

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERA AGRÓNOMO**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS DE  
*Rhizobium sp.* DE RAICES DE ACCESIONES DE FRIJOL  
(*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL CENTRO EXPERIMENTAL  
SAN JUAN – INIA AMAZONAS**

**Autor: Bach. Lluly Consuelo Meléndez Chávez**

**Asesores: M. Sc. Jheiner Vásquez García**

**Dr. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

**Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz**

Registro: (.....)

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2023**

# AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UN TRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-H

### AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

#### 1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Meléndez Chávez Lluy Convelo  
DNI N°: 73752990  
Correo electrónico: 7375299041@untrm.edu.pe  
Facultad: Ingeniería y Ciencia Agraria  
Escuela Profesional: Ingeniería Agrónoma

#### Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): \_\_\_\_\_  
DNI N°: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
Facultad: \_\_\_\_\_  
Escuela Profesional: \_\_\_\_\_

#### 2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el centro experimental San Juan-IBIA Amazonas

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Vásquez García Jheiner  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 43274745  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): 0000-0002-6389-3796

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Leiva Espinoza Santos Triunfo  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 41265287  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): 0000-0003-1710-1994

#### 4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

[https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde\\_ford.html](https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html)  
4.00.00 ciencias agrícolas

#### 5. Originalidad del Trabajo

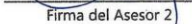
Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

#### 6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 09 / Junio / 2023

  
Firma del autor 1  
  
Firma del Asesor 1

  
Firma del autor 2  
  
Firma del Asesor 2

# AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-H

### AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

#### 1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Meléndez Chávez Lily Consuelo  
DNI N°: 73752990  
Correo electrónico: 7375299041@untrm.edu.pe  
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias  
Escuela Profesional: Ingeniería Agrónoma

#### Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): \_\_\_\_\_  
DNI N°: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
Facultad: \_\_\_\_\_  
Escuela Profesional: \_\_\_\_\_

#### 2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el centro experimental San Juan-INIA Amazonas

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Oliva Cruz Segundo Manuel  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 05374749  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): 0000-0002-9670-0970

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: \_\_\_\_\_  
DNI, Pasaporte, C.E N°: \_\_\_\_\_  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): \_\_\_\_\_

#### 4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

[https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde\\_ford.html](https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html)  
4.00.00 Ciencias agrícolas

#### 5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

#### 6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC. Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 09 / Junio / 2023



[Firma]  
Firma del autor 1

[Firma]  
Firma del Asesor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del autor 2

\_\_\_\_\_  
Firma del Asesor 2

## **DEDICATORIA**

A los autores de mis días y mis hermanos, pues sin su apoyo incondicional, no hubiese podido culminar el primer peldaño de los muchos que tengo que subir para lograr el objetivo final; amor infinito para ellos.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme vida y salud todos los días.

A mis padres Pedro Pablo y Alejandrina por siempre estar conmigo, inculcándome valores, darme una educación digna y de calidad. Por quererme y acompañarme en los momentos difíciles.

A mis hermanos Lenin, Llony, Cadeli, Enller y Alexandra por darme la motivación de siempre salir adelante y ser perseverante en lo que quiero lograr; por brindarme todos los días su compañía y amor que tienen hacia mi persona.

A mi alma mater la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza que me formo como profesional.

A la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias; Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma; docentes de esta escuela por enseñarme y formarme durante 5 años para lograr el sueño tan anhelado de ser una profesional al servicio de la comunidad.

A la Dra. Liz Marjory S. Cumpa Velásquez por su apoyo incondicional en el Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal.

A mis Asesores M. Sc. Jheiner Vásquez García, Mg. Santos Triunfo Leiva y Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz por su asesoría y apoyo.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación para obtener el título profesional de Ingeniero Agrónomo.

Al Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal y a todo el personal que labora en dicho laboratorio, por brindarme su apoyo en el manejo de equipos y facilitarme con todos los materiales e insumos.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

**Rector**

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

**Vicerrector Académico**

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

**Vicerrectora de Investigación**

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

**Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



**UNTRM**

**REGLAMENTO GENERAL**

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 3-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el centro experimental San Juan - INIA Amazonas; del egresado Lily Consuelo Meléndez Chávez de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 06 de Junio de 2023

Firma y nombre completo del Asesor

Jheiner Vásquez García

43274145

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 3-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el centro experimental San Juan - INIA Amazonas; del egresado Lily Consuelo Meléndez Chávez de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 06 de Junio de 2023

Firma y nombre completo del Asesor

Santo Leizaola Espinoza  
211265280



## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 3-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de frijol (Phaseolus vulgaris L) en el centro experimental San Juan - INIA Amazonas; del egresado Lluly Consuelo Meléndez Chávez de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 06 de Junio de 2023

Firma y nombre completo del Asesor

Sigfredo Manuel Oliva Cruz  
DNI 05374749

## JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



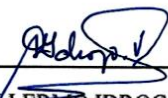
Ph. D. LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

**PRESIDENTA**



D. Sc. JORGE ALBERTO CONDORI APFATA

**SECRETARIO**



Mg. GUILLERMO IDROGO VÁSQUEZ

**VOCAL**

# CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



## ANEXO 3-Q

### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de 50 accesiones de feijón (Phaseolus vulgaris L.) en el centro experimental San Juan - Tarma Amazonas.

presentada por el estudiante ( )/egresado (✓) Lloly Consuelo Meléndez Chávez

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronoma

con correo electrónico institucional 7375299041@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 23 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (✓) / igual ( ) al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene \_\_\_\_\_ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 25 de Mayo del 2023

G.L.A.  
SECRETARIO

[Signature]  
PRESIDENTE

[Signature]  
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....  
.....

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 3-S

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 14 de Junio del año 2023, siendo las 15:00 horas, el aspirante: Lily Consuelo Meléndez Chávez, asesorado por Hg. Theinar Vásquez, Dr. Santos Trivinto, Dr. Manuel Oliva defiende en sesión pública presencial () a distancia () la Tesis titulada: Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de 50 accesiones de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el Centro experimental San Juan - INIA - Amazonas, para obtener el Título Profesional de Ingeniería Agrónoma, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ligia Magali García Rosero

Secretario: Jorge Alberto Condou Apfata

Vocal: Guillermo Edmundo Vásquez



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 16:12 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

C. A.

SECRETARIO

[Signature]

PRESIDENTE

[Signature]  
VOCAL

#### OBSERVACIONES:

Se debe modificar el título de la siguiente manera:  
« Caracterización morfológica de cepas de Rhizobium sp. de raíces de accesiones de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el Centro experimental San Juan - INIA - Amazonas. »

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UN TRM.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS .....	vi
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vii
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	viii
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	ix
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS.....	x
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	xi
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	xii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN .....	xviii
ABSTRACT.....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	20
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
2.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	23
2.1.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	23
2.1.2. DESCRIPCIÓN DEL CAMPO .....	23
2.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO .....	24
2.2.1. POBLACIÓN.....	24
2.2.2. MUESTRA.....	24
2.2.3. MUESTREO .....	24
2.3. METODOLOGÍA .....	24
2.3.1. RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS DE FRIJOL .....	25
2.3.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE NÓDULOS DE FRIJOL.....	25
2.3.3. AISLAMIENTO EN MEDIO YEM.....	26
2.3.4. AISLAMIENTO DE COLONIAS .....	27
2.3.5. PRESERVACIÓN Y CONSERVACIÓN EN GLICEROL 30% V/V .....	27

2.3.6.	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE RHIZOBIUM</b> .....	28
2.3.6.1.	<b>EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LISIS SALINA</b> .....	28
2.3.6.2.	<b>PERFILES O HUELLAS GENÓMICAS (FINGERPRINTING)</b> .....	29
2.3.6.3.	<b>ELECTROFORESIS</b> .....	29
2.4.	<b>VARIABLES DE ESTUDIO</b> .....	30
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	<b>CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA</b> .....	32
3.2	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR</b> .....	37
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
	<b>CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA</b> .....	40
	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR</b> .....	41
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño Experimental.....	<b>24</b>
<b>Tabla 2.</b> Variables a Nivel de Colonia .....	<b>30</b>
<b>Tabla 3.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto .....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida crema. .....	<b>33</b>
<b>Tabla 5.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Perciano rojo .....	<b>34</b>
<b>Tabla 6.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Manteca.....	<b>34</b>
<b>Tabla 7.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto plomo .....	<b>35</b>
<b>Tabla 8.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto rayado .....	<b>35</b>
<b>Tabla 9.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida negro rayado.....	<b>36</b>
<b>Tabla 10.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida crema rayado.....	<b>36</b>
<b>Tabla 11.</b> Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Canarias .....	<b>37</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de ubicación del experimento.....	<b>23</b>
<b>Figura 2.</b> Extrayendo plantas de frijol, en etapa de floración. ....	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Desinfección de nódulos . ....	<b>26</b>
<b>Figura 4:</b> Siembra de nódulos.....	<b>26</b>
<b>Figura 5:</b> Aislado colonias de rhizobium.....	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Muestras en glicerol. ....	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Extracción de ADN. ....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Proceso de huellas Genómicas. ....	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Electroforesis.....	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Caracterización morfológica de cepas de rhizobium .....	<b>32</b>
<b>Figura 11.</b> Gel de las 108 cepas de rhizobium.....	<b>39</b>
<b>Figura 12.</b> Árbol de similitud UPGMA de cepas de <i>Rhizobium sp.</i> aislados en el INIA .....	<b>39</b>



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Fotografías de raíces con nódulos de frijol. ....	<b>48</b>
<b>Anexo 2.</b> Fotografías de actividades realizadas en laboratorio. ....	<b>49</b>
<b>Anexo 3.</b> Fotografías de actividades realizadas en biología molecular. ....	<b>50</b>
<b>Anexo 4.</b> Fotografías de las huellas genómicas de cepas de rhizobium. ....	<b>50</b>
<b>Anexo 5.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto. ....	<b>51</b>
<b>Anexo 6.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Toda la vida crema. ....	<b>52</b>
<b>Anexo 7.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Perciano rojo. ....	<b>48</b>
<b>Anexo 8.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Manteca. ....	<b>49</b>
<b>Anexo 9.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto plomo. ....	<b>55</b>
<b>Anexo 10.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto rayado. ....	<b>56</b>
<b>Anexo 11.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Toda la vida negro rayado. ....	<b>57</b>
<b>Anexo 12.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Toda la vida crema rayado. ....	<b>58</b>
<b>Anexo 13.</b> Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Canario. ....	<b>59</b>

## RESUMEN

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas más consumidas en el Perú, debido a que aporta proteínas, vitaminas y minerales. Por otro lado, el *Rhizobium* se encuentra en los nódulos de las raíces del cultivo de frijol, el cual fija y aporta nitrógeno al suelo, creando una interacción específica entre ellos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar morfológicamente cepas de *Rhizobium sp.* de las raíces de 9 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Centro Experimental San Juan – INIA Amazonas. Esto se realizó en dos fases: caracterización morfológica y caracterización molecular de 108 cepas de *Rhizobium*. Para la caracterización morfológica se realizó mediante el aislamiento de colonias en medio YEM más Nistatina y en la caracterización molecular se hizo mediante el cebador BOXA1R. Los resultados de la caracterización morfológica mostraron que todas son iguales, porque tienen las mismas características: borde liso, color blanco, aspecto traslúcido, textura gomosa y forma convexa. El análisis de huellas genómicas de las cepas de *Rhizobium* presentó diversidad genética, ya que se logró formar 34 grupos de las cepas con una similitud de 65% y un coeficiente de Pearson al 2% de tolerancia.

**Palabras clave:** Frijol, rhizobium, cepas, diversidad genética, huellas genómicas.

## ABSTRACT

The bean crop (*Phaseolus vulgaris*) is one of the most consumed legumes in Peru, because it provides proteins, vitamins and minerals. On the other hand, the Rhizobium is found in the root nodules of the bean crop, which fixes and provides nitrogen to the soil, creating a specific interaction between them. The objective of this research was to characterize morphologically strains of Rhizobium sp. from the roots of 9 bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions at the San Juan Experimental Center – INIA Amazonas. This was done in two phases: morphological characterization and molecular characterization of 108 Rhizobium strains. The morphological characterization was carried out by isolating colonies in YEM medium plus Nystatin and the molecular characterization was done using the BOXA1R primer. The results of the morphological characterization showed that they are all the same, because they have the same characteristics: smooth edge, white color, translucent appearance, rubbery texture, and convex shape. The analysis of genomic fingerprints of the Rhizobium strains presented genetic diversity, since it was possible to form 34 groups of strains with a similarity of 65% and a Pearson coefficient of 2% tolerance.

**Keywords:** Bean, rhizobium, strains, genetic diversity, genomic footprints.

## I. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más importante del mundo, ya que representa el 87% de las leguminosas consumidas a nivel mundial (Cantaro *et al.*, 2019), autóctona de países de América Central y del Sur, que establece simbiosis con diferentes simbiotes pertenecientes principalmente a rizobios, de gran importancia económica, cultural y nutricional (Rajnovic *et al.*, 2022).

En el Perú, el frijol se produce en las costas norte y sur y en la sierra norte (MINAGRI, 2016). Es fuente principal de la dieta diaria de la gran mayoría de las personas, debido a que posee una alta producción y consumo, por sus excelentes cualidades agrícolas como óptimo rendimiento, adaptable para la costa y valles interandinos cálidos, útil en rotación de cultivos, acrecienta de suelos por su propiedad de fijar nitrógeno mediante la simbiosis con *rhizobium* y cualidades nutricionales (22-28% de proteínas, 59-60% de carbohidratos, vitaminas, minerales y fibras solubles) (Cantaro *et al.*, 2019; Vilchez, 2017). El departamento con mayor producción de frijol es Cajamarca, por ser sus tierras muy ricas (MINAGRI, 2016). Sin embargo, el rendimiento se ve gravemente afectado debido a los daños causados por plagas, enfermedades, malezas y un mal manejo del cultivo; además que no existe por parte de los gobiernos de turno, tanto, locales, regionales y central, una adecuada educación para los agricultores, para que puedan optimizar la producción que tienen (FAOSTAT, 2016).

La simbiosis de *rhizobium* con algunas plantas, es el proceso biológico que convierte el nitrógeno elemental atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_3$ ), una forma utilizable por las plantas (Angeles & Cruz 2015). Hay microorganismos, como bacterias del género *rhizobium*, que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con plantas leguminosas. Se considera que la mayor cantidad de nitrógeno atmosférico dado son producto de dicha asociación (Richards, 1987). Se dice que el 80 % del nitrógeno fijado en el planeta es por la actividad de las bacterias del género *rhizobium* (Sessitsch *et al.* 2002). El uso de inoculantes comerciales a base de *Rhizobium* es una práctica estandarizada para los agricultores, con la finalidad de aumentar los rendimientos a bajos costos, pues en la mayoría de casos se utilizan

productos químicos, generando contaminación y no se le da el tiempo necesario para que pueda recuperarse, se regenere y pueda iniciar nuevamente el inicio del cultivo (Calero *et al.*, 2019).

*Rhizobium sp.* infecta y forma nódulos en huéspedes específicos ya que la bacteria posee una molécula grande que recopila la información requerida para infestar a la planta huésped susceptible (Rincón *et al.*, 2000 ). La formación de la masa es un proceso impulsado por un cambio de señales entre los dos participantes de la interrelación; sustancias con efecto nitrógeno (factores de nodulación); entre las legumbres capaces de juntarse con *Rhizobium sp.* están los tréboles, las judías, la alfalfa, los guisantes, el maní, la veza, etc. Estas plantas desarrollan en sus raíces nódulos que contienen por dentro bacteroides o rizobios (Saldaña, 2017).

La interrelación rhizobium – leguminosa puede fijar de 24 a 584 Kg de nitrógeno por hectárea y suministrar en algunos casos hasta el 90% de las necesidades de la planta (Mayz *et al.*, 2010). La inserción biológica de nitrógeno atmosférico coadyuva a disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, a enmendar los problemas de contaminación de los suelos y el agua, así como a reducir los costos de producción de manera sostenible, el cual sería ideal en nuestros suelos, pues la mayoría utiliza químicos muchas veces en forma desmedida (Saldaña, 2017).

Los elementos Box tienen simetría diádica con el potencial de formar estructuras de bucle de tallo estables y están ubicados dentro de regiones intergénicas; los elementos Box son secuencias repetitivas de mosaico compuestas por varias combinaciones de tres subunidades, boxA, boxB y boxC, que son regiones 59, 45 y 50 nucleótidos de longitud, respectivamente (Koeuth *et al.*, 1995).

En el país aún no existen muchos estudios relacionados a la caracterización morfológica y molecular de cepas de rhizobium en el cultivo de frijol, por lo que se realizó el siguiente trabajo de investigación. Teniendo como principal objetivo caracterizar morfológicamente cepas de *Rhizobium sp.* de raíces de 9 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Centro Experimental San Juan – INIA Amazonas.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- ❖ Caracterizar morfológicamente cepas de *Rhizobium sp.* de nódulos de raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) domesticado de 9 accesiones del Centro Experimental San Juan – INIA.
- ❖ Determinar grupos morfológicos de *Rhizobium sp.* presentes en 9 accesiones frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del Centro Experimental San Juan – INIA, en base a una similitud utilizando técnicas de análisis multivariado.

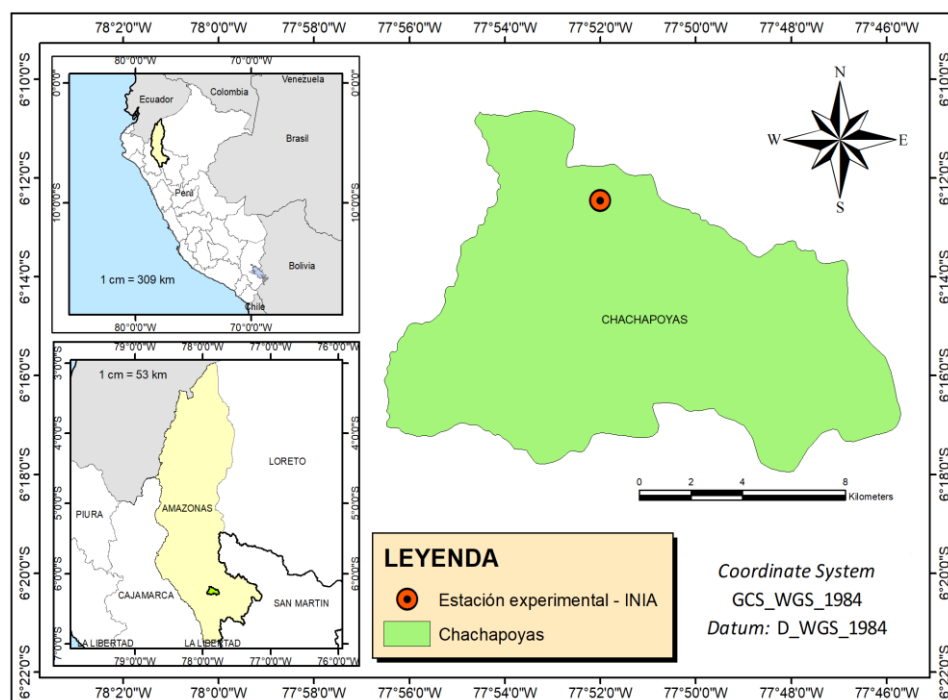
## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. ÁREA DE ESTUDIO

#### 2.1.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La recolección de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se realizó del Banco de Germoplasma del INIA de la Colección de Germoplasma de Leguminosas en la Sede de la Estación Experimental Agraria Amazonas del Fundo San Juan, provincia Chachapoyas, región Amazonas (mapa de ubicación, figura 1).

La caracterización morfológica de cepas de rhizobium se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES).



**Figura 1.** Mapa de ubicación del experimento.

#### 2.1.2. DESCRIPCIÓN DEL CAMPO

El área de la investigación fue de 3600 m<sup>2</sup>, la cual están distribuidas 50 accesiones de frijol; cada accesión contó con las medidas de 6m x 6m formando la figura geométrica de un cuadrado. En esta investigación se trabajó con 09 accesiones (3 Frijol Pinto, 3 Toda la Vida, 1 Perciana, 1 Manteca, 1 Canario).

## **2.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO**

### **2.2.1. POBLACIÓN**

La población estuvo compuesta por 2500 plantas distribuidas en 50 accesiones de frijol, cada accesión conformada por 50 plantas.

### **2.2.2. MUESTRA**

La muestra estuvo conformada por 09 accesiones de frijol. De cada accesión se recolecto 3 plantas de frijol para realizar la caracterización morfológica de cepas de rhizobium (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diseño Experimental

<b>ACCESIONES</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>NÚMERO DE PLANTAS</b>
A1	Pinto	3
A2	Toda la vida crema	3
A3	Perciano rojo	3
A4	Manteca	3
A5	Pinto plomo	3
A6	Pinto rayado	3
A7	Toda la vida negro rayado	3
A8	Toda la vida crema rayado	3
A9	Canario	3

### **2.2.3. MUESTREO**

Se realizó un muestreo randomizado, colectando 3 plantas por cada accesión.

## **2.3. METODOLOGÍA**

La investigación se desarrolló en dos fases: la primera fase se realizó en campo, en la Estación Experimental San Juan – INIA Amazonas y la segunda fase se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal (LABISANV) del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza



(UNTRM). Se detalla la metodología que se utilizó, de acuerdo a los objetivos específicos planteados en la investigación.

### **2.3.1. RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS DE FRIJOL**

Se seleccionaron 3 plantas en la etapa de floración de cada accesión, debido que en esta etapa es donde se encuentra la mayor concentración de nódulos en la raíz del frijol. Luego con la ayuda de una pala se hizo un hoyo alrededor de la planta con una profundidad de 20 cm aproximadamente, para extraer la planta de frijol. Después con una tijera de podar se cortó las ramas, para quedarnos sólo con la raíz. Cuando ya se tuvo la raíz, esta se envolvió con papel toalla para que no se deshidrate. Por último, se guardó en una bolsa de plástico colocando la letra “A” de accesión más el número que le corresponde (Figura 2).



**Figura 2.** Extracción de plantas de frijol, en etapa de floración.

### **2.3.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE NÓDULOS DE FRIJOL**

Se seleccionaron 4 nódulos por cada planta de los colectados, los que se encontraban en la base de la raíz que tengan aspecto rosáceo, forma rugosa y grandes. Estos nódulos se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml, se le agregó agua destilada estéril y se pasó por vórtex para quitar toda la tierra de los nódulos. Posteriormente fueron lavados 5 veces con agua destilada estéril. A continuación, fueron desinfectados con una solución de NaClO 5% durante 4 minutos, luego lavados 5 veces con agua destilada estéril. Después fueron desinfectados con etanol 70% por un minuto, estos

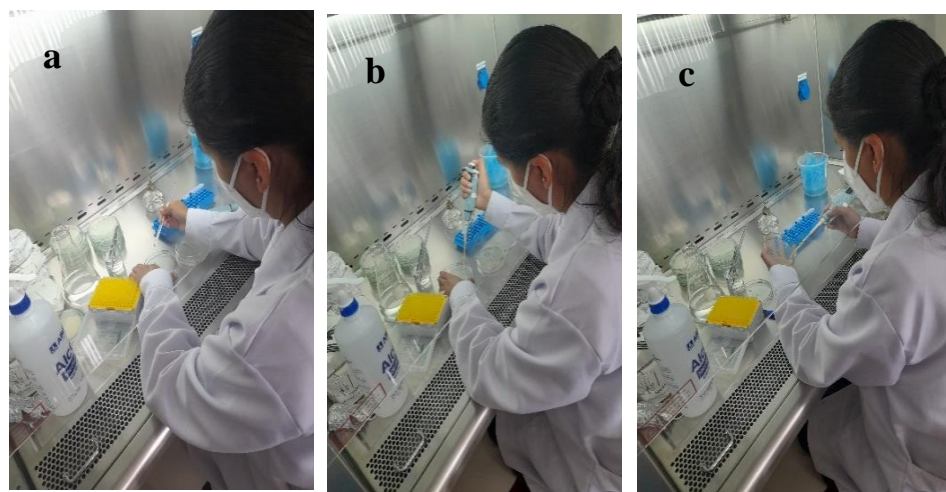
pasando por vórtex. Finalmente, se lavó 5 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de etanol (Figura 3).



**Figura 3.** Desinfección de nódulos. **a.** Raíces de frijol con nódulos. **b.** Desinfección de nódulos extraídos de la raíz.

### 2.3.3. AISLAMIENTO EN MEDIO YEM

Los nódulos que fueron desinfectados se aplastaron con una varilla de vidrio estéril, el líquido obtenido del nódulo se sembró de forma estriada en placas con medio YEM (Extracto de levadura 0,4 g/L, Manitol 10 g/L, NaCl 0,1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/L,  $K_2HPO_4$  0,5 g/L y Agar 15 g/L) e incubados a 28°C entre 2 y 3 días hasta observar crecimiento de colonias. Para comprobar la eficiencia del método de desinfección se incubó el agua del último lavado en medio YEM (Figura 4).



**Figura 4:** Siembra de nódulos. **a.** Nódulos aplastados con la varilla de vidrio. **b.** Colecta del líquido del nódulo. **c.** Siembra del líquido del nódulo.

#### 2.3.4. AISLAMIENTO DE COLONIAS

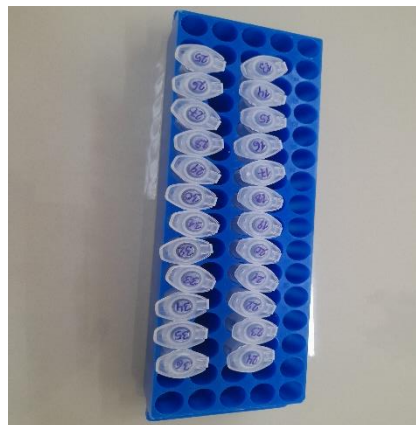
Las bacterias crecidas fueron aisladas a placas Petri con medio YEM más Nistatina (protege al medio para que no se contaminen las bacterias), solo se aisló una colonia de la bacteria mediante estriado, se incubó a 28°C entre 2 y 3 días hasta observar su crecimiento (Figura 5).



**Figura 5:** Aislando colonias de rhizobium.

#### 2.3.5. PRESERVACIÓN Y CONSERVACIÓN EN GLICEROL 30% V/V

Los aislamientos de colonias obtenidas fueron crecidos en medio TY (Tryptona 5 g/L y Extracto de levadura 3 g/L) mediante la inoculación, durante 24 horas a 28°C en agitación con 150 – 180 rpm. Luego en un tubo eppendorf de 1,5 ml se agregó 300 µl de cultivo (medio TY más la bacteria crecida) y 700 µl de glicerol estéril. Después esto se pasa por vórtex para homogenizar y se guarda en el ultra congelador a -80°C para la conservación de las cepas (Figura 6).



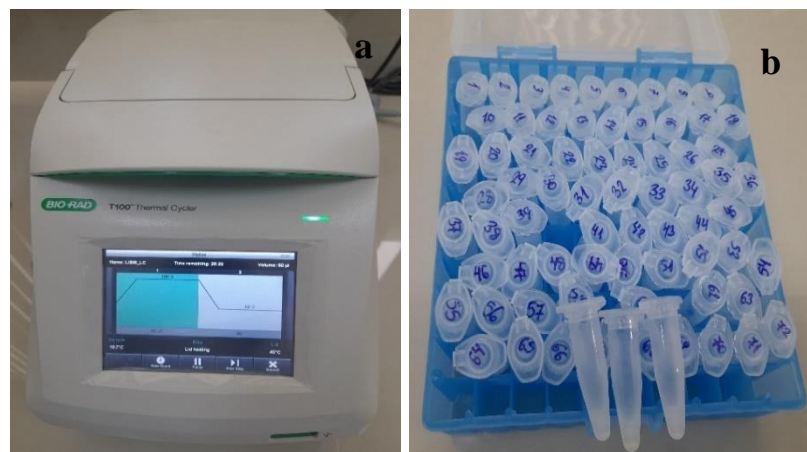
**Figura 6.** Muestras en glicerol.

### 2.3.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE RHIZOBIUM

La caracterización molecular comprendió las actividades de extracción de ADN, análisis de perfiles o huellas genómicas (Fingerprinting) y electroforesis.

#### 2.3.6.1. EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LISIS SALINA

Las cepas conservadas en glicerol se sembraron de forma estriada en medio Agro TY (Agar 15 g/L, Extracto de levadura 3 g/L y Tryptona 5g/L) obteniendo cultivo bacteriano fresco, el cual se incubó por un día. Posteriormente en un tubo eppendorf de 0,2 ml se mezcló 100  $\mu$ l de la mezcla de lisis TE1X (1mM de EDTA y 10mM de TRIS) con el cultivo bacteriano fresco, la masa de este cultivo se sacó de las placas con mondadientes estériles y se colocó en el tubo, se pasó por vórtex para homogenizar. Luego se incubó en el termociclador a 100°C por 25 minutos. Después se realizó un shock térmico, se puso las muestras a enfriar en la refrigeradora a -20°C por 15 minutos, se sacaron las muestras y se observó que se habían formado cristales, se descongeló y se homogenizó (vórtex). Asimismo, se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm en tubos de 1,5 ml, el sobrenadante se tomó y pasó a tubos eppendorf de 1,5 ml. Por último, las muestras se almacenaron a -20°C (Figura 7).



**Figura 7.** Extracción de ADN. **a.** Termociclador BIO-RAD T100. **b.** Producto resultante de lisis.

### 2.3.6.2. PERFILES O HUELLAS GENÓMICAS (FINGERPRINTING)

El análisis de fingerprinting o huella genómica fue realizado mediante la técnica BOX-PCR (Koeuth *et al.*, 1995), usando el oligonucleótido BOXA1R. Para la reacción de PCR se utilizó los siguientes insumos: 5X Green buffer (10  $\mu$ l/1X), dNTP 10 mM (1  $\mu$ l/1X), BOXA1R 100  $\mu$ l (1  $\mu$ l/1X), Taq (0,25  $\mu$ l/1X), MgCl<sub>2</sub> 50 mM (2,35  $\mu$ l/1X), agua ultra pura (5,4  $\mu$ l/1X) y muestra (5  $\mu$ l/1X); sumando un total de 25  $\mu$ l. Todos estos insumos fueron puestos en tubo eppendorf de 0,20 ml y se formó un coctel, la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD T100, con las siguientes condiciones: 7 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C, 8 minutos a 65°C y un espacio final de extensión de 65°C durante 16 minutos. (Figura 8).



**Figura 8.** Reacción de PCR. **a.** Termociclador BIO-RAD T100. **b.** Productos resultantes de la PCR. **c.** Electroforesis en gel de agarosa.

### 2.3.6.3. ELECTROFORESIS

Los productos resultantes de la PCR fueron comprobados por el proceso de electroforesis: 3  $\mu$ l del producto de PCR fue cargado en el gel agarosa, sumergido en solución Tris Acetate EDTA (TAE) 1X. El gel fue preparado a una concentración de 1,5 g de agarosa, 100 ml de TAE 1X y 4  $\mu$ l de SYBR Safe. La electroforesis consto de una corrida de 45 minutos a 75 voltios. Además de las muestras corridas, también se corrió un marcador de peso molecular de 1kb (Promega), esto nos sirvió como indicador de

tamaño de los productos de PCR amplificados. Por último, las muestras corridas en gel agarosa fueron fotografiadas bajo luz UV (Figura 9).



**Figura 9.** Electroforesis. **a.** Proceso de electroforesis. **b.** Marcador de peso molecular de 1kb.

#### 2.4. VARIABLES DE ESTUDIO

Las variables de estudio para la caracterización morfológica fueron las siguientes: borde, color, aspecto, textura y forma (Tabla 2).

**Tabla 2.** Variables a Nivel de Colonia

CARACTERÍSTICAS				
BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
Lisa	Blanco	Opaca	Gomosa	Convexa
Rugoso	Rosado	Traslúcida	Poco gomosa	Copular
			Gomosa suave	
			Acuosa	

Para la diversidad genética de cepas de rhizobium se utilizó el programa bioinformático GelJ, el cual es una herramienta que sirve para analizar imágenes de gel, que contienen huellas genómicas de ADN (Heras *et al.*, 2015), en el cual se ingresó las fotografías tomadas bajo luz UV del gel de agarosa.

## 2.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA DIVERSIDAD GENÉTICA

### 2.4.1.1 MÉTODO UPGMA

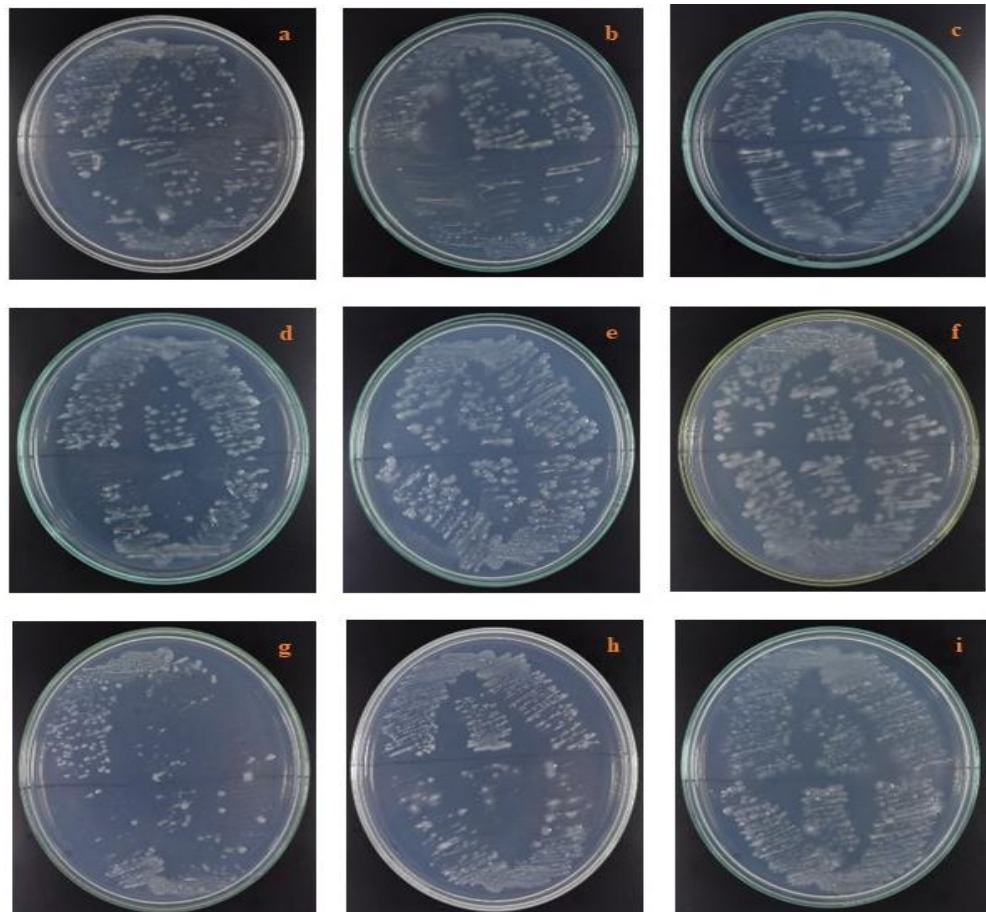
Según Sneath & Sokal (1975), el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) consiste en la indagación de la distancia más corta en la matriz de diferencias genéticas y agrupar las unidades que se adaptan a formar como una sola unidad taxonómica autónoma.

El método UPGMA al igual que todos los demás métodos genéticos basados en distancia, dadas las cadenas genéticas de los taxones, genera una matriz de distancia y realiza sus cálculos con esta. La matriz de intervalo *matriz* es una matriz cuadrada de tamaño  $n$ , donde  $n$  es el número de taxones a clasificar y *matriz*  $i j$  es la distancia genética entre una especie  $i$  y una especie  $j$ .

### III. RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los resultados de la caracterización morfológica de las 108 cepas aisladas, 12 cepas de cada accesión de frijol se muestran en la tabla 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Las cepas no mostraron diferencia en el borde, color, aspecto, textura y forma de la colonia. El borde de la colonia fue lisa, mientras que el color fue de color blanco. En cuanto a aspecto la colonia presentó apariencia traslúcida. En textura la colonia mostró una textura gomosa. En el caso de la forma la colonia tuvo una forma convexa (Figura 10).



**Figura 10. Caracterización morfológica de cepas de rhizobium. a. Accesión 1: cepas de Pinto. b. Accesión 3: cepas de Toda la vida crema. c. Accesión 8: cepas de Perciano rojo. d. Accesión 9: cepas de Manteca. e. Accesión 17: cepas de Pinto plomo. f. Accesión 19: cepas de Pinto rayado. g. Accesión 20: cepas de Toda la vida negro rayado. h. Accesión 22: cepas de Toda la vida crema rayado. i. Accesión 25: cepas de Canarias.**



**Tabla 3.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto.

CÓDIGO		CARACTERÍSTICAS				
DE CEPA	LUGAR	BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
A1P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A1P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 4.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida crema.

CÓDIGO		CARACTERÍSTICAS				
DE CEPA	LUGAR	BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
A3P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A3P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 5.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Perciano rojo.

<b>CÓDIGO</b>		<b>CARACTERÍSTICAS</b>				
<b>DE CEPA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>BORDE</b>	<b>COLOR</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>TEXTURA</b>	<b>FORMA</b>
A8P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A8P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 6.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Manteca.

<b>CÓDIGO</b>		<b>CARACTERÍSTICAS</b>				
<b>DE CEPA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>BORDE</b>	<b>COLOR</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>TEXTURA</b>	<b>FORMA</b>
A9P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A9P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 7.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto plomo.

CÓDIGO		CARACTERÍSTICAS				
DE CEPA	LUGAR	BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
A17P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A17P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 8.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Pinto rayado.

CÓDIGO		CARACTERÍSTICAS				
DE CEPA	LUGAR	BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
A19P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A19P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 9.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida negro rayado.

<b>CÓDIGO</b>		<b>CARACTERÍSTICAS</b>				
<b>DE CEPA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>BORDE</b>	<b>COLOR</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>TEXTURA</b>	<b>FORMA</b>
A20P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A20P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 10.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Toda la vida crema rayado.

<b>CÓDIGO</b>		<b>CARACTERÍSTICAS</b>				
<b>DE CEPA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>BORDE</b>	<b>COLOR</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>TEXTURA</b>	<b>FORMA</b>
A22P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A22P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

**Tabla 11.** Caracterización Morfológica de 12 cepas de rhizobium de Canarias.

CÓDIGO		CARACTERÍSTICAS				
DE CEPA	LUGAR	BORDE	COLOR	ASPECTO	TEXTURA	FORMA
A25P1N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P1N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P1N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P1N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P2N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P2N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P2N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P2N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P3N1	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P3N2	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P3N3	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa
A25P3N4	INIA	Lisa	Blanco	Traslúcida	Gomosa	Convexa

### 3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se analizó 108 cepas de rhizobium de aislamientos de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, mediante el uso de la técnica de huellas genómicas (figura 11). Con los perfiles genómicos se construyó un dendrograma (figura 12). Debido, a que entre el rhizobium y el cultivo de frijol hay una simbiosis específica, se estableció una similitud al 65%. De esta manera las cepas quedaron distribuidas en 34 grupos genómicos diferentes (enumerados del 1 al 34), la mayoría de ellos formados por 1 y 2 aislamientos; 2 grupos formados por 11 aislamientos, 5 grupos formados por 6 aislamientos y un grupo formado por 8 aislamientos. La agrupación de las cepas se asoció con el lugar de colecta, ya que estos fueron recolectados de un solo lugar. El amplio número de grupos formados por cepas que compartieron menos del 65% de similitud sugiere una alta diversidad genética de rhizobium que desarrollan nódulos en *Phaseolus vulgaris*.

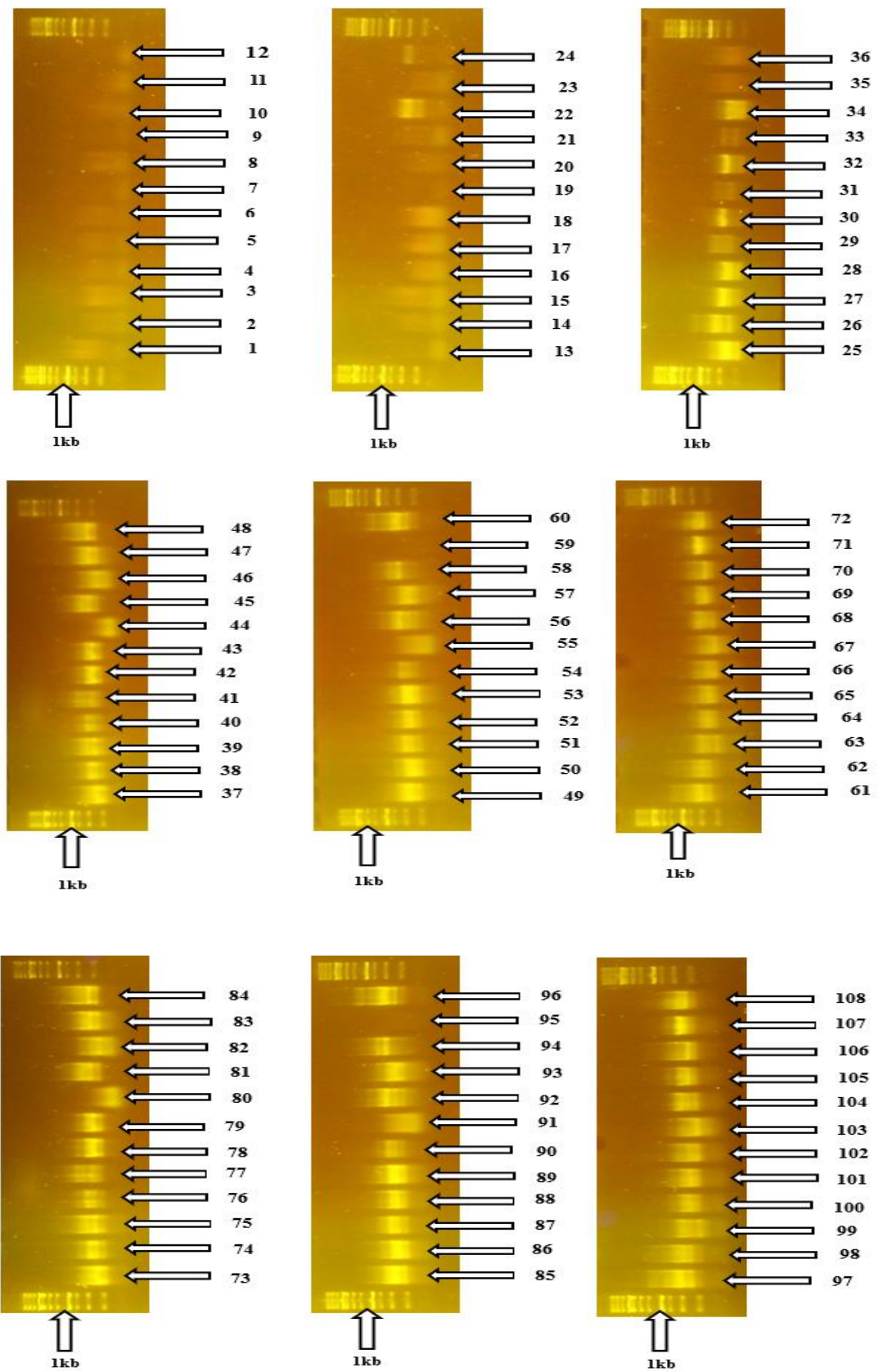
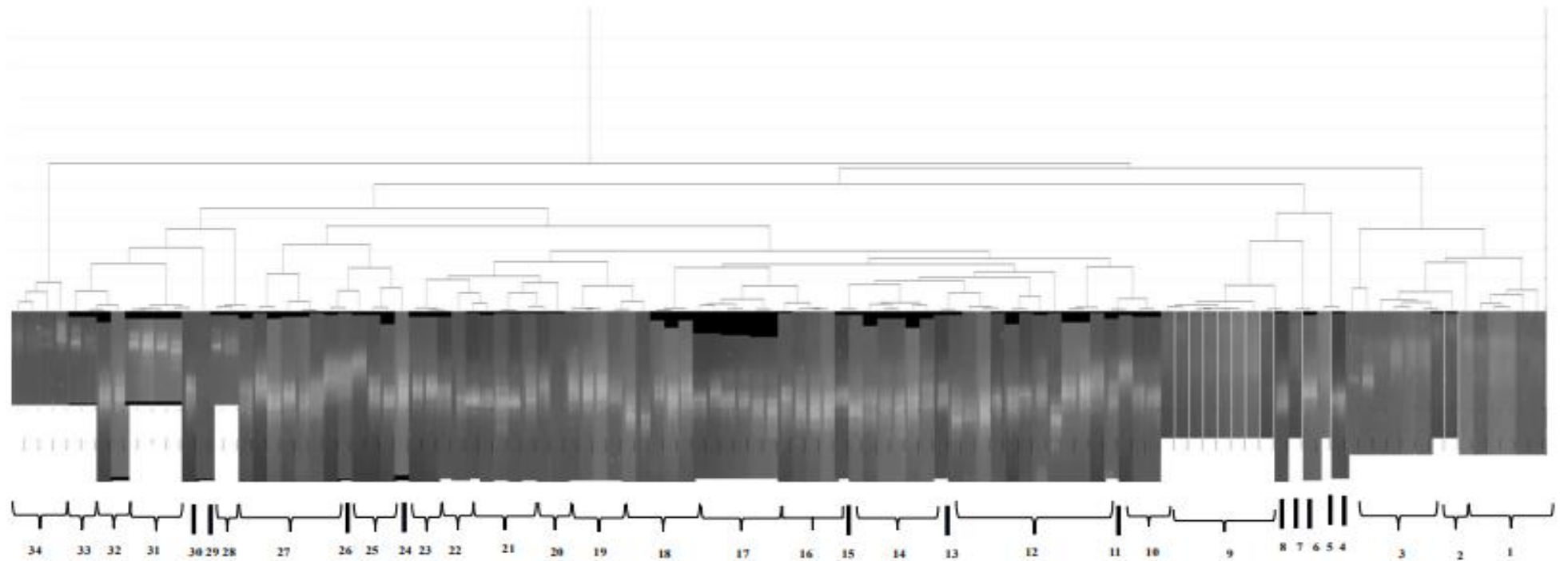


Figura 11. Gel de las 108 cepas de rhizobium.



**FIGURA 12. Árbol de similitud UPGMA de cepas de *Rhizobium sp.* aislados en el INIA.** Se realizó mediante las huellas genómicas de ADN usando el oligonucleótido BOXA1R. Los datos fueron analizados por el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson al 2% de tolerancia. Los aislamientos se diferenciaron en 34 grupos Box con 65% de similitud.

#### **IV. DISCUSIÓN**

##### **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA**

Según los resultados obtenidos que presentaron las cepas tanto en color blanco, borde liso, aspecto traslúcido, textura gomosa y forma convexa, se puede afirmar que las 108 cepas pertenecen a rhizobium. López *et al.*, (2017) obtuvo cepas que mostraron transformación en velocidad de crecimiento, forma, aspecto y textura, no así en color (todas blancas) ni margen (todas lisas). En velocidad de incremento, todas las cepas mostraron desarrollo rápido, entre 2 y 3 días. Once de ellas completaron su crecimiento en 2 días, incluidas seis provenientes de frijoles silvestres. En cuanto a la estructura de las colonias, 14 cepas mostraron configuración convexa y 6 forma cupular. En aspecto, 12 cepas presentaron apariencia traslúcida y ocho opaca; fue notable que todos los aislados de la forma silvestre de frijol, mostraran aspecto claro. En textura de colonias, 14 de los 20 aislados presentaron textura gomosa. Seis de las nueve cepas de la forma silvestre mostraron esta textura. En vista de que todos los aislados presentaron color blanco y borde liso, que mostraron crecimiento rápido (1 a 3 días), aspecto traslúcido (60 %) y textura gomosa (70 %), además de tener en cuenta lo asentado lo que se cita en la literatura, se puede inferir que los 20 aislados pertenecen a bacterias del género rhizobium, y que las cepas procedentes del frijol silvestre y del domesticado son similares.

Por su parte Granda *et al.*, (2009) examinó un total de 65 colonias de bacterias, todas las colonias obtenidas formaron parte de la caracterización morfológica, que se basó en la diferencia en cuanto a: tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación de las colonias. De todos los aislados solo 33 demostraron características diferentes en al menos un parámetro, aunque la mayoría respondieron a rasgos distintivos del género rhizobium. Se destaca que en los muestreos realizados se encontraron más de un aislado diferente, lo cual demuestra la diversidad morfológica de las bacterias. De un total de 33 aislados el 66,7 % (22) tuvieron morfología de coco-bacilo, mientras que el resto fueron bacilos cortos abundante, siendo característico de este género. Tanto la elevación como los bordes son parámetros muy dependientes del medio de cultivo, no obstante, con la



utilización de medio Fred modificado todas las colonias crecieron con elevación y el 66,7 % presentaron bordes regulares.

Así mismo, Villanueva & Quintana (2012) encontró 10 cultivos oriundos de rizobios, aislados a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*, en agar manitol extracto de levadura - rojo de congo (ELMA-RC) a 28°C. Cuando se determinaron las características macromorfológicas se encontró que tenían tamaño variable entre 1 y 7 mm de longitud, borde entero, consistencia gelatinosa, de color blanquecino a rosado y tiempo de crecimiento entre 3 y 10 días. Por su lado, las características culturales determinaron crecimiento en Medio Lactosa Extracto de Levadura y ausencia de crecimiento en Medio Luria Bertani habiéndose hallado que el género más frecuente (60%) fue rhizobium.

Para Granda y Torres (2013), todos los apartados obtenidos mediante el proceso de aislamiento se realizaron por la caracterización morfológica mediante la diferenciación de las colonias respecto a: tinción al Gram, tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación de las colonias. Donde un total de cuarenta y cinco aislados se consiguieron del procesamiento de las muestras. De ellos treinta y tres contaron con características morfológicas pertenecientes al género rhizobium. La variabilidad de los caracteres morfológicos de las bacterias diazotróficas se evidenció teniendo en cuenta que de los treinta y tres aislados seleccionados, veinte y cuatro presentaron cambios diversos en al menos un parámetro morfológico evaluado.

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

Se analizó 108 cepas de rhizobium de aislamientos de nódulos, mediante el uso de la técnica de huellas genómicas. De esta manera las cepas quedaron distribuidas en 34 grupos genómicos diferentes, la mayoría de ellos formados por 3 aislamientos. El amplio número de grupos formados por cepas que compartieron menos del 65% de similitud sugiere una alta diversidad genética de rhizobium.

El ADN genómico total de 94 cepas se utilizó como matriz en las oposiciones de amplificación por PCR con REP (REPIR-1 y REP2-1), ERIC (ERICIR y ERIC2), BOXAIR o Cebadores GTG5 (rep-PCR) (VERSALOVIC et al., 1994). Las

reacciones de rep-PCR dieron como resultado huellas dactilares específicas, tamaños de fragmentos que van desde menos de 0,3 kb hasta aproximadamente 6,5 kb. Un enlace medio (UPGMA) el dendrograma se derivó de la huella dactilar combinada de perfiles. En este dendrograma, las especies representadas por varias cepas formaron grupos. La mayoría de las cepas africanas sin nombre formaron dos grupos separados (grupo 8 y 11), que contienen solo cepas sudanesas y kenianas. Tres de las cepas africanas (HAMBI 248, 1550 y 1703) pertenecían al grupo principal de *Simorhizobium terangae* y otras tres cepas (HAMBI 1392, 1551 y 1698) agrupadas con *Simorhizobium terangae* ORS 1057 y 1058, separadas de la principal *Simorhizobium* grupo de *terangae*. Cepas HAMBI 1393, 1495 y 1496 se encontró que se encontraban en el grupo *Simorhizobium saheli*, cepa HAMBI 1681 al grupo de *Simorhizobium medicae* y dos cepas sin nombre (HAMBI 1393 y 1478) formaron un grupo con *Rhizobium etli*. Se encontró que la cepa HAMBI 1487 pertenecía a un grupo que contiene varias especies mesorhizobial. Ocho cepas (HAMBI 249, 260, 1395, 1480, 1499, 1604, 1625 y 1705) no estaban relacionadas con ninguna de las especies establecidas incluidas, ni con los grupos 8 u 11 (Nick *et al.*, 1999).

## V. CONCLUSIONES

- ❖ En la caracterización morfológica, todas las cepas mostraron las mismas características: borde liso, color blanco, aspecto translúcido, textura gomosa y forma convexa; no se obtuvo ninguna diferencia con las características morfológicas de las cepas.
- ❖ En el análisis de las huellas genómicas, se encontró una gran diversidad genética; ya que se obtuvo 34 grupos diferentes de cepas, pudiendo ver que entre accesiones de frijol si existe diversidad genética, en cuanto a rhizobium.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda seguir estudiando estas cepas a nivel molecular, para saber a qué especie de rhizobium pertenece cada una de ellas.
- Realizar más estudios a nivel de la región y del país de la caracterización morfológica y molecular de las leguminosas, para conocer sus características morfológicas y su diversidad genética.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J. (2017). Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa* .
- Ángeles Núñez, J. G. & Cruz Acosta, T. (2015). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 929-942.
- Calero, A.; Pérez, Y.; Quintero, E.; Olivera, D. & Peña, K. (2019). Efecto de la aplicación asociada entre *Rhizobium leguminosarum* y microorganismos eficientes sobre la producción del frijol común. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 295-308.
- Cantaro, A.; Huaranga, A. & Zúñiga, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *IDESIA*, 73-81.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). (2016). FAOSTAT. Disponible en <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Granda, K.; Colás, A.; Cupull, R.; Gutiérrez, Y. & Torres, R. (2009). Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) . *Centro Agrícola*, 5-14.
- Granda, K. & Torres, R. (2013). Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur de Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 6-15.
- Heras, J.; Domínguez, C.; Mata, E.; Pascual, V.; Lozano, C.; Torres, C. & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 1-8.
- Koeuth, T.; Versalovic, J. & Lupski, J. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*. 408-418.

- López, J.; Lépiz, R.; González, D.; Rodríguez, R.; López, E. & Olalde, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rhizobium colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 73-81.
- Mayz J.; Láres, A. & Alcorcés, N. (2010). Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana en *Vigna unguiculata* (L.) Walp.cv. C4A-3. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 194 – 202.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO (MINAGRI). (2016). *Series Históricas de Producción Agrícola- Compendio Estadístico*. . Lima-Perú. Disponible en <http://siea.minagri.gob.pe>.
- Nick, G.; Jussila, M.; Hoste, B.; Niemi, M.; Kaijalainen, S.; De Lajudie, P.; Gillis, M.; De Bruijn, F. & Lindstrom, k. (1999). Rhizobia Isolated from Root Nodules of Tropical Leguminous Trees Characterized Using DNA-DNA dot-blot Hybridisation and rep-PCR Genomic Fingerprinting . *Systematic and Applied Microbiology*, 287-299.
- Rajnovic, V.; Ramírez, M.; Kajic, S.; Igual, J.; Peix, A.; Velásquez, E. & Sikora, S. (2022). *Rhizobium croatiense* sp. nov. and *Rhizobium redzepovicii* sp. nov., two new species isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* in Croatia. *Systematic and Applied Microbiology*. 1-7.
- Richards, N. (1987). *The microbiology of terrestrial ecosystems*. Harlow, Reino Unido: Longman Group UK Ltd.
- Rincón, J.; Clavero, T.; Razz, R.; Pietrosemoli, S.; Mendez, F. & Noguera, N. (2000). Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). *Revista Facultad de Agronomía*, 342-357.
- Sessitsch, A.; Howieson, G.; Perret, X.; Antoun, H. & Martínez, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 323-378.
- Sneath, P. & Sokal, R. (1975). Human biology. *Reviews Numerical taxonomy*, 285-288.

- Vilchez, J. (2017). Capacidad antagonista y promotora del crecimiento vegetal de rizobacterias aisladas del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). (*Tesis de Título Profesional*). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, Lima.
- Villanueva, E. & Quintana, A. (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 24-103.

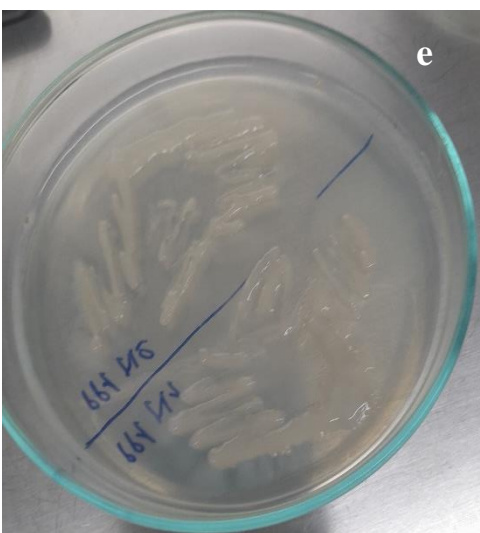
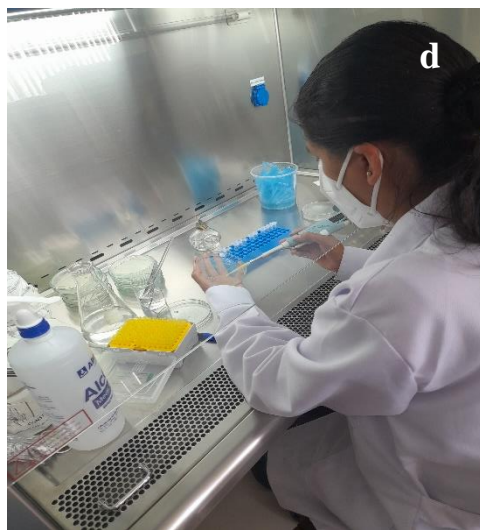
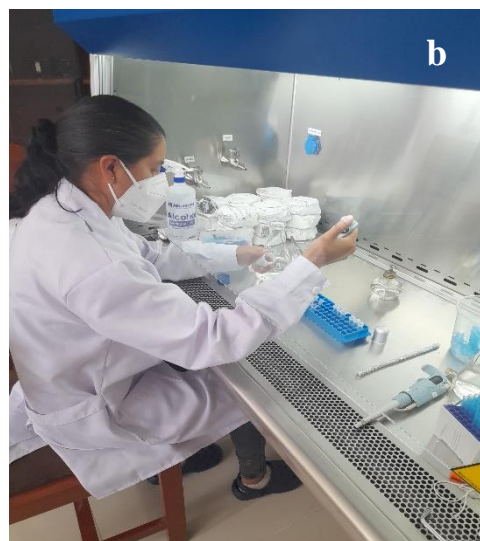
## ANEXOS

**Anexo 1.** Fotografías de raíces con nódulos de frijol. **a.** Frijol Pinto. **b.** Toda la vida Crema. **c.** Perciano Rojo. **d.** Manteca. **e.** Pinto Plomo. **f.** Pinto Rayado. **g.** Toda la Vida Negro Rayado. **h.** Toda la Vida Crema Rayado. **i.** Canario.

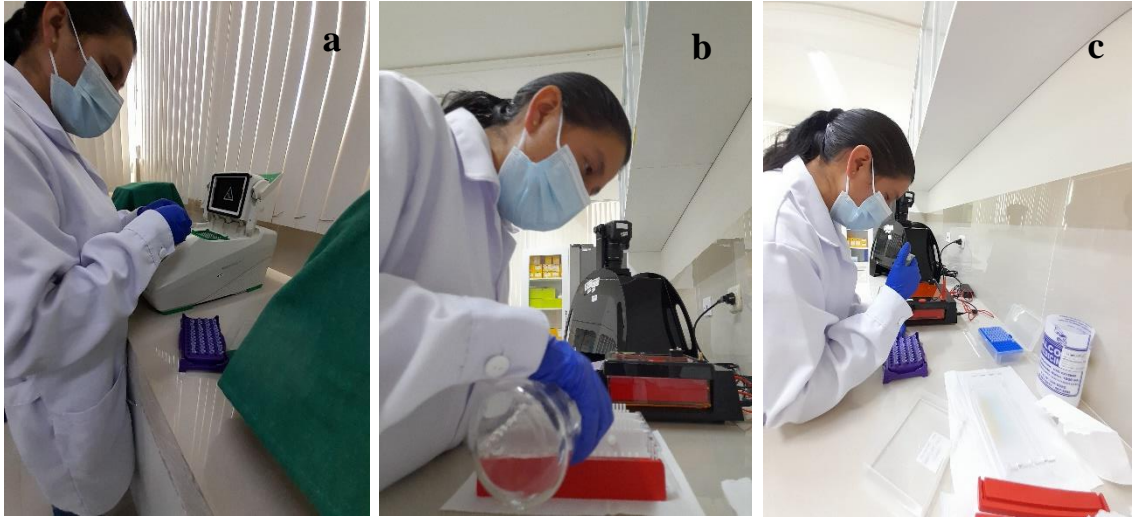




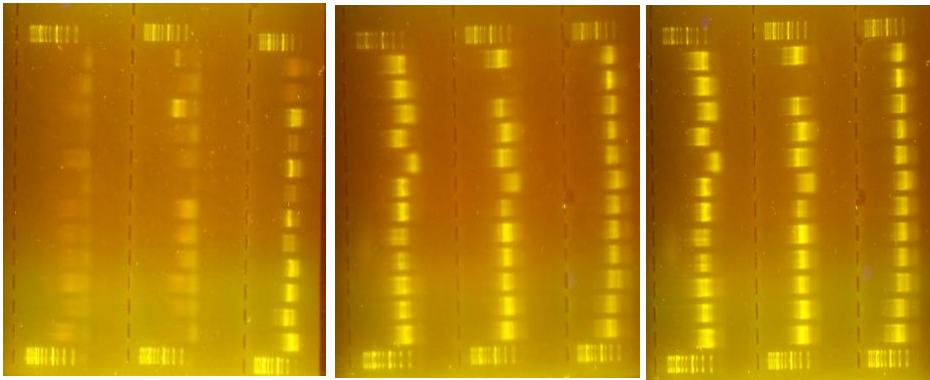
**Anexo 2.** Fotografías de actividades realizadas en laboratorio. **a.** Sirviendo medio de cultivo. **b.** Desinfección de nódulos. **c.** Chancando los nódulos. **d.** Sembrando los nódulos en medio de cultivo. **e.** Colonias de rhizobium. **f.** Aislamiento de cepas.



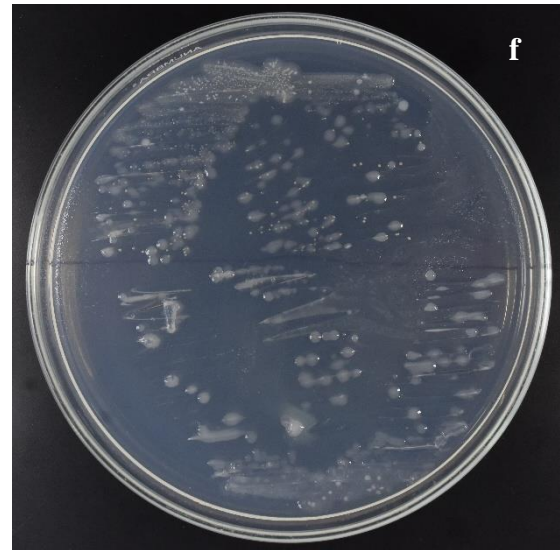
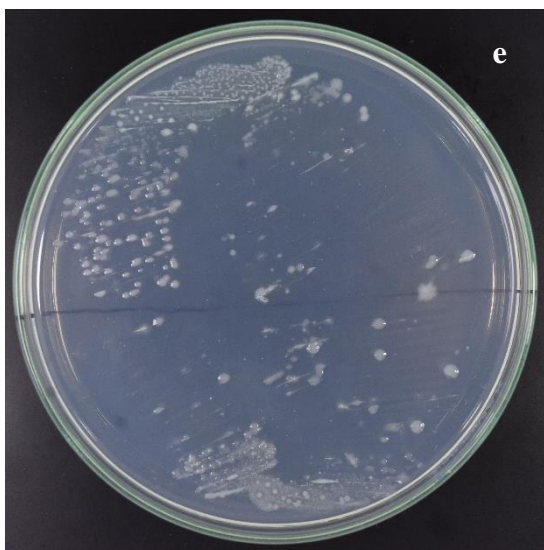
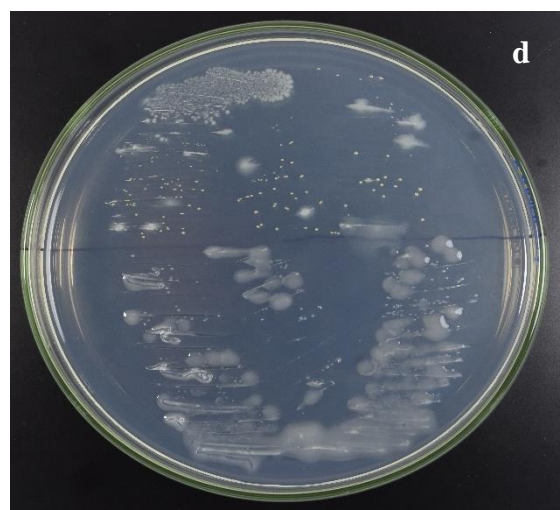
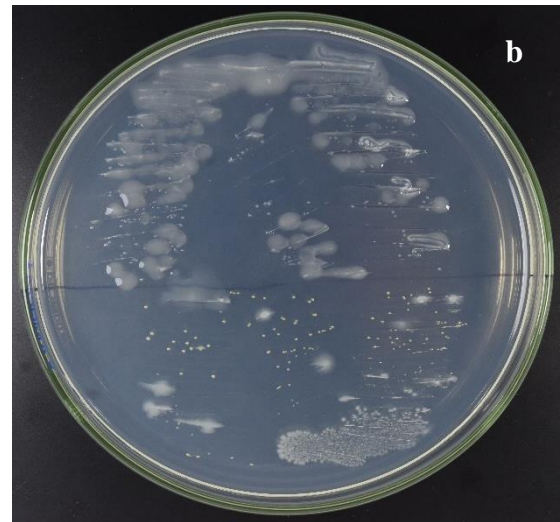
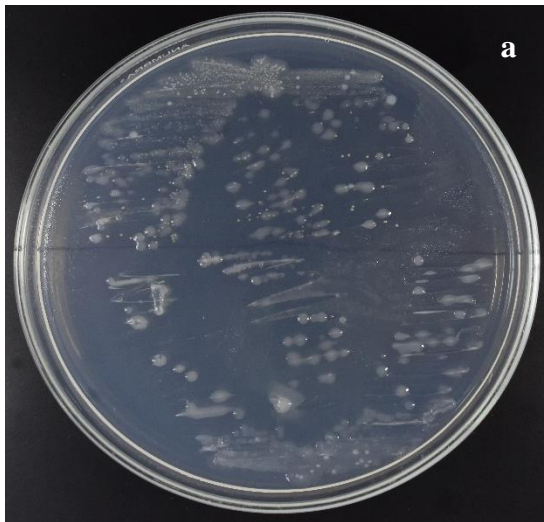
**Anexo 3.** Fotografías de actividades realizadas en biología molecular. **a.** Poniendo las muestras en el termociclador. **b.** Preparando gel agarosa. **c.** Colocando las muestras en el gel agarosa.



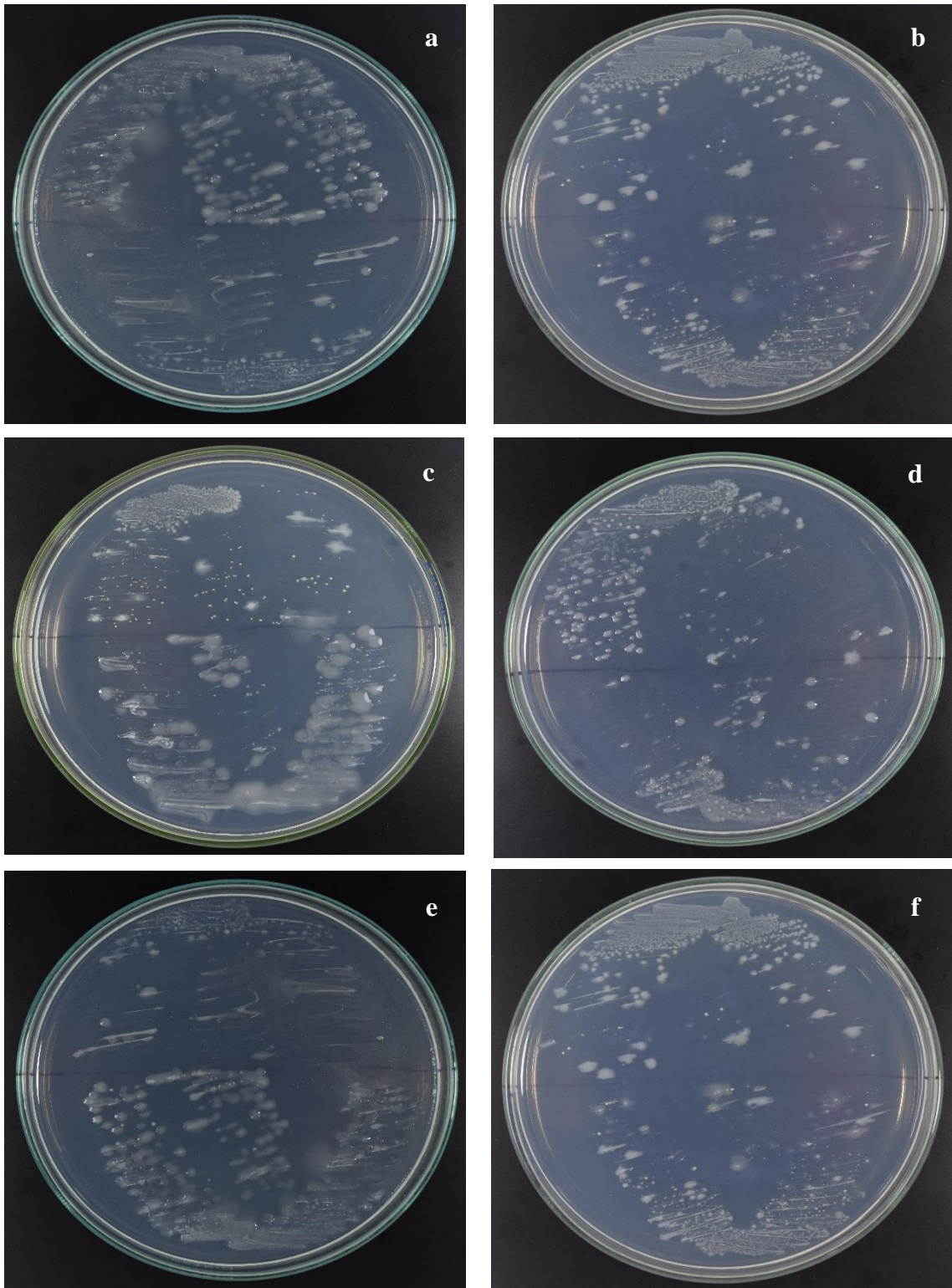
**Anexo 4.** Fotografías de las huellas genómicas de cepas de rhizobium.



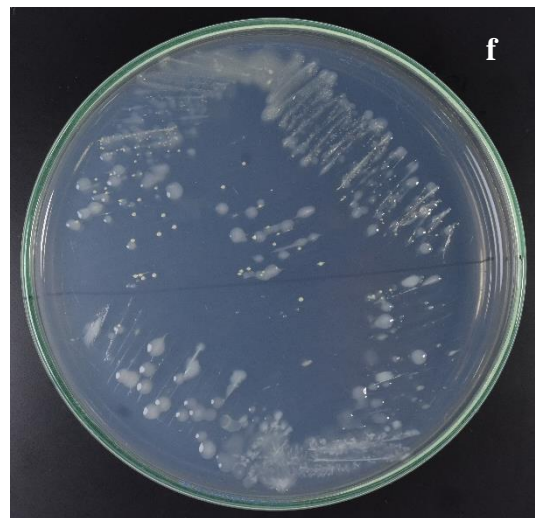
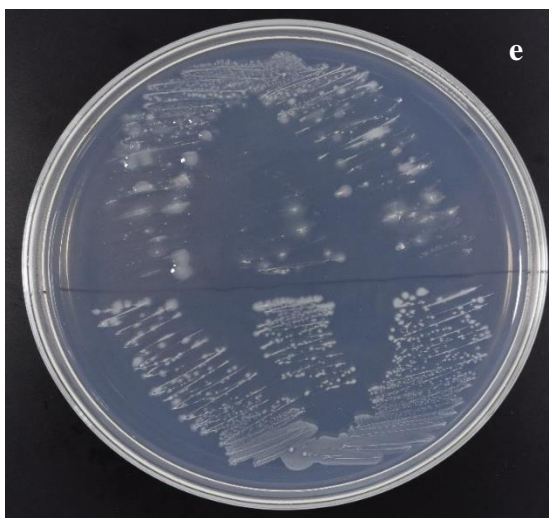
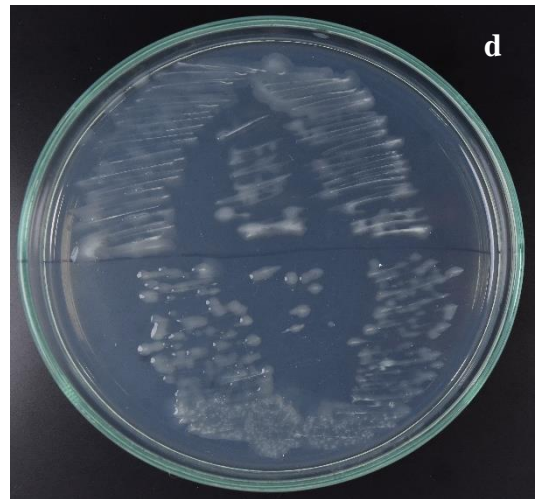
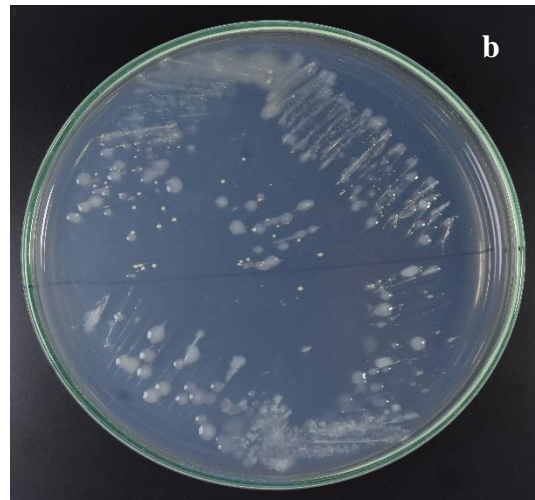
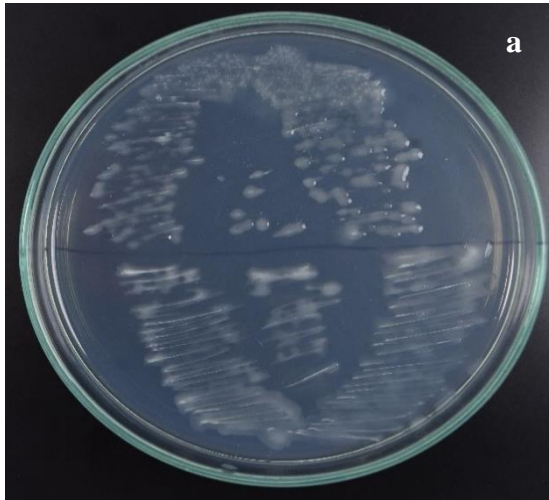
**Anexo 5.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



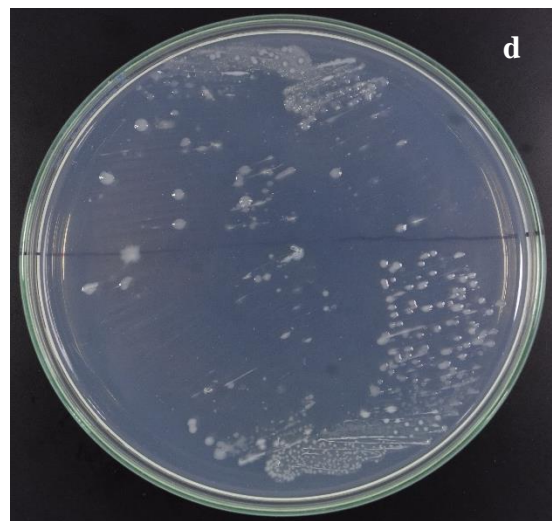
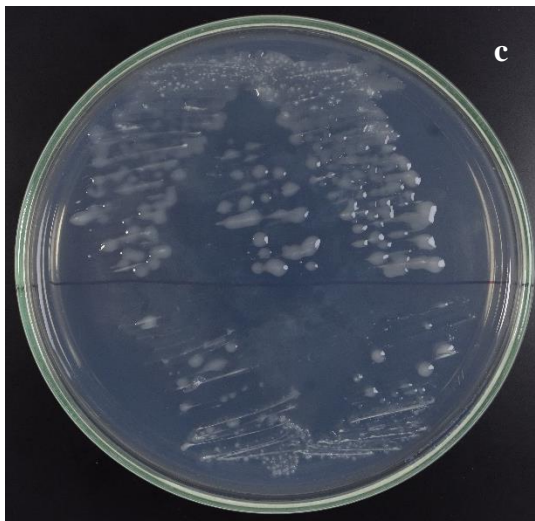
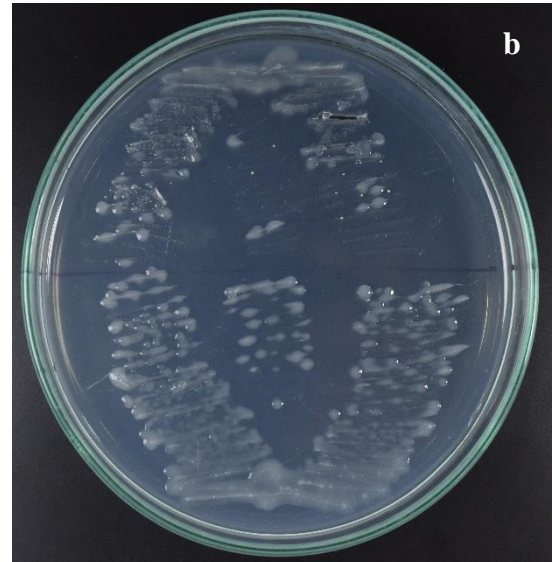
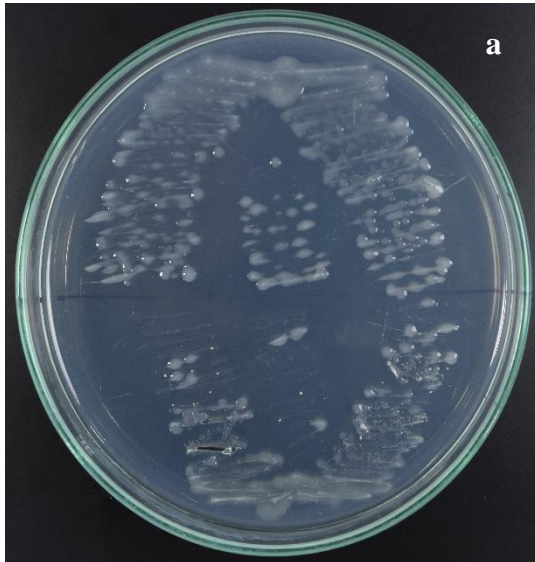
**Anexo 6.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Toda la vida crema. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



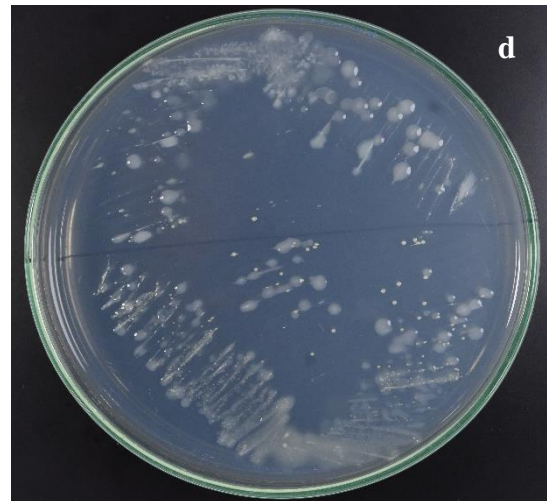
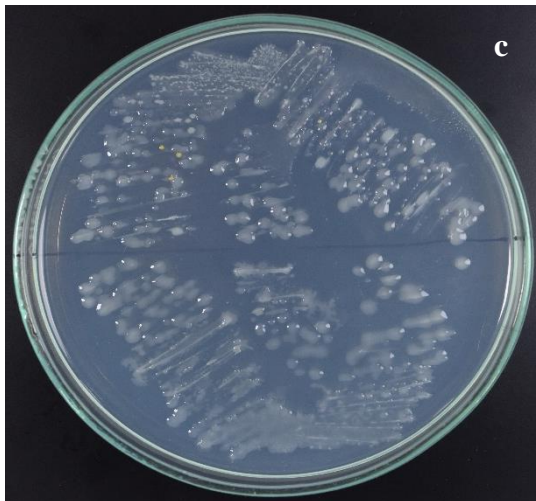
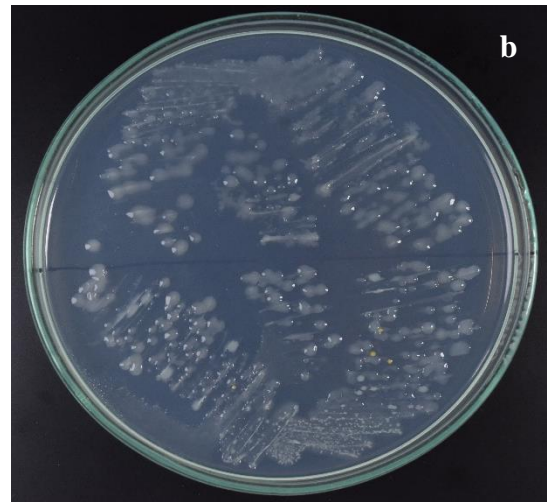
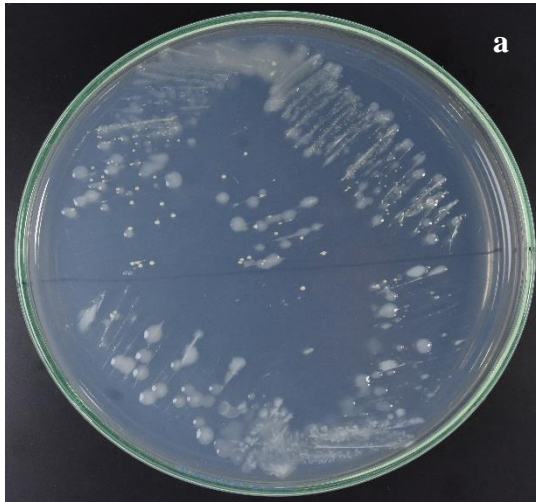
**Anexo 7.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Perciano rojo. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



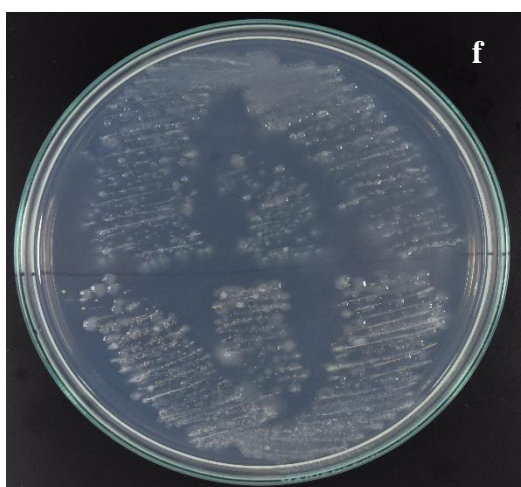
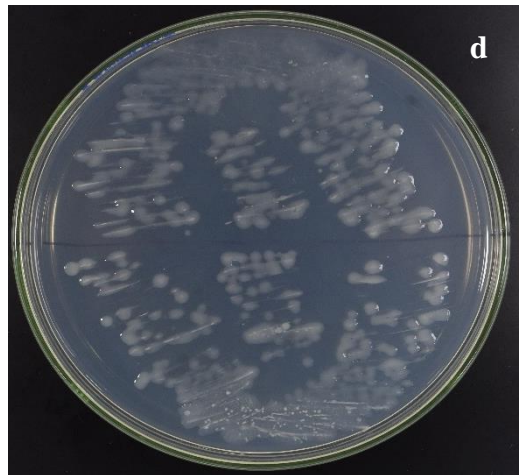
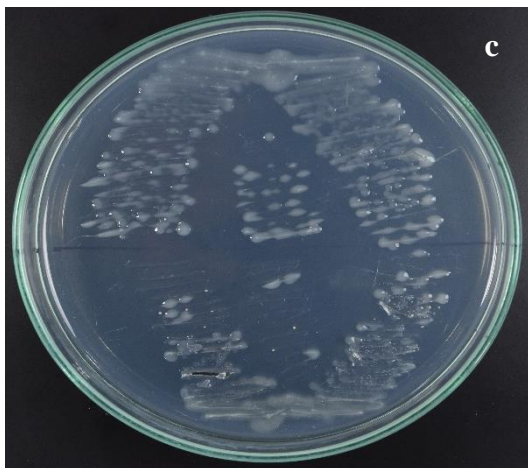
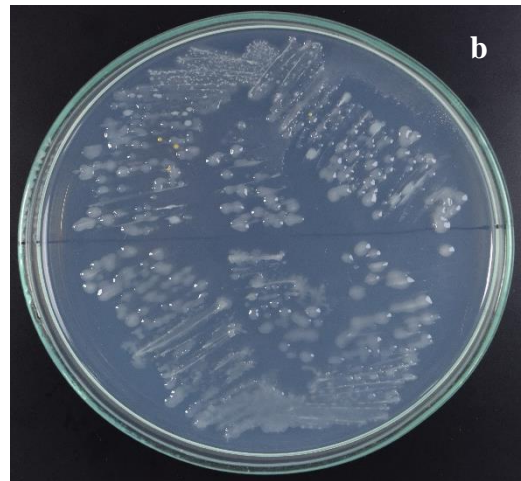
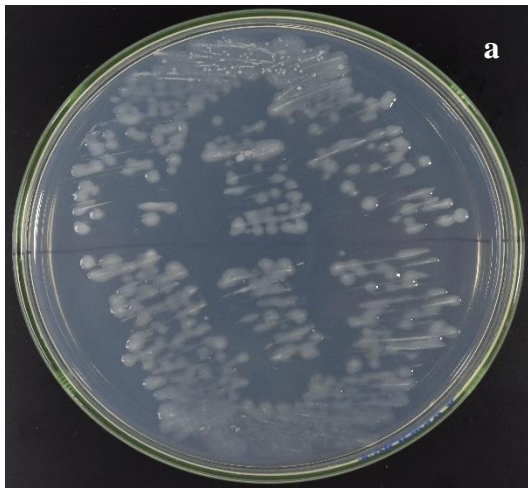
**Anexo 8.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Manteca. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



**Anexo 9.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto plomo. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



**Anexo 10.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Pinto rayado. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



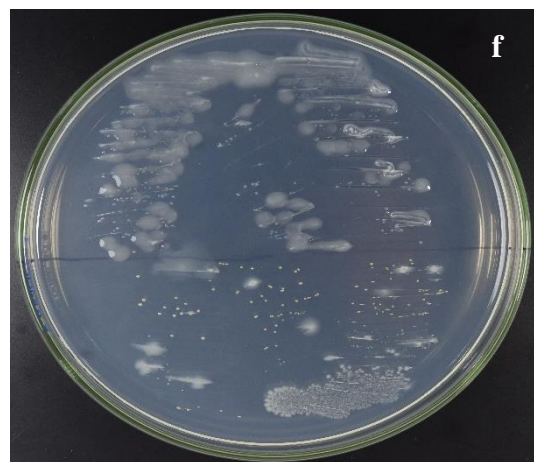
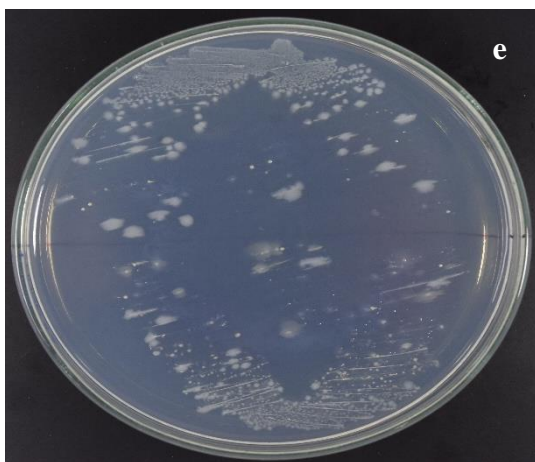
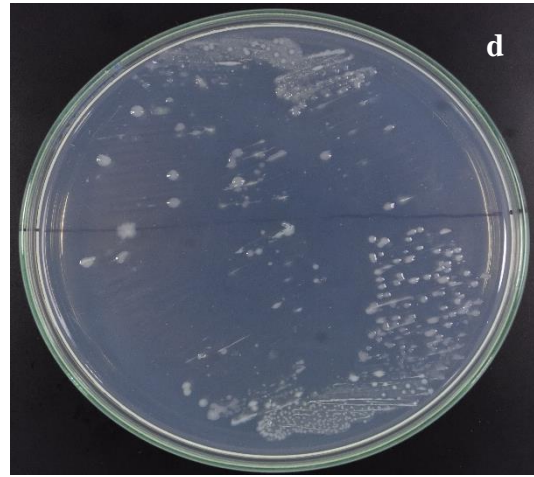
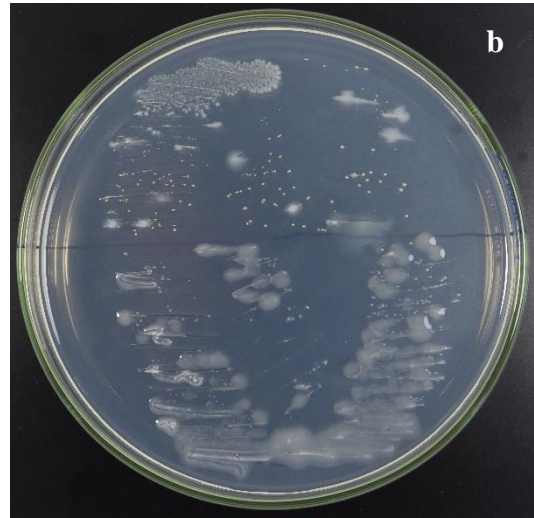
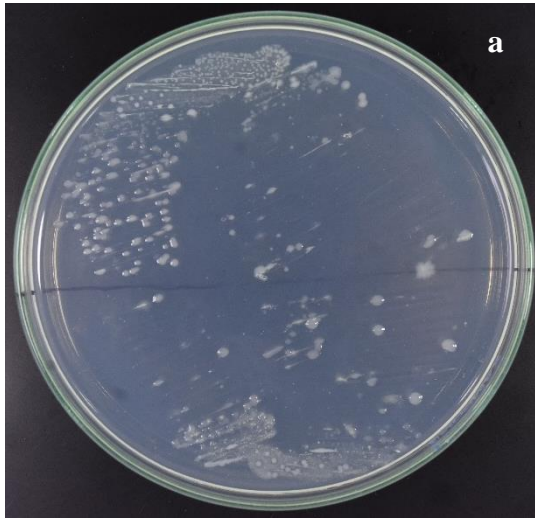


**Anexo 11.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Toda la vida negro rayado.

**a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4.

**c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4.

**e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.

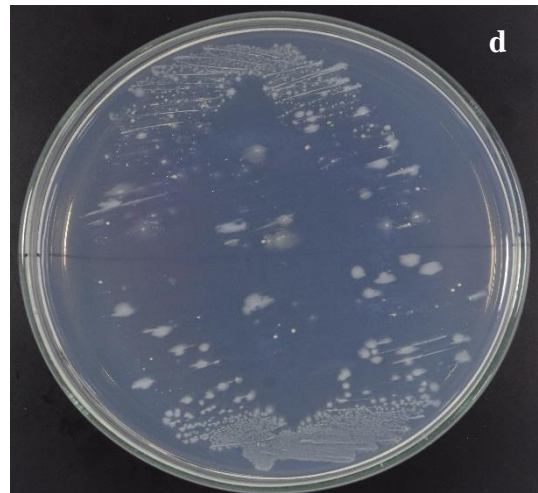
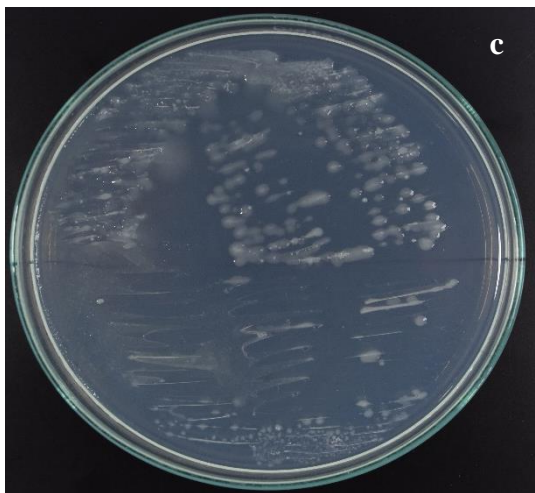
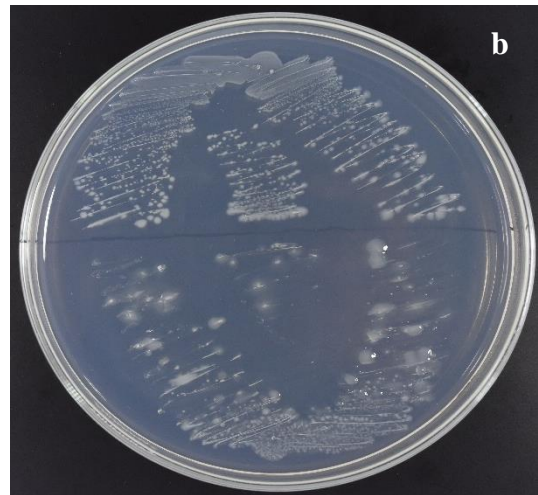
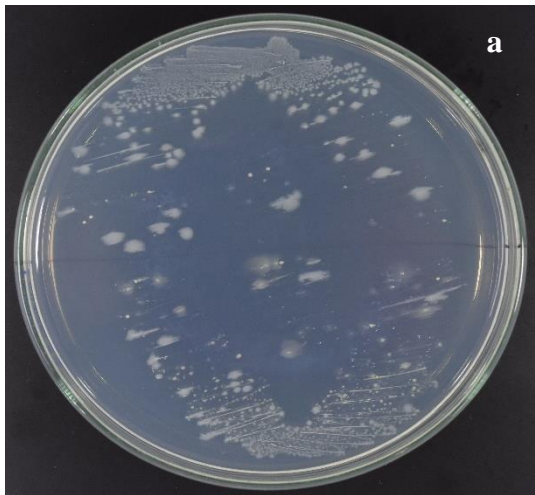


**Anexo 12.** Fotografías de cepas de *Rhizobium* del frijol Toda la vida crema rayado.

**a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4.

**c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4.

**e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.



**Anexo 13.** Fotografías de cepas de rhizobium del frijol Canario. **a.** Cepas de la planta uno, del nódulo 1 y 2. **b.** Cepas de la planta uno, del nódulo 3 y 4. **c.** Cepas de la planta dos, del nódulo 1 y 2. **d.** Cepas de la planta dos, del nódulo 3 y 4. **e.** Cepas de la planta tres, del nódulo 1 y 2. **f.** Cepas de la planta tres, del nódulo 3 y 4.

