

## **TÍTULO DEL PROYECTO**

Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rhizobios que nodulan especies de Lupinus L.

## **SIGLAS**

RHIZLUP

## **TIPO DE PROYECTO**

Basica

## **LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

Biodiversidad y botánica sistemática

## **DURACIÓN ESTIMADA**

Fecha de inicio: 01/06/2017 Fecha de término: 31/05/2018

## **PARTICIPANTES**

- LEZAMA ASENSIO PEDRO BERNARDO (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000000214
- LEZAMA ESCOBEDO MARTHA KARINA (COLABORADOR) — 000035855
- CANCINO PADILLA ANTONIO ABDIAS (ESTUDIANTE) — 000167243

## **INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE**

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (Departamento Academico de Ciencias)

## **I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los rhizobios son un grupo parafilético, en su mayoría ubicados taxonómicamente en el orden Rhizobiales, aunque pueden presentarse en otros ordenes (Weir, 2006). En los últimos años, la clasificación de estos microorganismos ha sufrido cambios sustanciales debido a la adición de nuevos géneros y especies (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014), ya que inicialmente la ubicación taxonómica se basó en caracteres únicamente fenotípicos, pero actualmente el uso de la taxonomía polifásica, ha revolucionado considerablemente la clasificación de microorganismos, sobre todo por el empleo de diferentes técnicas moleculares, principalmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuya aplicación se optimiza desde inicios de los 90s (Graham et al., 1991).

El establecimiento de simbiosis rhizobios-leguminosas, es un proceso de 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).

Las Fabaceae son la tercera familia más grande en las plantas con flores, siendo una de sus particularidades su capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias fijadoras de Nitrógeno (Niham, & Xaxlo, 2017), lo cual le confiere ventajas para una mejor producción y a bajo costo

porque reduce los requerimientos de fertilizantes nitrogenados; y sobre todo con menor contaminación ambiental (Gauri et al., 2011).

El Perú un país megadiverso, con aproximadamente 1000 especies de leguminosas, y muchas de ellas establecen simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno; pero no se conoce con certeza la especie de dichos microorganismos; tal como sucede con el género *Lupinus*, cuyas especies comestibles tienen semillas que contienen más del 40% de proteínas y con menos sustancias antagónicas para el organismo que cualquier otra leguminosa, como sucede con las lectinas e inhibidores de proteasas (Eggum et al., 1993); tampoco factores antinutricionales, o sus niveles son más bajas, tales como, inhibidores de tripsina, ácido fítico, taninos, saponinas, por lo cual puede ser incorporado a los alimentos, con ventajas incluso en relación a la soya (Brebaum & Boland, 1995).

Sabemos que en la atmosfera la cantidad de oxígeno es alta (97%), pero no está disponible para las plantas, salvo aquellas que tienen la capacidad de fijarlas; razón por la cual en diversos países se está investigado las especies nodulantes en diversas leguminosas de interés económico como el género *Lupinus*, con aproximadamente 200 kg/ha (Kurlovich, et al., 2002). Sin embargo, en nuestro país muy poco se ha investigado al respecto, por lo que urge estudiar la diversidad genética de estas especies y/o cepas, y en la literatura revisada para el género *Lupinus*, no se ha encontrado mayormente trabajos al respecto, salvo el estudio de especies de este género vegetal colectadas en la provincia de Corongo, Ancash (Lezama, 2010) y su relación con sus simbioses para estudios sistemáticos y taxonómicos (Lezama, et. al, 2014).

A nivel mundial, las especies de rhizobios que nodulan *Lupinus* hasta ahora descritas están sufriendo cambios por la incorporación a su estudio de nuevas propiedades fisiológicas, bioquímicas y moleculares, lo cual ha permitido sinonimizar diversas cepas, así como la propuesta y creación de nuevas taxa, basado en estudios taxonómicos polifásicos; sobre todo al revisar especies vegetales que tiene hábitats diversos y sujetos a diferentes formas de presión ambiental (Peix, et al. 2015).

Por lo anterior, es fundamental realizar investigaciones polifásica de los rhizobios que nodulan especies de *Lupinus*, sustentado en una inicial caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica, para luego continuar a nivel molecular, no solamente para contribuir al mejor conocimiento de la taxonomía de estos simbioses en nuestro país al permitirnos la identificación de especies; sino también para fomentar o propiciar su empleo posterior para el logro de una agricultura sustentable; considerando que el uso de los simbioses asociados a sus leguminosas correspondientes puede ser útil para preservar el frágil ecosistema y combatir la desertificación; siendo para ello imperioso identificar asociaciones rhizobio - leguminosa, aunque sería ideal incluir también otros microorganismos como las micorrizas, que permitirían una restauración ideal del ecosistema y sobre todo el manejo de una agricultura sostenible bajo condiciones desfavorables como el estrés producido por salinidad y pH de los suelos, sequias y calor

(Mosbah, 2017).

Con las consideraciones anteriores, se ha planteado el siguiente problema: ¿Cuáles son las características morfológicas y bioquímicas de las cepas de rhizobios que nodulan a especies del género *Lupinus* spp.?

## II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Los estudios taxonómicos de los rhizobios nodulantes de leguminosas se inicia en el año 1888, cuando Beijerinck obtuvo por primera vez un cultivo bacteriano puro y a la bacteria le denominó *Bacillus radicicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados bacterianos debido que tenían características diferentes acorde con el huésped del que se obtenían. Hasta 1929 ya se habían reconocido seis especies: *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. (Wei, et al. 2003).

Estudios posteriores demuestran que la nodulación bacteriana cruzaba las fronteras de las diferentes especies, por lo que se sugiere no solamente considerar al huésped al que nodulan sino basarse en resultados de la taxonomía numérica, evaluando sus tasas de crecimiento, flagelos, reacciones acidez/alcalinidad en medio agar manitol levadura (YMA), originándose con ello dos grupos (Wang, & Martinez 2007).

Por los 1980s se combinan los métodos tradicionales con los de la Biología Molecular, tal como hibridación ADN-ADN y rRNA-ADN; dividiéndose a los rhizobios en base a dichos resultados en dos géneros: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, El primero considerado de crecimiento rápidos (< tres días), en el cual se incluyeron tres especies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* y *R. loti*. *R. leguminosarum* con tres biovars; el bv. *viciae* que antes era la especie *R. leguminosarum*; bv. *Phaseoli* que era *R. phaseoli*; y bv. *trifolii* anteriormente denominada *R. trifolii*. Las tres biovars constituyen el mismo grupo en taxonomía numérica y en hibridación ADN-ADN, pero corresponden a diferentes grupos de nodulación cruzada (Jordan, 1982).

A partir de los 90s la taxonomía de estas bacterias fijadoras de nitrógeno (FBN) sufre cambios gracias al desarrollo acelerado y paralelo de las técnicas moleculares y la bioinformática, de tal manera que se vienen describiendo nuevos géneros y especies. Estudios actuales demuestran la existencia de una gran diversidad entre estas bacterias aisladas de las Fabaceae (leguminosas); reconociéndose hasta febrero del 2014 un aproximado de 98 especies pertenecientes a 14 géneros de rhizobios, destacando aquellas que realizan simbiosis, tales como: *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella* (Clase -*proteobacteria*); *Burkholderia*, *Cupriavidus*, (anteriormente *Ralstonia*) de la Clase -*proteobacteria*

y algunas formas de *-proteobacteria* (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014) , e incrementándose hasta 148 especies en el 2016 (Mousavi, S. 2016); por lo que las investigaciones últimas están orientadas no solamente a la identificación de bacterias; sino su aplicación posterior en especies vegetales de importancia agrícola, que permitiría un adecuado manejo de la FBN y con menores costos de producción (Stepkowski, 2007).

En España, se han caracterizado aislados rizobiales nodulantes de *Phaseolus vulgaris*, empleando electroforesis de RNA de bajo peso molecular, concluyendo que se han identificado probablemente a las especies *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and bv. *trifolii*, and *Sinorhizobium fredii*, y dado la existencia de cruzamientos interespecíficos se debe confirmar con otras técnicas moleculares (Velásquez, et al. 2001).

En la China se han tipificado a los rhizobios aislados de nódulos de los géneros *Astragalus* y *Lespedeza*, empleando métodos de taxonomía numérica, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), secuenciación de genes RNAr 16S amplificado or PCR, contenido de G+C del DNA, hibridación DNA–DNA, y nodulación cruzada con especies seleccionadas de las leguminosas; determinando que con la taxonomía numérica se generaban dos clusters pero con una similitud del 82%, y en ambos se ubicaban rhizobios de *Astragalus* y *Lespedeza*; y con hibridación DNA-DNA el grado de similitud fue mayor en el cluster 2. Lo anterior más el análisis filogenético permitió establecer que uno de los cluster estaba relacionado con *Rhizobium galegae* and *Rhizobium huautlense*; y del análisis integrado plantean la existencia de una nueva especie *.Rhizobium loessense* sp. nov. (Wei, et al.; 2003).

En Europa, la especie introducida de Norte América *Robinia pseudoacacia* se emplea para la forestación; sin embargo, había dificultad en su desarrollo por lo que se sospecha que podría deberse a los simbioses que tiene; por ello se aislaron 17 cepas rizobiales las que fueron examinadas fenotípicamente y caracterizadas por análisis rDNA 16S, encontrándose que presentaban nueve genotipos. Los análisis demostraron que el 76 % de los mismos pertenecía al género *Mesorhizobium* y 24 % a *Rhizobium*. Para el primero se identificaron *M. amorphae*, *M. loti*, *M. huakuii*; y en el segundo *R. leguminosarum* y *R.tropici*; sin embargo, dos genotipos quedaron sin identificar. Concluyen que en esta especie vegetal, sus simbioses tienen alta diversidad filogenética y ello sería la razón para que esta especie tenga éxito como árbol pionero para la forestación, pese a no ser nativo y puede cultivarse en cualquier tipo de suelo (Ulrich & Zaspel, 2000).

En Morocco se han estudiado la biodiversidad de cepas rizobiales que nodulaban *Cicer arietinum* L. utilizando marcadores fenotípicos como diversas fuentes carbonadas, resistencia a antibióticos y metales pesados, tolerancia a la salinidad y pH. Además se empleó RFLP de rDNA 16S amplificado por PCR, usando cepas referenciales. Del análisis de los resultados concluyen que la mayoría de las cepas pertenecen al género *Mesorhizobium*; sin embargo, una cepa a

Sinorhizobium, constituyéndose en el primer reporte para esta especie vegetal (Maallah, et al. 2002).

En la India, para caracterizar a los rizobios de *Cicer arietinum* (garbanzo) se emplearon técnicas fenotípicas y moleculares, utilizando 28 aislados rizobiales nativos, obtenidos de la región peninsular y norte de la India. Los patrones fenotípicos demostraron adaptaciones de estos aislados a condiciones abióticas de estrés tal como calor y salinidad; dos ellos fueron tolerantes a 1,5% de concentración de NaCl manteniendo una eficiente tasa de fijación de nitrógeno; dos cepas con una tasa de solubilización de fosfato de 66.7 y 71 ug/ml; que fueron considerados como potenciales para producción de inoculantes. El perfil molecular RFLP determinó la existencia de tres cluster con un porcentaje de similaridad del 67%; las que posteriormente fueron analizados filogenéticamente; concluyendo que garbanzo era nodulado por tres especies de *Mezorhizobium*; 46% de ellas agrupadas en *M. loti*; y las otras identificadas como *M. ciceri* y *M. mediterraneum*, curiosamente solo éstas dos últimas habían sido consideradas como específicas para *Cicer arietinum* en la India (Rai, et al. 2012).

Asimismo, aplicando análisis filogenético multilocus se ha tratado de elucidar los orígenes de *Serradella* y cepas de *Bradyrhizobium* en lupinos que persisten en suelos de la parte occidental de Australia y Sud Africa. Las cepas nativas seleccionadas provenientes de diferentes cluster DNA (RAPD) –PCR, eran distintas de las inoculadas. El análisis filogenético efectuado con genes de la nodulación (*nodA*, *nodZ*, *nodL*, *noel*), los housekeeping (*dnaK*, *recA*, *glnII*, *atpD*), y secuencias de transcrito intergenico rRNA 16S-23S, demostraron que *Serradella* y *Lupinus cosentinii* se encontraban entremezcladas probablemente por hibridación con cepas de *Bradyrhizobium canariense*; estos datos soportan la idea que las cepas de ambas especies vegetales, incluyendo las formas no cultivadas de Australia y Sud Africa se originaron bajo la influencia de especies transportadas accidentalmente de otras partes de Europa, dándole mayor capacidad para soportar pH ácido (Stepkowski, et al., 2005).

Se ha evaluado filogenéticamente 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; la mayoría del Nuevo Mundo pertenecen al linaje de *Bradyrhizobium japonicum* incluyendo el de la muestra proveniente de Perú; mientras las europeas están asociadas con *Bradyrhizobium canariense*, pero se sospecha que probablemente otras leguminosas no del género *Lupinus* han contribuido también a la diversidad en las especies bacterianas (Stepkowski, et al., 2007).

Investigaciones realizadas en Polonia, para rizobios de *Lupinus* empleando tres genes housekeeping (*AtpD*, *glnII* y *recA*) y el gen específico *nodA*, han encontrado nodulación por *Bradyrhizobium canariense* y *B. japonicum* (Stepkowski, et al.; 2011).

El estudio de estas bacterias fijadoras de nitrógeno en muestras aisladas a partir de diversas

especies vegetales de áreas cálidas y xerofíticas de Asia, África y América, han permitido identificar probablemente nuevas especies de *Ensifer* (*Sinorhizobium*); aunque se requieren estudios a nivel de genoma; porque sus requerimientos de fuente carbonada en el medio de cultivo son específicos o compartidos, requiriéndose por ello nuevos estudios para establecer y aclarar su interacción simbiótica (Le Quére, et al., 2017).

En México, se ha evaluado la estructura genética de tres especies de *Bradyrhizobium* aislados de *Lupinus* (*Lupinus campestris*, *Lupinus montanus*, y *Lupinus exaltatus*). De los 41 aislados, se diferenciaron 18 tipos electroforéticos (ETs) por electroforesis enzimática multilocus, de 5 enzimas metabólicas. Los resultados indican que hubo una gran diversidad genética y la mayor parte de aislados (63%) pertenecían a dos clusters y fueron aislados de los nódulos de *L. montanus* y *L. campestris*, y solo un cluster fue aislado frecuentemente de *L. exaltatus*. El análisis enzimático y la secuencia rRNA 16S permiten concluir que las cepas bacterianas están altamente relacionadas con *Bradyrhizobium japonicum* (Barrera, et al; 1997).

En Brasil, investigaciones en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) han demostrado que es una especie promiscua al nodular con diversas cepas microbianas, aunque se siguen descubriendo cepas con mayor capacidad de FBN, o incluso propuestas como nuevas especies como *Rhizobium paranenze* en base a estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, que lo hacen diferentes a los ya conocidos (Fuzinato, et. al., 2014).

En el Perú se ha demostrado la capacidad de *Rhizobium* para estimular la germinación de la semilla y promover el crecimiento vegetal en tomate (Santillana, et al., 2005); aunque sin precisar la especie; al igual que la evaluación de la infectividad y efectividad de *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. en *Phaseolus lunatus* “pallar” encontrando variabilidad en los parámetros evaluados (Matos & Zúñiga, 2002).

En la revisión de la literatura sobre los simbioses de *Lupinus*, para el Perú existen muy pocos reportes; salvo el determinado por caracteres fenotípicos de rhizobios obtenidas de especies de *Lupinus* colectadas en el norte del departamento de Ancash; donde se llegó a determinar dos cluster por el método UPGM pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium*, y *Bradyrhizobium* sin determinar la especie y/o cepa (Lezama, 2010)

### **III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)**

La importancia de una adecuada caracterización de bacterias que nodulan especies de lupinos se puede enfocar desde diversos puntos de vista; por ejemplo:

**Científico:** una adecuada caracterización de las bacterias será un parámetro más que permitirá

identificarlo con mayor certeza, determinando las especies nodulantes de lupinos; y considerando que hasta la fecha no tenemos trabajos de esta naturaleza será un aporte al conocimiento científico de la taxonomía de los rhizobios en el país y el mundo.

Así mismo, actualmente a nivel mundial se está tratando de reconstruir la filogenia de las especies de *Lupinus* y un parámetro es la caracterización de sus especies simbiotes; por lo que una taxonomía correcta de ellas contribuiría a este objetivo, que permitiría trabajos posteriores con entidades internacionales.

**Aplicación biotecnológica:** Perú es un país megadiverso, y pese a ello aún tenemos graves problemas de desnutrición proteica; y *Lupinus* es un cultivo alternativo dado su capacidad de producir y almacenar proteínas en sus semillas. Si sabemos que existe coevolución entre la planta y el microorganismo (Thompson, 2003), es posible que, conociendo las especies, a futuro podemos evaluar su capacidad de fijar nitrógeno y transferirlo a las especies cultivadas para lograr una mejor eficiencia en la tasa de FBN y por lo tanto mayor producción proteica y a menor costo; lo cual a su vez contribuiría al logro de una agricultura sustentable; porque estudios bioquímicos y moleculares están determinando que algunas especies de leguminosas son promiscuas, es decir establecen simbiosis con más de un género o cepa bacteriana; de allí la importancia de su caracterización para un adecuado manejo y utilización en campo agronómico (Andrews & Andrews, 2016).

**Perspectivas:** considerando que nuestro país es una zona eminentemente agrícola, y tenemos la Escuela de Ingeniería Agrónoma en la Universidad; los datos obtenidos en este proyecto, con investigaciones posteriores permitirían determinar la especie o cepa microbiana que tiene mayor eficiencia en la Fijación Biológica de Nitrógeno; lo cual serviría para incorporarlo a Programas de mejoramiento de leguminosas, particularmente del género *Lupinus* y con ello aprovechar de manera eficaz sus potencialidades nutricionales, y etnofarmacológicas.

#### IV. OBJETIVOS

Objetivo General	Resultados finales	Medios de verificación
Caracterizar morfológica y bioquímicamente cepas de rhizobios que nodulan especies de <i>Lupinus</i> spp.	Diferenciar morfológica y bioquímicamente cepas de rhizobios nodulantes de las especies de <i>Lupinus</i> estudiados	Informe Parcial Informe Final

Objetivos Especificos	Resultados finales	Medios de verificación
Usar los parámetros estandarizados para determinar las características morfológicas y bioquímicas de las cepas de rhizobios que nodulan especies de <i>Lupinus</i> spp	Comparar morfológica y bioquímicamente las cepas que nodula a <i>Lupinus</i> spp	Cuadros con los datos de los parámetros estandarizados estudiados
Elaborar la matriz de datos con los parámetros evaluados empleando el Software NTsys para la agrupación UPGM de los caracteres determinados de cepas de rhizobios que nodulan especies de <i>Lupinus</i> spp	Obtener las agrupaciones de semejanza de las especies usando NTsys	Presentación de dendrogramas obtenidos
Analizar los cluster obtenidos del análisis UPGMA para identificación a las cepas de rhizobios que nodulan especies de <i>Lupinus</i> spp	Interpretar la distancia entre los árboles obtenidos al aplicar el UPGMA	Presentación de árboles individuales y de consenso usando el software NTsys

## V. MARCO TEÓRICO

Las plantas para su nutrición requieren nitrógeno como macronutriente, pero pese a su abundancia en la atmósfera (78%), en los suelos tropicales y subtropicales es deficitaria su disponibilidad debido a los procesos de nitrificación, desnitrificación, lixiviación (Larcher, 1995), y volatilización de amonio (Soule & Piper, 1994); 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 (Dixon & Wheeler, 1993); y sobre todo por el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), a través de algunas bacterias y hongos (Mohr & Schopfer, 1995), ya sea en forma libre como *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter* spp., *Oscillatoria* spp, *Nostoc* spp.,

*Anabaena spp.*; o simbióticamente como es el caso de la Familia Leguminosae con bacterias Gram negativas del orden Rhizobiales (Larcher, W., 1995); los cuales presentan una gran variedad de cepas y estirpes (Weir, 2006); pero altamente especializadas, por ello la taxonomía actual de los rhizobios se base en un enfoque polifásico que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras, confiriéndole a la taxonomía una base más natural y confiable (Wang & Martínez, 2007).

Los rhizobios son bacterias Gram negativas capaces de inducir la formación de nódulos en raíces de leguminosas, y habitualmente separados en dos cluster cercanos a *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* respectivamente, pero las investigaciones indican que se puede manipular a los genes de estas bacterias para una mejor simbiosis y expresión génica de sus enzimas responsables de la fijación de nitrógeno (Shoukry, et al, 2013).

Se estima que los rhizobios no conocidos en el mundo representan un recurso biológico porque las Fabaceae al poseer alrededor de 750 géneros y más de 20,000 especies (ILDIS, 2007), 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).

Actualmente, en relación al género *Lupinus*; tienen mayor importancia económica *L. mutabilis* en America y *Lupinus luteus* en Europa y Australia, sobre todo por amplitud en su área de cultivo, fructificación estacional, y sus propiedades físico químicas analizadas (Clements, 2014). En nuestro país tenemos casi 200 especies de *Lupinus*, en su mayoría silvestres (Bracko & Zarucchi, 1973) dado la coevolución interespecífica con sus rhizobios (Thompson, 2003) servirían como una fuente de genes para el mejoramiento en la tasa de FBN; para lo cual es fundamental conocer a la especie bacteriana que lo nodula (Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014); siendo preciso para ello el uso integrado de técnicas fenotípicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares (Wang & Martínez, 2007).

El análisis de proteínas totales en electroforesis en una dimensión permite agrupar a los rhizobios con base en las similitudes de los patrones. Generalmente, los grupos definidos por esta técnica están relacionados con aquellos que se pueden distinguir por su similitud de ADN-ADN o por patrones de enzimas metabólicas; y la determinación de polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción (RFLP) para revelar la diversidad genética entre grupos de cepas bacterianas, incluye la digestión del ADN total, la separación del ADN digerido por electroforesis y la hibridación de los patrones de restricción con un detector específico de un gen o unos genes, aunque también se pueden digerir productos sintetizados por PCR y analizar los RFLP directamente por electroforesis, permitiendo caracterizar a los genes 16S rRNA amplificados por PCR o ADN del espacio intergénico (Wang & Martínez, 2007).

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 uno de los principales criterios para la descripción de géneros y especies de rizobios, 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 (Stepkouski, 2005); por lo que se hace necesario emplear otras técnicas como hibridación DNA-DNA, que se sustenta en la capacidad de desnaturalización del DNA frente a altas temperaturas y de reasociarse a temperaturas menores (Wang & Martínez, 2007).

La interacción mutualista entre las leguminosas y los rizobios ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos 40 años, ya que este proceso es responsable de aproximadamente el 60% de la FBN mundial, y provee 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\$ 10 billones ahorrados anualmente en fertilizantes (Beker, 2010).

*Phaseolus vulgaris* (frejol) es una de las legumbres más estudiadas por su capacidad de fijar nitrógeno dado su distribución y uso mundial, por lo que a través de estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, así como análisis de genes *recA*, *gyrB* y *rpoA*, hibridación DNA-DNA se está caracterizando a sus simbioses, habiéndose establecido que pueden también nodular a *Leucaena leucocephala* y *Leucaena esculenta*, aunque sin la eficiencia en la tasa de FBN; debido a que las plantas, en contacto con los rizobios compatibles, responden a través de una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares, las mismas que pueden separarse espacial y temporalmente, pero en forma coordinada. Los eventos más tempranos se producen en la epidermis de las células, donde son evidentes cambios en la morfología del pelo radical. Paralelamente, en el córtex, se activa la división celular que dará lugar al primordio de nódulo que alojará las bacterias que logran invadir las células de las plantas (Beker, 2010)

Las leguminosas liberan a la rizósfera moléculas que actúan como quimioattractantes bacterianos. Entre estos exudados se encuentran flavonoides y no-flavonoides que incluyen a betaínas y ácidos aldónicos, cuyo espectro depende de la especie del vegetal, su estado fisiológico y edad; en respuesta a ello los rizobios sintetizan moléculas señal denominados factores de nodulación (Factor *nod factor*) estableciendo una interacción específica, garantizando que la planta hospedadora sólo permita la simbiosis con el rizobio compatible (Spaink, 2000).

Según las consideraciones de simbiosis, es necesario caracterizar las etapas de la interacción entre las plantas y las cepas de rizobios; considerando que se establece una relación preferencial entre cepas de la misma región geográfica y mucho más para establecer su relación filogenética, 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; (Aguilar, 2006).; pero no puede dejarse de lado de ninguna manera los caracteres fenotípicos de la

taxonomía numérica, porque si bien los géneros de rizobios se definen teniendo como base la filogenia de los genes 16S rRNA, cada género tiene otras características distintivas (Wang & Martínez, 2007)

## **VI. HIPÓTESIS**

Implícito

## **VII. METODOLOGÍA**

### **Material de estudio:**

Especies de *Lupinus* colectados en los departamentos de Ancash y La Libertad

- *Lupinus mutabilis*
- *Lupinus weberbaueri*
- *Lupinus paniculatus*

### **Cepas de estudio**

- Cepas colectadas de los lupinos
- Cepas patrón ATCC de especies tipos de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*

### **Medios de cultivo**

- Bacto agar
- Agar Manitol Levadura (YMA)
- Agar TSI
- Agar triptona levadura
- Agar glucosa peptona
- Agar levadura lactosa
- Agar almidón

- Medio triptona extracto de levadura
- Medio M9 Salt minimal 5x

### **Reactivos para los ensayos Bioquímicos: Fuentes de carbohidratos**

- Glucosa
- Lactosa
- Sacarosa
- Maltosa
- Xilosa
- Fructosa

### **Reactivos para los ensayos Bioquímicos: Electroforesis**

- Isocitrato deshidrogenasa (1.1.1.42)
- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (1.1.1.49)
- L-alanina deshidrogenasa (1.4.1.1)
- Glutamato deshidrogenasa (1.1.1.46),
- Fosfoglucomutasa (2.7.6.1)
- Malato deshidrogenasa (1.1.1.38),
- Tris borato pH 8.2.
- Tris-citrato pH 7.5
- Tris-citrato pH 8.0
- Tris acetato pH 7.5
- Cloruro de sodio

## **Indicadores, antibióticos y otros**

- Azul de bromotimol
- Azul de bromofenol
- Purpura de bromocresol
- Rojo de congo
- Peptona
- Reactivo de Kovac's
- Estreptomina
- Kanamicina
- Acido Nalidixico
- Tetraciclina
- Cloranfenicol
- Silicagel con indicador de humedad

## **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**

Las muestras botánicas serán colectadas en la provincia de Corongo - Ancash, y en la provincia de Otuzco y Julcan, Departamento de La Libertad; empleando las técnicas estándares internacionales, las mismas que serán prensadas para luego ser identificadas en el HAO, Museo USM y/o enviando las muestras a los especialistas

De las muestras colectadas se extraerán los nódulos bacterianos, se colocarán en bolsas ziploc conteniendo silicagel para su traslado al laboratorio

### **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 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 la cepa ya purificada se efectuarán los ensayos morfológicos y bioquímicos

### **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 QP, agua oxigenada al 30 % y bicloruro de mercurio. Serán sembrados en medio YMA empleando Rojo Congo como indicador y en las colonias se evaluarán, su forma, color, textura, cantidad de goma, apariencia, tamaño, elevación y 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: 0.5, 2, 3, 4 5

**Resistencia a los antibióticos:** se empleará el Test de Kirby Bauer para evaluar a los antibióticos, estreptomina, Kanamicina, Acido Nalidíxico, Cloranenicol, y Tetraciclina

**Evaluación de crecimiento en distintas fuentes carbonadas;** para ello solamente se reemplazará el manitol, que es el azúcar ideal de crecimiento por: maltosa, sacarosa, lactosa, xilosa, fructosa

**Ensayos enzimáticos,** las bacterias serán cultivadas 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 patrón 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 (Martinez, et. al. 2002)

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, O.M., López, M.V. Donato, M., Morón, B., Soria-Díaz, M.E., Clemente Mateos, C., et al. 2006. Phylogeny and nodulation signal molecule of rhizobial populations able to nodulate common beans -other than the predominant species *Rhizobium etli*- present in soils from the Northwest of Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 573-586.

Andrews, M. & Andrews, M.E. 2016. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. Faculty of Agriculture and Life Sciences, Lincoln University doi:10.20944/preprints201608.0005.v1

Barrera, L; Trujillo, J. Ggoodfellow, J.; Garcia;L.; Hernhdez, L. Davila, G. et al. ,1997. Biodiversity of Bradyrhizobia Nodulating Lupinus spp. *Int. J. of Syst. Bacteriology*. 47(4): 1086 – 1091

Beker, M. 2010. *Caracterización fisiológica y molecular de la interacción Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli* Tesis Doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Argentina

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*.

Brako, L. & Zarucchi, J.L. 1993. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot., *Missouri Botanical Garden* 45: 1-1286

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.org](http://www.plosone.org) Setiembre 2014

Dixon, R. & Wheeler, C. 1993. Nitrogen fixation in plants. Chapman & Hall, NY. USA: 157 pp.

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

Fuzinatto, R.; Ribeiro, R.; Marcon, J. Orillo, E.; Rogel, M.; Andrade, D.. Et al. 2014. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil *IJSEM*. 64(9) 3222-3229

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.

Graham, P. Sadowsky, H.; Kersters, M. Barnet, H., Bradley, R., Cooper, J. . et al. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol*- 41; :582-587.

ILDIS. 2007. Catalogue of life: 2007 Annual Checklist. Disponible en URL: <http://www.ildis.org/leguminosae>

Jordan, D.. 1982.. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-

growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136-139.

Kurlovich, B.; Tikhonovich, I, Kartuzova, L. & Heinanem, J. 2002. Nitrogen Fixation. En Kurlovich. Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg Pub. House.269 -287

Larcher, W. 1995. Physiological Plant Ecology. 3rd. Ed. Edit. Springer. Germany: 168-199

Le Quère, A.; Tak, N.; Singh, H.; Lavire, C.; Meyer, T.; Chapulliot, D. 2017. Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed 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-y

Lezama, P. 2010. Las Especies de *Lupinus* L. (Fabaceae) y de sus simbioses en el distrito de Corongo-Ancash. Tesis Doctoral, UNMSM. Lima. Disponible en URL: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1386/1/Lezama\\_ap.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1386/1/Lezama_ap.pdf)

Lezama, P.; Lezama, M.K.; Carrion, J.; Stepkowski, T. 2014. Diversidad de especies del género *Lupinus* L. y de sus simbioses en el departamento de Ancash. *Pueblo Continente* 25(1): 117 - 123

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

Maallah, J.; Berraho, E.B.; Muñoz; S., Sanjuan; S. Lluch, C.. 2002. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Applied Microbiology*. 93: 531-540

Martínez, M., Hernández, V., Palomo, A. y Vásquez, J. 2002. Diversidad Genética de Rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 3(1):9-18.

Matos, G. & Zuñiga, D. 2002. Comportamiento de Cepas nativas de rizobios aisladas de la Costa

del Perú en dos Cultivares de pallar (*Phaseolus lunatus* L.). *Ecología Aplicada* 1(1): 19 - 24

Mohr, H. & P. Schopfer. 1995. *Plant Physiology*. Edit. Springer. Germany: 467-499

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

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

Santillana, N. Arellano, C. Zúñiga, D. 2002. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4(1,2): 47 - 51

Shoikry, A. Khattab, A. Abou-Ellail, M. El-Shabrawy. 2013. Molecular and Biochemical characterization of new *Rhizobium leguminosarum* biovar *viviae* strains isolated from different located of Egypt. *J. App. Sciences Research*. 9(11) 5983 - 5877

Soule, J. & Piper, J. 1994. *Farming in Nature's Image*. Island Press. USA:90-117

Spaink HP..2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev . Microbiol*. 54:257–288.

Stepkowski, T.; Moulin, L., Krzyc, A.. 2005. European Origin of *Bradyrhizobium* Populations Infecting Lupins and Serradella in Soils of Western Australia and South Africa. *Appl. Env. Microbiology*. 71(11): 7041-7052

Stepkowski, T.; Hughes, C.; Law, J. et al. 2007. Diversification of Lupine *Bradyrhizobium* Strains: Evidence from Nodulation Gene Trees. *App. and Env. Microb.* Vol. 73(10): 3254-3264

Stepkowski, T.; Bak, M.; Moulin, L.; Króliczak, J.; Golińska, B.; Narońca, D.; Safronova, V.I.; Młodrzak, 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.

Wang, T. & Martinez, J. 2007. *Taxonomía de Rhizobium*. CIFBN. UNAM. México.: Cat. 12  
Disponibile en URL: <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo12.pdf>

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.

Weir, B. 2006 *Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia*. Tesis Ph. D. University of Auckland. New Zeland

**CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>INICIO</b>	<b>FIN</b>
Ensayos Morfológicos	01/06/2017	31/12/2017
Colección de nódulos bacterianos	01/06/2017	28/02/2018
Investigación bibliografica y planificacion de actividades	01/06/2017	31/03/2018
Mantenimiento de cepario	01/08/2017	31/05/2018
Ensayos bioquímicos	01/11/2017	30/04/2018
Informe Parcial del Proyecto	01/01/2018	31/01/2018
Analisis de datos	08/01/2018	31/05/2018
Informe Final del Proyecto	15/05/2018	30/05/2018

**PRESUPUESTO**

<b>DESCRIPCION</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>PRECIO_UNITARIO</b>	<b>PRECIO_PARCIAL</b>
REACTIVOS E INSUMOS	4 UNI	175	700
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	350	350
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	350	350
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	420	420
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	280	280
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	175	175
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	294	294
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	175	175
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	210	210
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	438	438
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	427	427
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	266	266
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	266	266
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	266	266
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	266	266
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	192	192
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	332	332
MATERIAL DE VIDRIO	100 UNI	3.50	350
TRANSPORTE NACIONAL	4 UNI	450	1800
HOSPEDAJE	8 UNI	150	1200
OTROS	1 UNI	332	332
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	140	140
MATERIAL DE VIDRIO	100 UNI	2.10	210
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	455	455
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	126	126
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	315	315
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	158	158
MATERIAL DE VIDRIO	200 UNI	1.75	350
OTROS	1 UNI	438	438
OTROS	1 UNI	595	595
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	245	245
ALIMENTACION	12 UNI	150	1800
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	175	175
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	210	210
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	700	700
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	385	385
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	385	385
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	420	420
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	140	140
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	140	140
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	126	126
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	700	700
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	437	437
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	350	350
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	445	445