

# BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias · Universidad del Cauca

## **PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LÍNEA**

El Comité Editorial de Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial informa que este manuscrito ha cumplido los requisitos editoriales y científicos y ha sido aprobado para publicación, con base en los conceptos emitidos por los pares evaluadores. Se publica anticipadamente, en versión pdf, de manera provisional, con base en la última versión electrónica del manuscrito y sin haber sido sometido a los procesos de edición, diagramación y corrección de estilo.

La versión anticipada de este manuscrito puede ser descargada, usada y citada, aclarando que la versión definitiva que se va a encontrar en la plataforma de la revista, puede diferir de ésta e aspectos de forma.

# Selección de rizobios eficientes en líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes a sequía\*

## Selection of efficient rhizobia in lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) drought tolerant

CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO<sup>1</sup>; SUÁREZ-FRAGOZO, ELVA-CECILIA<sup>2</sup>; AGUIRRE-PÉREZ, LAURA<sup>3</sup>; GÓMEZ-RAMÍREZ, LUIS-FERNANDO<sup>4</sup>; TOFIÑO-RIVERA, ADRIANA-PATRICIA<sup>5</sup>

### RESUMEN

El rendimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se ve limitado por condiciones de sequía prolongada y escasez de nutrientes en el suelo. La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) seleccionó cinco genotipos de frijol común por presentar características de biofortificación, buen tamaño de grano y tolerancia al déficit hídrico, sin embargo, se requiere técnicas sostenibles que contribuyan a la adaptación de estos genotipos, y mitiguen el impacto de la sequía y escasez de nutrientes en la producción de este cultivo. Las

---

\*Proyecto de origen: "Obtención de variedades para uso comercial o de economía campesina de frijoles tolerantes a la sequía bajo sistemas de producción sostenibles en el Caribe colombiano". Financiación: Iniciativa de Cooperación para la Alimentación y la Agricultura Corea-América Latina (KoLFACI)

<sup>1</sup> Universidad Popular del Cesar, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Becario Postdoctoral Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- Agrosavia, C.I. Motilonia. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3391-420X>

<sup>2</sup> Universidad Popular del Cesar, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Estudiante de Microbiología. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6084-5150>

<sup>3</sup> Universidad Popular del Cesar, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Estudiante de Maestría en Microbiología Agrícola e Industrial. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-5240-2149>

<sup>4</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia C.I Motilonia. <https://orcid.org/0000-0001-9847-0606>

<sup>5</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia C.I Motilonia <https://orcid.org/0000-0001-7115-7169>

Correspondencia: [juancubillos@unicesar.edu.co](mailto:juancubillos@unicesar.edu.co)

### Cómo citar este artículo

CUBILLOS-HINOJOSA JUAN GUILLERMO; SUÁREZ-FRAGOZO ELVA CECILIA, AGUIRRE-PÉREZ LAURA; GÓMEZ-RAMÍREZ LUIS FERNANDO; TOFIÑO-RIVERA ADRIANA PATRICIA. Selección de rizobios eficientes en líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes a sequía. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 21, n. 2, 2023, p. xx-xx. Doi:

### Historial del artículo

Recibido para evaluación: 13 de Junio 2022

Aprobado para publicación: 23 de Marzo 2023

rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son una alternativa para mejorar la absorción de nutrientes y la adaptación de las plantas a condiciones adversas. En este trabajo se evaluó la eficiencia de rizobios en la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en los genotipos de frijol común seleccionados. Se tomaron muestras de suelo en la rizósfera y raíces de los cinco genotipos de frijol en el Centro de Investigación Motilonia, como también dos muestreos alternativos en otras zonas del departamento del Cesar. Se utilizaron las semillas de frijol como trampa para obtener nódulos en el laboratorio. También se evaluó la nodulación y la FBN de 11 cepas del banco de AGROSAVIA en los cinco genotipos de frijol y se midió la eficiencia simbiótica de 7 de las cepas en cuatro de los genotipos. Se obtuvieron 3 aislados con características de rizobios, simbioses del genotipo 77-SMG22. Las cepas más eficientes en la FBN fueron la P17 y P22 en el genotipo 45-HTA10-2, las cepas C229 y P37 en el 48-HTA14-1, en el genotipo 56-DAB295 todas las cepas simbioses fueron eficientes (C229, P03, P22 Y P37), y en el genotipo 77-SMG22 el tratamiento más eficiente fue el inoculante comercial Rhizobiol®. Por tanto, las cepas del banco de AGROSAVIA promueven el desarrollo de algunos genotipos de frijol común reflejado en el crecimiento de las plantas.

**PALABRAS CLAVES:** *Phaseolus vulgaris* L.; Déficit hídrico; Estrés abiótico; Nodulación; Fijación biológica de nitrógeno; Leguminosas; Fertilización inorgánica; Rizobacterias; Rizobios; Biofertilización,

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) yield is limited by prolonged drought conditions and nutrients scarcity in the soil. The Colombian Agricultural Research Corporation (AGROSAVIA) selected five common bean genotypes for presenting biofortification characteristics, good grain size and water deficit tolerance, however, sustainable techniques are required that contribute to the adaptation of these genotypes, and mitigate the impact of drought and nutrient scarcity on the crop production. Plant growth promoting rhizobacteria is an alternative to improve nutrients absorption and plants adaptation to adverse conditions. In this work, the efficiency of rhizobia in biological nitrogen fixation (BNF) in selected common bean genotypes was evaluated. Soil samples were taken in the rhizosphere and roots of the five bean genotypes at the Motilonia Research Center, as well as two alternative samplings in other areas of the Cesar department. Bean seeds were used as a trap to obtain nodules in the laboratory. The nodulation and biological nitrogen fixation of 11 strains from the AGROSAVIA bank in five bean genotypes were evaluated and the symbiotic efficiency of 7 of the strains in four of the genotypes was measured. Three isolates with rhizobia characteristics, symbionts of the 77-SMG22 genotype, were obtained. The most efficient strains in BNF were P17 and P22 in genotype 45-HTA10-2, strains C229 and P37 in 48-HTA14-1, in genotype 56-DAB295 all symbiont strains were efficient (C229, P03, P22 and P37), and in the 77-SMG22 genotype the most efficient treatment was the commercial inoculant Rhizobiol®. Therefore, the strains from the AGROSAVIA bank promote the development of some common bean genotypes reflected in the growth of the plants.

**KEYWORDS:** *Phaseolus vulgaris* L.; Water deficit; Abiotic stress; nodulation; Biological nitrogen fixation; Legumes; Inorganic fertilization; Rhizobacteria; Rhizobia; Biofertilization.

## INTRODUCCIÓN

El frijol común (*P. vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de mayor importancia en términos de consumo directo en países en desarrollo. Constituye un alimento con alto contenido proteico, cubriendo la creciente necesidad de proteínas de millones de personas en todo el mundo. Además, aporta carbohidratos, vitaminas y minerales, principalmente hierro y zinc (Nadeem et

*al.*, 2021) es utilizado como forraje para la alimentación animal y para mejorar la calidad del suelo gracias a su capacidad para establecer asociaciones con bacterias que pueden fijar el nitrógeno atmosférico (Alemnéh *et al.*, 2020)

En 2020 los países asiáticos tuvieron la mayor área cosechada de frijoles en el mundo con 18.867.971 ha, seguido de África (8.464.013 ha) y América (7.169.372 ha). No obstante, Europa tuvo un mayor rendimiento (2,04 t.ha<sup>-1</sup>) seguido por América (1,13 t.ha<sup>-1</sup>) ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAOSTAT, 2021).

En Colombia, de acuerdo con estadísticas de la Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano (Agronet, 2020) el área cultivada de frijol fue de 6.313.75 ha, con una producción de 8.468,26 t y un rendimiento de 1,34 t.ha<sup>-1</sup>. La Región Caribe participa con el 21 % del área cultivada con 9.712 ha y el 13,9 % de la producción nacional con 7.510 t. Dentro de esta región, el departamento con mayor superficie es el Cesar, con 3.341,04 ha y una producción de 2.392,25 t, seguido de Bolívar con 2.472 ha y una producción de 2.178 t.

En el frijol, al igual que en la mayoría de las leguminosas de grano, los rendimientos unitarios no se han podido incrementar en los últimos años pese al esfuerzo de los programas de mejoramiento (Debouck *et al.*, 2021). De hecho, se proyecta que diferentes zonas de América Latina, donde el frijol común es un alimento básico fundamental, reducirán las áreas de cultivo debido a diversos factores bióticos y abióticos asociados a la variabilidad climática (Jiménez, 2019) lo que afectará la seguridad alimentaria de millones de personas cuya supervivencia y nutrición depende de esta leguminosa (Losa *et al.*, 2022). Estos factores (que incluyen condiciones de déficit hídrico, altas temperaturas, limitantes del suelo y la incidencia de fitopatógenos, entre otros) conllevan a procesos de estrés en las plantas que limitan considerablemente su desarrollo, lo cual se ve reflejado en rendimientos medios de frijol por debajo de 1 t.ha<sup>-1</sup> en la mayoría de los países tropicales, incluido Colombia (Beebe, 2012).

A fin de superar estas limitaciones El Centro Internacional De Agricultura Tropical (CIAT), en el programa de mejoramiento del frijol ha desarrollado múltiples poblaciones derivadas de cruces interespecíficos *Phaseolus vulgaris* X *P. acutifolius* tolerantes al calor para mejorar la productividad del frijol común en áreas cálidas y secas (Suarez *et al.*, 2020). Ahora, desde la alianza con La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), se abre la posibilidad de evaluar estas poblaciones avanzadas en las condiciones agroecológicas del Caribe seco para la identificación de genotipos de alta adaptación a zonas planas con sequía estacional (Burbano-Erazo *et al.*, 2021)

Para facilitar la adaptación del nuevo germoplasma a estas condiciones, y asegurar una eficiente absorción de nutrientes se busca la implementación de técnicas agrícolas modernas, que sean eficientes y sostenibles. Los nuevos cultivares a obtener, requieren un modelo de manejo productivo que mitigue de alguna forma el impacto del estrés abiótico y la deficiencia nutricional característica en suelos de bajo contenido de materia orgánica sobre la producción de grano y la huella de carbono en la producción de proteína vegetal (Aguilera *et al.*, 2020).

El uso de inoculantes biológicos a base de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) constituye una alternativa promisoriosa para reducir los efectos negativos del estrés abiótico en el cultivo de frijol y mejorar su adaptación a estas condiciones (Steiner *et al.*, 2020). Las PGPR tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante mecanismos como estimulación del sistema antioxidante de la planta, producción de sideróforos, fijación simbiótica de nitrógeno y producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal (Sambangi *et al.*, 2021; Guzmán-Duchen y Montero-Torres, 2021). Dentro

de las PGPR, los rizobios son uno de los grupos más estudiados, los cuales se asocian de manera endosimbiótica con las plantas leguminosas formando nódulos radicales donde se lleva a cabo la FBN (Bianco, 2020).

Las condiciones de sequía prolongada y altas temperaturas afectan la nodulación en las plantas leguminosas (Villanueva, 2021), por lo que se requiere la identificación de cepas de rizobios eficientes bajo estas condiciones, capaces de asociarse simbióticamente con genotipos de alta productividad que posibiliten el desarrollo sostenible de este cultivo. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de rizobios en la estimulación del crecimiento vegetal de genotipos de frijol tolerantes a sequía, bajo condiciones controladas.

## MÉTODO

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación Motilona (AGROSAVIA), ubicado a 10° 0' de latitud norte y 73° 14' de longitud oeste en el municipio de Agustín Codazzi (microrregión Valle del Cesar), caracterizado por presentar una temperatura promedio anual de 28,7 °C, humedad relativa de 60 % y una precipitación anual promedio de 1.585 mm. El material vegetal evaluado correspondió a cinco líneas de frijol común provenientes de cruces interespecíficos para tolerancia a sequía, procedentes del banco de germoplasma del (CIAT), identificadas como: 45-HTA10-2, 48-HTA14-1, 55-G122, 56-DAB295 y 77-SMG22.

### Aislamientos y cepas de rizobios

Los aislamientos de rizobios evaluados en este estudio fueron obtenidos a partir de muestras de raíces y suelo rizosférico tomadas a una profundidad de 0-20 cm en un cultivo de frijol establecido en el C.I. Motilonia (AGROSAVIA) y en zonas montañosas no intervenidas, con leguminosas silvestres como vegetación nativa, ubicadas en los municipios de Valledupar y San Diego, departamento del Cesar (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Localización de muestreo de suelo rizosférico y raíces tomadas en el departamento del Cesar para el aislamiento de rizobios nativos.

Ubicación	Coordenadas	Altitud (msnm)	Características del lugar de muestreo
CI Motilonia, Agustín Codazzi (Cesar)	10°00'N y 73°14'W	110	Cultivo de frijol común ( <i>P. vulgaris</i> L.)
Vía a Valencia de Jesús, Valledupar (Cesar)	10°18'N y 73°24'W	150	Zona montañosa con leguminosas silvestres como vegetación nativa
Media Luna, San Diego (Cesar)	10°19'N y 73°10'W	160	Zona montañosa con leguminosas silvestres como vegetación nativa

Las muestras de raíz y suelo fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA) de la Universidad Popular del Cesar, donde fueron procesadas con el fin de aislar los rizobios. En vista de que no hubo presencia de nódulos en las raíces, 10 g de cada muestra de suelo fueron homogenizados en 90 mL de solución salina estéril (0,85 % p/v) y sometidos a agitación a 430 rpm durante 3 horas (Cubillos *et al.*, 2021).

El aislamiento de rizobios a partir de estas muestras consistió en usar semillas de plantas de los genotipos del frijol en estudio como trampa separadamente, para obtener nódulos bajo condiciones controladas de laboratorio. Para ello, las semillas fueron desinfectadas siguiendo la metodología sugerida por Vincent (1970). Brevemente, fueron suspendidas en alcohol al 70 %

por 30 segundos, enjuagadas con agua destilada estéril y seguidamente suspendidas en hipoclorito de sodio al 3,5 % durante 30 segundos. Finalmente, fueron lavadas seis veces más con agua destilada estéril, y sembradas por separado en macetas de plástico con vermiculita y arena en proporción 2:1 como sustrato de crecimiento. Las semillas fueron inoculadas con 10 mL de las suspensiones de suelo obtenidas previamente. Durante el proceso de crecimiento, las macetas fueron regadas con una solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada por Silveira *et al.* (1998), y conservadas bajo condiciones controladas de laboratorio.

Pasados 30 días desde la siembra, las plantas fueron retiradas del sustrato sin dañar el sistema radicular con el fin de extraer los nódulos presentes, los cuales se desinfectaron en alcohol al 70 % por 30 segundos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 30 segundos, y lavados finalmente con agua destilada estéril siete veces. En la cabina de flujo laminar los nódulos fueron macerados en tubos de ensayo con agua destilada estéril, utilizando un agitador de vidrio. Finalmente, la suspensión obtenida de los nódulos se sembró en cajas con Agar Levadura Manitol con adición de rojo congo (LMA+RC) (Vincent, 1970) utilizando el método de microgota y agotamiento por estría.

Las cajas fueron incubadas a  $28 \pm 2$  °C durante 10 días, realizando un seguimiento diario del crecimiento de colonias con características propias de rizobios, las cuales fueron transferidas por medio de siembra en estría a nuevas cajas con LMA+RC y almacenadas en condiciones de refrigeración a 3°C (Cubillos *et al.*, 2021).

Por otra parte, también se evaluaron 11 cepas de rizobios de la Colección de Microorganismos con Interés Biofertilizante (CMIB) de AGROSAVIA, pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, aislados a partir de *Phaseolus* sp., *P. vulgaris* y *Vigna sinensis* (Cuadro 2), y el bioproducto Rhizobiol® de AGROSAVIA a base de las cepas ICA J-01 e ICA J-96 de *Bradyrhizobium japonicum* ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), registrado para el cultivo de soya.

**Cuadro 2.** Cepas de rizobios de la colección de microorganismos con interés Biofertilizantes-CMIB de AGROSAVIA, evaluadas en este estudio.

Código	Origen	Especie
C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281
C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>
P03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10
P17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>
P19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899
P22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10
P25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.
P26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sulae</i>
P29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii
P37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460
P40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>

## Caracterización morfológica de rizobios

Los aislados bacterianos obtenidos y las cepas de la CMIB fueron caracterizados a nivel macroscópico teniendo en cuenta parámetros morfológicos de las colonias, como diámetro, color, tipo de borde, consistencia y tiempo de crecimiento (Hernández *et al.*, 2012). También fueron caracterizados a nivel microscópico en términos de morfología, agrupación y reacción a la tinción de Gram de las células (Cubillos *et al.*, 2021, Hernández *et al.*, 2012). Además, se evaluaron los cambios de pH en medio Agar Levadura Manitol con azul de bromotimol (LMA+AB) (Cubillos *et al.*, 2021, Hernández *et al.*, 2012). Las colonias aisladas fueron conservadas en cajas con Agar Levadura Manitol LMA en refrigeración (Vincent, 1970).

### **Autenticación simbiótica de cepas de rizobios de la CMIB de AGROSAVIA en genotipos de frijol**

Se midió la capacidad de nodulación y actividad de leg-hemoglobina de las 11 cepas de rizobios de la CMIB de AGROSAVIA pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* (Cuadro 2), y del bioproducto Rhizobiol<sup>®</sup> a base de las cepas ICA J-01 e ICA J-96 de *Bradyrhizobium japonicum*. Para ello, suspensiones concentradas de células de cada cepa fueron preparadas y ajustadas con agua destilada estéril a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> por el método de la gota.

Las semillas de frijol de cada genotipo (45-HTA10-2, 48-HTA14-1, 55-G122, 56-DAB295, 77-SMG22), previamente desinfectadas utilizando la metodología de Vincent (1970), se sembraron en macetas de plástico con 500 g de una mezcla de vermiculita y arena estéril (2:1) estéril, luego todos los genotipos fueron inoculados con 1 mL de cada suspensión bacteriana de cada cepa, En el caso del bioproducto Rhizobiol<sup>®</sup>, fue aplicado en la semilla 1 mL en concentración de  $1 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>, la cual previamente fue verificada por el método de la gota (Goulart *et al.*, 2016). Se utilizaron tres réplicas experimentales por cada tratamiento, que corresponden a cada una de las cepas evaluadas en cada genotipo.

Después de la germinación de las semillas, las plántulas fueron dejadas en crecimiento bajo condiciones controladas de laboratorio por un periodo de 30 días, durante los cuales se realizó aplicación semanal de una solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada por (Silveira *et al.*, 1998) exenta de nitrógeno (N). Transcurridos los 30 días posteriores a la inoculación, las plantas fueron extraídas con el fin de observar la formación de nódulos, los cuales fueron posteriormente lavados y cortados para verificar la producción de leghemoglobina por la actividad de enzima nitrogenasa, por medio de la coloración rojiza observada en el interior del nódulo, lo que indica que el proceso de fijación biológica de nitrógeno se encuentra activo (Cubillos *et al.*, 2021).

### **Evaluación de la eficiencia en la fijación de nitrógeno de cepas de la CMIB en genotipos de frijol**

Para este ensayo se seleccionaron los tratamientos que en el experimento anterior formaron nódulos en los genotipos con actividad leg-hemoglobina positiva que se obtuvieron en el experimento anterior. La preparación de inóculos y desinfección e inoculación de semillas de frijol se realizó como se indicó previamente. Las semillas fueron plantadas en macetas de plástico con 900 g de una mezcla de vermiculita y arena (2:1) e inoculadas con 2 mL de las suspensiones bacterianas y/o el bioproducto ajustados a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Como controles del experimento, se implementaron dos tratamientos no inoculados, uno sin nitrógeno (Control-N) y el segundo con adición de nitrógeno (Control+N) a una dosis equivalente a 100 kg.ha<sup>-1</sup> en forma de nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), tomando como referencia

las recomendaciones del modelo productivo de frijol rojo para el Caribe seco (Rozo-Leguizamon *et al.*, 2018). Esta dosis de N se agregó en aplicaciones semanales de 10 mL de una solución de 4,28 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> durante el desarrollo del experimento. Se utilizaron tres réplicas experimentales por cada tratamiento, establecidas en un diseño en bloques completos al azar.

Después de 30 días de crecimiento, se recolectaron las plantas separando la parte aérea del sistema radicular. Se determinó la masa fresca y seca de parte aérea (MSPA) y raíz (MSR), así como el número de nódulos. La biomasa aérea fue triturada y depositada en tubos Eppendorf de 2 mL para la determinación de nitrógeno-N. Por último, se calculó el índice de eficiencia relativa (IER) teniendo en cuenta la fórmula descrita por Brockwell *et al.* (1966).

$$IER = \frac{NT - (NT - N)}{(NT + N) - (NT - N)} \times 100 \quad (Ec. 1)$$

Donde:

NT = nitrógeno total de la planta con tratamiento inoculado.

NT-N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado y sin adición de nitrógeno

NT+N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado con adición de nitrógeno.

### **Análisis estadístico**

Los datos experimentales fueron sometidos primero a test de normalidad y homogeneidad de varianza para cada variable y luego al análisis de varianza (ANOVA) usando un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el test de Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS 15.

## **RESULTADOS**

### **Nodulación de raíces en genotipos de frijol común tolerantes a sequía establecidos en campo**

Las muestras de raíces de frijol común tomadas en el C.I. Motilonia en los cinco genotipos no presentaron nódulos, posiblemente se deba a que no hay rizobios nativos específicos con los que puedan asociarse simbióticamente o debido a la influencia de factores que limitan este proceso. La asociación simbiótica y la nodulación depende del genotipo de la planta, la bacteria y las condiciones ambientales o del suelo (Torres-Gutiérrez *et al.*, 2021), las condiciones ambientales estresantes limitan los procesos de nodulación afectando negativamente la simbiosis rizobio-leguminosa (Shankar *et al.*, 2021; Villanueva, 2021). Otra posible explicación puede ser la disponibilidad de nitrógeno en el cultivo, ya que en este ensayo las plantas fueron fertilizadas teniendo en cuenta la deficiencia de nitrógeno en el suelo y los requerimientos del cultivo, cuya fertilización incluyó fuentes nitrogenadas. En suelos con deficiencia de nitrógeno hay una mayor necesidad de simbiosis planta-rizobio, debido a la necesidad de este elemento, contrario a ello su disponibilidad limita la nodulación y fijación biológica de nitrógeno (Reinprecht *et al.*, 2020; Rojas y Cordero, 2021).

### **Aislamiento de rizobios nativos de suelos del Departamento del Cesar**

**Nodulación.** Los resultados obtenidos en este experimento mostraron una baja nodulación en general de los genotipos estudiados (Cuadro 3); fue posible observar colonias típicas de

rizobios al inocular muestras de los suelos en cajas con medio LMA+RC, sin embargo, no fueron simbioses de estas plantas.

**Cuadro 3.** Nodulación en genotipos de frijol común (*P. vulgaris*) inoculados con suspensiones de suelos obtenidos en tres localidades del departamento del Cesar.

Lugar de muestreo	Genotipo de <i>P. vulgaris</i>	Nodulación
CI Motilonia, Agustín Codazzi (Cesar)	45-HTA10-2	-
	48-HTA14-1	-
	55-G122	-
	56-DAB295	-
	77-SMG22	-
Vía a Valencia de Jesús, Valledupar (Cesar)	45-HTA10-2	-
	48-HTA14-1	-
	55-G122	-
	56-DAB295	-
	77-SMG22	-
Media Luna, San Diego (Cesar)	45-HTA10-2	-
	48-HTA14-1	-
	55-G122	-
	56-DAB295	-
	77-SMG22	+

\*- Nodulación negativa, +nodulación positiva.

A pesar de considerarse a *Phaseolus vulgaris* como un género de leguminosas promiscuo (Shamseldin y Velázquez, 2020), en este experimento hubo una baja simbiosis; solo en el genotipo 77-SMG22 inoculado con suelo de Media Luna (Cesar) hubo formación de nódulos activos (Cuadro 3), una posible explicación a ello pueden ser el hecho de que la distribución y el genotipo de la leguminosa influyen en la existencia y prevalencia de rizobios en el suelo, como también las asociaciones simbióticas que se establezcan (Shankar *et al.*, 2021). Dos de los suelos muestreados provienen de regiones no intervenidas en las que no se ha cultivado frijol común, cuyas especies vegetales nativas tal vez mantengan otra diversidad de rizobacterias en el suelo.

### Caracterización de las colonias

Luego de la prospección de los nódulos se obtuvieron tres aislamientos con características propias de rizobios, clasificados como 7701, 7702 y 7703 (Cuadro 4), todos tuvieron un periodo de crecimiento corto (24 h), presentaron forma, borde, elevación y consistencia igual, solo uno de los aislados (7703) presentó coloración blanca a diferencia de los otros dos que se tornaron de color rosado en LMA+RC. En todos los tubos se evidenció la producción de ácido en LMA+AB.

**Cuadro 4.** Características fenotípicas de aislados simbioses obtenidos de nódulos del genotipo 77-SMG22.

Aislamiento	Forma	Borde	Elevación	Color en LMA+RC	Opacidad	Consistencia	Tiempo de crecimiento (horas)	Tamaño (mm)	Reacción acida/alcalina a LMA+AB
7701	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Brillante	Acuosa	24	3,0	Ácida
7702				Rosada	Brillante	Acuosa	24	2,0	Ácida
7703				Blanca	Brillante	Acuosa	24	2,5	Ácida

LMA+RC (Agar Levadura Manitol con Rojo Congo), LMA+AB (Agar Levadura Manitol con Azul de bromotimol).

La morfología de los aislados es característica del grupo rizobios según describen Somasegaran y Hoben (1992). Estos resultados son similares a otros reportados en la literatura donde se obtuvo rizobios con estas características fenotípicas, simbioses de frijol común (Wekesa *et al.*, 2021) y frijol lima (*Phaseolus lunatus*) (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2021). Los tres aislados crecieron a las 24 h, esto los ubica en el grupo de rizobios de crecimiento rápido, además, presentaron forma convexa, borde regular, superficie lisa y producción de ácido en LMA+AB; características son propias del género *Rhizobium*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Valero *et al.*, (2021) quienes clasificaron aislados simbioses de frijol caupí en el departamento de la Guajira con estas características presuntivas de *Rhizobium* sp.

### Evaluación de las cepas de la CMIB

En la caracterización fenotípica de las cepas obtenidas de la CMIB de AGROSAVIA (Cuadro 5) se observó que todas las cepas presentaron forma redonda, borde regular y elevación convexa. Las cepas del género *Rhizobium* (C229, P03, P17, P19, P22, P25, P26 y P29) tuvieron un tiempo de crecimiento de dos días, siete de ellas formaron colonias de color rosa en LMA+RC a diferencia de la cepa C229 cuyas colonias fueron blancas. La cepa C74 corresponde a *Bradyrhizobium liaoningense* strain 2281, fue de crecimiento más lento (5 días) al igual que la cepa P37 (*Mesorhizobium qingshengii* strain CCBAU 33460), además las dos formaron colonias blancas. Se observó que siete de las ocho cepas del género *Rhizobium* tuvieron una reacción ácida en LMA+AB, por otro lado, para la cepa del género *Bradyrhizobium* (C74) y *Mesorhizobium* (P37) la reacción fue alcalina en esta prueba, además estas dos últimas cepas son de crecimiento lento, a diferencia de las cepas del género *Rhizobium* que presentaron un crecimiento rápido. Estos resultados son acordes con las características fenotípicas reportadas para estos géneros de rizobios por Somasegaran y Hoben (1992).

### Características de las colonias

**Cuadro 5.** Características fenotípicas, tipo de crecimiento en LMA+RC, reacción alcalina o ácida en medio LMA+AB de cepas del banco de AGROSAVIA

Cepa	Formar	Borde	Elevación	Color ALMR	Opacidad	Consistencia	Tiempo de crecimiento (días)	Tamaño (mm)	Reacción ácida/alcalina LMA+AB
C74	Redonda	Regular	Convexa	Blanca		Acuosa	5	1	Alcalina
C229				Blanca	Brillante	Acuosa	2	1	Ácida
P03				Rosa	Brillante	Acuosa	2	2	
P17				rosa	Brillante	Acuosa	2	1,5	
P19				Crema-Rosa	Brillante	Acuosa	2	2	
P22				rosa	Brillante	Acuosa	2	3	
P25				Rosa	Brillante	Gomosa	2	2	
P26				Rosa	Brillante	Gomosa	2	2	
P29				Rosa	Brillante	Acuosa	2	1	Alcalina
P37				Blanca	Brillante	Acuosa	5	1	Alcalina
P40	ND								

\*LMA+RC (Agar Levadura Manitol con Rojo Congo), LMA+AB (Agar Levadura Manitol con Azul de bromotimol). ND: No disponible, debido a que la cepa no creció.

### Autenticación simbiótica de cepas de rizobios de la CMIB de Agrosavia en los cinco genotipos de frijol tolerantes a sequía

La simbiosis de las cepas con los genotipos de frijol común fue determinada por la nodulación y actividad leg-hemoglobina evidenciada por la coloración rojiza al interior del nódulo, se encontró

que son simbioses del genotipo 45-HTA10-2 las cepas P17, P22 y P25. Del 48-HTA14-1 C229 y P37. Del 55-G122 la cepa C229, a su vez en el 56-DAB295 las cepas C229, P03, P22 y P37 y para el genotipo 77-SMG22 las P17, P19, P37 más el tratamiento con Rhizobiol® que presentó nódulos activos en este último genotipo (Cuadro 6).

En referencia a los genotipos 56-DAB295 y 77-SMG22, cuatro cepas formaron nódulos activos. Adicionalmente, las cepas C229 y P37 fueron capaces de formar nódulos activos en tres de los genotipos evaluados, se ha encontrado que la cepa C229 es una especie importante que forma nódulos en plantas de *P. vulgaris* L. (Martínez *et al.*, 1991; Bettioli *et al.*, 2020). La afinidad de las cepas por los genotipos puede ser el resultado de la compatibilidad entre los compuestos liberados por las semillas de frijol y la bacteria, ya que la simbiosis inicia con la liberación de exudados de raíces como azúcares y flavonoides, los cuales actúan como quimioatrayentes de rizobios e inductores de genes de nodulación (Patra y Mandal, 2022). Esto mismo, fue descrito por Vaishnav *et al.* (2017) que indicó que la simbiosis inicia con la liberación de exudados de raíces como azúcares y flavonoides, los cuales actúan como quimioatrayentes de rizobios e inductores de genes de nodulación.

**Cuadro 6.** Genotipos de frijol común inoculados con CMIB de AGROSAVIA, nodulación, actividad leghemoglobina

Genotipo	Cepa	Origen	Especie	Nodulación	Nódulos activos Fix *
45-HTA10-2	C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281	No	-
	C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	No	-
	P 03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	No	-
	P 17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Si	-
	P 19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	No	-
	P 22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	Si	+
	P 25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Si	+
	P 26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sulae</i>	Si	-
	P 29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	No	-
	P 37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460	Si	-
	P 40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	No	-
	Rhizobiol®	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	No	-
48-HTA14-1	C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281	No	-
	C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	Si	+
	P 03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	No	-
	P 17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Si	+
	P 19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	No	-
	P 22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	Si	-
	P 25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	NO	-
	P 26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sulae</i>	Si	-
	P 29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	No	-
	P 37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460	Si	+
	P 40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	No	-
	Rhizobiol®	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	No	-
55-G122	C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281	Si	-
	C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	Si	+
	P 03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	No	-
	P 17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	No	--
	P 19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	No	-
	P 22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	ND	
	P 25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	ND	
	P 26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sulae</i>	Si	-
	P 29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	No	-
	P 37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460	ND	
	P 40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	ND	
	Rhizobiol®	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	No	-
56-DAB295	C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281	No	-
	C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	Si	+
	P 03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	Si	+
	P 17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	No	-
	P 19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	Si	-
	P 22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	Si	+
	P 25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Si	-

	P 26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sllae</i>	Si	-
	P 29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	Si	-
	P 37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460	Si	+
	P 40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	No	-
	Rhizobiol®	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	No	-
77-SMG22	C74	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain 2281	No	-
	C229	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	Si	-
	P 03	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	No	-
	P 17	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Si	+
	P 19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> strain CIAT 899	Si	+
	P 22	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium pusense</i> strain NRCPB10	No	-
	P 25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	No	-
	P 26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium sllae</i>	No	-
	P 29	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	No	-
	P 37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> strain CCBAU 33460	Si	+
	P 40	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	No	-
	Rhizobiol®	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Si	+

\* La evaluación de la capacidad simbiótica de las cepas del Banco de AGROSAVIA fue determinada por la actividad de la leghemoglobina evidenciada por los nódulos siendo considerados fix (+) activos, fix (-) negativo. ND: No disponible, debido a que las semillas no germinaron.

### **Eficiencia simbiótica en la fijación de nitrógeno de cepas CMIB de Agrosavia en cuatro genotipos de frijol**

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los 4 genotipos estudiados en la prueba de eficiencia simbiótica (Cuadro 7).

El tratamiento con la cepa P17 (*Rhizobium phaseoli*) presentó contenido de MSPA igual que el tratamiento nitrogenado para los dos genotipos en las que se inoculó (45-HTA10-2 y 77-SMG22) (Cuadro 7). Según la literatura esta especie es una de las que forma nódulos en plantas de frijol común (Gunnabo *et al.*, 2021). Santoyo *et al.* (2021) demostraron que *P. vulgaris* respondió positivamente a la simbiosis con *R. phaseoli*, con coloración rojiza en los nódulos característica de la actividad Leghemoglobina, cuya proteína está relacionada con la FBN y el aumento del crecimiento de frijol común. De forma similar Aserse *et al.* (2020) reportaron que aumentó la biomasa y el rendimiento de grano en el cultivo de frijol común en simbiosis con *R. phaseoli* y lo describieron como un rizobio con potencial bioinoculante en condiciones de estrés por sequía.

El tratamiento con *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 (cepa P19) en el genotipo 77-SMG22 se encuentra por debajo del tratamiento nitrogenado en términos de MSPA (Cuadro 7), estos resultados difieren de varios reportados en la literatura, como es el caso de Milcheski *et al.* (2022) quienes reportan que esta cepa de *R. tropici* promovió mayor masa de nódulos viables y mayor acumulación de nitrógeno en la parte aérea de la planta de frijol. Pàdua-Oliveira *et al.* (2022) reportaron que un cultivar de frijol común respondió positivamente a la inoculación con

esta cepa alcanzando rendimientos similares a los logrados con la fertilización con 80 kg ha<sup>-1</sup> de N-urea.

En el genotipo 48-HTA14-1 la cepa C229 (*R. tropici*) tuvo una MSPA similar al tratamiento nitrogenado, mientras que en el 56-DAB295 fue significativamente superior (Cuadro 7), estos resultados reflejan que esta especie de rizobio estimuló el crecimiento de estos genotipos, Da Silva *et al.* (2020) obtuvieron en su estudio que la inoculación de las semillas con esta bacteria aumentó el número de vainas y el rendimiento del grano en el cultivo de frijol común

La cepa P22 (*Rhizobium pusense* strain NRCPB10) al inocularse en los genotipos 45-HTA10-2 y 56-DAB295, presentó igual MSPA que los tratamientos nitrogenados. Estos resultados se asemejan a los que reportó Costa *et al.* (2018) quienes aislaron e identificaron varios simbioses de frijol común que correspondían a esta cepa. La cepa P03 también corresponde a *R. pusense* strain NRCPB10 y solo fue simbiote del genotipo 56-DAB295, a diferencia de la P22 estuvo estadísticamente por encima del tratamiento nitrogenado en términos de MSPA.

Al inocular *Rhizobium* sp. (Cepa P25) en el genotipo 45-HTA10-2 se observó que la MSPA estuvo significativamente por debajo de tratamiento con adición de nitrógeno e igual que el control absoluto (Control-N) esto difiere de los resultados publicados por Granda *et al.* (2016) quienes al inocular frijol común con seis cepas de *Rhizobium* sp. observaron un aumento significativo de la MSPA de todas las cepas sobre el tratamiento control.

La cepa P37 (*Mesorhizobium qingshengii* strain CCBAU 33460) fue una de las que más genotipos infectó (48-HTA14-1, 56-DAB295 y 77-SMG22), y en todos los genotipos produjo MSPA iguales a los tratamientos que recibieron fertilización nitrogenada. Esta es una cepa que se aisló inicialmente de nódulos activos de *Astragalus sinicus* (Zheng *et al.*, 2013), y no hay estudios en la actualidad que la describan como simbiote de frijol común. Se ha encontrado que al menos 8 especies del género *Mesorhizobium* forman nódulos en una amplia variedad de leguminosas, una de las más importantes es el garbanzo (Gunnabo *et al.*, 2020)

El tratamiento con Rhizobiol® en el genotipo 77-SMG22 fue el más eficiente, se mantuvo por encima del tratamiento nitrogenado en contenido de MSPA, y fue el único genotipo donde se formaron nódulos por este tratamiento, cuyo bioinsumo es a base de *Bradyrhizobium japonicum*, un rizobio que ha mostrado ser eficiente en la nodulación y FBN en el cultivo de soja (Soto-Valenzuela *et al.*, 2021). Estos resultados contrastan con los encontrados por Angeles-Núñez y Cruz-Acosta (2015) quienes reportaron que *B. japonicum* no produce nódulos en frijol común. Sin embargo, este género de rizobios ha sido reportado como formador de nódulos en otra especie del género *Phaseolus* como es el caso de *P. lunatus* (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2021)

Con relación a la MSR se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los genotipos, por lo que es posible inferir que las cepas no estimularon el crecimiento radicular de las plantas estudiadas, a pesar de aumentar la MSPA.

Las cepas que tuvieron una acumulación de nitrógeno estadísticamente similar al Control+N fueron la P22 y P17 para el genotipo 45-HTA10-2, en el 48-HTA14-1 las P37 y C229, en el 56-DAB295 las P03, C229, P22 y P37 según la prueba de Tukey. Sin embargo, en el genotipo 77-SMG22 todos los tratamientos (Rhizobiol, P37, P17, y P19), de igual forma la cepa P25 en el genotipo 45-HTA10-2 estuvieron estadísticamente por debajo del Control+N. Es posible afirmar que el nitrógeno acumulado de los tratamientos resulta de la FBN realizada por las bacterias y el contenido de nitrógeno en la semilla para el caso de los tratamientos inoculados con las

cepas, y en el Control+N proviene de la fuente nitrogenada usada, en este caso nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )

El índice de eficiencia relativa (IER) muestra qué tan eficiente es la bacteria en la fijación biológica de nitrógeno al asociarse simbióticamente con plantas leguminosas (Brockwell *et al.*, 1966). Las cepas P03 y P22 corresponden a *R. pusense* strain NRCPB10, la P22 mostró ser eficiente en los genotipos 45-HTA10-2 y 56-DAB295 presentando un IER de 102,99% y 86,50% respectivamente y la P03 en el genotipo 56-DAB295 con un índice de 105,70 %. Por otro lado, la cepa P17 (*R. phaseoli*) tuvo un porcentaje de 87,67 en el genotipo 45-HTA10-2 y 59,74 % en el 77-SMG22, los porcentajes para esta cepa fueron inferiores al tratamiento Control+N, sin embargo, esta cepa es componente activo del único inoculante registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para el cultivo de frijol en Colombia y aplicado con el fin de mejorar la nutrición nitrogenada de las plantas (ICA, 2021).

La cepa P25 *Rhizobium* sp. tuvo un IER de 52.96%, en el genotipo 45-HTA10-2 estos resultados difieren de los reportados por López-Alcocer *et al.* (2020) quienes obtuvieron índices de eficiencia en la FBN por encima del 83 % de la simbiosis de diferentes cepas de *Rhizobium* sp. con una variedad de frijol común. Por otro lado, la cepa C299 (*R. tropici*) mostró ser eficiente en los dos genotipos con los que se asoció, el 48-HTA14-1 (93,26 %) y el 56-DAB295 (91,36 %), esto comprueba que esta especie formó nódulos efectivos en la FBN, tal como reportó Moura *et al.*, (2022).

*Mesorhizobium qingshengii* strain CCBAU 33460 (Cepa P37) presentó un IER alto en el genotipo 48-HTA14-1 con 91,93 %, seguido del genotipo 56-DAB295 con 82,23 %. La cepa P19 (*Rhizobium tropici* strain CIAT 899) obtuvo un IER de 59,58% en el genotipo 77-SMG22. Por último, el tratamiento Rhizobiol en el genotipo 77-SMG22 arrojó un IER de 76,33 %.

**Cuadro 7.** Valores promedio de MSPA, MSR, Nac e IER de los genotipos inoculados con 7 cepas de la CMIB de AGROSAVIA y Rhizobiol para el genotipo 77

Tratamientos	MSPA (g)	MSR (g)	N acumulado (mg)	IER %
45-HTA10-2 + p17	0,25 a	0,023 a	14,14 a	87,67
45-HTA10-2 + p22	0,26 a	0,028 a	16,45 a	102,99
45-HTA10-2 + p25	0,14 b	0,025 a	8,90 b	52,96
45-HTA10-2 + N	0,23 a	0,031 a	15,97 a	100,00
45-HTA10-2	0,10 b	0,035 a	0,93 c	0,00
48-HTA10-2 + C229	0,07 a	0,009 a	4,38 a	93,26
48-HTA14-1 + P37	0,06 a	0,013 a	4,32 a	91,93
48-HTA14-1 + N	0,06 a	0,009 a	4,66 a	100,00
48-HTA14-1	0,02 b	0,011 a	0,05 b	0,00
56-DAB295 + C229	0,26 b	0,040 a	13,21 a	91,36
56-DAB295 + P03	0,34 a	0,043 a	15,25 a	105,70
56-DAB295 + P22	0,21 bc	0,027 a	12,52 a	86,50
56-DAB295 + P37	0,19 bc	0,022 a	11,91 a	82,23
56-DAB295 + N	0,17 c	0,027 a	13,96 a	100,00
56-DAB295	0,06 d	0,024 a	0,23 b	0,00
77-SMG22 + P17	0,17 b	0,034 a	9,91 c	59,74

77-SMG22 + P19	0,12 c	0,021 a	9,89 c	59,58
77-SMG22 + P37	0,16 b	0,048 a	11,09 bc	66,97
77-SMG22 + Rhizobiol	0,23 a	0,018 a	12,62 b	76,33
77-SMG22 + N	0,18 b	0,016 a	16,48 a	100,00
77-SMG22	0,04 d	0,064 a	0,17 d	0,00

\*Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo con la prueba de Tukey con un  $\alpha=0,05$ .)45(genotipo 45-HTA10-2), 48(genotipo 48-HTA14-1), 56 (genotipo 56-DAB295), 77(77-SMG22), masa seca de la parte aérea (MSPA), masa seca de la raíz (MSR), nitrógeno acumulado (Nac), Índice de eficiencia relativa (IER)

El estudio de cepas de rizobios es uno de los primeros pasos para la obtención de bioinoculantes eficientes en cultivos de interés, el conocer qué tan eficiente es la interacción rizobio-leguminosa en condiciones ambientales reales permite formular inoculantes dirigidos a las necesidades de los cultivos en una región en particular. Con base en los resultados se puede inferir que hay microorganismos eficientes en la fijación biológica de nitrógeno que favorecen la biomasa vegetal de algunos de los genotipos de frijol común en estudio, como también cepas que a pesar de nodular ciertos genotipos no fueron eficientes en la fijación de nitrógeno, esto se asemeja a lo reportado por Moura *et al.* (2022) quienes encontraron que sólo una quinta parte de los aislamientos de rizobios utilizados en su estudio fueron efectivos en la FBN en frijol común. Lo anterior confirma que *Phaseolus vulgaris* es un género promiscuo por su capacidad de asociarse con varias especies de rizobios (Shamseldin y Velázquez, 2020), sin embargo, la nodulación no significa una eficiente fijación biológica de nitrógeno, puesto que las leguminosas pueden ser noduladas por rizobios incluso si dicha asociación resulta en una deficiente fijación de nitrógeno.

## CONCLUSIONES

Los rizobios nativos presentan especificidad por genotipo de plantas de frijol común, evidenciado en la asociación simbiótica de los aislamientos con el genotipo 77-SMG22.

Las cepas del banco de AGROSAVIA promueven el crecimiento de los genotipos de frijol común, reflejado en el incremento de la masa seca de la parte aérea de la planta; las más eficientes en la FBN las P17 y P22 en el genotipo 45-HTA10-2; las cepas C229 y P37 en el 48-HTA14-1; en el genotipo 56-DAB295 todas las cepas simbiotes fueron eficientes (C229, P03, P22 Y P37); y en el genotipo 77-SMG22 el tratamiento más eficiente es con el inoculante comercial Rhizobiol®.

## AGRADECIMIENTOS

A la Iniciativa de Cooperación para la Alimentación y la Agricultura Corea-América Latina (KoLFACI) por el financiamiento de esta investigación en alianza con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- Agrosavia. Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – MINCIENCIAS por el apoyo de la beca postdoctoral y al Grupo de Investigación en Microbiología Agropecuaria y Ambiental - MAGYA de la Universidad Popular del Cesar por el apoyo técnico.

## REFERENCIAS

- AGRONET. RED DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN DEL SECTOR AGROPECUARIO COLOMBIANO. Reporte: Area, producción y rendimiento nacional por cultivo. Agronet, MinAgricultura, 2020.  
<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> [consultado el....]
- AGUILERA, EDUARDO.; PIÑERO, PABLO; INFANTE-AMATE, JUAN; GONZÁLEZ-DE MOLINA, MANUEL; LASSALETTA, LUIS; SANZ-COBEÑA, ALBERTO. Emisiones de gases de efecto invernadero en el sistema agroalimentario y huella de carbono de la alimentación en España. Madrid (España): Real Academia de Ingeniería, 2020.
- ALEMNÉH, A.A.; ZHOU, Y; RYDER, M.H; DENTON, M.D. Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume–rhizobial symbioses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, n. 5, 2020, p. 1133-1156.  
<https://doi.org/10.1111/jam.14754>
- ANGELES-NÚÑEZ, JUAN-GABRIEL; CRUZ-ACOSTA, TERESA. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, v. 6, n. 5, 2015, p. 929-942.
- ASERSE, AREGU-AMSALU; MARKOS, DANIEL; GETACHEW, GENET; YLI-HALLA, MARKKU; LINDSTRÖM, KRISTINA. Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 66, n. 4, 2020, p. 488-501.  
<https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1624724>
- BEEBE, STEPHEN. Common bean breeding in the tropics. En JANICK, JULIO, *Plant breeding reviews*, v. 36, 2012, p. 357-426.  
<https://doi.org/10.1002/9781118358566.ch5>
- BETTIOL-TROMBETA, JOÃO-VICTOR; FILLA, VINICIUS-AUGUSTO; LEAL, FABIO-TIRABOSCHI; COELHO, ANDERSON-PRATES; MEIRELLES, FLAVIA-CONSTANTINO; LEMOS, LEANDRO-BORGES; BOSSOLANI, JOÃO-WILLIAM. Sustainable production of common beans: inoculation, co-inoculation and mineral fertilization in early-cycle cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v. 44, n. 1, 2020, p. 16-28.  
<https://doi-org.biblioteca.unimaqdalena.edu.co/10.1080/01904167.2020.1822403>
- BIANCO, LUCIANA. Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, v. 38, n. 2, 2020, p. 21-29.  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292020000200021>
- BROCKWELL, J.; HELY, W.; NEAL, SMITH. A Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, v. 6, n. 23, 1966, p. 365-370.  
<https://doi.org/10.1071/EA9660365>
- BURBANO-ERAZO, ESTEBAN; LEÓN-PACHECO, ROMER-IGOR; CORDERO-CORDERO, CARINA-CECILIA; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, FELIPE; CORTÉS, ANDRES J.; TOFIÑO-RIVERA, ADRIANA-PATRICIA. Multi-environment yield components in advanced common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)x tepary bean (*P. acutifolius* A. Gray) interspecific lines for heat and drought tolerance. *Agronomy*, v. 11, n. 10, 2021.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy11101978>
- COLOMBIA. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Productos Bioinsumos Registrados. Colombia, 2021. <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dccc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>
- COSTA, MAIRA-REJANE; CHIBEBA, AMARAL-MACHACULEA; MERCANTE, FABIO-MARTINS; HUNGRIA, MARIANGELA. Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis*, v. 76, n. 2, 2018, p. 163-176.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-018-0543-6>

- CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO; SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ; DA SILVA-ARAUJO, FERNANDA. Efficiency of rhizobia selection in Rio Grande do Sul, Brazil using biological nitrogen fixation in *Phaseolus lunatus*. African Journal of Agricultural Research, v. 17, n. 2, 2021, p. 229-237.  
<https://doi.org/10.5897/AJAR2020.15066>
- DA SILVA, JOSE-GERALDO; DE BRITO-FERREIRA, ENDERSON-PETRONIO; DAMIN, VIRGINIA; NASCENTE, ADRINAO-STEPHAN. Response of the common bean to liquid fertilizer and *Rhizobium tropici* inoculation. Semina: Ciências Agrárias, v. 41, n. 6, 2020, p.2967-2976.  
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p2967>
- DEBOUCK, DANIEL; SANTAELLA, MARCELA; SANTOS, LUIS-GUILLERMO. "History and impact of a bean (*Phaseolus* spp., Leguminosae, Phaseoleae) collection", Genetic Resources, v. 2, n.4, 2021, p. 21-43.  
<https://doi.org/10.46265/genresj.WJEU8358>
- FAOSTAT. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Datos sobre alimentación y agricultura, 2021.  
<https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> [Consultado el 10 de enero de 2021]
- GRANDA-MORA, IVAN-KLEVER; NÁPOLES-GARCÍA, MARIA-CARIDAD; ROBLES-CARRIÓN, ÁNGEL-ROLANDO; ALVARADO-CAPÓ, YELENYS; TORRES GUTIÉRREZ, RONAL. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. Centro Agrícola, v. 43, n. 4, 2016, p. 49-56.
- GUNNABO, ASHENAFI-HAILU; GEURTS, RENE; WOLDE-MESKEL, ENDALKACHEW; DEGEFU, TULU; GILLER, KEN-E; HEERWAARDEN, JOOST-VAN. Phylogeographic distribution of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. FEMS Microbiology Ecology, v. 97, n. 4, 2021, p. 1-16.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiab046>
- GUNNABO, ASHENAFI-HAILU; HEERWAARDEN, JOOST-VAN; GEURTS, RENE; WOLDE-MESKEL ENDALKACHEW; DEGEFU, TULU; GILLER, KEN-E. Symbiotic interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes and *Mesorhizobium* strains. Symbiosis, v. 82, 2020, p. 235–248.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-020-00724-6>
- GUZMÁN-DUCHEN, DANIEL; MONTERO-TORRES, JULIO. Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. Revista De Investigación E Innovación Agropecuaria Y De Recursos Naturales, v. 8, n. 2, 2021, p.87-101.  
<https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- HOAGLAND, R; ARNON, I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley. University of California, 1950, 32 p.
- JIMÉNEZ, OSWALT. R.; Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Breeding. En Al-Khayri, J. M. Jain S. M.; Johnson D. V; Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes, v. 7. 2019, 151-200 p.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3_5)
- LÓPEZ-ALCOCER, JOSE-DE JESUS; LÉPÍZ-ILDEFONSO, ROGELIO; GONZÁLEZ-EGUIARTE, DIEGO-RAYMUNDO; RODRÍGUEZ-MACÍAS, RAMON; LÓPEZ-ALCOCER, EDUARDO. Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre. Terra Latinoamericana, v. 38, n. 4, 2020, p. 841-852. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.654>
- LOSA, ALESSIA; VORSTER, JUAN; COMINELLI, ELEONORA; SPARVOLI, FRANCESCA; PAOLO, DARIO; SALA, TEA; MARIKA, FERRARI; CARBONARO, MARINA; MARCONI, STEFANIA; CAMILLI, EMANUELA; REBOUL, EMMANUELLE; WASWA, BOAZ; EKEZA, BEATRICE; ARAGÃO, FRANCISCO; KUNERT, KARL. Drought and heat affect common

- bean minerals and human diet—What we know and where to go. *Food and Energy Security*, v. 11, n. 1, 2022, p. 1-28.  
<https://doi.org/10.1002/fes3.351>
- MILCHESKI, VIVIANE-DE FATIMA; SENFF, SINDI-ELEN; ORSI, NICOLE; BOTELHO, GLORIA-REGINA; FIOREZE-DA COSTA LARA, ANA-CAROLINA. Influência da interação entre genótipos de feijoeiro e rizóbios na nodulação e fixação de nitrogênio. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 21, n. 1, 2022, p. 8-15.  
<https://doi.org/10.5965/223811712112022008>
- MOURA, FERNANDA-TEREZINHA; RIBEIRO, RENAN-AUGUSTO; HELENE, LUISA-CAROLINA; NOGUEIRA, MARCO-ANTONIO; HUNGRIA, MARIANGELA. So many rhizobial partners, so little nitrogen fixed: The intriguing symbiotic promiscuity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Symbiosis*, v. 68, 2022, p. 168-185.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-022-00831-6>
- NADEEM, MUHAMMAD-AZHAR; YEKEN, MEHEMET-ZAHIT; SHAHID, MUHAMMAD-QASIM; HABYARIMANA, EPHREM; YILMAZ, HILAL; ALSALEH, AHMAD; HATIPOĞLU; RÜŞTÜ; ÇILESİZ, YETER; KHAWAR, KHALID-MAHMOOD; LUDIDII, NDIKO; ERCİŞLI, SEZAI; AASIMA, MUHAMMAD; KARAKÖYA, TOLGA; BALOCH, FAHEEM-SHEHZAD. Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 35, n. 1, 2021, p.759-787.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1920462>
- PÀDUA-OLIVEIRA, DAMIANY; RUFINI, MARCIAA; DIAS-MARTINS, FABIO-AURELIO; SAVANAA-DA SILVA, JACQUELINE; DA SILVA-ARAGÃO, OSCAR-OBEDE, DE SANTANA, MARCIO-JOSE; BASTOS-DE ANGRADE, MESSIAS-JOSE; DE SOUZA-MOREIRA, FATIMA-MARIA. Inoculation with *Rhizobium tropici* can totally replace N-fertilization in the recently released BRSMG Uai bean cultivar. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 44, 2022, p. 1-8.  
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.52475>
- PATRA, DIPANWITA; MANDAL, SUKHENDU. Nod-factors are dispensable for nodulation: A twist in bradyrhizobia-legume symbiosis. *Symbiosis*, v. 86, n. 1, 2022, p. 1-15.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-021-00826-9>
- REINPRECHT, YARMILLA; SCHRAM, LYNDSAY; MARSOLAIS, FRÉDÉRIC; SMITH, THOMAS-H; HILL, BRETT; PAULS, KARL-PETER. Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production. *Frontiers in plant science*, v. 11, n. 1172, 2020, p. 1-19.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01172>
- ROJAS, PAOLA-BRENES; CORDERO, JUAN-JOSÉ; PEÑA-CORDERO, WAGNER. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la nodulación de arveja en un suelo andisol de La Angelina, Cartago. *Repertorio Científico*, v. 24, n. 2, 2021, p. 8-14.  
<https://doi.org/10.22458/rc.v24i2.3888>
- SAMBANGI, PRATYUSHA; SRINIVAS, VADLAMUDI; GOPALAKRISHNAN, SUBRAMANIAM. Understanding the Evolution of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In SHRIVASTAVA, NEERAJ; MAHAJAN, SHUBHANGI; VARMA, AJIT. *Symbiotic Soil Microorganisms*. *Soil Biology*, v. 60, 2021, p. 187-200.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-51916-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51916-2_12)
- SANTOYO-PIZANO, GUSTAVO; HERNÁNDEZ-MENDOZA, JOSE-LUIS; MÁRQUEZ-BENAVIDES, LILIANA; LUNA-ESQUIVEL, GUSTAVO; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, JUAN-MANUEL. *Rhizobium phaseoli* tolerante a un insecticida en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*. *Revista de la Sociedad de Investigación Selva Andina*, v. 12, n. 1, 2021, p. 30-37.  
<https://doi.org/10.36610/j.isars.2021.12010030>

- SHAMSELDIN, ABDELAAL; VELÁZQUEZ, ENCARNA. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (*Common bean*) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 36, n. 63, 2020, p. 1-12.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>
- SHANKAR, SIRIAM; HAQUE, EKRAMUL; AHMED, TANVEER; KIRAN, JORGE-SEGHAL. HASSAN, SAQIB; SELVIN, JOSE. Rhizobia–Legume Symbiosis During Environmental Stress. En In SHRIVASTAVA, NEERAJ; MAHAJAN, SHUBHANGI; VARMA, AJIT; *Symbiotic Soil Microorganisms*, v. 60, 2021. p. 201-220.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-51916-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51916-2_13)
- SILVEIRA, J.; CONTADO, J.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, J. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brazil)*, 1998.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-31312000000300003>.
- SOMASEGARAN, PADMA.; HOBEN, HEINZ. Cultural Properties, Cell Morphology, and Nutritional Requirements of Rhizobia. In: *Handbook for Rhizobia*. New York (United States Of America): Springer, 1992; 31-37 p.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8_3) 2012
- SOTO-VALENZUELA, JAVIER; CATUTO-SUÁREZ, ANDREA; ÁLVAREZ-VERA, MANUEL. Evaluación del crecimiento y nodulación de plantas de soja (*Glycine max*) inoculadas con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum* en Manglaralto, Santa Elena (Ecuador). *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, v. 8, n. 2, 2021, p. 27-32.  
<https://doi.org/10.26423/rctu.v8i2.577>
- STEINER, FABIO, DA SILVA-OLIVEIRA, CARLOS-EDUARDO; ZOZ, TIAGO; ZUFFO, ALAN-MARIO; DE FREITAS-SOARES, ROGELIO. Co-inoculation of common bean with *Rhizobium* and *Azospirillum* enhance the drought tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 67, n. 5, 2020, p. 923-932.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720050167>
- SUAREZ, JUAN-CARLOS; POLANÍA, JOSÉ; CONTRERAS, AMARA; RODRÍGUEZ, LEONARDO; MACHADO, LEIDY; ORDOÑEZ, CLAUDIA; BEEBE, STEVEN; RAO, I. Adaptation of common bean lines to high temperature conditions: genotypic differences in phenological and agronomic performance. *Euphytica*, v. 216, n. 28, 2020.  
<https://doi.org/10.1007/s10681-020-2565-4>
- TORRES-GUTIÉRREZ, RONAL.; GRANDA-MORA, KLEVER-IVAN.; BAZANTES-SANTOS, KASSANDRA-DEL ROCIO.; ROBLES-CARRIÓN, ANGEL. Rhizobium Diversity Is the Key to Efficient Interplay with *Phaseolus vulgaris*. En MADDELA, NAGA-RAJU.; GARCÍA-CRUZATTY, LUZ.; CHAKRABORTY, SAGNIK. *Advances in the Domain of Environmental Biotechnology*, 2021, 521-548 p.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7_19)
- VALERO-VELERO, NELSON-OSVALDO; CASTRO-VERGEL, CLAUDIA-MARCELA; USTATE-MORALES, YEISON-ENRIQUE; GÓMEZ-GÓMEZ, LILIANA-CECILIA. Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycoides*. *Biología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, v. 19, n. 2, 2021, p. 154-169.  
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1608>
- VILLANUEVA, NERY-SANTILLANA. Mecanismos de inducción de rizobios para reducir el estrés por sequía en las leguminosas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, v. 23, n. 4, 2021, p. 258-265.  
<http://dx.doi.org/10.18271/ria.2021.263>
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *International Biological Programme*. Oxford (United Kingdom): Blackwell scientific, 1970, 164 p.

WEKESA, CLABE-SIMIYU; FURCH, ALEXANDRA; OELMÜLLER, RALF. Isolation and characterization of high-efficiency rhizobia from Western Kenya nodulating with Common bean. *Frontiers in microbiology*, v. 12, 2021, p. 1-13.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.697567>

ZHENG, WEN-TAO; LI JR, YING; WANG, RUI; SUI, XIN-HUA; ZHANG, XIAO-XIA; ZHANG, JUN-JIE; WANG, EN-TAO; CHEN, WEN-XIN. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 63, n. 6, 2013, p. 2002-2007.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.044362-0>