



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EVALUACIÓN DE DOS CEPAS (COTOPAXI Y TUNGURAHUA) DE
RHIZOBIUM SPP A DOS DOSIS EN EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet)
VAR. INIAP-450 (ANDINO), CEASA – COTOPAXI. 2021-2022”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo

Autor:

Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola

Tutor:

Parra Gallardo Giovana Paulina Ing. Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

Marzo 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Jesica Paola Changoluisa Sangoquiza, con cedula de ciudadanía No. 0503663403 declaro ser autora del presente proyecto de investigación: "Evaluación de dos cepas (Cotopaxi y Tungurahua) de *Rhizobium* spp a dos dosis en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (Andino), CEASA - Cotopaxi, 2021-2022", siendo la Ingeniera Mg. Giovana Paulina Parra Gallardo Tutora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 11 de marzo del 2022.

Jesica Paola Changoluisa Sangoquiza

Estudiante

CC: 050366340-3

Ing. Mg. Giovana Paulina Parra Gallardo

Docente tutora

CC: 180226703-7

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CHANGOLUISA SANGOQUIZA JESICA PAOLA**, identificada con la cedula de ciudadanía **0503663403**, de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.- LA CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de **Ingeniería Agronómica**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado "Evaluación de dos cepas (Cotopaxi y Tungurahua) de *Rhizobium* spp a dos dosis en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (Andino), CEASA - Cotopaxi, 2021-2022", la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico.-

Inicio de la carrera: Octubre 2016 – Marzo 2017

Finalización de la carrera: Octubre 2021- Marzo 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 7 de enero del 2022

Tutor: Ing. Mg. Parra Gallardo Giovana Paulina

Tema: "Evaluación de dos cepas (Cotopaxi y Tungurahua) de *Rhizobium* spp a dos dosis en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (Andino), CEASA - Cotopaxi, 2021-2022".

CLÁUSULA SEGUNDA.- LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA.- Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA.- OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA.- El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA.- El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA.- CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.- Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA.- LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.- LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA.- En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA.- Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 11 días del mes de marzo del 2022.

Jesica Paola Changoluisa Sangoquiza
LA CEDENTE

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

"EVALUACIÓN DE DOS CEPAS (COTOPAXI Y TUNGURAHUA) DE RHIZOBIUM SPP A DOS DOSIS EN EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (ANDINO), CEASA - COTOPAXI, 2021-2022", de Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola, de la carrera Ingeniería Agronómica, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre-defensa.

Latacunga 11 de marzo, 2022

Ing. Mg. Giovana Paulina Parra Gallardo

DOCENTE TUTORA

CC: 180226703-7

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola, con el título del Proyecto de Investigación: "EVALUACIÓN DE DOS CEPAS (COTOPAXI Y TUNGURAHUA) DE RHIZOBIUM SPP A DOS DOSIS EN EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (ANDINO), CEASA - COTOPAXI, 2021-2022", ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga 11 de marzo 2022

Lector 1 (Presidente)
Ing. Mg. Francisco Hernán Chancusig
CC: 0501883920

Lector 2
Ing. PhD. Carlos Javier Torres Miño
CC: 0502329238

Lector 3
Ing. Mg. Diana Elisabeth Toapanta Gallegos
CC: 1002749800

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud y vida para dar lo mejor de mi cada día de mi vida estudiantil.

A mi madre Blanca Marina Sangoquiza por apoyarme siempre y más que todo en el transcurso de mis estudios y por siempre estarme alentándome que sea algo en la vida profesionalmente.

A mis hermanos por siempre estar en mí presentes, apoyándome siempre, cuando ha sido necesario en mi vida y dándome palabras de aliento para que salga adelante a pesar de los malos ratos que he tenido en mi vida.

Como no agradecer a mis amigos ya que han sido un apoyo más en el transcurso de los ciclos y en el empeño y ayuda constante de la investigación

Agradezco a la Universidad Técnica de Cotopaxi por permitirme formarme profesionalmente y a cada uno de las personas que participaron en este proceso de formación, como no agradecer a la Ing. Mg. Giovana Paulina Parra Gallardo por involucrarme en este proceso investigativo, el cual me ha ayudado a adquirir, desarrollar nuevos conocimientos y destrezas en cuanto al estudio de semillas y bacterias beneficiarias.

Jesica Paola Changoluisa Sangoquiza

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado sin excepción alguna a mi madre Blanca Marina Sangoquiza por ser una madre, compañera y amiga consejera, más que toda una persona humilde y trabajadora en todo el transcurso de mis estudios universitarios.

A mi hermana Sonia Guadalupe Changoluisa Sangoquiza por ayudarme a sobresalir en la cuestión de trabajo y por ser muy atenta en todos los espacios referidos a mis estudios.

A todos mis hermanos Wilson, William, Freddy, Diego, Edgar, Lorena por ser un gran apoyo en mi vida y demostrar lo humilde que es nuestra familia.

A mi novio por tenerme paciencia y brindarme su amor y apoyo incondicional para seguir adelante y ser lo que un día soñamos juntos y hacerlos realidad.

A mis amigos que siempre estuvieron alentándome y apoyándome en el transcurso de la investigación y a todas las personas que me aconsejaron, no olvido cada uno de los consejos y alientos que me dieron para sobre salir adelante con mi mismo esfuerzo, trabajo y seguir sobre saliendo como lo ha sido ahora.

Ahora si puedo decirles lo conseguimos FAMILIA.

Jesica Paola Changoluisa Sangoquiza

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE DOS CEPAS (COTOPAXI Y TUNGURAHUA) DE RHIZOBIUM SPP A DOS DOSIS EN EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (ANDINO), CEASA-COTOPAXI 2021-2022.”

AUTOR: Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola

RESUMEN

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en la provincia de Cotopaxi Parroquia Eloy Alfaro campus Salache, con una altura de 2.700 msnm en la Universidad Técnica de Cotopaxi en el laboratorio de la carrera de Ingeniería Agronómica se realizó la evaluación de un manual para la conservación y multiplicación de la bacteria *Rhizobium spp* (Cotopaxi y Tungurahua), inoculando en el Lupinus a dos disoluciones las cuales son (1cc) y (2cc) sumergiendo por semilla en la variedad (Andino), con la finalidad de formar nódulos en las raíz (FBN), obteniendo ya las dosis necesarias se aplicó en el campo con un diseño experimental de bloques completos al azar DBCA, con un arreglo factorial de 2x2+1 con tres repeticiones. Con análisis de varianza ADEVA, para jerarquizar a los tratamientos y para los resultados significativos se aplicó la prueba Tukey al 5%. Actuando el *Rhizobium* en la fase fenológica inicial del Lupinus (chocho), al cultivo se obtuvo bajo condiciones controladas, teniendo una M.O inicial de 2,5%. Donde se obtuvo los resultados de germinación con un 100% a los 13 días entre las dos cepas, obteniendo en primer lugar a la D2 con una altura de 38,31a los 66 días, además teniendo en cuenta el número de hojas y la floración en un alto rango con la cepa Cotopaxi con dosis (2cc). Donde el diámetro y la nodulación tienden a dar en primer lugar a la cepa Tungurahua con dosis (2cc). De acuerdo al número de nódulos formados en las dos dosis tiene como resultado en la cepa (Tungurahua) dosis (2cc) con un número total de 76 nódulos en el tratamiento TD2 manteniéndose en el rango (A) con una media de 4,06 y el tamaño de nódulos fue entre 0,4mm a 0,7mm, con condiciones controladas del *Rhizobium* de 25 a 30°C con una HR de 21%. La variedad INIAP-450 (Andino) necesita de dosis moderada en la aplicación de la bacteria al sumergir.

Palabras clave: Dosis, Cepas, Inoculación, *Rhizobium*, (FBN), Raíz, Nódulos.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

THEME: "EVALUATION OF TWO STRAINS (COTOPAXI AND TUNGURAHUA) OF RHIZOBIUM SPP AT TWO DOSES IN CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP-450 (ANDINO), CEASA-COTOPAXI, 2021-2022"

AUTHOR: Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola

ABSTRACT

This research project was carried out at Cotopaxi province, Eloy Alfaro Parish, Salache campus, at an altitude of 2,700 meters above sea level at Technical University of Cotopaxi. Agronomy Engineering career laboratory, a manual evaluation for conservation and multiplication of Rhizobium spp bacteria (Cotopaxi and Tungurahua) was carried out, inoculating in Lupinus to 2 solutions which are (1cc) and (2cc) submerging by seed at (Andino) variety, with the purpose to form nodules in the root (FBN), obtaining necessary doses, in field with an experimental design of complete random blocks DBCA was applied, with a factorial arrangement of 2x2+1 with three repetitions. ADEVA variance analysis was used to rank treatments and 5% Tukey test was applied for significant results. Acting the Rhizobium at initial phenological phase of Lupinus (chocho), the crop was obtained under controlled conditions, having an initial M.O. of 2.5%. Where germination results were obtained with 100% at 13 days between two strains, obtaining in first place D2 with a height of 38.31 at 66 days, also taking into account the number of leaves and flowered in a high range with Cotopaxi strain doses with (2cc). Where diameter and nodulation tend giving the first place to Tungurahua strain with doses (2cc). According to the number of nodules formed in two doses results in the strain (Tungurahua) dose (2cc) with a total number of 76 nodules in treatment TD2 keeping in the range (A) with a mean of 4.06 and the nodule size was between 0.4mm to 0.7mm, with Rhizobium controlled conditions of 25 to 30°C with a RH of 21%. The variety INIAP-450 (Andean) requires moderate dosage in the application of the bacteria when submerged.

Keywords: Dosage, Strains, Inoculation, *Rhizobium*, (FBN), Root, Nodules.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN.....	ix
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. INTRODUCCIÓN.	3
3. PROBLEMÁTICA.....	4
4. JUSTIFICACIÓN.	5
5. BENEFICIARIOS.....	5
6. OBJETIVOS.....	6
6.1. Objetivo General.....	6
6.2. Objetivos Específicos	6
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANEADOS.....	7
8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	8
8.1. Generalidades del cultivo de Chocho (<i>Lupinus mutabilis sweet</i>).	8
8.2. Clasificación taxonómica.	9
8.3. Ventajas del cultivo de chocho	9
8.4. Desventajas del cultivo de chocho	9
8.5. Requerimientos edafoclimaticos.....	10
8.6. Capacidad del Lupinus (Chocho) para mejorar la fertilidad del suelo.....	10
8.7. Etapas fenológicas.	11

8.7.1.	Emergencia	11
8.7.2.	Cotiledonar	11
8.7.3.	Desarrollo	11
8.7.4.	Floración	11
8.7.5.	Reproductivo	11
8.7.6.	Envainamiento.....	11
8.7.7.	Cosecha:.....	12
8.8.	Descripción botánica.	12
8.8.1.	Frutos y semilla.	12
8.8.2.	Inflorescencia.	12
8.8.3.	Hojas.	12
8.8.4.	Tallos y Ramificaciones.	12
8.9.	Raíces y nódulos del Lupinus (chocho).	12
8.9.1.	Raíz.....	12
8.9.2.	Nitrógeno en la planta.....	12
8.9.3.	Nodulación en la raíz.	13
8.10.	Manejo agronómico de la variedad del Lupinus INIAP- 450 ANDINO.....	13
8.11.	Enfermedades del Lupinus.....	14
8.11.1.	Las principales enfermedades que afectan al cultivo del Lupinus en la sierra Ecuatoriana son:.....	14
8.12.	Plagas del lupinus	15
8.13.	Rhizobium.	16
8.13.1.	Origen del Rhizobium.	16
8.14.	Generalidades del Rhizobium.	17
8.14.1.	Fijación biológica del nitrógeno (DIAZOTROFIA) es un proceso antiguo.	17
8.14.2.	Como se originan y su formación del Rizobios.	17
8.14.3.	Descripción microscópica y macroscópica.....	17

8.14.4.	Descripción de especies de Rizobios.	18
8.14.5.	Caracterización de cepas de Rhizobium como potenciales binóculos.	18
8.15.	Simbiosis Rhizobium – Leguminosa.	19
8.16.	La macrosimbionte - Las leguminosas.....	19
8.17.	Metabolismo de la Rhizobia.	20
8.18.	El nódulo.....	20
8.18.1.	Procesos de la nodulación.	20
<input type="checkbox"/>	Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos.	20
<input type="checkbox"/>	Encuvamiento del pelo radical.....	20
<input type="checkbox"/>	Generación del hilo de infección.	20
<input type="checkbox"/>	Formación de vesículas.	21
<input type="checkbox"/>	Forma externa de nódulos.	21
8.18.2.	Formación de nódulos.	21
8.19.	Tipos de nódulos.....	22
8.19.1.	Nódulos de crecimiento determinado.....	22
8.19.2.	Nódulos de crecimiento ilimitado.....	22
8.20.	Estructura de los factores de nodulación.	22
8.21.	Cepas de Rhizobium.....	23
8.22.	Concentración de las cepas de Rhizobium.	23
8.23.	Factores que afectan la nodulación del Rhizobium.	23
8.23.1.	La Biorremediación.	24
8.23.2.	La bioaumentación.....	24
8.23.3.	La Bioestimulación.....	24
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
9.1.	Materiales.	24
9.1.1.	Maquinarias y equipo.	24
9.1.2.	Material experimental.....	25

9.1.3.	Materiales de campo.....	25
9.1.4.	Materiales de Laboratorio	25
9.2.	Caracterización del sitio de investigación.	26
9.3.	Localización geográfica.....	26
10.	HIPÓTESIS.....	27
10.1.	H0= Hipótesis Nula.	27
10.2.	H1= Hipótesis Alternativa.	27
10.3.	H0= Hipótesis Nula.	27
10.4.	H2= Hipótesis Alternativa.	27
11.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	27
11.1.	Datos a evaluar.....	28
11.2.	Porcentaje de germinación.....	29
11.3.	Altura de planta.....	29
11.4.	Numero de hojas verdaderas.....	29
11.5.	Diámetro del tallo.	29
11.6.	Porcentaje de la floración.....	29
11.7.	Numero de nódulos formados en la raíz.	29
11.8.	Tamaño de nódulos.....	29
11.9.	Cepas multiplicadas de <i>Rhizobium</i> spp (C y T)	30
11.10.	FACTORES EN ESTUDIO.....	30
12.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
12.1.	Esquema del ADEVA.....	31
13.	METODOLOGÍA.....	32
13.1.	Área de estudio.....	32
13.2.	Muestreo del área de estudio.	32
13.3.	Preparación del Invernadero para la colación de las fundas vivero.	32
13.4.	Preparación del suelo en las fundas vivero.....	32

13.5.	Adquisición de la semilla del chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) Var. INIAP-450.	33
13.6.	Inoculación de dosis en la semilla y siembra del Lupinus de la variedad ANDINO (INIAP-450).....	33
13.7.	Labores pre culturales.....	33
13.8.	Toma de datos.	33
13.9.	Análisis de suelo final.	34
13.10.	Multiplicación de Rhizobium spp.	34
14.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	35
14.1.	El % de germinación del chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>) obtenido en la investigación realizada.....	35
	Altura de plantas (cm).....	37
14.2.	Prueba de Tukey al 5% para dosis en la variable de altura de plantas de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).	39
14.3.	Diámetro del tallo	41
14.4.	Prueba de Tukey al 5% en los tratamientos en el diámetro del tallo.....	43
14.5.	Prueba de Tukey al 5% para Dosis del Rhizobium.....	45
14.6.	Prueba de Tukey al 5% para Cepa * Dosis del Rhizobium.....	46
14.7.	Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs Testigo.	48
14.8.	Número de Hojas	49
14.9.	Prueba de Tukey al 5% en tratamientos en el número de hojas.	51
14.10.	Prueba de Tukey al 5% en cepas en el número de hojas.	53
14.11.	Prueba de Tukey al 5% en la Dosis en el número de hojas.....	54
14.12.	Floración en las plantas del cultivo de chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).	55
14.13.	Prueba de Tukey al 5% en Tratamientos en la floración.....	57
14.14.	Prueba de Tukey al 5% en Cepas en la floración.....	59
14.15.	Prueba de Tukey al 5% en Dosis en la floración.	60

14.16.	Nodulos en la raíz del chocho (<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>).	61
14.17.	Prueba de Tukey al 5% en Tratamientos en la nodulación.	62
14.18.	Prueba de Tukey al 5% en Cepas en la nodulación.	64
14.19.	Prueba de Tukey al 5% en Cepas* Dosis en la nodulación.	65
14.20.	Análisis de suelo inicial y final.....	67
15.	CONCLUSIONES	69
16.	RECOMENDACIONES.....	70
17.	BIBLIOGRAFIA	71
18.	ANEXOS.....	77
19.	FOTOGRAFÍAS.....	89
15.	MANUAL DE LA MULTIPLICACIÓN DEL RHIZOBIUM SPP.	94

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Y ACTIVIDADES A REALIZAR.....	7
TABLA 2.	TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA DEL CULTIVO DE CHOCHO.	9
TABLA 3.	REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMATICOS DEL CULTIVO DEL LUPINUS.	10
TABLA 4.	RENDIMIENTO Y FERTILIDAD DE NITRÓGENO AL SUELO.....	11
TABLA 5.	MANEJO AGRONÓMICO Y RECOMENDACIONES SOBRE LA VARIEDAD ANDINO.	13
TABLA 6.	ENFERMEDADES DEL LUPINUS.....	14
TABLA 7.	PLAGAS DEL CULTIVO DEL LUPINUS.	15
TABLA 8.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA BACTERIA RHIZOBIUM.....	16
TABLA 9.	ESPECIES DE LOS RIZOBIOS A-PROTEOBACTERIAS Y B-PROTEOBACTERIAS.....	18
TABLA 10.	FACTORES DE CRECIMIENTO PARA EL RHIZOBIUM.	20
TABLA 11.	EXPRESIÓN DE LOS GENES NOD A Y NOD B EN DIFERENTES CULTIVOS	22
TABLA 12.	CARACTERÍSTICAS DEL SITIO DE INVESTIGACIÓN.....	26
TABLA 13.	OPERALIZACIÓN DE VARIABLES (VARIABLE INDEPENDIENTE).....	27

TABLA 14. OPERALIZACIÓN DE VARIABLES (VARIABLE DEPENDIENTE).....	28
TABLA 15. TRATAMIENTOS DEL ENSAYO EXPERIMENTAL	30
TABLA 16. PARCELA NETA.....	31
TABLA 17. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANCA (ADEVA) PARA EL CULTIVO DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET). LATACUNGA, COTOPAXI, 2022.....	31
TABLA 18. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL RHIZOBIUM (C Y T) DE LAS COLONIAS Y BACTERIAS AISLADAS.....	34
TABLA 19. ADEVA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%) DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD 450 – ANDINO A LOS 6 DÍAS 8 DÍAS 10 DÍAS 13 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DOSIS DE RHIZOBIUM SPP.	36
TABLA 20. ALTURA DE PLANTAS (CM) A LOS 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 Y 77DIAS DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) BAJO LA DOS DIFERENTES DOSIS DEL RHIZOBIUM SPP.	38
TABLA 21. PRUEBA TUKEY AL 5%.	39
TABLA 22. ADEVA DEL DIÁMETRO DE TALLO (MM) DE LAS PLANTAS A LOS 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 Y 77 DÍAS DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) BAJO A LAS DOS DIFERENTES DOSIS DEL RHIZOBIUM SPP.....	42
TABLA 23. PRUEBA TUKEY AL 5%.	43
TABLA 24. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.	45
TABLA 25. PRUEBA TUKEY AL 5%.	46
TABLA 26. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.	48
TABLA 27. ADEVA DEL NÚMERO DE HOJAS EN LOS 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 Y 77 DÍAS DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN DEL CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) BAJO LAS DOS DIFERENTES DOSIS DEL RHIZOBIUM SPP.	50
TABLA 28. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.	51
TABLA 29. PRUEBA TUKEY AL 5%.	53
TABLA 30. PRUEBA DE TUKEY AL 5%8.....	54
TABLA 31. ADEVA DE FLORACIÓN A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN DEL CULTIVO DEL CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SSWEET</i>) BAJO LA DOS DIFERENTES DOSIS DEL <i>RHIZOBIUM SPP</i>	56

TABLA 32. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.....	57
TABLA 33. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.....	59
TABLA 34. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.....	60
TABLA 35. ADEVA DE NÓDULOS A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN DEL CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) BAJO LA DOS DIFERENTES DOSIS DEL <i>RHIZOBIUM SPP</i>	61
TABLA 36. PRUEBA TUKEY AL 5%.....	62
TABLA 37. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.....	64
TABLA 38. PRUEBA DE TUKEY AL 5%.....	65
TABLA 39. INTERPRETACIÓN DE ANÁLISIS INICIAL Y FINAL.....	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROMEDIOS DE LA ALTURA DE PLANTAS DE CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) VARIEDAD 450 INIAP (ANDINO) A LOS 66 DÍAS DESPUÉS DE SU GERMINACIÓN CON DOS DIFERENTES DOSIS DE <i>RHIZOBIUM SPP</i> DE COTOPAXI – TUNGURAHUA.....	39
FIGURA 2. PROMEDIO EN TRATAMIENTOS DEL DIAMETRO DEL TALLO DEL CULTIVO DEL CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO EN LOS DÍAS 24, 35, 43, 52, 59 Y 66, DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE <i>RHIZOBIUM SPP</i> (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	44
FIGURA 3. PROMEDIO EN DOSIS DEL DIAMETRO DEL TALLO DE CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO EN LOS DÍAS 24, 43, 52 Y 59, DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE <i>RHIZOBIUM SPP</i> (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.	46
FIGURA 4. PROMEDIO EN CEPAS*DOSIS DEL DIAMETRO DEL TALLO DEL CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO EN EL DIA 59 DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE <i>RHIZOBIUM SPP</i> (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.	47
FIGURA 5. PROMEDIO EN TRATAMIENTOS VS TESTIGOS DEL DIAMETRO DEL TALLO DE CHOCHO (<i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i>) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO EN LOS DÍAS 24, 35, 43, 52, 59, 66 Y 77 DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON	

DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA)	49
FIGURA 6. PROMEDIO EN TRATAMIENTOS EN EL NÚMERO DE HOJAS DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO EN LOS DÍAS 24, 35, 43, 52, 59, 66 DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	52
FIGURA 7. PROMEDIO EN CEPAS EN NÚMERO DE HOJAS DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 52 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	53
FIGURA 8. PROMEDIO EN LA DOSIS EN EL NÚMERO DE HOJAS DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 24, 35, 43, 52 Y 66 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.	55
FIGURA 9. PROMEDIO EN LOS TRATAMIENTOS EN LA FLORACION DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	58
FIGURA 10. PROMEDIO EN LAS CEPAS EN LA FLORACION DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	59
FIGURA 11. PROMEDIO EN LAS DOSIS EN LA FLORACION DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	60
FIGURA 12. EL PROMEDIO EN LOS TRATAMIENTOS EN LOS NODULOS DE LA RAIZ DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.	63
FIGURA 13. PROMEDIO EN LOS CEPAS EN LOS NODULOS DE LA RAIZ DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77	

DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.....	64
FIGURA 14. PROMEDIO EN LOS CEPAS* DOSIS EN LOS NODULOS DE LA RAIZ DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VARIEDAD INIAP – 450 ANDINO A LOS 77 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DOS DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SPP (COTOPAXI – TUNGURAHUA) A DOS DOSIS 1CC – 2CC.	66
FIGURA 15. ANÁLISIS DE SUELO INICIAL Y FINAL DEL CULTIVO DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET), INIAP-450 ANDINO.	67

INDICE DEL IMAGEN

IMAGEN 1. IMAGEN 1. ORIGEN DEL CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET). ...	8
IMAGEN 2. PLAGAS DEL CULTIVO DEL LUPINUS.....	15
IMAGEN 3. LOCALIZACIÓN DE LA UTC, FACULTAD CAREN.	26

INDICE DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFÍA 1. PREPARACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	89
FOTOGRAFÍA 2. COLOCACIÓN DEL SISTEMA DE RIEGO.....	89
FOTOGRAFÍA 3. DESINFECCIÓN Y COLOCACIÓN DEL ABONO (TURBA) EN LAS FUNDAS.....	89
FOTOGRAFÍA 4. INOCULACIÓN DE LA SEMILLA DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) DOSIS (1CC Y 2CC) RHIZOBIUM SPP (TUNGURAHUA Y COTOPAXI), VAR. INIAP-450.....	91
FOTOGRAFÍA 5. SIEMBRA DEL LUPINUS INOCULADO CON LAS DOS DOSIS.	91
FOTOGRAFÍA 6. CONTROL DE TEMPERATURA Y HR EN EL CULTIVO DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VAR. INIAP-450.	92
FOTOGRAFÍA 7. REGADÍO CADA 7 A 8 DÍAS AL CULTIVO DE CHOCHO.....	92
FOTOGRAFÍA 8. DESARROLLO DEL CULTIVO DE CHOCHO (LUPINUS MUTABILIS SWEET) VAR. INIAP-450.....	92
FOTOGRAFÍA 9. EXTRACCIÓN DE RAÍCES PARA EL CONTEO DE NÓDULOS FORMADOS EN EL CULTIVO DE CHOCHO.	92

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. AVAL DE TRADUCCIÓN.....	77
ANEXO 2. DISEÑO DE CAMPO.....	78
ANEXO 3. DATOS DE LOS INDICADORES EVALUADOS.....	79
ANEXO 4. HOJA DE VIDA DEL ESTUDIANTE.....	81
ANEXO 5. HOJA DE VIDA DEL TUTOR.....	82
ANEXO 6. ANÁLISIS DE SUELO INICIAL.....	83
ANEXO 7. ANÁLISIS DE SUELO FINAL DE CADA DOSIS.....	84
ANEXO 8. TESTIGO (SIN DOSIS DE RHIZOBIUM).....	88

1. INFORMACIÓN GENERAL.

Título del Proyecto: “Evaluación de dos cepas (Cotopaxi y Tungurahua) de *Rhizobium* spp a dos dosis en el Chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) VAR. INIAP - 450 (Andino) CEASA, COTOPAXI 2021-2022.”

Fecha de inicio:

Octubre - 2021

Fecha de finalización:

Marzo -2022

Lugar de ejecución.

Institución: Universidad Técnica de Cotopaxi.

Campus Salache.

Cantón: Latacunga

Provincia: Cotopaxi

Institución, unidad académica y carrera que auspicia

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Ingeniería Agronómica.

Carrera que auspicia:

Ingeniería Agronómica.

Proyecto de investigación vinculado:

Microbiología, Agricultura sustentable, biotecnología vegetal.

Equipo de investigadores:

Tutor: Ing. Mg. Parra Gallardo Giovana Paulina. CC: 1802267037

Lector 1: Ing. Mg. Fransisco Hernan Chancusig. CC: 0501883920

Lector 2: Ing. PhD. Carlos Javier Torres Miño. CC: 0502329238

Lector 3: Ing. Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos. CC: 1002749800

Autor del proyecto: Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola. CC: 050366340-3

Correo electrónico: jesica.changoluisa3403@utc.edu.ec

Área de Conocimiento.

Agricultura – silvicultura y pesca – biodiversidad – Postcosecha.

Línea de investigación:

Desarrollo y Seguridad Alimentaria

Se entiende por seguridad alimentaria cuando se dispone de la alimentación requerida para mantener una vida saludable. El objetivo de esta línea es la investigación sobre producto, factores y procesos que facilitan el acceso de la comunidad a alimentos nutritivos e inocuos y supongan una mejora de la economía local.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Producción Agrícola Sostenible; Tecnologías aplicadas a la agricultura.

Línea de Vinculación.

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano social

2. INTRODUCCIÓN.

La siguiente investigación se realizó en la provincia de Cotopaxi Parroquia Eloy Alfaro campus Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi, lugar donde se siembra y se realiza la producción y conservación de la semilla del chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) en el área de Granos Andinos, donde se ha observado la necesidad que atraviesa el cultivo por los escasos niveles de macronutrientes que no contienen el suelo de la institución y uno de ellos son las bacterias fijadoras de Nitrógeno (BFN) siendo una privación del cultivo de chocho para tener un incremento de desarrollo y producción aceptable para la Universidad y presentar semillas de alta calidad a los habitantes.

Basando en la evaluación de dos cepas de *Rhizobium* provenientes de Cotopaxi y Tungurahua, la cual será inoculada mediante sumersión en la semilla del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) INIAP-450 bajo condiciones controladas. Los aspectos tomados en cuenta en la investigación fue la ecología, elaboración de un manual sobre los procesos de la multiplicación del *Rhizobium* en el laboratorio de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi e inoculación de la bacteria a dos dosis (1cc-2cc) para las dos cepas y realizar la toma de datos expuestos en los factores en estudio, la información de datos se ingresó en el programa Excel una vez diseñada la tabla para el registro de campo.

Con la cooperación de la ingeniera encargada del Laboratorio de Ingeniería Agronómica se estableció los protocolos de la multiplicación del *Rhizobium*. Además se establecerá información para realizar un manual práctico que ayude al entendimiento sobre la bacteria *Rhizobium* Cotopaxi y Tungurahua.

La utilización de microorganismos benéficos como son los rizobios, involucra una cadena de procesos para la reproducción y multiplicación masiva. Según la preparación de materiales y medios de cultivo con las técnicas de multiplicación.

El manual elaborado contiene la descripción de los procesos y pasos para realizar la multiplicación del *Rhizobium* y ser utilizado como inoculante.

El propósito de esta investigación es lograr atestiguar que la inoculación de la bacteria *Rhizobium* favorece a una planta hospedera (leguminosas) y son genéticamente estables en las fases fenológicas de la planta inoculada y beneficios favorables de costos para los productores del Lupinus.

3. PROBLEMÁTICA.

En el transcurso de los años el cultivo del chocho ha obtenido un bajo incremento a mediados del siglo XIX en lo que se destina a la alimentación, sembrando únicamente en las alturas de la serranía del Ecuador, utilizando únicamente como abonos verdes para la mejora y rendimiento de terrenos o como cerco protector de otros cultivos, corroborando que en la Sierra el cultivo de chocho era prácticamente nulo, una vez el tallo o el follaje de la planta del chocho en el tiempo de secarse solían utilizar como abono que benefician a los terrenos y aún más si su follaje esta en verde, cuando sus tallos están secos son utilizado como combustible, esto se da cuando existe escases de leña demostrando que en algunos agricultores no existe el interés de este cultivo. (*Estrella, 1998*)

En algunos artículos o investigaciones realizadas se dice que, en la mayoría de los casos, la siembra del chocho se puede realizar sin preparar el suelo y no hace falta la selección de semilla o adquisición de semilla certificada ya que con semilla de mala calidad se puede obtener un cultivo de chocho para la producción; además, el agricultor solo regresa a la cosecha. (*El Telégrafo Ecuador, 2016*)

El uso discriminado de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura ocasiona contaminación cuando aplican estos fertilizantes, la planta no la aprovecha en su totalidad. La mejor opción es FBN (fijación biológica del nitrógeno), siendo una opción natural de síntesis y asimilación del (N) con la bacteria *Rhizobium*, siendo una forma de fertilización alternativa para mejorar los suelos y aumentar la capacidad de la formación de nódulos en la raíz del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y de las demás leguminosas.

Donde se ha concretado el uso de la bacteria *Rhizobium spp* ya que fija este macronutriente en mayores cantidades al suelo provocando un mayor desarrollo de las plantas inoculadas. Las cepas de *Rhizobium* (Cotopaxi y Tungurahua) se inocularon para la verificación de su grado de colonización y su adaptabilidad.

4. JUSTIFICACIÓN.

El presente proyecto de investigación, con el tema: “Evaluación de dos cepas (Cotopaxi y Tungurahua) de *Rhizobium spp* a dos dosis en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (Andino), CEASA - Cotopaxi, 2021-2022.” Tiene como finalidad evaluar la presencia y existencia de nódulos mediante la inoculación de las dos cepas de la bacteria *Rhizobium* en la semilla del chocho, buscando una alternativa en mejorar la formación de nódulos en las raíces de esta planta, por lo que se consideró que la presente investigación dará una solución a este cultivo donde exista un bajo nivel de nitrógeno en el suelo y mejorar estas condiciones mediante la inoculación de las dos cepas del *Rhizobium* (Cotopaxi y Tungurahua) inoculadas en la semilla mediante sumersión a dos dosis (1cc-2cc) para verificar exactamente que dosis tubo excelentes resultados y es más aceptable a la planta.

Lo que se pretende alcanzar con la inoculación del *Rhizobium* en el chocho, es ayudar a fijar el nitrógeno en el suelo y aumentar la nodulación en sus raíces para obtener un alto crecimiento y producción, así ayudando a suelos que presentan bajos niveles de nitrógeno y disminuir la contaminación del control químico aplicados en la agricultura.

Establecer una tecnología alternativa con el uso de microorganismos benéficos en leguminosas como es en la bacteria *Rhizobium* que sean realizadas mediante una síntesis de en la fijación del nitrógeno con las disoluciones del *Rhizobium* en la semilla del *Lupinus*, ayudando así al agricultor que se dedica a este cultivo a cambiar el método de manejo agronómico y aplicando el inoculo de *Rhizobium* a este cultivo para no depender de controles químicos y disminuir la contaminación del suelo y agua, mejorando su economía u producción en el chocho.

5. BENEFICIARIOS

Beneficiarios directos

Los beneficiarios de este proyecto de investigación son los productores del cultivo del chocho, donde se siembran este tipo de cultivos en las distintas comunidades, pueblitos, parroquias y provincias del Ecuador.

Beneficiarios indirectos

Profesionales de la carrera de agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi y los estudiantes del nivel académico de ingeniería agronómica

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Evaluar las dos cepas de *Rhizobium spp*, Cotopaxi y Tungurahua a dos dosis en el (*Lupinus mutabilis Sweet*) en la variedad, INIAP-450 Andino.

6.2. Objetivos Específicos

- Comprobar la adaptabilidad de las dos cepas *Rhizobium* (Cotopaxi y Tungurahua) en el Lupinus Var. INIAP-450 (andino).
- Determinar la mejor dosis de los inóculos aplicados en el cultivo del Lupinus.
- Identificar el número de nódulos de *Rhizobium* formados en la raíz por cada cepa y dosis.
- Establecer un manual sobre los métodos adecuados para la multiplicación del *Rhizobium spp*.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANEADOS.

Tabla 1. Objetivos y actividades a realizar

ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS:			
OBJETIVO 1	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Comprobar la adaptabilidad de las dos cepas de <i>Rhizobium</i> (Cotopaxi y Tungurahua) en el <i>Lupinus</i> INIAP-450 (andino).	Observar el proceso de crecimiento del cultivo con la dos dosis aplicadas.	Siembra Determinar la efectividad si las dosis fueron las correctas.	Libro de campo Fotografías
OBJETIVO 2	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Determinar la mejor dosis de los inóculos aplicados en el cultivo del <i>Lupinus</i> .	Observar el crecimiento antes y después del inóculo en el cultivo.	% de germinación Altura de planta Diámetro de tallo Número de hojas verdaderas	Libro de campo Fotografías
OBJETIVO 3	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Identificar el número de nódulos de <i>Rhizobium</i> formados en la raíz por cada cepa y dosis.	Extracción de la raíz del chocho. Toma de muestras de nódulos. Observar los nódulos.	Numero de nódulos contados para cada cepa de <i>Rhizobium</i>	Libro de campo. Fotografías.
OBJETIVO 4	ACTIVIDADES	RESULTADO DE LA ACTIVIDAD	MEDIOS DE VERIFICACIÓN
Establecer un manual sobre los métodos adecuados para la multiplicación del <i>Rhizobium spp.</i>	Adquisición de las cepas. Preparación de la disolución.	Medios de cultivo. Cepas multiplicadas de <i>Rhizobium</i> .	Fotografías Manual

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

8.1. Generalidades del cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilis sweet*).

Origen.

Imagen 1. Imagen 1. Origen del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).



Fuente: (Changoluisa, 2022)

El chocho es una leguminosa que cultivaban los antiguos pobladores de la región andina central. Se cree que el cultivo de lupinus comenzó alrededor del 2200 al 2500 a.C. Las culturas egipcia y andina domesticaron diferentes especies de lupinos: lupinos egipcios y lupinos andinos. Estas especies estaban incluidas en la dieta de estas culturas, y los pueblos indígenas de los Andes, desde Colombia hasta Bolivia, comían lupinos en grandes cantidades. (Villacrés et al., 2006)

El género lupinus se compone con alrededor de 200 especies distribuidas en América. (Angulo, 2015) El chocho crece en zonas agroecológicas áridas y arenosas (como cualquier cultivo, produce dependiendo el rendimiento del suelo), ubicado en 2.600 y 3.400 msnm de altitud, con una precipitación anual de 300 a 600 mm anuales, la temperatura fluctúa entre 7° C y 14 °C. (Inoue, 2015).

El mejoramiento se realizó por evaluaciones en la variedad INIAP-450 ANDINO se obtuvo de una población de genoplasma introducida desde Perú en 1992. (Andino, 1999). Mejorado en 1993 con un triple truco, se consideró comprimible y se introdujo en la biblioteca INIAP Primarca. (Caicedo C, Murillo A, Peralta E, Pinzon J, Rivera M. 1999)

(La Hora, 2016). El ciclo vegetativo de esta leguminosa se cumple entre los seis y ocho meses según la variedad. citado por (Rivera Roldan, 2017) Menciona que el ciclo vegetativo varía entre 150 y 360 días dependiendo el genotipo y se toma en cuenta la maduración antes de germinar.

8.2. Clasificación taxonómica.

Tabla 2. Taxonomía y morfología del cultivo de chocho.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Leguminosae Fabaceae
Subfamilia:	Faboideae
Genero:	Lupinus
Subgénero:	Platycarpus (wats.) kurl.
Especie:	L. mutabilis
Nombre científico:	Lupinus mutabilis Sweet
Nombre común:	Tarwi, chocho

Fuente: (Almeida, 2015)

8.3. Ventajas del cultivo de chocho

Este cultivo se siembra y se cultiva principalmente en altitudes entre 2.000 y 3.800 msnm, en climas templados y fríos siendo una de las ventajas principales en cultivar en cualquier región. Por su alto contenido proteico y la facilidad en adaptarse en cualquier suelo aportando nitrógeno. (Tapia Nuñez, 2015).

Considerando el valor proteico y calórico, su alto contenido de alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina). Algunos agricultores utilizan el agua de cocción del Lupinus como laxante y como controlador de plagas en plantas, es importante incorporar plantas de lupinus en su estado de floración e incorporar en el suelo y utilizar como abonos verdes que ayuda a la retención del agua en el suelo. Este cultivo ayuda a suelos erosionados para la conservación de los mismos, el lupinus fija aproximadamente de 50 a 200 kg/ha al año. (Rivera Roldan, 2017).

8.4. Desventajas del cultivo de chocho

El mal manejo de suelos en tiempos antiguos y el uso de excesivo de agroquímicos se ha conducido a un desequilibrio microbiano del suelo, en lo que afecta a la degradación de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Deficiencia de minerales y humificación de materia

orgánica del suelo también el el incremento de la incidencia de las enfermedades radiculares.(Omar et al., 2018).

8.5.Requerimientos edafoclimaticos.

Tabla 3. Requerimientos edafoclimaticos del cultivo del Lupinus.

Clima:	Área moderadamente frías.
Temperatura:	7° C - 14°C.
Pluviosidad:	350-800 mm.
Altitud:	2.500 a 3.500 m.s.n.m.
Tipo de suelo:	Francos. Francos arenosos.
PH:	5.5 a 7.00

Fuente: (Jose, 2015).

8.6. Capacidad del Lupinus (Chocho) para mejorar la fertilidad del suelo.

El Lupinus debido a su alto contenido proteico, tiene la gran capacidad de movilizar macronutrientes en la cuales es la alta calidad en fibra, calcio, fosforo, hierro, zinc que se encuentran fijados en el suelo, esto se debe a que el lupinos obtiene un sistema de exudados de ácidos cítricos en el sistema radicular y es una de las leguminosas que sustituyeron a los productos de origen animal como son (carnes, leche, huevos, etc.). Es un alimento estratégico en lucha de la desnutrición rural y urbana, el lupinus tiene una gran efectividad en fijación del nitrógeno ayudando a recuperar a suelos con escasas de este elemento.(Suquilanda, 2009).

Las revisiones bibliográficas nos permite establecer que el cultivo de Lupinus aumenta la fertilidad del suelo: la cual se demostrará en la siguiente tabla:

Tabla 4. Rendimiento y fertilidad de nitrógeno al suelo.

TIPO DE MATERIA	RENDIMIENTO	FERTILIDAD del suelo (acumulación de N)
Grano	<ul style="list-style-type: none"> • 2.5 a 3.5 t/ha. 	<ul style="list-style-type: none"> • 100 a 250 kg/ha.
Residuos postcosecha (raíces y rastrojos).	<ul style="list-style-type: none"> • 3 a 8 toneladas de materia orgánica. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 kg de óxido fosfórico. • 50 kg de óxido de potasio.

Fuente: (ABRIL PORRAS, 2015)

8.7.Etapas fenológicas.

Según (Caicedo Carlos, 2001).Determina los estados vegetativos de la planta desde la siembra hasta la cosecha.

8.7.1. Emergencia

Se considera emergencia cuando los cotiledones emergen del suelo.

8.7.2. Cotiledonar

Los cotiledones comienzan a abrirse de forma horizontal en los dos lados y aparecen los primeros foliolos enrollados en el eje central.

8.7.3. Desarrollo

Comienza el apareamiento de hojas verdaderas hasta la presencia de la inflorescencia (2 cm de longitud).

8.7.4. Floración

Inicio en la apertura de las flores.

8.7.5. Reproductivo

Empieza del inicio de la floración hasta la completa maduración de la vaina.

8.7.6. Envainamiento

Formación de vainas (2cm de longitud).

8.7.7. Cosecha:

Maduración (grano seco).

8.8.Descripción botánica.

8.8.1. Frutos y semilla.

El *Lupinus* está dentro de vainas alargadas de 5 a 12 cm y varían de formas como: redonda, ovalada a casi cuadrangular, y miden entre 0,5 a 1,5 cm en cada vaina se puede encontrar de 3 a 5 granos, un kg tiene de 3.500 a 5.000 semillas.

8.8.2. Inflorescencia.

Es un racimo fertilizada donde la flor mide de 1.2 cm de longitud y tiene forma de papilionáceas, los pétalos varían dependiendo en el color blanco al púrpura.(Barrera Eisy, 2015).

8.8.3. Hojas.

Son digitadas, compuestas, pecioladas de cinco o más folíolos.(Villacrés et al., 2006)

8.8.4. Tallos y Ramificaciones.

Presenta una estructura única de distintos niveles de floración, el tallo principal termina en la inflorescencia al igual que las ramas que siempre termina en la inflorescencia y la ramificación se origina de yemas axilares de las hojas.(José, 2015)

8.9.Raíces y nódulos del *Lupinus* (chocho).

8.9.1. Raíz.

Se sabe que como leguminosa, el chocho o tarwi o como otra planta desempeña un rol de sostén y transporta la savia del suelo hasta todos sus órganos y se caracteriza por que posee una raíz pivotante vigorosa y profunda que en algunas investigaciones realizadas sobre esta raíz ha llegado hasta los 3m de profundidad dependiendo la variedad. (Tapia & Fries, 2007).

8.9.2. Nitrógeno en la planta.

El nitrógeno es importante en la planta y forma parte de las proteínas, y otros compuestos orgánicos como son las coenzimas, vitaminas, ácidos nucleicos, entre otros. El nitrógeno es fundamental en la síntesis de la planta y utiliza la luz del sol como fuente de energía para la realización de las funciones metabólicas como la absorción de nutrientes, las hojas son las más ricas en contenido de nitrógeno y disminuye el contenido en la etapa de la floración. Al avanzar la edad disminuye la cantidad de nitrógeno y a la vez se incrementa la celulosa (Este elemento es el que son encarga del color, crecimiento de hojas, generen frutos y semillas adecuadas. (ZARATE, 2016)

8.9.3. Nodulación en la raíz.

La nodulación en la raíz se desarrolla a partir del quinto día después de la germinación, esta se desarrolla un proceso de simbiosis junto con las bacterias nitrificantes que se encuentran en el suelo, para así formar nódulos de varios tamaños entre 1 a 3 cm. Demostrando que tenemos un suelo con presencia de bacterias, a estas bacterias se las conoce como Rhizobium ya que el lupinus actúan con gran efectividad en el eje central de la raíz o relacionándose con las plantas más vigorosas y productivas. Pero hay que tomar en cuenta que, si deseamos alcanzar nódulos de hasta 3 cm, debemos seleccionar las condiciones climáticas y de suelo semejantes que este cultivo requiere ya que, si logramos alcanzar estos factores, los nódulos no solo se van a formar en la raíz primaria sino también en la ramificación radicular e incluso se formaran en las raíces secundarias. (*ECOGRAINS & Cultivos Andinos – FAO, 2014*)

8.10. Manejo agronómico de la variedad del Lupinus INIAP- 450 ANDINO.

Tabla 5. Manejo agronómico y recomendaciones sobre la variedad Andino.

Tamaño:	Medio
Cosecha:	Entre los 6 y 7 meses
Susceptible:	Plagas y enfermedades foliares y radicales
Rinde:	14 quintales por hectárea
Rinde:	Superior en 211 % al promedio de ecotipos locales
Diámetro de grano:	8 mm
Color:	Crema
Forma:	Redondo
Zonas recomendadas:	Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo
Altitud:	2700 a 3400 m
Época de siembra:	Diciembre-marzo/septiembre-noviembre
Cantidad de semilla/ha:	60 a 80 kg
Distancia de siembra:	60 cm entre surcos y 25 a 30 cm entre sitios
Cantidad de siembra/semilla:	3 semillas/sitio
Fertilización :	60 kg de P (3 sacos de 18-46-00)

Principales plagas:	Trozador, Barrenador del tallo, Gorgojo
Enfermedades comunes:	Foliares: Roya, Antracnosis y Ascochyta. Radiculares: <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium spp</i> y <i>Rhizoctonia spp</i>
Recomendaciones:	Para el control de malezas puede ser manual o químico y para control de plagas y enfermedades se recomienda utilizar productos comerciales.

Fuente: (Caicedo et al., 1999)

8.11. Enfermedades del Lupinus.

En el Ecuador se han realizado investigaciones para avanzar sobre el conocimiento de las enfermedades que afectan al cultivo y se han realizado estudios en las provincias de Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Cotopaxi donde se determinó que en el cultivo del Lupinus son afectados por las siguientes enfermedades. . (Castillo & Ochoa, 2001)

8.11.1. Las principales enfermedades que afectan al cultivo del Lupinus en la sierra Ecuatoriana son:

- ❖ Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*)
- ❖ Roya (*Uromyces Lupini*)
- ❖ Cercospora (*Cercoapora spp*)
- ❖ Mancha anular (*Ovularia lupinicola*)
- ❖ Ascochyta (*Ascochyta spp*)
- ❖ Fusarium (*Fusarium spp*), (*Fusarium oxysporum*)
- ❖ Rhizoctonia (*Rhizoctonia spp*)

Estas enfermedades afectan al desarrollo de la planta, presentando pudrición radicular, marchitamiento del tallo y esto debido al efecto de las zonas lluviosas u humedad ya que pueden presentarse de manera temprana.(B., 2009)

Tabla 6. Enfermedades del lupinus.

NOMBRE COMUN	PATOGENO	CONTROL
Antracosis	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Desinfección de semilla
Quemado del tallo	<i>Ascochyta spp</i>	Drenaje

	<i>Phoma lupini</i>	
Marchitez	<i>Rhizoctonia solani</i> (plantas jóvenes) <i>Fusarium oxysporum</i> (plantas adultas)	Rotación de cultivos
Roya	<i>Uromyces lupini</i>	Rotación de cultivos
Mancha anular	<i>Ovularia lupinicola</i>	Innecesario
Pudrición del tallo	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Rotación de cultivos

Fuente: (Rivera Roldan, 2017)

8.12. Plagas del lupinus

El lupinus presenta sus primeros estadios como cortes del cuello de la planta y se presentan en la época de floración, el gusano celeste es una plaga que afecta a la producción en un 20% alimentándose de la medula de la raíz pueden observarse de 4 a 5 larvas. (Sánchez Omar. A, 2016)

Imagen 2. Plagas del cultivo del lupinus.



Fuente: (Caicedo Carlos, 2001)

Tabla 7. Plagas del cultivo del lupinus.

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	ATAQUE
Insecto del suelo: Cortadores	<i>(Feltia spp)</i> <i>(Agrotis sp)</i>	Larvas que cortan a las plántulas.
Gusano peludo de la semilla	<i>(Copitarsia turbata)</i>	Larvas que cortan a los cotiledones y se comen el polen.

	(<i>Astylus spp</i>)	
Barrenador: Gorgojo barrenador	(<i>Apion sp</i>)	Galería en la base del tallo.
Minador de hojas	(<i>Liriomisa spo</i>)	Minan las hojas.
Picadores: Trips	(<i>Frankliniella spp</i>)	Perforan las hojas y castran a las flores.
Cigarritas	(<i>Bergalia</i>)	Consumen savia y transmiten virus.
Masticadores: Lorito	(<i>Diabrotica spp</i>) (<i>Epicauta spp</i>)	Comen las hojas.

Fuente:(García Zambrano, 2014)

8.13. Rhizobium.

Es uno de los principales e importante microorganismo capaces de fijar nitrógeno que se encuentran en la atmosfera libres como fijar nitrógeno a través de nódulos que se forman en la raíz de una planta huésped (leguminosa), fue una de las principales bacterias producidas a gran escala, durante 105 años se ha ido experimentando en diversos cultivos de forma inoculante.(Naconha, 2021)

8.13.1. Origen del Rhizobium.

La fijación biológica del nitrógeno es la opción natural que obtuvo Beijerinck en 1888 fue el primer cultivo bacteriano puro de la nodulación de la raíz de una leguminosa y lo nombro (*Bacillus radicícola*). Posteriormente Frank plantío nombrarlo *Rhizobium*.(En Tao Wang, Julio Martínez Romero, n.d.)

Tabla 8. Clasificación taxonómica de la bacteria Rhizobium.

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Proteobacteria alfa
Orden:	Rhizobiales
Familia:	Rhizobiaceae
Genero:	<i>Rhizobium</i>
Especie:	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

Fuente:(*Rhizobium* - EcuRed, n.d.)

8.14. Generalidades del Rhizobium.

8.14.1. Fijación biológica del nitrógeno (DIAZOTROFIA) es un proceso antiguo.

Se designó que su origen Eon Arqueano o conocido como la edad de la anaerobiosis y su proceso se llevó a cabo dentro de la atmosfera primitiva, en años anteriores los procariontes radican el complejo enzimático de nitrogenasa. La atmosfera primitiva se transforma en oxigenica, algunas bacterias con alto linaje en conjunto con las angiospermas, obteniendo enlaces moleculares con abundante simbiosis mutabilistas hasta en nuestros tiempos que es en el caso de los rizobios, el nitrógeno es fijado dentro de los nódulos y establecen en la raíz de la planta en otros casos obtiene poca aparición en los tallos de la leguminosa. (Lloret & Martínez .R, 2005)

8.14.2. Como se originan y su formación del Rizobios.

Empiezan con los factores de nodulacion y su genoma es idéntico que facilitan plásmidos o islas simbiosis en condiciones a población agrícolas. Genes responsables de nódulos o replicación de plásmidos más recientes que los de fijación de nitrógeno, su origen se asocia dependiendo al hospedero de la leguminosa. (Lloret & Martínez-Romero, 2005)

8.14.3. Descripción microscópica y macroscópica.

Existen bacilos de 0.5-1.0*1.2 -3.0 μm , los Gram negativos y no formadores de esporas son móviles y gracias a los flagelos peritricos, usualmente de 1 a 6. Las colonias son de color blancas y beige de forma circular semitranslucidas en ocasiones mucoides con un diámetro de 2.4 mm con una temperatura de 27°-39°C. en la reproducción de la bacteria Rhizobium requiere de un PH de 6-7 pueden desarrollarse en suelos ligeramente ácidos, el tiempo que tarde la generación de las cepas es de 1:30 horas a 5 horas y el tiempo que empiezan hacerse visibles las colonias empiezan de 3 a 5 días de incubación. (Cuadrado et al., 2009)

8.14.4. Descripción de especies de Rizobios.

Tabla 9. Especies de los rizobios α -proteobacterias y β - proteobacterias.

Clase	Orden	Familia	Genero	N° spp	Especie	Hospedante y representante
α - proteobacterias	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	111	R.leguminosarum	Tréboles, judía, guisante
			Sinorhizobium -> -> Ensifer	11 21	S. fredii E. adhaerens	Melilotus, Medicago Melilotus
			Shinella	7	S. granuli	Kummerowia Lotus, Medicago
			Allorhizobium Neorhizobium	5 4	A. undicola N. galegae	Sesbania cannabina
		Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	38	B. japonicum	Soja
		Brucellaceae	Ochrobactrum	18	O. anthropi	Lupinus
		Xanthobacteraceae	Azorhizobium	3	A. caulinodans	Sesbania
		Hyphomicrobiaceae	Devosia	23	D. riboflavina	Neptunia natans
		Methylobacteriaceae	Methylobacterium	53	M. organophilum	Crotalaria spp.
			Microvirga	16	M. subterranea	Lupinus
Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	46	M. loti	Lotus spp.		
	Aminobacter	6	A. aminovorans	-----		
	Phyllobacterium	11	P. myrsinacearum	Trifolium y Lupinus		
β - proteobacterias	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	121	B. cepacia C.	Mimosa
			Cupriavidus	16	necátor	Mimosa
		Burkholderiaceae	Herbaspirillum	16	H. seropedicae	-----

Fuente:(Laich, n.d.)

A nivel de genero con otros genes cromosomales sin embargo son incongruentes con los siguientes genes simbióticos (nif, nod), son codificados con elementos móviles y con el pasar del tiempo permite evolucionar a la planta hospedera para realizar FBN.(Lloret & Martínez. R, 2005)

En investigaciones realizadas sobre la bacteria de *Rhizobium* consideran que es un proceso biológico de Nitrógeno Atmosférico que tiene la capacidad de abastecer hasta el 90% de las necesidades de la planta.(López-Alcocer et al., 2017)

8.14.5. Caracterización de cepas de *Rhizobium* como potenciales binóculos.

Hoy en día, la taxonomía de las bacterias *Rhizobium* tiene como enfoque a los polifásicos que adjunta a la caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia entre otras características, se conceptualiza que estas bacterias aun no son públicas en el mundo. No

se pueden exceder de estudios genéticos si no se obtiene de sus propiedades fenotípicas de acuerdo a las distintas bacterias fijadoras de Nitrógeno.(Cuadrado et al., 2009)

8.15. Simbiosis Rhizobium - Leguminosa.

La importancia que muestra en la agronomía la asociación mutualista Rhizobium, acoplado al cultivo a una escala mundial, ambos participantes ya sea la leguminosa y el Rhizobium que son capaces de vivir independientemente, sin embargo la ventaja que muestra en la formación de nódulos, y mutuamente se benefician de estos fijadores, verificando que los nódulos formados en la raíz son órganos especializados como el resultado de un diálogo molecular que se da por parte de las Rhizobias y las plantas. (Lloret & Martínez, 2005)

Según (Gabriel & Teresa, 2015) menciona que la importancia de Rhizobium-leguminosa se estima que obtiene alta cantidad de (FBN) y varía entre 24 a 584 kg de (N) nitrógeno por hectárea (ha) y en algunas ocasiones pueden absorber hasta el 90% de la necesidad de la planta.(Mayz et al., 2010), la importancia de la información sobre la fijación biológica de nitrógeno contribuye en disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados a remediar los problemas de contaminación del suelo y agua tal cual a disminuir los costos de producción y representa una ventaja económica, a la par buenas prácticas en el ambiente y en la producción agrícola. (Saldaña, 2017), Mediante el uso de cepas compatibles con el hospedero homólogo y nos permite utilizar el potencial de la interacción del Rhizobium-leguminosa.

8.16. La macrosimbionte - Las leguminosas.

Las leguminosas son plantas pertenecientes e incluidas en la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida y de orden Fabales, su nombre proviene del latín legum que significa *semillas con vaina*, Actualmente todas las leguminosas pertenecen a una familia denominada Fabaceae con tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinoideae y Papilionoideae. (Cronquist, 1988)

Según (Lewis et al., 2005). Las subfamilias Faboideae y Mimosoideae tienen la capacidad de realizar la nodulación, siendo capaces de establecer simbiosis con la bacteria Rhizobia.

8.17. Metabolismo de la Rhizobia.

Tabla 10. Factores de crecimiento para el Rhizobium.

TIPOS	AEROBIOS
Temperatura de crecimiento	25 y 30°C (algunas especies necesitan) 40°C
pH óptimo para crecimiento	6.0 y 7.0 pero pueden predominar de 4.0 a 10.0
Generación de las cepas de Rhizobium	1.2 – 5.0 horas

Fuente: (Kuykendall, 2005)

8.18. El nódulo

La formación del nódulo es un largo proceso inducido por un intercambio de señales entre los participantes de interacción: sustancias con efecto de nitrógeno como se pueden llamar (factores de nodulación). (Saldaña, 2017)

8.18.1. Procesos de la nodulación.

Las etapas de infección y desarrollo de nódulos radicales son claras y estas incluyen:

- **Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos.**

Estos pueden ser derivados al ácido arquidonio o flavonoides siendo los más investigado, los rizobias activan genes NOD que producen factores NOD son glucaminosadas con un ácido arquidónico parte no reductora.

- **Encuvamiento del pelo radical.**

Los factores NOD y los flavonoides son necesarios para el desarrollo de nódulos. El factor NOD induce el flujo de iones de calcio (Ca^{+2}), lo que conduce a la despolarización de la membrana, lo que conduce a la reorganización del filamento de actina, lo que cambia la orientación de los pelos de la raíz.

- **Generación del hilo de infección.**

Los compuestos están involucrados en este paso. Llamada lectina, es una proteína que contiene carbohidratos que funciona como un adhesivo entre las bacterias y las plantas. Luego, las bacterias penetran en los pelos de la raíz e inducen a la planta a formar tubos de composición similar a las paredes celulares, llamados canales de infección.

- **Formación de vesículas.**

Las bacterias se liberan desde el canal de infección hacia el citoplasma de las células vegetales mediante un mecanismo similar a la endocitosis. *Rhizobium* se aísla del citoplasma por una membrana de la planta huésped llamada perimembrana (BPM), y luego sufre una serie de divisiones hasta obtener un Bacteroidetes, que son bacterias que cubren vesículas con BPM proporcionadas por la planta huésped. Los cuerpos pueden ser cuarenta veces más grandes que los bacilos de los que se desarrollan. El sistema vascular de la planta se extiende dentro de los nódulos y transporta nutrientes hacia y desde los nódulos. Bacteroides inician la fijación de nitrógeno

- **Forma externa de nódulos.**

La forma se compone principalmente de Planta huésped, que puede ser esférica, cilíndrica o redonda. Los nódulos activos son grandes y rojizos, lo que se atribuye a la presencia de hemoglobina en las piernas. Esta proteína ha sido ampliamente estudiada por su relación simbiótica. Actualmente se sabe que el grupo hemo se deriva de Bacteroides y la globulina se deriva de plantas, su función principal es promover la difusión de oxígeno en el nódulo, puede ser utilizado como transportador de electrones en la fijación de nitrógeno.

En algunos casos las formas de los bacteroides no tienen capacidad de división, pero esto no impide a la formación de nódulos y contienen rizobios en estado de latencia. Siendo una ventaja para realizar la actividad de proliferar en el suelo utilizando como nutrientes del nódulo destruido, donde las bacterias tienen la oportunidad de iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo hasta encontrar una planta (leguminosa) hospedera. (Wang *et al.*, 2002)

8.18.2. Formación de nódulos.

La interacción que se produce entre los rizobios y las leguminosas es un fenómeno de tipo infeccioso en el que las bacterias entran por las raíces de la planta, se multiplican en su interior y producen filamentos, también conocidos como "hilos de infección"; por el interior de los pelos radiculares hasta la se alcanza la corteza de la raíz. (Naconha, 2021)

Las legumbres excretan metabolitos secundarios en la rizósfera, incluidos los flavonoides y las chalconas, que son compuestos que señalan los genes que inducen la nodulación que producen señales de retorno, lipoquinoligosacáridos o, más comúnmente, conocidos como factores de

nodulación. Por otro lado, las secreciones de los rizobios, como el ácido indolacético, provocan una fuerte proliferación de las células de la raíz, dando como resultado la formación de nódulos típicos de las leguminosas. (López M, 1984)

8.19. Tipos de nódulos.

8.19.1. Nódulos de crecimiento determinado.

Son los que presentan nódulos de crecimiento limitado y se caracteriza por obtener una estructura externa de forma esférica y no presentan nódulos de transferencia.

8.19.2. Nódulos de crecimiento ilimitado.

Estos nódulos poseen células meristematicas en división que permite al nódulo en crecer, presentan nódulos de transferencia y las células presentan un elevado incremento de vacuolas , principalmente en las células periféricas. (García, 2011)

8.20. Estructura de los factores de nodulación.

La estructura básica química de los factores de nodulación es compleja y contiene semejanza a todas las especies de la bacteria, además son encargadas de formar cadenas comunes y que estén compuestas de tres a cinco unidades. (Nápoles *et al.*, 2008) Estas son: N-acetil glucosamina (quitina). Unidas por el enlace β -1.4 que esta derivada de genes comunes con el extremo no reductor proveniente de una cadena alifática, variada en longitud e insaturación y está compuesta por distintas sustituciones las cuales son acetil, carbamoil, metil, sulfato y varios grupos de azúcares en el extremo reductor. (Nápoles *et al.*, 2007)

Tabla 11. Expresión de los genes nod A y nod B en diferentes cultivos

Nod A	Nod afecta el desarrollo del tabaco induciendo la división celular en los protoplastos.
	Activan la respuesta en auxinas
Nod B	En cultivos celulares como el tomate estimula la rápida alcalinización al igual que en las zanahorias.
	Tiene la posibilidad de formar embriones somáticos.

Fuente: (Croci, 2020)

En investigaciones encontradas demuestran en algunas plantas que no pertenece a la familia de las leguminosas y son capaces de reconocer con una respuesta efectiva ante los factores Nod. (Paredes, 2013)

8.21. Cepas de Rhizobium.

La adquisición y obtención de un excelente rendimiento en los cultivos como tal las leguminosas, es necesario utilizar los fertilizantes nitrogenados, los agricultores cuando adquieren productos altamente costosos, elevan sus costos de producción afectando su economía y su consumo, una de las opciones inevitables para mejorar el factor fertilizante es la utilización de inoculantes bacterianos que aporten al suelo con las bacterias Rhizobium, factibles por su infectividad y efectividad simbiótica. (*Hamdi, 1985*)

Se debe obtener el conocimiento y apoyo para la fabricación de esta misma bacteria de gran importancia para el agricultor, conlleva a la familia de las leguminosas y necesario para la población. Según el estado legislativo en Brasil los fabricantes de inoculantes deben cumplir con estos requisitos: Empleo de cepas recomendadas por organismos de investigación, asegurar la garantía mínima de que la cepa que contiene 10 millones de rizobios por gramo. (*Matos & Zúñiga, 2003*)

La morfología macro y microscópica aparte de las propiedades bioquímicas, que permiten agrupar a cepas con propiedades fisiológicas y son capaces de transformar el nitrógeno de la atmosfera y fijar a través de nódulos en la raíz, (Cuadrado et al., 2009) es la primera bacteria producida a gran escala como inoculante durante 105 años en distintos cultivos del sector agrícola. (Naconha, 2021)

8.22. Concentración de las cepas de Rhizobium.

Se trata de varios inoculantes que son preparados a diferentes disoluciones, que debe estar estabilizado, altamente concentrado y en forma líquida que contiene a las bacterias del género Rhizobium spp. Con una concentración equilibrada de 3.2×10^4 y 5.8×10^9 UFC/ml ya que esto ayuda a promover una rápida nodulación de las raíces de las plantas leguminosas. Una vez formadas estos nódulos la planta deja de necesitar aportes de nitrógeno (fertilizantes químicos), ya que estas actúan como fabricantes naturales y captadores de nitrógeno atmosférico que transforma en nitrógeno biodisponible (NH_4^+). (*FERTIVEG AGRI, 2021*)

8.23. Factores que afectan la nodulación del Rhizobium.

Los factores que afectan a la nodulación son varios, como las temperaturas extremas que se producen en el día y la noche, la salinidad, acidez o sequía, son las principales que afectan negativamente a la simbiosis del Rhizobium-leguminosa, donde como resultado se obtiene una baja nodulación y bajos niveles de la fijación biológica del nitrógeno. (*Nápoles et al., 2007*)

8.23.1. La Biorremediación.

La biorremediación tiene como proceso a la utilización de microorganismos que se encuentren concentrados y altamente especializados en incrementar y mejorar la capacidad de degradación de la población microbiana del suelo de la forma más natural posible. Al inocular microorganismos vivos que han sido aislados con métodos de laboratorio y seleccionados por su alta capacidad de degradar contaminantes, dando como periodo de largo tiempo (atenuación natural) resultado la biodegradación a su tiempo aumentado la biomasa microbiana (bioaumentación y bioestimulación). (LÓPEZ *et al.*, 2016)

8.23.2. La bioaumentación.

La bioaumentación aporta al agricultor a un control adicional sobre el sistema de tratamientos en sus cultivos, permitiendo variar la diversidad y calidad de la población microbiana de la planta en las que se aconteció esta práctica. De acuerdo a las cepas selectivas pueden ser adaptadas en diferentes suelos atacados a contaminantes particulares estabilizando los procesos microbianos y reduciendo los costos operativos de la planta brindando un mejor desarrollo de esta. (LÓPEZ *et al.*, 2016)

8.23.3. La Bioestimulación.

La bioestimulación es una tecnología estratégicamente macro y micronutrientes que añaden a los suelos, para que el crecimiento microbiano incremente así a la población de microorganismos o de lo contrario, la biofortificación incluye agregar células con organismos capaces de realizar distintos procesos. (López, E., Cisneros, S. & Ochoa, 2016)

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

9.1. Materiales.

9.1.1. Maquinarias y equipo.

- Azadón
- Pala
- Rastrillo
- Carretilla
- Flexómetro
- Cámara fotográfica
- Balanza
- Bomba de agua

- Sistema de microaspersión
- Higrotermómetro
- Calibrador

9.1.2. Material experimental.

- Semilla de Lupinus (Andino)
- Disoluciones de Rhizobium (Cotopaxi, Tungurahua)

9.1.3. Materiales de campo.

- Letreros de identificación
- Martillo
- Funda de vivero (30 cm x 25 cm)
- Guantes de caucho
- Libro de campo
- Mascarilla
- Turba (abono)
- Sarán
- Balanza
- Sorvetes

9.1.4. Materiales de Laboratorio

- Mandil
- Cajas petri
- Alcohol
- Guantes quirúrgicos
- Frascos de vidrio
- Mango para asa
- Agujas o asas de inoculación
- Goteros
- Micropipetas
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Agua destilada
- Matraz Erlenmeyer

9.2. Caracterización del sitio de investigación.

Tabla 12. Características del sitio de investigación.

SITIO DE LA INVESTIGACION			
Provincia:	Cotopaxi	Cultivo nuevo:	Chocho (INIAP-450)
Cantón:	Latacunga	Sistema de Siembra:	Manual
Parroquia:	Eloy Alfaro	Superficie del ensayo:	5.10 x 3.80
Lugar:	CEASA Salache (UTC)	N° de tratamientos:	15
Localidad:	Salache	N° de fundas x T:	6
Longitud:	00°59'57S	Área de cada tratamiento:	1 x 1.10
Latitud:	78°37'14W	Distancia entre tratamientos:	50
Altitud:	2.725 msnm	Número de plantas:	90
Fecha de siembra:	12/10/2021	Distancia de caminos:	50
		Textura de suelo:	Franco arenoso

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

9.3. Localización geográfica.

Imagen 3. Localización de la UTC, facultad CAREN.



Fuente: (Google Maps, 2022)

10. HIPÓTESIS.

10.1. H0= Hipótesis Nula.

- Las cepas del inoculante no influyen en el desarrollo fenológico inicial *Rhizobium* del cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).

10.2. H1= Hipótesis Alternativa.

- Las cepas del inoculante influye en el desarrollo fenológico inicial *Rhizobium* del cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).

10.3. H0= Hipótesis Nula.

- La dosis del inoculo de *Rhizobium spp*, aplicados en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) no forman nódulos en la raíz.

10.4. H2= Hipótesis Alternativa.

- La dosis del inoculo de *Rhizobium spp*, aplicados en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) si forman nódulos en la raíz.

11. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Tabla 13. Operalización de variables (Variable independiente).

INDICADOR	ÍNDICE UNIDAD DE MEDIDA	INTRUMENTO TECNOLÓGICO	INTRUMENTO METODOLÓGICO	TECNICA
Material genético Semilla (Andino)	variedad	No aplica	Libro de campo	Medición
Dosis de Rhizobium	ml	Gotero o cuenta gotas	Libro de campo	Conteo

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

Tabla 14. Operalización de variables (Variable dependiente).

INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	INTRUMENTO TECNOLÓGICO	INTRUMENTO METODOLÓGICO	TÉCNICA
Desarrollo del Chocho				
Porcentaje de germinación	%	Calculadora	Libro de campo	Conteo
Altura de planta	cm	Flexómetro o regla	Libro de campo	Medición
Número de Hojas	#	Libro de campo	Libro de campo	Conteo
Diámetro de tallo	cm	Calibrador	Libro de campo	Medición
Floración	%	Calculadora	Libro de campo	Conteo
Nodulación				
Nódulos	#	Microscopio estereoscópico o lupa	Libro de campo	Conteo
Tamaño de nódulos.	cm	Regla	Libros de campo	Longitud
Multiplicación del Rhizobium spp				
Cepas multiplicadas	#		Cajas Petri	Conteo
Conteo de UFC	Formula	Contador de UFC	Libro de registro	Conteo

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

11.1. Datos a evaluar.

De acuerdo al cuadro de Operalización de variables se le tomo en cuenta y se realizó la toma de datos, obteniendo muy en cuenta el porcentaje de plantas germinadas con las dos dosis de (1cc) y dosis de (2cc), aplicadas con disolución de Rhizobium en la semilla del lupinus, altura de planta, numero de hojas verdaderas, diámetro de tallo, porcentaje de floración y número de nódulos formados en las raíces.

11.2. Porcentaje de germinación.

Se realizó este procedimiento a los 6 días después de haber realizado la siembra, la cuantificación se realizó por cada tratamiento aplicando una regla de tres para determinar el porcentaje de plantas germinadas.

11.3. Altura de planta.

La altura de la planta se tomó a los 10 días, después de haber obtenido el 100% de la germinación del cultivo, se escogió 1 planta de muestra por funda y 6 por tratamiento con la ayuda de un flexómetro y el libro de campo.

11.4. Numero de hojas verdaderas.

Se tomó en cuenta este procedimiento en cuanto la planta comenzó a propagar sus primeras hojas y se procedió a tomar los datos de las hojas verdaderas de cada planta señalada de los *Lupinus*, los datos tomados se apuntaron en el libro de campo.

11.5. Diámetro del tallo.

En la toma de datos del diámetro del tallo se tomó en cuenta a los 10 días después de haber obtenido el porcentaje de germinación al 100% del cultivo, con la ayuda del calibrador los datos obtenidos fueron anotados en el libro de campo.

11.6. Porcentaje de la floración.

El porcentaje de la floración se obtuvo de acuerdo a los tratamientos, los datos tomados en cuenta se recolectaron desde el día 77, el porcentaje de floración se obtuvo mediante la aplicación de una regla de tres, así se obtuvo el porcentaje y fue anotado en el libro de campo.

11.7. Numero de nódulos formados en la raíz.

Para la toma de datos de la cantidad de nódulos formados en la raíz del cultivo *Lupinus*, se extrajo la planta completa con toda la raíz a los 4 meses, de lo cual durante el procedimiento de extracción de la planta se utilizó una lupa como ayuda de visión, se contó los nódulos formados en cada tratamiento y se anotó en el libro de campo.

11.8. Tamaño de nódulos.

En la obtención del tamaño de los nódulos se procedió a extraer a las raíces del *Lupinus*, y remojándolos en un balde con agua para transparentarlas a las raíces y estén completamente visibles, con la ayuda de un calibrador se midió su tamaño o longitud y se anotó en el libro de campo.

11.9. Cepas multiplicadas de *Rhizobium* spp (C y T)

Para la multiplicación de las dos cepas de *Rhizobium*, se procedió a realizar en los laboratorios de IAGR de la UTC, con la guía de la docente encargada de las instalaciones se realizó un manual sobre este tema, donde se encuentra detallado cada paso a realizar.

11.10. FACTORES EN ESTUDIO.

- **Factor A:** cepas de *Rhizobium* spp.
 - a). C: Cotopaxi.
 - a). T: Tungurahua.

- **Factor B.** Dosis
 - b). D1: (1cc)
 - b). D2: (2cc)

- **Testigo.**
 - a). T: Sin dosis de *Rhizobium*.

12. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para este proyecto de investigación se aplicó el diseño experimental DBCA, bloques completamente al azar, con dos factores de estudio y un testigo con un arreglo factorial de $2 \times 2 + 1$ con tres repeticiones.

a. Tratamientos.

Tabla 15. Tratamientos del ensayo experimental

Tratamientos	Codificación	Descripción
1	CD1	<i>Rhizobium</i> Cotopaxi 1cc
2	CD2	<i>Rhizobium</i> Cotopaxi 2cc
3	TD1	<i>Rhizobium</i> Tungurahua 1cc
4	TD2	<i>Rhizobium</i> Tungurahua 2cc
5	Testigo	Sin <i>Rhizobium</i>

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

b. Unidad experimental.

Tabla 16. Parcela neta.

ANDINO - 450			
	REP I	REP II	REP III
T1	T	CD1	TD2
T2	TD1	TD2	T
T3	TD2	CD2	CD1
T4	CD2	T	CD2
T5	CD1	TD1	TD1

Elaborado por: (Changoluisa, 2022)

12.1. Esquema del ADEVA

Tabla 17. Esquema de análisis de variancia (ADEVA) para el cultivo de chocho (Lupinus mutabilis Sweet). Latacunga, Cotopaxi, 2022.

F de V	SC	GL
<i>Total</i>	(t-r-1)	14
<i>Tratamientos</i>	(t-1)	4
<i>Repeticiones</i>	(r-1)	2
<i>Cepas</i>	C	1
<i>Dosis</i>	D	1
<i>Cepas*Dosis</i>	CD	1
<i>Tratamientos vs testigos</i>	C*T	1
<i>Error Exp.</i>	Diferencia	8

C.V%=

13. METODOLOGÍA.

La metodología de este proyecto fue el método experimental cuantitativa, dando a realizar de este proyecto el estudio del Rhizobium en el desarrollo del Lupinus, siendo esta inoculada directamente a la semilla con dos dosis y dos cepas, a cotejando la presencia de nódulos en sus raíces, favoreciendo en la fase fenología inicial de este cultivo, se recogió datos y se realizó un análisis cuantitativo de las variables anunciadas en el proyecto de investigación.

13.1. Área de estudio.

Para el área de estudio de la investigación, se seleccionó un espacio de 5.10 x 3.80 m² ubicado en el (Sector Salache) campus CAREN de la Universidad Técnica de Cotopaxi, perteneciente al Cantón Latacunga, una vez delimitado el área de estudio se utilizó un GPS, con el que se tomaron las coordenadas del área y se determinó el espacio a utilizar y de igual forma se utilizó una cinta métrica.

13.2. Muestreo del área de estudio.

Se realizó un muestreo del suelo para conocer las condiciones iniciales en las que empezó la investigación, de acuerdo para este estudio se recolecto 1 muestra de 2 kg de suelo, concorde a las repeticiones se recolecto el suelo de las fundas con las diferentes dosis más el testigo a una profundidad de 20 cm, las muestras recolectadas fueron enviadas a los laboratorios de TOTALCHEM en la ciudad de Ambato, para el análisis microbiológico del suelo donde se obtuvo las siguientes características del suelo. (**Ver anexo 5**)

13.3. Preparación del Invernadero para la colación de las fundas vivero.

En la preparación y limpieza del invernadero se precedió a realizar la limpieza e igualación del área designada para la colocación de las fundas de polipropileno de acuerdo al diseño experimental, se instaló el sistema de riego de macroaspersión.

Una vez configurado el higrómetro se procedió a adaptarlo en la parte superior en uno de los tubos del invernadero para controlar la temperatura y humedad relativa (HR) del invernadero con el motivo de precautelar la vida de las plantas y evitar el estrés hídrico.

13.4. Preparación del suelo en las fundas vivero.

La tierra se obtuvo de uno de los terrenos de la Universidad Técnica de Cotopaxi en el campus Salache de la Facultad de CAREN, se extrajo y se transportó una cantidad de 10 T de tierra, al

sector del invernadero de la Universidad, donde se procedió a cernir la tierra obtenida con un sarán para obstruir las rocas y basuras que se encontraron entre la tierra, al obtener ya una tierra completamente limpia, suave y libre de basuras.

En fundas de 30 x 25 cm se colocó la tierra y se dejó reposar por 24 horas, luego del reposo se colocó la turba (abono) desinfectado, en cuanto a la aplicación de la turba ya pesada se procedió a colocar de 39 g en cada funda y se procedió a mezclar con la tierra de cada funda por tratamientos hasta haber obtenido una mezcla homogénea.

13.5. Adquisición de la semilla del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) Var. INIAP-450.

La adquisición de la semilla se lo hizo a través del departamento de granos andinos de la Universidad Técnica de Cotopaxi Facultad CAREN en Salache.

13.6. Inoculación de dosis en la semilla y siembra del *Lupinus* de la variedad ANDINO (INIAP- 450).

En este proceso se realizó de la siguiente manera:

Se colocó 108 semillas para la primera dosis de la Cepa (Cotopaxi y Tungurahua) en un vaso de precipitado del laboratorio de la Universidad se colocó 54 semillas en cada vaso, luego se colocó 1cc de dosis por cada semilla, en cada vaso se colocó 54 cc y se dejó en reposo por 5 minutos mientras la semilla absorbió, después se procedió a realizar la siembra del lupinus en las fundas designadas y el mismo proceso se realizó para la siguiente dosis que fue el de 2cc en la semilla del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) Var. ANDINO-450.

13.7. Labores pre culturales.

El riego se realizó cada 7 a 8 días dependiendo la temperatura del invernadero y humedad de la tierra en las fundas, con un sistema de microaspersión, también se procedió a realizar la aireación del suelo y eliminación de las plantas adventicias cada mes ya que el suelo presento compactación y esto generaba que las raíces no se desarrollen con normalidad.

13.8. Toma de datos.

En el transcurso del ciclo fenológico del cultivo del chocho, se recolecto la toma de datos cada 8 días, según a lo planificado en los datos a evaluar.

13.9. Análisis de suelo final.

Una vez las raíces del *Lupinus* estén completamente extraídas, se procedió a recolectar las 5 muestras de suelo por cada tratamiento de las dos dosis y recolectando muestras con una profundidad de 20 cm con la cantidad de 1 kg, una vez obtenidas las muestras fueron enviadas a los laboratorios de TOTALCHEM en la ciudad de Ambato, donde los resultados después de la extracción de las raíces y comparar el análisis microbiológico del suelo donde se obtuvo las siguientes características del suelo. (Ver Anexo 6)

13.10. Multiplicación de *Rhizobium* spp.

Una vez adquirido las cepas de *Rhizobium* de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, se procedió a realizar la multiplicación a partir de las diluciones en las que llegaron las cepas, la parte inicial se procedió a obtener la cepas de apertura llamada (cepas madre) donde se tomó un 1cc de las cepas adquiridas y se colocó en los medios de cultivo preparados en nutriente Agar con agua destilada, después se realizó otros medios de cultivo en nutriente Agar y se tomó muestras con la herramienta de aza de las cepas madre para ubicarlas en las cajas Petri recién preparadas y las incubamos (cepas multiplicadas), para el crecimiento se preparo medios de cultivo en PCA y se realizó el mismo procedimiento que la anterior, esto para obtener el bacterias más fuertes, por ultimo para el conteo de las UFC se realizó el procedimiento de las diluciones seriadas. (Ver Anexo N° 9)

Tabla 18. Características morfológicas del *Rhizobium* (C y T) de las colonias y bacterias aisladas.

Características	Aislado A1 Tungurahua	Aislado A2 Cotopaxi
<i>Colonias</i>		
Diámetro (mm)	2 -2.5	1.8 -2.0
Color:	Translúcidas brillantes	Beige
Forma:	Redonda	Redonda
Borde:	Liso	Liso
Elevación:	Pulvinada	Pulvinada
Consistencia:	Mucilaginosa	Suave
<i>Bacterias</i>		
Forma:	Células bacilares alargadas	Células esferoidales
Largo:	2.0m-2.5 μ	0.9m-1.0 m

Ancho:	1.0 μ	0.9m-1.0 m
Determinación taxonómica:	Género: Rhizobium	Género: Rhizobium
Observaciones adicionales:	Células que presentan septos transversales teñidos positivamente con la tinción de Gram. Tiempo de incubación de 5 a 7 días.	Tiempo de incubación 6 días

Fuente: (Pérez, 2021)

14. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

14.1. El % de germinación del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) obtenido en la investigación realizada.

En la tabla número 19 del porcentaje de germinación de las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) se observa que los resultados del análisis de varianza para los días 6, 8, 10, 13, donde se puede identificar que no existe significancia estadística para los tratamientos, repeticiones, cepas, dosis, cepas* dosis, tratamientos vs testigo, por lo cual se indica que las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) que fueron sembradas con las dos diferentes dosis de Rhizobium spp su germinación fue igual que las semillas que fueron sembradas sin ninguna dosis, y mostrando el coeficiente de variación para el día 6 de 89,00%, para el día 8 de 79,43% para el día 10 de 33,67% y para el día 13 de 4,36%

Tabla 19. ADEVA del Análisis de varianza para porcentaje de germinación (%) del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad 450 – Andino a los 6 días 8 días 10 días 13 días después de la siembra con dos dosis de *Rhizobium* spp.

F.V.	6 DIAS				8 DIAS				10 DIAS				13 DIAS			
	gl	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.	F	p-valor	sig.			
Tratamientos	4	0,27	0,890	ns	0,36	0,830	ns	0,55	0,702	ns	1	0,461	ns			
Repeticiones	2	0,93	0,433	ns	1,07	0,389	ns	0,55	0,596	ns	1	0,410	ns			
Cepas	1	0,02	0,896	ns	0	1,000	ns	0,04	0,856	ns	1,25	0,296	ns			
Dosis	1	0,95	0,359	ns	1,11	0,322	ns	0,04	0,856	ns	1,25	0,296	ns			
Cepas*Dosis	1	0,02	0,896	ns	0,28	0,614	ns	1,79	0,218	ns	1,25	0,296	ns			
Tratamientos vs testigo	1	0,09	0,770	ns	0,06	0,819	ns	0,36	0,566	ns	0,25	0,631	ns			
Error	8															
Total	14															
Cv		89,00			79,43			33,67			4,36					

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Altura de plantas (cm)

En la tabla 20 de la variable de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*), se muestra los resultados del análisis de varianza para los días 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 en donde se puede observar que existe una significancia estadística para las dosis en el día 66, y en los demás días no existe significancia estadística para los días 10, 24, 35, 43, 52, 59, y 77 indicando coeficientes de variación en el día 10 de 24,26% para el día 24 de 13,17% para el día 35 de 10,38%, para el día 43 de 12,41%, para el día 52 de 16,63%, para el día 59 de 13,89% y el día 77 de 10,08% lo cual indica que en esta variable la altura de las plantas tuvieron una uniformidad regular durante todo el tiempo de investigación.

Tabla 20. Altura de plantas (cm) a los 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 días después de la germinación del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) bajo la dos diferentes dosis del *Rhizobium* spp.

F.V.	10 DIAS				24 DIAS				35 DIAS				43 DIAS				52 DIAS				59 DIAS				66 DIAS				77 DIAS			
	g	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	F	p-valor	si g.	
Tratamientos	4	0,44	0,775	ns	0,73	0,595	ns	2,35	0,142	ns	1,47	0,298	ns	2,40	0,136	ns	1,19	0,384	ns	2,56	0,120	ns	0,87	0,524	ns							
Repeticiones	2	0,45	0,653	ns	0,03	0,974	ns	0,63	0,558	ns	0,30	0,752	ns	1,27	0,333	ns	0,28	0,764	ns	0,10	0,903	ns	0,86	0,459	ns							
Cepas	1	0,25	0,631	ns	1,45	0,263	ns	0,26	0,625	ns	0,45	0,520	ns	0,24	0,638	ns	0,50	0,498	ns	0,54	0,482	ns	0,01	0,932	ns							
Dosis	1	0,30	0,598	ns	0,16	0,698	ns	4,11	0,077	ns	1,10	0,326	ns	1,60	0,242	ns	1,70	0,228	ns	5,90	0,041	*	2,64	0,143	ns							
Cepas*Dosis	1	1,22	0,301	ns	0,45	0,522	ns	4,55	0,066	ns	3,92	0,083	ns	2,45	0,156	ns	2,34	0,165	ns	2,83	0,131	ns	0,38	0,557	ns							
Tratamientos vs testigo	1	0,00	0,974	ns	0,87	0,378	ns	0,48	0,509	ns	0,40	0,543	ns	5,31	0,050	ns	0,23	0,642	ns	0,98	0,351	ns	0,45	0,523	ns							
Error	8																															
Total	1																															
	4																															
Cv		24,26			13,17			10,38			12,41			16,63			13,89			10,09												

Nota: F.V. = Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, C.V. Coeficiente de Variación, N/S No Significativo, (*) = Significativo, (**) = Altamente significativo.

Fuente: La autora

14.2. Prueba de Tukey al 5% para dosis en la variable de altura de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).

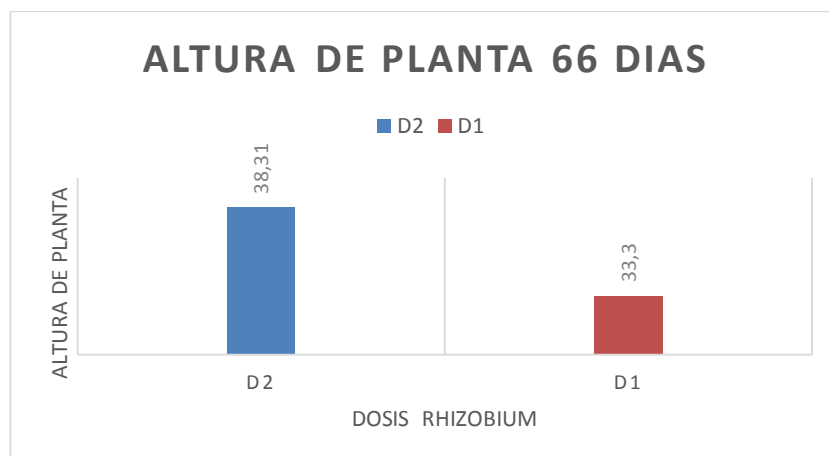
En la tabla 21 se puede observar después de realizar la prueba Tukey al 5% se observa que existe diferencia entre las dosis en la variable altura de las plantas en los diferentes días de las etapas fenológicas del crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) lo cual a mostrado dos rangos de significancia para las dosis, lo cual indica un promedio para el día 66 lo cual la dosis 2 de 2cc, se encuentra en primer rango de significancia dando el mejor resultado con 38,31 cm de altura con el rango A, la dosis 1 de 1 cc, se encuentra en el último rango dándole un promedio de 33,3 cm en la variable altura de planta.

Tabla 21. Prueba Tukey al 5%.

66 Días		
Dosis	Medias	Rango
D2	38,31	A
D1	33,3	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 1. Promedios de la altura de plantas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) variedad 450 INIAP (ANDINO) a los 66 días después de su germinación con dos diferentes dosis de *Rhizobium spp* de Cotopaxi – Tungurahua.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Discusión: Esta bacteria se caracteriza por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta.(Santillana et al., 2016)

La agricultura plantea mejorar la eficiencia de la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y *Rhizobium* competitivos, capaces de ser usados en biorremediación y fitorremediación y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos; en tal sentido, las investigaciones se han orientado al estudio del *Rhizobium* como promotor del crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas, proceso conocido como capacidad PGPR.(Santillana et al., 2016)

En el estudio se presentaron con diferentes dosis el efecto estimulante sobre las semillas de tomate, resultando en una mejor germinación, posiblemente debido a la habilidad de los rizobios para producir hormonas como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquininas, sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas.(Santillana et al., 2016)

14.3. Diámetro del tallo

En la tabla 22 de la variable diámetro del tallo de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), los datos nos indican que se puede observar que a los 10 días no existe fuente de variación que presenten significación, su coeficiente es de 8,64 lo cual en este día podemos determinar que el diámetro fue completamente uniforme, en los 24 días como podemos observar en la tabla del diámetro de los tallos de investigación, para los días 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 en donde se puede observar que existe significancia estadística para los tratamientos en los días 24, 35, 43, 52, 59 y 66 lo cual mostro un coeficiente de variación a los 24 días de 3,81 en los 35 días de 4,69, en los 43 días de 3,85, en los 52 días de 3,28, en los 59 días de 3,94 y a los 66 días de 4,01, para la dosis en los días 24, 43, 52 y 59 días tienen significancia con el coeficiente de variación de los 24 días con 3,81 de los 43 días con 3,85, los 52 días con 3,28, y en los 59 días con 3,94, tanto en los días 66 y 77 se pudo observar que se llegó a tener una igualdad en los datos dándonos a entender una similitud igualitaria en el diámetro, para cepas vs dosis se llegó a tener significancia en el día 59 con un coeficiente de 3,94 tanto que en los demás días nos indican que fueron regulares en el diámetro, para tratamientos vs testigo se puede observar que hay diferencia significativa en los siguientes días como en los 24, 35, 43, 52, 59, 66 y en los 77 días lo cual nos indica que solo el día 10 tuvo una igualdad en el diámetro pasado ese tiempo los datos variaron hasta la finalización del trabajo de investigación realizada en el cultivo.

Tabla 22. ADEVA del Diámetro de tallo (mm) de las plantas a los 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 días después de la germinación del chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) bajo a las dos diferentes dosis del *Rhizobium spp.*

F.V.	10 DIAS			24 DIAS			35 DIAS			43 DIAS			52 DIAS			59 DIAS			66 DIAS			77 DIAS		
	g	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.	F	p- valo r	si g.		
Tratamientos	4	0,95	0,48	n	9	0,00	5 *	6,48	3 *	9,47	4 *	10,42	3 *	10,45	3 *	6,54	2 *	2,90	3	s				
Repeticiones	2	0,13	0,87	n	1,15	0,36	n	1,51	8	0,48	8	0,21	2	0,5	3	0,55	9	0,34	4	s				
Cepas	1	0,33	0,58	n	3,50	0,09	n	0,02	9	0,33	0	0,02	0	0,19	8	0,09	2	0,80	7	s				
Dosis	1	2,11	0,18	n	11,00	0,01	1 *	4,75	1	7,00	9 *	10,50	2 *	13,50	6 *	4,33	1	1,60	2	s				
Cepas*Dosis	1	1,11	0,32	n	4,00	0,08	n	3,00	2	5,00	6	4,00	1	6,50	4 *	3,00	2	1,20	5	s				
Tratamientos vs testigo	1	0,17	0,68	n	18,59	0,00	3 *	17,74	3 *	24,12	1 *	27,29	1 *	25,32	1 *	19,52	2 *	8,18	1	s				
Error	8																							
Total	4																							
Cv		8,64			3,81			4,69		3,85		3,28		3,94		4,01		4,86						

Nota: F.V. = Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, C.V. Coeficiente de Variación, N/S No Significativo, (*) = Significativo, (**) = Altamente significativo.

Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.4. Prueba de Tukey al 5% en los tratamientos en el diámetro del tallo.

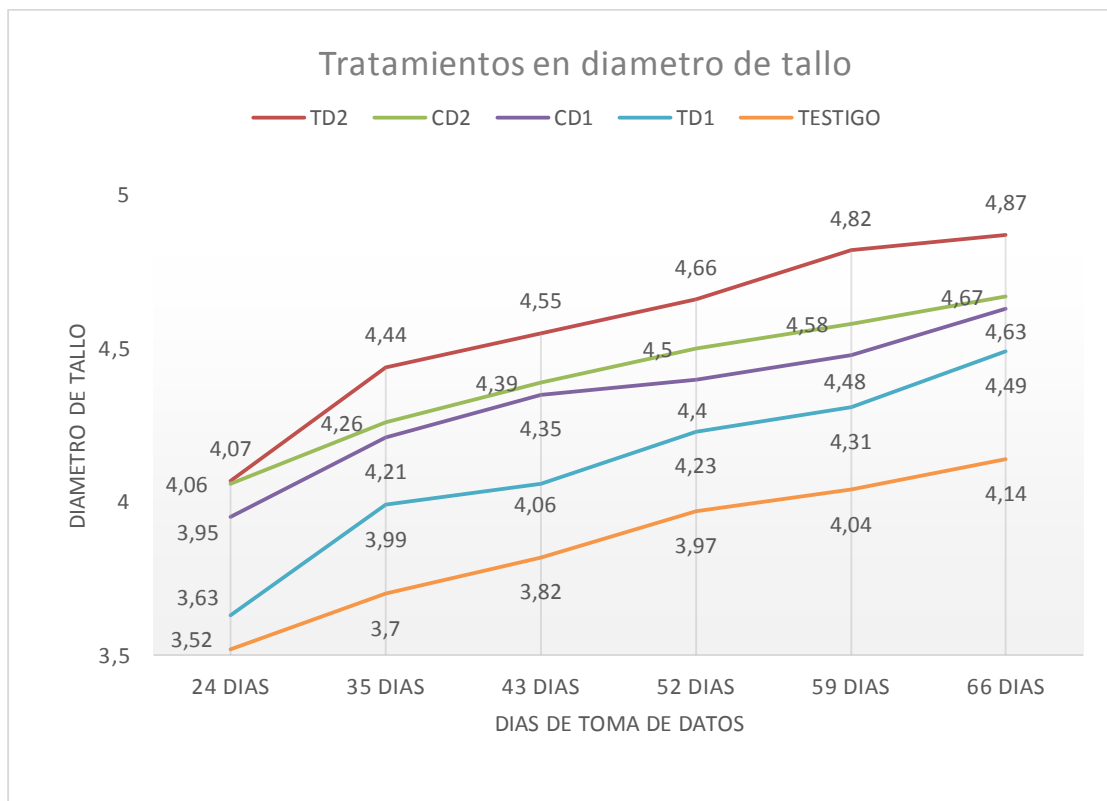
En la tabla 23 realizada al prueba Tukey al 5% se puede observar que existe diferencias significativas entre tratamientos en la variable diámetro del tallo en los diferentes días de la etapa fenológica del crecimiento de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) la cual nos muestra hasta tres rangos de significancia para los tratamientos lo cual al TD2 se ubica en los días 24 con 4,0 en los 35 con 4,4, en los 43 con 4,5, en los 52 con 4,6, en los 59 con 4,8 y en los 66 con 4,8 siendo el del primer rango dándole como el mejor tratamiento en esta variable, estos tres rangos fueron los que se obtuvo en esta variable (A, B, C) en los 24, 35, 43, 52, 59 días, el testigo en todos los días estudiados se ubica en el último rango de significancia.

Tabla 23. Prueba Tukey al 5%.

Tratamientos	24 DIAS		35 DIAS		43 DIAS		52 DIAS		59 DIAS		66 DIAS	
	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango
TD2	4,07	A	4,44	A	4,55	A	4,66	A	4,82	A	4,87	A
CD2	4,06	A	4,26	A	4,39	A B	4,5	A B	4,58	A B	4,67	A
CD1	3,95	A B	4,21	A B	4,35	A B	4,4	A B	4,48	A B	4,63	A B
TD1	3,63	B C	3,99	A B	4,06	B C	4,23	B C	4,31	B C	4,49	A B
TESTIGO	3,52	C	3,7	B	3,82	C	3,97	C	4,04	C	4,14	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 2. Promedio en tratamientos del diametro del tallo del cultivo del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino en los días 24, 35, 43, 52, 59 y 66, después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Discusión: El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo todas las características fenotípicas e incluyendo como variable principal la velocidad de crecimiento, que permite realizar una clasificación jerárquica.

La presencia de cepas crecimiento rápido frente a las de crecimiento lento que no fueron inoculadas se tiene que las plantas con la bacteria ayudan en las diversas etapas de las plantas. (Cuadrado et al., 2009)

14.5. Prueba de Tukey al 5% para Dosis del Rhizobium.

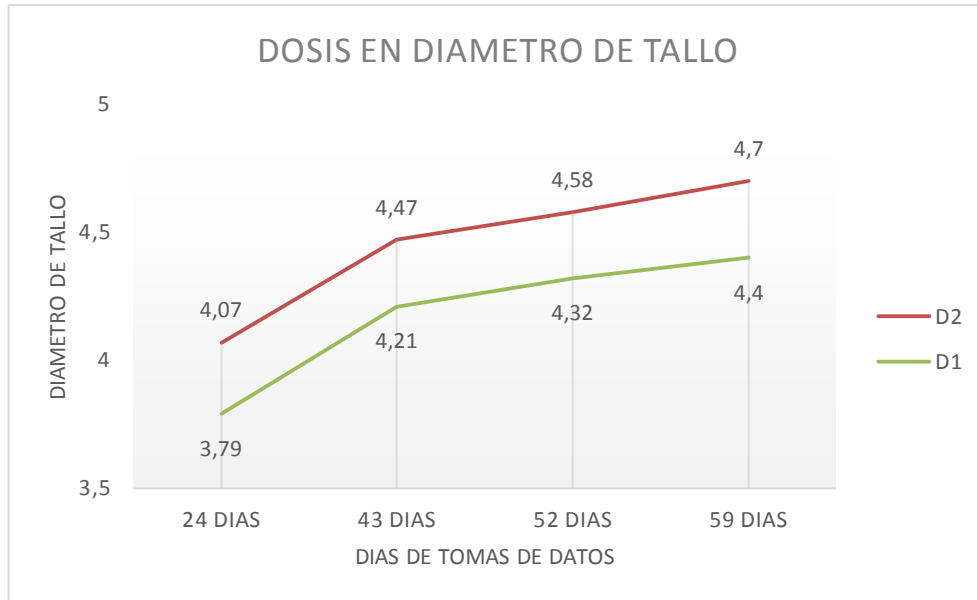
En la tabla 24 realiza la prueba Tukey al 5% se observa en la dosis en la variable diámetro del tallo podemos observar 2 rangos de significancia en el cual la dosis 2 se ubica en primer lugar con promedios en los días 24 con 4,07, en 43 con 4,47, en 52 con 4,58 y en los 59 con 4,7 en el diámetro del tallo en la área de investigación estudiada lo cual sobrepasa el promedio de la dosis 1 que se encuentra con los promedios de 3,79, 4,21, 4,32, 4,4 en el diámetro lo cual no se pudo tener resultados esperados.

Tabla 24. Prueba de Tukey al 5%.

Dosis	24 DIAS		43 DIAS		52 DIAS		59 DIAS	
	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango
D2	4,07	A	4,47	A	4,58	A	4,7	A
D1	3,79	B	4,21	B	4,32	B	4,4	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 3. Promedio en dosis del diametro del tallo de chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino en los días 24, 43, 52 y 59, después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.6. Prueba de Tukey al 5% para Cepa * Dosis del *Rhizobium*.

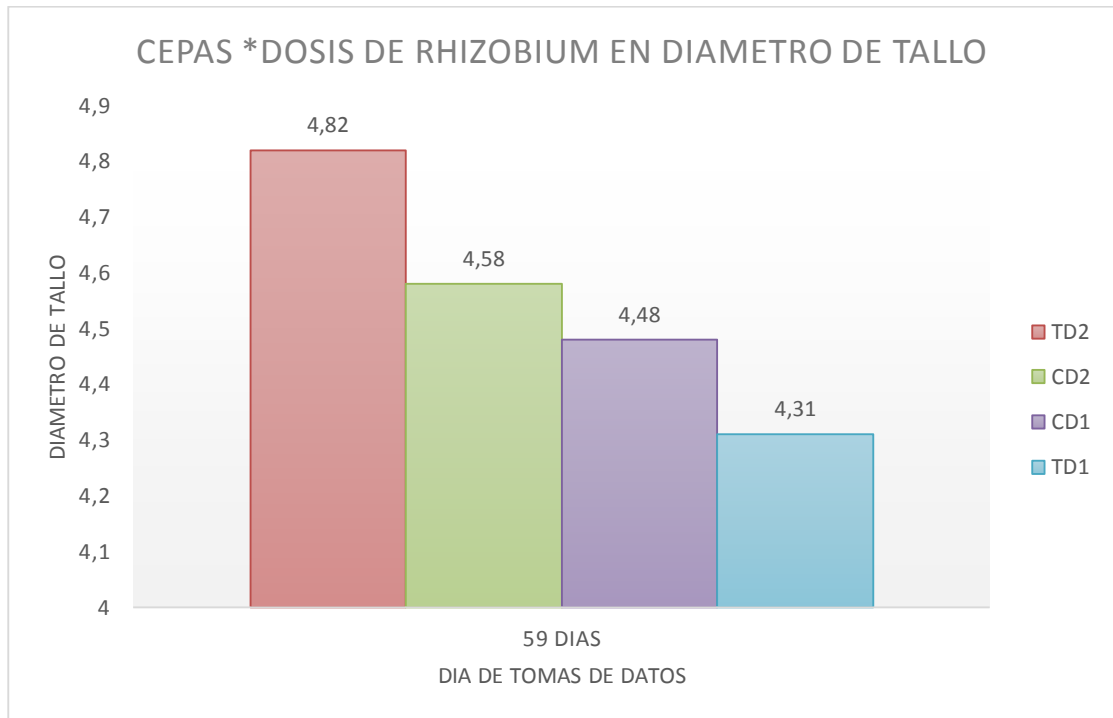
En la tabla 25 se puede observar realizada la prueba Tukey al 5% podemos observar que en el día 59 tenemos dos rangos de significancia en el cual el TD2 se ubica en el primer lugar con el promedio de 4,82 mm de diámetro de tallo en el área estudiada, lo cual nos da a entender que en estos días este tratamiento es el mejor que muestra resultados en los demás días, se llegó a tener una uniformidad en los tallos de las plantas.

Tabla 25. Prueba Tukey al 5%.

59 DIAS		
Cepas *dosis	Medias	Rangos
TD2	4,82	A
CD2	4,58	A B
CD1	4,48	A B
TD1	4,31	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 4. Promedio en Cepas*Dosis del diametro del tallo del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino en el día 59 después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.7. Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs Testigo.

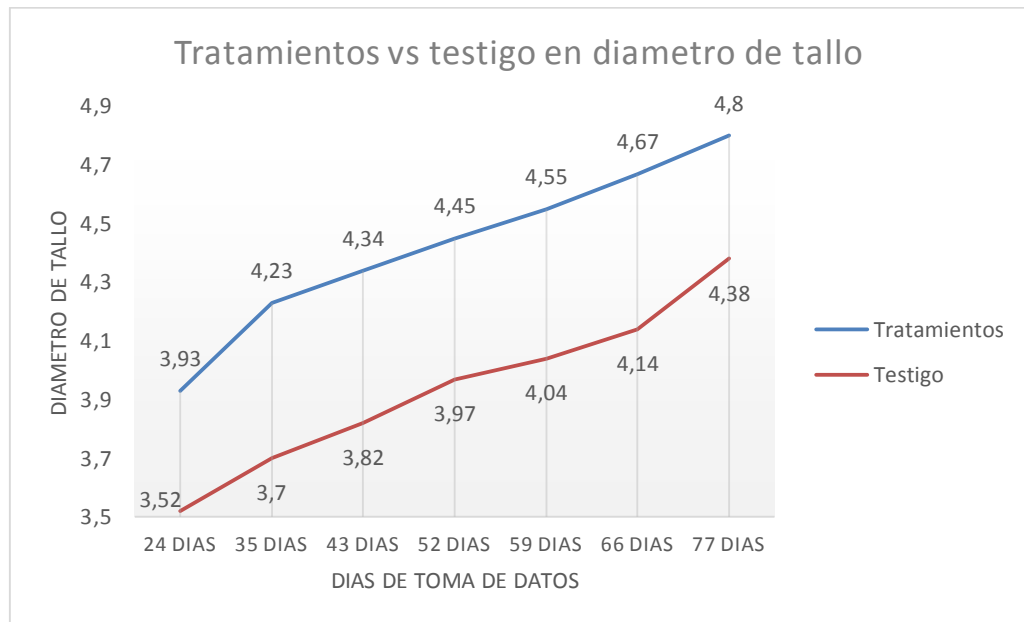
En la tabla 26 realizada la prueba Tukey al 5% se pudo observar que existe diferencias entre tratamientos vs testigo en el diámetro del tallo en los diferentes días en la etapa fenológica del crecimiento de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) mostrando dos rangos de significancia para los tratamientos indicando un promedio para el día 24 de 3,93 con dos rangos (A, B) de variación, para los 35 días se muestra un promedio de 4,23 con dos rangos (A, B) de variación, para los 43 días se muestra un promedio de 4,34 con dos rangos (A,B) de variación, para los 52 días se muestra un promedio de 4,45 con dos rangos (A,B) de variación, para los 59 días se muestra un promedio de 4,55 con dos rangos (A,B) de variación, para los 66 días se muestra un promedio de 4,67 con dos rangos (A,B) de variación, para los 77 días se muestra un promedio de 4,8 con dos rangos de significancia (A,B) lo cual nos indica que los tratamientos indicaron los resultados esperados en esta investigación dejándole en el último rango a los testigos.

Tabla 26. Prueba de Tukey al 5%.

	24 DIAS		35 DIAS		43 DIAS		52 DIAS		59 DIAS		66 DIAS		77 DIAS	
	Medias	Rang o	Medias	Rang o	Medias	Rango o	Medias	Rang o	Medias	Rang o	Medias	Rang o	Medias	Rang o
Tratamientos	3,93	A	4,23	A	4,34	A	4,45	A	4,55	A	4,67	A	4,8	A
Testigo	3,52	B	3,7	B	3,82	B	3,97	B	4,04	B	4,14	B	4,38	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 5. Promedio en Tratamientos vs Testigos del diametro del tallo de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) variedad INIAP – 450 Andino en los días 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua)



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.8. Número de Hojas

En la tabla 27 variable número de hojas en la planta de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*), se puede observar que los resultados obtenidos hay significancia estadística en tratamientos en los días 52 con un coeficiente de variación de 9,97 y en el día 66 con 9,03 en los demás días no presentaron significancia, de igual manera existe significancia en cepas en el día 52 con un coeficiente de 9,07, en el análisis de varianza en los días 24, 35, 43, 52, 59, y 66 se puede observar que existe significancia estadística en la dosis con un coeficiente de variación de en los 24 días con 6,04, en el día 35 con 17,86, a los 43 días con 10,18, en los 52 días con 9,07, en los 59 días con 12,84 y a los 66 días con un coeficiente de variación de 9,03, de igual manera las demás fuentes de variación no tienen significancia estadística en ninguno de los días estudiados.

Tabla 27. ADEVA del Número de hojas en los 10, 24, 35, 43, 52, 59, 66 y 77 días después de la germinación del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) bajo las dos diferentes dosis del Rhizobium spp.

F.V.	g l	10 DIAS			24 DIAS			35 DIAS			43 DIAS			52 DIAS			59 DIAS			66 DIAS			77 DIAS		
		F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.	F	r	g.
Tratamientos	4	0,45	0,76	n	3,19	0,07	n	2,43	0,13	n	3,58	0,05	n	5,71	0,01	n	1,68	0,24	n	7,83	0,00	n	0,90	0,50	n
Repeticiones	2	0,19	0,83	n	1,85	0,21	n	0,35	0,71	n	0,14	0,87	n	1,05	0,39	n	0,41	0,67	n	0,74	0,50	n	0,26	0,78	n
Cepas	1	1,21	0,30	n	1,00	0,34	n	1,34	0,28	n	2,93	0,12	n	6,64	0,03	n	0,46	0,51	n	1,50	0,25	n	0,07	0,79	n
Dosis	1	0,05	0,82	n	6,50	0,03	n	6,26	0,03	n	10,70	0,01	n	15,19	0,00	n	4,45	0,06	n	25,50	0,00	n	2,31	0,16	n
Cepas*Dosis	1	0,47	0,51	n	4,67	0,06	n	2,09	0,18	n	0,43	0,53	n	0,00	0,96	n	0,22	0,65	n	0,00	0,96	n	0,25	0,63	n
Tratamientos vs testigo	1	0,08	0,77	n	0,07	0,79	n	0,02	0,90	n	0,39	0,55	n	1,11	0,32	n	1,58	0,24	n	4,29	0,07	n	0,97	0,35	n
Error	8																								
Total	1																								
	4																								
Cv		21,24			6,04			17,86			10,18			9,07			12,84			9,03			17,66		

Nota: F.V. = Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, C.V. Coeficiente de Variación, N/S No Significativo, (*) = Significativo, (**) = Altamente significativo.

Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.9. Prueba de Tukey al 5% en tratamientos en el número de hojas.

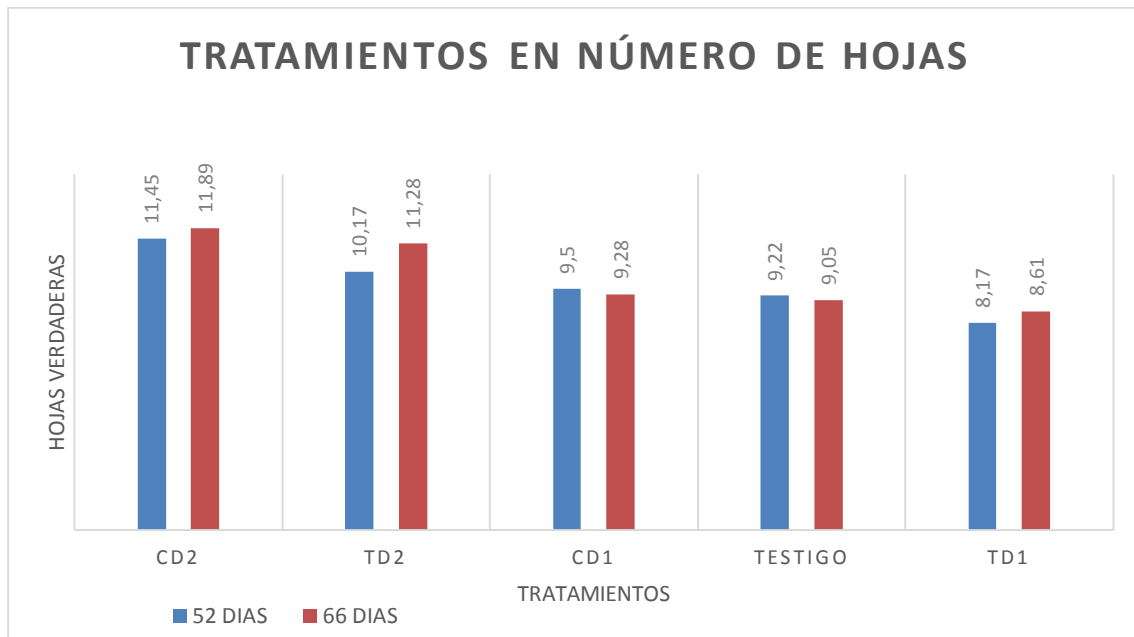
En la tabla 28 realizada la prueba Tukey al 5% se observa que existe diferencia en los tratamientos en la área foliar en los diferentes días de la etapa fenológica del crecimiento de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) mostrando de dos a tres rangos de significancia para los tratamientos e indicando al T4 (CD2) en el primer lugar en los diferentes días con valores promedios a los 52 de 11,45, y en los 66 días con 11,89, esto nos indica que este tratamiento fue el mejor que se obtuvo mayores resultados mi investigación realizada.

Tabla 28. Prueba de Tukey al 5%.

Tratamientos	52 DIAS		66 DIAS			
	Medias	Rango	Medias	Rango		
T4: CD2	11,45	A	11,89	A		
T2: TD2	10,17	A	11,28	A	B	
T3: CD1	9,5	A	9,28	B	B	C
T5: TESTIGO	9,22	A	9,05	B	C	
T1: TD1	8,17		8,61	B	C	

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 6. Promedio en Tratamientos en el número de hojas del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino en los días 24, 35, 43, 52, 59, 66 después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Discusión: Los resultados mostraron que mientras se realice la aplicación de *Rhizobium* spp asociada con microorganismos eficientes comparadas con las otras formas se incrementó los parámetros morfológicos y productivos evaluados, como la producción de hojas, la altura de la planta, las legumbres por planta, los granos por legumbre, la masa de 100 semillas y el rendimiento del grano en 153,23%, cuando no fueron inoculadas con *Rhizobium*, y 100%, con la inoculación en relación con el tratamiento control.

La inoculación con *Rhizobium* en plantas de fríjol de forma individual o asociada fue eficiente en promover el incremento. Este efecto benéfico de la inoculación con *Rhizobium* en plantas de fríjol fue reportado y de la mayor de plantas (leguminosas). (Hurtado et al., 2019)

14.10. Prueba de Tukey al 5% en cepas en el número de hojas.

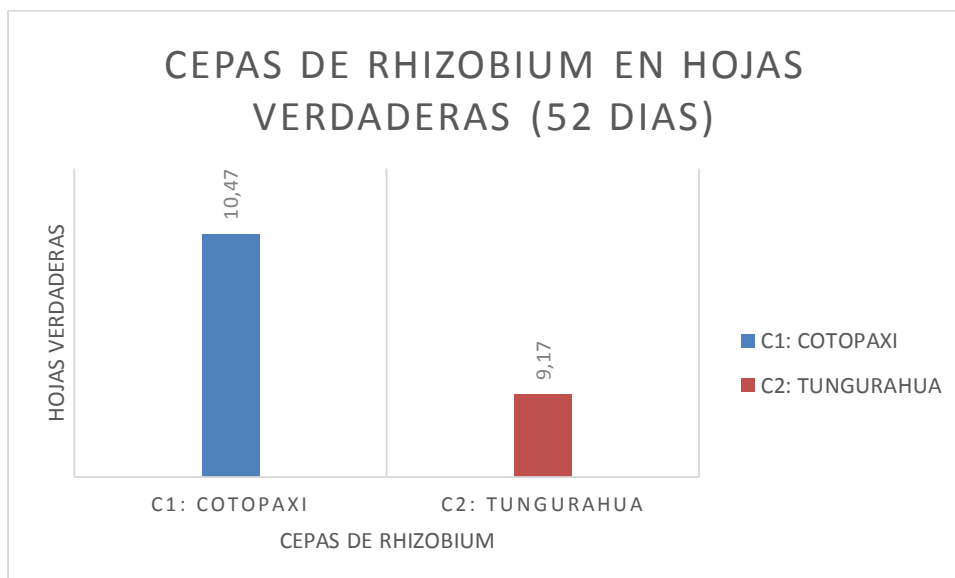
En la tabla 29 realizada la prueba Tukey al 55 se puede identificar que existe dos rangos de significancia en esta variable utilizada toda la investigación, indica que la cepa de Cotopaxi se ubicó en el primer rango de significancia en el día 52 con un valor de 10,47, dando a entender que esta cepa fue la que indico mayores resultados en las plantas en el área foliar.

Tabla 29. Prueba Tukey al 5%.

52 DIAS		
Cepas	Medias	Rango
C1: COTOPAXI	10,47	A
C2: TUNGURAHUA	9,17	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 7. Promedio en Cepas en número de hojas de chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino a los 52 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.11. Prueba de Tukey al 5% en la Dosis en el número de hojas.

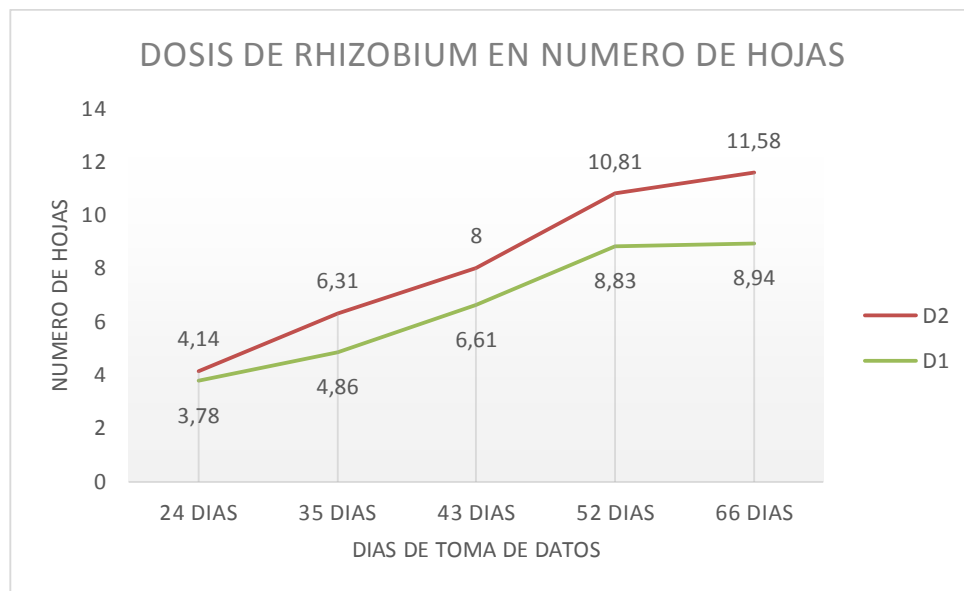
En la tabla 30 realizada la prueba Tukey al 5% se puede observar que hay dos rangos de significancia en el cual la dosis 2 como podemos observar en los diferentes días como son a los 24 días con 4,14 a los 35 días con 6,31, a los 43 días con 8, a los 52 días con 10,81 y a los 66 días con 11,58 se coloca en el primer rango en el número de hojas por lo cual la dosis 2 tuvo mucha importancia en la variable número de hojas por lo cual se llega a determinar que la mejor dosificación fue de D2 2cc.

Tabla 30. Prueba de Tukey al 5%⁸

Dosis	24 DIAS		35 DIAS		43 DIAS		52 DIAS		66 DIAS	
	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango	Medias	Rango
D2	4,14	A	6,31	A	8	A	10,81	A	11,58	A
D1	3,78	B	4,86	B	6,61	B	8,83	B	8,94	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 8. Promedio en la Dosis en el número de hojas de chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) variedad INIAP – 450 Andino a los 24, 35, 43, 52 y 66 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium* spp (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.12. Floración en las plantas del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet).

En esta tabla 31 con el análisis de varianza en la variable estudiada como el número de inflorescencia a los 77 días se puede observar significancia estadística en las siguientes fuentes de variación como es en los tratamientos, cepas, dosis y tratamientos vs testigos, por otro lado, las demás fuentes de variación no indican significancia estadística durante todo la investigación y su coeficiente de variación es de 14,78, por lo cual se ira identificando la floración en los diferentes tratamientos.

Tabla 31. ADEVA de Floración a los 77 días después de la germinación del cultivo del chocho (*Lupinus mutabilis sSweet*) bajo la dos diferentes dosis del *Rhizobium spp.*

77 DIAS						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	sig.
Tratamientos		0,86	4	0,22	36,08	<0,0001 **
Repeticiones		0,03	2	0,01	2,16	0,1778 ns
Cepas		0,24	1	0,24	24	0,0012 *
Dosis		0,15	1	0,15	15	0,0047 *
Cepas*Dosis		0,01	1	0,01	1	0,3343 ns
Tratamientos vs testigo		0,47	1	0,47	78,22	<0,0001 **
Error		0,05	8	0,01		
Total		0,94	14			
Cv		14,78				

Nota: F.V. = Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, C.V. Coeficiente de Variación, N/S No Significativo, (*) = Significativo, (**) = Altamente significativo.

Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.13. Prueba de Tukey al 5% en Tratamientos en la floración.

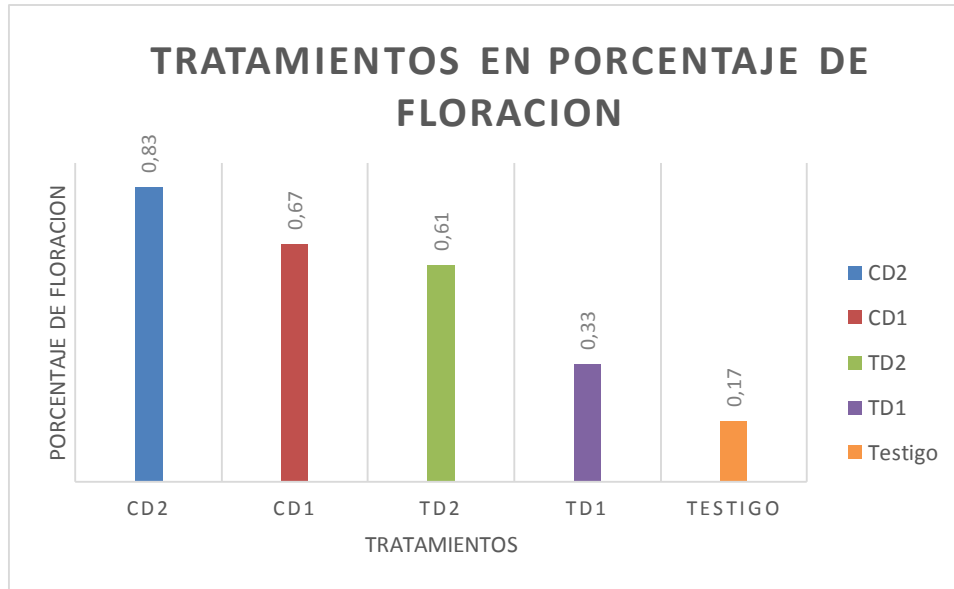
En la tabla 32 podemos observar con la prueba Tukey al 5%, esta tabla nos muestra cuatro rangos (A, AB, B, C), de variación como podemos darnos cuenta que en los tratamientos se puede observar que la dosis 2 (2cc) de Rhizobium (Cotopaxi), se encuentra en el primer rango de significancia a los 77 días de investigación con un promedio de 0,83 de floración esto quiere decir que este tratamiento fue el de mayores resultados en esta variable estudiada durante toda la investigación.

Tabla 32. Prueba de Tukey al 5%.

Tratamientos	Medias	Rango
CD2	0,83	A
CD1	0,67	A B
TD2	0,61	B
TD1	0,33	C
Testigo	0,17	C

Fuente. (Changoluisa, 2022)

Figura 9. Promedio en los Tratamientos en la floración del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Discusión: Las variables morfofisiológicas fueron determinados bajo condiciones de campo. Los días a floración se evaluaron en plena floración y los valores están comprendidos entre días, respectivamente se tuvo los mayores resultados este cultivo es parte principal de la dieta diaria de personas pobres, donde tiene la más alta producción y consumo debido a que reúne buenas cualidades agronómicas (precocidad, buen potencial de rendimiento, buena adaptación para los valles interandinos fríos, utilidad en programas de rotación, mejorador de suelos por su propiedad de fijar nitrógeno mediante la simbiosis con *Rhizobium*).

En el Perú, muy pocos experimentos han sido realizados bajo condiciones de campo con diversas variedades. Generalmente se han hecho en una sola variedad. Estos estudios previos muestran una respuesta adecuada en la floración por la nodulación y el efecto de la simbiosis sobre el crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos.(Cantaro-Segura et al., 2019)

14.14. Prueba de Tukey al 5% en Cepas en la floración.

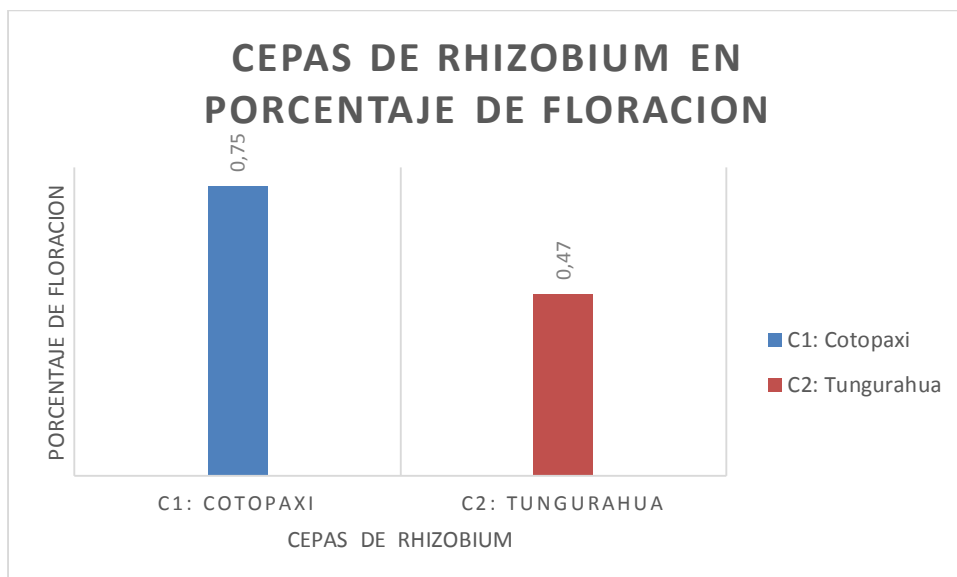
En la tabla 33 realizada la prueba de Tukey al 5% se puede observar que la cepa (C1) Cotopaxi se encuentra en el rango (A) de significancia durante la investigación con un promedio de 0,75, dando como mejores resultados finales en la floración del cultivo de la investigación del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variada INIAP 450 Andino.

Tabla 33. Prueba de Tukey al 5%.

Cepas	Medias	Rango
C1: Cotopaxi	0,75	A
C2: Tungurahua	0,47	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 10. Promedio en las Cepas en la floración del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.15. Prueba de Tukey al 5% en Dosis en la floración.

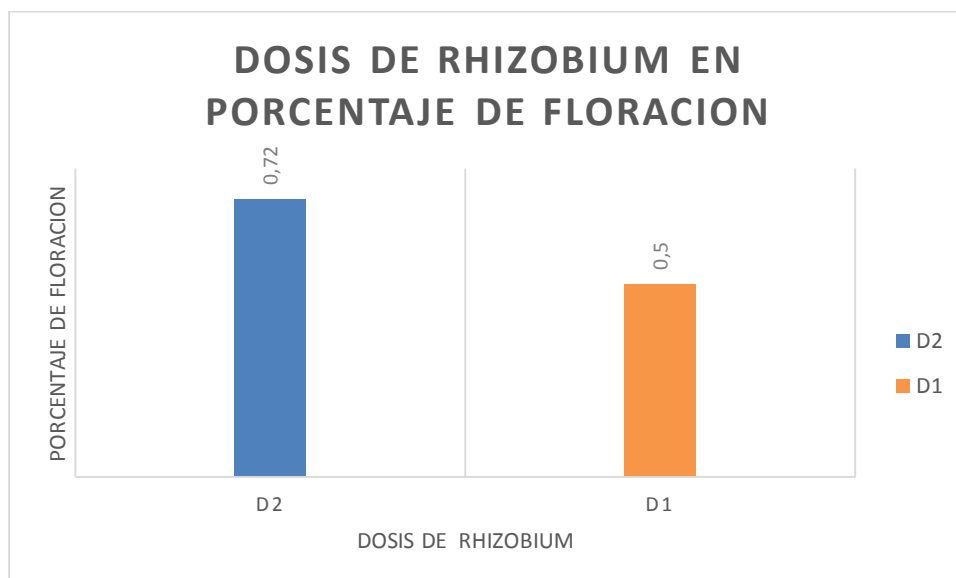
En la tabla 34 realizada la prueba Tukey al 5% se observa que existe diferencia entre las dosis en la variable de floración a los 77 días de la etapa fenológica de crecimiento de las plantas de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) mostrando dos rangos de significancia para las dosis lo cual la a la dosis D2 se ubica en el primer rango de significancia dando los mejores resultados con un promedio de 0,72, la cual tuvo más efecto en la planta la dosis dos que es de 2cc.

Tabla 34. Prueba de Tukey al 5%.

Dosis	Medias	Rango
D2	0,72	A
D1	0,5	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 11. Promedio en las Dosis en la floracion del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.16. Nódulos en la raíz del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*).

En esta tabla 35 con el análisis de varianza en la variable estudiada como el número de nódulos a los 77 días se puede observar significancia estadística en las siguientes fuentes de variación como es en los tratamientos, cepas, cepas*dosis y tratamientos vs testigos, por otro lado, las demás fuentes de variación no indican significancia estadística durante toda la investigación y su coeficiente de variación es de 4,26, por lo cual se ira identificando los nódulos en los diferentes tratamientos.

Tabla 35. ADEVA de nódulos a los 77 días después de la germinación del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) bajo la dos diferentes dosis del *Rhizobium spp.*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	sig.
Tratamientos	19,64	4	4,91	439,65	<0,0001	**
Repeticiones	0,05	2	0,02	2,12	0,182	ns
Cepas	2,73	1	2,73	273,00	<0,0001	**
Dosis	0,0003	1	0,0003	0,03	0,8668	ns
Cepas*Dosis	5,28	1	5,28	528,00	<0,0001	**
Tratamientos vs testigo	11,63	1	11,63	1041,66	<0,0001	**
Error	0,09	8	0,01			
Total	19,78	14				
Cv	4,26					

Nota: F.V. = Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, C.V. Coeficiente de Variación, N/S No Significativo, (*) = Significativo, (**) = Altamente significativo.

Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.17. Prueba de Tukey al 5% en Tratamientos en la nodulación.

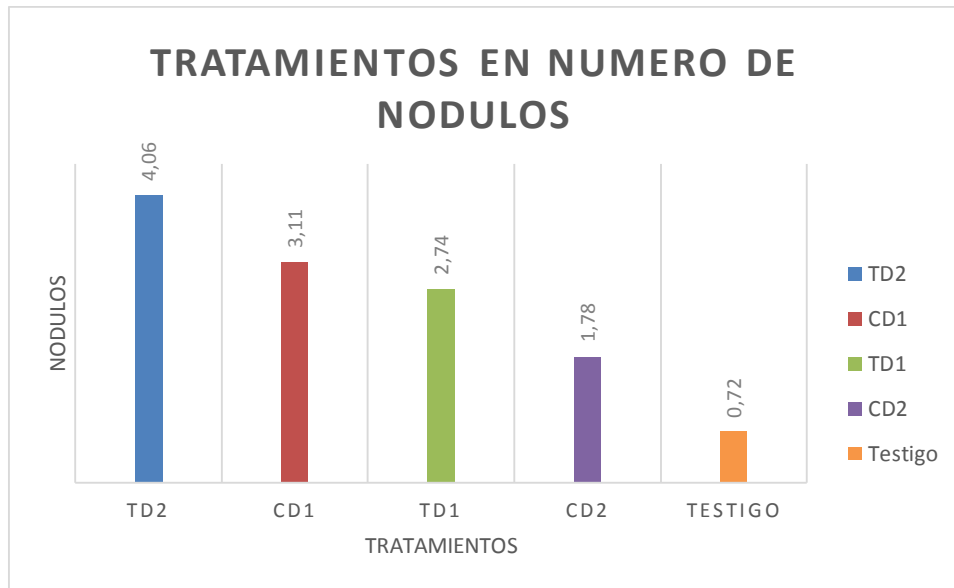
En la tabla 36 realizada la prueba Tukey al 5% se puede observar los rangos de significancia que arrojan los resultados obtenidos, que indican hasta cinco rangos de significancia (A, B, C, D, E) lo cual el TD2 se ubica en el primer lugar con los mejores resultados en la variable de nódulos lo cual nos conlleva que este tratamiento es el que tuvo mayor cantidad de nódulos en la investigación con un promedio de 4,06.

Tabla 36. Prueba Tukey al 5%.

Tratamientos	Medias	Rango
TD2	4,06	A
CD1	3,11	B
TD1	2,74	C
CD2	1,78	D
Testigo	0,72	E

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 12. El promedio en los Tratamientos en los nodulos de la raiz del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Discusión: Las leguminosas muestran una amplia diversidad tanto morfológica como de hábitats y ecología, encontramos que las leguminosas son noduladas por los rizobio y la fijación de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa es de considerable importancia en agricultura, porque causa un aumento significativo del nitrógeno las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas. (Wang et al., 2002)

Este estudio procura brindar una alternativa de solución con la aplicación del inoculante en la dosis adecuada en cultivos de vainita, cuyos resultados puedan contribuir a la disminución de la fertilización química nitrogenada. Y así ayuda al incremento en el contenido de N en el cultivo vegetal de igual manera en su peso seco y mantienen el rendimiento en las leguminosas, baja costos de producción y la contaminación de mantos acuíferos y suelos, es vital para una agricultura sustentable.(Chipana et al., 2017)

14.18. Prueba de Tukey al 5% en Cepas en la nodulación.

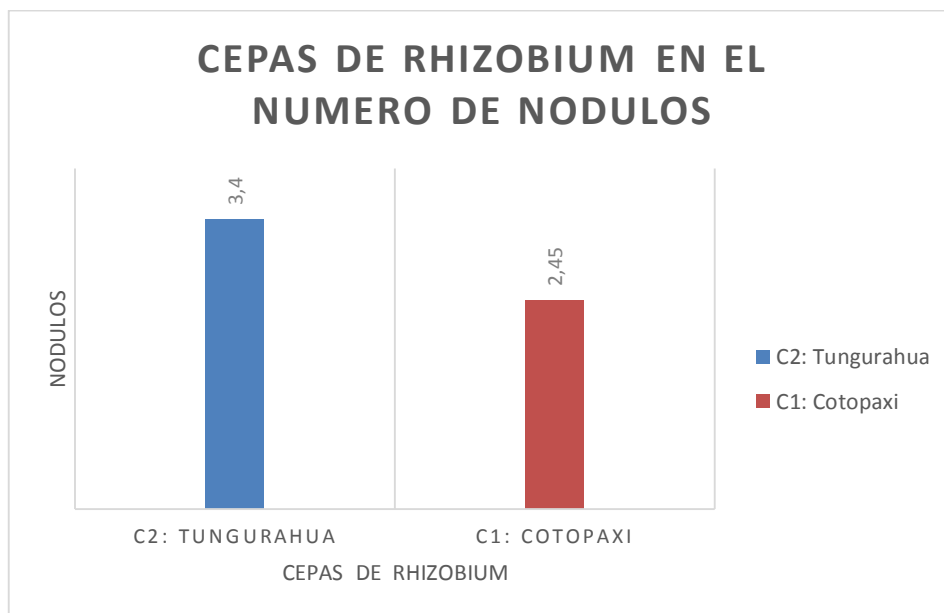
En la tabla 37 realizada la prueba Tukey al 5% se puede observar que la cepa (C2) Tungurahua se encuentra en el rango (A) de significancia durante la investigación con un promedio de 3,4, dando como mejores resultados finales en la nodulación del cultivo de la investigación del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variada INIAP 450 Andino.

Tabla 37. Prueba de Tukey al 5%.

Cepas	Medias	Rango
C2: Tungurahua	3,4	A
C1: Cotopaxi	2,45	B

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 13. Promedio en los Cepas en los nodulos de la raiz del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

14.19. Prueba de Tukey al 5% en Cepas* Dosis en la nodulación.

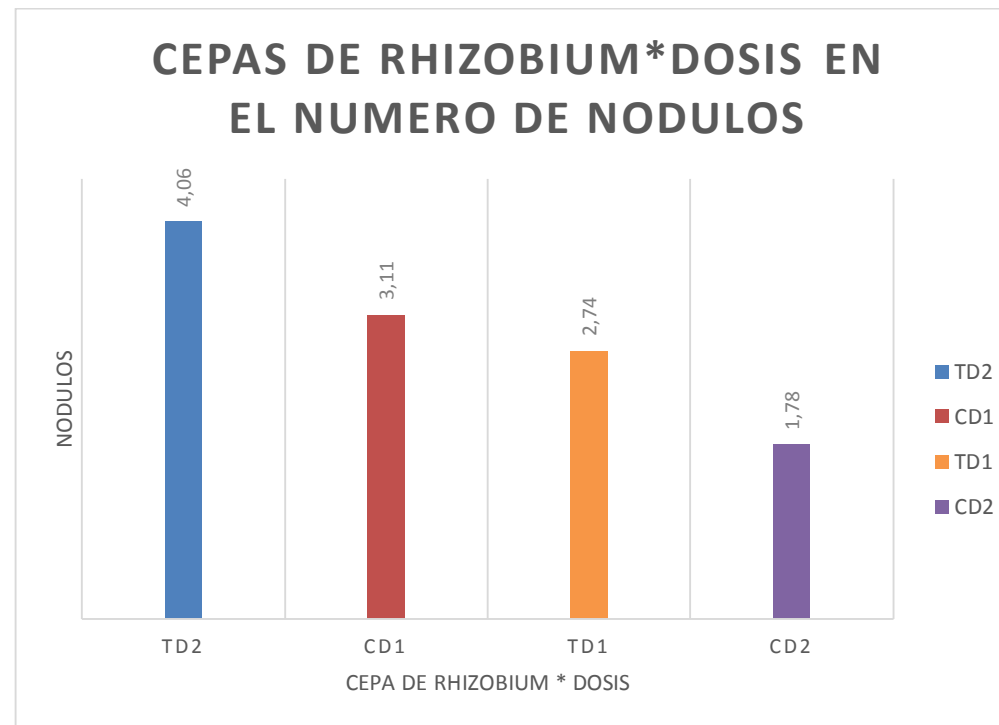
En la tabla 38 realizada la prueba Tukey al 5% se puede observar los rangos de significancia que arrojan los resultados obtenidos, que indican hasta cuatro rangos de significancia (A, B, C, D,) lo cual el TD2 se ubica en el primer lugar con los mejores resultados en la variable de nódulos lo cual nos conlleva que este tratamiento es el que tuvo mayor cantidad de nódulos en la investigación con un promedio de 4,06.

Tabla 38. Prueba de Tukey al 5%.

Cepas*dosis	Medias	Rango
TD2	4,06	A
CD1	3,11	B
TD1	2,74	C
CD2	1,78	D

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 14. Promedio en los Cepas* Dosis en los nodulos de la raiz del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) variedad INIAP – 450 Andino a los 77 días después de la siembra con dos diferentes cepas de *Rhizobium spp* (Cotopaxi – Tungurahua) a dos dosis 1cc – 2cc.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

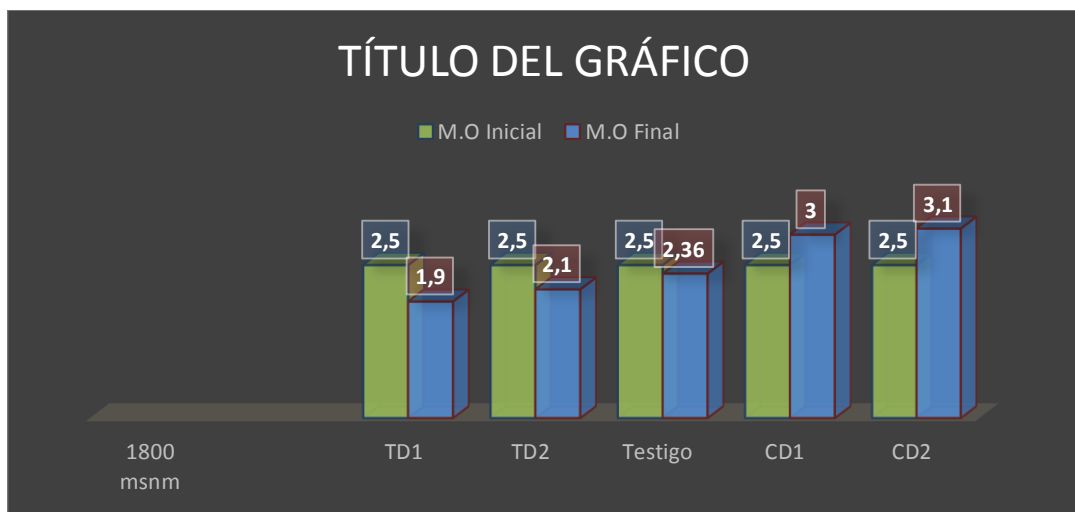
14.20. Análisis de suelo inicial y final.

Tabla 39. Interpretación de análisis inicial y final

Localización		
1800 msnm	M.O Inicial	M.O Final
TD1	2,5	1,9
TD2	2,5	2,1
Testigo	2,5	2,36
CD1	2,5	3
CD2	2,5	3,1

Fuente: (Changoluisa, 2022)

Figura 15. Análisis de suelo inicial y final del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), INIAP-450 Andino.



Fuente: (Changoluisa, 2022)

Al empezar este proyecto con un suelo inicial en Materia Orgánica de 2,5% demostrando un nivel bajo y con un PH de 7,75 siendo ligeramente alcalino, una vez extraído las raíces del *Lupinus* a los 4 meses se recogió 2 kg del suelo de cada tratamiento y del testigo para realizar los análisis finales del suelo, obteniendo los siguientes resultados; Los mejores resultados de esta investigación en el CD1 con un 3% y el CD2 con un 3,1% ya que la bacteria *Rhizobium* en la cepa de (Cotopaxi) con 1cc – 2cc ha sido de gran importancia e incremento en la mejora en cuanto a los recursos del suelo, es una alternativa de mejora en la M.O de acuerdo al cultivo del Chocho, demostrando que la planta de chocho si mejora los suelos pobres en nutrientes, pero su crecimiento fue retrasado a comparación con los tratamientos, aumentando el porcentaje en M.O. De acuerdo al TD1 Y TD2 con cepas de *Rhizobium* de (Tungurahua) de 1cc – 2cc que son los dos que se redujeron en la M.O, de acuerdo al TD1 con un 2,5% reduciendo a un 1,9%

, en el TD2 con un 2,5% reduciendo a un 2,1% obteniendo los dos un nivel bajo. En el testigo obteniendo una M.O de 2,5% reduciendo a un 2,36. Todos los tratamientos mantuvieron un pH entre 7,58 a 7,93 ligeramente alcalino.

Discusión: El 85% de la fijación de nitrógeno en el suelo tiene como origen biológico. La fijación de nitrógeno se reduce en amoniaco y se convierte en forma orgánica, es una de la característica en algunos procariotas. Bacterias como los rizobios hacen simbiosis con las raíces de las plantas leguminosas, formar nódulos radicales y realizan fijación biológica de nitrógeno. (Chipana et al., 2017)

15. CONCLUSIONES

- La adaptabilidad de las cepas de *Rhizobium* en el cultivo de *Lupinus mutabilis Sweet* inoculado con las dosis, se puede identificar que tuvo significancia estadística para los tratamientos, repeticiones, cepas, cepas*dosis, tratamientos vs testigos, su germinación fue igual a la que se sembró sin dosis de *Rhizobium* demostrando plantas vigorosas, en la altura de planta con media en dosis de 38,31 en la D2 (2cc) en rango A, el diámetro de tallo en tratamientos con una media de 4,07 rango A, ubicando a los testigos en el rango C hasta el final de la investigación.
- El mejor inoculo de *Rhizobium* fue la dosis (TD2) Tungurahua dosis 2cc, obteniendo resultados satisfactorios como en el diámetro de tallo con una media final 4,87 a los 66 días en rango A.
- Una vez extraída la raíz a los 77 días se contabilizó el número de nódulos con los siguientes resultados, se concluyó que la dosis TD2 presentó una media de 4.06 en rango A, presentando un número total de 76 nódulos con una raíz pivotante ramificada y fuerte llegando al tamaño de 25cm, sobrepasando a las demás dosis aplicadas en el cultivo de chocho donde los datos más bajos obtenidos fue de la dosis CD2 con medias de 1,78.
- En la multiplicación de *Rhizobium* se pudo concluir que las cepas en reproducirse más rápido fue la cepa de Cotopaxi a los 3 días en la incubadora a 30°C presentado un color amarillento, mientras que la de Tungurahua se observó un color celeste transparente a los 5 días, una vez realizado las diluciones seriadas se contabilizó y la cepa de Cotopaxi trabajó con 4.4×10^{-5} UFC y la de Tungurahua con 2.5×10^{-1} , donde se puede decir que la bacteria rizobios no son iguales ni en el color, estas bacterias trabajan de forma diferente en la planta que se encuentren hospedadas (leguminosas) realizando el proceso de la FBN.

16. RECOMENDACIONES

- Es recomendable que si se va a realizar la inoculación, se debe tomar medidas de precaución y colocar las dosis correctas, ya que si se sobre pasa de dosis al inocular la semilla puede sufrir estrés y la bacteria no va a adaptarse a esas condiciones, existen varios métodos de inoculación que lo mencionas varios autores en sus proyectos solo es importante leer, entender y aplicarlo en el campo. En este proyecto se aplicó el método sumergir a la semilla en el inoculante a un 1cc y 2cc.
- Es fundamental conocer al *Rhizobium* que se va a aplicar al cultivo, saber sus características el sector proveniente de la bacteria y la forma de actuar en el cultivo inoculado, donde así se podrá saber si ayudara a formar nódulos y desarrollo de la planta, ahí sabremos con qué tipo de rizobios se está trabajando, obtendremos resultados esperados como fue la de esta investigación que se obtuvo un buen desarrollo del *Lupinus* y abundancia en nódulos en las raíces, donde la dosis recomendada fue (TD2).
- Es importante dar un manejo adecuado al manual de la multiplicación del *Rhizobium spp* para la obtención de diluciones como inoculantes de las mismas, para así poder obtener en campo una vida microbiana correcta al momento de inocular a un cultivo de leguminosas.

17. BIBLIOGRAFIA

- ABRIL PORRAS, victor H. (2015). La importancia del Lupino en el mantenimiento y mejoramiento de la fertilidad del suelo. *X CONGRESO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA ESPE 2015*, 22–25.
file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/dgarccos,+C1_Articulo_5.pdf
- Almeida Cuastumal, J. L. (2015). “Evaluación del rendimiento de cuatro ecotipos de chocho (*Lupinus mutabilis*), en el Centro Experimental San Francisco, en Huaca – Carchi”.
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI.
- Andino, I. (1999). Material De Siembra. *INIAP-450*, 1992.
- B., E. P. I. N. M. O. Á. M. I. M. R. M. D. R. O. L. L. A. C. M. (2009). Amaranto y Ataco. *Programa Nacional de Leguminosas y Granoas Andinos . Santa Catalina, INIAP*, 69, 3.7.
<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
<http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/306/4/iniapscbd359.pdf>
- Barrera Eisy. (2015). EVALUACIÓN DEL FRIJOL LUPINUS (*Lupinus mutabilis*) COMO ABONO VERDE PARA LA PRODUCCION AGROECOLOGICA EN EL MUNICIPIO DE SUBACHOQUE CUNDINAMARCA. *EVALUACIÓN DEL FRIJOL LUPINUS (Lupinus Mutabilis) COMO ABONO VERDE PARA LA PRODUCCION AGROECOLOGICA EN EL MUNICIPIO DE SUBACHOQUE CUNDINAMARCA.*, 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Caicedo, C., Murillo, A., Pinzón, J., Peralta, E., & Rivera, M. (1999). INIAP-450 ANDINO VARIEDAD DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet) Manejo agronómico y recetas para su consumo. *INIAP FU .NDACYT*, 0(0), 01–05.
- Caicedo Carlos; Murillo Angel; Peralta Eduardo; Pinzon Jose; Rivera Marco. (1999). INIAP-450 ANDINO VARIEDAD DE CHOCHO PARA LA ZONA CENTRO/NORTE DE LA SIERRA ECUATORIANA. *ESTACION INIAP SANTA CATALINA*.
<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Caicedo Carlos, P. E. (2001). EL CULTIVO DE CHOCHOS *Lupinus mutabilis* Sweet: FITONUTRICION, ENFERMEDADES Y PLAGAS, EN EL ECUADOR. *INIAP-*

Estacion Experimental Santa Catalina, 103.

<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zúñiga-Dávil, D. (2019). *Efectividad simbiótica de dos cepas de Rhizobium sp. en cuatro variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en Perú* (pp. 73–81). Artículos de identificación.

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292019000400073&lang=pt

Castillo, J., & Ochoa, J. (2001). El Cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Fitonutrición, Enfermedades y Plagas, en el Ecuador. *Enfermedades Del Chocho, 103*, 19–29.

Chipana, V., Clavijo, C., Medina, P., & Castillo, D. (2017). INOCULACIÓN DE VAINITA (*Phaseolus vulgaris* L.) CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Rhizobium etli* Y SU INFLUENCIA SOBRE EL RENDIMIENTO DEL CULTIVO. *Ecología Aplicada, 16*(2), 2017. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v16i2.1012>

Croci, C. (2020). *Dinàmica de la expresi3n de los nod de rizobios pertenecientes al g3nero Cupriavidus*. Universidad de la Rep3blica Uruguay.

Cronquist, A. (1988). The Evolution and Classification of FLOWERING PLANTS. *Bronx, New York. U.S.A.: New York Botanical Garden, 0*(Botanica Garden), 10–20.

Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. (2009). Caracterizaci3n de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulaci3n) seleccionados de los cultivos de fr3jol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioin3culos. *Revista Colombiana de Ciencias Qu3mico - Farmac3uticas, 38*(1), 78–104.

<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>

ECOGRAINS, & Cultivos Andinos – FAO. (2014). *Caracteristicas del Tarwi, TARWI o CHOCHO (Lupinus Mutabilis)*. 01.

<https://ecograins.wordpress.com/2014/05/02/caracteristicas-del-tarwi/>

El Tel3grafo Ecuador. (2016). *El d3ficit de chocho llega a 6.397 toneladas*. 17 - 12.

En Tao Wang, Julio Mart3nez Romero, I. L. L. (n.d.). *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas*. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>

- Estrella, E. (1998). *El Pan de América. Etnohistoria de los alimentos aborígenes del Ecuador* (3° edición). FUNDACYT.
- FERTIVEG AGRI, s. I. (2021). *NITROCODE RB, concentrado de bacterias del Género Rhizobial*. Nutrición Avanzada Para Tus Cultivos.
- Gabriel, J., & Teresa, A. (2015). Aislamiento , caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol * Isolation , molecular characterization and evaluation of nitrogen-fixing strains in promoting the growth of beans Resumen Intr. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 929–942. <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263139893002.pdf>
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. In *Ct* (Vol. 3).
- García Zambrano, J. L. (2014). *Gestión de la producción asociativa del chocho (Lupinus Mutabilis Sweet) y su incidencia en el nivel de ingresos de los habitantes productores de la comunidad Sarachupa*. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/8567>
- Hamdi, Y. (1985). La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. *Boletín de Suelos de La FAO N°*, 49(0), 0.
- Hurtado, A. C., Díaz, Y. P., Rodríguez, E. Q., & Viciado, D. O. (2019). Efecto de la aplicación asociada entre *Rhizobium leguminosarum* y microorganismos eficientes sobre la producción del fríjol común. *Manejo de Sistemas Productivos*, 20(2), 295–308. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v20n2/0122-8706-ccta-20-02-00295.pdf>
- Inoue, I. A. F. G. G. I. R. C. G. I. N. M. F. I. H. (2015). Manejo Integrado del Cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilissweet*). *Recomendaicon Para Agricultores*, 4–44. http://www.congope.gob.ec/wp-content/uploads/2017/10/Cultivo_de_chocho_manual.pdf
- Jose, A. (2015). Universidad politécnica estatal del carchi. *Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencoas Ambientales*.
- Kuykendall, D. (2005). Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática. *Springer Estadounidense*, 1(0), 0.
- La Hora. (2016). *Antes de sembrar el chocho, prevenga todo tipo de enfermedades*.

- Laich, F. (n.d.). *La fijación biológica del nitrógeno y la fertilidad del suelo*.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). Legumes of the World. In *Royal Botanic Gardens Kew, UK* (Vol. 01, Issue 0).
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1–2), 43–60.
https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-1_2f.pdf
- Lloret, L., & Martínez Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM*, 47(0), 1–5.
- López-Alcocer, J. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2017). Morphological and biochemical characterization of rhizobium strains collected from wild and domesticated common bean. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73–81.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2017.1.73-81>
- López, E., Cisneros, S. & Ochoa, J. (2016). Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y λ -cialotrina. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 3(8), 1–9.
https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion_y_Laboratorio/vol3num8/Revista_de_Simulacion_y_Laboratorio_V3_N8_1.pdf
https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion_y_Laboratorio/vol3num8/Revista_de_Si
- LÓPEZ, E., CISNEROS, S., & OCHOA, J. (2016). Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y λ -cialotrina. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 03(0), 01–05.
- Lopez M, J. E. (1984). Inoculación de leguminosas forrajeras. *IPA LA Platina*, 24(232), 5–9.
<https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/36924>
- Matos Cuzcano, G., & Zúñiga Dávila, D. (2003). VIABILIDAD DE CEPAS DE RIZOBIOS EN INOCULANTES BASADOS EN SOPORTES NO ESTÉRILES. *Ecología Aplicada*, 02, 81–84.
- Mayz, J., Lárez, A., & Alcorcés, N. (2010). Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana

en vigna unguiculata (L.) walp. cv. C4A-3. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 194–202.

Muriel Sánchez Omar Alexis. (2016). Universidad Tecnica De Cotopaxi Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales. *IDENTIFICACIÓN DE LAS PLAGAS EN EL CULTIVO DE CHOCHO (Lupinus Mutabilis Sweet) DURANTE SU DESARROLLO FENOLÓGICO EN LA PARROQUIA ELOY ALFARO (CHAN) CANTÓN LATACUNGA PROVINCIA COTOPAXI, INVESTIGACION*, 19–61.

Naconha, A. E. (2021). EVALUACIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE RHIZOBIUM EN LA PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE ARVEJA (Pisum sativum L.) VARIEDAD TEMPRANA PERFECTA”. *UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS*, 4(1), 6.

Nápoles, M., Gómez, G., & Costales, D. (2007). FACTORES DE NODULACIÓN. EXPERIENCIA EN CUBA. *Cultivos Tropicales*, 28(0), 75–76.

Nápoles, M., Gómez, G., & Costales, D. (2008). FACTORES DE NODULACIÓN. EXPERIENCIA EN CUBA *Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Cuba*, 29(0), 71–80.

Omar, M., Marlene, A., & Ortuño, N. (2018). *Respuesta del tarwi a la inoculación con cepas de rizobias aisladas de plantas silvestres y cultivadas de lupinus a nivel de invernadero* (pp. 1–11). *Rev. peru biol.* vol.27 no.1 Lima ene./mar 2020.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332020000100035

Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria.* Universidad Católica Argentina.

Rhizobium - EcuRed. (n.d.). Retrieved March 23, 2022, from <https://www.ecured.cu/Rhizobium>

Rivera Roldan, R. (2017). *Evaluación del Manejo Agronómico y Rendimiento del Cultivo de Lupinus mutabilis sweet en Tayabamba - La Libertad.* 01–45.

Saldaña, J. (2017). Aislamiento e identificación de cepas nativas de Rhizobium phaseoli en suelo de la presa de la Juventud de Marín. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4(7), 1–22.

- Santillana, N., Arellano, C., & Zúñiga, D. (2016). CAPACIDAD DEL Rhizobium DE PROMOVER EL CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4(1-2), 47. <https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.297>
- Suquilanda, M. B. (2009). *Producción orgánica de cultivos andinos*. 126, 199. http://www.mountainpartnership.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
- Tapia, M. E., & Fries, A. M. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. In *Fao; Anpe-Perú*.
- Tapia Nuñez, M. E. (2015). El Tarwi, Lupino Andino. *Fondo Italo Peruano*, 1-108. <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf> 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”
- Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L., & Segovia, G. (2006). USOS ALTERNATIVOS DEL CHOCHO. *Departamento Nutrición y Calidad de Los Alimentos INIAP Facultad de Ciencias e Ingeniería En Alimentos UTA*, 0(0), 4-5.
- Wang, E. T., Martínez Romero, J., & López Lara, I. (2002). Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. *Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México*, 8(0), 01. <https://doi.org/968-36-8879-9>
- ZARATE, W. (2016). Carrera De Ingeniería Agronómica. In *Repositorio.Umsa.Bo*. <http://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13131/T-2401.pdf?sequence=1>

18. ANEXOS

Anexo 1. Aval de traducción.



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

CENTRO DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen del proyecto de investigación al idioma Inglés cuyo título versa: **“EVALUACIÓN DE DOS CEPAS (COTOPAXI Y TUNGURAHUA) DE RHIZOBIUM SPP A DOS DOSIS EN EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) VAR. INIAP - 450 (ANDINO), CEASA - COTOPAXI, 2021-2022”** presentado por **Changoluisa Sangoquiza Jesica Paola**, estudiante de la carrera de **Ingeniería Agronómica**, perteneciente a la **Facultad Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

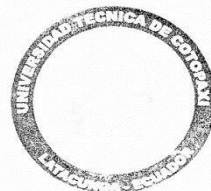
Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a la peticionaria hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimare conveniente.

Latacunga, 31 de marzo del 2022.

Atentamente,



Escáner el certificado por:
**EDISON MARCELO
PACHECO PRUNA**



CENTRO
DE IDIOMAS

.....
Lic. Edison Marcelo Pacheco Pruna Mg.
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS
C.C. 050261735-0

Anexo 3. Datos de los indicadores evaluados.

Porcentaje de germinación.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	% GER-día 6	% GER-día 8	% GER-día 10	% GER-día 13
T	1	1	1	17	17	67	100
TD1	2	1	1	67	83,3	83,3	100
TD2	3	1	1	0	0	67	100
CD2	4	1	1	0	17	67	100
CD1	5	1	1	33,3	33,3	83,3	100
CD1	1	2	1	50	50	83,3	100
TD2	2	2	1	16,7	17	83,3	100
CD2	3	2	1	100	100	100	83,3
T	4	2	1	66,7	100	100	100
TD1	5	2	1	33,3	50	50	100
TD2	1	3	1	67	67	100	100
T	2	3	1	17	33,3	33,3	100
CD1	3	3	1	67	67	100	100
CD2	4	3	1	0	0	33,3	100
TD1	5	3	1	50	50	67	100

Altura de la planta.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	ALTURA DIA 10 (cm)	ALTURA DIA 24(cm)	ALTURA DIA 35 (cm)	ALTURA DIA 43 (cm)	ALTURA DIA 52 (cm)	ALTURA DIA 59 (cm)	ALTURA DIA 66 (cm)	ALTURA DIA 77 (cm)
T	1	1	1	9,92	15,08	20,5	25,75	29	31,23	32,83	36,33
TD1	2	1	1	8,03	16,17	22,5	27,2	30,5	34,67	36	38,23
TD2	3	1	1	6,23	13,25	23,17	26,92	30	32,58	36,5	34,83
CD2	4	1	1	5,17	13,08	19,92	23,35	27,83	28,95	35,5	35,5
CD1	5	1	1	8,17	16,67	21,33	26,67	30,5	36,7	36,42	40,33
CD1	1	2	1	8,08	15,08	23,08	29,33	32,17	35,68	36,83	37,5
TD2	2	2	1	6,17	15,25	24,67	28,25	35,33	38,93	41	45,5
CD2	3	2	1	7,62	18,17	23,67	28,83	33,5	38,58	38,92	41,75
T	4	2	1	4,62	13,75	20,17	23,42	27,33	30,5	30,75	34,25
TD1	5	2	1	6,03	13,42	19,17	24,83	27,33	31,02	31,52	35,9
TD2	1	3	1	8,53	17	24	30,5	35,83	39,08	40,33	44,83
T	2	3	1	6,42	13,33	21,17	25,92	13,5	35,87	37	41,67
CD1	3	3	1	7,75	16,5	21,58	27,58	32	33,38	34,13	35,75
CD2	4	3	1	6,37	16,08	22	26,17	30,83	36,42	37,58	43,17
TD1	5	3	1	5,25	12,25	14,17	16,67	19,67	21,92	24,92	35,9

Numero de hojas.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	# DE H.V DIA 10 (unidad)	# DE H.V DIA 24 (unidad)	# DE H.V DIA 35 (unidad)	# DE H.V DIA 43 (unidad)	# DE H.V DIA 52 (unidad)	# DE H.V DIA 59 (unidad)	# DE H.V DIA 66 (unidad)	# DE H.V DIA 77 (unidad)
T	1	1	1	2	3,83	5,67	6,86	8,83	9,67	9,83	10,33
TD1	2	1	1	2,5	4	5,83	7	9,17	10,83	9,5	11,83
TD2	3	1	1	2,17	4,33	6,17	7,83	9,33	10	10,5	10,17
CD2	4	1	1	2	4	6,17	7,17	10,17	10,5	11	10,67
CD1	5	1	1	2	4,17	4,17	6,67	8,83	10,5	9,83	10,5
CD1	1	2	1	2,5	4	6,67	7,17	9,83	10,5	9,33	10,17
TD2	2	2	1	1,67	4,17	6,5	7,33	10,5	11,83	10,83	10,83
CD2	3	2	1	2,5	4,17	6,83	8,67	12,67	12	12,17	11,67
T	4	2	1	1,83	4,17	5,83	7	9	7,67	7,83	8,17
TD1	5	2	1	1,33	3,67	3,5	6,33	8,33	9,17	8	10,4
TD2	1	3	1	2,17	4,17	6,5	8,17	10,67	12,5	12,5	15,5
T	2	3	1	2,5	4	5,5	7,17	9,83	11,5	9,5	10,67
CD1	3	3	1	2,17	3,83	6	7,5	9,83	10	8,67	10
CD2	4	3	1	1,83	4	5,67	8,83	11,5	12,33	12,5	11,67
TD1	5	3	1	1,5	3	3	5	7	8,33	8,33	7,67

Diámetro del tallo.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	DIAM. Del Tallo día 10 (mm)	DIAM. Del Tallo día 24 (mm)	DIAM. Del Tallo día 35 (mm)	DIAM. Del Tallo día 43 (mm)	DIAM. Del Tallo día 52 (mm)	DIAM. Del Tallo día 59 (mm)	DIAM. Del Tallo día 66 (mm)	DIAM. Del Tallo día 77 (mm)
T	1	1	1	3,36	3,55	3,76	3,87	4,00	4,03	4,16	4,69
TD1	2	1	1	3,35	3,67	4,22	4,27	4,36	4,51	4,74	4,86
TD2	3	1	1	4	4,32	4,64	4,7	4,73	4,8	4,81	4,97
CD2	4	1	1	3,5	4,17	4,47	4,5	4,58	4,58	4,62	4,67
CD1	5	1	1	3	3,93	4,03	4,11	4,2	4,29	4,38	4,58
CD1	1	2	1	3,52	3,93	4,45	4,52	4,55	4,62	4,85	4,77
TD2	2	2	1	3,64	4,05	4,31	4,45	4,52	4,8	4,83	4,92
CD2	3	2	1	3,75	4,08	4,34	4,38	4,57	4,76	4,84	4,92
T	4	2	1	3,2	3,32	3,56	3,71	3,92	3,99	4,11	4,22
TD1	5	2	1	3,09	3,65	3,96	4,02	4,25	4,32	4,49	4,93
TD2	1	3	1	3,44	3,84	4,37	4,49	4,72	4,85	4,96	5,15
T	2	3	1	3,49	3,69	3,78	3,88	3,98	4,11	4,15	4,23
CD1	3	3	1	3,52	3,99	4,14	4,41	4,46	4,54	4,65	4,84
CD2	4	3	1	3	3,93	3,97	4,29	4,36	4,39	4,54	4,69
TD1	5	3	1	3,34	3,58	3,8	3,9	4,07	4,11	4,23	4,34

Porcentaje de floración.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	% DE Floracion día 77
T	1	1	1	0,17
TD1	2	1	1	0,33
TD2	3	1	1	0,67
CD2	4	1	1	0,83
CD1	5	1	1	0,67
CD1	1	2	1	0,67
TD2	2	2	1	0,5
CD2	3	2	1	0,67
T	4	2	1	0,17
TD1	5	2	1	0,33
TD2	1	3	1	0,67
T	2	3	1	0,17
CD1	3	3	1	0,67
CD2	4	3	1	1
TD1	5	3	1	0,33


Numero de Nodos.

	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	VARIEDAD	# DE Nodos día 83
T	1	1	1	0,83
TD1	2	1	1	2,8
TD2	3	1	1	4
CD2	4	1	1	1,83
CD1	5	1	1	3,17
CD1	1	2	1	3
TD2	2	2	1	4,17
CD2	3	2	1	1,83
T	4	2	1	0,83
TD1	5	2	1	2,75
TD2	1	3	1	4
T	2	3	1	0,5
CD1	3	3	1	3,17
CD2	4	3	1	1,67
TD1	5	3	1	2,67

Anexo 4. Hoja de vida del estudiante.

FICHA SIITH**DATOS PERSONALES:**

TIP O	CI/PAS	NACIONALID AD	APELLIDO	APELLIDO M	NOMBR E	FNAC	EST CIVIL	SEX O	GENERO
C	05036634 03	ECU	CHANGOLUI SA	SANGOQUI ZA	JESICA PAOLA	30/06/19 97	SOLTERO /A	F	HETEROSEXU AL



SANGRE	DISCAPACIDAD	%	CONADIS	ETNIA	NACION INDIGENA
O+	NINGUNA		0 No aplica	MESTIZO	NO APLICA

LUGAR NAC	RESIDENCIA	CONVENC	CELULAR	DIRECCION
ECU_050102	ECU_050102	032000000	0907039359	LA LAGUNA CALLE PUTZALAHUA

MAIL PERSONAL	MAIL INST
JESICA.CHANGOLUISA3403@UTC.EDU.EC	JESICA.CHANGOLUISA3403@UTC.EDU.EC

DATOS ACADÉMICOS:

TITULO	NOMBRE	AREA	SUBAREA	PAIS	SENESCYT
--------	--------	------	---------	------	----------

Anexo 5. Hoja de vida del tutor.**DATOS PERSONALES****APELLIDOS:** PARRA GALLARDO**NOMBRES:** GIOVANA PAULINA**ESTADO CIVIL:** DIVORCIADA**CEDULA DE CIUDADANIA:** 180226703-7**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** 28 - 07 -1969**DIRECCION DOMICILIARIA:** AMBATO: Pasaje Toro S.N. y Jorge Carrera**TELEFONO CONVENCIONAL:** 032588381**TELEFONO CELULAR:** 09878394949, 0998435238**CORREO ELECTRONICO:** giovana.parra@utc.edu.ec; gioppg@gmail.com;**EN CASO DE EMERGENCIA CONTACTARSE CON:** PABLO FRANCISCO LOPEZ

PARRA - 0995638722

ESTUDIOS REALIZADOS Y TITULOS OBTENIDOS

NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO EN EL CONESUP	CODIGO DEL REGISTRO CONESUP
TERCER	INGENIERA AGRÓNOMA	19/05/2003	1010-03-392713
CUARTO	MAGISTER EN GESTIÓN DE EMPRESAS AGROPECUARIAS Y MANEJO DE POSCOSECHA	03/12/2008	1010-08-684405
	DIPLOMADO EN TECNOLOGIAS PARA LA GESTION Y PRÁCTICA DOCENTE	06/10/201	010-08-684405
	MAESTRÍA EN TECNOLOGIAS PARA LA GESTION Y PRÁCTICA DOCENTE (EGRESADA)		
	DOCTORADO EN AGRICULTURA PROTEGIDA (CANDIDATA)		

HISTORIAL PROFESIONAL**UNIDAD ACADEMICA EN LA QUE LABORA:** C.A.R.E.N.**CARRERA A LA QUE PERTENECE:** INGENIERIA AGRONOMICA**AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:** EJE PROFESIONAL**PERIODO ACADEMICO DE INGRESO A LA UTC:** ABRIL 1998

FIRMA |

Anexo 6. Análisis de suelo Inicial.

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE						
Paola Changoluisa						
Cliente:						
Dirección:	Cotopaxi	Teléfono:	978780843			
Provincia:	Cotopaxi	Cantón:	cod. Lab	5,92022		
INFORMACION DE LA MUESTRA						
Tipo de Muestra:	suelo	Fecha de ensayo:	del 11 de enero al 11 de febrero			
Fecha de toma de muestra:	11/01/2022	Dirección de la muestra:	cotopaxi			
Fecha de recepción en	11/01/2022	Cod. Lab	5,62022			
Observaciones:	Muestra tomada por el cliente					
RESULTADOS						
Id.Cliente	Parametros		Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica
X2	K	Ac.Am	1,10	meq/100g	alto	A.atómica
	Ca	Ac.Am	14,8	meq/100g	alto	A.atómica
	Mg	Ac.Am	2,8	meq/100g	alto	A.atómica
	Cu	Olsen mod.	2,0	ppm	medio	A.atómica
	Mn	Olsen mod.	3,0	ppm	bajo	A.atómica
	Zn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atómica
	PH	H2O 1:2,5	7,75		Ligeram Alcalino	Conductimétrico
	M.O.	W-B	2,5	%	bajo	gravimétrico
	CE	H2O 1:2,5	0,808	mmhos/cm	No Salino	Conductimétrico
	NTotal	calcula a partir de	0,13	%	bajo	Volumétrica
	P	Olsen mod.	122,3	ppm	alto	Colorimétrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimétrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimétrico
	N-NH4	Olsen/azul indafenol		ppm		Colorimétrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumétrico
	Ca/Mg	calcula	5,2	meq/100g	alto	N/A
	Mg/K	calcula	2,5	meq/100g	Optimo	N/A
	(Ca+Mg)/K	calcula	15,8	meq/100g	Optimo	N/A
	Sat. De bases	Cálculo				
Acidez Int.	KCl				Volumétrica	



Ing. Carlos Mayorga

TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza unicamente de los análisis mas no de la toma de muestra

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha emitido este informe en forma exclusiva y confidencial

Anexo 7. Análisis de suelo final de cada dosis.

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE

Paola Changoluisa

Cliente:

Dirección: Cotopaxi Teléfono: 978780843

Provincia: Cotopaxi Cantón:

INFORMACION DE LA MUESTRA

Tipo de Muestra: suelo Fecha de ensayo: del 11 de enero al 11 de febrero

Fecha de toma de muestra: 11/01/2022 Dirección de la muestra: cotopaxi

Fecha de recepción en: 11/01/2022 Cod. Lab: 5,62022

Observaciones: Muestra tomada por el cliente

RESULTADOS						
Id.Cliente	Parametros		Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica
CDI	K	Ac.Am	0,76	meq/100g	alta	A.atómica
	Ca	Ac.Am	11,9	meq/100g	alta	A.atómica
	Mg	Ac.Am	1,9	meq/100g	alta	A.atómica
	Cu	Olsen mod.	4,0	ppm	medio	A.atómica
	Mn	Olsen mod.	3,0	ppm	bajo	A.atómica
	Zn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atómica
	PH	H2O 1:2,5	7,58		Ligeram. Alcalino	Conductimétrico
	M.O.	W-B	3,0	%	bajo	gravimétrico
	CE	H2O 1:2,5	0,868	mmhos/cm	No Salino	Conductimétrico
	NTotal	calcula a partir de	0,15	%	bajo	Volumétrica
	P	Olsen mod.	112,5	ppm	alta	Colorimétrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimétrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimétrico
	N-NH4	Olsen/azul indofenol		ppm		Colorimétrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumétrico
	Ca/Mg	calcula	6,3	meq/100g	alta	N/A
	Mg/K	calcula	2,5	meq/100g	FALSO	N/A
	(Ca+Mg)/K	calcula	18,2	meq/100g	Optimo	N/A
	Saf. De bases	Cálculo				
Acidez Inf.	KCl				Volumétrica	



Ing. Carlos Mayorga

TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza únicamente de los análisis mas no de la toma de muestra

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este informe en forma exclusiva y confidencial

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE

Ciente: Paola Changoluisa
 Dirección: Cotopaxi Teléfono: 978780843
 Provincia: Cotopaxi Canton:

INFORMACION DE LA MUESTRA

Tipo de Muestra: suelo Fecha de ensayo: del 11 de enero al 11 de febrero
 Fecha de toma de muestra: 11/01/2022 Dirección de la muestra: cotopaxi
 Fecha de recepción en: 11/01/2022 Cod. Lab: 5,72022
 Observaciones: Muestra tomada por el cliente

RESULTADOS

Id.Cliente	Parametros		Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica
CD2	K	Ac.Am	0.89	meq/100g	alto	A.atómica
	Ca	Ac.Am	12.9	meq/100g	alto	A.atómica
	Mg	Ac.Am	2.4	meq/100g	alto	A.atómica
	Cu	Olsen mod.	3.0	ppm	medio	A.atómica
	Mn	Olsen mod.	2.0	ppm	bajo	A.atómica
	Zn	Olsen mod.	1.0	ppm	bajo	A.atómica
	PH	H2O 1:2.5	7.94		Ligeram. Alcalino	Conductimétrico
	M.O.	W-B	3.1	%	bajo	gravimétrico
	CE	H2O 1:2.5	0.781	mmhas/cm	No Salino	Conductimétrico
	NTotal	calcula a partir de	0.16	%	bajo	Volumétrica
	P	Olsen mod.	105.8	ppm	alto	Colorimétrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimétrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimétrico
	N-NH4	Olsen/azul indofenol		ppm		Colorimétrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumétrico
	Ca/Mg	calcula	5.4	meq/100g	alto	N/A
	Mg/K	calcula	2.7	meq/100g	Optimo	N/A
	(Ca+Mg)/K	calcula	17.2	meq/100g	Optimo	N/A
	Sat. De bases	Cálculo				
Acidez int.	KCl				Volumétrica	



Ing. Carlos Mayorga

TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza unicamente de los análisis mas no de la forma de muestra

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este informe en forma exclusiva y confidencial

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE

Paola Changoluisa

Cliente:

Dirección: Cotopaxi Teléfono: 978780843

Provincia: Cotopaxi Cantón:

INFORMACION DE LA MUESTRA

Tipo de Muestra: suelo Fecha de ensayo: del 11 de enero al 11 de febrero

Fecha de toma de muestra: 11/01/2022 Dirección de la muestra: cotopaxi

Fecha de recepción en: 11/01/2022 Cod. Lab: 5,82022

Observaciones: Muestra tomada por el cliente

RESULTADOS						
Id.Cliente	Parametros	Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica	
TD1	K	Ac.Am	1,10	meq/100g	alto	A.atòmica
	Ca	Ac.Am	9,8	meq/100g	alto	A.atòmica
	Mg	Ac.Am	1,7	meq/100g	alto	A.atòmica
	Cu	Olsen mod.	2,0	ppm	medio	A.atòmica
	Mn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atòmica
	Zn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atòmica
	PH	H2O 1:2,5	7,72		Ligeram. Alcalino	Conductimétrico
	M.O.	W-B	1,90	%	bajo	gravimétrico
	CE	H2O 1:2,5	1,181	mmhos/cm	No Salino	Conductimétrico
	NTotal	calcula a partir de	0,10	%	bajo	Volumétrica
	P	Olsen mod.	102,0	ppm	alto	Colorimétrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimétrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimétrico
	N-NH4	Olsen/azul Indofenol		ppm		Colorimétrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumétrico
	Ca/Mg	calcula	5,8	meq/100g	alto	N/A
	Mg/K	calcula	1,5	meq/100g	bajo	N/A
	(Ca+Mg)/K	calcula	10,5	meq/100g	Optimo	N/A
	Sat. De bases	Cálculo				
Acidez Int.	KCl				Volumétrica	



Ing. Carlos Mayorga

TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza unicamente de los análisis mas no de la toma de muestra

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este informe en forma exclusiva y confidencial

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE						
Paola Changaluisa						
Cliente:						
Dirección:	Cotopaxi	Teléfono:	978780843			
Provincia:	Cotopaxi	Canton:				
INFORMACION DE LA MUESTRA						
Tipo de Muestra:	suelo	Fecha de ensayo:	del 11 de enero al 11 de febrero			
Fecha de toma de muestra:	11/01/2022	Dirección de la muestra:	cotopaxi			
Fecha de recepción en:	11/01/2022	Cod. Lab	5,92022			
Observaciones:	Muestra tomada por el cliente					
RESULTADOS						
Id. Cliente	Parametros		Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica
TD2	K	Ac.Am	0,96	meq/100g	alto	A.atômica
	Ca	Ac.Am	10,0	meq/100g	alto	A.atômica
	Mg	Ac.Am	2,8	meq/100g	alto	A.atômica
	Cu	Olsen mod.	3,0	ppm	medio	A.atômica
	Mn	Olsen mod.	2,0	ppm	bajo	A.atômica
	Zn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atômica
	PH	H2O 1:2,5	7,68		Ligeram. Alcalino	Conductimetrico
	M.O.	W-B	2,10	%	bajo	gravimetrico
	CE	H2O 1:2,5	0,805	mmhos/cm	No Salino	Conductimetrico
	NTotal	calcula a partir de	0,11	%	bajo	Volumetrica
	P	Olsen mod.	98,0	ppm	alto	Colorimetrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimetrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimetrico
	N-NH4	Olsen/azul indofenol		ppm		Colorimetrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumetrico
	Ca/Mg	calcula	3,8	meq/100g	Optimo	N/A
	Mg/K	calcula	2,7	meq/100g	Optimo	N/A
	(Ca+Mg)/K	calcula	13,1	meq/100g	Optimo	N/A
	Sat. De bases	Cálculo				
Acidez Int.	KCl				Volumetrica	



Ing. Carlos Mayorga
TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza unicamente de los análisis mas no de la toma de muestra

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este informe en forma puntual y confidencial.

Anexo 8. Testigo (sin dosis de *Rhizobium*).

INFORME DE RESULTADOS



DATOS DEL CLIENTE						
Cliente: Paola Changolusa						
Direccion:		Cotopaxi	Teléfono:		978780843	
Provincia:		Cotopaxi	Canton:			
INFORMACION DE LA MUESTRA						
Tipo de Muestra:	suelo	Fecha de ensayo:	del 11 de enero al 11 de febrero			
Fecha de toma de muestra:	11/01/2022	Direccion de la muestra:	cotopaxi			
Fecha de recepcion en	11/01/2022	Cod. Lab	5,92022			
Observaciones:	Muestra tomada por el cliente.					
RESULTADOS						
Id.Cliente	Parametros		Resultado	Unidad	Nivel	Técnica analítica
TP	K	Ac.Am	1,80	meq/100g	alto	A.atômica
	Ca	Ac.Am	13,2	meq/100g	alto	A.atômica
	Mg	Ac.Am	2,2	meq/100g	alto	A.atômica
	Cu	Olsen mod.	2,0	ppm	medio	A.atômica
	Mn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atômica
	Zn	Olsen mod.	1,0	ppm	bajo	A.atômica
	PH	H2O 1:2,5	7,54		Ligeram. Alcalino	Conductimetrico
	M.O.	W-B	2,36	%	bajo	gravimetrico
	CE	H2O 1:2,5	0,833	mmhos/cm	No Salino	Conductimetric
	NTotal	calculo a partir de	0,12	%	bajo	Volumétrica
	P	Olsen mod.	98,0	ppm	alto	Colorimetrico
	B	Fos-Ca		ppm		Colorimetrico
	Cl	H2O 1:1		ppm		
	S	Fos-Ca		ppm		Turbidimetrico
	N-NH4	Olsen/azul indofenol		ppm		Colorimetrico
	CIC	Ac.Am		meq/100g		volumetrico
	Ca/Mg	calculo	6,0	meq/100g	alto	N/A
	Mg/K	calculo	1,4	meq/100g	bajo	N/A
	(Ca+Mg)/K	calculo	9,8	meq/100g	bajo	N/A
	Sat. De bases	Cálculo				
Acidez Int.	KCl				Volumétrica	



Ing. Carlos Mayorga
TOTALCHEM

TotalChem Se responsabiliza unicamente de los análisis mas no de la toma de muestra.

Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basado en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este informe en forma exclusiva y confidencial.

19. FOTOGRAFÍAS.

Fotografía 1. Preparación del área de estudio.



Fotografía 2. Colocación del sistema de riego.



Fotografía 3. Desinfección y colocación del abono (turba) en las fundas.



Fotografía 4. Inoculación de la semilla de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) dosis (1cc y 2cc) *Rhizobium* spp (Tungurahua y Cotopaxi), var. INIAP-450.



Fotografía 5. Siembra del *Lupinus* inoculado con las dos dosis.



Fotografía 6. Control de temperatura y HR en el cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) var. INIAP-450.



Fotografía 7. Regadío cada 7 a 8 días al cultivo de chocho.



Fotografía 8. Desarrollo del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) var. INIAP-450.



Fotografía 9. Extracción de raíces para el conteo de nódulos formados en el cultivo de chocho.



15. MANUAL DE LA MULTIPLICACIÓN DEL RHIZOBIUM SPP.



Ingeniería
Agronómica

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

MANUAL DE MULTIPLICACIÓN Y DILUCIONES SERIADAS
(UFC) DE LA BACTERIA RHIZOBIUM SPP.

Autores:

Chango Alex

Changoluisa Paola

Colaboradores científicos:

Ing. Mg. Parra Giovana

Ing. Llanos Tannya

Latacunga - Ecuador

MARZO 2022



INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
Origen de los genes (Rhizobium spp)	1
Que es la bacteria Rhizobium	2
Características	2
Tipos de bacterias de Rhizobium y funciones	3
METODOLOGIA	4
Diferencia de los caldos Nutritivos (Agar) para observar los resultados	4
PROCESOS DE LA MULTIPLICACION DE LA BACTERIA RHIZOBIUM SPP	5
MATERIALES	6
PROCEDIMIENTO	6
Adquisición de la solución líquida de Rhizobium spp y sus características	6
Preparación del Medio de Cultivo para las cepas de apertura	7
Obtención de las dos primeras cepas de Rhizobium spp	8
Multiplicación de Rhizobium spp (Cy T)	9
CRECIMIENTO DE LA BACTERIA RHIZOBIUM SPP EN PCA NUTRITIVO	11
PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA LAS UFC	12



1. INTRODUCCIÓN.

Conocida como simbiosis fijación biológica del nitrógeno (FBN) (rizobio-leguminosa) es un proceso de vital importancia en la biosfera, donde actúan microorganismos portadores de la enzima llamada nitrogenasa, su función principal es convertir el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado, siendo así más asimilable para las plantas. Cabe recalcar algo importante para que la bacteria fijadora de nitrógeno tenga efectividad de realizar la FBN necesita de una planta hospedante.

1.1. Origen de los genes (*Rhizobium* spp)

En el género rizobios de los FBN se obtuvo en el año 1888, donde el Botánico y fitopatólogo holandés Beijerinck, considerado uno de los pioneros de la microbiología donde su prioridad era realizar estudios sobre la naturaleza de los virus, consiguió obtener el primer cultivo bacteriano de nódulos puros de la raíz de una planta leguminosa donde lo llamo *Bacillus radicolica*, donde al momento de aislarlos Frank observo que tenía bacterias aisladas 100% puros de FBN lo nombró *Rhizobium*. Basándose en la especificidad y características de los huéspedes para 1929 ya se consiguió reconocer seis tipos de bacterias de FBN (*Rhizobium leguminosarum*, *trifolii*, *phaseoli*, *meliloti*, *japonicum* y *lupini*). Basándose a cada característica que las hacia diferentes en esta clasificación, cada especie de *Rhizobium* encontrada se componía de cepas donde compartían un grupo de leguminosas huéspedes específicas para la nodulación. (Wang *et al.*, 2002)



1.2. Que es la bacteria Rhizobium.

Estas bacterias son del género Rhizobium con capacidad de inducir en las raíces de leguminosas, donde su principal función es la estructuración especializada de nódulos, donde una explicación química para mejor entendimiento se refiere a que el N₂ atmosférico ya que es muy estable e inerte esta se reduce a iones amonio (NH₄⁺), cuando realiza este proceso el N₂ es más asimilable para la mayoría de las especies vegetales y es donde actúa la bacteria del Rhizobium generando la fijación del nitrógeno atmosférico en la planta, realizando un proceso de alta eficiencia de FBN y puede ser capaz de abastecer hasta un 90% de las necesidades de nitrógeno en las plantas. (López *et al.*, 2017)

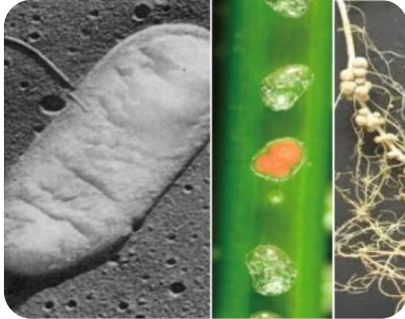
1.3. Caracterización de cepas de Rhizobium.

Explorar nuevas alternativas de nodular a las plantas para el desarrollo de las leguminosas y es posible de otras especies, es aprovechar el uso potencial de las bacterias Rhizobium para inducir la nodulación y fijar el nitrógeno, un estudio realizado en Bolívar del país Colombia, nos menciona que al momento de aislar al bacteria Rhizobium en cepas de agar estas demostraron que son capaces de crecer de mejor manera en ambientes hostiles, tiendo la capacidad potencial de ser utilizados como bioinoculantes para la fijación del nitrógeno (FBN), se caracterizaron un número de 52 cepas de rizobios, dando como resultado un crecimiento de acuerdo al ambiente que se encuentren, un crecimiento lento tiene un porcentaje del 63,5%, mientras que lo más rápido es del 36,5% con los materiales de laboratorio correctos para el crecimiento de la bacteria. (Cuadrado *et al.*, 2009)



1.4. Tipos de bacterias de Rhizobium y funciones.

Género Azorhizobium



Función principal: Contiene cepas que forman nódulos de raíz y de tallo y fijan nitrógeno en condiciones de vida libre.

Cepas de Bradyrhizobium



Función principal: Crecen lentamente en colonias de menos de 1 mm de diámetro después de 7 días de incubación y estas producen álcali en medio YMA.

Género Mesorhizobium



Función principal: Estas incluye cepas con colonias de crecimiento lento o moderado resultando con colonias de 1-2 mm después de 5 a 7 días de incubación y estas produce ácido en medio YMA.

Géneros restantes, Allorhizobium, Rhizobium y Sinorhizobium



Función principal: Estas crecen rápido en colonias mayores de 2 mm después de 5 a 7 días de incubación y también producen ácido en medio YMA. (Wang *et al.*, 2002)

NOTA: Medio YMA. Es un medio complejo que permite el desarrollo de los rizobios durmientes, es diferencial, ya que permite distinguir a los contaminantes que se han infiltrado, estas se teñirán de color rojo, mientras que las colonias de rizobios se verán blancuzcas y cremosas.

2. METODOLOGÍA.

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Área laboratorio de Agronomía; pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Campus Salache, donde se realizó las siguientes actividades: adquisición de la bacteria Rhizobium especies (Cotopaxi y Tungurahua) que fueron utilizadas como cepas madres para realizar la multiplicación de más Rhizobium en cajas Petri en nutrient AGAR para la reproducción y para el crecimiento en caldo nutritivo PCA , para después realizar las diluciones seriadas (UFC) y determinar la cuantificación de microorganismos y contabilizar las bacterias viables en las muestras procesadas, determinando las dosis para la inoculación, en volumen (dosis) y aplicarlas en las plantas de Lupinus en campo.

Para esta investigación se utilizo como base, la metodología experimental adoptada de Medios de aislamiento, enriquecimiento y Cultivo por (WEAVER & GRAHAM, 1994); la cual será adaptada según las condiciones que requería las cepas de los investigadores Alex Chango y Paola Changoluisa, multiplicando cepas para cada especie de Rhizobium (*Cotopaxi* y *Tungurahua*) a partir de las cepas madres o de apertura.

2.1. Diferencia de los Caldos Nutritivos (Agar) para observar resultados.



- **Agar nutritivo para la multiplicación – resultados de 4 a 5 días.**



Especificaciones		
Marca	Medios de cultivo NEOGEN®	
analito	E. coli, Salmonella spp.	
Plataforma	Medios de cultivo deshidratados	
Masa	500g	
Fórmula	Fórmula	Litro
	peptona	5,0g/L
	Extracto de carne	3,0g/L
	Cloruro de sodio	8,0 g/l
	agar	12,0 g/l

Fuente: (NEOGEN, 2020)

Se usa para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos y no está diseñado para usarse en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos. Un medio de uso general para el cultivo de organismos que no son exigentes en sus requisitos nutricionales, por ejemplo, organismos que se pueden aislar del aire, el agua, el polvo, etc.

- **Agar nutritivo PCA para crecimiento – resultados a partir de 48horas**



Composición de Plate Count Agar (PCA)

Ingredientes	gramos/litro
Digerido enzimático de caseína/triptona	5.0
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1.0
agar	15.0

pH final 7,0 ± 0,2 a 25°C

Fuente: (NEOGEN, 2020)

El agar de recuento en placa (PCA) es un sustrato bacteriológico que se utiliza para determinar el número total de bacterias aeróbicas vivas en una muestra.

3. PROCESOS DE MULTIPLICACIÓN DE LA BACTERIA RHIZOBIUM SPP.



Es importante saber que, si se va a realizar este procedimiento del multiplicar a la bacteria *Rhizobium* spp, debemos contar con materiales apropiados para la manipulación de la bacteria, centros de laboratorio de microbiología donde no exista contaminación de patógenos.

4. MATERIALES.

Materiales de laboratorio.

- Frascos de vidrio (resistentes al calor).
- Ajugas o asas de inoculación (siembra).
- Mango para asa.
- Cajas Petri.
- Cinta Parafilm.
- Papel aluminio.
- Mandil.
- Guantes.
- Fosforo.
- Lampara de alcohol.
- Rociador con alcohol.
- Goteros
- Micropipetas.
- Matraz Erlenmeyer.
- Soporte para tubos de ensayo.

Equipos de laboratorio.

- Incubadora.
- Autoclave.
- Cámara de flujos.
- Contador de colonias digital.
- Balanza.
- Contador de UFC.

NOTA: es importante saber que todos los materiales, instrumentos y equipos que se van a utilizar en prácticas de microbiología deben estar previamente esterilizadas.

5. PROCEDIMIENTO.

5.1. Adquisición de la solución líquida de *Rhizobium* spp y sus características.

Estas bacterias (*Rhizobium* spp) fueron adquiridas en estado líquido, provenientes de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua para realizar cepas en caldos nutritivos y obtener cepas de apertura de las dos.

Características

Aislado A1 Tungurahua

Aislado A2 Cotopaxi



Colonias

Diámetro (mm)	2 -2.5	1.8 -2.0
Color:	Translúcidas brillantes	Beige
Forma:	Redonda	Redonda
Borde:	Liso	Liso
Elevación:	Pulvinada	Pulvinada
Consistencia:	Mucilaginosa	Suave



Bacterias

Forma:	Células bacilares alargadas	Células esferoidales
Largo:	2.0m-2.5 μ	0.9m-1.0 m
Ancho:	1.0 μ	0.9m-1.0 m
Determinación taxonómica:	Género: Rhizobium	Género: Rhizobium

Observaciones adicionales:	Células que presentan septos transversales teñidos positivamente con la tinción de Gram. Tiempo de incubación de 5 a 7 días.	Tiempo de incubación 6 días
-----------------------------------	--	-----------------------------

Fuente: (Pérez, 2021)

- Preservar la bacteria en una nevera de laboratorio a 3°C a 4°C hasta el momento de realizar la cepa de apertura para la debida multiplicación de la bacteria.

5.2.Preparación del Medio de Cultivo para las cepas de apertura.

Preparar el medio cultivo en nutrient AGAR (nutritivo) en cajas Petri. *Los pasos a realizar son:*

- En una balanza pesamos el agar 23 gr de Agar Nutritivo.
- En un frasco de vidrio saturamos 1000 ml de agua destilada
- Mezclamos bien hasta contener una consistencia completamente diluida.
- Ingresamos a la autoclave por 30 min – 1 kPa a 121 °C.



- En la cámara de flujos dispensamos el medio de cultivo en cajas Petri hasta cubrir toda la superficie y dejamos enfriar hasta obtener el medio de cultivo en estado sólido o gel.



IMPORTANTE: No dejar enfriar el medio de cultivo por mucho tiempo ya que este producto al enfriarse se convertirá en una solución sólida y



5.3. Obtención de las dos primeras cepas de *Rhizobium* spp.

Con estas dos primeras cepas se iniciará la multiplicación de las bacterias. Los pasos a realizar son:

- Cajas Petri con medio de cultivo Agar nutritivo, en estado sólido.
- Retirar de la nevera a los frascos de *Rhizobium* (*Cotopaxi* y *Tungurahua*)
- Con una micro pipeta tomar 1cc de *Rhizobium*, colocar en el medio de cultivo y repartir con una aza de siembra.
- Sellamos las cajas Petri con cinta Parafilm y colocamos fecha y nombre.
- Colocamos en la incubadora a 25°C. Y observar los resultados después de 4 a 5 días
- resultado con éxito. Observar fotografía N° 01.



Fotografía N° 01: Primera cepa obtenida a través de una solución líquida de Rhizobium.



Fuente: Laboratorio de microbiología – UTC – Facultad Caren

5.4. Multiplicación del Rhizobium spp (C y T).

Los pasos a realizar son:

- Preparar 23 gramos de Agar nutritivo en 1000 ml de agua destilada para los medios de cultivo.
- Colocamos el medio de cultivo en la autoclave por 30 minutos, 1kPa y 121°C
- En la cámara de flujos dispensamos los medios de cultivo en cajas Petri para realizar la siembra.
- Con el asa de inoculación o siembra (2 asas para cada bacteria), y una lámpara de alcohol encendida realizar la siembra con la **técnica de estrías – continuo**. Observar la imagen 1.

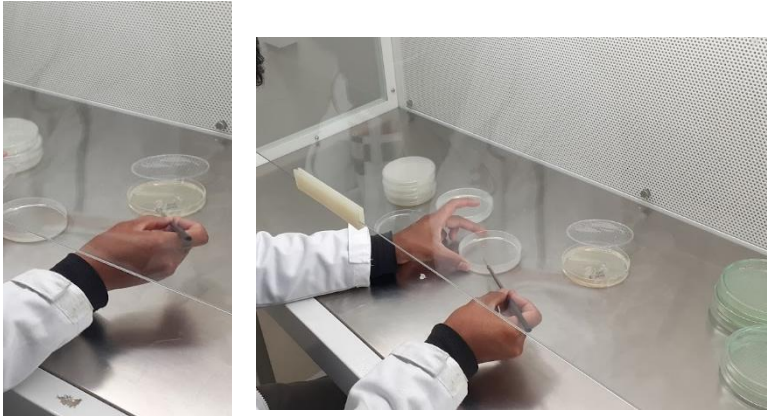
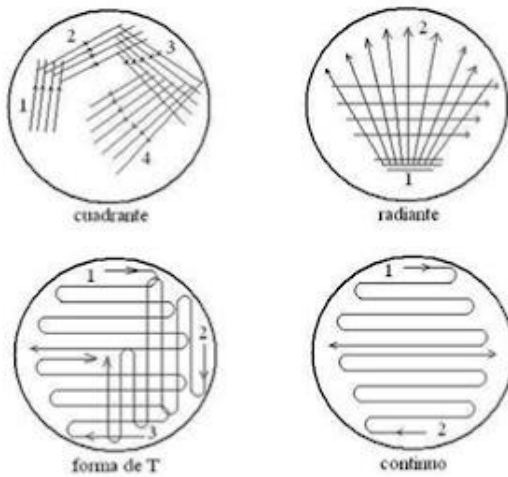


Imagen 01: Inoculación de medio de cultivos – técnicas.



Fuente: (Carrillo, 2008)

- Sellamos las cajas Petri con cinta Parafilm y colocamos en la incubadora de 25 a 30 °C.
- Resultados a los 4 días: (*ver fotografía N° 02*)



Fotografía N° 02: Resultados de la multiplicación del Rhizobium (Cotopaxi y Tungurahua).



Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC – Facultad Caren.

Fotografía N° 03: Cepas de Rhizobium spp multiplicadas en la incubadora (C y T).



Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC.

6. CRECIMIENTO DE LA BACTERIA RHIZOBIUM SPP EN PCA NUTRITIVO.

Para realizar este procedimiento se realizó los siguiente:

- Se tomó dos cepas multiplicadas de la incubadora de Cotopaxi y Tungurahua.
- En una balanza pesamos 23.5 gr de PCA (PLATE COUNT AGAR) para los medios de cultivo.
- Saturamos en un frasco de vidrio 1000 ml de agua destilada y mezclamos con el PCA.
- Colocamos en la autoclave por 30 min, 1Kpa a 121°C.



- En la cámara de flujos se plaqueo las cajas Petri y esperamos hasta obtener un caldo nutritivo sólido.
- Se realizó la siembra con la **técnica de estrías – continuo**, y sellamos con cinta Parafilm,
- Colocamos en la incubadora a 30 a 35 °C y esperamos **48 horas** para obtener resultados.
- Resultados. (*ver fotografía N° 04*)

Fotografía N° 04: Crecimiento del Rhizobium spp en 48 en Agar – PCA.



Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC.

6.1.PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS PARA LAS UFC.

En este procedimiento para realizar el conteo de las UFC del Rhizobium de las cepas (C y T), se realizó los siguientes pasos.

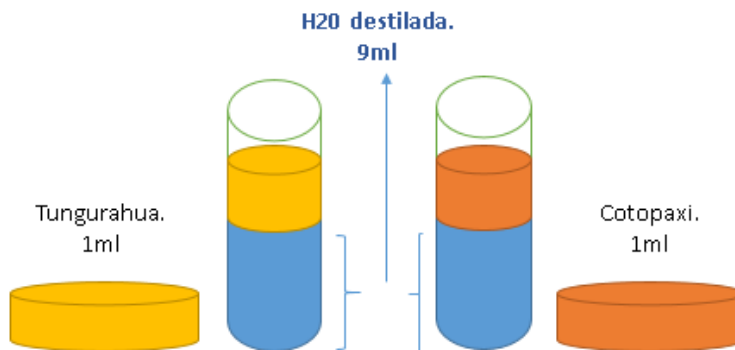
NOTA: Todo este procedimiento realizar en la cámara de flujos con la lámpara de alcohol encendida para eliminar todo tipo de contaminación.

- Extraer una cepa de Tungurahua y Cotopaxi de la incubadora.
- En dos tubos de ensayo incorporar 9 ml de agua destilada estéril para cada cepa (T y C).
- Con una micro pipeta incorporar 1 ml de agua destilada esterilizada y la diluimos en la cepa de cada Rhizobium.



- Con una aza de siembra estéril se realizó la técnica de raspado (*raspar al Rhizobium del medio de cultivo en el agua destilada*).
- Una vez realizado el raspado incorporar la solución líquida de la caja Petri al tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada. Donde el resultado será la **OBTENCION DE LA DILUCION 10^{-1}** .

Dilución seriada para el Rhizobium.



- Prepara 2 medios de cultivo en Agar PCA (una para cada bacteria).
- Con una micro pipeta sustraemos del tubo de ensayo 1 Rhizobium e incorporamos en los medios de cultivo Para finalmente dispensar con una aza de Drigralsky en direcciones por la caja Petri durante 10 segundos.
- Sellamos con cinta Parafilm ponemos nombre y fecha, y guardamos en la incubadora a 30 a 35 °C y esperar de 2 a 3 días para los resultados.

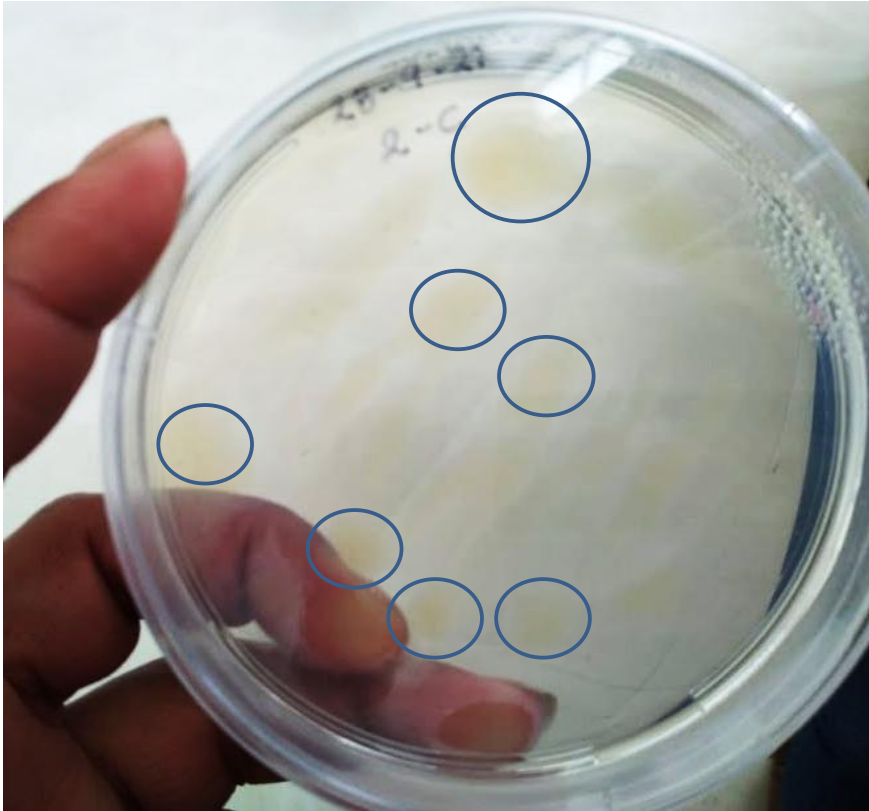


ml de
PCA.
todas



- Resultados obtenidos.

Fotografía N° 05: Colonias formadas de Rhizobium a dos días en la incubadora (UFC).



Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC.

- Extraer al Rhizobium a los 3 días de la incubadora (sino se encuentra más de 25 colonias formadas se debe dejar reproducir más días en la incubadora) y con el equipo contador de colonias realizar el conteo de las UFC.

Fotografía N° 06: Conteo de las UFC para cada cepa de Rhizobium.



Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC.



1.1. Numero de colonias obtenidos en cada cepa: se debe seleccionar si el número de UFC sobre pasa los 25 a 250 colonias formadas para realizar el conteo.

Tungurahua = Cepa N°1: 253 UFC

Cotopaxi = Cepa N°1: 436 UFC

1.2. Calculo de las colonias UFC

El resultado se expresará en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. A la hora de obtener este resultado hay que tener en cuenta que se han sembrado 0.1 ml y el factor de dilución.

Formula: UFC = # Colonias x 1 ml (*soluto*) x Inverso de la dilución (*diluyente*).

Si se han contado más de dos placas sembradas de la dilución. Para expresar el resultado del recuento, primeramente, se hace la media de las placas contadas y luego aplicar la fórmula de la UFC.

1.3. Resultados de conteo:

2. Tungurahua:

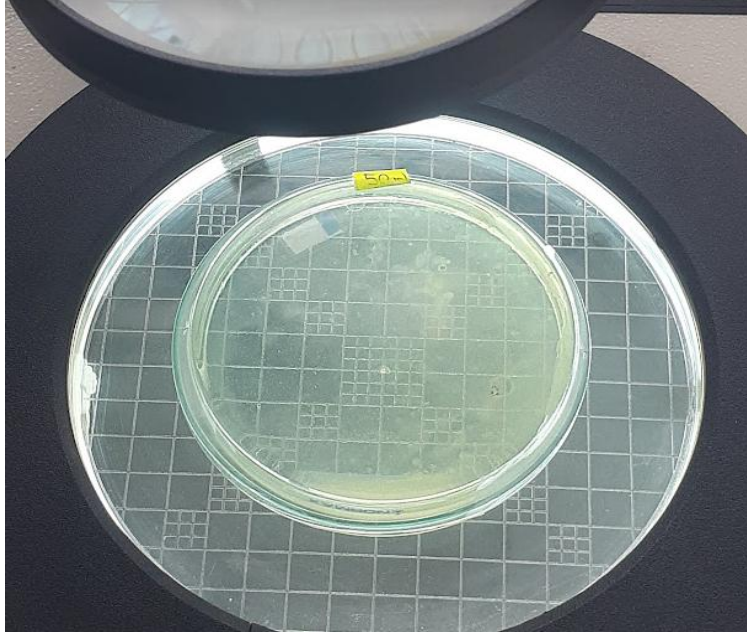
$$\text{UFC} = 253 \times 1\text{ml} \times 10^{-1} = 2.5 \times 10^{-1} \text{ UFC}$$

3. Cotopaxi:

$$\text{UFC} = 435 \times 1\text{ml} \times 10^{-1} = 4.4 \times 10^{-5} \text{ UFC}$$

Fotografía N° 07: Colonias formadas del Rhizobium spp y resultados del conteo UFC (C y T).





Fuente: Laboratorio de IAGR – UTC.