

## Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo

### Response of *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla to inoculation of *Rhizobium* native strains of the Ecuador in greenhouse native races of the Ecuador

Klever Iván Granda Mora<sup>1</sup>, María Caridad Nápoles García<sup>2</sup>, Ángel Rolando Robles Carrión<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>3</sup> y Roldán Torres Gutiérrez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. Av. Pío Jaramillo Alvarado S/N. La Argelia. Loja, Ecuador, Casilla Letra "S".

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba, CP 32700.

<sup>3</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

E-mail: yelenys@ibp.co.cu

---

**RESUMEN.** El desarrollo de biofertilizantes a base de cepas de *Rhizobium* para su aplicación en el cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) requiere del estudio previo de la interacción bacteriana con los cultivares de interés. Por ese motivo esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la inoculación de cepas nativas de *Rhizobium*, aisladas del sur de Ecuador, sobre *P. vulgaris* cultivar Mantequilla. Se realizó un ensayo en casa de cultivo, donde se evaluaron parámetros de nodulación, biomasa, fijación de nitrógeno y la eficiencia de la simbiosis. Todas las cepas inoculadas fueron capaces de nodular las plántulas de frijol. El número de nódulos totales, la biomasa nodular y la biomasa de las plantas, se afectaron favorablemente con la inoculación de diferentes cepas de *Rhizobium*. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar las cepas *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* COL6 y *R. etli* PIN 1. Las evidencias experimentales mostraron el potencial de cepas nativas de *Rhizobium* para su utilización como biofertilizantes al elevar las tasas de fijación de nitrógeno en frijol común en el sur de Ecuador.

**Palabras clave:** bacterias diazotróficas, biofertilización, frijol, nodulación

**ABSTRACT.** The development of biofertilizers based on *Rhizobium* strains for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) requires studies about bacterial interaction with target cultivars. For these reason, the aim of this paper was to determine the effect of the inoculation of *Rhizobium* native strains, isolated from southern Ecuador, on *P. vulgaris* cultivar Mantequilla. An assay was performed in greenhouse. It were evaluated the parameters of nodulation, biomass, nitrogen fixation and efficiency of the symbiosis. All inoculated strains were able to nodulate bean seedlings. The total number of nodules, nodular biomass and plant biomass, were favourably affected by inoculation of *Rhizobium* strains. The best results were obtained with *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* COL 6 and *R. etli* PIN 1 strains. The experimental evidences shows the potential of native strains of *Rhizobium* for it use as biofertilizers because they are able to raise the rates of nitrogen fixation in common bean in southern Ecuador.

**Keywords:** diazotrophic bacteria, biofertilization, common bean, nodulation

---

## INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más importante a nivel global (Drevon *et al.*, 2001). Se cultiva en todos los continentes y forma parte de la dieta básica de

millones de familias en el mundo. El alto contenido de proteínas, minerales y compuestos antioxidantes de su grano, hace de *P. vulgaris* un cultivo clave para la salud y seguridad alimentaria en países en

desarrollo (Sánchez et al., 2014).

En Ecuador este cultivo es de singular importancia, no solo por su fácil cultivo y volumen de producción, sino porque resulta ser un producto que trasciende como fuente de alimento y sustituto de otros nutrimentos en la sociedad, sobre todo en familias donde el ingreso per capita limita la adquisición de bienes de alto valor proteico pero de mayor valor económico (MAGAP, 2013).

Las plantas leguminosas son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), a través de la simbiosis con bacterias del suelo conocidas comúnmente como rizobios (Zaccardelli et al., 2013).

La inoculación de plantas de *P. vulgaris* con cepas de rizobios eficientes y adaptadas a las condiciones ambientales, se utiliza con frecuencia para disminuir el uso de fertilizantes químicos de nitrógeno (Yadegari y Rahmani, 2010). Sin embargo, para obtener estos bioinoculantes se requieren estudios sobre la interacción de las cepas bacterianas con los cultivares de interés (Chanway et al., 2014). A pesar de que Ecuador es centro de origen y domesticación de esta leguminosa, los estudios relacionados con cepas nativas de *Rhizobium* y sobre la interacción rizobios- *P. vulgaris* son escasos (Bernal y Graham, 2001; Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2015).

El cultivar Mantequilla tiene gran importancia económica en el sur del país ya que se cuenta entre los más demandados por los agricultores y consumidores. Sus semillas son de color crema, tiene hábito de crecimiento determinado y su

rendimiento promedio está sobre 1,36 t ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, sus requerimientos nutricionales son elevados, especialmente de nitrógeno (MAGAP, 2013). Atendiendo a lo anterior, se requieren estudios que tributen a un mejor entendimiento de la interacción de este cultivar con cepas de *Rhizobium* aisladas de las zonas de cultivo, lo cual podría contribuir al desarrollo de bioinoculantes.

En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la inoculación de cepas nativas de *Rhizobium*, aisladas del sur de Ecuador en el cultivo del frijol (*P. vulgaris*) cultivar Mantequilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en esta investigación (tabla 1) pertenecen a la colección de cultivos del Centro de Biotecnología y se obtuvieron de estudios previos de aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium* de suelos franco-arcilloso, franco-limoso de tipo entisoles e inceptisoles que representan suelos jóvenes, carentes de caracterización pedogenética en la región sur del Ecuador. Además, se utilizó la cepa tipo *Rhizobium etli* CNPAF512 de la colección de cepas del banco de microorganismos de la Universidad de Lovaina, Bélgica.

### Condiciones experimentales

Tabla 1. Origen de las cepas de *Rhizobium* utilizadas en el estudio de inoculación de *P. vulgaris* cv. Mantequilla en casa de cultivo

Código de la cepa	Especie de <i>Rhizobium</i>	Localidad	Tipo de suelo	Altura* (msnm)
CB1	<i>Rhizobium tropici</i>	Catamayo	Inceptisol	1078
RC2	<i>Rhizobium tropici</i>	Loja	Entisol	2120
PIN1	<i>Rhizobium etli</i>	Pindal	Inceptisol	800
COL6	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	Calvas	Inceptisol	1193
NAM1	<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	Gonzanamá	Inceptisol	1680
VP1	<i>Rhizobium etli</i> bv. mimosae	Loja	Entisol	2145

\* Altura expresada en metros sobre el nivel del mar (msnm)

El estudio se desarrolló en un invernadero con iluminación solar, temperatura media del día de 20 °C y de la noche sobre 16 °C. La humedad relativa se mantuvo en 70 %. El sustrato utilizado para el crecimiento vegetal consistió en una mezcla de suelo de montaña de estructura franco arcillosa, arena y turba (2:1:1), se realizaron tres ciclos sucesivos de esterilización en autoclave con una duración de 1 hora a 120 °C cada 24 horas. Se utilizaron macetas de 2 kg de capacidad para la siembra de una semilla de frijol común cv. Mantequilla por hoyo en cada maceta, para cada uno de los tratamientos.

La humedad del sustrato se proporcionó mediante el riego manual cada 48 horas a todas las macetas para alcanzar una humedad cercana a la capacidad de campo. Como no se controló la evapotranspiración de las plantas, en ocasiones este riego se espació hasta 72 horas. Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorizado, con cinco réplicas por cada uno de los tratamientos que se correspondieron con las cepas de *Rhizobium* (tabla 1), más la cepa tipo CNPAF512 y un tratamiento control sin fertilización ni inoculación.

### Preparación del inóculo e inoculación

Todas las cepas bacterianas se inocularon en Erlenmeyer de 250 ml que contenían medio de cultivo líquido Extracto de Levadura Manitol (ELM), con pH ajustado a 7 y se incubaron durante 24 h a 30 °C en incubadora giratoria (TECHNE TS1500, USA) a 250 rpm. Luego de transcurrido el tiempo para el crecimiento bacteriano, se ajustaron los cultivos a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> ( $DO_{595}=0,7$ ). La inoculación de las cepas bacterianas se realizó al momento de la siembra, y consistió en aplicar 1 ml de inóculo sobre cada semilla de frijol (Torres-Gutiérrez, 2008).

### Evaluaciones

A los 30 días después de la siembra se colectaron las plantas de todos los tratamientos. Se cuantificó el número total de nódulos por planta, se determinó la biomasa nodular: masa fresca (mg) y seca (mg) de los nódulos y la biomasa de la planta: masa seca de la raíz y el follaje (mg). En ambos casos la masa seca se determinó después de 72 h en estufa a 70 °C. Del follaje de las plantas se determinó el contenido de nitrógeno total por el método Kjeldahl (Bradstreet, 2015). Estos valores se emplearon para estimar el nitrógeno fijado (Yadegari y

Rahmani, 2010) ( $N_f=N_i-N_c$ ;  $N_i$  nitrógeno total en el tratamiento inoculado,  $N_c$  nitrógeno total en el tratamiento control no inoculado). El índice de efectividad de la inoculación (IEI) foliar y radical en cada tratamiento se estimó con los valores de masa seca foliar y radical mediante la fórmula:  $IEI=(\text{tratamiento inoculado}-\text{tratamiento control}/\text{tratamiento control}) \times 100$  (Santillana *et al.*, 2005). Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las variables ( $p \leq 0,05$ ) para los tratamientos inoculados.

### Análisis estadístico

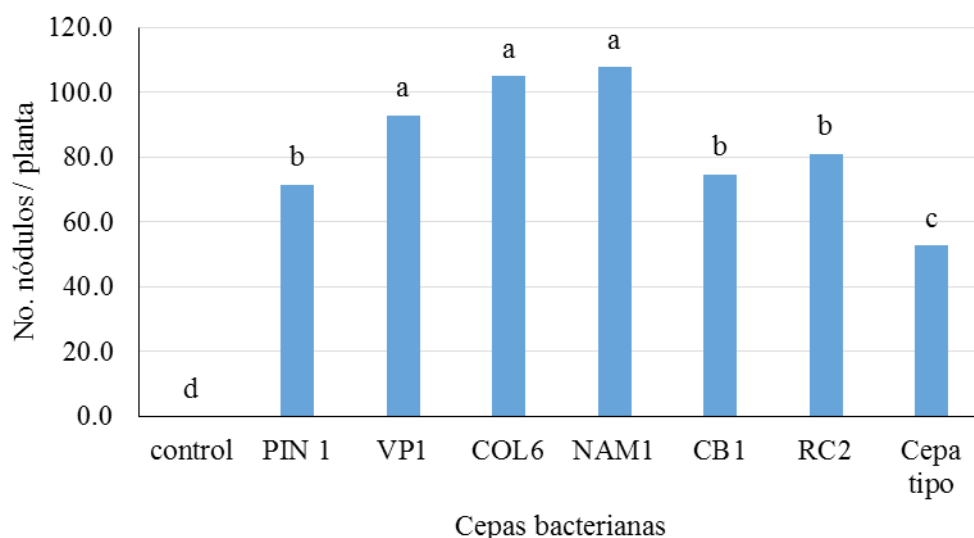
Los datos obtenidos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS v.21 IBM. Previa comprobación de la normalidad de datos y homogeneidad de varianzas se hicieron comparaciones de medias. Al no cumplirse los supuestos se emplearon pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Mann Witney para  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

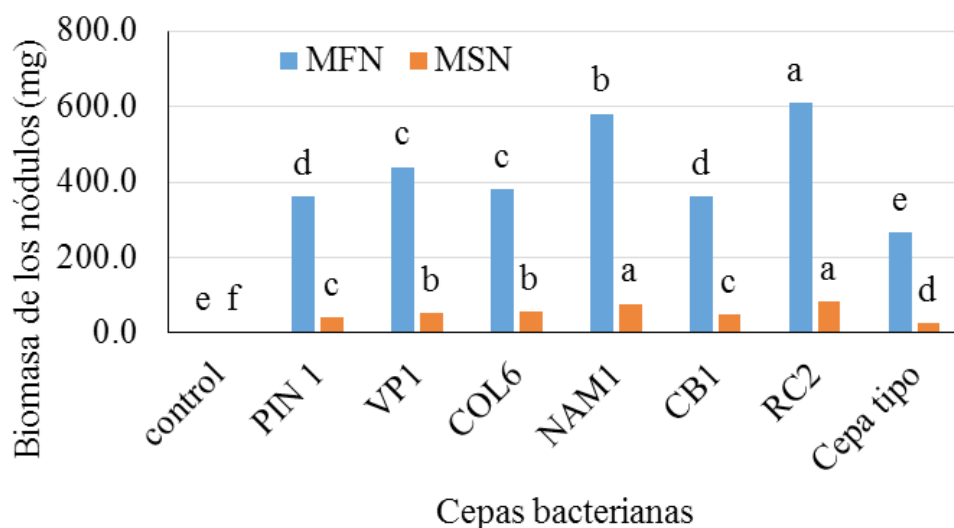
Se comprobó que todas las cepas de *Rhizobium* aisladas del sur de Ecuador fueron capaces de formar nódulos en las plántulas de frijol común cv. Mantequilla en casa de cultivo. Este resultado corrobora la promiscuidad de *P. vulgaris* para formar nódulos con diferentes especies de rizobios (Michiels *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2015) y refiere por primera vez la capacidad del cv. Mantequilla de interactuar con cinco especies de *Rhizobium*. El número de nódulos por planta y su biomasa dependieron de la cepa (figuras 1 y 2).

Fue evidente la estimulación de la nodulación con las diferentes especies de *Rhizobium*. Sin embargo, no todas las cepas inoculadas favorecieron en igual medida el número de nódulos. Los valores más altos de número de nódulos por planta se obtuvieron con las cepas *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* COL6 y *R. etli* bv. mimosae VP1 sin diferencias significativas entre ellas pero sí con el resto de los tratamientos. Las dos cepas de *R. tropici* (CB1 y RC2) mostraron resultados similares en cuanto a esta variable.

Esto se relaciona con la capacidad de cada cepa para formar nódulos en la leguminosa hospedera y establecer un proceso simbiótico eficiente. Se ha demostrado que la eficiencia en este proceso ocurre a partir de la acción de proteínas específicas y el intercambio de señales moleculares, resultantes de la secreción de



**Figura 1. Número de nódulos en plántulas de frijol común cv. Mantequilla, inoculadas con cepas de *Rhizobium*.** Letras sobre barras indican diferencias significativas entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para  $p \leq 0,05$ . PIN1 *Rhizobium etli*, VP1 *Rhizobium etli* bv. mimosae, COL6 *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, NAM1 *Rhizobium mesoamericanum*, CB1 *Rhizobium tropici*, RC2 *Rhizobium tropici*



**Figura 2. Biomasa nodular en plántulas de frijol común cv Mantequilla inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium*.** MFN masa fresca de nódulos, MSN masa seca de nódulos. Letras sobre barras indican diferencias significativas entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para  $p \leq 0,05$ . PIN1 *Rhizobium etli*, VP1 *Rhizobium etli* bv. mimosae, COL6 *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, NAM1 *Rhizobium mesoamericanum*, CB1 *Rhizobium tropici*, RC2 *Rhizobium tropici*

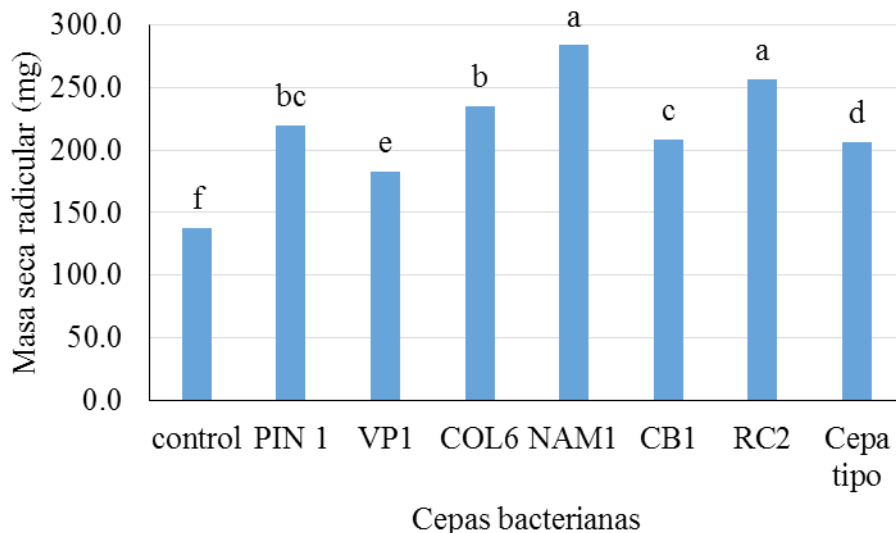
polisacáridos y proteínas, tanto del micro como del macrosimbionte. Se han identificado a los flavonoides como moléculas señal en las plantas, reguladores de la expresión de los genes de nodulación en las bacterias (Hassan y Mathesius, 2012). Estos resultados de estimulación en la formación de nódulos se deben, posiblemente al establecimiento de una comunicación más o menos específica entre hospedero-hospedante, a través de los exudados emitidos por la raíz de la planta y la respuesta receptiva por las bacterias (Cesco *et al.*, 2012). En este sentido, otros ensayos realizados con la inoculación de *Rhizobium leguminosarum* por Argaw y Akuma (2015) mostraron mayor número de nódulos en plantas de frijol cv. Dursito que los obtenidos en este trabajo con el cv. Mantequilla.

Experimentos similares han mostrado también en plantas de otras leguminosas como soya (*Glycine max* L.) inoculadas con cepas de *Rhizobium* sp., tuvieron incrementos significativos en la formación de nódulos (Alam *et al.*, 2015).

Con respecto la biomasa nodular (masa fresca y seca de los nódulos) también se observaron diferencias entre las cepas (figura 2). *Rhizobium tropici* RC2 a pesar de no tener el mayor número de nódulos la biomasa nodular alcanzó los valores máximos en masa fresca y sin diferencias

significativas con *Rhizobium mesoamericanum* NAM1 en cuanto a la masa seca. Tanto para el número de nódulos como para la biomasa nodular las cepas nativas mostraron resultados significativamente superiores a la cepa tipo. Este resultado muestra el potencial de las cepas nativas para interactuar con el cultivar local Mantequilla de gran demanda y aceptación en la zona sur del país.

La inoculación de las rizobacterias también afectó las variables evaluadas en las plantas. Los resultados de la estimación de la fijación de nitrógeno (% N total, N fijado), tuvieron correlación positiva con el número de nódulos (Correlación de Pearson 0,7848). Para la biomasa foliar no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El efecto en la biomasa radical (MSR) dependió de la cepa (figura 3). Los índices de efectividad de la inoculación estimados estuvieron por encima del 30 % y las cepas *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* bv. viciae COL6 y *R. etli* PIN1 mostraron valores de nitrógeno fijado  $\geq 0,5$  con IEI superiores al 60 %. Similares resultados obtuvieron Yadegari y Rahmani (2010) con aumento del nitrógeno fijado por cepas de *Rhizobium* inoculadas en frijol. Los incrementos en la biomasa radical ocasionados por todas las cepas pudieran responder a la producción de reguladores del crecimiento tales



**Figura 3. Biomasa radical en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium*.**

Letras sobre barras indican diferencias significativas entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para  $p \leq 0,05$ . PIN1 *Rhizobium etli*, VP1 *Rhizobium etli* bv. mimosae, COL6 *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, NAM1 *Rhizobium mesoamericanum*, CB1 *Rhizobium tropici*, RC2 *Rhizobium tropici*



como el ácido indol acético, lo cual ha sido señalado por varios autores como una de las características de las especies de *Rhizobium* que promueve el crecimiento de las plantas (Chanway et al., 2014).

Sin embargo, los índices de efectividad de la inoculación en la biomasa foliar fueron discretos y en el caso de la cepa tipo y *R. etli* bv. *mimosae* VP1 resultaron en valores negativos. Las evaluaciones se realizaron 30 días después de la inoculación y estos resultados posiblemente estuvieron vinculados a que el efecto de la inoculación de las bacterias no se tradujo en incrementos significativos de la biomasa foliar apreciable a este tiempo de cultivo aunque se observó que los contenidos de nitrógeno y el

nitrógeno fijado fueron mayores en relación con el control (tabla 2).

El análisis de correlación entre las variables estudiadas mostró relación positiva entre ellas. Se encontró una correlación significativa ( $p < 0,01$ ) entre el número de nódulos y la masa fresca y seca de los nódulos y de estos con las variables relacionadas con la biomasa de la planta (masa seca radicular y foliar) (tabla 3). Ello evidenció un efecto estimulador de estas cepas sobre el crecimiento de las plantas en la fase vegetativa después de 30 días de inoculación.

Los resultados de las cepas NAM1, COL6 y PIN1 sugieren que estas pueden ser utilizadas en ulteriores investigaciones de campo para dilucidar su efecto en la estimulación no solo de

**Tabla 2. Biomasa radical, foliar y fijación de nitrógeno de plántulas de frijol común inoculadas con cepas de *Rhizobium***

Tratamientos	IEI (%) MSR	IEI (%) MSF	NT (%)	N fijado
<b>Cepa tipo</b>	49,83	-6,37	2,56	0,06
<b>R. tropici CB1</b>	51,23	6,43	2,57	0,07
<b>R. tropici RC2</b>	86,02	6,10	2,75	0,25
<b>R. etli PIN1</b>	59,01	24,42	3,00	0,50
<b>R. leguminosarum bv. viciae COL6</b>	69,94	27,18	3,04	0,54
<b>R. mesoamericanum NAM1</b>	105,63	18,90	3,08	0,58
<b>R. etli bv. mimosae VP1</b>	32,53	-9,40	2,97	0,47
<b>Control</b>	-	-	2,50	-

MSR: masa seca de raíz, MSF: masa seca del follaje, % NT: % nitrógeno total en follaje. IEI: índice de efectividad de la inoculación.

**Tabla 3. Correlación entre las variables estudiadas**

Variables	MFN	MSN	MSR	MSF
<b>NN</b>	0,423**	0,435**	0,201**	0,161**
<b>MFN</b>		0,924**	0,453**	0,123*
<b>MSN</b>			0,557**	0,211**
<b>MSR</b>				0,293**

\*\*Correlación significativa para  $p < 0,01$ , \*Correlación significativa para  $p < 0,05$ . NN número de nódulos por planta, MFN masa fresca de los nódulos, MSN masa seca de los nódulos, MSR masa seca radicular, MSF masa seca foliar.

parámetros de nodulación y biomasa, sino a la vez, el efecto de la fijación de N y la eficiencia de la simbiosis respecto a componentes de rendimiento y el rendimiento agrícola de diferentes genotipos de frijol común. Por ese motivo, desde una perspectiva sostenible, los resultados de este trabajo pueden ser considerados para el desarrollo de bioinoculantes que contribuyan a recuperar suelos degradados, incorporar nitrógeno a los ecosistemas e incrementar los rendimientos agrícolas de cultivos estratégicos como el frijol común como una alternativa agronómica viable. El aumento y la ampliación del papel de la inoculación con estos microorganismos pueden disminuir la necesidad de fertilizantes químicos y de ese modo reducir los efectos ambientales adversos.

## CONCLUSIONES

Seis cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador y pertenecientes a cinco especies fueron capaces de nodular plántulas de frijol común cv. Mantequilla y producir un efecto estimulador en su crecimiento. Ello demostró la predisposición del hospedero para realizar simbiosis con diferentes especies de *Rhizobium* y la capacidad de promoción del crecimiento de las plantas por las cepas estudiadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALAM, F., M.A.H. BHUIYAN, S.S. ALAM, T.R. WAGHMODE, P.J. KIM, Y.B. LEEAND. Effect of *Rhizobium* sp. BARIRGm901 inoculation on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean (*Glycine max*) genotypes in gray terrace soil. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 79 (10): 1660-8, 2015. ISSN 0916-8451.

2. ARGAW, A. and A. AKUMA. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sp. inoculation improves the agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environmental Systems Research*, 4: 11, 2015. ISSN 2193-2697.

3. BERNAL, G. and P.H. GRAHAM. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparison with Mexican bean rhizobia. *Can J Microbiol* 47 (6): 526-534, 2001. ISSN 1480-3275.

4. BRADSTREET, R.B. The Kjeldahl method for organic nitrogen. *Burlington Elsevier Science*.

Nueva Jersey, Estados Unidos. 2015, 248p. ISBN 1483258599.

5. CESCO, S., T. MIMMO, G. TONON, N. TOMASI, R. PINTON, R. TERZANO and P. NANNIPIERI. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 48 (2): 123-149, 2012. ISSN 0178-2762.

6. CHANWAY, C.P., R. ANAND and H. YANG. Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biological and Ecology of Nitrogen Fixation*. T. Ohyama (ed.), InTechOpen. 2014. ISBN: 978-953-51-1216-7.

7. DREVON, J.J., C. ABDELLY, N. AMARGER, E.A. AOUANI, J. AURAG, H. GHERBI, M. JEBARA, C. LLUCH [*et al.*]. An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *Journal of biotechnology*, 91 (2): 257-268, 2001. ISSN: 0168-1656.

8. FERREIRA, P.A.A., M.A.P. SILVA, A. CASSETARI, M. RUFINI, F.M.D.S. MOREIRA and M.J.B. ANDRADE. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. *Ciência Rural*, 39 (7): 2210-2212, 2009. ISSN: 0103-8478.

9. HASSAN, S. and U. MATHESIUS. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany*, 63 (9): 3429-3444, 2012. ISSN: 0022-0957.

10. MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca). *Estadísticas Agropecuarias*. 2013. En sitio web: <http://www.magap.gob.ec>. Consultado el 20 de diciembre de 2014.

11. MICHIELS, J., B. DOMBRECHT, N. VERMEIREN, C. XI, E. LUYTEN and J. VANDERLEYDEN. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*, 26 (3): 193-205, 1998. ISSN: 1574-6941.

12. RIBEIRO, R.A., E. ORMENO-ORRILLO, R.F. DALL'AGNOL, P.H. GRAHAM, E. MARTINEZ-ROMERO y M. HUNGRIA. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of

- the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in microbiology*, 164 (7): 740-748, 2013. ISSN: 0923-2508.
13. RIBEIRO, R.A., T.B. MARTINS, E. ORMEÑO-ORRILLO, J.R.M. DELAMUTA, M.A. ROGEL, E. MARTÍNEZ-ROMERO and M. HUNGRIA. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65 (9): 3162-3169, 2015. ISSN 1466-5034.
14. SÁNCHEZ, A.C., R.T. GUTIÉRREZ, R.C. SANTANA, A.R. URRUTIA, M. FAUVART, J. MICHIELS and J. VANDERLEYDEN. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, 62: 105-112, 2014. ISSN: 1164-5563.
15. SANTILLANA, N., C. ARELLANO y D. ZÚÑIGA. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4 (1-2): 47-51, 2005. ISSN: 1726-2216
16. TORRES-GUTIÉRREZ, R. Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. *Dissertationes of Agriculture. PhD thesis*, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. 155 p. 2008.
17. YADEGARI, M. and H.A. RAHMANI. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds' inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (9): 792-799, 2010. ISSN: 1991-637X.
18. ZACCARDELLI, M., A. PENTANGELO and P. TRIPODI. Characterization of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Ecotype Fagiolo Occhio Nero Di Oliveto Citra Using Agronomic, Biochemical and Molecular Approaches. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16 (18): 901, 2013. ISSN: 1028-8880.

---

Recibido el 15 de diciembre de 2015 y aceptado el 20 de septiembre de 2016