

Trabajos presentados al I Congreso Internacional de Biotecnología e innovación (ICBi), 9 - 12 de julio de 2018, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
Editoras:
Ilanit Samolski Klein
María Lucila Hernández-Macedo
Gretty Katherina Villena Chávez

Autores

Nataly Taco-Taype 1

nataly2012@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6115-0262>

Doris Zúñiga-Dávila* 1

dzuniga@lamolina.edu.pe
<https://orcid.org/0000-0002-4564-6775>

Correspondencia

*Corresponding author

1 Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina

Citación

Taco-Taype N, 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>

SECTION I:

AGRICULTURAL AND ANIMAL BIOTECHNOLOGY

ARTICLE

Efecto de la inoculación de plantas de Tarwi con cepas de *Bradyrhizobium* spp. aisladas de un lupino silvestre, en condiciones de invernadero

Effect of inoculation of Tarwi plants with *Bradyrhizobium* spp. strains isolated from a wild lupine, under greenhouse conditions

Resumen

El "tarwi" o "chocho" (*Lupinus mutabilis* Sweet) es la única especie cultivada del género *Lupinus* en América, valorado por su alto contenido proteico y capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con rizobios. Su variabilidad genética está reforzada por aproximadamente 84 especies silvestres en el Perú. La presente investigación se realizó para evidenciar si los rizobios de una especie silvestre de lupino (*Lupinus* sp.) fueran capaces de nodular y promover el crecimiento del tarwi. Los nódulos radiculares fueron colectados de un campo de cultivo en abandono de Huaraz (Ancash-Perú) a 3497 m de altitud; se aislaron 8 cepas rizobianas de crecimiento lento (6-7 días) que por sus características microbiológicas y moleculares corresponden al género *Bradyrhizobium*. Estas fueron inoculadas en semillas de tarwi y reinoculadas a plántulas de 15 días. Se aplicó diseño completamente aleatorizado con 11 tratamientos (incluyendo la cepa control LMRT28, N+ con fertilización nitrogenada, y N- sin fertilización) y 5 repeticiones. Después de 70 días en invernadero se observó que todas las cepas nativas, a excepción de LSHZ-L1 y LSHZ-L2, mostraron nódulos radiculares de coloración rojiza indicador de la actividad de la leghemoglobina. Seis de las cepas incrementaron significativamente la longitud aérea de las plantas respecto al N- y al control LMRT28; también hubo diferencias significativas en cuanto al peso seco aéreo destacando cinco cepas nativas; la mayor cobertura foliar fue desarrollada por LSHZ-L7; y la cepa LSHZ-L3 presentó significativamente mayor número de nódulos secundarios y estuvo correlacionada con el peso seco de la raíz.

Abstract

The "tarwi" or "chocho" (*Lupinus mutabilis* Sweet) is the unique specie of the genus *Lupinus* cultivated in America, appreciated for its high protein content in seeds, and the ability to fix nitrogen in symbiotic association with rhizobia. Its genetic variability is reinforced by approximately 84 wild species in Peru. The present investigation was carried out to show if the rhizobia of a wild lupino (*Lupinus* sp.) might be able to nodulate and promote the growth of tarwi. The root nodules were collected from an abandoned crop field of Huaraz (Ancash-Peru) at 3497 m of altitude, were isolated 8 slow-growing (6-7 days) rhizobial strains, which due to their microbiological and molecular characteristics correspond to the genus *Bradyrhizobium*. These strains were inoculated in tarwi seeds, and co-inoculated to the 15-day seedlings. It was applied a completely randomized design with 11 treatments (including the control strain LMRT28, N+ with nitrogen fertilization and N- without fertilization) and 5 repetitions. After 70 days of growth in greenhouse conditions, all treatments with native strains, with the exception of LSHZ-L1 and LSHZ-L2, showed reddish-colored root nodules, indicator of leghemoglobin activity. Six of the strains significantly increased the aerial length of the plants respect to the N- and the LMRT28 treatment; also, there were significant differences in relation of aerial dry weight being better in five treatments with native strains. The major foliar coverage was developed by LSHZ-L7; and the greatest number of secondary nodules was showed in LSHZ-L3, which is correlated with the dry weight of the root.

Palabra clave:

lupino silvestre; *Bradyrhizobium*; nodulación.

Keyword:

wild lupine; *Bradyrhizobium*; nodulation.

Introducción

Una de las características muy importantes de las fabáceas (leguminosas) es la simbiosis que establecen con bacterias fijadoras de nitrógeno, en órganos especiales denominados "nódulos radiculares" en el que el dinitrógeno (N_2) atmosférico es transformado en amonio el cual es asimilado por la planta para su crecimiento, a esto se debe la capacidad de las leguminosas de crecer aún en suelos áridos o de escasa fertilidad (Ramírez et al. 2016). En zonas áridas y semiáridas, Celaya et al. (2011) menciona que el nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes, aunque la atmosfera es un gran reservorio de nitrógeno (78%) ésta no está disponible para las plantas en su forma original.

Asimismo, las leguminosas, después de las gramíneas, constituyen un elemento importante en la alimentación humana y animal (Ramírez et al. 2016). La familia Fabaceae está formada aproximadamente por 751 géneros (Lewis et al. 2013) y se distribuye por todo el planeta, a excepción solo de las regiones polares y los desiertos con temperaturas extremas (Lamas & Acedo 2016).

Uno de los géneros correspondientes a la tribu de las Genisteae de las fabáceas es *Lupinus*, probablemente agrupa de 300 a 400 especies en todo el mundo. Según Macbride (1948) con más de 84 especies identificadas en el Perú, se distribuyen entre los 2500 a 4500 m de altitud, a mayores altitudes presentan formas de crecimiento postrado y almohadillado y con raíces profundas. Sin embargo, es importante resaltar que los *Lupinus* son tolerantes a suelos ácidos, salinos, y son sensibles a suelos pesados y mal drenados (mencionado por Fernández-Pascual et al. 2007). Las especies silvestres toman nombres aymaras y quechuas como "ckera", "pacha ckera", "ckera janckas" (Tapia 2015).

Los *Lupinus* principalmente son nodulados por bacterias de crecimiento lento como es el *Bradyrhizobium*, perteneciente a los Rhizobiales y la familia Bradyrhizobiaceae, además integra los α -Proteobacterias (mencionado por Fernández-Pascual et al., 2007). La simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* participa activamente en la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Kurlovich et al. 2002), y *Lupinus* es una de las pocas leguminosas de la zona altoandina con potencial de ser aprovechada para restaurar áreas degradadas (Fernández-Pascual et al. 2007).

Lezama (2010) realizó el estudio de los simbioses de diez especies de *Lupinus* distribuidos en el distrito de Corongo, provincia de Corongo, departamento de Ancash, identificando a través de sus características bioquímicas siete especies de *Bradyrhizobium* y tres de *Mesorhizobium*, propuso que las características de los nódulos bacterianos y sus simbioses podrían ser usados para mejorar los estudios taxonómicos del género *Lupinus*. Posteriormente realizó inoculaciones cruzadas, en las semillas colectadas de cada una de las diez especies, y las sembró en los suelos de cada zona de estudio del cual fueron colectadas, comprobando que la semilla que correspondía al lugar de colección desarrollaba nódulos, no así las demás que no correspondían, por lo cual con-

cluyó que habría una alta especificidad de las cepas bacterianas con sus correspondientes especies de *Lupinus*.

Lupinus mutabilis Sweet (conocida como "tarwi") es la única especie de lupino domesticada en América. Tapia (2016) menciona que la domesticación se efectuó desde hace más de 3000 años y está adaptada a alturas entre los 2000 a 3800 msnm. Su distribución se extiende en Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y el norte de Argentina bajo diferentes sistemas de producción (Jacobsen & Mujica 2006). En el Perú se cultivan en los valles interandinos de las regiones de Cajamarca, La Libertad, Huánuco, Junín, Cusco, Apurímac y Puno. En la sierra norte se le conoce como "chocho", en la sierra central como "tarwi", y en el sur como "tauri"; su siembra es para autoconsumo y se realiza al final de la rotación de cultivos (Camarena et al. 2009).

Respecto al valor nutritivo del tarwi Castañeda et al. (2007) menciona que podría contener más del 43% de proteínas (con alta concentración de cisteína, lisina y metionina), 25.5% de fibras, 13.5% de azúcares, aceites y minerales (cobalto, fósforo y potasio); sin embargo, debido también al contenido de alcaloides (como lupanina, esparteína, lupadinina, anagréina, genisteína, gramina, 13-hidroxilupanina, L-Dopa, Luteína, Wighteona) las semillas tienen un sabor amargo que requieren de un proceso de desamargado para ser consumida.

La fijación de nitrógeno de *L. mutabilis* podría variar entre 50 a 100 kg/ha (Tapia 2015, Mujica 1990); o ser aún más altos como los reportes de Barreda (2015) en Colombia que han cuantificado entre 280 y 501 kg/ha de nitrógeno fijado; y recomienda el tarwi como abono verde para incorporación de nitrógeno al suelo en lugar de aplicación de fertilizantes sintéticos; por otro lado, Mullin et al. (2000) recomienda su uso para el cultivo rotatorio con cultivos de cereales. La aplicación de inoculantes rizobianos podría aumentar aún la fijación del nitrógeno, y por tanto, mejorar la fertilidad del suelo. Por las características mencionadas el tarwi es una leguminosa andina cuyo cultivo y consumo necesitan ser revalorados y es necesario desarrollar herramientas biotecnológicas para repotenciar estas características, a fin de generar alternativas para superar los problemas de desnutrición en el Perú.

El objetivo del presente trabajo fue comprobar si las bacterias simbióticas aisladas de una especie silvestre son capaces de nodular y promover el crecimiento de la especie cultivada *Lupinus mutabilis*. El interés de las cepas silvestres radica en su adaptación a situaciones de estrés como tolerancia a sequías, a bajas temperaturas, a suelos con bajo contenido de nutrientes, entre otras y constituirían un potencial inoculante para la especie cultivada.

Material y métodos

Colecta de muestras de campo. Las muestras, que consistieron en raíces con nódulos de buen aspecto de la especie de *Lupinus silvestre*, fueron colectados de tres puntos de muestreo ubicados en la ladera de una colina en el distrito de Unchus, provincia de Huaraz, departa-

mento de Ancash (WGS84, LE 228399, N 8947516, 3497 m). Los puntos correspondieron a zonas erosionadas de campos de cultivo en abandono. Las muestras se trasladaron en condiciones de frío al Laboratorio de Ecología Microbiología y Biotecnología (LEMYB) de la UNALM.

Aislamiento de rizobios de nódulos.- Se procedió según los protocolos reportados por Zuñiga (2012). Las cepas aisladas se sometieron a pruebas de pureza en agar peptona-glucosa (PGA) y agar levadura-lactosa o LLA para descartar la presencia de posibles contaminantes.

Caracterización bioquímica y molecular.- Las cepas se sometieron a crecimiento en medio LMA con azul de bromotimol (0.5% en NaOH 0.016N), indicador de acidez, durante siete días; una vez concluido el crecimiento se observó cambio de coloración en el medio (Sosa et al. 2004). El grupo de los *Bradyrhizobium* en general alcalinizan este medio tornando el color verde del medio a un color azul.

Se realizó la caracterización molecular de una muestra de tres cepas solo para comprobar si las cepas aisladas correspondían al género *Bradyrhizobium*. Para ello se realizó la extracción del ADN de una muestra de tres cepas, según el manual de extracción del Kit de extracción de DNA (GeneJET Genomic DNA Purification Kit-Thermo Fisher Scientific) a partir del suspendido de una colonia aisladas en 5 mL medio LMC (pH= 7±0.2); luego se realizó la amplificación del gen 16S ARNr en un termociclador Biometra con un volumen de reacción de 25 µL. Una vez verificada la presencia de las bandas de 1500 pb en un gel de electroforesis que corresponde a este gen, se solicitó el servicio de secuenciación de Macrogen Inc. Las secuencias generadas de cada cepa fueron alineadas y corregidas manualmente empleando el software BioEdit. Finalmente fueron comparadas con la base de datos EzBioCloud.

Ensayo en el invernadero.- Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 11 tratamientos (Cepas: LSHZ-L1, LSHZ-L2, LSHZ-L3, LSHZ-L4, LSHZ-L5, LSHZ-L6, LSHZ-L7, LSHZ-L8; cepa control: LMRT28; y controles sin inoculantes N- y N+) y cinco repeticiones; por lo cual se tuvieron 55 unidades experimentales. La cepa control correspondiente a *Bradyrhizobium yuanmingense* fue proporcionada por el laboratorio LEMYB-UNALM.

Preparación del sustrato.- La preparación del sustrato consistió en una mezcla de vermiculita y arena lavada en una proporción de 3/1. La mezcla se humedeció con 500 mL de agua por cada 1000 cc de volumen aproximadamente; fueron luego colocadas en fundas de tela para ser esterilizadas tres veces (una vez por día) en una autoclave de suelos por una hora a 121 °C. Este sustrato estéril se dispuso en macetas estériles de un kilogramo y fueron colocados en el invernadero del LEMYB.

Desinfección de la semilla.- Las semillas de tarwi corresponden a una variedad local procedente de la provincia de Aija del departamento de Ancash. El ciclo vegetativo de esta variedad es de 8 a 9 meses, sus semillas son blancas y el peso de 100 semillas es de 21.14 g. Las semillas fueron adquiridas en el mercado central de la ciu-

dad de Huaraz, y conservadas en el laboratorio LEMYB a 13 °C. Previamente se realizaron pruebas de germinación en placa con papel filtro húmedo, mostrando 93% de germinación al tercer día a 23 °C. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con alcohol a 70% por tres minutos y con hipoclorito de sodio al 2% por 1 min, finalmente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril entre 5 a 7 veces.

Multiplicación del inóculo.- La multiplicación de cada cepa se realizó en 15 mL de medio LMC (Caldo Levadura Manitol) en tubos de ensayo de 40 mL de capacidad, se incubaron en agitación a 150 rpm y a 28 °C por 5 días hasta alcanzar una población bacteriana de aproximadamente 10⁸ cel/mL.

Siembra e inoculación de las semillas.- Se colocaron dos semillas por maceta con una pinza estéril. Luego se procedió a la inoculación colocando 500 µL de cada cepa rizobiana sobre cada semilla (1 mL por cada maceta). En caso de los controles N- y N+ se colocaron 500 µL de agua estéril por semilla.

Entre 4 y 5 días después de la siembra se observaron los cotiledones de la mayoría de las plantas inoculadas y entre los 10 a 15 días presentaron hojas verdaderas. A los 15 días se realizó la reinoculación, previamente se deshijaron las macetas con dos plantas, a fin de dejar una planta por maceta. La reinoculación se realizó con el mismo volumen y concentración de inóculo, a la altura del cuello de la planta.

Condiciones ambientales del invernadero.- Durante todo el experimento, las temperaturas máximas registradas variaron entre 15.29 a 18.68 °C, y las mínimas entre 14.91 y 15.37 °C. La humedad relativa varió entre 89.9 y 91.92%. Estos parámetros fueron registrados por la estación meteorológica ubicada dentro del invernadero del LEMYB.

Evaluaciones morfométricas de plantas de tarwi.- La evaluación de las variables morfométricas se realizaron durante la cosecha de las plantas, al final de la floración de la yema principal. A excepción de la medición de la cobertura foliar, medida una semana antes.

- Longitud aérea de la planta: medida con un flexómetro, en centímetros, desde el cuello de la planta hasta la yema terminal.
- Cobertura foliar: medida en un equipo de fotoradiografía, Mobile Phenotyping Unit (fenotipificador), al cual se ingresó las características de una planta por escala de colores, distinguiendo los colores que corresponden al tallo, las hojas e inflorescencias. Para el fotografiado de cada unidad experimental, el equipo se programó para la toma de 16 imágenes de forma rotatoria por muestra; los resultados emitidos por el equipo son datos de cada medición y el promedio de las 16 mediciones.
- Número de hojas: se realizó el conteo de forma manual.
- Peso fresco y seco aéreo y radicular: se realizó el

corte a la altura del cuello de la planta separando la parte aérea de la parte radicular; con apoyo de una balanza de precisión se realizó el pesado de la parte aérea de la planta; cada unidad experimental se colocó dentro de sobres de papel craft, en un horno marca WTB Binder ED115 a 60 °C por cuatro días, hasta alcanzar un peso constante (peso seco aéreo). El mismo procedimiento se realizó para las raíces, y se secaron en una estufa a 28 °C, a fin de no dañar los nódulos.

- Número de nódulos: se realizó el conteo de los nódulos localizados en la raíz principal (nódulos primarios) y en las raíces secundarias (nódulos secundarios).
- Otros: se tomaron nota de los aspectos cualitativos de cada planta, presencia de clorosis en hojas, estado fenológico (fructificación, floración, prefloración y vegetativo), caída de hojas, presencia de infecciones por hongos o insectos plaga, entre otros.

Análisis estadístico. Los datos exploratorios fueron analizados en el programa de datos Excel. En el programa R se realizó una visualización inicial de los parámetros descriptivos de cada una de las variables cuantitativas (todas a excepción del estado fenológico). Se realizó el análisis de componentes principales (ACP) a fin de verificar los componentes que mejor explican el efecto los inoculantes en el crecimiento de las plantas.

Se utilizó el programa SPSS para el análisis de varianzas (ANOVA) con un nivel de significancia $p = 0.05$ y bajo la prueba de Tukey a fin de identificar el o los tratamientos que influenciaron significativamente en el crecimiento de las plántulas.

Finalmente se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para identificar las variables que están directamente relacionados entre sí; y se ha complementado con un análisis de regresión lineal para los que mostraron relación a fin de ver el grado de significancia. La visualización del estado de las diferentes variables en cada uno de los tratamientos fue visualizada en un gráfico de estrellas empleado los datos promedios.

Resultados y discusión

Determinación de la especie silvestre. Las muestras colectadas de campo, según las descripciones presentadas por Lezama (2010) podrían corresponder a *Lupinus lindleyanus* (Tribu Luppineae, Familia Fabaceae); y según el manual de Macbride (1948) varias características concuerdan con la descripción de *L. cf. lindleyanus*, pudiéndose utilizar “cf.” (Vásquez & Rojas 2006) por ciertas diferencias con la descripción y la necesidad de comparar con más ejemplares; sin embargo, debido a que no es el objetivo principal de esta investigación y la falta de datos más exactos, la especie silvestre empleada la denominamos como *Lupinus* sp. Es una herbácea anual de 25 cm aproximadamente de altura, con una sola inflorescencia terminal de flores moradas, con frutos de no más de 2.5 cm de largo. Presenta una raíz principal con nódulos frecuentes; y pocas raíces secundarias con

algunos nódulos, de menor tamaño que los presentes en la raíz principal.

Caracterización de las cepas rizobianas aisladas.

Los aislamientos fueron dirigidos a purificar cepas rizobianas de crecimiento lento (5 a 7 días) y que vira el medio LMA con azul de bromotimol de verde a color azul (Cuadrado et al. 2009, Marquina et al. 2011) por la producción de álcali en el medio, características propias de los *Bradyrhizobium*. Se obtuvieron un total de ocho aislados con estas características. También se aislaron otras de cepas de crecimiento rápido que no forman parte de los objetivos del presente estudio.

No se detectó crecimiento de estas cepas en el medio PGA, ni mostraron coloración amarilla en el medio LLA con el reactivo de Benedict.

La caracterización molecular de tres de las cepas, según la base de datos de EzBioCloud, corresponden al género *Bradyrhizobium* (Tabla 1). El análisis del gen 16S permite la clasificación hasta el nivel del género. Estos resultados permiten inferir que el resto de las cepas, que presentaron similares características corresponden a este mismo género.

Tabla 1. Determinación de especies de acuerdo con EzBioCloud identificadas por la amplificación del gen 16S.

Cepa	Similaridad	Especie
LSHZ-L1	99.64%	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>
LSHZ-L3	99.71%	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>
LSHZ-L5	99.78%	<i>Bradyrhizobium canariense</i>

Los resultados nos indican que las cepas estudiadas corresponden al género *Bradyrhizobium*.

Efecto de las cepas rizobianas en el crecimiento y nodulación de plantas de tarwi. En cuanto a las características de nodulación: todas las cepas, a excepción de LSHZ-L1 y LSHZ-L2, resultaron ser infectivas; se observaron nódulos en la raíz principal pivotante y en las raíces secundarias. Los controles sin inocular (N- y N+) no mostraron nódulos en la raíz principal (Fig.1).

En general los nódulos en la raíz principal fueron más grandes (5 – 10 mm) que en los de la raíz secundaria, algo aplanadas a esféricas, ubicados principalmente cerca del cuello y a lo largo de la raíz principal; y los nódulos secundarios fueron de tamaños variables, esféricos y/o con protuberancias (Fig.2), distribuidos desde zonas próximas a la raíz primaria hasta zonas distantes.

ANOVA mostró diferencias altamente significativas ($\alpha = 0.01$) en longitud de la parte aérea, cobertura foliar, peso seco aéreo, número de nódulos principales y, número de nódulos secundarios (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las variables evaluadas en los tratamientos.

Variables	F-value	ANOVA
Longitud Aérea	6.129	8.99e-06 ***
Cobertura Foliar	9.549	3.37e-08 ***
Peso Seco Aéreo	14.47	6.7e-11 ***
Número de hojas	1.962	0.0616
Peso Seco Radicular	1.853	0.079
Número de Nódulos Principales	10.68	6.85e-09 ***
Número de Nódulos Secundarios	31.29	<2e-16 ***

***;<0.001

La Tabla 3 muestra los datos de las variables evaluadas, y la significancia entre los tratamientos, según la prueba de Tukey. La longitud de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas silvestres, a excepción de LSHZ-L1 y LSHZ-L2, fueron significativamente mayores al control N-. La cobertura foliar, relacionada con el desarrollo de las ramas y hojas, de todos los tratamientos fueron significativamente superiores a LSHZ-L1 y LSHZ-L2. En ambas variables destacan las cepas LSHZ-L4, LSHZ-L5, LSHZ-L7, y el control N+.

El cuanto al peso seco aéreo, los análisis mostraron hasta seis agrupaciones según la prueba de Tukey, destacando el control N+; las cepas LSHZ-L8, LSHZ-L7 y LSHZ-L6 superaron significativamente a los demás tratamientos.

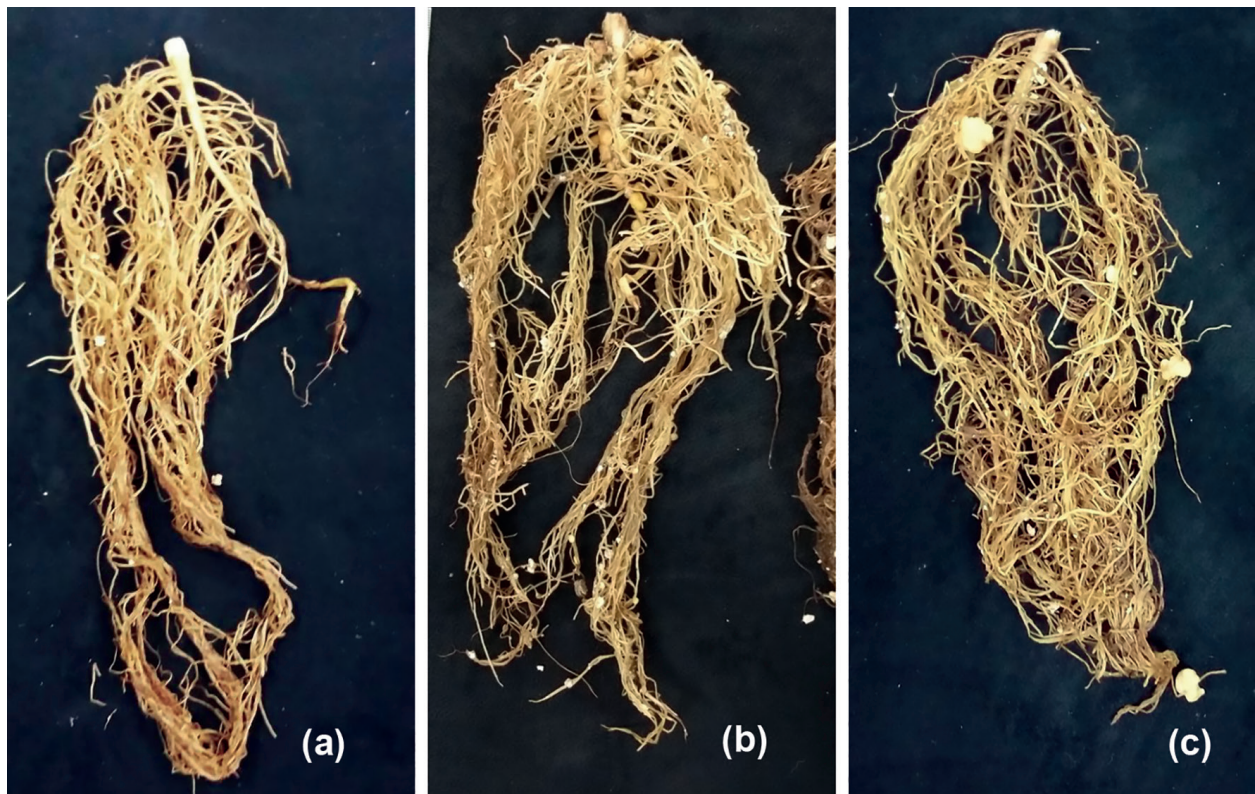


Figura 1. Distribución de los nódulos en las raíces de *Lupinus mutabilis*. A. Sin presencia de nódulos; B. Presencia de nódulos en las raíces principales y secundarias; C. Nódulos solo en raíces secundarias.



Figura 2. Forma de nódulos en las raíces de *Lupinus mutabilis*. A. con protuberancias; B. esféricos; y C. aglomerados en el cuello de la raíz.

Tabla 3. Efecto de las bacterias rizobianas en el crecimiento de plantas de tarwi.

CEPAS	Longitud aérea (cm)		Cobertura foliar (cm ²)		Peso Seco Aéreo (g)		Número de hojas (unid.)		Peso Seco de Raíz (g)		N°. de Nódulos principales (unid.)		N°. de Nódulos secundarios (unid.)	
N-	58.28	cd	14.92	a	1.72	bcd	19.3	a	0.41	a	0	b	41.3	b
N+	68.88	a	18.55	a	2.20	a	19.5	a	0.33	a	0	b	34.5	bc
LMRT-28	60.18	bcd	15.03	a	1.76	bc	17.2	a	0.38	a	9.4	a	28.2	bc
LSHZ-L1	53.58	de	9.02	b	1.41	de	16	a	0.31	a	0	b	0.6	e
LSHZ-L2	50.45	e	8.31	b	1.11	e	15.3	a	0.27	a	0	b	7	de
LSHZ-L3	65.50	ab	14.73	a	1.58	cd	17.6	a	0.51	a	12.4	a	88.2	a
LSHZ-L4	66.70	ab	16.00	a	1.79	bc	15.4	a	0.29	a	9	a	29.8	bc
LSHZ-L5	66.02	ab	16.73	a	1.81	bc	17.4	a	0.28	a	12	a	22.2	bcd
LSHZ-L6	66.04	ab	15.90	a	1.83	bc	16.8	a	0.28	a	11.2	a	20.4	bcde
LSHZ-L7	66.96	ab	17.18	a	1.96	ab	16	a	0.36	a	6.2	ab	38.2	bc
LSHZ-L8	65.46	ab	18.16	a	1.98	ab	16	a	0.41	a	12	a	19.6	cde

Nota: Valores de la misma columna, seguidos por la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Hay diferencias significativas en el número de nódulos primarios y secundarios en los tratamientos. Seis de las cepas incluyendo el control LMRT28 forman el primer grupo de cepas con buena nodulación en la raíz primaria con promedios que varían entre 9 y 12.4 nódulos/planta; el segundo grupo le corresponde a la cepa LSHZ-L7 con alrededor de 6 nódulos/planta; y el tercer grupo que incluye a los tratamientos con LSHZ-L1 y LSHZ-L2 no presentan nódulos (Tabla 3).

En cuanto al número de nódulos secundarios, se han observado hasta ocho agrupaciones (Tabla 3); destacando la cepa LSHZ-L3 con 88.2 nódulos/planta, el resto de los tratamientos presentaron entre 20 y 41 nódulos/planta, y el menor número de nódulos (entre 1 y 7) se observó en LSHZ-L1 y LSHZ-L2. Los controles N- y N+ también presentaron varios nódulos secundarios pequeños, debido a la contaminación por efecto de la manipulación.

En cuanto al número de ramas por planta varió entre 15 y 20, destacando el control N+ (19.6); asimismo el peso seco de la raíz varió entre 0.26 a 0.51g; observándose el mayor valor en el tratamiento LSHZ-L3, el cual estaría relacionado directamente con la cantidad de nódulos desarrollados (Tabla 4).

La longitud de la parte aérea de seis de los tratamientos inoculados (excepto LSHZ-L1 y LSHZ-L2) varió entre 65.46 y 66.96 cm y fueron significativamente mayores que LMRT-28 (60.18cm) y el control N- (58.27cm). Asimismo, se observó que en cinco tratamientos correspondientes a cepas nativas, la cobertura foliar varió entre 15.9 y 18.16 cm² siendo mayor al N- (14.9 cm²). En relación al peso seco aéreo, los tratamientos LSHZ-L7 (1.96 g) y LSHZ-L8 (1.98 g) tuvieron valores significativamente mayores que los tratamientos LMRT-28, LSHZ-L4, LSHZ-L5 y LSHZ-L6; a su vez estas cepas, fueron significativamente mayores que el N-.

En los tratamientos LSHZ-L1 y LSHZ-L2, debido a que no desarrollaron nódulos en la primera etapa del desarrollo, mostraron los valores más bajos de longitud aérea, cobertura foliar y peso seco aéreo.

El análisis PCA muestra que el primer componente, explica el 43% de la información que estarían relacionados con el crecimiento de *L. mutabilis*; y junto al segundo componente explican un acumulado del 70%. Las variables representativas que forman el primer componente (PC1) son la longitud aérea, el cobertura foliar y el número de nódulos secundarios; y el segundo componente (PC2), son el peso seco aéreo y el peso seco de la raíz.

En análisis de correlación nos muestra que la longitud aérea está altamente correlacionada con el cobertura foliar (70%) y el peso seco aéreo (67%); y más alta es la correlación entre el cobertura foliar y el peso seco aéreo (79%). La Tabla 4 muestra la significancia producto de la regresión lineal entre las variables mencionadas; así como la relación entre el número de nódulos totales con la longitud aérea, cobertura foliar y peso seco raíz; así mismo muestra que hay relación entre los valores de peso seco aéreo y el número de ramas de las plantas.

Tabla 4. Comparación de las variables evaluadas entre los tratamientos analizada a través de una regresión lineal

Variables		Valore de Correlación	t value	Significancia
Longitud aérea	Cobertura Foliar	0.707	7.278	1.61E-09 ***
Longitud aérea	Peso Seco Aéreo	0.673	6.629	1.78E-08 ***
Cobertura Foliar	Peso Seco Aéreo	0.793	9.49	5.08E-13 ***
Longitud aérea	Nódulos Totales	0.423	3.406	0.00126 **
Cobertura Foliar	Nódulos Totales	0.349	2.712	0.00899 ***
Peso Seco Raíz	Nódulos Totales	0.435	3.522	0.000891***
Peso Seco Aéreo	Nro. de Ramas	0.303	2.315	0.024498 *

A fin de determinar la cepa que promovió los mejores valores entre las variables evaluadas, en el siguiente diagrama (Fig. 3) se puede observar en general que las cepas silvestres mostraron mejores resultados que la cepa control LMTR28. La cepa LSHZ-L3 evidenció mejo-

res valores en cuanto al número de nódulos primarios y secundarios los mismos que están relacionados con el mayor peso radicular respecto a los otros tratamientos. Las cepas LSHZ-L4, LSHZ-L5, LSHZ-L6, LSHZ-L7 y LSHZ-L8 tuvieron mejores valores en cuanto al Peso Seco Aéreo, Cobertura Foliar y Longitud aérea, en comparación con control N-; y todas ellas mostraron menor número de nódulos secundarios respecto a LSHZ-L3, sin embargo tanto nódulos primarios como secundarios estarían implicados en el desarrollo aéreo de la planta. Las cepas LSHZ-L1 y LSHZ-L2 mostraron los valores más bajos en relación a las variables evaluadas, explicada básicamente por la ausencia de nodulación en la raíz principal.

Conclusiones

Las cepas LSHZ-L4, LSHZ-L5, LSHZ-L6, LSHZ-L7 y LSHZ-L8 son consideradas potencialmente buenas para mejorar el crecimiento del cultivo de lupinus, y podrían ser utilizadas a nivel de campo dentro de un manejo sustentable.

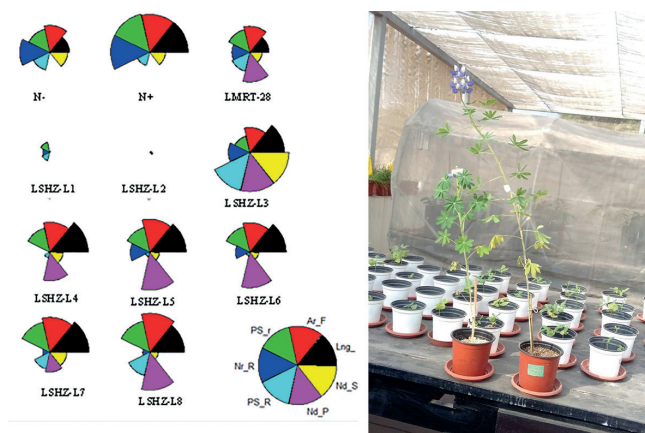


Figura 3. (A) Representatividad de las variables evaluadas por tratamientos. (B) Crecimiento de planta de tarwi inoculado con cepa LSHZ-L6 (derecha) comparativa a control N- (izquierda). Lng_: Longitud aérea de la planta; PS_R: Peso seco de raíz, PS_r: Peso seco aéreo, Ar_F: Cobertura foliar, Nr_R: Nro de ramas, Nd_P: Número de nódulos principales, Nd_S: Número de nódulos secundarios.

Literatura citada

- Barreda E.D. 2015. Evaluación del frijol Lupinus (*Lupinus mutabilis*) como abono verde para la producción agroecológica en el municipio Subachoque, Cundinamarca. Tesis de Ingeniero en Agroecología. Facultad de Ingeniería de la Corporación Universitaria Minuto de Dios. Bogotá, Colombia.
- Camarena F., A. Huaranga, J. Jiménez, E. Mostacero. 2009. Revalorización de un cultivo subutilizado chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Fondo Edit. CONCYTEC. 220.
- Castañeda B., R. Castro de la Mata; R. Manrique, L. Ibañez. 2007. Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers. "maca" y *Lupinus mutabilis* Sweet. "chocho" en ratas. Revista Horizonte Médico 7(1): 32-38.
- Celaya H., A. Castellanos. 2011. Mineralización de Nitrógeno en el suelo de zonas áridas Y semiáridas. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Terra Latinoamericana, 29 (3): 343-356.
- Chirinos-Arias M.C. 2015. Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. Revista Bio Ciencias 3(3): 163- 172. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.03.03.03>.
- Cuadrado B., G. Rubio, W. Santos. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 38 (1): 78-104. <http://dx.doi.org/10.15446/rc-qiquifa>
- Fernández-Pascual M., J. Pueyo, M.R. De Felipe, M.P. Golvano, M.M. Lucas. 2007. Singular Features of *Bradyrhizobium*- *Lupinus* Symbiosis. Dynamic Soil, Dynamic Plant. Global Siente Books, Madrid España.
- Jacobsen E., A. Mujica. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. Pp. 458-482.
- Kurlovich B. 2002. The history of Lupin domestication. En Kurlovich, B. Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg Pub. House. Pp. 147-164.
- Llamas, F., Acedo, C. 2016. Las Leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de los usos y de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. AmbioCiencias, 14, 5-18. Revista de divulgación científica editada por la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147- 8942 (edición impresa).
- Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Rico L, Clark R. 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling. South African Journal of Botany. 89:76-84. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.005>.
- Lezama B.P. 2010. Las Especies de *Lupinus* L. (Fabaceae) y de sus simbiontes en el distrito de Corongo-Ancash. Tesis de para optar el grado de Doctor. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1386>
- Marquina ME, González NE, Castro Y. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Revista de Biología Tropical. 59(3):1017-1036. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3375>
- Mcbride J.F. 1948. Flora of Perú. *Lupinus*. Botanical Series. Field Museum of Nature History. V. XIII, part III (1): 459-506.
- Mujica A. 1990. Investigación y producción del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Perú. INIAA-PICA, Puno, Perú. 49 p.
- Mullin M., A. Bellio. 2000. Organogenesis from hypocotyl thin cell layers of *Lupinus mutabilis* and *Lupinus albus*. Plant Growth Regulation, 30: 177-83.
- Ramírez-Bahena M.H., A. Peix, E. Velázquez, E.J. Bedmar. 2016. Historia de la Investigación en la Simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. Arbor Ciencia, Pensamiento y Cultura 192 (779): a319. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3009>
- Sosa A., A. Elías, O.A. García, M. Sarmiento. 2004. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. Revista cubana de ciencia agrícola 38 (2):197.

- Tapia M. 2015. El Tarwi, Lupino Andino. Mujeres Andinas en Camino: Promoción del producto tarwi de la Provincia de Huaylas hacia el mercado nacional e internacional en el marco rural del desarrollo sostenible. Corporación Gráfica Universal SAC. Perú
- Vásquez R., R. Rojas. 2006. Plantas de la Amazonía Peruana, Clave para Identificar las Familias de Gymnospermae y Angiospermae. *Arnaldoa* 13 (1): 09 – 258.
- Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722. Pub. No. MAN0012663 Rev. Date 12 October 2016 (Rev. B.00)
- Zúñiga D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

Agradecimientos / Acknowledgments:

Los autores agradecen a la Dra. Esperanza Martínez (UNAM-México) por la revisión de la parte molecular de las bacterias, a Katy Medina Marcos y Cesar Verde Mendocilla (INAIIGEM) por su ayuda y guía en los trabajos de campo, a Katty Ogata (UNALM) por la gestión logística en el laboratorio.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Rol de los autores / Authors Roles:

NTT: Conceptualización del trabajo. Realizó los trabajos de campo, los experimentos en invernadero, análisis estadísticos de resultados y la redacción del manuscrito. DZD: Conceptualización del trabajo, Diseño experimental, supervisión del ensayo en invernadero. Discusión de resultados, Revisión del manuscrito.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Proyectos 177-2015, 244-2015 y 009-2017 del FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica).

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Resolución Jefatural N°014-2016-SERNANP-PNH: Autorización para realizar investigación científica con extracción de especímenes silvestres en el Área Natural Protegida Parque Nacional Huazcaran. Registro CUT 023428-2016. Informe N°41-2016-SERNANP-PNH/MSP