódulos (González-Sama *et al.*, 2006).

2.3.4. Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el *Lupinus alopecuroides*

La FBN representa un ahorro importante de nitrógeno del suelo (Cicore *et al.*, 2005). Esta característica es muy ventajosa ya que con pequeñas cantidades de fertilizantes nitrogenados es posible obtener altos rendimientos, con el derivado impacto económico y ecológico (García *et al.*, 1996). Sin embargo, para que ocurra una eficiente fijación, las raíces deben interactuar en el suelo con cepas compatibles de *Rizobios*, por lo que los factores que afecten el crecimiento de las raíces o la actividad de la planta hospedera, como las condiciones del suelo y factores ambientales, afectan la formación de nódulos y, por tanto, limitan la simbiosis y la FBN (Alexander, 1980; Hungria & Neves, 1987; Graham, 1990; García *et al.*, 2003).

Las altas temperaturas inhiben la FBN y la nodulación puede fallar si las temperaturas del suelo alcanzan 40 °C o más en los primeros cinco cm de profundidad, temperatura que mata a muchas bacterias reduciendo su población en el suelo. Las altas temperaturas también inhiben la formación de pelos radicales (Hungria y Vargas, 2000). En otra parte, se reporta la disminución en la FBN cuando la concentración de humedad en el suelo es de bajo al 50% de agua útil (Serraj *et al.*, 1995), debido a que la tolerancia a la sequía es influenciada por la capacidad de las plantas para captar el agua del suelo, las leguminosas de raíces profundas lo extraen de mayores profundidades para mantener su potencial hídrico y evitar una reducción en el índice de FBN (Valles *et al.*, 2003). Desde el punto fisiológico, diversos estudios consideran que una de las principales limitantes del proceso de FBN es la disponibilidad de fotosintatos hacia los nódulos (Mahon, 1977; Hungria y Franco, 1988), por lo que consume de tres a cuatro veces más energía metabólica que la absorción y asimilación de nitrógeno mineral. Durante algunos períodos de crecimiento activo de la planta, del 30 al 50% de los carbohidratos producidos en la fotosíntesis neta diaria son consumidos por las raíces noduladas. Con respecto al suelo las limitaciones

por acidez son importantes, la supervivencia en un medio de pH bajo y cambios químicos en el suelo causados por acidez alta, como una alta proporción de aluminio y hierro-manganeso. En suelos ácidos disminuye la disponibilidad de fósforo, Molibdeno y hay deficiencia de Calcio, esto conlleva a que la acidez afecta las primeras etapas del proceso de infección para la nodulación (Giller y Wilson, 1991). Por otro lado, la magnitud de dicho transcurso se reduce cuando el cultivo se expone en ambientes con superior disponibilidad de los nitratos (NO_3^-) (Imsande, 1989), existiendo un efecto inhibitorio del nitrato sobre la FBN, ya que la FBN resulta más costosa en términos energéticos, por lo que la planta utiliza preferentemente el nitrógeno inorgánico del suelo, (Becana y Bedmar, 1991).

2.4. Definición de términos

Comunidad microbiana. - Suma de todos los microorganismos y los factores abióticos de un ambiente particular. Poblaciones de microorganismos: por crecimiento celular (Torsvik *et al.*, 2002).

Diazótrofos: son bacterias con la capacidad de fijar dinitrógeno (N_2) atmosférico como el amonio (Postgate, 1998).

Endófito. - Son microorganismos unicelulares que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas. Bacterias endófitas (Arnold, 2005).

Endosimbiosis. – Es la asociación del organismo que reside en el interior de otro. El término etimológicamente podría usarse para designar a cualquier simbiote que habitara en el interior del organismo de otro ser vivo, si bien también pueda utilizarse el vocablo endosomático (simbiote endosomático). En caso, por ejemplo, en muchas de las bacterias que constituyen la microbiota intestinal (Starr, 1975).

Exudado radicular: Son los compuestos orgánicos redimidos al exterior por las raíces de plantas sanas e intactas. Las causas que pueden conmovier en la edad de la planta, son: la temperatura, nutrición, luz, enfermedades radiculares y medio de cultivo (Arone, 2012).

Nódulos radicales. – Se trata asociaciones simbióticas de bacterias y las plantas superiores. Las más distinguidas son los del *Rhizobium* con especies de las leguminosas. El cual las plantas suministran a la bacteria los compuestos carbonados como su fuente de energía y un ambiente protector, que recibe nitrógeno en una forma aprovechable para la formación de proteínas. Simbiosis en las especies de leguminosa y de *Rhizobium* es definida. Como ejemplo del, *Glycinemax*, la soja, se relaciona con bacterias de *Bradyrhizobium japonicum* (Ellmore, 1981).

Los orgánulos de origen endosimbiótico aparecen muy transformados, pero conservan un genoma propio y se multiplican autónomamente, revelando su origen como organismos distintos (Burr . y Barthlott, 1991).

Primordio nodular. - es un nódulo en proceso de formación. Normalmente la bacteria debería de estar distribuida en toda la parte obscura del órgano, sin embargo, debido a la ausencia de PI3P, se detiene el proceso de infección durante la formación del hilo de infección (Schultze y Kondorosi, 1998).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): Son aquellas bacterias beneficiosas que encontramos en suelos (rizosférico y no rizosférico) como también los endofitos en las raíces de las plantas. Capaces de incitar el crecimiento y desarrollo e las plantas de modo directa e indirecta (Arone, 2012).

Rizobios. - son bacterias que se hallan en el perfil de suelo que fijan nitrógeno diazotrófico después de haberse instaurado endosimbióticamente dentro de nódulos radiculares en las leguminosas. Los cuales no pueden independientemente fijar nitrógeno atmosférico: requieren necesariamente una

planta hospedante. Morfológicamente son, con frecuencia son, gram - negativas, móviles y no esporulan (Sawada et al., 2003).

Rizosfera. - Es la parte del suelo inmediata a las raíces vivas y que está bajo la directa influencia de estas. En donde las raíces tienen lugar dominante de interacción dinámica con microorganismos (April et al., 2014).

Simbionte. - Es un organismo que tiene una relación de ayuda con otro organismo. Especie animal o vegetal que vive en simbiosis con otra especie diferente. Organismo que vive habitualmente en el espacio corporal de otro, pero sin perjudicarlo (<https://www.ecured.cu/Simbionte>).

2.5. Hipótesis

Los rizobios endosimbiontes aislados de nódulos de *Lupinus alopecuroides*, crecidas en zonas las alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica y evaluadas mediante el gen 16S rRNA, corresponden al género *Bradyrhizobium*.

2.6. Variables

2.6.1. Variable N° 1

Nódulos de *Lupinus alopecuroides* crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica.

2.6.2. Variable N° 2

Rizobios localizadas en los nódulos de *Lupinus alopecuroides*.

2.6.3. Variable intervinientes

- Clima
- Propiedades del suelo
- Sanidad de las plantas de *Lupinus alopecuroides*
- Medio de cultivo

2.6.4. Variables evaluadas

- Rizobios de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides*.
- Bacterias endosimbióticas de nódulos radicales de *Lupinus alopecuroides* mediante el gen 16S rRNA.

2.7. Operacionalización de variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Escala
Variable N° 1: Nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i> .	Nódulos de <i>Lupinus</i> tienen crecimiento indeterminado, por lo cual mantiene un meristemo activo. Por ello, no muestran las peculiaridades típicas de nódulos indeterminados: son cilíndricas, el meristemo apical, y en la franja infectada, un gradiente diferente desde los meristemos hasta el pie del nódulo. El cual catalogan como un subtipo especial y único nombrado nódulo lupinoide.	Los nódulos se obtuvieron de las raíces de las plantas de <i>Lupinus alopecuroides</i> , en la etapa de floración.	Presencia de nódulos Numero de nódulos efectivos e infectivos.	Tamaño y sanidad de nódulos. Contados.
Variable N° 2: Rizobios localizadas en los nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i> .	Son bacterias que fijan el nitrógeno diazotrófico a continuación de tener establecido el endosimbíoticamente adentro de los nódulos radicales de las legumbres (<i>Lupinus</i>). independientemente los rizobios no pueden fijar nitrógeno de la atmosférico, lo requieren plantas hospedantes y morfológicamente son, en frecuente, gram negativas, no esporulan y son móviles.	Los endosimbionte, aislados de nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i> ,	Concentración de bacterias Aislados.	En una escala de 10^5 a 10^{10} número de bacterias por ml.

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Ámbito temporal y espacial

3.1.1. Ubicación política

Departamento : Huancavelica
Provincia : Castrovirreyna
Distrito : Castrovirreyna
Lugar : Castrovirreyna.

3.1.2. Ubicación geográfica

Latitud sur : $13^{\circ}17'11.00''$
Longitud Oeste : $75^{\circ}18'56.79''$
Altitud : 3956 msnm



Ilustración 3. Localización del distrito y provincia de Castrovirreyna-Huancavelica.

3.1.3. Factores climáticos

Temperatura promedio	:	6.3 °C.
Humedad relativa	:	57% hasta 73%
Precipitación promedio anual	:	766 mm al año.

3.1.4. Localización geográfica

Nuestro país está conformado por 24 departamentos y entre ellos está el departamento de Huancavelica, donde se halla la provincia y distrito de Castrovirreyna, localizada a una altitud media de 3956 m. s. n. m. Su clima es seco, con una temperatura que presenta fuertes variaciones entre el día y la noche. Se conoce por ser una provincia destacadamente en la agropecuaria. Sus cultivos agrícolas son la papa, cebada, mashua, haba, maiz y oca (Municipalidad provincial de Castrovirreyna, 2004).

En la provincia de Castrovirreyna se encuentra la comunidad campesina de Castrovirreyna, ubicada a 3956 m.s.n.m.

(<http://www.castrovirreyna.hca.mp.gob.pe/indextur.html>).

3.2. Tipo de investigación

Este trabajo de investigación es aplicada ya que el propósito fundamental es dar soluciones a problemas prácticos la fertilidad natural de las chacras en la región, por tanto, contribuirá en el ahorro de energía fósil (petróleo), así como también en la reducción de la contaminación del medio ambiente.

3.3. Nivel de investigación

El actual trabajo de investigación corresponde a un nivel de investigación descriptiva, orientada a la caracterización de los rizobios endosimbiontes en nódulos de *Lupinus alopecuroides*. crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica.

3.4. Población, muestra y muestreo

3.4.1. Población:

La población estuvo conformada por 240 nódulos procedentes de 30 plantas de *Lupinus alopecuroides* crecidas en el sector de Chocra Pucro, Castrovirreyna, Huancavelica.

3.4.2. Muestra:

Se tomaron 5 nódulos por cada planta

3.4.3. Muestreo:

El tipo de muestreo utilizado fue el simple – aleatorio

3.5. Método de investigación

Se fundamentó en el Método Científico y utilizo como procesos lógicos la inducción y la deducción.

a) Toma de muestras de suelo para análisis de sus propiedades físico-químicas

Se han utilizado el suelo donde crecen *Lupinus alopecuroides*, cuyas georreferencias de altitud, latitud y longitud de Chocra Pucro (Lugar donde crecen plantas de chocra, llamado así por los habitantes de zona), se indican en la tabla 1. Se tomaron al azar las muestras, de 0 a 20 cm de calado, en 3 zonas diferentes del lugar, persiguiendo la metodología que propuso USDA (2009) y Guerrero (1998). Para su análisis se enviaron a la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM-Lima), al laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes, el cual emplea la sistemática definida por Chapman y Pratt (1973).

Tabla 1. Localización de Chocra Pucro lugar donde crece la Ccra.

Georeferencia	Suelo de <i>Lupinus alopecuroides</i>
Altitud (m.s.n.m.)	3996 m.s.n.m.
Latitud Sur	13°17'11.00''
Longitud Oeste	75°18'56.79''

b) Toma de muestras de *Lupinus alopecuroides* para el análisis foliar

En cuanto la toma de muestras se empleó el método de Barbazan (1998) y Piaggese (2004) que se utilizan los tallos y hojas del tercio medio de las plantas en una fase fenológica de floración. Los análisis se ejecutaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM-Lima), que utiliza las técnicas descritas por Chapman y Pratt (1973).

c) Aislamiento de endosimbionte utilizando el método dependiente de cultivo celular.

- Recolección de plantas

Se recolectaron 30 plantas de *Lupinus alopecuroides* crecidas en el sector de Chocra Pucro, Castrovirreyna, Huancavelica.

- Recolección de nódulos

Para la recolección de nódulos, se seleccionaron 15 plantas vigorosas de las 30 recolectadas con hojas verdes y sanas, los cuales se muestrearon alrededor de 35 nódulos vivos e inmunes, que preservaron en frascos de vidrio con material desecante (en gel sílica) hasta la siembra correspondiente, aislamiento e identificación en el Laboratorio (Talbi, 2011).

- Esterilización de nódulos

Los nódulos de cada planta se combinaron y 12 de ellos se esterilizaron en HgCl₂ al 0.25% por 5 minutos. Consecutivamente, se lavaron abundante agua destilada estéril. Cada uno de los nódulos se colocaron en una placa Petri, el cual se le adicionó 2 gotas de agua estéril y se trituró con una varilla de vidrio también estéril. El extracto resultante se utilizó para inocular placas Petri con medio YEM (Vincent, 1970). Para demostrar la eficacia de la esterilización, 3 nódulos sin triturar, se rodaron sobre placas rellenas de medio YEM. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante 8 d. Las unidades formadoras de colonias

(UFCs) con diferente morfología que surgieron en las placas se seleccionaron mediante reconocimiento con una lupa de aumento 10X y cada una de ellas se volvieron a sembrar en placas Petri con medio YEM hasta obtener colonias morfológicamente uniformes.

- **Medio de cultivo bacteriano**

Medio YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970)

Se empleó como medio de práctica para el cultivo de las bacterias manejadas en este estudio. El cual está compuesta de la siguiente manera:

- Manitol 10 g
- K_2HPO_4 0,5 g
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,2 g
- NaCl 0,1 g
- Extracto de levadura 0,5 g
- Agua destilada 1 l
- pH 7.0

Para disponer con medios sólidos, se añadió agar bacteriológico (15 g/l). seguramente el medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

- **Conservación de cepas bacterianas**

Para la preservación amplia de las distintas cepas se emplearon criotubos que aguantaban glicerol estéril (concentración final 20%) al que se adiciona alícuotas de los diferentes cultivos bacterianos en fase logarítmica de incremento (aprox. 10^8 células/ml). Consecuentemente se almacenaron en criotubos a -80 °C.

- **Cultivo bacteriano**

Las cepas derivadas, se sembró en tubos de vidrio con 3 ml de medio líquido YEM y se incubó a 30 °C, en agitación a 120 r.p.m. durante 48 a 72 horas, tiempo preciso para que la consistencia celular de las diferentes cepas bacterianas, determinada espectrofotométricamente a 600 nm de longitud de onda, fuera ~ 0.6. Posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación de los cultivos en una microfuga a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos, a temperatura ambiente. Cuando una de las cepas

producía abundante polisacárido, las células se lavaron con sarkosil al 0,1% en solución tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

- **Obtención de ADN genómico**

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el producto comercial Real Pure Genomic ADN Extraction, de Durviz, siguiendo las instrucciones del fabricante. En esencia:

- Sedimentar las células (3 ml de cultivo) por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos en microtubos.
- Eliminar el sobrenadante y pesar el sedimento (20-40 mg).
- Resuspender el sedimento en 500 μ l de tampón de extracción[®]. Adicionar 100 μ l de solución de PVP[®] y agitar en vortex durante 20 segundos.
- Adicionar 60 μ l de solución de lisis y 3 μ l de ARNasa. Agitar la mezcla vigorosamente mediante vortex e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- Enfriar las muestras a temperatura ambiente y adicionar 250 μ l de tampón de precipitación de proteínas[®]. Agitar vigorosamente mediante vortex durante 20-30 segundos, e incubar a -20 °C durante 10 minutos.
- Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. Comprobar la aparición de precipitado proteico.
- Recoger el sobrenadante, que contiene el ADN, en un microtubo con 600 μ l de isopropanol conservado a -20 °C. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar de nuevo a 14.000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 600 μ l de etanol al 70%. Mezclar de nuevo por inversión. Centrifugar de nuevo a 14.000 r.p.m. durante 2 minutos.
- Eliminar el etanol y secar al aire mediante inversión del tubo sobre papel absorbente.
- Resuspender el precipitado en 50 μ l de agua destilada estéril o tampón de hidratación[®]. Favorecer la resuspensión del ADN

mediante inmersión del tubo en agua durante 30 minutos a 65 °C. Agitar manualmente de vez en cuando para asegurar la total resuspensión.

- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

- **Cuantificación del ADN**

Con la ayuda del espectrofotómetro NanoDrop, modelo ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA), el cual se empleó para estimar la calidad y cantidad del ADN.

- **Envío de muestras al exterior para su amplificación y secuenciación**

- **Preparación de los inóculos**

Se obtuvieron a partir de cultivos frescos en medio sólido YEM los inóculos bacterianos que se pudo recoger con 5-10 ml del mismo medio líquido utilizando una espátula de Drigalsky hasta obtener una suspensión bacteriana de, aproximadamente, 10^8 células viables por ml. El conjunto de células viables se estimó deduciendo el número de UFCs. Cada semilla se inoculó con 7 ml de la correspondiente suspensión bacteriana

d) Esterilización de semillas, germinación e inoculación de plantas

- **Esterilización de semillas y germinación**

Las semillas de Ccera (*Lupinus alopecuroides*) se esterilizaron de la siguiente manera:

- 1) Las semillas se sumergieron en una solución de $HgCl_2$ al 2,5% durante 10 minutos en agitación.
- 2) Se lavó con abundante agua destilada estéril.
- 3) Se embebió en agua destilada estéril durante 1-2 horas a temperatura ambiente, en agitación.
- 4) Se lavó abundantemente con agua estéril y se colocó sobre placas Petri con agar al 1%.
- 5) Se germinó en oscuridad a 30 ° C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud.

- **Cultivo de plantas en jarra Leonard**

En cuando la jarra Leonard (Leonard, 1943) consiste en un sistema de dos recipientes independientes, lo cual el superior se satura con vermiculita y el inferior se llena con solución nutritiva mineral. Entrambas partes están acopladas por un pabulo hecho con papel de filtro. En conjunto se llevaron a esterilizar en la autoclave a 120 °C hasta los 20 minutos. En la superficie de la vermiculita se realizan unas aberturas con la varilla estéril de vidrio donde se colocan las plantas ya geminadas. Cada planta se inocula con 10 ml de la suspensión bacteriana. La capa de la superficie de la vermiculita se resguarda con perlita estéril, el cual evita en posible la contaminación ambiental y el reflejo de la luz, por lo que previene el calentamiento excesivo de las raíces de las plantas. Cada jarra se envolvió con papel aluminio para evitar que la luz alcance las raíces.

- **Solución nutritiva para el cultivo de plantas**

Se empleó la solución mineral (Rigaud y Puppo, 1975), cuya constitución se narra a continuación:

Macroelementos (para un litro de agua)

• KH_2PO_4	68 mg
• K_2HPO_4	44 mg
• $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$	123 mg
• K_2SO_4	174 mg
• SO_4Ca	173 mg
• EDTA férrico (forma comercial Secuestrene)	25 mg

Microelementos (para un litro de agua):

• $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,11 mg
• BO_3H_3	2,85 mg
• $\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$	3,07 mg
• $\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 mg
• $\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 mg

La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

e) Obtención de ADN metagenómico de nódulos de *Lupinus alopecuroides*.

Para la obtención del ADN metagenómico procedente de los nódulos de *L. alopecuroides*, una vez esterilizado el nódulo, este se cortó por el medio con la ayuda de un scalpel estéril y se extrajo con una pinza estéril la masa de los bacteroides de la zona media del nódulo que es de color rosa oscuro. Una vez puesto esta masa el microtubo del kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit Mo Bio, se continuó con la extracción del ADN metagenómico siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, que a continuación se detalla:

- Pesar 0.25 g de muestra aprox. y adicionar al microtubo de 2 ml.
- Mezclar la muestra con ligero vortex y adicionar la solución C1, 60 μ l (si este precipitado es de color blanco lechoso, calentar a 60 °C hasta disolver).
- Invertir manualmente varias veces los microtubos para mezclar.
- Utilizar el homogenizador por 90 segundos a 1600 rpm.
- Centrifugar en una microfuga a 12200 rpm por 30 segundos (no exceder los 10000xg los tubos se pueden romper).
- Retirar el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml aproxim. de 400 a 500 μ l.
- Adicionar la solución C2, 250 μ l y dar vortex por 5 segundos.
- Incubar a 4 °C por 5 minutos.
- Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- Retirar el sobrenadante, aproxm. 600 μ l a un nuevo tubo de 2 ml.
- Adicionar la solución C3, de 200 μ l y dar vortex ligero.
- Incubar a 4 °C por 5 minutos.
- Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- Retirar el sobrenadante hasta 750 μ l a un nuevo microtubo de 2 ml.
- Adicionar solución C4 (mezclar bien antes de utilizar), 1200 μ l y dar vortex por 5 segundos.
- Cargar dentro del SPIN FILTER aproximadamente 650 μ l.

- Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto, volver a cargar 650 μ l, centrifugar y cargar otra vez; realizar solo 3 cargadas y desechar el eluido.
- Lavar con la solución C5, adicionar 500 μ l, al SPIN FILTER.
- Centrifugar a 12200 rpm por 30 segundos. Desechar el eluido.
- Volver a centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- Retirar el filtro y colocar en un nuevo tubo eppendorf.
- Adicionar 50 μ l de agua MLQ estéril a la membrana.
- La membrana se debe rehidratar por más de un minuto.
- Centrifugar a 12200 rpm por 30 segundos.
- El ADN está listo en el eluido.
- Almacenar el ADN a -20 °C hasta usarse.

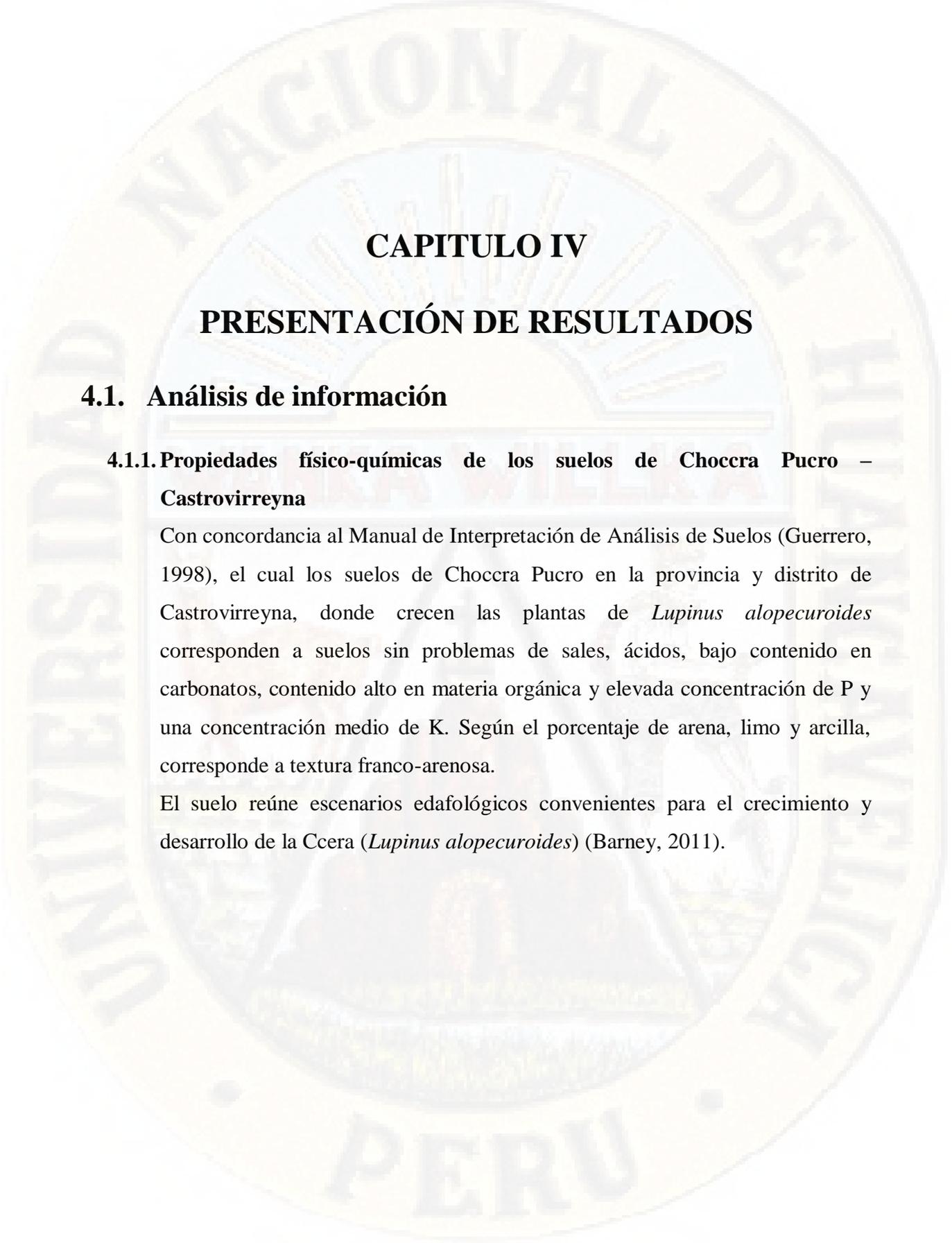
Una vez cuantificado la calidad y cantidad del ADN se envió a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), Valencia, España, para su amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en la plataforma de Illumina-Miseq.

3.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

- **Técnicas de recolección de datos.** - Para la recolección de datos se empleó el método dependiente e independiente de cultivo celular, según la metodología descrita por Talbi (2011) y Arone (2012).
- **Instrumentos de recolección de datos.** - Los instrumentos utilizados en la recolección de datos, fueron entre otros el empleo de cabina de flujo laminar, termociclador, cubetas de electroforesis, fotodocumentador, secuenciador, software de bioinformática, etc.

3.7. Técnicas y procedimiento de análisis de datos

Para el análisis de la diversidad bacteriana se utilizó el gen 16S rRNA. Para el procesamiento de secuencias se empleó programas bioinformáticos como el Chromas 2.6.6 y MEGA X 10.0.5. Las secuencias limpias se contrastaron con las almacenadas en GenBank mediante el programa BLASTn disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/)



CAPITULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de información

4.1.1. Propiedades físico-químicas de los suelos de Chocra Pucro – Castrovirreyna

Con concordancia al Manual de Interpretación de Análisis de Suelos (Guerrero, 1998), el cual los suelos de Chocra Pucro en la provincia y distrito de Castrovirreyna, donde crecen las plantas de *Lupinus alopecuroides* corresponden a suelos sin problemas de sales, ácidos, bajo contenido en carbonatos, contenido alto en materia orgánica y elevada concentración de P y una concentración medio de K. Según el porcentaje de arena, limo y arcilla, corresponde a textura franco-arenosa.

El suelo reúne escenarios edafológicos convenientes para el crecimiento y desarrollo de la Ccera (*Lupinus alopecuroides*) (Barney, 2011).

Tabla 2. Análisis físico-químico del suelo de Choccara Pucro, Castrovirreyna.

Parámetros		Ccera (<i>L. alopecuroides</i>)	
Análisis Mecánico	Arena	%	60
	Limo		30
	Arcilla		10
Clase Textural		Fr.A.	
pH (1:1)		5,96	
C.E. (1:1 dS/m)		0,10	
CaCO ₃ %		0,00	
M.O. %		8,53	
P ppm		18,3	
K ppm		368	
CIC		29,12	
Cationes Cambiables	Ca ⁺²	meq/100g	13,60
	Mg ⁺²		2,07
	K ⁺		0,81
	Na ⁺		0,15
	Al ⁺³ + H ⁺		0,05
Suma de cationes		16,67	
Suma de Bases		16,62	
% Sat. De Bases		57	

Fr. A. = Franco Arenoso

4.1.2. Análisis foliar de la Ccera (*Lupinus alopecuroides*).

El análisis foliar interpretado del macro y micronutrientes de las hojas y tallos de *Lupinus alopecuroides* se presenta en la Tabla 3. El cual la concentración del N, P, K, S, Mg, Ca, Fe Mn, B y Na se encuentran en el rango característico para el contenido de nutricional de estos elementos, los valores de Cu y Zn son inferiores a las congregaciones normales (5-20 ppm para el Cu y 25-150 ppm para el Zn) (Piaggese 2004; Barbazán 1998).

Tabla 3. Análisis foliar de *L. alopecuroides* crecida en Choccara Pucro, Castrovirreyna.

Parámetro	Valor
Materia seca (%)	19,50
N (%)	4,47
P (%)	0,28
K (%)	2,29
Ca (%)	1,30
Mg (%)	0,36
S (%)	0,17
Na (%)	0,02
Zn (ppm)	30
Cu (ppm)	5
Mn (ppm)	55
Fe (ppm)	302
B (ppm)	36

4.1.3. Identificación de endosimbiontes aislados de nódulos de *Lupinus alopecuroides*

Después de la incubación en medio YEM del extracto obtenido de los nódulos del *L. alopecuroides* se obtuvieron 30 UFCs lo cual 14 fueron morfológicamente diferentes.

Después de la amplificación y secuenciación parcial del gen 16 rRNA de cada una de las cepas representativas de cada grupo, se realizó la búsqueda mediante el programa BLASTN de secuencias homólogas depositadas en los Bancos de Datos y se estableció que sólo 8 aislados son miembros del orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria (Tabla 5 e Ilustración 4). Los géneros más abundantes fueron *Bradyrhizobium* y *Phyllobacterium* cada uno con 03 representantes, seguido de *Rhizobium* con 02 representantes. Se detectó, además, la presencia de bacterias no incluidas en el orden Rhizobiales, que representaron el 74% del total de cepas aisladas (Tabla 4 e Ilustración 4). De ellas, el 13% corresponde al género *Pseudomonas*, el 10% al género *Rhodococcus*, el 7% a los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Rahnella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, y el 3% a los géneros *Pantoea*, *Erwinia* y *Staphylococcus*, (Tabla 4 e Ilustración 4).

Ilustración 4. Representación gráfica del porcentaje de bacterias aisladas de nódulos de *Lupinus alopecuroides* crecidas en Choccará Pucro.

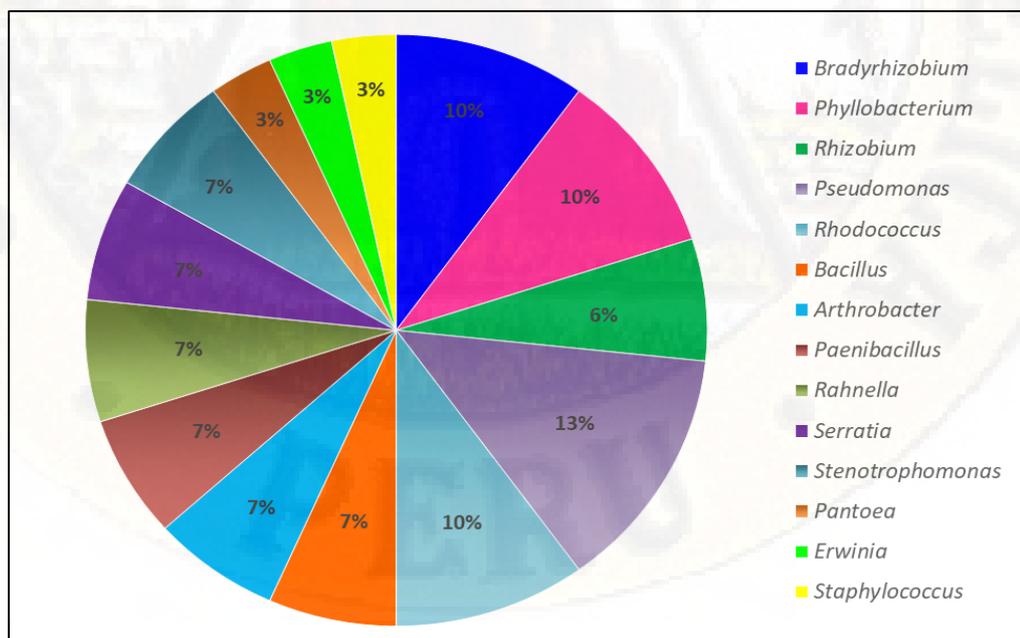


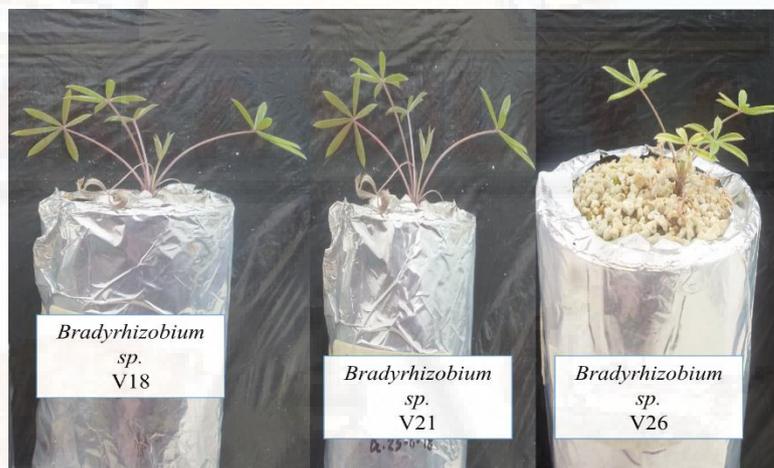
Tabla 4. Identificación de cepas aisladas de nódulos de *Lupinus alopecuroides* crecidas en Choccara Pucro, Castrovirreyna.

Grupo REP	Cepas	Especie filogenética	Familia	Orden	Clase
I	V1	<i>Erwinia rhapontici</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Gammaproteobacteria
II	V2, V3	<i>Rahnella aquatilis</i>	Enterobacteriaceae	enterobacteriales	Gammaproteobacteria
III	V4, V5	<i>Serratia grimesii</i>	Enterobacteriaceae	enterobacteriales	Gammaproteobacteria
IV	V6, V7, V23	<i>Rhodococcus jialingiae</i>	Nocardiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
V	V8, V17	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
VI	V9, M9, V13, V14, V19	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
VII	V10, V15	<i>Rhizobium sp.</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Proteobacteria alfa
VIII	V11, V12	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Gammaproteobacteria
IX	V16	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacillaceae	Bacillales	Bacilos
X	V18, V21, V26	<i>Bradyrhizobium sp</i>	Bradyrhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XI	V20, V22, V27	<i>Phyllobacterium sp</i>	Phyllobacteriaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XII	V24, 25	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Paenibacillaceae	Bacillales	Bacilli
XIII	M8	<i>Staphylococcus succinus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	cocci
XIV	M7	<i>Pantoea agglomerans</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Gammaproteobacteria

4.1.4. Caracterización simbiótica de las cepas aisladas de *Lupinus alopecuroides*

Para confirmar la capacidad de las cepas V18, V21, V26 (*Bradyrhizobium* sp), para nodular la planta hospedadora de las que se aislaron originalmente, se inocularon plantas del *L. alopecuroides* con cada una de ellas. Las plantas que formaron nódulos presentaron plantas vigorosas, en cambio las plantas que no formaron nódulos llegaron a secarse, lo que confirmaría que se trata del endosimbionte de *L. alopecuroides* (Ilustración 5).

Ilustración 5. Plantas de *L. alopecuroides* inoculadas con los aislados V18, V21 y V26



En la ilustración 6 se muestra *L. alopecuroides* inoculada con el aislado V18, V21 y V26 formaron nódulos en sus raíces.

Ilustración 6. Planta de *L. alopecuroides* inoculada con el aislado V26.



4.1.5. Identificación de endosimbionte de nódulos de *Lupinus alopecuroides* empleando el método independiente del cultivo celular.

Obtenida las secuencias se procedieron con el análisis bioinformático y se empleó FastQC y SEED2 para el procesamiento de secuencias, lo que permitió obtener 67235 secuencias con una longitud de 430 a 470 nucleótidos.

La clasificación de las secuencias se realizó empleando el comando “Classifier” de RDP 11, que permite asignar las secuencias de ADN a nivel de dominio y en las categorías taxonómicas de phyla, clase, orden, familia y género (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación taxonómica de secuencias de ADN procedente de nódulos de *L. alopecuroides*.

Categoría taxonómica	Número de taxa
Phyla	19
Clase	41
Orden	48
Familia	95
Genero	200

Tabla 6. Géneros bacterianos endosimbiontes de nódulos de *L. alopecuroides* y número de secuencias determinado por el método independiente de cultivo celular.

GENERO	Nº de secuencias promedio
<i>Streptophyta</i>	26053.25
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Serratia</i>	562.25
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Aeromonas</i>	141.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Mycobacterium</i>	123.25
<i>Mucilaginibacter</i>	117.5
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Anoxybacillus</i>	62.25
<i>Pedobacter</i>	45.25
<i>Geobacillus</i>	27
<i>Phyllobacterium</i>	23.75
<i>Duganella</i>	23

<i>Granulicella</i>	21
<i>Aeribacillus</i>	20.5
<i>Hydrogenophilus</i>	16.25
<i>Brevibacillus</i>	15.25
<i>Janthinobacterium</i>	15
<i>Gemmatimonas</i>	14.75
<i>Gp6</i>	14.75
<i>Saccharibacteria_genera_incertae_sedis</i>	14.75
<i>Labrys</i>	13.75
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Gaiella</i>	12
<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	11.5
<i>Acinetobacter</i>	11.25
<i>Rhodococcus</i>	11.25
<i>Gp4</i>	10.5
<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	10
<i>Segetibacter</i>	8.75
<i>Herbaspirillum</i>	8.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>WPS-1_genera_incertae_sedis</i>	7.75
<i>Carnobacterium</i>	7.25
<i>Rhizorhabdus</i>	7
<i>Arthrobacter</i>	6.25
<i>Rahnella</i>	5.75
<i>caldibacillus</i>	5.5
<i>Bosea</i>	5.25
<i>Massilia</i>	5.25
<i>Rhizobacter</i>	5.25
<i>Caulobacter</i>	5
<i>Chryseobacterium</i>	4.75
<i>Sphingobacterium</i>	4.75
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Rubrobacter</i>	4.5
<i>Variovorax</i>	4.5
<i>Kribbella</i>	4.25
<i>Pseudonocardia</i>	4.25
<i>Chthonomonas / Armatimonadetes_gp3</i>	4
<i>Corynebacterium</i>	3.75
<i>Dyadobacter</i>	3.75
<i>Hymenobacter</i>	3.75
<i>Nocardioides</i>	3.75

<i>Opitutus</i>	3.75
<i>Staphylococcus</i>	3.75
<i>Labilithrix</i>	3.5
<i>Tepidisphaera</i>	3.5
<i>Microlunatus</i>	3.25
<i>Sphingobium</i>	3.25
<i>Novosphingobium</i>	3
<i>Pirellula</i>	3
<i>Chitinophaga</i>	2.75
<i>Skermanella</i>	2.75
<i>Aquabacterium</i>	2.5
<i>Dokdonella</i>	2.5
<i>Inquilinus</i>	2.5
<i>Prevotella</i>	2.5
<i>Angustibacter</i>	2.25
<i>Gp16</i>	2.25
<i>Reyranella</i>	2.25
<i>Angustibacter</i>	2
<i>Pseudoxanthomonas</i>	2
<i>Adhaeribacter</i>	1.75
<i>Aeromicrobium</i>	1.75
<i>Brevundimonas</i>	1.75
<i>Devosia</i>	1.75
<i>Luteolibacter</i>	1.75
<i>Nitrospira</i>	1.75
<i>Asticcacaulis</i>	1.5
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Kaistia</i>	1.5
<i>Nitrobacter</i>	1.5
<i>Parafilimonas</i>	1.5
<i>Phenylobacterium</i>	1.5
<i>Terrimonas</i>	1.5
<i>Atopostipes</i>	1.25
<i>Enhydrobacter</i>	1.25
<i>Enterococcus</i>	1.25
<i>Gp1</i>	1.25
<i>Gp10</i>	1.25
<i>Parcubacteria_genera_incertae_sedis</i>	1.25
<i>Propionibacterium</i>	1.25
<i>Spirosoma</i>	1.25
<i>Terrimicrobium</i>	1.25
<i>Actinomyces</i>	1

<i>Anaeromyxobacter</i>	1
<i>Arenimonas</i>	1
<i>Gp7</i>	1
<i>Lysinibacillus</i>	1
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Micromonospora</i>	1
<i>Microvirga</i>	1
<i>Neisseria</i>	1
<i>Ohtaekwangia</i>	1
<i>Rubellimicrobium</i>	1
<i>Streptococcus</i>	1
<i>Aridibacter</i>	0.75
<i>Candidatus Solibacter</i>	0.75
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0.75
<i>Deinococcus</i>	0.75
<i>Epilithonimonas</i>	0.75
<i>Ferruginibacter</i>	0.75
<i>Flavisolibacter</i>	0.75
<i>Ilumatobacter</i>	0.75
<i>Intrasporangium</i>	0.75
<i>Lacibacter</i>	0.75
<i>Niastella</i>	0.75
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Sanguibacter</i>	0.75
<i>Solirubrobacter</i>	0.75
<i>Taibaiella</i>	0.75
<i>Terrabacter</i>	0.75
<i>Veillonella</i>	0.75
<i>Xanthomonas</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Alcaligenes</i>	0.5
<i>Algoriphagus</i>	0.5
<i>Blautia</i>	0.5
<i>Cellulomonas</i>	0.5
<i>Cellvibrio</i>	0.5
<i>Chryseolinea</i>	0.5
<i>Cytophaga</i>	0.5
<i>Delftia</i>	0.5
<i>Dongia</i>	0.5
<i>filifactor</i>	0.5
<i>Geodermatophilus</i>	0.5
<i>Glycomyces</i>	0.5

<i>Gp3</i>	0.5
<i>Gp5</i>	0.5
<i>Hyphomicrobium</i>	0.5
<i>Kallotenue</i>	0.5
<i>Kytococcus</i>	0.5
<i>Lactococcus</i>	0.5
<i>Luteibacter</i>	0.5
<i>Lysinibacillus</i>	0.5
<i>Meiothermus</i>	0.5
<i>Microbacterium</i>	0.5
<i>Oxalicibacterium</i>	0.5
<i>Phycococcus</i>	0.5
<i>Prostheco bacter</i>	0.5
<i>Raoultella</i>	0.5
<i>Sphingopyxis</i>	0.5
<i>Terriglobus</i>	0.5
<i>Thauera</i>	0.5
<i>Achromobacter</i>	0.25
<i>Amycolatopsis</i>	0.25
<i>Aquicella</i>	0.25
<i>Aquipuribacter</i>	0.25
<i>Armatimonas / Armatimonadetes_gp1</i>	0.25
<i>Bacillariophyta</i>	0.25
<i>Bacillus</i>	0.25
<i>Bacteriovorax</i>	0.25
<i>Blastocatella</i>	0.25
<i>Blastococcus</i>	0.25
<i>Buttiauxella</i>	0.25
<i>Candidatus Koribacter</i>	0.25
<i>Catenulispora</i>	0.25
<i>Collinsella</i>	0.25
<i>Gemmata</i>	0.25
<i>Gp20</i>	0.25
<i>Gp25</i>	0.25
<i>Herminiimonas</i>	0.25
<i>Jatrophihabitans</i>	0.25
<i>Lentzea</i>	0.25
<i>Luteococcus</i>	0.25
<i>Methylophilus</i>	0.25
<i>Methylotenera</i>	0.25
<i>Micrococcus</i>	0.25
<i>modestobacter</i>	0.25

<i>Moheibacter</i>	0.25
<i>Neorhizobium</i>	0.25
<i>Nitrosospira</i>	0.25
<i>Paracoccus</i>	0.25
<i>Pedomicrobium</i>	0.25
<i>Peredibacter</i>	0.25
<i>Pigmentiphaga</i>	0.25
<i>Povalibacter</i>	0.25
<i>Pusillimonas</i>	0.25
<i>Rhodoferax</i>	0.25
<i>Rufibacter</i>	0.25
<i>Schlesneria</i>	0.25
<i>Sediminibacterium</i>	0.25
<i>Sphaerochaeta</i>	0.25
<i>Tardiphaga</i>	0.25
<i>Vulcaniibacterium</i>	0.25
<i>Zavarzinella</i>	0.25

4.1.6. Géneros bacterianos implicados en actividad PGPR.

En este apartado se relacionan las bacterias implicadas con actividad PGPRs, los que se clasifican de acuerdo a la literatura de acuerdo a su posible función en el biocontrol, las fijadoras del N₂, solubilizadoras de fosfato, las productoras de hormonas vegetales, productoras de sideróforos y los de la actividad ACC-deaminasa e inductoras de resistencia sistémica.

Tabla 7 Géneros bacterianos implicados en biocontrol.

Género	Nº de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Phyllobacterium</i>	23.75
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Herbaspirillum</i>	8.25
<i>Arthrobacter</i>	6.25
<i>Massilia</i>	5.25
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Corynebacterium</i>	3.75

<i>Staphylococcus</i>	3.75
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Cellulomonas</i>	0.5
<i>Delftia</i>	0.5
<i>Microbacterium</i>	0.5
<i>Bacillus</i>	0.25

Tabla 8. Géneros bacterianos implicadas en fijación biológica de nitrógeno

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Mycobacterium</i>	123.25
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Phyllobacterium</i>	23.75
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>Arthrobacter</i>	6.25
<i>Corynebacterium</i>	3.75
<i>Novosphingobium</i>	3
<i>Devosia</i>	1.75
<i>Nitrospira</i>	1.75
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Propionibacterium</i>	1.25
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0.75
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Delftia</i>	0.5
<i>Bacillus</i>	0.25
<i>Nitrosospira</i>	0.25
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	0.25

Tabla 9. Géneros bacterianos implicados como solubilizadoras de fosfatos.

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75

<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Aeromonas</i>	141.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Brevibacillus</i>	15.25
<i>Janthinobacterium</i>	15
<i>Labrys</i>	13.75
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Herbaspirillum</i>	8.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>Chryseobacterium</i>	4.75
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Variovorax</i>	4.5
<i>Staphylococcus</i>	3.75
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Xanthomonas</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Bacillus</i>	0.25
<i>Micrococcus</i>	0.25

Tabla 10. Géneros bacterianos implicadas como productoras de fitohormonas.

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Aeromonas</i>	141.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Mycobacterium</i>	123.25
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Pedobacter</i>	45.25
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Rhodococcus</i>	11.25
<i>Herbaspirillum</i>	8.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>Arthrobacter</i>	6.25
<i>Chryseobacterium</i>	4.75
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Variovorax</i>	4.5

<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0.75
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Xanthomonas</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Microbacterium</i>	0.5
<i>Bacillus</i>	0.25

Tabla 11. Géneros bacterianos implicadas como productoras de sideróforos.

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Aeromonas</i>	141.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Mycobacterium</i>	123.25
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Rhodococcus</i>	11.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>Chryseobacterium</i>	4.75
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Variovorax</i>	4.5
<i>Novosphingobium</i>	3
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Xanthomonas</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Microbacterium</i>	0.5
<i>Bacillus</i>	0.25

Tabla 12. Géneros bacterianos implicadas en la actividad ACC-Deaminasa.

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Mycobacterium</i>	123.25

<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Phyllobacterium</i>	23.75
<i>Rhodococcus</i>	11.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>Caulobacter</i>	5
<i>Variovorax</i>	4.5
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Bacillus</i>	0.25

Tabla 13. Géneros bacterianos implicados como inductoras de resistencia sistémica.

Género	N^a de secuencias promedio
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Bacillus</i>	0.25

4.2. Prueba de hipótesis.

Los rizobios endosimbiontes aislados de nódulos de *Lupinus alopecuroides*, crecidas en zonas las alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica y evaluadas mediante el gen 16S rRNA, efectivamente corresponden al género *Bradyrhizobium*.

Para comprobar la hipótesis se empleó el método del 16S rRNA, que se utilizó para la secuenciación, también se utilizó la metagenómica que también nos servido para comprobar que *Bradyrhisobium* sp es el endosimbionte que nodulan en el *L. alopecuroides* mediante los programas bioinformáticos como el Chromas 2.6.6 y MEGA X 10.0.5. Las secuencias limpias se compararon con las depositadas en GenBank mediante el programa BLASTn disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Por lo cual la hipótesis queda demostrada la ilustración 4, y también en la tabla 4.

4.3. Discusión de resultados

En este trabajo de investigación se ha llevado a cabo la caracterización de bacterias endosimbióticas aisladas de nódulos de plantas de *Lupinus alopecuroides* (Ccera) crecidas, como cultivo espontáneo en las zonas alto andinas de la comunidad de Castrovirreyna-Huancavelica.

A partir de los extractos de nódulos se obtuvieron 30 cepas, pero solo 14 cepas fueron las que presentaron las diferentes morfologías en las unidades formadoras de colonias que aparecieron en las placas de cultivo. y una vez amplificada se secuenció parcialmente con el gen 16S rRNA de los aislados, lo que demostró la presencia de 3 especies *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. y *Phyllobacterium* sp, implícitas en el orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria, que constituyeron el 26% de las cepas aisladas (Tabla 4 e Ilustración 4). Lo que también pudieron encontrar Banasiewicz *et al.*, (2016); Barrera *et al.*, (1997); Corona *et al.*, (2006); Trujillo *et al.*, 2005 y Valverde *et al.*, (2005),

La asociación simbiótica del *Bradyrhizobium* sp. entre el *Lupinus alopecuroides* que son rizobios nativos es el principal sistema de aportación de N al suelo como lo manifestaron anteriormente Barrera *et al.*, (1997) como también Corona *et al.*, (2006).

Las especies de rizobios capaces de formar asociaciones simbióticas con plantas del género *Lupinus* pertenecen a la especie estrechamente relacionada del género *Bradyrhizobium* y *Microvirga*, la especie de *Bradyrhizobium* sp. (Barrera *et al.*, 1997), y *Microvirga zambiensis* strain WSM3693 (Banasiewicz *et al.*, 2016), entre ambas especies hay diferencias ya que tienen propiedades bioquímicas distintos, sin embargo también se pueden distinguir por sus diferentes características fenotípicas y genotípicas.

La cepa tipo *Bradyrhizobium* sp se aisló de nódulos de *Lupinus montanus* (Corona *et al.*, 2006); y que, a nivel genético, son iguales que del *Lupinus alopecuroides* que obtuvimos con el gen 16S rRNA. Hasta donde nosotros pudimos llegar con el trabajo de investigación ya que no pudimos identificar la especie específica ya que no contábamos con más recursos económicos

Conclusiones

1. *Bradyrhizobium* sp. es el microsimbionte específico de la ccera (*Lupinus alopecuroides*) que crece en las zonas alto andinas de Castrovirreyna - Huancavelica.
2. Existen bacterias ineptas que forman nódulos en el *Lupinus alopecuroides* que pueden encontrarse en su interior como endosimbiontes. Su función es desconocida.
3. Las plantas incitan el crecimiento de determinados géneros bacterianos, la mayoría de ellos con capacidad para promover el crecimiento vegetal, y cuya exuberancia depende del tipo de planta.
4. Las raíces de la ccera (*Lupinus alopecuroides*) contienen numerosas bacterias endófitas, la mayoría de ellas no descritas como tales hasta la fecha.

Recomendaciones

- ✓ Replicar el trabajo de investigación empleando la metodología descrita para *Bradyrhizobium* sp. y evaluar su presencia en los nódulos del *Lupinus alopecuroides*.
- ✓ Estudiar con mayor profundidad en las diferentes fases fenológicas del *Lupinus alopecuroides* y ver la dinámica poblacional bacteriana por cada fase.
- ✓ Se recomienda realizar estudios similares en otros cultivos de sierra a nivel de la región Huancavelica.
- ✓ En el futuro aspirar a producir inoculantes de los aislados
- ✓ Evaluar actividad PGPR de los endosimbiontes de nódulos de *Lupinus alopecuroides*

Referencias bibliográficas

- Abrosimova, LN, y Revut, IB (1964). Actividad biológica y la composición del aire del suelo en la capa de arado. *Sov Soci Sci.*; 7: 682-691.
- Alexander, M. (1980). Introducción a la Microgiología del suelo. México: AGT.
- Altieri, M, y Merrick, L, (1994.). Agroecology and in situ conservation of native diversity in the Third World. En Wilson, E. (eds). *Biodiversity*. 10th. Print. Nat. Acad. Press. USA: 361-369.
- Altieri, M, y Nicholls, C (2000). Agroecología: teoría y práctica para una agricultura sostenible. México.
- Amann, RI, Ludwig, W, y Schleifer, KH, (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Anderson, S. (1975) Cultivos de Cobertura: componentes de sistemas integrados. Taller Regional Latino-americano. 3-6 de febrero 1997. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma de Yucatán, Menda, Yucatán, México.
- April, Richard; Keller, Dianne. (2014) «Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States». *Biogeochemistry* 9: 1-18. Consultado el 8 de diciembre de 2019
- Arnold, AE. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. En *Current trends in mycological research*. Deshmukh, S. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68
- Arone, GJ, Calderón, C, Moreno, S, y Bedmar, E. (2013). Identification of Ensifer strains isolated from root nodules of *Medicago hispida* grown in association with *Zea mays* in the quechua región of the Peruvian Andes. Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), P.O. Box 419, 18080 Granada, Spain e-mail: aronejose@yahoo.com.
- Arone, GJ. (2012). Biodiversidad microbiana en chacras maiceras de Allpas (Acobamba, Huancavelica, Perú) cultivadas bajo el sistema tradicional andino. Agencia Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental

- del Zaidín-Granada. Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR 730-2013
ISBN: 978-84-9028-412-4.
- Atkins, CA. (1986). The legume *Rhizobium* symbiosis: limitations to maximizing nitrogen fixation. *Out Look on Agriculture*, 129-134.
- Bacon, CW, y White, JF, (2000). *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York
- Banasiewicz, Espinosa, López y De La Cruz (2016). Use of 16s rRNA gene for characterization of phosphate-solubilizing bacteria associated with corn, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Tel. and Fax 01 (595) 951-0170. Corresponding author (despinos@colpos.mx), México.
- Barbazán, M. (1998). *Análisis de Plantas y Síntomas Visuales de Deficiencia de Nutrientes*. Montevideo-Uruguay.
- Barbazán, M. (1998). *Análisis de Plantas y Síntomas Visuales de Deficiencia de Nutrientes*. Montevideo-Uruguay.
- Barney, V. (2011). Biodiversidad y ecogeografía del género *lupinus* L. (*leguminosae*) en Colombia.
- Barney, V. (2011). Biodiversidad y ecogeografía del género *lupinus* L. (*leguminosae*) en Colombia.
- Barrera, E. (2015). Evaluación del frijol lupinus (*lupinus mutabilis*) como abono verde para la producción agroecológica en el municipio de subachoque cundinamarca. Corporación universitaria minuto de dios facultad de ingeniería. Bogotá.
- Barrera, N, García, S, Dávila, O, Martínez, E, y Rodríguez, O, (1997). Biodiversidad de *Bradyrhizobium* simbiontes de Lupinus e inducción de factores de nodulación. XVIII RELAR: 201-203.
- Beattie, GA, y Lindow, SE, (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol* 33:145-172.
- Becana, M, & Bedmar, EJ, (1991). Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. En: J. Olivares, & J. Barea (Edits.), *Fijación y movilización de nutrientes* (Vol. VII, págs. 19-23). Madrid, España: Raycar S.A.
- Bell, CR, Dickie, GA, Harvey, WLG, y Chan, JW, (1995). Endophytic bacteria in grapevine *Can J Microbiol* 41:46-53.

- Ben-Dov, Y, Miller DR, y Gibson, GA, (2009). ScaleNet. A Data Base of the Scale Insects of the World, <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm> (consultado en mayo del 2019).
- Bontemps, C., Elliot, GN., Simon, MF., Dos Reis junior, F., Gross, E., Lawton, R., Neto, NE., Loureiro, MF., Faria, SM., Sprent, JI., James, EK., y Young, JPW. (2010). Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 19:44-52.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, RH., y Uroz, S. (2009). Análisis de pirosecuenciación de suelos forestales revelan una diversidad fúngica inesperadamente alta. *New Phytol* 184: 449–456.
- Burr B. y Barthlott 1991. En un velamen como tejido en la corteza de la raíz de las orquídeas. *Flora* 185: 313-323.
- Buyanovsky, GA, y Wagner, GH, (1983). Ciclos anuales de nivel de dióxido de carbono en el aire del suelo. *Soci Sci Soc Am J* 47: 1139–1145.
- Camarena, F., Huaranga, A., Jiménez, J. y Mostacero, E. (2012). Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Primera Edición. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina-Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). 222 pp
- Chen, K, y Pachter, L, (2005). Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLoS Computational Biology* 1: e24. doi:10.1371/journal.pcbi.0010024.
- Chirinos-Arias (2015). Análisis de la Variabilidad Genética entre treinta accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) usando marcadores moleculares *REVISTA BIO CIENCIAS*, <http://revistabiociencias.uan.edu.mx>.
- Chwieger, F, y Tebbe, CC, (1998). A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4860-4876.
- Cicore, P, Sainz, RH, Echeverría, H, y Barbieri, P, (2005). Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en el cultivo de soja en función de la disponibilidad de agua y azufre, y del sistema de labranza. *Cl. Suelo*, 23(2), 205-210.

- Coloma, J. (2009). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (Tesis Bioquímico farmacéutico). Riobamba-Ecuador.
- Corona, E., Munive, J., Sánchez, J., Corona, M., Salinas, F., Chávez, L., y Bermúdez, K., (2006). Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos de plantas de *lupinus montanus* hbk. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Universidad Tecnológica de Tecamac. Universidad Benemérita de Puebla. Apartado Postal 24. Yautepec, Morelos. México.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Review Microbiology* 3:470-478.
- Dary, M, Chamber-Pérez, MA, Palomares, AJ, y Pajuelo, E, (2010). In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting *rhizobacteria*. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 323-330.
- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., y Raina, V. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381: 805-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596060/>.
- de Bruijn, FJ. (1992). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:2180-2187.
- de Felipe, MR. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En: Fijación de Nitrógeno, Fundamentos y Aplicaciones. pp 9-16. E. J. Bedmar, J. González, C. Lluch, B. Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). ISBN: 84-611- 1198-5.
- De Long, E, y Pace, N, (2001). Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. Downloaded from <http://sysbio.oxfordjournals.org/> at Serials Acq (Law) on October 1, 2012. *Syst. Biol.* 50(4):470–478.
- Dennis, A, Fuller, R, y Valacich, J, (2008) Media, Tasks, and Communication Processes: A Theory of Media Synchronicity. In *MIS Quarterly* 32(3), 575-600.
- Dixon, R, y Kahn, D, (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2 (8): 621-31.

- Doran, JW, Sarrantonio, M, y Liebig, MA, (1996) Soil Health and Sustainability. Advances in Agronomy Vol. 56. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Edwards, RA., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, DM., Saar, MO., Alexander, S., Alexander, EC., y Rohwer, F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC Genomics, 7:57 doi:10.1186/1471-2164-7-57
- Elliott, GN., Chou, JH., Chen, WM., Bloemberg, G., Bontemps, C., Martinez-Romero, E., Velázquez, E., Young, JPW., Sprent JI., y James, JK. (2010). *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. Environ Microbiol 11:762-778.
- Ellmore GS 1981. Dimorfismo de la raíz en *Ludwigia peploides* (Onagraceae): estructura y contenido de gases de las raíces maduras. Amer.J.Bot. 68: 557-568.
- Fierer, N, Bradford, MA, y Jackson, RB, (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88(6):1354-1364.
- Fierer, N, Bradford, MA, y Jackson, RB, (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88(6):1354-1364.
- Fore, JJ, Wiechers, IR, y Cook-Deegan, R, (2006). The effects of business practices, licensing, and intellectual property on development and dissemination of the polymerase chain reaction: case study. Journal of Biomedical Discovery and Collaboration, 1:7 doi:10.1186/1747- 5333-1-7
- Foster, RC. (1998). Microenvironment of soil microorganisms. Biol Fertil Soils 6:189-203.
- Franché, C, Lindstrom, K, y Elmerich, C, (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant soil, Vol, 321, p. 35-59.
- Galloway, JN., Townsend, AR., Erismann, JW., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, JR., y Sutton, MA. (2008). Transformación del ciclo del nitrógeno: tendencias recientes, preguntas y posibles soluciones. Science, 320 (5878), 889–892. doi: 10.1126 / science.1136674
- Gálvez, L, Genovese, MI, y Lajolo, FM, (2008). Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. Journal of Food Composition and Analysis 22: 397-404. <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/19494>.

- Gans J, Woilinsky, M, y Dunbar, J, (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390.
- García, A, Hernández, G, Nuviola, A, y Toscano, V, (1996). Efecto del P sobre el rendimiento y extracción del NP de frijol cultivado en tres suelos. *Agronomía Mesoamericana*, 7(1), 99-102.
- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., y Zapata, F. (2003). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2), 207-214.
- García, H. (2010). Metales Pesados, sales y sodio en suelos de Chinampa en México. *Agrociencia* 35:385-395.
- Germida, J, y Siciliano, S, (2001). Diversidad taxonómica de bacterias asociadas con las raíces de los cultivares de trigo modernos, recientes y antiguos. *Biología y fertilidad de los suelos*, 33 (5), 410-415. doi: 10.1007 / s003740100343
- Gill, M. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 1355-1359.
- Giller, PS. (1996). ¿La diversidad de las comunidades del suelo, la? ¿Selva tropical del pobre? *Biodiversidad y conservación*, 5 (2), 135–168. doi: 10.1007 / bf00055827
- Giller, K. E., & Wilson, K. F. (1991). Nitrogen fixation in Tropical Cropping Systems. Wallingford UK: CAB international.
- Giovannoni, J, Cornelius, S, Barry, y James, J, (2007, Ethylene and Fruit Ripening. *J Plant Growth Regul* 26:143–159 DOI: 10.1007/s00344-007-9002-y
- Gladstones, JS. (1984). Recent developments in the understanding, improvement, and use of lupins. Pp. 603-611 in *Advances in Legume Science, Proceedings of the International Legume Conference, Kew 1978* (R.J. Summerfield and A.H. Bunting, eds). Royal Botanic Gardens.
- Gladstones, JS. (1998). Distribution, origin, taxonomy. history and importance of Lupins as Crop Plants *Biology*. New York.
- Gladstones, JS. (1998). Taxonomy history and importance of Lupins as Crop Plants *Biology*. New York.
- Gladstones, JS. 1(984). Recent developments in the understanding, improvement, and use of lupins. Pp. 603-611 in *Advances in Legume Science, Proceedings of the*

- International Legume Conference, Kew 1978 (R.J. Summerfield and A.H. Bunting, eds). Royal Botanic Gardens.
- González-Sama, AT., Coba de la Peña, F., Redondo Vela, N., de María, L., Guasch, E., Fedorova, C., de Lorenzo, MJ., Hernández-Jiménez, JM., Pozuelo, MP., Golvano, MR., de Felipe, JJ., Pueyo, M., Fernández-Pascual, y Lucas MM. (2006). Características especiales de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C., Madrid.
- Graham, P. (2008) Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses, pp. 23-43. Edited by M. J. Dilworth, E.K. James, J. I. Sprent, W. E. Newton. Dordrecht: The Netherlands: Springer.
- Graham, PH. (1990). Problemas de la nodulación y fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L.: una reevaluación. Terra, 8, 71-82.
- Gross, R, y Tuesta, (1977). Lupin in Human Nutrition. Proc. 5th Intern. Lupin Conf. Poznan, Polonia: 51-63.
- Guerrero, J. (1998) Interpretación de Análisis de Suelos y Recomendaciones. UNALM-Perú.
- Guo, DCh, y Milewicz, DM, (2003). Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. Biotechnology Letters 25: 2079-2083
- Hall, N. (2007). Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. J Exp Biol 210:1518-25.
- Hallmann J, y Berg, G. (2006). Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. En Soil Biology, Volume 9. Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hallmann, J, Quadt-Hallmann, A, Mahaffee, WF, y Kloepper, JW, (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 43:895-914.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68:669-685.
- Handelman, J, Rondon, MR, Brady, SF, Clardy, J, y Goodman, RM, (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new

- frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5:245-249. doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
- Hardoim, PR, van Overbeek, LS, y van Elsas, JD, (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Cell Press* 16 (10):463-71.
- Henning, K, y Villforth, F, (1940). Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Bakteriensymbiose in höheren Pflanzen und ihrer Beeinflubung durch Leitelemente. *Biochem Z* 305:299-309.
- Hernández, J, Saldaña, J, y De la Garza, F, (1996). Inoculación de *Vicia villosa* (veza) y *Melilotus alba* (trébol dulce) con cepas de *Rhizobium* y su efecto como abono verde en cultivo de maíz. *XVIII RELAR*:75-79.
- Hinsinger, P, Bengough, AG, Vetterlein, D, y Young, IM, (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321: 117–152.
- Huamán, A., Chirinos-Arias, M., Solís, H., Sáez, G., Marocho, L., y Guevara, J., (2013). Evaluación in vitro de la actividad antileishmanial y antitripanosomal del extracto acuoso de las hojas y semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”. *Anales Facultad de medicina* 74(Supl 1): S19.
- Hungria, M, y Neves, MC, (1987). Cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transpon in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 103, 111-121.
- Hungria, M, y Vargas, MA, (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res*, 65, 151-164.
- Hunt, DE, Klepac-Ceraj, V, Acinas, SG, Gautier, C, y Bertilsson, S, (2006). Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol* 72:2221-2225.
- Hurek, T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu, M, y Kellenberger E (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J Bacteriol* 176:1913-1923
- Hurtado, A. (2012). El espectáculo lunar y los *Lupinus*. file:///D:/TESIS%20VIANE%20FINAL/El%20espectáculo%20lunar%20y%20los%20Lupinus.html revisado 20/10/19.
- Imsande, J. (1989). Rapid dinitrogen fixation during soybean pod fill enhances net photosynthetic output and seed yield: A new perspective. *Agron. J*, 81, 549-556.

- Jacobsen, SE., Mujica. A., Moraes Ilgaard, RB., Kvist, LP., Borchsenius F., y Balslev H. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. En Botánica Económica de los Andes Centrales. Edit. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 458-482.
- Jensen, PR, y Lauro, FM, (2008). An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(1):51-62. doi:10.1007/s10482-008-9239-x.
- Jordán, LA. (2005). Manual de edafología. Sevilla, España. pp 15 – 17
- Lessman, G. M., y G. E. Boyd. 1971. “Response of *Phaseolus vulgaris* to zinc as influenced by phosphorus level and source”. *Soil*. Pág. 935 - 938.
- Jussie, J. (1792). *Lupinus alopecuroides* Desr., *Encycl.* 3(2): 626. 1792.
- Keller, M, y Zengler, K, (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews* 2: 141-150
- Kennedy, ET, Ohls, J, Carlson, S, y Fleming, K, (1995). El índice de alimentación saludable: diseño y aplicaciones. *J Am Diet Assoc* 95, 1103–1108.
- Kloepper, JW, Schippers, B, y Bakker, P, (1992). Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology* 82:726-727.
- Kluepfel, DA. (1993). The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu Rev Phytopathol* 31:441-472
- Kobayashi, DY, y Palumbo, JD. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, pp 199-236
- Kumar, PS, Brooker, MR, Dowd, SE, y Camerlengo, T. (2011). Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS ONE* 6(6): e20956. doi:10.1371/journal.pone.0020956
- Ladygina, N, y Hedlund, K, (2010). Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 42:162-168.
- Leonard, LT. (1943). A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 45:523-527.
- Lezama, P. (2010). Las Especies de *Lupinus* L. (*Fabaceae*) y de sus simbioses en el distrito de Corongo-Ancash, Altramuces Legumbres – Variedades, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Liu, WT, Marsh, TL, Cheng, H, y Forney, LJ, (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment *length polymorphism* of genes encoding 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Mahon, JD. (1977). Respiration and the energy requirements for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiol*, 60, 817-821.
- Manter, DK, Delgado, JA, Holm, DG, y Stong, RA, (2010). Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol.* 60:157-166. DOI 10.1007/s00248-010-9658-x
- McInroy, JA, y Kloepper, JW, (1995a). Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. *Can J Microbiol* 41:895-901.
- McInroy, JA, y Kloepper, JW, (1995b). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337-342.
- Mocalli, S, y Benedetti, A, (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* 161: 497-505.
- Morales-García, YE., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., de la Torre, J., Martínez-Contreras, RD., Pérez-y-Terrón, R., y Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología* 14 (2):11-29
- Mullis, KB. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 (4):56-65.
- Municipalidad provincial de Castrovirreyna. (2004). «Plan vial provincial participativo de Castrovirreyna» (pdf). pp. 20-23. Consultado el 18 de junio de 2019.
- Muyzer, G, de Waal, EC, y Uitterlinden, AG, (1993). Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Muyzer, G, y Smalla, K, (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:27-141.
- Nossa, CW., Oberdorf, WE., Yang, L., Aas, JA., Paster, BJ., DeSantis, TZ., Brodie, EL., Malamud, D., Poles, MA., y Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers

- for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol* 16(33):4135-4144.
- Orsvik, V, y Ovreas, L, (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240-245.
- Paisio, C, González, P, Talano, M, y Agostini, E, (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. Departamento de Biología Molecular, FCEFQN, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601. C.P. 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Teléfono: 54-358-4676537; Fax: 54-358-4676232.
- Pankhurst, NW, Purser, GJ, Van Der Kraak, G, Thomas, PM y Forteach, GNR, (1996). Efecto de la temperatura de mantenimiento en la ovulación, fertilidad del huevo, niveles plasmáticos de hormonas reproductivas y esteroidogénesis ovárica in vitro en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. *Acuicultura*, 146 (3-4), 277–290. doi: 10.1016 / s0044-8486 (96) 01374-9
- Pastor, J, Hernández, AJ, Prieto, N, y Fernández-Pascual, M, (2003). “Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn”. *Journal of Plant Physiology*, 160(12): 1457-1465.
- Patriquin, DG, Dobereiner, J, y Jain, DK, (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can J Microbiol* 29:900-915
- Peix A, Nossa, CW, Chokshi, P, Blaser, MJ, y Yang, L, (2011). Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *PLoS ONE* 4(5): e5437. doi: 10.1371/journal.pone.0005437
- Pereira, P, Ibañez, F, Rosenblueth, M, Etcheverry, M, y Martinez-Romero E, (2011). Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *ISRN Ecology*. Article ID 938546, doi:10.5402/2011/938546
- Pérez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Miche-lena, JM., Silva FJ., Moya, A., y Latorre, A. (2006). A small microbial geno-me: the end of a long symbiotic relationship? *Science* 314:312-313.
- Philippot, L, Hallin, S, y Schloter, M, (2007). Ecology of dinitrifying prokaryptes, in; agricultural soil. Sparks DL (ed). *Adv. Agro*, pp: 249 – 304.
- Philipson MN, y Blair, ID, (1957) Bacteria in clover root tissue. *Can. J. Microbiol.* 3:125-129.

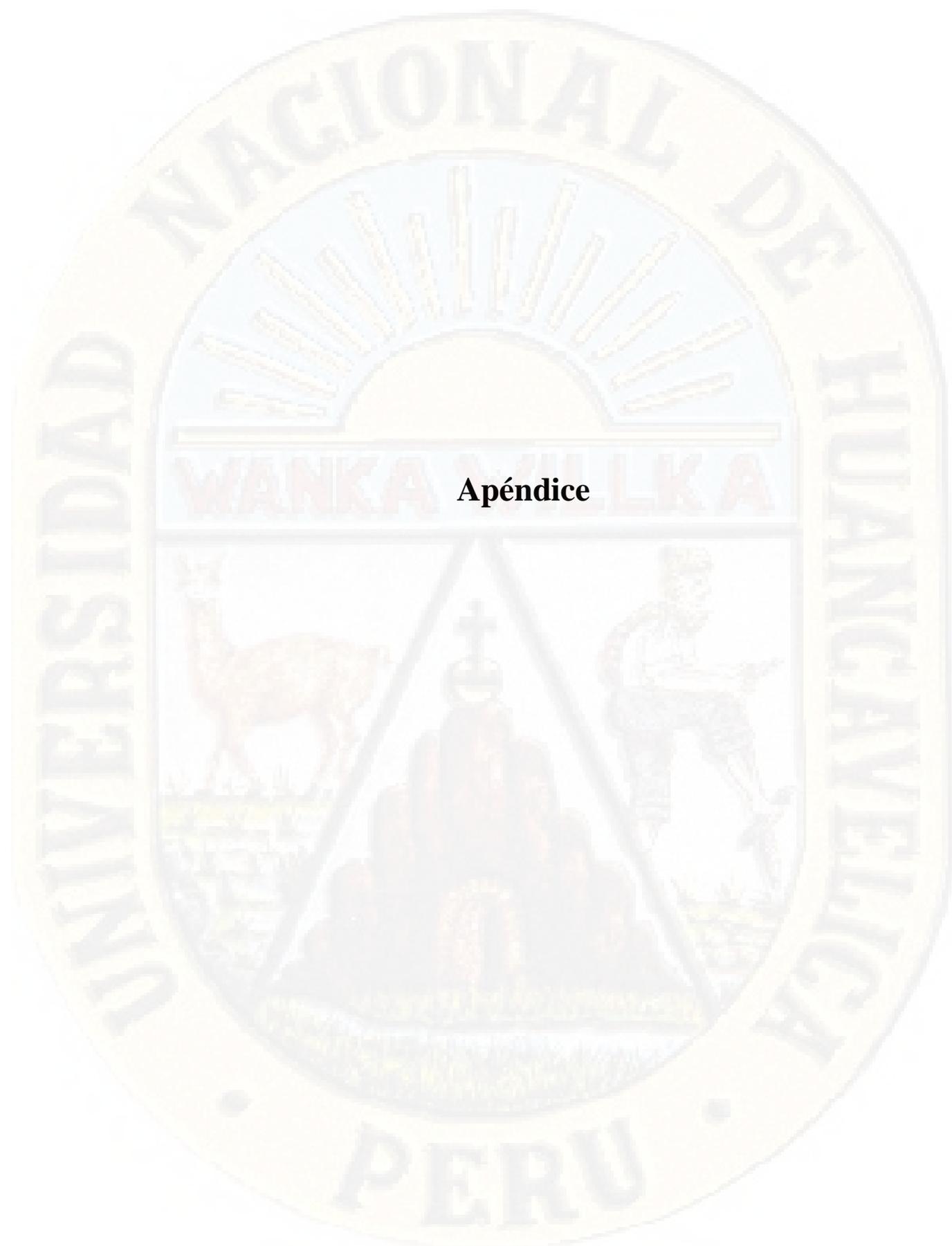
- Piaggese, A. (2004). Los microelementos en la Nutrición Vegetal. Italia.
- Pommeresche, R, y Hansen, S, (2017). Examen de la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas. Centro de Investigación y Formación Agrarias (CIFA) c/ Héroes 2 de mayo, 27, 39600 Muriedas, Cantabria Phone +34 942254045, cifa@cifacantabria.org, www.cifacantabria.org.
- Postgate, J (1998). Nitrogen Fixation, 3rd Edition. Cambridge University Pres, Cambridge UK
- Riesenfeld, CS, Schloss, PD, y Handelsman, J, (2004). Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. Annual Review of Genetics 38:525-552.
- Rondon, M, Goodman, M, y Handelsman, J, (1999). The earths bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. Trends in Biotechnology 17:403-409.
- Rubio, L, y Ludden, P, (2008). Biosíntesis del cofactor hierro-molibdeno de la nitrogenasa. Annu Rev Microbiol. 62: 93-111. Doi: 10.1146 / annurev.micro.62.081307.162737.
- Rudney, JD, Xie, H, Rhodus, NL, Ondrey, FG, y Griffin, TJ, (2010). A metaproteomic analysis of the human salivary microbiota by three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. Molecular Oral Microbiology 25: 38-49.
- Samish, Z, Etinger-Tulczynska, R, y Bick, M, (1961). Microflora within healthy tomatoes. Appl Microbiol 9:20-25.
- Saravia, M. (2015). Control Biológico del nematodo de la papa en el Marco de la Agricultura Conservacionista. Programa Integrado de Manejo de Cuencas, disponible en promic@promic-bolivia.org.
- Sato, S, Isobe, S, y Tabata, S, (2006). Structural analyses of the genomes in legumes. Current Opinion in Plant Biology 13: 146-152. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526609001836>. 2010
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM (2003). «Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts». J. Gen. Appl. Microbiol. 49 (3): 155-79. PMID 12949698
- Sawada, H, Kuykendall, LD, y Young, JM, (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J Gen Appl Microbiol 49:155-179.

- Schink, B. (2002). Digestión anaerobia: conceptos, límites y perspectivas. *Ciencia y tecnología del agua*, 45 (10), 1–8. doi: 10.2166 / wst.2002.0274.
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual review of genetics*, 32, 33–57.
- Schuster, SC. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology». *Nature Methods* 5:16-18.
- Sentinelli, F, Lovari S, Vitale, M, Giorgi, G, di Mario, U, y Baroni, MG, (2000). A simple method for non-radioactive PCR-SSCP using MDET gel solution and a midi gel format: application for the detection of variants in the GLUT1 and CTLA-4 genes. *J Biotechnol* 78:201-201.
- Serraj, R, Fleurat, LP, Jaillard, B, y Drevon, JJ, (1995). Structural changes in the inner cortex cells of soybean roots nodules are induced by short term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant, Cell and Environment*, 18, 455-462.
- Sharrock, KR, Parkes, SL, Jack, HK, Rees-George, J, y Hawthorne, BT, (1991). Involvement of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. hybrid *Delicia*). *New Zealand J Crop Hort Sci* 19:157-165.
- Sharrock, KR, Parkes, SL, Jack, HK, Rees-George, J, y Hawthorne, BT, (1991). Involvement of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. hybrid *Delicia*). *New Zealand J Crop Hort Sci* 19:157-165.
- Singh, N, Arya, RS, Sharma, T, Dhuria, RK, y Garg, DD, (2008). Efecto de la alimentación de alimento completo a base de paja de racimo de frijol (*Cyamopsis tetragonoloba*) en forma suelta y comprimida sobre el rumen y los parámetros hemato-bioquímicos en ovejas Marwari. *Veterinario. Práctica*, 9 (2): 110-115 Amaral-Zettlera et al. 2008
- Singh, N. Arya, RS, Sharma, T, Dhuria, RK, y Garg, DD, (2008). Efecto de la alimentación de alimento completo a base de paja de racimo de frijol (*Cyamopsis tetragonoloba*) en forma suelta y comprimida sobre el rumen y los parámetros hemato-bioquímicos en ovejas Marwari. *Veterinario. Práctica*, 9 (2): 110-115
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., y Tebbe, C. (2007). Bacterial diversity assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene

- fragments: Do the different methods provide similar results? *J Microbiol Methods* 69:470-479.
- Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Welch, D., Huse, S., Neal, P., Arrieta, J., y Herndl, G. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the under explored rare biosphere. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 103:12115-12120.
- Soto, D, y Sukumar, S, (1992). Improved detection of mutations in the p53 gene in human tumours as single stranded conformation polymorphis and double satrande heterofduplex DNA. *PCR Method Appl* 2:96-99.
- Starr, M. P. (1975). «A generalized scheme for classifying organismic associations». *Symposia of the Society for Experimental Biology (en inglés)* 29: 1-20.
- Stein, RA. (2008). Next-Generation Sequencing Update. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 28
- Stotzky, G. (1983). Gene transfer among bacteria in soil. In: *Gene Transfer in the Environment*, S. B. Levy & R. V. Miller (eds), p. 165-222 McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Sturz, AV. (1995). The role of endophytic bacteria during seed decay and potato tuberization. *Plant Soil* 75:257-263.
- Talbi, C. (2011). Nuevas estrategias para mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno en *phaseolus vulgaris* cultivada en suelos afectados por estreses abióticos. Editor: Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR 1182-2012, ISBN: 978-84-695-1156-5.
- Tiedje, JM, Asuming-Brempong, S, Nüsslein K, Marsh, TL, y Flynn, SJ, (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13,109–122.
- Torsvik, V, Ovreas, L, y Thingstad, TF, (2002). Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296:1064-1066.
- Torsvik, V, y Ovreas, L, (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240-245.
- Trevet, IW, y Hollis, JP, (1948). Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology* 38:960-967.
- Tringe, S. (2005), Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* 308:554-557.

- Trujillo, ME., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, AM., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, PF., Molina, EM., y Velazquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. Nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1318-1327.
- Uroz, S, Buée, M, Murat, C, Frey-Klett, P, y Martin, F, (2010). Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), 281-288 doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00117.x
- USDA (2000) *Managing Cover Crops Profitably*. Sustainable Agriculture Network, National Agricultural Library. Beltsville, MD 20705-2351.
- Usher, MB. (1979). Changes in the species-area relations of higher plants on nature reserves. *J. appl. Ecol.*, 16, 213-15.
- Valles, MB, Cadisch, G, y Aluja, SA, (2003). Comparación de metodologías de isotopos para evaluar fijación de nitrógeno atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia*, 37, 117-128.
- Valverde, A., Velazquez, E., Santos, FF., Vizcaino, N., Rivas, R., Mateos, PF., Molina, EM., Igual, JM., y Willems. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989 A.
- van Elsas, JD, Trevors, JT, y Starodub, ME, (1998). Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol Lett* 53:299-306.
- van Elsas, JD, y Trevors, JT, (1998). Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol Lett* 53:299-306.
- van Elsas, JD. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Cell Press* 16 (10):463-71.
- Vara Prasad, MN, y Oliveira Freitas, HM, (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol* 6(3):285-321.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, MJ., Esteban, E., Peñalosa, JM., y Carpena, RO. (200). Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and as pollute acid soil. *Water air soil pollut* 177, 349-365.
- Velázquez, E, Mateos, PF, Trujillo, M. Rivas, R, y Martínez-Molina, E, (2006). Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. En: *Fijación de Nitrógeno, Fundamentos y Aplicaciones*. pp. 45-52. E. J. Bedmar, J. González, C. Lluch, B.

- Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). ISBN: 84-611-1198-5.
- Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell. Oxford.
- Waters, CM, y Bassler, BL, (2005). Detección de quórum: comunicación de célula a célula en bacterias. Revisión anual de la biología celular y del desarrollo, 21, 319-346. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Weisburg, WG, Barns, SM, Pelletier, DA, y Lane, DJ, (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3-14.
- Winters, RD, y Winn, WC, (2010). A simple, effective method for bacterial culture storage: A brief technical report. *Journal of Bacteriology and Virology* 40(2):99-101 DOI 10.4167/jbv.2010.40.2.99
- Woese, CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51, 221-271.
- Woese, CR., Fox, GE., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, BJ., y Stahl, D. (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254:83-86.
- Zakhia, F, y Lajudie, P, (2006). Modern bacterial taxonomy: application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL). *Can J Microbiol* 52:169-181.
- Zornoza, P, Millán, R, Sierra, MJ, Seco, A, y Esteban, E, (2010). Efficiency of white lupin in the removal of mercury from contaminated soils: soil and hydroponic experiments. *J Environ Sci* 22(3):421-427.



Apéndice

Anexo 1. Phylas identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*.

PHYLA	PROMEDIO
<i>Proteobacteria</i>	66249.5
<i>Cyanobacteria / Chloroplast</i>	32034.75
<i>Bacteroidetes</i>	325.5
<i>Actinobacteria</i>	280.75
<i>Firmicutes</i>	191.5
<i>Acidobacteria</i>	78.75
<i>Verrucomicrobia</i>	36
<i>Gemmatimonadetes</i>	14.75
<i>Saccharibacteria</i>	9
<i>bacteriaceae</i>	7.75
<i>WPS-1</i>	7.25
<i>Planctomycetes</i>	5.5
<i>Chloroflexi</i>	4.75
<i>Armatimonadetes</i>	4.5
<i>Parcubacteria</i>	1.25
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	0.75
<i>Chlamydiae</i>	0.75
<i>Nitrospirae</i>	0.25
<i>Spirochaetes</i>	0.25

Anexo 2. clases identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*.

CLASE	promedio
<i>Gammaproteobacteria</i>	41759.5
<i>Chloroplast</i>	26073.5
<i>Alphaproteobacteria</i>	23789.25
<i>Actinobacteria</i>	286.75
<i>Sphingobacteriia</i>	233
<i>Bacilli</i>	185.5
<i>Betaproteobacteria</i>	157.5
<i>Flavobacteriia</i>	136.5
<i>Acidobacteria_Gp1</i>	42
<i>Deltaproteobacteria</i>	19.25
<i>Cytophagia</i>	17.75
<i>Acidobacteria_Gp6</i>	14.75
<i>Acidobacteria_Gp4</i>	14
<i>Spartobacteria</i>	12.25

<i>Subdivision3</i>	11.25
<i>Planctomycetia</i>	7.75
<i>Bacteroidia</i>	4.25
<i>Chthonomonadetes</i>	4
<i>Opitutae</i>	4
<i>Phycisphaerae</i>	3.5
<i>Verrucomicrobiae</i>	3.5
<i>Clostridia</i>	2.5
<i>Acidobacteria_Gp16</i>	2.25
<i>Acidobacteria_Gp3</i>	2
<i>Nitrospira</i>	1.75
<i>Caldilineae</i>	1.5
<i>Deinococci</i>	1.5
<i>Acidobacteria_Gp10</i>	1.25
<i>Acidobacteria_Gp7</i>	1
<i>Anaerolineae</i>	0.75
<i>Chlamydiia</i>	0.75
<i>Cyanobacteria</i>	0.75
<i>Negativicutes</i>	0.75
<i>Acidobacteria_Gp5</i>	0.5
<i>Chloroflexia</i>	0.5
<i>Cianobacterias</i>	0.5
<i>Erysipelotrichia</i>	0.5
<i>Acidobacteria_Gp20</i>	0.25
<i>Acidobacteria_Gp25</i>	0.25
<i>Armatimonadia</i>	0.25
<i>Spirochaetia</i>	0.25

Anexo 3. Orden identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*.

ORDEN	Nº de secuencias promedio
<i>Enterobacteriales</i>	31095.25
<i>Rhizobiales</i>	23687.5
<i>Pseudomonadales</i>	10386.25
<i>Bacillales</i>	156.5
<i>Aeromonadales</i>	141.25
<i>Actinomycetales</i>	119.5
<i>Sphingobacteriales</i>	98.25
<i>Burkholderiales</i>	78.25
<i>Sphingomonadales</i>	52.25

<i>Xanthomonadales</i>	37
<i>Myxococcales</i>	18.5
<i>Flavobacteriales</i>	18
<i>Hydrogenophilales</i>	16.25
<i>Cytophagales</i>	14.75
<i>Gemmatimonadales</i>	14.75
<i>Rhodospirillales</i>	12.25
<i>Gaiellales</i>	12
<i>Lactobacillales</i>	11.75
<i>Planctomycetales</i>	7.75
<i>Acidimicrobiales</i>	6.75
<i>Caulobacterales</i>	6
<i>Rubrobacterales</i>	4.5
<i>Opitutales</i>	4
<i>Chthonomonadales</i>	3.75
<i>Bacteroidales</i>	3.5
<i>Tepidisphaerales</i>	3.5
<i>Verrucomicrobiales</i>	3.5
<i>Methylophilales</i>	2.25
<i>Solirubrobacterales</i>	2.25
<i>Neisseriales</i>	2
<i>Caldilineales</i>	1.5
<i>Clostridiales</i>	1.5
<i>Rhodobacterales</i>	1.5
<i>Anaerolineales</i>	0.75
<i>Deinococcales</i>	0.75
<i>Nitrospirales</i>	0.75
<i>Selenomonadales</i>	0.75
<i>Thermales</i>	0.75
<i>Erysipelotrichales</i>	0.5
<i>Kallotenuales</i>	0.5
<i>Armatimonadales</i>	0.25
<i>Bdellovibrionales</i>	0.25
<i>Coriobacteriales</i>	0.25
<i>Legionellales</i>	0.25
<i>Nitrosomonadales</i>	0.25
<i>Rhodocyclales</i>	0.25
<i>Spirochaetales</i>	0.25
<i>Vibrionales</i>	0.25

Anexo 4. Familias identificadas, y su número de secuencias promedio determinadas en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*.

FAMILIA	Nº de secuencias promedio
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	79277.25
<i>Enterobacteriaceae</i>	31095.25
<i>Cloroplasto</i>	19168
<i>Pseudomonadaceae</i>	10370.5
<i>Chloroplast</i>	6900.5
<i>Rhizobiaceae</i>	406.75
<i>Sphingobacteriaceae</i>	180.25
<i>Aeromonadaceae</i>	141.75
<i>Flavobacteriaceae</i>	136.25
<i>Mycobacteriaceae</i>	123.75
<i>Oxalobacteraceae</i>	98.25
<i>Chitinophagaceae</i>	52.75
<i>Sphingomonadaceae</i>	50.75
<i>Xanthomonadaceae</i>	35.25
<i>Phyllobacteriaceae</i>	29.75
<i>Bacillaceae 1</i>	28.75
<i>Micrococcaceae</i>	24
<i>Streptomycetaceae</i>	22.5
<i>Caulobacteraceae</i>	17.5
<i>Comamonadaceae</i>	16.5
<i>Hydrogenophilaceae</i>	16.25
<i>Paenibacillaceae 1</i>	16.25
<i>Gemmatimonadaceae</i>	14.75
<i>Nocardioideae</i>	14
<i>Xanthobacteraceae</i>	13.75
<i>Moraxellaceae</i>	12.5
<i>Cytophagaceae</i>	12
<i>Gaiellaceae</i>	12
<i>Nocardiaceae</i>	11.5
<i>Carnobacteriaceae</i>	8.5
<i>Planctomycetaceae</i>	7.75
<i>Pseudonocardiaceae</i>	7.25
<i>Microbacteriaceae</i>	6.5
<i>Intrasporangiaceae</i>	5.5
<i>Propionibacteriaceae</i>	4.75
<i>Rubrobacteraceae</i>	4.5
<i>Micromonosporaceae</i>	4.25
<i>Chthonomonadaceae</i>	4

<i>Opitutaceae</i>	4
<i>Prevotellaceae</i>	3.75
<i>Staphylococcaceae</i>	3.75
<i>Labilitrachaceae</i>	3.5
<i>Tepidisphaeraceae</i>	3.5
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	3.5
<i>Corynebacteriaceae</i>	3
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	2.75
<i>Burkholderiales_incertae_sedis</i>	2.5
<i>Kineosporiaceae</i>	2.5
<i>Methylocystaceae</i>	2.5
<i>Rhodospirillaceae</i>	2.25
<i>Alcaligenaceae</i>	2
<i>Methylobacteriaceae</i>	2
<i>Neisseriaceae</i>	2
<i>Burkholderiaceae</i>	1.75
<i>Enterococcaceae</i>	1.75
<i>Nitrospiraceae</i>	1.75
<i>Sinobacteraceae</i>	1.75
<i>Acetobacteraceae</i>	1.5
<i>Caldilineaceae</i>	1.5
<i>Cyclobacteriaceae</i>	1.5
<i>Rhodobacteraceae</i>	1.5
<i>Streptococcaceae</i>	1.5
<i>Actinomycetaceae</i>	1.25
<i>Deinococcaceae</i>	1.25
<i>Cryptosporangiaceae</i>	1
<i>Geodermatophilaceae</i>	1
<i>Planococcaceae</i>	1
<i>Polyangiaceae</i>	1
<i>Anaerolineaceae</i>	0.75
<i>Clostridiaceae1</i>	0.75
<i>Nannocystaceae</i>	0.75
<i>Parachlamydiaceae</i>	0.75
<i>Solirubrobacteraceae</i>	0.75
<i>Thermaceae</i>	0.75
<i>Veillonellaceae</i>	0.75
<i>Bacteriovoracaceae</i>	0.5
<i>Beijerinckiaceae</i>	0.5
<i>Cellulomonadaceae</i>	0.5
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.5
<i>Glycomycetaceae</i>	0.5

<i>Kallotenuaceae</i>	0.5
<i>Lachnospiraceae</i>	0.5
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.5
<i>Ruminococcaceae</i>	0.5
<i>Armatimonadaceae</i>	0.25
<i>Brucellaceae</i>	0.25
<i>Catenulisporaceae</i>	0.25
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.25
<i>Coxiellaceae</i>	0.25
<i>Iamiaceae</i>	0.25
<i>Nitrosomonadaceae</i>	0.25
<i>Rhodocyclaceae</i>	0.25
<i>Sanguibacteraceae</i>	0.25
<i>Spirochaetaceae</i>	0.25
<i>Vibrionaceae</i>	0.25

Anexo 5. Géneros identificados, y su número de secuencias promedios determinadas en los nódulos radicales del *Lupinus alopecuroides*.

GENERO	Nº de secuencias promedio
<i>Streptophyta</i>	26053.25
<i>Bradyrhizobium</i>	11699.75
<i>Pseudomonas</i>	9869.75
<i>Serratia</i>	562.25
<i>Rhizobium</i>	365.5
<i>Aeromonas</i>	141.5
<i>Flavobacterium</i>	130.25
<i>Mycobacterium</i>	123.25
<i>Mucilaginibacter</i>	117.5
<i>Pantoea</i>	86.5
<i>Anoxybacillus</i>	62.25
<i>Pedobacter</i>	45.25
<i>Geobacillus</i>	27
<i>Phyllobacterium</i>	23.75
<i>Duganella</i>	23
<i>Granulicella</i>	21
<i>Aeribacillus</i>	20.5
<i>Hydrogenophilus</i>	16.25
<i>Brevibacillus</i>	15.25
<i>Janthinobacterium</i>	15
<i>Gemmatimonas</i>	14.75

<i>Gp6</i>	14.75
<i>Saccharibacteria_genera_incertae_sedis</i>	14.75
<i>Labrys</i>	13.75
<i>Sphingomonas</i>	13
<i>Stenotrophomonas</i>	12.75
<i>Gaiella</i>	12
<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	11.5
<i>Acinetobacter</i>	11.25
<i>Rhodococcus</i>	11.25
<i>Gp4</i>	10.5
<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	10
<i>Segetibacter</i>	8.75
<i>Herbaspirillum</i>	8.25
<i>Mesorhizobium</i>	8
<i>WPS-1_genera_incertae_sedis</i>	7.75
<i>Carnobacterium</i>	7.25
<i>Rhizorhabdus</i>	7
<i>Arthrobacter</i>	6.25
<i>Rahnella</i>	5.75
<i>caldibacillus</i>	5.5
<i>Bosea</i>	5.25
<i>Massilia</i>	5.25
<i>Rhizobacter</i>	5.25
<i>Caulobacter</i>	5
<i>Chryseobacterium</i>	4.75
<i>Sphingobacterium</i>	4.75
<i>Streptomyces</i>	4.75
<i>Rubrobacter</i>	4.5
<i>Variovorax</i>	4.5
<i>Kribbella</i>	4.25
<i>Pseudonocardia</i>	4.25
<i>Chthonomonas / Armatimonadetes_gp3</i>	4
<i>Corynebacterium</i>	3.75
<i>Dyadobacter</i>	3.75
<i>Hymenobacter</i>	3.75
<i>Nocardioides</i>	3.75
<i>Opitutus</i>	3.75
<i>Staphylococcus</i>	3.75
<i>Labilithrix</i>	3.5
<i>Tepidisphaera</i>	3.5
<i>Microlunatus</i>	3.25
<i>Sphingobium</i>	3.25

<i>Novosphingobium</i>	3
<i>Pirellula</i>	3
<i>Chitinophaga</i>	2.75
<i>Skermanella</i>	2.75
<i>Aquabacterium</i>	2.5
<i>Dokdonella</i>	2.5
<i>Inquilinus</i>	2.5
<i>Prevotella</i>	2.5
<i>Angustibacter</i>	2.25
<i>Gp16</i>	2.25
<i>Reyranella</i>	2.25
<i>Angustibacter</i>	2
<i>Pseudoxanthomonas</i>	2
<i>Adhaeribacter</i>	1.75
<i>Aeromicrobium</i>	1.75
<i>Brevundimonas</i>	1.75
<i>Devosia</i>	1.75
<i>Luteolibacter</i>	1.75
<i>Nitrospira</i>	1.75
<i>Asticcacaulis</i>	1.5
<i>Burkholderia</i>	1.5
<i>Kaistia</i>	1.5
<i>Nitrobacter</i>	1.5
<i>Parafilimonas</i>	1.5
<i>Phenylobacterium</i>	1.5
<i>Terrimonas</i>	1.5
<i>Atopostipes</i>	1.25
<i>Enhydrobacter</i>	1.25
<i>Enterococcus</i>	1.25
<i>Gp1</i>	1.25
<i>Gp10</i>	1.25
<i>Parcubacteria_genera_incertae_sedis</i>	1.25
<i>Propionibacterium</i>	1.25
<i>Spirosoma</i>	1.25
<i>Terrimicrobium</i>	1.25
<i>Actinomyces</i>	1
<i>Anaeromyxobacter</i>	1
<i>Arenimonas</i>	1
<i>Gp7</i>	1
<i>Lysinibacillus</i>	1
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Micromonospora</i>	1

<i>Microvirga</i>	1
<i>Neisseria</i>	1
<i>Ohtaekwangia</i>	1
<i>Rubellimicrobium</i>	1
<i>Streptococcus</i>	1
<i>Aridibacter</i>	0.75
<i>Candidatus Solibacter</i>	0.75
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0.75
<i>Deinococcus</i>	0.75
<i>Epilithonimonas</i>	0.75
<i>Ferruginibacter</i>	0.75
<i>Flavisolibacter</i>	0.75
<i>Ilumatobacter</i>	0.75
<i>Intrasporangium</i>	0.75
<i>Lacibacter</i>	0.75
<i>Niastella</i>	0.75
<i>Paenibacillus</i>	0.75
<i>Sanguibacter</i>	0.75
<i>Solirubrobacter</i>	0.75
<i>Taibaiella</i>	0.75
<i>Terrabacter</i>	0.75
<i>Veillonella</i>	0.75
<i>Xanthomonas</i>	0.75
<i>Acinetobacter</i>	0.5
<i>Alcaligenes</i>	0.5
<i>Algoriphagus</i>	0.5
<i>Blautia</i>	0.5
<i>Cellulomonas</i>	0.5
<i>Cellvibrio</i>	0.5
<i>Chryseolinea</i>	0.5
<i>Cytophaga</i>	0.5
<i>Delftia</i>	0.5
<i>Dongia</i>	0.5
<i>filifactor</i>	0.5
<i>Geodermatophilus</i>	0.5
<i>Glycomyces</i>	0.5
<i>Gp3</i>	0.5
<i>Gp5</i>	0.5
<i>Hyphomicrobium</i>	0.5
<i>Kallotenue</i>	0.5
<i>Kytococcus</i>	0.5
<i>Lactococcus</i>	0.5

<i>Luteibacter</i>	0.5
<i>Lysinibacillus</i>	0.5
<i>Meiothermus</i>	0.5
<i>Microbacterium</i>	0.5
<i>Oxalicibacterium</i>	0.5
<i>Phycococcus</i>	0.5
<i>Prostheco bacter</i>	0.5
<i>Raoultella</i>	0.5
<i>Sphingopyxis</i>	0.5
<i>Terriglobus</i>	0.5
<i>Thauera</i>	0.5
<i>Achromobacter</i>	0.25
<i>Amycolatopsis</i>	0.25
<i>Aquicella</i>	0.25
<i>Aquipuribacter</i>	0.25
<i>Armatimonas / Armatimonadetes_gp1</i>	0.25
<i>Bacillariophyta</i>	0.25
<i>Bacillus</i>	0.25
<i>Bacteriovorax</i>	0.25
<i>Blastocatella</i>	0.25
<i>Blastococcus</i>	0.25
<i>Buttiauxella</i>	0.25
<i>Candidatus Koribacter</i>	0.25
<i>Catenulispora</i>	0.25
<i>Collinsella</i>	0.25
<i>Gemmata</i>	0.25
<i>Gp20</i>	0.25
<i>Gp25</i>	0.25
<i>Hermiimonas</i>	0.25
<i>Jatrophihabitans</i>	0.25
<i>Lentzea</i>	0.25
<i>Luteococcus</i>	0.25
<i>Methylophilus</i>	0.25
<i>Methylotenera</i>	0.25
<i>Micrococcus</i>	0.25
<i>modestobacter</i>	0.25
<i>Moheibacter</i>	0.25
<i>Neorhizobium</i>	0.25
<i>Nitrosospira</i>	0.25
<i>Paracoccus</i>	0.25
<i>Pedomicrobium</i>	0.25
<i>Peredibacter</i>	0.25

<i>Pigmentiphaga</i>	0.25
<i>Povalibacter</i>	0.25
<i>Pusillimonas</i>	0.25
<i>Rhodoferax</i>	0.25
<i>Rufibacter</i>	0.25
<i>Schlesneria</i>	0.25
<i>Sediminibacterium</i>	0.25
<i>Sphaerochaeta</i>	0.25
<i>Tardiphaga</i>	0.25
<i>Vulcaniibacterium</i>	0.25
<i>Zavarzinella</i>	0.25

Anexo 6 Análisis de suelos, caracterización del suelo alto andinos donde crecen la Ccera (*Lupinus alopecuroides*).

Solicitante : VIANE MARYTRINI MEJIA HUARANCA

Departamento : HUANCAVELICA

Provincia : CASTROVIRREYNA

Distrito : H.R. 62645-020C-

Predio :

Referencia : 18

Fact.: 2449

Fecha : 02/03/2018

Número de Muestra	Claves	C.E.		Análisis Mecánico				Clase	CIC	Cationes Cambiables						Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases		
		pH (1:1)	dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm			Arena %	Limo %	Arcilla %	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺				Na ⁺	Al ⁺³ + H ⁺
	0.20-0.40cm	5,96	0,10	0,00	8,53	18,3	368	60	30	10	Fr.A.	29,12	13,60	2,07	0,81	0,15	0,05	16,67	16,62	57

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Número de Muestra

Claves	Pb	Cd	Cr
	ppm	ppm	ppm
0.20-0.40cm	68,97	1,35	13,05

Dr. Sady García Bendezú
Jefe del Laboratorio

Anexo 7. Análisis foliar de la Ccera (*Lupinus alopecuroides*).

FECHA : 09/03/2018

N.	CLAVE DE	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Zn	Cu	Mn	Fe	B	M.S.
Lab.	CAMPO	%	%	%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%
919		4,47	0,28	2,29	1,30	0,36	0,17	0,02	30	5	55	302	36	19,50

N.	CLAVE DE	Pb	Cd	Cr
Lab.	CAMPO	ppm	ppm	ppm
919		3,19	0,49	4,54

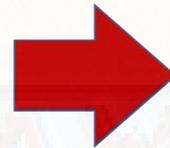
Dr. Sady García Bendezú

Jefe de Laboratorio

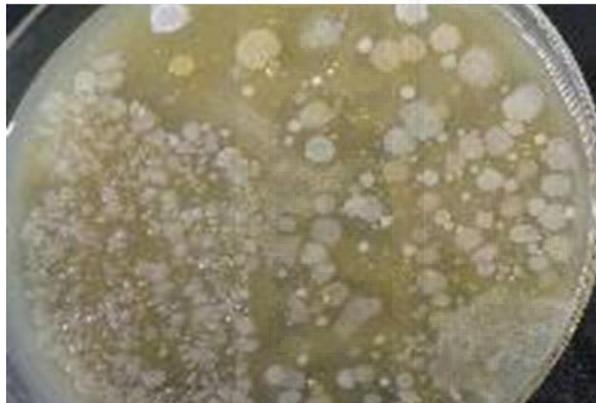
Anexo 8. Esterilización de nódulos y aislamiento de sus endosimbiontes.



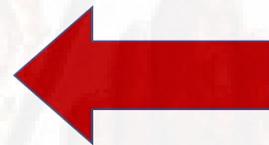
ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE NÓDULOS



NÓDULOS SUPERFICIALMENTE ESTÉRILES

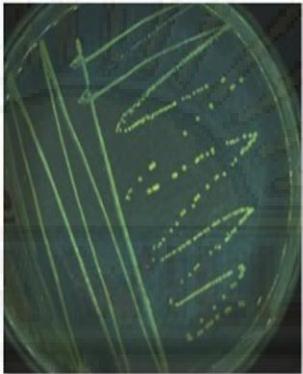


CRECIMIENTO DE DIFERENTES COLONIAS



AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESDE LOS NÓDULOS

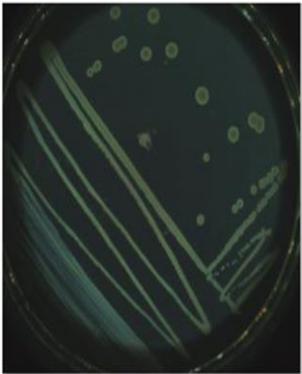
Anexo 9. Proceso de purificación de aislados bacterianos.



M10



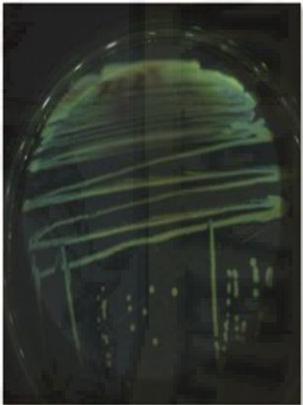
M12



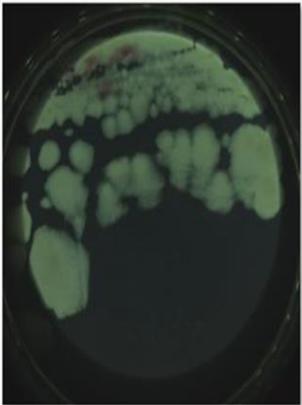
M13



M14



M15

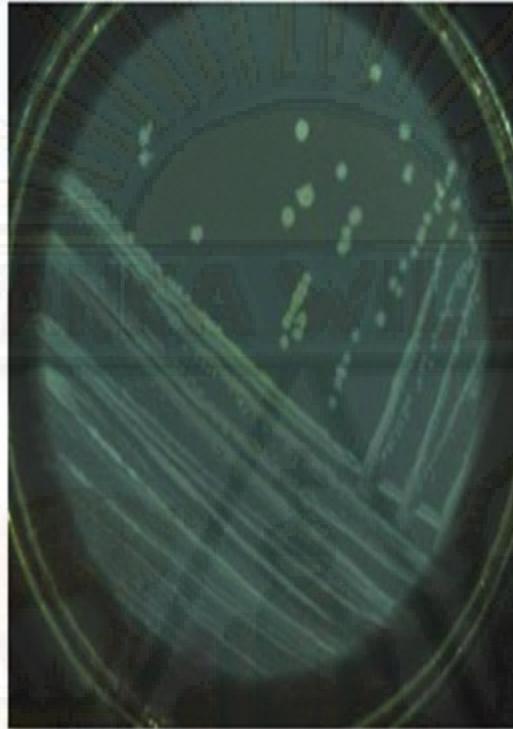


M16

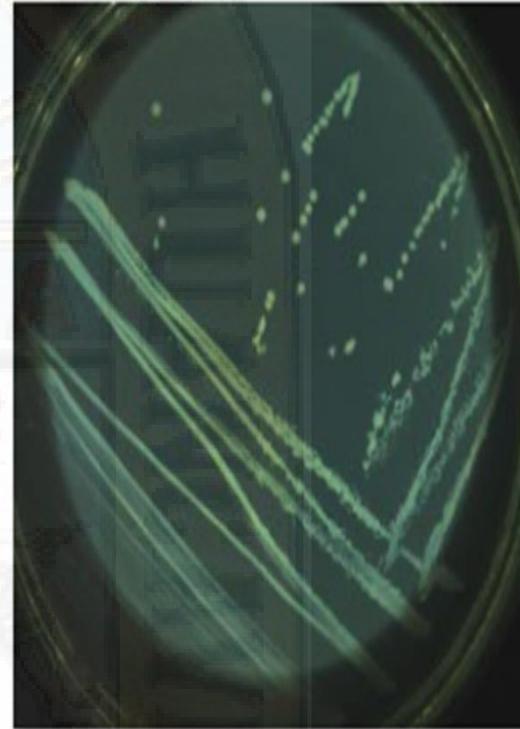
Anexo 10. *Bradyrhizobium* sp. Aislados del *Lupinus alopecuroides*.



V18



V21



V26

**Identificación de rizobios aislados de nódulos de *Lupinus alopecuroides*. Crecidas en zonas alto andinas de
Castrovirreyna-Huancavelica**

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>General El tarwi es una leguminosa andina cuyo cultivo y uso requieren ser revalorados por su fácil adaptación a suelos circunstanciales, tiene tolerancia al estrés hídrico y su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en el suelo, que es ideal para sistemas de cultivos agroecológicos u orgánicos.</p>	<p>General Evaluar las bacterias endosimbióticas de los nódulos radicales de <i>Lupinus alopecuroides</i> crecidas en las zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica.</p>	<p>Los rizobios endosimbiontes aislados de nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i>, crecidas en zonas las alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica y evaluadas mediante el gen 16S rRNA, corresponden al género Bradyrhizobium.</p>	<p>Variable N° 1: Nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i> crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica.</p>	<p>Se estableció en el Método Científico y se utilizaron como técnicas lógicas de inducción y deducción, empleando metodologías descritas por Arone (2012) y Talbi (2011). Tipo de investigación Es de tipo aplicada su propósito fundamental es contribuir con el restablecimiento de la fertilidad natural de las chacras en la región, por tanto, contribuirá en el ahorro de energía fósil (petróleo), así como también en la reducción de la contaminación del medio ambiente. Nivel de investigación El nivel de investigación es descriptiva, orientada a la caracterización de los rizobios endosimbiontes en nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i>.</p>
<p>Específicos ¿Qué especie de rizobios es el endosimbionte de <i>Lupinus alopecuroides</i> crecidas en zonas alto andinas de Castrovirreyna-Huancavelica?</p>	<p>Específicos ❖ Aislar los rizobios de nódulos radicales de <i>Lupinus alopecuroides</i>. ❖ identificar las bacterias endosimbióticas de nódulos radicales de <i>Lupinus alopecuroides</i> mediante el gen 16S rRNA.</p>		<p>Variable N° 2: Rizobios localizadas en los nódulos de <i>Lupinus alopecuroides</i></p>	

