

EFFECTO DE BIOFERTILIZANTES EN EL RECuento DE RIZOBIOS E INDICADORES MORFOLÓGICOS DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.), EN ECUADOR

EFFECT OF BIOFERTILIZERS ON RHIZOBIUM COUNT AND MORPHOLOGICAL INDICATORS OF SNAP BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) IN ECUADOR

Edwin Alfredo Cáceres-Acosta^{1a}, Alejandro Alfredo Aguirre-Flores^{1b*}, Rogelio Castro-Brindis^{2a}, Juan José Almaraz-Suárez³, María Teresa Colinas-León^{2b}, Ma. de Jesús Juárez-Hernández^{2c} y Roberto Odón Montes-Colmenares⁴

^{1a} Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Jerónimo Leiton y Gatto Sobral s/n. Ciudadela Universitaria. 170521. Quito, Ecuador
<https://orcid.org/0000-0002-1020-1872>

^{1b} Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Jerónimo Leiton y Gatto Sobral s/n. Ciudadela Universitaria. 170521. Quito, Ecuador
<https://orcid.org/0000-0002-2759-4377>

^{2a} Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, México
<https://orcid.org/0000-0002-8668-8621>

^{2b} Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, México
<https://orcid.org/0000-0003-2617-5928>

^{2c} Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, México
<https://orcid.org/0000-0002-5043-4240>

³ Colegio de Posgraduados. Carretera México-Texcoco km. 36.5. 56230. Montecillo, Texcoco, México
<https://orcid.org/0000-0002-2696-2684>

⁴ Dirección de Producción Sustentable, Dirección General de la Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural del Gobierno de la Ciudad de México. 16610. Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-5330-3991>

* Autor para correspondencia: aaaguirre@uce.edu.ec

RESUMEN

El nitrógeno en el suelo es crucial para la agricultura, pero a menudo es limitante, afectando el rendimiento de los cultivos. La deficiencia requiere fertilizantes sintéticos, pero su uso inadecuado causa daños ambientales y costos elevados. Las bacterias del género *Rhizobium*, simbiotes de leguminosas, ofrecen una solución al fijar nitrógeno de manera sostenible, reduciendo la dependencia de fertilizantes. Esta investigación determinó el número más probable (NMP) de células de *Rhizobium* spp. procedente de dos biofertilizantes comerciales de origen ecuatoriano y mexicano en condiciones de invernadero. Para esto, se realizó la inoculación directa con disoluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) en macetas con pomina esterilizada al vapor, donde se germinaron plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake. A los 45 días después de siembra (DDS)

se evaluaron los siguientes indicadores morfológicos: área foliar, peso de la planta en húmedo, altura de planta y número de flores, determinándose diferencias estadísticas entre el tipo de biofertilizante y la concentración de cada dilución. El experimento se adecuó a un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcela dividida con tres repeticiones por dilución, en consideración de las fluctuaciones de temperatura presentes en la zona de estudio. El NMP, al 95% de confianza, fue de $4,45 \times 10^7$ rizobios g^{-1} de pomina en una dilución 10^{-5} para el biofertilizante mexicano, y $1,48 \times 10^5$ rizobios g^{-1} de pomina en una dilución 10^{-4} para el biofertilizante ecuatoriano. La dilución óptima estimada para ambos productos fue de 10^{-8} .

Palabras clave: *Rhizobium*, leguminosas, dilución, simbiosis, sustratos, dosis.

ABSTRACT

Soil nitrogen is crucial for agriculture, but it is often limited, affecting crop yields. Deficiency requires synthetic fertilizers, but their improper use results in environmental damage and high costs. Bacteria of the genus *Rhizobium*, symbionts of legumes, offer a sustainable solution by fixing nitrogen, thus reducing dependence on fertilizers. This research determined the most probable number (MPN) of cells of *Rhizobium* spp. from two commercial biofertilizers of Ecuadorian and Mexican origin under greenhouse conditions. For this, direct inoculation with serial dilutions (10^{-1} to 10^{-10}) was performed in pots with steam-sterilized pumice where Blue Lake variety snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants were germinated. The following morphological indicators were evaluated at 45 days after sowing (DAS): leaf area, plant wet weight, plant height, and number of flowers, determining statistical differences between the type of biofertilizer and the concentration of each dilution. The experiment followed a randomized complete block design with a split-plot arrangement, with three replicates per dilution, considering temperature fluctuations in the study area. The MPN at 95% confidence was 4.45×10^7 rhizobia g^{-1} of pumice at a 10^{-5} dilution for the Mexican biofertilizer, and 1.48×10^5 rhizobia g^{-1} of pumice at a 10^{-4} dilution for the Ecuadorian biofertilizer. The estimated optimal dilution for both products was 10^{-8} .

Keywords: *Rhizobium*, legumes, dilution, symbiosis, substrates, dose.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el desarrollo del ciclo fenológico de las plantas, su biodisponibilidad resulta limitante en la productividad de los cultivos, ya que es requerido para la síntesis de macromoléculas como proteínas y ADN (Cerón y Aristizábal, 2012; Morales-Morales et al., 2019), sin embargo, pese a ser abundante en la atmósfera en forma de N gaseoso (N_2), no es biodisponible para la planta, limitándose a las reservas de N inorgánico en forma de amonio y nitratos (NH_4^+ y NO_3^-), formas presentes en el suelo y en las que es disponible para el desarrollo vegetal (Pankievicz et al., 2019). La deficiencia de este elemento es suplida mediante la adición de fertilizantes nitrogenados (Mahmud et al., 2020), sin embargo, la producción de fertilizantes sintéticos demanda un elevado consumo de energía y altos costos (Cherkasov et al., 2015), sin mencionar los efectos negativos en el ambiente como la fuga de N en forma de N_2O hacia la atmósfera y la eutrofización de los cuerpos de agua subterránea y superficial producto de la infiltración y escorrentía de formas químicas reactivas de N (Zhang et al., 2020).

En la naturaleza, determinados microorganismos del suelo cumplen un papel crucial en el ciclo del N (Barrera et al., 2012; Morales-Morales et al., 2019). La interacción microbiana en la transformación del N implica la fijación de N_2 en NH_4^+ , éste posteriormente es asimilado y convertido en N para formar parte de la biomasa (Kuypers et al., 2018). Los microorganismos responsables de la fijación biológica del N atmosférico (FBN) son conocidos diazótrofos que incluyen especies de los dominios Bacteria, Archaea y un limitado grupo de eucariotas (Mahmud et al., 2020), los diazótrofos pueden clasificarse en tres grupos, dependiendo del mecanismo involucrado para la FBN (Kneip et al., 2007). Los diazótrofos simbióticos fijan N únicamente en estructuras especializadas llamadas nódulos, formados por hospederos específicos de la familia Fabaceae, con excepción de *Frankia* spp., que puede formar nódulos en árboles distintos al grupo de las leguminosas (Boyd y Peters, 2013). De igual forma, los diazótrofos endofíticos fijan N al desarrollarse dentro de los tejidos vegetales de leguminosas y no leguminosas, sin presentar estructuras especializadas (Gupta et al., 2019), finalmente,

las bacterias diazotróficas asociativas y de vida libre, pueden fijar N mientras se desarrollan en la superficie de las raíces o en el suelo rizosférico (Nag et al., 2020).

El sistema de FBN se restringe de forma especial a la relación simbiótica entre leguminosas y bacterias conocidas como "rizobios" (Mus et al., 2016), este término generaliza a las bacterias de los filos α y β -proteobacteria que son capaces de formar nódulos de raíz en sus hospederos, llamados también simbioses de raíz (Ferrera-Cerrato, 2007; Lindström y Mousavi, 2020), este grupo de bacterias comprende 18 géneros de las familias Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), Brucelaceae (*Ochrobactrum*), Methylobacteriaceae (*Methylobacterium*, *Microvirga*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*), Xanthobacteraceae (*Azorhizobium*), Hyphomicrobiaceae (*Devosia*) y Burkholderiaceae (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia*) (Jaiswal et al., 2021; Lindström y Mousavi, 2020).

La asociación entre bacterias nodulíferas fijadoras de N (BNFN) y la planta hospedera depende del intercambio de carbono provisto a través de los fotosintatos de la planta como fuente de energía para los microorganismos, además de N en forma de NH_4^+ , que es retornado a la planta mediante la actividad de la nitrogenasa microbiana (Lindström y Mousavi, 2020). El proceso de nodulación se da lugar bajo condiciones de escasez de N en el sistema edáfico, produciéndose interacciones a nivel molecular entre la raíz de la planta y los rizobios (Ayra et al., 2021; Maróti y Kondorosi, 2014), además, esta relación también se ve determinada por la interacción genotipo por ambiente (Lodeiro, 2015; Oono y Denison, 2010).

Esta interacción se produce gracias a compuestos polifenólicos, llamados flavonoides, exudados por la raíz hacia la rizosfera, estos actúan como quimio-activantes para los rizobios (Peters et al., 1986; Masson-Boivin et al., 2009), en consecuencia, sus genes responsables de la nodulación (*nod*) actúan (Suárez et al., 2008; Walker et al., 2020). Esta interacción es específica, de tal suerte que los flavonoides exudados por un espectro limitado de leguminosas hospederas serán recibidos por determinadas cepas de rizobios (Cerro et al., 2017; García y Ojeda, 2004; Goldwasser et al., 2010; Liu y Murray, 2016; Peters et al., 1986).

El efecto de las BNFN en el desarrollo vegetal y el aumento de la producción ha sido ampliamente descrito (Acuña y Uribe, 2016; Escobar Avendaño, 2012; Giller y Cadisch, 1995; Herridge, 2008; Viçosi

et al., 2020). Por ejemplo, la fijación biológica de N, producto de la inoculación de *Bradyrhizobium japonicum*, contribuye al aumento significativo del número de vainas en plantas de soya (*Glycine max* L. Merrill) (Mahmud et al., 2020), González et al. (2012) reportan un incremento en el rendimiento con 1,34 t ha⁻¹ de frijol común más que las plantas sin inoculación con *Rhizobium* spp. Lo propio, sucede con la inoculación con cepas nativas de *Rhizobium* spp. en frijol de la variedad Blanco Molinero que obtiene 2.836 kg ha⁻¹, valor que supera la media nacional de Perú de 2.000 kg ha⁻¹ cultivada de forma convencional (Cantaro-Segura et al., 2019), en esta misma senda, Chipana et al. (2017) determinaron que, además de existir influencia positiva en el rendimiento por hectárea, el rendimiento por planta y número de vainas por planta de frijol común después de aplicar *Rhizobium etli* directamente en el suelo también se potencializa, indicando que existe una notable incidencia en aspectos morfofisiológicos en el cultivo, esto demuestra que los rizobios tienen un efecto positivo en la mejora de indicadores morfológicos y productivos como el aumento del número de hojas, mayor altura de planta, mayor número de vainas por planta y mayor peso de grano por vaina (Calero et al., 2019).

Otros estudios, complementan los beneficios de los rizobios más allá del rendimiento, por ejemplo, Van Sambeek y Garrett (2004) reportan el aumento del 28% de N disponible en suelo de bosque gracias al efecto de la rizodeposición de las leguminosas noduladas por rizobios, lo que sin duda es clave en la mitigación de los efectos de la emisión de gases de efecto invernadero. De la misma manera, la alfalfa (*Medicago sativa* L.), una leguminosa forrajera, que se utiliza como cultivo asociado de diferentes especies vegetales, es capaz de proveer de N asimilable al suelo gracias al mecanismo simbiótico rizobios-leguminosa (Adhikari y Missaoui, 2017; Heichel et al., 1981), convirtiéndose en una leguminosa estratégica también en la obtención de pasturas más eficientes en términos de ganadería (Cox et al., 2019), otros autores reportan beneficios del uso de BFN como promotoras de crecimiento vegetal en otros cultivos de canasta básica, por ejemplo, en cultivos de raji (*Eleusine coracana*) y garbanzo verde (*Vicia radiata*) en simbiosis con *Rhizobium mayense* en la India (Shameem et al., 2023), chocho (*Lupinus mutabilis*) en simbiosis con *Bradyrhizobium* spp. en Perú (Monroy-Guerrero et al., 2022) o habas (*Vicia faba*) en simbiosis con *Rhizobium* spp. en Etiopía (Allito et al., 2020).

Por otro lado, los rizobios representan una potencial herramienta biotecnológica de fácil aplicación agrícola sin los efectos nocivos por el mal uso de los fertilizantes químicamente

synetizados en el ambiente (Crews y Peoples, 2004), por ejemplo, algunos de ellos son tolerantes a suelos con remanentes de pesticidas derivados de fenantreno y benzo[a]pireno (González-Paredes et al., 2013), así mismo, Garcidueñas-Piña et al. (2022) destacan el papel de los rizobios en procesos de fitoremediación aplicada a la remoción de cobre y otros metales pesados gracias a la interacción de *Rhizobium* spp. con especies forestales como *Prosopis laevigata* y *Acacia farnesiana*.

En virtud de lo anterior, el estudio de la infección y formación de nódulos en las raíces de una leguminosa es fundamental para el potenciamiento de esta herramienta biotecnológica, éste es uno de los criterios más confiables para la diferenciación de los rizobios de otros microorganismos edáficos de forma cualitativa (Matos y Zúñiga, 2003). Cuando se requiere hacer un recuento de los rizobios presentes en una muestra que contenga varios tipos de microorganismos, como por ejemplo, muestras de suelos o ensayos en sustratos no estériles, es necesario contar los rizobios indirectamente por los nódulos que se hayan formado en plantas estériles de una especie leguminosa mediante el método del Número Más Probable (NMP) (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988), esta predicción estadística supone ser una herramienta útil para estimar la concentración aproximada de microorganismos por unidad de masa de sustrato, suelo o semilla, especialmente cuando no se dispone de un laboratorio o los recursos necesarios para lograr este fin.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de dos biofertilizantes comerciales de diferente origen (mexicano y ecuatoriano) enriquecidos con *Rhizobium* spp. en el recuento de rizobios e indicadores morfológicos de la vainita o frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake en condiciones de invernadero en el Ecuador. Actualmente existe una gran cantidad de productos aparentemente con propiedades biofertilizantes en el mercado de insumos agrícolas, los cuales pueden ser validados con la metodología que se propone en esta investigación, de esta manera se pueda garantizar que el pequeño agricultor tenga resultados positivos en el uso de estos productos biológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio del experimento

La investigación se realizó en condiciones de invernadero en el Campo Docente Experimental "La Tola" (CADET), de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador,

ubicado en la latitud S 0°13'28.04545'', longitud W 78°22'16.74608'', a 2 457 m.s.n.m. (GPS Test), durante el periodo 2021-2022, en la provincia de Pichincha en la parroquia Tumbaco.

El CADET está ubicado en la zona de transición ecológica de bosque montano bajo y bosque húmedo montano bajo (Cañadas, 1983; MAGAP, 2013). Según datos meteorológicos tomados de la Estación Meteorológica M002 "La Tola" del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, ubicada en el mismo campo experimental, entre el periodo 2013 a 2020, las temperaturas máximas alcanzan los 25 °C, mientras que las mínimas descienden entre los 10 a 5 °C, teniendo en promedio temperaturas entre los 15 a 18 °C (Cáceres et al., 2021). Por otro lado, en cuanto a régimen pluviométrico, se observa que el periodo con mayores precipitaciones se registra entre enero a mayo, con un máximo entre marzo y abril; cuando las precipitaciones superan los 200 mm, éstas empiezan a disminuir en la temporada seca que se produce entre junio a agosto, posteriormente en el último cuatrimestre del año, las precipitaciones aumentan progresivamente. Estas fuentes de variabilidad espacio-temporales son consideraciones importantes en los ciclos de cultivo en los Andes ecuatorianos, temperaturas inferiores a los 10 °C y altas precipitaciones afectan negativamente el cultivo de frijol ejotero (Toledo, 2003; Cáceres et al., 2021), siendo la temperatura la principal fuente de variabilidad del experimento.

Implementación del experimento

La implementación del experimento consistió en tres momentos, primero se esterilizó al vapor el sustrato, éste consistió en pomina (cascajo de piedra pómez) de tamaño uniforme de ± 5 mm en promedio, el cual fue colocado en setenta macetas sin perforaciones de polietileno expandido con capacidad de 1 dm³ que previamente fueron esterilizadas con alcohol isopropílico al 99%, la cantidad de sustrato colocado fue de 400 g, cada maceta se constituye en una unidad experimental.

El segundo momento consistió en la siembra de las semillas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake, importada de los Estados Unidos de Norteamérica. La siembra se realizó a una profundidad de 3 cm, es decir, aproximadamente tres veces la longitud de la semilla.

El tercer momento implicó la preparación de diez diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) a partir de dos biofertilizantes comerciales enriquecidos con *Rhizobium* spp. de origen ecuatoriano y mexicano, el primero con una concentración de partida para la solución madre de 1×10^7 UFC por gramo y el segundo con 5×10^8 UFC por gramo.

A partir de estas diluciones, se inoculó con una jeringuilla de 1 mL de capacidad, una única dosis en cada maceta, de modo que, para cada dilución existió tres repeticiones (tres unidades experimentales) para cada biofertilizante como lo recomiendan Muñoz-Rojas et al. (2016), es decir, treinta macetas para el biofertilizante ecuatoriano y treinta macetas para el mexicano, además se prepararon diez macetas testigo en las que no se inoculó ningún producto, este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de Moreira (2012).

El riego se realizó con agua destilada, éste fue dosificado partiendo de un volumen de 3 mL por planta de forma diaria, se aplicó manualmente con jeringuillas esterilizadas para cada aplicación en todas las macetas, mismo que fue aumentando semanalmente a razón de 1,17 mL hasta alcanzar 10 mL en la séptima semana en la que se realizó el ensayo destructivo. Las macetas fueron cubiertas con papel film traslúcido hasta la primera semana de emergencia, cuando el hipocótilo empieza a ser visible y comienza su desarrollo, esto con la finalidad de evitar la contaminación de los inóculos, el diseño del experimento se basó en las recomendaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988) y Moreira (2012).

Determinación de rizobia mediante número más probable (NMP)

La determinación del NMP, se basa en la técnica de inoculación en planta desarrollada por Brockwell (1981) empleando *P. vulgaris* como cultivo trampa por su amplio rango de leguminosa hospedera y precocidad de nodulación (Martínez-Scott et al., 2002). Para el cálculo del NMP se requiere la ecuación [1]:

$$NMP = \frac{m*d}{v*n} \quad [1]$$

Donde:

NMP = número más probable de células por gramo de sustrato;

m = número más probable (por mL) en la primera dilución considerada;

d = dilución de la primera dilución considerada;

v = volumen inoculado (1 mL);

n = número de semillas, volumen o peso del suelo, sustrato o del inoculante.

Variables evaluadas

Según la ficha técnica de las semillas, la variedad de vainitas Blue Lake tienen un ciclo de producción de 65 días, la floración inicia aproximadamente a los 45 días después de la siembra (DDS) (ALASKA S.A., 2019), rango que

coincide con los valores reportados para plena floración en *P. vulgaris* por Cantaro-Segura et al. (2019). Las variables fueron medidas a los 45 DDS en consideración que las plantas se encontraban en plena floración bajo las condiciones experimentales, cuando se esperaría que la nodulación se encuentre en su punto máximo, al ser un ensayo destructivo válido para estudios posteriores, no se evaluó rendimiento, las variables medidas fueron: área foliar (cm²), peso de la planta en húmedo (g), que, si bien es cierto, la literatura sugiere la variable peso de la materia seca, puesto que el contenido de agua varía en función de las condiciones ambientales, en este ensayo experimental por limitantes operativas y por consideraciones de ensayos futuros que comprenderán esta variable en condiciones de humedad, se procedió únicamente a reportar el peso en húmedo enfatizando se trata de una variable morfológica y no productiva, se midió además, altura de planta (cm) y número de flores (unidades por planta).

Para la evaluación de la inoculación de las cepas, por presencia o ausencia de nódulos en la raíz de cada planta se utilizó la tabla de NMP del Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988), basada en la original publicada por Vincent (1975) para determinar el NMP de rizobios por unidad de masa de sustrato empleado en función de cada concentración realizada. Para la determinación del área foliar se empleó la herramienta informática ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) versión 1.8.0_172 para Windows 10 en 64 bit.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó la herramienta de software RStudio versión 2021.09.0 Build 351. El análisis de los datos de las variables se adaptó a un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con arreglo de parcela dividida, la parcela grande considera los dos biofertilizantes, la parcela chica considera las diez diluciones con tres repeticiones por dilución y por biofertilizantes y diez testigos no inoculados pero sometidos a las mismas condiciones, el diseño se justifica por la variabilidad que se presenta en las condiciones de temperatura particulares de los valles interandinos de Ecuador, existiendo en el mismo día variación de temperatura, incluso en condiciones de invernadero, lo que afecta a las unidades experimentales, estas variaciones en el CADET pueden ir de 25 °C en el pico más alto a menos de 10 °C en su punto más bajo, con una alta posibilidad de heladas, temperaturas que afectan a la vainita según afirma Toledo (2003), al no contar con invernaderos adecuados, se propone la aplicación de un diseño completamente

aleatorizado como comúnmente se realiza en condiciones análogas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número Más Probable (NMP)

La evaluación de la nodulación de las plantas de frijol ejotero inoculadas con todas las disoluciones a los 45 DDS comprendió el conteo de positivos (existe presencia de nódulos) y negativos (ausencia de nódulos) por maseta, incluyendo plantas testigo, las que no fueron inoculadas y en consecuencia ninguna presentó nodulación (Tabla 1).

La tabla de NMP, publicada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988), muestra los números más probables para 10, 8, 6 y 4 diluciones (S), esta fue validada con un factor del 95% de los límites de confianza, con este instrumento se evaluaron dos pruebas de nodulación considerando el origen del biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp., existieron diez disoluciones cuyas concentraciones fueron seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-10} .

En el caso del biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. mexicano, se evaluó el NMP considerando ocho diluciones (S = 8) tomando como primera disolución a la concentración 10^{-5} por ser la primera en presentar respuesta positiva a la nodulación en todas las repeticiones.

En el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. ecuatoriano, existieron siete disoluciones, de un total de diez que inicialmente fueron consideradas para la evaluación del NMP, no obstante, sólo se consideró para el cálculo un total de seis disoluciones (S = 6) siendo la primera, aquella que presenta resultados positivos en sus tres repeticiones en la concentración 10^{-4} . En el primer caso se cuentan 22 macetas positivas y en el segundo 18 macetas, es decir, presentaron nódulos, en el caso de las plantas testigo no existió nodulación.

El descarte de las tres primeras disoluciones para el biofertilizante ecuatoriano y dos primeras del mexicano del cálculo, se fundamenta en que normalmente las disoluciones menores, es decir, aquellas que presentan mayor concentración de microorganismos, pueden contaminarse con muchos otros microorganismos que a veces inhiben el crecimiento de la planta o en su defecto la nodulación, o por el contrario siempre tenderán a nodular; mientras que, en las disoluciones mayores, es decir, las más diluidas, las plantas nodulan como respuesta a un bajo índice de contaminantes, en estos casos, las macetas son contadas como positivos (Vincent, 1975; Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988; Bécquer, 2004), sin embargo, el comportamiento que se observa en la Tabla 1, puede deberse a que el biofertilizante con cepas

Tabla 1. Control de positivos y negativos del ensayo de nodulación en función del biofertilizante y la concentración de la disolución empleada.

Table 1. Control of positives and negatives of the nodulation test depending on the biofertilizer and the concentration of the solution used.

Dilución	<i>Rhizobium</i> spp. (México)			Dilución	<i>Rhizobium</i> spp. (Ecuador)			Plantas testigo	
	R1	R2	R3		R1	R2	R3		
10^{-1}	+	+	+	10^{-1}	+	+	+	1	-
10^{-2}	+	+	+	10^{-2}	+	+	+	2	-
10^{-3}	+	-	+	10^{-3}	+	+	+	3	-
10^{-4}	+	+	-	10^{-4}	+	+	+	4	-
10^{-5}	+	+	+	10^{-5}	+	+	+	5	-
10^{-6}	+	+	+	10^{-6}	+	+	+	6	-
10^{-7}	+	+	+	10^{-7}	+	+	+	7	-
10^{-8}	+	+	+	10^{-8}	-	+	+	8	-
10^{-9}	+	+	+	10^{-9}	-	+	+	9	-
10^{-10}	+	+	+	10^{-10}	+	-	+	10	-

* (+) Plantas con presencia de nódulos, (-) Plantas con ausencia de nódulos. R = Repeticiones. En gris claro las repeticiones excluidas del cálculo por recomendación de CIAT (1988) en consideración de su alta concentración y en gris oscuro, la repetición a partir de la cual se considera el conteo de NMP por presentar triple positivo conforme se indica en la metodología. La diferencia en el comportamiento puede explicarse por la interacción gen por ambiente, ya que son cepas obtenidas en diferentes orígenes y condiciones ambientales (Oono y Denison, 2010).

de *Rhizobium* spp. ecuatoriano, se encuentran mejor adaptadas a las condiciones ambientales en los Andes, de forma contraria, el producto mexicano presenta nodulación negativa en dos macetas correspondientes a las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , respectivamente, esto puede deberse a la interacción genotipo por ambiente (Oono y Denison, 2010), ya que se tratan de cepas introducidas que no fueron previamente sometidas a un proceso de adaptación a las condiciones ambientales propias de los valles interandinos ecuatorianos, y por tanto, se aplicó conforme utilizan los pequeños agricultores de la Sierra ecuatoriana quienes no realizan períodos de aclimatación de las cepas de ningún producto biológico comercial importado.

Los valores de números más probables (m) por mililitro en las primeras disoluciones, según lo consultado en el instrumento, fueron de $5,8 \times 10^4$ células para $S = 8$ en su primera disolución 10^{-5} y de $5,9 \times 10^3$ células para $S = 6$ en su primera disolución 10^{-4} . El cálculo del NMP requiere emplear la ecuación [1] detallada en la metodología, los resultados que se obtuvieron son $4,45 \times 10^7$ rizobios g^{-1} de sustrato de pomina estéril inoculada con el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. de origen mexicano y $1,48 \times 10^5$ rizobios g^{-1} de sustrato de pomina estéril inoculada con el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. de origen ecuatoriano, al respecto, Fernández-Canigia (2020) sostiene que las cepas de distintas especies rizobianas tienen condiciones óptimas de crecimiento según los factores ambientales, lo propio sucede con los diferentes cultivares de leguminosas, dicho de otra manera, si la planta se encuentra en condiciones subóptimas de desarrollo, ésta limitará la simbiosis y por lo tanto la FBN.

Las comunidades bacterianas que nodulan la planta hospedera indican si las condiciones del ensayo experimental, tales como temperatura, luz, humedad o concentración de nutrientes son adecuadas para que se lleve a cabo el proceso de nodulación y en consecuencia la fijación simbiótica de N en las plantas para su desarrollo, en lo referente a temperatura, se sabe que esta variable puede afectar la persistencia de los rizobios en inoculantes y puede influir sobre su supervivencia en el suelo, éste es un mecanismo que la naturaleza ha desarrollado para condicionar a lo largo del año el número de poblaciones naturalizadas en el suelo, por tanto el estrés térmico (por altas o bajas temperaturas), ocurrido especialmente en la fase inoculación tendrá como efecto una marcada reducción en el número de bacterias efectivas introducidas (Mpepereki et al., 1996; Fernández-Canigia, 2020).

En este contexto, cultivares como soya y frijol,

requieren temperaturas entre 25 a 30 °C para su óptima simbiosis y, donde rangos térmicos inferiores en el suelo, restringen la nodulación y fijación simbiótica de N (Lira-Junior et al., 2005), en virtud de aquello, las variaciones de temperatura en el sustrato o en el suelo son un factor trascendental en la actividad simbiótica entre el microorganismo y la planta, esto definitivamente es un factor edafoclimático a tomar en cuenta en las zonas de cultivo de leguminosas en los valles interandinos propios de países como Ecuador, Colombia y Perú, cuyas temperaturas presentan fluctuaciones extremas en un mismo día (Espinosa, 1991; Espinosa et al., 2018; Mohr y Pendleton, 1944; Sánchez, 1976; Zehetner et al., 2003), es por esto que, pese a que los ensayos de nodulación se realicen en condiciones de invernadero, si éste no presenta un sistema de control térmico, éste no queda exento de la incidencia térmica del exterior tanto del ambiente como del suelo o de los sustratos en maceta, actuando como un factor de bloqueo en el ensayo experimental (Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, 2008).

Por otro lado, Hasan et al. (2022) demostraron en hallazgos recientes que la formación de nódulos en plantas de soya se ve inducido por señales activadas por efecto de la luz que se mueve desde la parte aérea de la planta hasta sus raíces, lo que implica un nuevo factor de variabilidad en el estudio de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, este asombroso descubrimiento podría explicar parte de la variabilidad que se presenta en la nodulación, pese a existir inóculo viable.

En cuanto a la concentración de rhizobia necesaria para obtener resultados positivos en los cultivos, se debe mencionar que no hay estudios que puedan ser extrapolados para este fin, así lo determinaron Mulas García et al. (2018), no obstante, la dosis de rhizobia necesaria para garantizar la nodulación en plantas leguminosas es 10^4 rizobios g^{-1} de suelo (Hirsch, 1996). El NMP para la inoculación directa en semilla puede variar en función de la calidad de los inoculantes de país a país, por sus condiciones edafoclimáticas particulares, y por lo general está entre 10^3 y 10^6 UFC semilla $^{-1}$ (Herrmann y Lesueur, 2013), análogo a lo determinado Bernal y Graham (2015) cuyos valores de NMP varían entre 10^4 y 10^6 bacterias por gramo de suelo, las diferencias podrían deberse al tipo de sustrato empleado y la naturaleza del inóculo, las características fisicoquímicas del suelo, la humedad y las relaciones climáticas al momento de la toma de las muestras, estos factores condicionan la cantidad de exudados de las raíces y determinan la variación de la presencia de bacterias diazótrofes en las muestras, especialmente en condiciones de

campo (Argüello-Navarro et al., 2016; Fernández-Canigia, 2020).

Asimismo, los investigadores Bernal y Graham (2015) reportan un rango de NMP de 10^5 a 10^6 bacterias por gramo de suelo en todos los conteos de NMP de *Rhizobium* spp. en tres suelos del Ecuador, valores independientes del cultivar empleado, donde además la diversidad genética estimada en dos de los tres suelos analizados fue mayor cuando se emplearon cultivares de frijol nativo, los autores reportan un NMP de $3,59 \times 10^3$ bacterias por gramo de suelo en Cotacachi (Imbabura, Ecuador), para la variedad de frijol Puebla 152, y de forma análoga, en la misma localidad, un NMP de $3,36 \times 10^3$ bacterias por gramo de suelo para la variedad de frijol Bolón 6.

En soya, Albareda et al. (2009) consiguieron una producción máxima con intervalos de entre 10^5 a 10^6 rhizobia semilla⁻¹, donde además se observaron incrementos en el peso seco del nódulo, el rendimiento de la semilla y el contenido de N de la semilla cuando el número de rizobios aplicados a la semilla aumentó de 10^4 a 10^7 UFC g⁻¹ de suelo, rango en el que se ubicarían los valores de NMP reportados en este estudio en sustrato de pomina estéril.

Respuesta de los indicadores morfológicos al tipo de biofertilizante y concentración

Las plantas inoculadas con *Rhizobium* spp., mismas que fueron empleadas en la determinación del NMP presentan importantes diferencias en las variables área foliar (cm²), peso de la planta en húmedo (g), altura de planta (cm) y número de flores (unidades por planta). En la Fig. 1 se puede observar cómo se distribuyen los valores medidos de cada variable en función del tipo y concentración de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. (ecuatoriano y mexicano). En todos los casos se puede observar una respuesta mayor para el biofertilizante de origen ecuatoriano, en donde, las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} demuestran un incremento en área foliar, siendo 10^{-8} la concentración óptima para encontrar mejoría en los indicadores (Fig. 1a), peso de la planta (Fig. 1b), altura (Fig. 1c) y número de flores (Fig. 1d).

El análisis de varianza en DBCA con arreglo de parcela dividida demuestra que existen diferencias estadísticas altamente significativas (Tabla 2) en el incremento del área foliar, peso de planta en húmedo, altura de planta y número de flores por

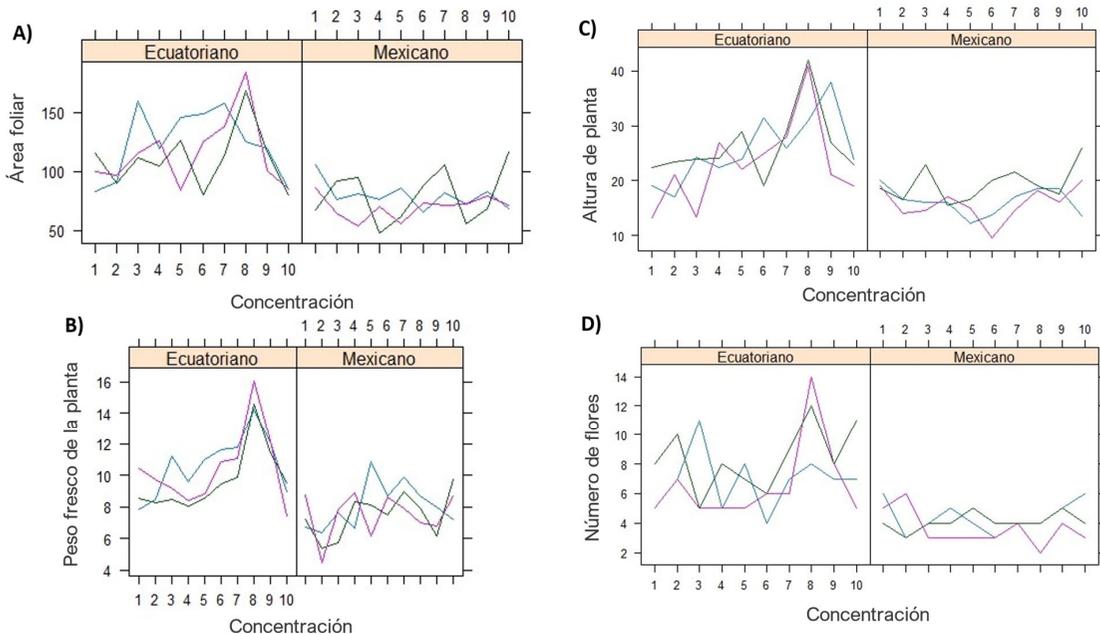


Fig. 1. Respuesta de las variables: a) área foliar (cm²), b) peso de la planta en húmedo (g), c) altura de planta (cm) y número de flores a los 45 DDS en función del tipo de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. y su concentración. Gráficos obtenidos con RStudio.

Fig. 1. Response of the variables: a) leaf area (cm²), b) wet plant weight (g), c) plant height (cm) and number of flowers at 45 DAP depending on the type of biofertilizer enriched with *Rhizobium* spp. and its concentration. Graphs were created using RStudio.

efecto del tipo de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. que se empleó en el ensayo de nodulación para un α igual a 0,05, dado que su nivel de significancia es menor al de α se concluye que la relación es diferente de cero (Morales, 2011) demostrándose las diferencias estadísticas mencionadas.

Lo propio sucede con la incidencia de la concentración sobre el incremento del peso en húmedo de la planta y la interacción entre tipo de biofertilizante y concentración propiamente, Torres Gutiérrez (2008) determinó que, al evaluar el peso fresco y seco del follaje de frijol común, no se observan diferencias estadísticas significativas en tratamientos de inoculación combinada o de *Rhizobium* spp. en solitario, por tal que no restringe el uso del peso fresco como variable indicadora de variación en factores morfofisiológicos, especialmente si se busca correlacionar con área foliar e índice de clorofila en estudios posteriores, salvo que se busque evaluar específicamente biomasa.

Por otro lado, también se encuentran diferencias estadísticas en la variable respuesta altura de planta como consecuencia de la concentración empleada en la inoculación del sustrato, así como la interacción entre el tipo de biofertilizante versus concentración, para esta misma fuente de variación se identifica una ligera diferencia para la variable respuesta área foliar. Los gráficos de validación (QQ-plot) de los residuos y los datos predichos de cada una de las variables se ajustan al modelo propuesto como se demuestra en Fig. 2 en sus literales correspondientes.

La respuesta de las variables medidas confirma el beneficio en el comportamiento de los indicadores morfológicos y productivos del frijol inoculado con BNFN, Calero et al. (2019) reportan un incremento en el rendimiento del

grano como consecuencia del mejoramiento de los parámetros morfológicos como el número de hojas por planta y el área foliar tras emplearse bacterias diazotróficas. El beneficio de la inoculación se extiende también a otros componentes del rendimiento como el número de vainas por planta, consecuencia de un mayor número de flores, mayor cantidad de granos por vaina y un importante incremento en la masa de cada 100 granos de frijol comestible. Estos efectos corroboran los criterios de Díaz et al. (2009) quienes manifiestan que los microorganismos eficientes pueden ser empleados como inoculantes del suelo para la restitución del equilibrio de las poblaciones microbiológicas que componen el suelo y, en consecuencia, una mejora sustancial en la disponibilidad y asimilación de nutrientes que favorece un desarrollo óptimo de los hospederos de estos microsimbiontes.

Tras rechazarse la hipótesis nula de igualdad de medias mediante por el método de análisis de varianza, para las fuentes de variabilidad: tipo de biofertilizante y concentración, se requiere comparar las medias de los niveles de los factores que obtienen diferencias estadísticas significativas en las fuentes de variabilidad mencionadas (Tabla 2) mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey (HSD Tukey) a fin de establecer los rangos óptimos de las fuentes de variabilidad con un α igual a 0,05.

El incremento en el área foliar por efecto del tipo de biofertilizante denota que existen diferencias entre las medias calculadas, se determinó dos rangos de significancia, el mayor con una media calculada de 116,55 cm² de área foliar para las plantas inoculadas con *Rhizobium* spp. de origen ecuatoriano frente a 76,25 cm² de media calculada de área foliar para las plantas inoculadas con *Rhizobium* spp. de origen mexicano como se muestra en la Fig. 2 literal a.1.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson (valor P) del análisis de varianza con α de 0,05.
Table 2. Pearson correlation coefficients (P-value) from the analysis of variance with α of 0.05.

Fuente de Variación	Coeficientes de Correlación de Pearson (valor P)			
	Área Foliar (cm ²)	Peso de Planta (g)	Altura de Planta (cm)	Número de Flores (unidad)
Tipo de Biofertilizante	1,25x10 ⁻⁹ ***	5,36x10 ⁻¹¹ ***	9,25x10 ⁻⁹ ***	2,54x10 ⁻⁹ ***
Concentración	0,1784	1,03x10 ⁻⁵ ***	0,00751**	0,2116
Tipo de Biofertilizante vs. Concentración	0,0129*	7,21x10 ⁻⁵ ***	0,00903**	0,0697
Tipo de Biofertilizante vs. Repetición	0,3486	0,0779	0,2318	0,1262

Signif. codes: 0 " *** " 0,001 " ** " 0,01 " * " 0,05 " . " 0,1 " " 1

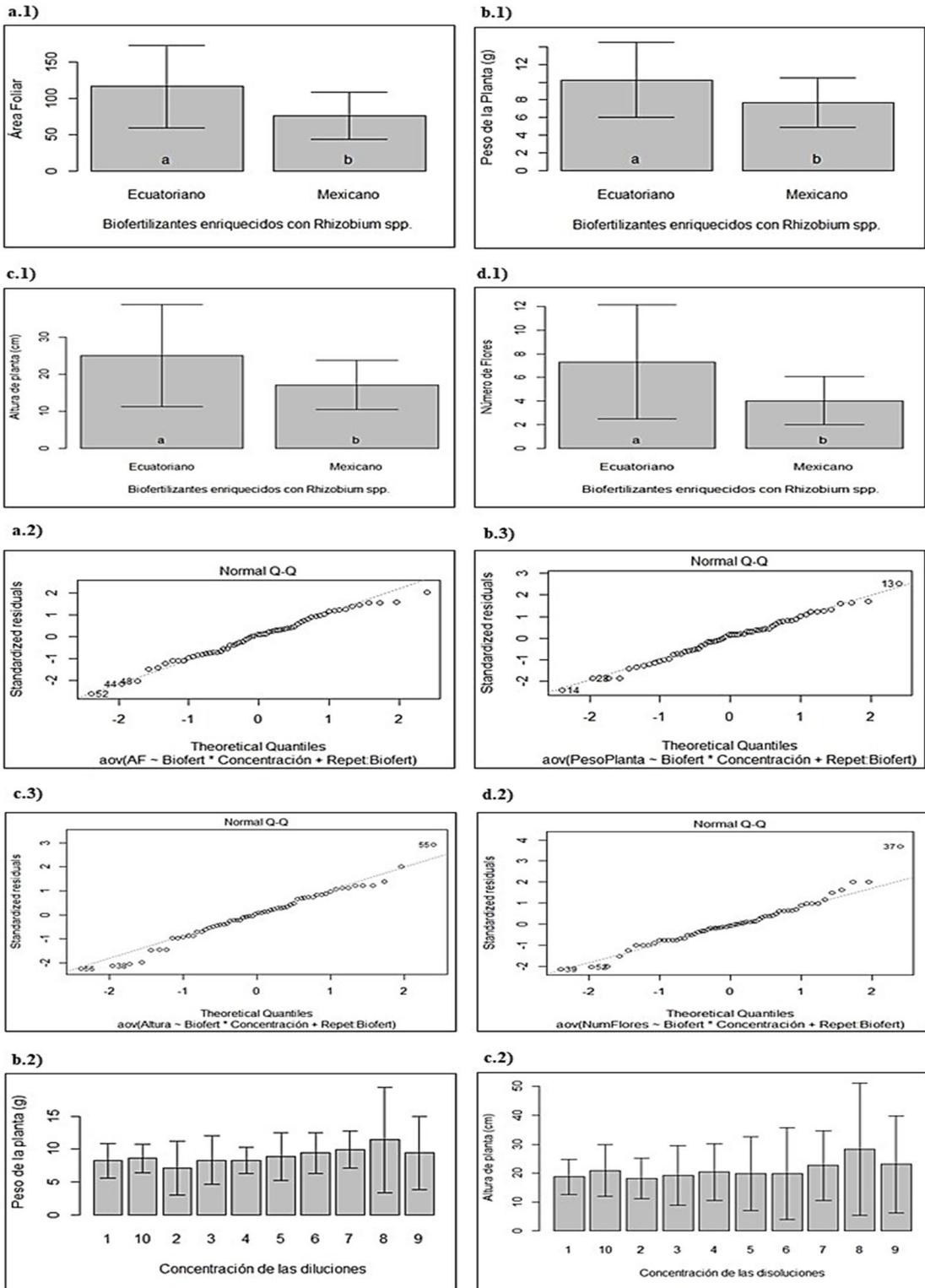


Fig. 2. Rangos de significancia de las variables: área foliar (a.1), peso de la planta en húmedo (b.1 y b.2), altura de planta (c.1 y c.2) y número de flores por planta (d.1 y d.2).

Fig. 2. Significance ranges of the variables: leaf area (a.1), wet plant weight (b.1 and b.2), plant height (c.1 and c.2) and number of flowers per plant (d.1 and d.2).

En cuanto al incremento del peso de la planta en húmedo, por efecto del tipo de biofertilizante, se observa dos rangos de significancia (Fig. 2. B.1), de forma que la media que se obtiene para el producto ecuatoriano es de 10,26 g por planta frente al producto mexicano que alcanza una media de 7,70 g por planta. Además la variable presenta diferencias estadísticas significativas en función de la concentración de biofertilizante empleada, estableciéndose tres rangos de significancia donde la concentración 10^{-8} presenta mayor incremento en el peso de la planta en húmedo independientemente del tipo de biofertilizante empleado, considerando que las concentraciones 10^{-6} a 10^{-10} con relación a la variable, poseen un mismo rango de significancia podemos afirmar que estos resultados guardan consistencia con los valores de NMP reportados.

La variable altura de planta obtiene una media para el producto ecuatoriano de 25,03 cm frente a 17,12 cm obtenidos por efecto del producto mexicano como se evidencia en la Fig. 2. Literal c.1. De manera análoga, el HSD test evidencia dos rangos de significancia entre las concentraciones de biofertilizante, siendo la concentración 10^{-8} la que alcanza mejor respuesta con 28,28 cm de altura, hallándose consistencia con los datos obtenidos en la variable respuesta peso de la planta frente a la concentración 10^{-2} que obtiene la media más baja de altura de planta con 18,08 cm como se puede observar en la Fig.2., apartado c.2.

Finalmente, en cuanto al número de flores por planta, se determinó dos rangos de significancia para el tipo de biofertilizante empleado, el producto ecuatoriano obtuvo una media de 7,30 flores frente a 4,03 flores promedio por planta para el biofertilizante de origen mexicano como se puede evidenciar en la Fig. 2. Literal d.1. Los efectos positivos obtenidos en todos estos indicadores morfológicos coinciden con los criterios de Bernal y Graham (2015) y González et al. (2012) en el incremento de área foliar, aumento en la altura de la planta (Cantaro-Segura et al., 2019), así como en el número de hojas y flores (Lara-Capistrán et al., 2019).

CONCLUSIONES

El NMP calculado para el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. de origen mexicano fue de $4,45 \times 10^7$ células de rizobios por cada gramo de pomina estéril procedente de una dilución 10^{-5} , frente a $1,48 \times 10^5$ células de rizobios por cada gramo de sustrato procedente de una dilución 10^{-4} en macetas inoculadas con *Rhizobium* spp. de origen ecuatoriano, este comportamiento se puede explicar por el efecto de la temperatura en condiciones de valle interandino, en

invernaderos no automatizados.

Se determina que existen diferencias altamente significativas para la fuente de variabilidad: tipo de biofertilizante, de modo que el origen del producto empleado determina en todos los casos un incremento en las variables respuesta área foliar, peso en húmedo de la planta, altura de planta y número de flores, siendo el producto ecuatoriano el que obtiene mejores indicadores morfológicos frente al producto mexicano a los 45 DDS (etapa de plena floración y cuando existen aún nódulos), esto se explica porque la cepa al ser de origen nacional, presenta mayor adaptabilidad al medio en que fue probada y no requiere de etapas de adaptación o aclimatación.

El rango óptimo de concentración de disoluciones de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp., independientemente de su origen, en sustrato de pomina estéril es de 10^{-7} a 10^{-9} , donde 10^{-8} se considera como dilución óptima para obtener efectos positivos en promoción del crecimiento y mejora de los indicadores morfológicos: altura de planta, área foliar, peso en húmedo y número de flores. El peso en húmedo de planta y altura de planta demuestran un incremento atribuible a la concentración de biofertilizante empleado, siendo la concentración 10^{-8} la que presenta una media superior en ambos casos. Estas mismas variables junto con el área foliar también presentan diferencias estadísticas en la interacción entre las fuentes de variabilidad tipo de biofertilizante y concentración.

Se recomienda la replicación del experimento considerando un mayor número de repeticiones y variables agronómicas evaluables, condiciones de control estricto de la temperatura ambiental y del sustrato, soluciones nutritivas iguales para los cultivos, luminosidad idónea y periodos de aclimatación de biofertilizantes comerciales importados.

LITERATURA CITADA

- Acuña, O. y L. Uribe. 2016. Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 35-40. doi: 10.15517/am.v7i1.24786.
- Adhikari, L., and A.M. Missaoui. 2017. Nodulation response to molybdenum supplementation in alfalfa and its correlation with root and shoot growth in low pH soil. *Journal of Plant Nutrition* 40(16): 1-39. doi: 10.1080/01904167.2016.1264601.
- ALASKA S.A. 2019. Ficha técnica vainita Blue Lake. Disponible en: <https://www.imporalaska.com/> (Consultada 10 noviembre 2021).

- Albareda, M., D. Rodríguez-Navarro, and F.J. Temprano. 2009. Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. *Field Crops Res.* 113(3): 352–356. doi: 10.1016/J.FCR.2009.05.013.
- Allito, B.B., N. Ewusi-Mensah and V. Logah. 2020. Legume-Rhizobium strain specificity enhances nutrition and nitrogen fixation in faba bean (*Vicia faba* L.). *Agronomy* 10(6): 826. doi: 10.3390/AGRONOMY10060826.
- Argüello-Navarro, A.Z., N. Madiedo-Soler y L.Y. Moreno-Rozo. 2016. Cuantificación de bacterias diazótroficas aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.), por la técnica de Número Más Probable (NMP) Quantification of diazotrophs bacteria isolated from cocoa soils (*Theobroma cacao* L.), by the technique of Most Probable Number (MPN). *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(2): 40–47. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47678.
- Ayra, L., M. del R. Reyero-Saavedra, M.C. Isidra-Arellano, L. Lozano, M. Ramírez, et al. 2021. Control of the Rhizobia nitrogen-fixing symbiosis by common bean MADS-Domain/AGL transcription factors. *Front. Plant. Sci.* 12:1–17. doi: 10.3389/fpls.2021.679463.
- Barrera, A.F., J.G. **Alvarez-Herrera**, A.F. Forero, C. Salamanca y L.P. Pinzón. 2012. Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. *Temas agrarios* 17(1):32–43. <https://doi.org/10.21897/rta.v17i1.694>
- Bécquer, C.J. 2004. Descripción y clasificación de rizobios: Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Biología* 18(1): 9-30. <https://link.gale.com/apps/doc/A146273536/AONE?u=anon~35e45b93&sid=googleScholar&xid=607316b7>
- Bernal, G. y P.H. Graham. 2015. La diversidad del Rhizobium asociado con *Phaseolus vulgaris* L. en Ecuador, y comparaciones con el Rhizobium de México. En: *Canadian Journal of Microbiology* 47:6:526-534, VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito, Ecuador. p. 526–534. doi: 10.1139/w01-037
- Boyd, E.S. and J.W. Peters. 2013. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front. Microbiol.* 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00201.
- Brockwell, J. 1981. A strategy for legume nodulation research in developing regions of the old world. *Plant Soil* 58(1/3):367–382. <https://doi.org/10.1007/BF02180063>
- Cáceres, E., R. Castro, M. Colinas, M. de J. Juárez, J. Almaraz, et al. 2021. Edaphic source and tillage systems on yield and nutritional quality of green bean in Ecuadorian volcanic soils. *Bioscience Research* 18(4):3132–3142. [https://www.isisn.org/BR18\(4\)2021/3132-3142-18\(4\)2021BR21-442.pdf](https://www.isisn.org/BR18(4)2021/3132-3142-18(4)2021BR21-442.pdf)
- Calero, A., Y. Pérez, E. Quintero, D. Olivera, K. and Peña. 2019. Effect of the associated application between *Rhizobium leguminosarum* and efficient microorganisms on common bean production. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 20(2): 295–308. doi: 10.21930/rcta.vol20_num2_art:1460.
- Cañadas, L. 1983. Valle de Tumbaco. El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Auspicio especial Banco Central del Ecuador. Banco Central del Ecuador, Quito, Ecuador. p. 171–173; 148–149.
- Cantaro-Segura, H., A. Huaranga-Joaquín y D. Zuñiga-Dávil. 2019. Efectividad simbiótica de dos cepas de Rhizobium sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *IDESIA (Chile)* 37(4): 73–81.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobium; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali, Colombia. Disponible en: https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABE088.pdf
- Cerón, L., and F. Aristizábal. 2012. Nitrogen and phosphorus cycles dynamics in soils. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 285–295.
- Cerro, P., F. Pérez-Montaño, A. Gil-Serrano, F.J. López-Baena, M. Megías, et al. 2017. The Rhizobium tropici CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci. Rep.* 7. doi: 10.1038/srep46712.
- Cherkasov, N., A.O. Ibhaddon, and P. Fitzpatrick. 2015. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 90. doi: 10.1016/j.cep.2015.02.004.
- Chipana, V., C. Clavijo, P. Medina y D. Castillo. 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). doi: 10.21704/rea.v16i2.1012.
- Cox, B.F.E., P.A.M. Córdova, S.A.A. **Córdova y D.E.I. García**. 2019. Evaluación de los beneficios y desventajas de los cultivos de cobertura en el uso de pastos naturales, hacienda San Rafael, Santo Domingo Ecuador. *Ciencia Digital* 3(2): 137–148.

- Crews, T.E., and M.B. Peoples. 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102(3): 279–297. doi: 10.1016/j.agee.2003.09.018.
- Díaz, O., D. Montero, and J. Lagos. 2009. Effect of efficient microorganisms on cation exchange capacity in acacia seedlings (*Acacia melanoxylon*) for soil recovery in Mondoñedo, Cundinamarca. *Revista Colombiana Forestal* 12: 141–160. <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a10.pdf>
- Escobar Avendaño, E.A. 2012. Producción de biofertilizantes a base de *Rhizobium calliandrae*. Instituto Tecnológico Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. <http://repositorio.digital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/handle/123456789/3025>
- Espinosa, J. 1991. Los suelos volcánicos del Ecuador. p. 55-60. En: Mothes, P. (ed.). El paisaje volcánico de la Sierra Ecuatoriana. Geomorfología, fenómenos volcánicos y recursos asociados. Corporación Editora Nacional, Quito, Ecuador.
- Espinosa, J., J. Moreno, and G. Bernal. 2018. The Soils of Ecuador (J. Espinosa, J. Moreno, and G. Bernal, editors). Springer International Publishing, Madison, United States. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25319-0>
- Fernández-Canigia, M.V. 2020. Factores determinantes de la nodulación: edición ampliada y actualizada. 1ra ed. ampliada. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: https://images.engormix.com/externalFiles/6_factores_determinantes_de_la_nodulacion.pdf
- Ferrera-Cerrato, R. 2007. Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. 1ra ed. México Editorial Trillas, México.
- García, D.E., y F. Ojeda. 2004. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). III. Flavonoides totales. *Pastos y Forrajes* 27(3): 267–272. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=780>
- Garcidueñas-Piña, C., E.J. Arellano-Martínez, L.H. Morales-Garcidueñas, M. del C. **Gómez-Rangel**, I. Rubio-Franchini, et al. 2022. *Prosopis laevigata* and *Acacia farnesiana* in association with *Rhizobium* sp. remove copper from soil. *South African Journal of Botany* 151: 417–424. doi: 10.1016/J.SAJB.2022.09.019.
- Giller, K.E., and G. Cadisch. 1995. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant Soil* 174: 255–277. <https://doi.org/10.1007/BF00032251>
- Goldwasser, J., P.Y. Cohen, E. Yang, P. Balaguer, M.L. Yarmush, et al. 2010. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPAR α , PPAR γ and LXR α . *PLoS One* 5(8): e12399. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0012399.
- González, R., D. Núñez y R. Díaz. 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola* 39(4): 17–20. <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroagricola/2012/vol39/no4/3.pdf>
- González-Paredes, Y., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, J. Almaraz, E. Martínez-Romero, et al. 2013. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology* 63: 105–111. doi: 10.1016/J.APSSOIL.2012.09.010.
- Gupta, V.S.R., B. Zhang, P.R. Penton, J. Yu, and J.M. Tiedje. 2019. Diazotroph diversity and nitrogen fixation in summer active perennial grasses in a Mediterranean Region Agricultural Soil. *Front Mol. Biosci.* 6. doi: 10.3389/fmolb.2019.00115.
- Gutiérrez Pulido, H., y R. De la Vara Salazar. 2008. Análisis y diseño de experimentos (P. Roig, editor). 2da ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F., México. https://gc.scalahed.com/recursos/files/r161r/w19537w/analisis_y_diseno_experimentos.pdf
- Hasan, M.M., F.J. Corpas, and F. Xiang-Wen. 2022. Light: a crucial factor for rhizobium-induced root nodulation. *Trends Plant Sci.* 27(10): 955–957. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2022.07.002.
- Heichel, G.H., D.K. Barnes, and C.P. Vance. 1981. Nitrogen fixation of alfalfa in the seeding year. *Crop Sci.* 21(2): 330–335. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100020032x>
- Herridge, D.F. 2008. Chapter 4: Inoculation technology for legumes. p. 77–115. In: M.J. Dilworth et al., editor. *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer Science+Business Media B.V, Australia. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7>
- Herrmann, L., and d. Lesueur. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(20): 8859–8873. doi: 10.1007/S00253-013-5228-8.

- Hirsch, P.R. 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist* 133(1): 159–171. doi: 10.1111/J.1469-8137.1996.TB04351.X.
- Jaiswal, S.K., M. Mohammed, F.Y.I. Ibny, and F.D. Dakora. 2021. Rhizobia as a source of plant growth-promoting molecules: Potential applications and possible operational mechanisms. *Front Sustain. Food Syst.* 4(1):1–14. doi: 10.3389/fsufs.2020.619676.
- Kneip, C., P. Lockhart, C. Voß, and. U.G. Maier. 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evol. Biol.* 7(1):1–12. doi: 10.1186/1471-2148-7-55.
- Kuypers, M.M.M., H.K. Marchant, and B. Kartal. 2018. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(5). doi: 10.1038/nrmicro.2018.9.
- Lara-Capistrán, L., L.G. Hernández-Montiel, J.J. Reyes-Pérez, P.P. Rangel y L. Zulueta-Rodríguez. 2019. Respuesta agronómica de *Phaseolus vulgaris* a la biofertilización en campo. *Rev. Mex. de Cienc. Agric.* 10(5):1035–1046. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i5.936>
- Lindström, K., and S.A. Mousavi. 2020. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.* 13(5). doi: 10.1111/1751-7915.13517.
- Lira-Junior, M.D.A., A.S.T. Lima, J.R.F. Arruda, and D.L. Smith. 2005. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biol. Biochem.* 37(2): 235–239. doi: 10.1016/J.SOILBIO.2004.07.032.
- Liu, C.W., and J. Murray. 2016. The Role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. *Plants* 5(3). doi: 10.3390/plants5030033.
- Lodeiro, A.R. 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Rev. Argent. Microbiol.* 47(3): 261–273. doi: 10.1016/J.RAM.2015.06.006.
- MAGAP. 2013. Mapa Ecológico de la provincia de Pichincha, Escala 1:50.000, Año 2004. SIGTIERRAS | MAG. Disponible en: <https://online.fliphtml5.com/wtae/rnjm/#p=1>
- Mahmud, K., S. Makaju, R. Ibrahim, and A. Missaoui. 2020. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants* 9(1): 1–17. doi: 10.3390/plants9010097.
- Maróti, G., and E. Kondorosi. 2014. Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front Microbiol.* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00326.
- Martínez-Scott, M.M., A. Hernández-Hernández, J. Palomo-Gil y J. Vásquez-Arroyo. 2002. Diversidad genética de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 3(1): 9–18. https://www.researchgate.net/publication/373157502_DIVERSIDAD_GENETICA_DE_RHIZOBIA_ASOCIADA_A_CUATRO_LEGUMINOSAS_ARBOREAS_DEL_NORESTE_DE_MEXICO
- Masson-Boivin, C., E. Giraud, X. Perret, and J. Batut. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17(10). doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004.
- Matos, G., y D. Zúñiga. 2003. Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Ecología Aplicada* 2(1): 81–85. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v2n1/a12v2n1.pdf>
- Mohr, E.C.J., and R.L. Pendleton. 1944. The soils of equatorial regions. *Soil Science* 58(5): 410. https://journals.lww.com/soilsci/citation/1944/11000/the_soils_of_equatorial_regions.11.aspx
- Monroy-Guerrero, M., M. Memenza-Zegarra, N. Taco, E. Mostacero, K. Ogata-Gutiérrez, et al. 2022. Co-Inoculation of *Bradyrhizobium* spp. and *Bacillus* sp. on Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) in the High Andean Region of Peru. *Agronomy* 12(9): 2132. doi: 10.3390/AGRONOMY12092132/S1.
- Morales, P. 2011. El coeficiente de correlación. Universidad Rafael Landívar, Guatemala. https://ice.unizar.es/sites/ice.unizar.es/files/users/leteo/materiales/01._documento_1_correlaciones.pdf
- Morales-Morales, E., M. Rubí-Arriaga, J. López-Sandoval, A. Martínez-Campos y E. Morales-Rosales. 2019. Urea (NBPT) una alternativa en la fertilización nitrogenada de cultivos anuales. *Rev. Mex. de Cienc. Agric.* 10(8): 1875–1886. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1732>
- Moreira, F. 2012. Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. p. 177–216. En: Moreira, F., Huising, J., and D. Bignel, editores, *Manual de Biología de Suelos Tropicales*. 1ra ed. Instituto Nacional de Ecología, Coyoacán, México. [https://books.google.com.co/books?id=m-QMZAiP0YC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=falseMpeperekereki,S.,A.G.Wollum,andF.Makonese.1996.GrowthtemperaturecharacteristicsofindigenousRhizobiumandBradyrhizobiumisolatesfromZimbabweansoils.SoilBiol.Biochem.28\(10-11\):1537-1539.doi:10.1016/S0038-0717\(96\)00140-X](https://books.google.com.co/books?id=m-QMZAiP0YC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=falseMpeperekereki,S.,A.G.Wollum,andF.Makonese.1996.GrowthtemperaturecharacteristicsofindigenousRhizobiumandBradyrhizobiumisolatesfromZimbabweansoils.SoilBiol.Biochem.28(10-11):1537-1539.doi:10.1016/S0038-0717(96)00140-X)

- Mulas García, R., F. González Andrés, J. Brañas Lasala y D. Mulas García. 2018. Un fertilizante mineral complejo que comprende el microorganismo *Rhizobium leguminosarum*, procedimiento de producción y usos del mismo. P. 1–17. Patente de inventor Nro: ES2687810T3, España. <https://patentimages.storage.googleapis.com/28/75/23/65619860d59322/ES2687810T3.pdf>
- Muñoz-Rojas, J., Y.E. Morales-García, A. Baez-Rogelio, V. Quintero-Hernandez, A.P. River-Urbalejo, et al. 2016. Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora de México. Science Associated Editors L.L.C, Cheyenne, Estados Unidos de América. p. 65–82. DOI 10.5281/zenodo.5525234
- Mus, F., M.B. Crook, K. Garcia, A. Garcia Costas, B.A. Geddes, et al. 2016. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(13). doi: 10.1128/AEM.01055-16.
- Nag, P., S. Shriti, and S. Das. 2020. Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. *J. Appl. Microbiol.* 129(2). doi: 10.1111/jam.14557.
- Oono, R., and R.F. Denison. 2010. Comparing symbiotic efficiency between Swollen versus nonswollen Rhizobial bacteroids. *Plant Physiol.* 154(3): 1541. doi: 10.1104/PP.110.163436.
- Pankiewicz, V.C.S., T.B. Irving, L.G.S. Maia, and J.M. Ané. 2019. Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. *BMC Biol.* 17(1). doi: 10.1186/s12915-019-0710-0.
- Peters, N.K., J.W. Frost, and S.R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* (1979) 233(4767): 977–980. DOI: 10.1126/science.3738520
- Van Sambeek, J.W., and H.E. Garrett. 2004. Ground cover management in walnut and other hardwood plantings. In: Michler, C.H.; Pijut, P.M.; Van Sambeek, J.W.; Coggeshall, M.V.; Seifert, J.; Woeste, K.; Overton, R.; Ponder, F., Jr., eds. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium; Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station. P. 85-100. <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/14714>
- Sánchez, P. 1976. Properties and Management of soils in the Tropics. Wiley Interscience: 162-172. <https://doi.org/10.1017/9781316809785>
- Shameem, R., M.I. Sonali, P. Senthil, G. Rangasamy, K. Veena, et al. 2023. *Rhizobium mayense* sp. Nov., an efficient plant growth-promoting nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere soil. *Environ. Res.* 220: 115200. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115200>.
- Suárez, R., A. Wong, M. Ramírez, A. Barraza, M.D.C. Orozco, et al. 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(7): 958–966. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0958.
- Tesi, M., T. Pfau, A. Mengoni, and M. Fondi. 2020. Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nat. Commun.* 11(1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16484-2>
- Toledo, J.H. 2003. Cultivo de la Vainita. Instituto Nacional de Investigación Agraria, Lima, Perú. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/865/1/Toledo-Cultivo_vainita.pdf
- Torres Gutiérrez, R. 2008. Phytostimulatory effect of Rhizobium and plant growth promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. [Thesis prior to obtaining the degree of PhD in Bioengineering], Katholieke Universiteit Leuven. <https://www.researchgate.net/publication/28360611>.
- Viçosi, K.A., N. Peixoto, and A. Pelá. 2020. Response of snap bean cultivars of determined growing to inoculation with *Rhizobium tropici*. *Agrarian* 13(49): 352–361. doi: 10.30612/agrarian.v13i49.10335.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Walker, L., B. Lagunas, and M.L. Gifford. 2020. Determinants of host range specificity in Legume-Rhizobia symbiosis. *Front Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.585749.
- Zehetner, F., W.P. Miller, and L.T. West. 2003. Pedogenesis of volcanic ash soils in Andean Ecuador. *Soil Science Society of America Journal* 67(6): 1797–1809. https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACU698.pdf
- Zhang, X., Q. Fang, T. Zhang, W. Ma, G.L. Velthof, et al. 2020. Benefits and trade-offs of replacing synthetic fertilizers by animal manures in crop production in China: A meta-analysis. *Global Change Biology* 26(2). doi: 10.1111/gcb.14826.