




Volumen 1, Número 1, Julio - Diciembre 2021


Recibido: 21/07/2021, Aceptado: 05/11/2021, Publicado: 30/11/2021

Open Access

Identificación de rizobios en nódulos de *Lupinus alopecuroides* Desr. desarrolladas en las chacras de Castrovirreyna, Huancavelica

Identification of rhizobia in nodules of *Lupinus alopecuroides* Desr. developed in the farms of Castrovirreyna, Huancavelica

 Viane Marytrini Mejia Huaranca
Universidad Nacional de Barranca
mary.vianita@gmail.com

 Gregorio José Arone Gaspar
Universidad Nacional de Barranca
garone@unab.edu.pe

RESUMEN

Una de las leguminosas nativas de la región Puna y Janca de nuestro país es *Lupinus alopecuroides* Desr, esta leguminosa posee rol importante como planta pionera en colonizar espacios de suelos poco evolucionados y una vez establecida contribuye a regenerar la productividad natural de las chacras mediante la fijación biológica del N. Asimismo, los campesinos lo emplean en diversas actividades, en la salud de las personas y animales y para generar energía calorífica (leña). Dada su importancia se planteó analizar el endosimbionte de nódulos radicales de *L. alopecuroides* Desr desarrolladas en las chacras de Chocra Pucro (3996 m.s.n.m.), Castrovireyna, Huancavelica. Se evaluó 60 nódulos procedente de 20 plantas, se tomaron 3 nódulos por planta utilizando muestreo simple-aleatorio y se cultivaron en medio YEM. Lo que permitió obtener 30 aislados, cuando se amplificaron y secuenciaron el gen 16S rRNA se reagruparon en 14 géneros, 03 de ellos pertenecen a las rizobiaceas (*Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. y *Phyllobacterium* sp.), y una vez inoculadas empleando plántulas de *L. alopecuroides*, el género *Bradyrhizobium* logró formar protuberancias de nódulos radicales. Asimismo, en los nódulos viven otros géneros no rizobianos como *Erwinia*, *Rahnella*, *Serratia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Pantoea*, cuya función queda por aclarar.

Palabras clave: rizobios, endosimbiontes, *Lupinus alopecuroides*, *Bradyrhizobium*, 16S rRNA.

ABSTRACT

One of the native legumes of the Puna and Janca region of our country is *Lupinus alopecuroides* Desr, this legume has an important role as a pioneer plant in colonizing spaces of poorly evolved soils and once established contributes to regenerate the natural productivity of the farms through the biological fixation of the N. Likewise, the peasants use it in various activities, in the health of people and animals and to generate heat energy (firewood). Given its importance, it was proposed to analyze the endosymbiont of radical nodules of *L. alopecuroides* Desr developed in the farms of Chocra Pucro (3996 m.a.s.l.m.), Castrovireyna, Huancavelica. 60 nodules from 20 plants were evaluated, 3 nodules per plant were taken using simple-random sampling and grown in Yem medium. What allowed to obtain 30 isolates, when the 16S rRNA gene was amplified and sequenced, they were regrouped into 14 genera, 03 of them belong to the rhizobiaceas (*Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. and *Phyllobacterium* sp.), and once inoculated using seedlings of *L. alopecuroides*, the genus *Bradyrhizobium* managed to form radical nodules. Also, in the nodules live other non-rhizobian genera such as *Erwinia*, *Rahnella*, *Serratia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Pantoea*, whose function remains to be clarified.

Keywords: rhizobia, endosymbionts, *Lupinus alopecuroides*, *Bradyrhizobium*, 16S rRNA.

INTRODUCCIÓN

Los *Lupinus* spp. que crecen en diversos nichos de nuestro Perú sean cultivables o silvestres, se reconocen como tarwi, qera, chocho, lupino, anazo, etc. (Camarena et al., 2012) En Castrovirreyna, Huancavelica, a 3996 m.s.n.m. podemos encontrar a *Lupinus alopecuroides* un pariente de *Lupinus mutabilis* que se cultiva como alimento desde la época prehispánica (Jacobsen et al., 2006; Barney, 2011). Este grupo de leguminosas, sean silvestres o domesticadas, son de interés para los campesinos, porque lo emplean en la actividad agrícola como mejoradora de la capacidad productiva de sus suelos,

gastronomía, medicina, insecticida, ornamental, y biocombustible (Camarena et al., 2012; Davies et al., 2013; Huamán et al., 2013; Chirinos-Arias, 2015). Además, son plantas pioneras en revegetar suelos poco evolucionados y degradados, y una vez establecidas contribuyen a mejorar su productividad natural, lo que es aprovechada por las familias campesinas para cultivar sus siembras y asegurar la suficiencia alimentaria (García-Hernández, 2010; Saravia, 2015). Otra característica de esta leguminosa es que son flexibles al estrés abiótico (bajas temperaturas metales pesados, sequía, suelos granizados, ácidos, nitratos, salinidad, nieve, etc.) (Sato et al., 2010; Paisio et al., 2012).



Por otro lado, debido al incremento de la temperatura ambiental, los suelos frágiles de las regiones naturales de Suni, Puna y Janca de la región andina, que antes se consignaban para el pastoreo y crianza de camélidos, ovino y vacuno, hoy, comienzan a ser incorporados para la siembra de maca y otros cultivos, y dado que estos suelos se hallan en diversos grados de pendiente y expuestas a la erosión, pierden rápidamente su capacidad productiva y son abandonados. En este escenario, el mejor aliado para recuperar la productividad natural de los suelos, sin duda, son las leguminosas adaptadas a altitudes superiores a 3900 m como *L. alopecuroides* que habita en este nicho y son fuente barata de biomasa y puede aportar de 36.000 a 66.000 kg por ha de biomasa verde, 7.0 a 11.69 t por ha de biomasa seca y 288.4 a 501.12 kg de N por ha (Barrera, 2015). Asimismo, cabe indicar, actualmente, el Gobierno Regional de Huancavelica, mediante Ordenanza Regional N° 423-Gob.Reg-Hvca/CR desde el 17 de julio de 2019, vienen promoviendo e implementado en la región la producción orgánica, lo que motiva desarrollar actividades que contribuyan a su sostenibilidad mediante el empleo de leguminosas como *L. alopecuroides*, que permite restablecer la fertilidad natural y la salud de los suelos (Valderrama et al., 2015), de allí el interés por conocer el endosimbionte, por lo que se ha planteado analizar los simbiontes localizados en los nódulos radicales de *L. alopecuroides* desarrolladas en las chacras de Chocra Pucro, Castrovirreyna, Huancavelica, que permite la asimilación del N atmosférico y facilita la vida campesina en sus diversas actividades productivas, la salud, alimentación y el cuidado del ambiente, más aún en estos tiempos donde el

fertilizante nitrogenado ha incrementado su costo y hace más dependiente a la actividad agrícola campesina, ha parte de generar contaminación del suelo, agua y el ambiente.

METODOLOGÍA

Se empleó plantas de *L. alopecuroides* Desr en etapa de floración desarrolladas en las chacras de Chocra Pucro (3996 m.s.n.m.), Castrovireyna, Huancavelica.

Aislamiento de bacterias y medio de cultivo

Se evaluó 60 nódulos procedente de 20 plantas, se tomaron 3 nódulos por planta utilizando muestreo simple-aleatorio y se empleó el método dependiente empleando medio YEM. Los nódulos fueron transportados para su análisis al Laboratorio de IBPM (Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo) de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de Huancavelica. Para retirar el suelo adherido a los nódulos se lavaron en tubos falcon con abundante agua estéril. Para la esterilización superficial de los nódulos, los nódulos se sumergieron en etanol al 99% durante 60 s y una vez tapado herméticamente se agitó manualmente y en seguida se eliminó el etanol. Seguidamente, se añadió NaOCl al 5% por 15 minutos, constantemente se agito y finalmente se eliminó, para luego sumergir los nódulos en etanol al 99% por 30 s, pasado este periodo se eliminó el etanol y se procedió con el lavado por 5 veces empleando agua destilada estéril. Una vez esterilizada superficialmente, los nódulos estériles se colocaron en un mortero estéril, al cual se añadió 1 ml de tampón fosfato 67 mM estéril luego se

trituro empleando un pilón estéril. El líquido extraído se cultivó en placas Petri con medio YEM (Vincent, 1970). Los aislados crecieron a 30 °C por 8 días y las colonias resultantes fueron visualizadas y diferenciadas con la ayuda de una lupa y purificadas hasta lograr colonias uniformes (Talbi, 2011; Arone, 2012; Arone et al., 2014).

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

La extracción de ADN se realizó de las células bacterianas empleando el kit RealPure Genomic DNA Extraction (Durviz, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la cantidad y calidad de ADN empleando un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop ND1000). La secuenciación y amplificación del gen 16S rRNA (Woese, 1987; Woese y Fox, 1977; Amaral-Zettler et al., 2008) de los aislados se efectuaron en el Laboratorio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidin, en Granada, España. Una vez obtenida las secuencias estas se contrastaron con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLASTN (Altschul et al. 1990). Los estudios filogenéticos se ejecutaron en Mega 7 versión 7 (Kumar et al., 2016).

Pruebas de nodulación de la planta

En cuanto a las semillas del *L. alopecuroides*, estas fueron superficialmente esterilizadas para luego dejarlos germinar a 25 °C en la incubadora. Obtenidas las plántulas se trasplantaron en jarras Leonard (Leonard, 1943) (tres plántulas/jarra) que contiene vermiculita estéril y fueron inoculadas con alrededor de 10⁹ células/ml, por separado y con cada uno de los aislados. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero, empleando nutrición líquida (Rigaud y Puppo, 1975), una solución mineral carente de N. Las plántulas se evaluaron a los 50 días después de haber inoculado

RESULTADOS

Cultivada los extractos de los nódulos de *L. alopecuroides* se consiguieron 30 aislados y una vez secuenciadas parcialmente el gen 16S rRNA se reagruparon en 14 grupos. La comparación de las secuencias mediante las herramientas de BlastN, asignó además de otros miembros a 3 géneros rizobianos, *Rhizobium* sp., *Phyllobacterium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., que corresponden a las Alphaproteobacterias y constituyen el 26% de los aislados (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1

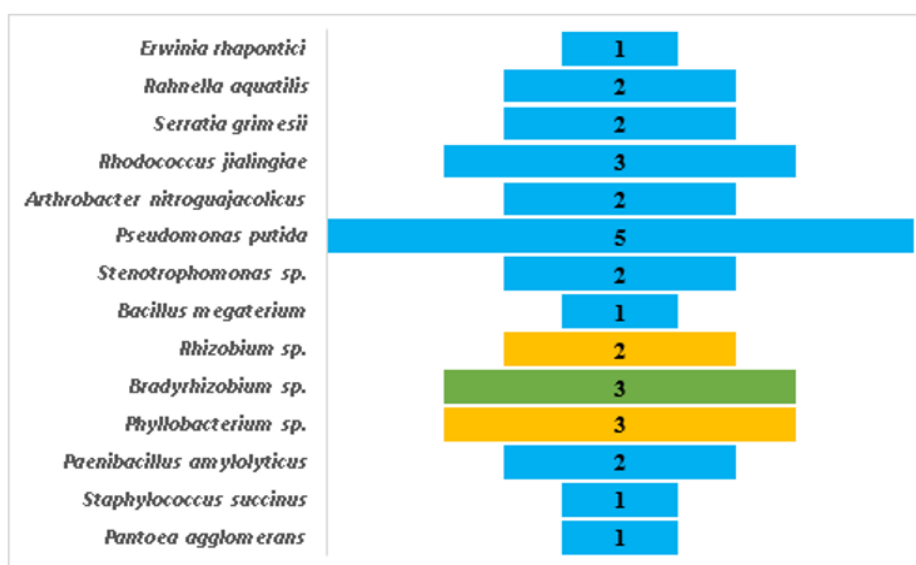
Caracterización de aislados de nódulos de L. alopecuroides de Chocra Pucro, Castrovirreyna, Huancavelica

Grupo REP	Aislados y su número	Orden	Familia	Especie filogenética
I	V1 (1)	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia rhapontici</i>
IX	V16 (1)	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus megaterium</i>
XIII	M8 (1)	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus succinus</i>
XIV	M7 (1)	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea agglomerans</i>
II	V2, V3 (2)	enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Rahnella aquatilis</i>
III	V4, V5 (2)	enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Serratia grimesii</i>
V	V8, V17 (2)	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>
VIII	V11, V12 (2)	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
XII	V24, 25 (2)	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
VII	V10, V15 (2)	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium sp.</i>
X	V18, V21, V26 (3)	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium sp.</i>
XI	V20, V22, V27 (3)	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	<i>Phyllobacterium sp.</i>
IV	V6, V7, V23 (3)	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus jialingiae</i>
VI	V9, M9, V13, V14, V19 (5)	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas putida</i>

Fuente: Adaptación a partir de los resultados de secuenciación parcial y amplificación del gen 16S rRNA de los aislados realizados en el Centro de Secuenciamiento de la Estación Experimental del Zaidín en Granada, España.

Figura 1

Bacterias endosimbiontes de nódulos radicales de L. alopecuroides desarrolladas en las chacras de Chocra Pucro, Castrovirreyna, Huancavelica.



DISCUSIÓN

Los rizobios que establecen asociaciones simbióticas con *Lupinus* corresponden estrechamente al género *Bradyrhizobium* sp. (Barrera et al., 1997); aunque otros estudios indican como simbiosis a otros géneros como *Microvirga lupini* que nodula a *Lupinus texensis* (Andam & Parker, 2007; Ardley et al. 2012). Se han demostrado también que la nodulación de *L. albus* prospera con *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al., 2005); en cambio, *Trifolium repens* y *L. albus* forma simbiosis con *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et al., 2005). La especie *Lupinus montanus* un pariente silvestre de *L. alopecuroides* forma simbiosis con el género *Bradyrhizobium* sp (Corona et al., 2006).

Para ratificar la capacidad de nodulación y simbiosis de los aislados V22 (*Phyllobacterium* sp.), V18 (*Bradyrhizobium* sp.) y V10 (*Rhizobium* sp.) se emplearon para inocular la planta huésped del cual fueron aisladas. Una vez pregerminadas las semillas, las plántulas de *L. alopecuroides* se inocularon con cada uno de los aislados y transcurrido el tiempo (50 días después de la inoculación) las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. establecieron protuberancias de nódulos radicales y se apreció plantas más vigorosas. En cambio, las plantas inoculadas con los aislados V22 (*Phyllobacterium* sp.) y V10 (*Rhizobium* sp.) llegaron a marchitarse, lo cual corrobora que *Bradyrhizobium* sp. es el endosimbionte del *L. alopecuroides* (Barrera et al., 1997) (Fig. 2).

Figura 2

Plantas de *L. alopecuroides* inoculadas con los aislados V18, V22 y V10, aislados procedentes de la misma planta.



Asimismo, Taco y Zuñiga (2020) indican al género *Bradyrhizobium* como el simbiote de una especie silvestre de lupino (*Lupinus* sp.). Igualmente, Lezama (2010) indica que en 10 especies del género *Lupinus*, *L. aridulus* C.P, *L. subtomentosus* C.P. Sm., *L. affmutabilis*, *L. brachypremnon* C.P. Sm, *L. carazensis* Ulbr., *L. lindleyanus* J. Agardh, *L. eriocladius* Ulbr, Sm, *L. mutabilis* Sweet., *L. weberbaueri* Ulbr. y *L. paniculatus* Desr, 7 especies de *Lupinus* forman simbiosis con el género *Bradyrhizobium* y 3 con el género *Mesorhizobium*. En este experimento no se llegó a detectar la presencia del género *Mesorhizobium*. Finalmente, el género *Lupinus* encierra alrededor de 275 especies de plantas entre hierbas y arbustos (Hughes y Eastwood, 2006) y los estudios realizados sobre sus simbiosis tanto dentro de su ambiente nativo (Barrera et al., 1997; Parker & Kennedy, 2006), como fuera de su área nativa (Stepkowski et al., 2005), indican que

predominantemente forman simbiosis con *Bradyrhizobium* (Andam & Parker, 2007).

Por otro lado, en los nódulos radicales de *L. alopecuroides*, aparte de los rizobios y el género simbiote, se hallaron otros géneros como *Rahnella*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Phyllobacterium*, *Pantoea*, *Erwinia* y *Serratia*. Al respecto, Huasasquiche (2018), al determinar el simbiote del tarwi (*L. mutabilis* Sweet) empleando secuenciación del gen 16S rRNA y genotipado molecular con BOX-PCR, obtiene al género *Bacillus* como endosimbiote que posee funciones como productora de ácido indol acético y solubilizadora de fósforo. Simultáneamente, revela la existencia de otros géneros como *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterococcus* y *Achromobacter*. Del mismo modo, en los nódulos de *L. montanus* se han descrito 3 géneros de bacterias: *Pseudomona* sp *Rhizobium* sp. y *Brevibacillus* sp. en el cual no se encontró la presencia del género *Bradyrhizobium* sp. (Corona et al., 2006). La diversidad de los simbioses, probablemente responden a la diversidad de climas y suelos y la adaptación y coevolución de las plantas para con sus diversos simbioses (de Moura et al., 2020) (Figura 1 y Tabla 1).

La simbiosis de *Bradyrhizobium* sp entre el *Lupinus alopecuroides* es vital por todos los beneficios que otorga esta asociación simbiótica, que hace posible que en los espacios de alta montaña se pueda utilizar su biomasa para recuperar la productividad de las chacras, porque es la fuente más barata de acceder al nitrógeno, un insumo que tiene mucha influencia en la producción de cosechas (Barrera, 2015).

Igualmente, esta planta se puede emplear para biorremediar ambientes contaminados con metales (Barrera, 2015).

CONCLUSIONES

La secuenciación parcial del gen 16s rRNA y la prueba biológica, indica que *Bradyrhizobium* sp. es el simbiote del *Lupinus alopecuroides*, una especie de leguminosa que se desarrolla en las chacras de Chocra Pucro Castrovirreyna – Huancavelica.

En los nódulos radicales de *L. alopecuroides*, conviven otras bacterias endosimbióticas, como *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Staphylococcus*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Stenotrophomonas* y *Pantoea*, cuyas funciones se desconoce.

REFERENCIAS

- [1] Andam, C. P., & Parker, M. A. (2007). Novel alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5687–5691. <https://doi.org/10.1128/AEM.01413-07>
- [2] Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Meyer E and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- [3] Amaral-Zettler, L., Peplies, J., Ramette, A., Fuchs, B., Ludwig, W. (2008). Actas del taller internacional sobre tecnología de ARN ribosómico, 7 al 9 de abril de 2008, Bremen, Alemania. *Syst y Appl Microbiol* 31: 258–268.

- [4] Ardley, J. K., Parker, M. A., De Meyer, S. E., Trengove, R. D., O'Hara, G. W., Reeve, W. G., Yates, R. J., Dilworth, M. J., Willems, A., & Howieson, J. G. (2012). *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(11), 2579–2588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035097-0>
- [5] Arone, G. J. (2012). *Biodiversidad microbiana en chacras maiceras de Allpas (Acobamba, Huancavelica, Perú) cultivadas bajo el sistema tradicional andino*. Agencia Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental del Zaidín-Granada. Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR 730-2013 ISBN: 978-84-9028-412-4.
- [6] Arone, G., Calderón, C., Moreno, S., & Bedmar, E. J. (2014). Identification of *Ensifer* strains isolated from root nodules of *Medicago hispida* grown in association with *Zea mays* in the Quechua region of the Peruvian Andes. *Biology and Fertility of Soils*, 50(1), 185–190. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0825-3>
- [7] Barney, V. (2011). Biodiversidad y ecogeografía del género *Lupinus* L. (leguminosae) en Colombia.
- [8] Barrera, E. (2015). Evaluación del frijol lupinus (*Lupinus mutabilis*) como abono verde para la producción agroecológica en el municipio de Subachoque en Cundinamarca. Corporación universitaria minuto de Dios Facultad de ingeniería. Bogotá.
- [9] Barrera, N., García, S., Dávila, O., Martínez, E., y Rodríguez, O. (1997). Biodiversidad de *Bradyrhizobium* simbiontes de *Lupinus* e inducción de factores de nodulación. XVIII RELAR: 201-203.
- [10] Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., Garcia, F. J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., van Berkum, P., Martinez-Romero, E. (1997). Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1086–1091.
- [11] Camarena, F., Huaranga, A., Jiménez, J. y Mostacero, E. (2012). Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Primera Edición. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina-Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). 222 pp.
- [12] Chirinos-Arias, M. C., Jiménez, J. E., & Vilca-Machaca, L. S. (2015). Analysis of Genetic Variability among thirty accessions of Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) using ISSR molecular markers. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 17–30. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.02>
- [13] Corona, E., Munive, J., Sánchez, J., Corona, M., Salinas, F., Chávez, L., y Bermúdez, K., (2006). Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos de plantas de *Lupinus montanus* hbk. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Universidad Tecnológica de

- Tecamac. Universidad Benemérita de Puebla. Apartado Postal 24. Yautepec, Morelos. México.
- [14] Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381: 805-16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596060/>.
- [15] García, H. (2010). Metales Pesados, sales y sodio en suelos de Chinampa en México. *Agrociencia* 35:385-395.
- [16] Huamán, A., Chirinos-Arias, M., Solís, H., Sáez, G., Marocho, L., Guevara, J. (2013). Evaluación in vitro de la actividad antileishmanial y antitripanosomal del extracto acuoso de las hojas y semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”. *Anales Facultad de medicina* 74(Supl 1): S19.
- [17] Huasasquiche, L. (2018). *Aislamiento y caracterización de la microflora asociada al cultivo de tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)*. Tesis para Optar el Título Profesional de: Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina - Facultad De Ciencias. Lima, Perú.
- [18] Hughes, C., Eastwood, R. (2006). Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10334–10339
- [19] Jacobsen, S. E., Mujica, A., Moraes Ilgaard, R. B., Kvist, L. P., Borchsenius F., y Balslev H. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. En *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Edit. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 458-482.
- [20] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [21] Leonard, L. T. (1943). A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 45:523-527.
- [22] Lezama, P. (2010). Las Especies de *Lupinus* (Fabaceae) y de sus simbiontes en el distrito de Corongo-Ancash, Altramuces Legumbres – Variedades, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- [23] Paisio, C., González, P., Talano, M., y Agostini, E. (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. Departamento de Biología Molecular, FCEFQN, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601. C.P. 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Teléfono: 54-358-4676537; Fax: 54-358-4676232.
- [24] Parker, M. A., Kennedy, D. A. (2006). Diversity and relationships of bradyrhizobia from legumes native to eastern North America. *Can. J. Microbiol.* 52:1148–1157.
- [25] Rigaud, J, y Puppo, A, (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.
- [26] Saravia, M. (2015). Control Biológico del



- nematodo de la papa en el Marco de la Agricultura Conservacionista. Programa Integrado de Manejo de Cuencas, disponible en promic@promic-bolivia.org.
- [27] Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyzanska, A., McInnes, A., Law, I. J., Howieson, J. (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting *Lupinus* and *Serradella* in soils of Western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7
- [28] Taco-Taype, N, y Zúñiga-Dávila, D, (2020). Efecto de la inoculación de plantas de Tarwi con cepas de *Bradyrhizobium* spp. aisladas de un lupino silvestre, en condiciones de invernadero. I Congreso Internacional de Biotecnología e innovación (ICBi), *Revista peruana de biología número especial* 27(1): 035 - 042 (marzo 2020). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17577>
- [29] Talbi, C. (2011). *Nuevas estrategias para mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno en Phaseolus vulgaris cultivada en suelos afectados por estreses abióticos*. Editor: Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR 1182-2012, ISBN: 978-84-695-1156-5.
- [30] Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Molina, E. M., y Velázquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. Nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1318-1327.
- [31] Valderrama Romero, A. S.; Valencia Sallo, C.; Villalba Quispe, H. y Abril Porras, V. (2015). La importancia del lupino en el mantenimiento de la fertilidad del suelo. X Congreso de Ciencia y tecnología ESPE. Ecuador.
- [32] Valverde, A., Velazquez, E., Santos, F. F., Vizcano, N., Rivas, R., Mateos, P. F., Molina, E. M., Igual, J. M., y Willems. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989 A.
- [33] Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. *International Biological Programme Handbook* 15. Blackwell. Oxford.
- [34] Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51, 221-271.
- [35] Woese, C.R. y Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74, 5088–5090.