



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: CARPIO ESPINOSA, MARÍA JOSÉ

**TEMA: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS
DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.),
CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), HABA (*Vicia
faba* L.) Y VICIA (*Vicia* sp.) EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE IMBABURA Y
OBTENCIÓN DE UN BANCO DE CEPAS.**

DIRECTORA: MSc. KOCH KAISER, ALMA ROSEL

CODIRECTOR: ING. TAIPE BOLAÑOS, MARCO VINICIO

SANGOLQUÍ, FEBRERO 2014.

RESUMEN

Se aislaron ciento cinco cepas de rizobios a partir de nódulos de raíces de cinco plantas leguminosas, arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) de suelos de la provincia de Imbabura, Ecuador. Se reactivaron ocho cepas de su estado de liofilización, y se refrescaron ocho de su estado de vejez en medio de cultivo, mismas que pertenecen al banco de Rizobiología del INIAP; con el propósito de caracterizarlas morfológica y bioquímicamente, para identificar a que género taxonómico corresponden y formar un cepario de rizobios. Los nódulos recolectados fueron evaluados según sus características en las raíces de las leguminosas, encontrándose desde formas redondas hasta pleomórficas, coloraciones internas (roja, verde, blanca y negra) y externas (café claro y café oscuro), tamaños y cantidades variadas, y amplia distribución en raíces secundarias principalmente. Una vez aislados los rizobios de los nódulos, se sembraron y purificaron en medio levadura manitol agar (LMA) + rojo congo (RC). Diecinueve cepas de rizobios no fueron viables. A continuación, se realizaron pruebas de autenticación y pureza, observándose bacilos cortos Gram negativos, con reacción ácida y una sola cepa con reacción alcalina en los medios LMA + púrpura de bromocresol (PCB) y LMA + azul de bromotimol (ABT), y sin cambio de coloración en los medios glucosa peptona agar (GPA) + PBC y levadura lactosa agar (LLA) + reactivo de Benedict (RB), excepto por dos cepas de *Agrobacterium*. Fueron seleccionadas cien cepas, veintiocho de arveja, doce de chocho, veintiséis de fréjol, dieciocho de haba y dieciséis de vicia. El análisis de conglomerados de la caracterización morfológica y bioquímica clasificó a las cepas de rizobios asociados a los cultivos de arveja en siete y once grupos, de chocho en seis grupos, de fréjol en seis y trece grupos, de haba en cinco y once grupos, y de vicia en cuatro y ocho grupos, respectivamente. Para la morfología, se tuvo en cuenta la textura, cantidad de goma, elevación, apariencia, margen, color, tamaño y forma de las colonias; y para la bioquímica, la asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, y tolerancia a varios niveles de pH, antibióticos, metales, concentraciones de salinidad y de urea. Los resultados señalaron que los rizobios asociados a los cultivos de fréjol, arveja, haba y vicia pertenecen al género *Rhizobium*, los rizobios asociados a los cultivos de chocho pertenecen al género *Ochrobactrum* y uno al género *Bradyrhizobium*. Se identificaron catorce cepas de rizobios capaces de crecer mejor en condiciones hostiles, las cuales tienen un uso potencial como bioinoculantes. Esto afianza la posibilidad de establecer estudios que permitan evaluar en una etapa de invernadero y campo el potencial de fijación de nitrógeno (N) de las cepas caracterizadas.

Palabras clave: leguminosas, nodulación, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.

ABSTRACT

One hundred and five rhizobia strains were isolated from root nodules of five legumes plants, pea (*Pisum sativum* L.), lupine (*Lupinus mutabilis* S.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), broad bean (*Vicia faba* L.) and vetch (*Vicia* sp.) from Imbabura province soils of Ecuador. Eight strains were reactivated from its lyophilization state, and eight strains were refreshed from its old age in culture medium, the strains belong to INIAP Rhizobiology Laboratory; in order to characterize them morphologically and biochemically; and, to identify the taxonomic genera they correspond and to form a rhizobia strain collection. Nodules collected were evaluated according to their characteristics of legumes roots. These were round to pleomorphic form, red, green, black and white internal colors, and light brown and dark brown external colors, varying sizes and amounts, and wide distribution in secondary roots. Once rhizobia strains were isolated from the nodules, they were cultured and purified in yeast mannitol agar medium (YMA) + congo red (CR). Nineteen rhizobia strains were not viable. Authentication and purity tests were performed, short Gram negative bacilli were observed. It was observed acid reactions and a single strain with alkaline reaction in YMA + bromocresol purple (BCP) and YMA + bromothymol blue (BTB) mediums, and no color change in glucose peptone agar (GPA) + BCP and yeast lactose agar (YLA) + Benedict reagent (BR) mediums, except for two *Agrobacterium* strains. One hundred strains of rhizobia were selected, twenty eight of pea, twelve of lupine, twenty six of bean, eighteen of broad bean and sixteen of vetch. The cluster analysis of the morphological and biochemical characterization classified rhizobia strains associated with pea crops in seven and eleven clusters, with lupine crops in six clusters, with bean crops in six and thirteen clusters, with broad bean crops in five and eleven clusters and with vetch crops in four and eight clusters, respectively. For morphology, it was took into account texture, gum amount, elevation, appearance, margin, color, size and shape of colonies; and for biochemistry, absorption of carbon and nitrogen sources, and tolerance to various pH levels, antibiotics, metals, salinity and urea concentrations. The results indicated that rhizobia strains associated with pea, bean, broad bean and vetch crops belong to the *Rhizobium* genus. The rhizobia strains associated with lupine crops belong to the *Ochrobactrum* genus and one strain to *Bradyrhizobium* genus. Fourteen strains were identified as able to grow better in hostile conditions; those have potential use as bioinoculants. These results point out the necessity to establish greenhouse and field experiments to study the potential nitrogen fixation of the characterized strains.

Key words: legumes, nodulation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.