**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIAS**

**PROYECTO DE INVESTIGACION**

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de rhizobios que nodulan *Vicia faba* L. habas y *Pisum sativum* L. arveja

Pedro Lezama Asencio

Trujillo – Perú

Junio 2020

**A. DATOS GENERALES**

# 1. Título o nombre del proyecto

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de rhizobios que nodulan *Vicia faba* L. “habas” y *Pisum sativum* L. “arveja”.

**2. Línea de investigación** Biotecnología **3. Unidad académica**

Departamento Académico de Ciencias

# 4. Equipo investigador

*Dr. Pedro Bernardo Lezama Asencio*

*Ms. Manuel Hidalgo Rodríguez*

Departamento Académico de Ciencias, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo Perú

*Tesista de Ingenieria Agrónoma*

Estudiante de Ingeniería Agrónoma, UPAO

# Personal Colaborador externo

*Mg. Renzo Valdez Núñez*

Universidad Nacional de Barranca. Lima

Dr. José Gómez Carrión

Laboratorio de Simbiosis Vegetal, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

Dr. Gaston Zolla

Universidad Nacional Agraria, La Molina Lima

Dra. Julia Amaya de Guerra

Laboratorio de Sanidad Vegetal, Trujillo

# 5. Institución y/o lugar donde se ejecutará el proyecto

Universidad Antenor Orrego de Trujillo: Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular,

Universidad Nacional de Barranca, Lima

Laboratorio de Simbiosis Vegetal, UNMSM- Lima

Laboratorio de Sanidad Vegetal. Trujillo

# 6. Duración (Fecha de inicio y término)

12 meses

Inicio: octubre 2020

Término: octubre 2021

**B: PLAN DE INVESTIGACIÓN**

# 1. Planteamiento y formulación del problema

Uno de los problemas de interés mundial en la actualidad es la pérdida de la fertilidad y erosión de los suelos, dando lugar al desarrollo de nuevas tecnologías agroecológicas como alternativas para el manejo de plagas, enfermedades, conservación de la biodiversidad y recursos naturales, y sobre todo lograr incremento en la productividad de los cultivos (Torres, et. al, 2018), preocupación que también ha sido asumido por la OMS - FAO con la finalidad de combatir la desnutrición mundial y disminuir la contaminación ambiental.

Dado la sobrepoblación mundial, todos los países se han visto en la necesidad de producir más para evitar el hambre. Sin embargo, trajo consigo el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y pesticidas, afectando no solamente a la sustentabilidad del suelo sino también han desencadenado impactos negativos sobre el ambiente, la salud humana, además de incrementar los costos de producción especialmente en los pequeños agricultores. Frente a ello está emergiendo el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que favorecen la agricultura por su capacidad de inducir la producción de fitohormonas y nutrientes vegetales, ayudan a la movilización de compuestos insolubles en el suelo, confiere mayor estabilidad en situaciones de estrés ambiental, y actúa como defensa frente a la variabilidad de patógenos vegetales; y sobre todo pueden aplicarse como biofertilizantes contribuyendo con ello al desarrollo de una agricultura sustentable (Sharma, et al., 2019)

El Perú no puede ser ajeno a este desarrollo tecnológico, sobre todo por su potencial al estar ubicado entre los 10 países megadiversos del planeta porque es repositorio de alta diversidad de climas y piso ecológicos, especies, recursos genéticos y culturas donde aún se practica una real agricultura orgánica (SINIA, 2018)

Una alternativa a las inquietudes mundiales es incrementar la productividad aprovechando distintos factores, entre ellos la diversidad vegetal, ya que contamos con la mayoría de familias vegetales entre las que destacan las legumbres pertenecientes a la familia Fabaceae, como fuente de proteínas, fibras, antioxidantes; y más aún por su capacidad de fijar nitrógeno en sus diversas formas, destacando la simbiosis con bacterias fijadoras de Nitrógeno, aunque lo hacen también en asociación o con bacterias de vida libre (Niham, & Xaxlo, 2017), que con un adecuado manejo se puede obtener ventajas para lograr una mejor producción y sobre todo a bajo costo porque los requerimientos de fertilizantes sería menor, aliviando con ello la contaminación que generan los fertilizantes químicos, y así permitir la recuperación de los suelos, y el desarrollo de una agricultura sustentable orgánica o natural (Gauri et al., 2011), puesto que también participan en procesos de eliminación de metales pesados como el cadmio (Li, 2018)

Pese a las ventajas mostradas anteriormente, emerge uno de los problemas típicos de nuestra agricultura; el no conocer aún el real potencial microbiológico para las leguminosas, incluyendo bacterias, hongos micorrícicos, solos o en asociación (Mohameda, 2019), quizá por el vasto número de especies de leguminosas (aproximadamente 1000), su comportamiento particular que paulatinamente se ha demostrado desde tiempos atrás (Eggum et al., 1993); y muchas de ellas son de gran importancia para la nutrición animal y humana como *Phaseolus vulgaris* “frejol”; *Lens culinaris* “lenteja serrana, *Cicer arietinum* “garbanzo, *Cajanus cajam* “frejol de palo”, *Pisum sativun* “arveja” y *Vicia fava* “haba”; más aun no poseen compuestos antagónicas, como las lectinas e inhibidores de proteasas o sus niveles son más bajas incluso que las de la soya (Brebaum & Boland, 1995).

Hasta ahora, las bacterias más estudiadas e incluidas dentro de las PGPR son las del, orden Rhizobiales, aunque en los últimos años, su clasificación taxonómica ha sufrido cambios sustanciales debido a la adición de nuevos géneros y especies empleando la taxonomía polifásica que incluye no solo caracteres fenotípicos sino también la tecnología molecular (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014).

Se debe resaltar que la simbiosis rizobios-leguminosas se establecen gracias a la interacción bioquímica y molecular, existiendo especificidad a nivel de la especie e incluso varietal, lo cual incluye receptores y moléculas señal altamente interrelacionadas (Manvika & Bhavdish, 2006), y a través de dichos estudios se han sinonimizado los nombres científicos de varias especies, así como se han añadido nuevas especies (Peix, et al. 2015)

El estudio de las Fabaceae en nuestro país, sus simbiontes e interacciones han recibido poca atención a lo largo de la historia de la domesticación de las plantas; mucho menos para un uso industrial; particularmente las habas y arvejas; que pese a su gran potencial nutritivo, la cantidad de área sembrada es cada vez menor basado en su poca producción y requerimiento de fertilizantes químicos. Sin embargo, en ellas viven microorganismos simbióticos capaces de fijar Nitrógeno atmosférico, por lo que urge caracterizar a dichos microrganismos de manera morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular, no solamente para contribuir al mejor conocimiento taxonómico de estos simbiontes sino aplicarlo posteriormente a los terrenos de cultivo en nuestro país a fin de mejorarlos y lograr una mayor productividad en el marco de una agricultura sustentable y así preservar nuestro ecosistema disminuyendo la desertificación y salinización (Mosbah, 2017).

La rizosfera y bacterias asociadas a ella son componentes clave de los microbiomas vegetales y van a mejorar la productividad del cultivo mientras se optimiza el uso de fertilizantes, agua y pesticidas como un reto continuo en la producción agrícola. En este contexto, las interacciones entre los cultivos y microorganismos son importantes para mejorar la sanidad vegetal, absorción de nutrientes, control de enfermedades y resistencia al estrés. En agricultura sostenible, es importante investigar la diversidad bacteriana en las diferentes especies vegetales y de qué manera los factores edáficos influyen sobre el microbioma bacteriano (Cordero, et al. 2020).

Con las consideraciones anteriores, se ha planteado el siguiente problema: ¿Cuáles son las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de las especies de rhizobios que nodulan a *Pisum sativum* y *Vicia faba*?

# 2. Antecedentes del problema

Las bacterias fijadoras de Nitrógeno en simbiosis con las leguminosas pertenecen al grupo de las α- y β-proteobacteria denominados en general rizobios, cuya clasificación inicial se basó en inoculaciones cruzadas en las plantas hospederas, reconociéndose solo dos grupos basado en su crecimiento: rápido y lento, acordes con su tiempo generacional en medios de cultivo, pero había inconsistencias obligando a crear nuevos métodos como estudios de su morfología serología, hibridizaciones RNA/DNA or DNA/DNA, análisis de plásmidos; dando lugar a estudios fenotípicos y bioquímicos (Rao, 2018), y desde 1888 hasta 1929 ya se habían reconocido seis especies, todos del único género Rhizobium : *R. leguminosarum, R. trifolii, R.phaseoli, R. meliloti, R. japonicum* y *R. lupini* . (Wei, et al. 2003).

Producto del avance de la biología molecular y bioinformática, hasta febrero del 2014 se habían identificado 13 géneros y 98 especies empleando la taxonomía polifásica (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014), para seguir adicionando incluso especies propios de la Clase *β-proteobacteria* y algunas de *γ-proteobacteria* incrementándose en el 2016 hasta 148 especies (Mousavi,. 2016); y cada año se describen nuevas sea silvestres, por fusión o separación de taxa basados principalmente en estudios moleculares, que ha demostrado la existencia de transferencia horizontal de genes entre los géneros clásicos *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, o *Bradyrhizobium* (Weir, 2016), demostrado en España al caracterizar por electroforesis de RNA de bajo peso molecular aislados rhizobiales de *Phaseolus vulgaris,*  donde identificaron a las especies *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and bv. trifolii, and *Sinorhizobium fredii* (Velásquez, et al. 2001).

Para *Bradyrhizobium*  se tiene ya alrededor de 50 especies descritas pero se estima que deben tener aproximadamente 750 a 800, como se puede observar en el último análisis de la secuencia de los genes glnll y recA y el genoma completo de este genero disponible en la base de datos (Kalita et al. 2020).

Se han estudiado la simbiosis en diversos cultivos, por ejemplo en Europa, en la especie introducida de Norte América *Robinia pseudoacaci*.se identificó a los generos *Mesorhizobium* y *Rhizobium,* aunque algunos genotipos quedaron sin identificar. (Ulrich & Zaspel, 2000). Así mismo al estudiar los rhizobios de *Cicer arietinum* (garbanzo) utilizando 28 aislados rizobiales nativos demostraron adaptaciones de estos aislados a condiciones abióticas de estrés tal como calor y salinidad; pero manteniendo una eficiente tasa de fijación de nitrógeno y contribuyendo a la solubilización de fosfato del suelo, confiriéndole potencial inoculante a las tres especies de *Mezorhizobium* (Rai, et al. 2012).

Otros estudios más avanzados se dedican a investigar la filogenia, habiéndose evaluado por ejemplo a los *Bradyrhizobium* que nodulan especies silvestres de lupinos del Viejo y Nuevo mundo, empleando técnicas de PCR y secuenciamiento de genes Nod y housekeeping; que nodulan lupinos silvestres; ubicando a la mayoría del Nuevo Mundo dentro del linaje de *Bradyrhizobium japonicum*, mientras las europeas están asociadas con *Bradyrhizobium canariense*, resultados similares fueron obtenidos en Polonia analizando los genes housekeeping (AtpD, glnII y recA) y el gen específico nodA, (Stepkowski, et al.; 2011); y en terrenos de áreas xerofíticos de Asia, Africa y América se han identificado probablemente especies de *Ensifer* (*Sinorhizobium*); aunque se requieren nuevos estudios a nivel molecular y de esa manera aclarar su interacción simbiótica (Le Quére, et al., 2017)

Existen investigaciones a nivel mundial de en *Vicia faba* “habas”, pero pocas en el Perú pese a estar entre los tres primeros países productores de esta leguminosa. Uno de las primeras adiciones a la única identificada hasta ese momento *Rhizobium leguminosarum* bv vicieae fue la propuesta de una nueva especie *Rhizobium fabae* sp. nov que nodulaba a las raíces de haba, previa caracterización morfológica, bioquímica, fisiológica y molecular en muestras aisladas en cultivos de la China, la misma que fue aceptada como especie válida (Tian, et.al., 2008); y en Etiopía se aislaron y caracterizaron especies nativas que nodulaban a las habas tolerantes a condiciones salinas, superando inclusive el 2% de Cloruro de Sodio (Keneni, et. al., 2010).

A partir de investigaciones colaborativas y de muestras aisladas de suelos peruanos, españoles y tunecinos se propuso una nueva especie *Rhizobium laguerreae* sp. nov. basado en estudios fenotípicos y moleculares que también nodulaba raíces de haba (Saidi, et. al., 2014).

En arveja se ha trabajado poco con *Rhizobium*, más bien destacan trabajos con *Micronospora pisi* sp. nov. caracterizados a través de estudios polifásicos y con secuenciación de RNA16s (García, et. al., 2010); y a partir de muestras de suelos españoles, se propuso tres nuevas especies: *Micromonospora ureilytica* sp. nov*., Micromonospora noduli* sp. nov. y *Micromonospora vinacea* sp. nov. (Carro, et al., 2016), incluso algunas aun no identificadas que podrían ser también especies nuevas, evidenciando lo mucho que falta por investigar en este campo (Carro, et. al. 2018).

En nuestro país no se ha podido determinar investigaciones sobre interacción rizobio arveja, salvo la de Moreno et. al (2016), quienes evaluaron nódulos colectados en los departamentos de la Libertad, Lambayeque, Cajamarca y Lima, confirmando su capacidad nodulativa en aproximadamente un 40%, y también evaluaron la frecuencia de la eficiencia en la nodulación de ese porcentaje, encontrando alta y baja velocidad de nodulación.

Algunas especies de *Rhizobium* como *R. anhuiense* pueden nodular de manera efectiva tanto a *Vicia fava* “habas” como a *Pisum sativum* “arvejas”, la misma que ha sido demostrada en muestras colectadas y analizadas en la China a través de estudios filogenéticos empleando análisis de RNAr 16s y genes housekeeping. Así mismo, al efectuar pruebas de nodulación cruzada fueron infectivos en *Phaseolus vulgaris* “frejol” pero no en *Glycine max* “soya”, *Arachis hipogea* “maní”, *Medicago sativa* “alfalfa, *Trifolium repens* “trébol” (Zhang, et.al, 2015)

# 3. Justificación del problema

Es necesario conocer a las especies que interaccionan entre si dado que han evolucionado de manera paralela y específica durante la simbiosis porque estudios recientes indican interacción ligando-receptor para el logro y éxito de la comunicación intercelular entre el vegetal y su correspondiente simbionte (Sharma, et. al., 2019) entonces al lograr la caracterización de los rizobios que nodulan en habas y arvejas lo podemos analizar desde distintos puntos:

**Científico**: conociendo con certeza las especies que interaccionan y al tener escasos trabajos en esta área será un aporte para los estudios taxonómicos tanto bacterianos como vegetales; más aún, de acuerdo a los antecedentes se vienen descubriendo cada vez nuevas especies, y basándonos en la megadiversidad del país es una oportunidad para la búsqueda de nuevo conocimiento; y con ello contribuir a los estudios filogenéticos y posteriormente de metagenómica del suelo, propiciando futuros trabajos colaborativos con entidades internacionales, ya que en el equipo de trabajo contamos con ellos y es necesario demostrarlo por medio de los trabajos realizados en la universidad

**Aplicación biotecnológica**: Las especies propuestas dado su ubicación taxonómica como Fabaceae son una fuente de proteínas y fibras, la primera para tratar de ayudar a combatir la desnutrición que aqueja a una buena parte de nuestra población, incluida incluso en la política de gobierno; y como fibra porque está demostrado que previenen el cáncer al colon que está incrementándose cada día en la población, consumida ya sea en forma inmadura o seca. Por lo que una correcta identificación taxonómica permitirá proponer su uso como fertilizante dado su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, disminuyendo con ello el uso de fertilizantes químicos que salinizan y deterioran al suelo, más aún si se considera su potencial para eliminar metales pesados y residuos de pesticidas, indudablemente motivos de otras investigaciones a fin de lograr el desarrollo de una adecuada y eficiente agricultura sustentable

**Perspectivas:** al estar aprobado la realización de la III etapa del Proyecto de irrigación Chavimochic, pertenecer a una zona de gran actividad agroindustrial y con alto potencial de agroexportación de cultivos naturales u orgánicos, uno de los roles de las universidades es realizar investigaciones para solucionar los problemas que aquejan a la sociedad, por ello los resultados de esta investigación pueden ser empleados como puntos de partida para investigaciones aplicadas, como determinación de la cantidad de nitrógeno fijado por estas especies vegetales, emplearlas como rotación .de cultivos, entre otras.

# 4. Objetivos

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Objetivo General** | **Resultados finales** | **Medios de verificación** |
| Caracterizar morfológica, bioquímica y molecularmente a los rizobios que nodulan especies de *Vicia faba* y *Pisum sativum*. | Diferenciar morfológica, bioquímica y molecularmente a los rizobios nodulantes de las especies de *Vicia faba* y *Pisum sativum*. | Informe Parcial  Informe Final |
| **Objetivos Especificos** | **Resultados finales** | **Medios de verificación** |
| Usar los parámetros estandarizados para determinar las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de los rizobios que nodulan especies de *Vicia faba* y *Pisum sativum*. | Comparar morfológica, bioquímica y molecularmente a los rizobios que nodulan especies de *Vicia faba* y *Pisum sativum*. | Cuadros con los datos de los parámetros estandarizados estudiados |
| Elaborar matrices de datos con los parámetros evaluados empleando el Software NTsys para la agrupación UPGM de los caracteres determinados de los rizobios estudiados | Obtener las agrupaciones de semejanza de las especies usando NTsys | Presentación de dendrogramas obtenidos |
| Analizar los cluster obtenidos del análisis UPGMA para evaluación de los rizobios estudiados | Interpretar la distancia entre los árboles obtenidos al aplicar el UPGMA | Presentación de árboles individuales y de consenso usando el software NTsys |

# 5. Marco teórico

Todas las plantas emplean Nitrógeno en forma NO3- y NH4+ constituyéndose en un elemento imperativo para un adecuado crecimiento y desarrollo vegetal, ya que incrementa su productividad al desempeñar roles fundamentales en las funciones bioquímicas y fisiológicas, requiriendo en promedio 1000 ug por K de materia seca. Aproximadamente entre 78% – 79% de Nitrógeno está disponible en la atmosfera en forma de N2, pero no es aprovechable por las plantas, porque no pueden absorberlos directamente, entonces el hombre emplea nitrógeno industrial para la fertilización de sus terrenos (Leghari, et. al., 2016)

Su disponibilidad en los suelos esta disminuida por los procesos de nitrificación, desnitrificación, lixiviación, volatización y a diferencia de otros nutrientes no puede ser reemplazado por la descomposición de las rocas o partículas del suelo, pero puede incorporarse al suelo por fenómenos físicos como las radiaciones ionizantes, descargas eléctricas, precipitaciones y principalmente por el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), a través de algunas bacterias y hongos (Leghari, et. al., 2016)

Para estos últimos, se han reportado números especies bacterianas asociadas a diferentes hospederos, aunque podría estar subestimado porque muchas de ellas no pueden ser cultivadas en laboratorio (Rosner, 2014), recurriéndose actualmente a estudios moleculares como la metagenómica que ha permitido aclarar el rol de los microorganismos en la evolución animal, vegetal y economía ambiental (Jansson & Hofmockel, 2018).

Estos microorganismos se encuentran sobre la superficie de organismos multicelulares y sus fluidos (exosimbiontes), así como dentro de las plantas (endosimbiontes); pero esta asociación no es un evento al azar sino controlado por reglas de ensamblaje específicas, incluyendo tipo de suelo, compartimento vegetal, especie/genotipo del huésped, sistema inmune vegetal, estadio de desarrollo de la planta, estación del año (Hassani, et. al., 2018); permitiendo con ello el establecimiento de nuevas interrelaciones específicas en la red trófica, aunque también la misma especie puede cumplir más de un rol (Hemlata, et al. 2015),

La rizósfera es una zona del suelo que rodea a las raíces y está influenciada por el sistema radicular (Hartmann, et al. 2008); y comparado con la zona adyacente, ésta es rica en nutrientes debido a la acumulación de una variedad de compuestos orgánicos liberados por las raíces a través de exudación, secreción y rizodeposición; que pueden ser usados por los microorganismos como fuente de Carbono y energía; por ello la actividad microbiana en esta zona es muy intensa, sirviendo como hospedero a una gran variedad de bacterias asociadas denominadas rizobacterias; que influyen positivamente en el crecimiento vegetal por lo que se les denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR); aunque también mejoran la productividad, y en los últimos años ha cobrado más auge puesto que, se persigue el desarrollo de una agricultura sustentable, con menor uso de fertilizantes sintéticos y pesticidas; promoviéndose por el contrario el uso de productos orgánicos e inoculantes microbianos (Hemlata, et. al. 2015)

Las PGPR incluyen muchos géneros bacterianos, número que se incrementa cada día gracias a herramientas moleculares para su identificación; ellas estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal de manera continua porque la mayor parte de su ciclo vital permanecen asociadas a la rizosfera (Pandey, et. al., 2012); actualmente, dado sus bondades muchos de ellos son comercializadas, por ejemplo especies de *Agrobacterium, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Delfitia, Paenibacillus macerans, Pantoea agglomerans, Pseudomonas, Serratia, Rhizobium, Bradyrhizobium* y *micorrizas* (Glick, 2012) .Estas interrelaciones puede estar restringida a la rizosfera (colonizan rizosfera, rizoplano, espacios intercelulares superficiales o capas muertas de células radiculares) o ser endofiticas, ocupando el espacio apoplástico con o sin formación de estructuras especializadas como los nódulos (Hemlata, et. al., 2015)

Se han postulado diversas maneras de clasificación de las PGPR (Glick, 2012); la más aceptada es aquella que considera: 1) extracelulares (e-PGPR), limitado al rizoplano, y 2) intracelulares (i-PGPR) que incluye a las bacterias que colonizan los espacios entre las células de la corteza radicular o en estructuras nodulares especializadas (Ashraf, et. al., 2013)

Las PGPR favorecen el crecimiento vegetal de manera directa o indirecta; aunque existe solapamiento entre ellas; los primeros incluyen mejora en la disponibilidad de nutrientes para el vegetal; por ejemplo, a través de la **fijación de Nitrógeno atmosférico**, producción de sideroforos quelantes de hierro, mineralización de materia orgánica, facilitando la utilización de Nitrógeno, Azufre, Fósforo; solubilización del fosfato; así como la producción de hormonas de crecimiento vegetal y reguladoras del estrés como 1-aminociclopropano-1-carboxilate (ACC) desaminasa; y entre los indirectos se incluyen inhibición de los microrganismos que tienen efecto negativo sobre la planta (por exclusion de nicho), por ejemplo hidrolisis de moléculas liberadas por los patógenos, síntesis de enzimas que hidrolizan la pared de los hongos, síntesis de HCN; mejora para efectuar simbiosis con rizobacterias y/o micorrizas, y control de insectos o enfermedades (Das, et. al., 2013)

Los rizobios más conocidos como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son considerados recursos biológicos porque habitan en las Fabaceae que son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y sobre todo están distribuidas en distintos ecosistemas; razón por la cual solo se han investigado los microsimbiontes de un pequeño número de ellas; y cada año se van incorporando nuevos género y/o especies (Clements, 2014).

El uso de técnicas de biología molecular provee una descripción más precisa para las especies, entre ellos el análisis de secuencias de los genes 16S rRNA se viene usando como unos de los principales criterios para la descripción de géneros y especies de rhizobios, considerándose que las cepas cuya secuencia del gen 16S rRNA son similares en un 97%, pertenecen probablemente a la misma especie, aunque dado que éste gen está muy conservado entre todos los organismos vivos, no permite distinguir las especies cercanamente relacionadas (Stepkowski, et. al., 2011).

La interacción leguminosas - rhizobios en los últimos años está siendo objeto de numerosos estudios porque es fuente de aproximadamente el 60% de la FBN a nivel mundial, proveyendo a estas plantas y a otros cultivos una fuente de nitrógeno ilimitada y renovable, estimándose que mediante esta asociación son fijadas anualmente entre 40 y 60 millones de toneladas de N, lo cual significa alrededor de U$S 10 -15 billones ahorrados anualmente en fertilizantes (Beker, 2010).

Para lograra una simbiosis adecuada se debe caracterizar las etapas de la interacción plantas-microorganismos; considerando el establecimiento de una especial relación y preferencial entre cepas de la misma región geográfica por lo que es indispensable una adecuada ubicación taxonómica tanto del vegetal como de la bacteria, a fin de repetir los mismos o usarlas para investigaciones futuras.

**6. Hipótesis**

Implícito

# 7. Metodología

**Material de estudio:**

* Nódulos bacterianos colectados en los departamentos de Ancash y La Libertad a partir de raíces de *Vicia faba* “habas” y *Pisum sativum* “alverja”
* Cepas patrón ATCCde especies tipos de rizobios

# Medios de cultivo

* Agar Manitol Levadura (YMA)
* Agar TSI
* Caldo Manitol levadura
* Agar Muller-Hinton

# Reactivos para los ensayos Bioquímicos y moleculares

* Kit de extracción de DNA
* Kit MyTaq DNA polimerasa
* DNA ladder
* Kit dNTP Mix
* Cloruro de Magnesio solución para DNApol
* Buffer TBE 10X
* Blue Green Loading Dye
* Primers

# Otros materiales

* Bolsas Ziploc
* Placas Petri
* Tubos de ensayo 130x100 con tapa
* Tubos de ensayo 130 x 100 sin tapa
* Tubos de Eppendorf 2 mL
* Tubos de Eppendorf 5 mL

**Métodos y técnicas.**

# Colección de nódulos bacterianos

* Los nódulos bacterianos serán colectados en la provincia de Corongo - Ancash, y en la provincia de Otuzco y Julcan, Departamento de La Libertad; empleando las técnicas estándares internacionales, para luego ser trasladadas al laboratorio empleando silicagel como indicador de humedad

# Manejo de las bacterias

* Se emplearán los procedimientos ya estandarizados (Vincent, 1970) y actualizados para el realizar el aislamiento, tipificación, purificación y mantenimiento del cepario; empleando el medio de cultivo agar YMA y caldo YMA de manera separada para cada entrada y repiques sucesivos para los mismos, evaluando cada 15 días sus características culturales, entre ellos su viabilidad
* Con los aislados ya purificados se efectuarán los ensayos morfológicos, bioquímicos y moleculares

# Ensayos Morfológicos

* En campo se analizarán los nódulos: tamaño, forma, posición en la raíz, ornamentaciones y presencia de Leg Hemoglobina
* En laboratorio, los nódulos serán esterilizados con etanol, agua oxigenada al 30 % y bicloruro de mercurio. Serán sembrados en medio YMA empleando como indicador Rojo Congo, y en las colonias se evaluarán, su forma, color, textura, cantidad de goma, apariencia, tamaño, elevación, margen

# Ensayos Bioquímicos

* Se emplearán las colonias desarrolladas en el medio YMA, en ella se analizarán:
* Reacción frente a la Catalasa
* Reacción Oxidasa frente al Reactivo de Kovac´s
* Producción de acidez o basicidad con indicadores azul de bromotimol y bromofenol
* Producción de ketolactosa, con púrpura de bromocresol
* Crecimiento a diferentes concentraciones de salinidad en porcentaje: 1, 2, 3, 4, 5
* Resistencia a los antibióticos: se empleará el Test de Kirby Bauer para evaluar a los antibióticos, estreptomicina, Kanamicina, Acido Nalidíxico, Cloranenicol, y Tetraciclina
* Evaluación de crecimiento en distintas fuentes carbonadas; se emplearán: maltosa, sacarosa, lactosa, xilosa, fructosa
* Ensayos enzimáticos, las bacterias serán cultivas en medio Triptona extracto de levadura y a partir de ella se evaluarán los perfiles electroforéticos de las principales vías metabólicas implicadas en el metabolismo de las cepas aisladas de los nódulos de *Lupinus*, empleando las enzimas: Isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42), Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), L-alanina deshidrogenasa (EC 1.4.1.1), Glutamato deshidrogenasa (EC 1.1.1.46), Fosfoglucomutasa (EC 2.7.6.1), Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.38), empleando como patron de comparación cepas ATCC de *Rhizobium, Bradyrhizobium*, obtenidas del CIAT – Colombia y/o Universidad de Varsovia. Para los corridos se emplearán los buffers: Tris borato pH 8.2, Tris-citrato pH 7.5, Tris-citrato pH 8.0, Tris acetato pH 7.5 según corresponda y los procedimientos estándar ya establecidos (Martínez, et. al. 2002)

**Ensayos moleculares**

* Extracción del DNA a partir del cultivo microbiano empleando el Kit correspondiente
* Purificación del DNA obtenido con los kits adecuados
* Amplificación de genes 16s RNA, empelando los dNTP y primer según las indicaciones del laboratorio que provee los reactivos
* Análisis de los genes

Las etapas anteriores se realizarán de acuerdo a las indicaciones específicas de los proveedores de material de investigación

# Análisis estadístico

La matriz de datos se construirá empleando NEDIT del software NTSys 2.2. A partir de dicha matriz se calculará la similitud entre especies bacterianas usando la opción SIMQUAL y el coeficiente de Simple Match Coefficient (SMC); para luego hacer el cluster analysis a través del análisis UPGMA; mediante la opción SAHN CLUSTERING; y con la opción TREE DISPLAY se visualizarán los agrupamientos o relaciones entre cepas, generándose el fenograma (dendrograma) independiente y de consenso; de cuyo análisis obtendremos la caracterización de las cepas de rhizobios

# 8. Bibliografía

Ashraf, M.A., Asif, M., Zaheer, A., Malik, A., Ali, Q., Rasool, M., 2013. Plant growth promoting rhizobacteria & sustainable agriculture: a review. Afr. J. Microbiol. Res. 7: 704 – 709

Berrada, H. & Fikri-Benbrahim, K. 2014. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Rhizobia Isolated from Meknes-tafilalet Soils and Study of Their Ability to Nodulate *Bituminaria bituminosa. British Microbiology Research Journal 4(4): 405-417, 2014*

Brebaum, S. & Boland, G.J. 1995. Sweet white lupin - a potential crop for Ontario. Canadian Journal of Plant Science, 75: 841-849

Clements, J.; R. Galek; B. Kpsak, D. Michalczyk, A. Iwona; C. Lak.; et al. 2014. Diversity of Selected Lupinus angustifolius L. Genotypes at the Phenotypic and DNA Level with Respect to Microscopic Seed Coat Structure and Thickness.. Plose One. 9(8) e102874. Disponible en URL [www.plosone.orgSetiembre](http://www.plosone.orgsetiembre/) 2014

Cordero, J.; De Freitas, R., Germida, J. 2020. Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada . J. Microbiol. 66: 71–85 (2020) dx.doi.org/10.1139/cjm-2019-0330

Das, A.J., Kumar, M., Kumar, R., 2013. Plant growth promoting PGPR: an alternative of chemical fertilizer for sustainable environment friendly agriculture. Res. J. Agric. Forest. Sci. 1: 21–23.

.

Eggum, B.O., Tomes, G., Beames, R.M. & Datta, F.U., 1993. Protein and energy evaluation with rats of seed from 11 lupin cultivars. Animal Feed Science and Technology, 43: 109-119

Gauri, A.K., Bhatt R.P.; Pant S.; Bedi M.K. y Naglot A. 2011. Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of Trifolium alexandrinum, Journal of Agricultural Technology: 7(6): 1705-1723.

Glick, B.R., 2012. Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica 1–15

Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant Soil 312, 7–14.

Hassani, A.; Duran, P.; Hacquard. 2018. Microbial interactions within the plant Holobiont. M;icrobiome. 6: 58. DOI <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>

Hemlata C.; Bagyaraja, D.; Selvakumarb, G.; Sundaramc. 2015 Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. Applied Soil Ecology 95: 38 – 53

Jansson, J & Hofmockel, K. 2018 The soil microbiome - from metagenomics to metaphenomics. Current Opinion in Microbiology. 43:162 - 168

Kalita, M., Małek, W. Coutinho. T. 2020. Putative novel Bradyrhizobium and Phyllobacterium species isolated from root nodules of Chamaecytisus ruthenicus. Systematic and Applied Microbiology 43 (2020) 126056

Le Quére, A.; Tak, N.; Singh, H.; Lavire, C.; Meyer, T.; Chapulliot, D. 2017. Genomic characterization of Ensifer aridi, aproposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC Genomics: 18(85): 1-24 DOI 10.1186/s12864-016-3447-

Manvika, S. & Bhavdish, N., 2006.Taxonomy of rhizobia: Current status CURRENT SCIENCE, 90(4): 4 – 25

Mosbah, M.; Taieb, T. y Habib, K. 2017. Status and Need of Research on Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Leguminous Plants in Saudi Arabia AJ Current Microbiology. 5(1): 1 – 8 disponible en URL: http: //www.ivyunion.org

Mousavi, S. 2016. Revised taxonomy of the family Rhizobiaceae, and phylogeny of mesorhizobia nodulating Glycyrrhiza spp. Thesys pH. Univerity of Helsinsky. Disponible en URL <http://ethesis.helsinki.fi/>

Niham, S. & Xaxlo, P. 2017. Isolation, Biochemical characterization and Metabolic fingerprinting of rhizobium from root nodules of clitoriaternatea. IJABFP. 8(1):19-30

Pandey, P., Bisht, S., Sood, A., Sharma, G.D., Maheshwari, D.K., 2012. Consortium of plant-growth-promoting bacteria: future perspective in agriculture. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 185–200.

Peix, A.; Ramirez, M.H.; Flores, J.; De la Vega, P.; Rivas, R.; Mateos, P. et al. 2015. Revision of the taxonomic status of the species Rhizobium lupini and reclassification as Bradyrhizobium lupini comb. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol 65, 1213–1219

Rai, R.; P. Trilochan; A. Singg. 2012. Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. Indian Journal of Experimental Biology. 50: 340 - 350

Rosner JL. 2014. Ten times more microbial cells than body cells in humans? Microbe 9:47. <http://dx.doi.org/10.1128/microbe.9.47.2>

Stępkowski, T.; Żak, M.; Moulin, L.; Króliczak, J.; Golińska, B.; Narożna, D.; Safronova, V.I.; Mądrzak, C.J. 2011. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst. Appl. Microbiol. 34*(5): 368-375.

Thompson, J. 2003. The coevolutionary Process. Chicago University Press. USA: 59-105

Ulrich, A. & Zaspel, I.. 2000. Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating *Robinia pseudoacacia* L. Microbiology. 146: 2997 - 3005

Velasquez, E, ; Martínez-Romero; E. Rodríguez, D. Trujillo, Daza., A.; Mateos, P.. 2001. Characterization of Rhizobial Isolates of *Phaseolus vulgaris* by Staircase Electrophoresis of Low-Molecular-Weight RNA.. 67(2): 1008 – 1010

Vincent J. .1975. Manual Práctico de Rhizobiología. Edit. Hemisferio Sur. Argentina. 165 pp.

Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E, Wang, E. T., Han, S. Z., y Chen, W. X. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2219-2230.

# C: CRONOGRAMA DE INVESTIGACIÓN

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| AÑO  MES  ACTIVIDADES | **2020** | | | **2021** | | | | | | | | | |
| **O** | **N** | **D** | **E** | **F** | **M** | **A** | **M** | **J** | **J** | **A** | **S** | **O** |
| Investigación bibliográfica y planificación | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |  |  |  |
| Colección de nódulos bacterianos | X | X |  | X | X |  | X | X |  | X |  |  |  |
| Mantenimiento de cepas bacterianas | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |  |  |
| Ensayos Morfológicos |  |  | X | X | X |  | X | X | X | X |  |  |  |
| Ensayos Bioquímicos |  | X | X |  | X | X |  | X | X |  | X |  |  |
| Ensayos moleculares |  |  |  |  |  |  | X | X | X | X | X |  |  |
| Análisis de datos |  |  |  |  |  |  | X | X | X | X | X | X |  |
| Informe Parcial |  |  |  |  |  |  | X |  |  |  |  |  |  |
| Informe Final |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | X |

D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO

|  |  |
| --- | --- |
| Partida presupuestaria | Monto (S/.) |
| 1. Equipos y bienes duraderos | 00.00 |
| 2. Recursos humanos | 00.00 |
| **3. Materiales e insumos** | **16 024** |
| **4. Pasajes y viáticos** | **2 976** |
| **5. Servicios tecnológicos** | **1 000** |
| **TOTAL** | **20 000.00** |

# CUADRO Nº 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Equipos y bienes duraderos** | **Especificaciones técnicas** | **Proforma (fecha)** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

# CUADRO Nº 2: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre** | **Escuela o Unidad a la que pertenece** | **% de dedicación** | **Honorario mensual** | **Nº de meses** | **Costo total S/.** |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

# CUADRO Nº 3: Material e insumos (adjuntar proformas)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo**  **unitario (S/.)** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **CEPAS PATRON** |  |  |  |
| Cepas ATCC de rhizobios | 100 | 6 unid | 600 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
| **REACTIVOS PARA ENSAYOS BIOQUIMICOS MOLECULARES** |  |  |  |
| Blue Green Loading dye | 240 | 1 | 240 |
| Kit dNTP Mix | 300 | 1 | 300 |
| Kit HyperLadder | 330 | 2 | 660 |
| Primer DNA | 150 | 8 | 1200 |
| Buffer TBE 10X | 83 | 3 | 249 |
| Kiy Mytaq DNA polimerase | 660 | 1 | 660 |
| MgCl2 solución | 250 | 2 | 500 |
| Kit Nucleo Spin Microbial DNA | 5015 | 1 | 5015 |
| Kit Nucelo Spin RNA Plant and Fungi | 6600 | 1 | 6600 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
| **TOTAL** |  |  | **16 024.00** |

# CUADRO Nº 4: Pasajes y viáticos

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Pasajes ida y vuelta en ómnibus a las ciudades más cercanos a lugares de colección | 200 Soles/ para dos personas | 4 viajes/2 personas | 800.00 |
| Transporte desde las ciudades a los lugares de colección en campo, principalmente por acémilas | 220 soles/02 unid./dia | 4 viajes/2 dias c/u | 1760.00 |
| Alimentación | 52 soles/ día para dos personas | 08 dias, equivale a dos salidas/4 salidas | 416.00 |
| **TOTAL** |  |  | **2976.00** |

# CUADRO Nº 5: Servicios tecnológicos

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Análisis especializado en laboratorio externo | 100.00 | 10 | 1000.00 |
| Software |  |  |  |
|  |  |  |  |
| **TOTAL** |  |  | **1000.00** |

# FORMATO 2

**DECLARACION JURADA DE COMPROMISO Y AUTENTICIDAD DEL PROYECTO**

**(SOLO PARA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Trujillo, 05 de junio. del 2020

**Señor Doctor**

**Luis Cerna Bazán**

**Vicerrector de Investigación**

**Presente.-**

De mi consideración:

El suscrito docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento Académico de Ciencias, identificado con DNI N° 17932896. y domicilio en Ortega y Gasset 343, DECLARO BAJO JURAMENTO mi compromiso de participar como Investigador Principal y **responsable** del proyecto de investigación titulado Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de especies de rizobios que nodulan *Vicia faba* L. habas y *Pisum sativum* L. arveja, el cual es **ORIGINAL Y AUTENTICO** y está enmarcado en las áreas académicas y líneas de investigación priorizadas por la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,

----------------------------------------------------

PEDRO BERNARDO LEZAMA ASENCIO

DNI N° 17932896

DOCENTE