

# Caracterización morfológica de la cepa nativa de *Rhizobium* sp. obtenida a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.)

Carlos Vinicio Alencastro Pavón<sup>1</sup>, José Ignacio Ayala Colimba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

\*Autor para correspondencia: carlosalencastro77@hotmail.com

Recibido: 2023/04/17 Aprobado: 2023/11/27

DOI: <https://doi.org/10.26621/ra.v1i29.889>

## RESUMEN

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y las leguminosas mantienen una relación simbiótica, que les permite obtener nutrientes de manera eficiente; sin embargo, existe escasa información acerca de las características morfológicas y el medio de conservación adecuado de las bacterias que nodulan en el sistema radical de la variedad rosada de arveja (*Pisum sativum* L.). El objetivo de esta investigación fue caracterizar química y morfológicamente la cepa nativa de *Rhizobium* sp., a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja, variedad rosada, para lo cual se estableció el cultivo de arveja en campo en el cantón Espejo, provincia del Carchi. Se muestreó de manera aleatoria, en zigzag, plantas jóvenes y vigorosas en la etapa fenológica de floración. Se tomaron tres plantas en cinco puntos de muestreo, para alcanzar un total de 15 plantas del lote. Los nódulos obtenidos se llevaron al laboratorio y se sembraron en levadura manitol agar con azul de bromotimol (YMA + AB). Se caracterizaron morfológicamente las cepas nativas de *Rhizobium* y se observaron colonias de forma circular, convexas, con borde entero y superficie lisa, de color blanca cremosa rosada y consistencia gelatinosa. Mediante la tinción de Gram, se reportaron bacilos Gram negativos; además, se realizó una caracterización bioquímica, donde la cepa presentó resistencia a NaCl 2 % e incapacidad de producir H<sub>2</sub>S. En la zona de estudio, se determinó que la cepa nativa que nodula en las raíces de *Pisum sativum* var. rosada es *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

**Palabras clave:** leguminosa, bacterias, conservación, simbiosis

## ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria and legumes maintain a symbiotic relationship, which allows them to obtain nutrients efficiently; however, there is little information on the morphological characteristics and adequate conservation medium of the bacteria that nodulate in the root system of the pink variety of pea (*Pisum sativum* L.). The objective of this research was to chemically and morphologically characterize the native strain of *Rhizobium* sp., from the root nodules of the pea crop, pink variety, for which field pea cultivation was established in the Espejo canton, province of Carchi. Random zig-zag sampling of young and vigorous plants in the phenological flowering stage was carried out. Three plants were taken at five sampling points, for a total of 15 plants in the lot. The nodules obtained were taken to the laboratory and sown on yeast mannitol agar with bromothymol Blue (YMA + AB). The native *Rhizobium* strains were morphologically characterized and circular, convex colonies with an entire edge and smooth surface, creamy-pink white in color and gelatinous consistency were observed. Gram-negative bacilli were reported by Gram staining; in addition, a biochemical characterization was carried out, where the strain presented resistance to 2 % NaCl and inability to produce H<sub>2</sub>S. In the study area it was determined that the native strain that nodules in the roots of *Pisum sativum* var. pink is *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

**Keywords:** legume, bacteria, conservation, symbiosis

Carlos Vinicio Alencastro Pavón  [orcid.org/0000-0002-8010-4517](https://orcid.org/0000-0002-8010-4517)

José Ignacio Ayala Colimba  [orcid.org/0000-0003-3007-7343](https://orcid.org/0000-0003-3007-7343)



## INTRODUCCIÓN

El cultivo de arveja (*Pisum sativum L.*) representa un rubro de importancia socioeconómica en la zona norte del Ecuador; sin embargo, el bajo rendimiento de los genotipos locales en comparación con variedades mejoradas provoca la erosión genética del cultivo (Arévalo, 2013). Carchi representa el 1.64 % de la superficie de labor agrícola a nivel nacional. Debido a las adecuadas condiciones agroecológicas que posee la zona, la agricultura es uno de los sectores económicos más importantes (INEC, 2011).

Una alternativa biológica para mejorar el comportamiento agronómico del cultivo de arveja (*Pisum sativum L.*), variedad rosada, es a través de la inoculación de cepas nativas de *Rhizobium sp.* que contribuyan a una producción sana para el consumo humano que permita evitar la erosión genética. Actualmente, existe escasa información acerca de las características morfológicas y los sustratos de conservación para la bacteria nativa que nodula en esta leguminosa, y, por tanto, no se dispone de biofertilizantes a base de rizobios que permitan mejorar la vida microbiana del suelo y, con ello, potenciar el crecimiento y desarrollo del cultivo de arveja.

En 2012, Castro evaluó la respuesta a la inoculación con tres dosis de *Rhizobium* en el cultivo de arveja "*Pisum sativum L.*" variedad rogger temprana, en la provincia del Carchi. Al evaluar el rendimiento, con respecto a la dosis del inóculo, el tratamiento tres (5 g de inoculante/kg de semilla) presentó 5181.30 kg/ha, siendo superior a los tratamientos uno y dos, cuya dosis utilizada fue 15 g de inoculante/kg de semilla y 10 g de inoculante/kg de semilla, respectivamente. En el Ecuador existen investigaciones acerca de rizobios en cultivos de fréjol, alfalfa, trébol y maní, con las que se ha registrado una alta heterogeneidad en los suelos ecuatorianos (Bernal et al., 2004). Con respecto a los rizobios asociados al cultivo de haba, chocho y vicia, no se han realizado estudios, y en lo referente a la arveja hay poca información.

La inoculación de plantas leguminosas 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 de *P. sativum*, los estudios relacionados con cepas nativas de *Rhizobium* y que aborden la interacción con rizobios son escasos (Ribeiro et al., 2013; Ribeiro et al., 2015).

Para aislar de manera eficiente cepas nativas de rizobios, es necesario obtener muestras directas de los nódulos de las plantas en estudio, ya que así se consiguen altas densidades de poblaciones microbianas, mediante la utilización de medios de cultivo específicos que faciliten el aislamiento y la identificación del microorganismo (Hernández et al., 2012). Para lograr el aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium sp.* a partir de nódulos colectados y desinfectados, se siembran sobre medios de cultivo específicos, como levadura manitol agar (LMA), agar XLD y Hectock, levadura manitol agar rojo congo, en LLA, etc. (Acosta, 2017).

El objetivo planteado fue caracterizar y conservar las cepas nativas de *Rhizobium sp.* obtenidas a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum var. rosada*), para salvaguardar su recurso genético en condiciones controladas.

## MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el cantón Espejo, provincia del Carchi (Figura 1); su altitud es de 2850 msnm, temperatura media de 12 °C, precipitación media anual de 800 mm/año, humedad relativa del 70 % y clasificación ecológica en bosque húmedo montano bajo (bh-M) (Castro, 2012).



Figura 1. Zona de estudio para la caracterización morfológica de la cepa nativa de *Rhizobium sp.*, en el cantón Espejo, Carchi

### Metodología de la investigación

A continuación, se detalla la metodología utilizada en esta investigación.

#### 1. Muestreo del suelo

Mediante la técnica en zigzag, se colectó una muestra de suelo de 1 kg en un área correspondiente a 500 m<sup>2</sup>, formada por 10 submuestras, cada una con un peso de 0.5 kg, obtenidas a una profundidad de 30 cm (Figura 2). Para ejecutar el muestreo, se trazó una cuadrícula sobre el área del suelo seleccionada, y dentro de ella se tomaron las submuestras de forma aleatoria hasta completar el número señalado. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno oscuras, para realizar el análisis fisicoquímico.



Figura 2. Técnica en zigzag para muestreo del suelo  
Fuente: INIAP, 2008

#### 2. Análisis físico-químico del suelo

En el análisis físico-químico del suelo, se determinó el pH, la materia orgánica (M.O.) y la conductividad eléctrica (C.E.), además de los macro y micronutrientes presentes en el suelo (N, P, S, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, B).

### 3. Establecimiento del cultivo de arveja (*Pisum sativum* var. rosada)

El cultivo de arveja (*Pisum sativum* var. rosada) tuvo un ciclo vegetativo de 100 días. La siembra se realizó a una distancia entre surcos de 60 cm y una distancia entre plantas de 30 cm, a una densidad de siembra de 70 kg/ha (Figura 3). El lote de estudio seleccionado tenía un área de 500 m<sup>2</sup>.



Figura 3. Cultivo de arveja establecido (*Pisum sativum* var. rosada) en el cantón Espejo, provincia del Carchi

### 4. Muestreo de nódulos

Se realizó un muestreo aleatorio en zigzag de plantas jóvenes y vigorosas en la etapa fenológica de floración. Se tomaron tres plantas en cinco puntos de muestreo, dando un total de 15 plantas del lote. En la extracción del sistema radicular de las plantas seleccionadas, es importante evitar daños mecánicos en la raíz. Los nódulos seleccionados se transportaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y a temperatura ambiente (Jiménez, 2007; Peña y Reyes, 2007) (Figura 4).



Figura 4. Muestreo de nódulos bacterianos

### 5. Procesamiento de nódulos en laboratorio

Los nódulos obtenidos se desinfectaron por inmersión sucesiva en alcohol al 70 % durante 60 segundos, en hipoclorito de sodio al 2.5 % por cuatro minutos, y, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril (Matos et al., 2007). Se observaron nódulos en diferentes posiciones, lo que se debe a las épocas de colonización de las bacterias en la raíz; en consecuencia, se tienen nódulos antiguos, inmaduros y jóvenes (Figura 5). Esta actividad se realizó en la cámara de flujo laminar para garantizar las condiciones asépticas.



Figura 5. A. Desinfección de las raíces y superficie de los nódulos de *Pisum sativum* var. rosada. B y C. Diversas localizaciones de los nódulos en las raíces de *P. sativum*

Con la ayuda de un bisturí, se seccionaron los nódulos, se ubicaron en placas con levadura manitol agar con azul de bromotimol como indicador (YMA + AB), y se incubaron a 30 °C por siete días para evaluar el crecimiento generado alrededor de los nódulos (Mora, 1995; Bécquer et al., 2000; Rincón et al., 2000; Salazar et al., 2001; Matos y Zúñiga, 2002; Jiménez, 2007; Pérez et al., 2008).



Figura 6. Localización de colonias bacterianas desprendidas de los nódulos

La metodología utilizada se complementó con lo mencionado por Carpio (2014), que recomienda colocar los nódulos en agua destilada por 30 min para hidratarlos, lavarlos y luego sumergirlos en etanol (95 %) durante un minuto para esterilizarlos superficialmente; posteriormente, se transfieren a una solución de hipoclorito de sodio (3 %) durante tres minutos y después se lavan los nódulos en agua destilada estéril (Figura 6).

### 6. Aislamiento e identificación de cepas nativas de rizobios

De acuerdo con las características planteadas por Martínez et al., en el año 2005, la selección se realizó en colonias con reacción ácida en el medio de cultivo YMA + AB, y morfología bacilar Gram negativa. Posteriormente, se sembró por agotamiento en cajas con agar YMA sin azul de bromotimol y se incubó a 30 °C durante siete días. Durante el periodo de incubación se visualizaron y constataron las características de la colonia, que fueron: diámetro, forma, borde, elevación, superficie, consistencia, color, exudación y apariencia (Pérez et al., 2008). La cepa fue evaluada según la metodología planteada por Prescott (2004); tomando inóculos y realizando siembra por agotamiento en medio YMA + RC (levadura manitol agar + rojo congo), las colonias se evaluaron con base en la absorción del rojo congo (Kuykendall et al., 2005; Matos et al., 2007).

Por otra parte, las cepas se sembraron en cajas con LLA (levadura lactosa agar) y se incubaron a 30 °C durante tres días; después, se realizaron extendidos y se adicionó reactivo de Benedict. Los resultados se valoraron de acuerdo a la producción de cetolactosa, como positivo

o negativo (Martínez et al., 2005; Kuykendall et al., 2005; Matos et al., 2007). Para la evaluación, se seleccionaron los inóculos de acuerdo a las características planteadas por Pérez et al. (2011) y Rojas (2009). Se evaluó el crecimiento de la cepa en diferentes medios para lograr la respectiva caracterización, para lo cual se realizó siembra por agotamiento en cajas con PGA + PB (peptona glucosa agar + púrpura de bromocresol), y se incubó a temperatura de 30 °C. Los resultados se valoraron de acuerdo al crecimiento, como positivo o negativo (Bécquer et al., 2000).

## 7. Conservación de cepas nativas de rizobios

Utilizando la metodología propuesta por Matos et al. (2007), la cepa aislada se cultivó en medio YMA + AB en plano inclinado y en caldo levadura manitol. Se incubó a 30 °C por cinco días; posteriormente, se llevó a una nevera a temperatura entre 4 °C y 5 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el análisis de suelo realizado se determinó un pH de 5.96, materia orgánica de 4.21 %, conductividad eléctrica de 0.187 mS/cm, clase textural franca y presencia de macro y micronutrientes (Tabla 1). Mora et al. (2017), mediante un análisis de suelo, determinaron que la materia orgánica aumentó hasta un 3.3 % luego de inocular cepas nativas de *Rhizobium*, además, Saldaña (2017) menciona que es probable encontrar diversas poblaciones microbianas en suelos con alto contenido de materia orgánica. De ahí la importancia de realizar un análisis de suelo para conocer el porcentaje de materia orgánica, ya que es un indicador de vida microbiana.

En cuanto a las condiciones de acidez edáfica, Hernández et al. (2017) evaluaron la tolerancia de rizobios a la acidez y determinaron que las bacterias del género *Rhizobium* presentaron una mayor capacidad de adaptación y crecimiento a un pH de 4.5 que a un pH 6.8. El pH determinado en el presente estudio fue de 5.96; esto permite suponer la presencia de mecanismos biológicos de los rizobios para sobrevivir en condiciones de acidez. Sin embargo, según Soarez et al. (2014), la acidez del suelo puede limitar el crecimiento de las poblaciones de rizobios en la rizosfera.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del suelo colectado en el cantón Espejo, provincia del Carchi

Característica	Valor
Textura	Franco
pH	5.96
Conductividad eléctrica	0.187 mS/cm
Nitrógeno total	15.66 ppm
Materia Orgánica	4.21 %
Fósforo	38.40 ppm
Potasio	0.79 meq/100 ml
Azufre	24.51 ppm
Calcio	14.84 meq/100 ml
Magnesio	3.41 meq/100 ml
Zinc	3.48 ppm
Cobre	4.81 ppm
Hierro	310.6 ppm
Manganeso	5.23 ppm
Boro	0.16 ppm

## Identificación y caracterización de las cepas aisladas de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum*) variedad rosada

Las cepas nativas presentaron características propias de rizobios. Las colonias observadas fueron de forma circular, convexas con borde entero y superficie lisa, de color blanca cremosa rosada y consistencia gelatinosa; además, presentaron una exudación abundante y de apariencia líquida. Asimismo, se observaron, mediante la tinción de Gram, bacilos Gram negativos, de flagelos polares finos no esporulados. Se observó, en general, un crecimiento rápido, encontrando un crecimiento a las 72 horas de incubación de colonias de 3 mm de diámetro (Tabla 2). Estos resultados son similares a un estudio previo realizado por Saldaña (2017), en el cual caracterizó cepas aisladas de plantas de *Phaseolus vulgaris* y reportó presencia de bacilos Gram negativos pleomorfos, colonias circulares, rosadas, convexas lisas, húmedas, con medidas de 2 a 5 mm de diámetro en un lapso de 3–5 días de crecimiento a 28 °C.

Por su parte, Hernández (2012) realizó un aislamiento de cepas de *Rhizobium* en dos leguminosas forrajeras y señaló que las colonias de los rizobios son convexas con bordes regulares, de color lechoso, consistencia gelatinosa y con un crecimiento lento, observando colonias de menos de 2 mm en tres días de incubación. Estos datos permiten suponer que el crecimiento de las colonias varía de acuerdo a la procedencia de la cepa de *Rhizobium*.

Además, Salazar et al. (2001), indican que mediante tinción Gram, los rizobios son bacilos Gram negativos, finos no esporulados. Ferrera y Alarcón (2007) mencionan que las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son consideradas un habitante prominente de la rizosfera; son bacilos móviles gram negativo, miden de 0.5 a 0.9 por 1.2 a 3.0  $\mu\text{m}$ , a menudo contienen gránulos de  $\beta$ -hidroxibutirato, y son pleomorfos en situaciones adversas. Estos reportes de los distintos autores permiten comparar los resultados obtenidos en la presente investigación.

**Tabla 2.** Características de la cepa nativa obtenida de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum*) variedad rosada en cantón Espejo, Carchi

Característica	Cepa nativa aislada*
Diámetro	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Consistencia	Gelatinosa
Color	Blanca cremosa rosada
Exudación	Abundante
Apariencia	Líquida
Morfología	Bacilos
Flagelos	Polares
Formación de exopolisacáridos	Positivo
Respiración	Aerobios
Gram	Negativo
T° Mínima de crecimiento	5 °C
T° Óptima de crecimiento	28 °C
Endoesporas	Negativo
Fluorescencia	Negativo

\*Tiempo de incubación: 72 horas.

Se realizó la caracterización bioquímica, con la que fue posible identificar la cepa nativa *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, ya que dio reacción positiva a la prueba de Biuret, resistencia a NaCl 2 %, incapacidad de producir H<sub>2</sub>S, no productora de 3 cetolactasa. Según Saldaña (2012), estas son características típicas de cepas de rizobio. Asimismo, un elemento esencial fue la falta de absorción del colorante rojo congo (Tabla 2). En la cepa nativa aislada de *Rhizobium* se reportó que la temperatura mínima de crecimiento es 5 °C y que la temperatura óptima es 28 °C, resultados similares a los obtenidos por Hernández (2012), que en su investigación manifiesta que las cepas de rizobios presentan un mejor crecimiento a 30 y 37 °C, y que a temperaturas extremas de 5 y 44 °C no se observa crecimiento.

Otra característica que tienen las cepas de rizobios es la no tolerancia al NaCl, lo cual se ve reflejado en los análisis obtenidos; se contrasta con lo reportado por López (2017), que indica que cepas nativas de rizobios no se desarrollan en presencia de cloruro de sodio al 2 %, y Patil et al. (2012), que señalan que el crecimiento bacteriano decrece al aumentar la cantidad de sal en el medio. Así también, Berrada et al. (2012) manifiestan que la tolerancia al NaCl es un criterio fundamental que permite diferenciar cepas de *Rhizobium* sp.

**Tabla 3.** Resultado de pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa nativa aislada, obtenida de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum*) variedad rosada

Sustrato	Respuesta
Glucosa peptona	Negativo
Gelatina hidrólisis	Negativo
Caseína Hidrólisis	Negativo
Litmus reacción	Alcalino
NaCl 2 %	Negativo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Biuret	Positivo
Rojo Congo	Negativo
3 Cetolasa	Negativo
Citrato	Negativo

#### Conservación de las cepas nativas aisladas de *Rhizobium*, obtenidas a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum*) variedad rosada

Para la conservación de las cepas nativas aisladas de *Rhizobium* se siguió la metodología propuesta por Hernández et al. (2012), la cual consistió en cultivar la cepa aislada en medio levadura manitol agar con azul de bromotimol (YMA + AB) en plano inclinado y en caldo levadura manitol, para, posteriormente, incubar a 30 °C por tres días (Figura 7). Asegurando la asepsia necesaria, se llevó la cepa aislada a una nevera a temperatura entre 4 y 5 °C. Esta metodología utilizada se complementa con lo mencionado por Rodríguez (1993), que recomienda que para un óptimo mantenimiento y conservación de colonias aisladas se deben sembrar en medio extracto de levadura manitol agar (ELMA) en tubos de ensayo a 4 °C. Por su parte, Jerez (2004) menciona que otro método de conservación es someter a las bacterias a un proceso de liofilización durante 24 horas a una temperatura de -54 °C; después, se recomienda almacenarlas en refrigeración a 4 °C.



**Figura 7.** Colonias de la cepa nativa de *Rhizobium*

## CONCLUSIONES

En la zona de estudio se identificó que la cepa nativa que nodula en las raíces de *Pisum sativum* var. rosada es *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, la cual fue caracterizada química y morfológicamente.

La cepa nativa presentó bacilos Gram negativos con colonias de forma circular, convexas de borde entero y superficie lisa, de color blanca cremosa rosada y consistencia gelatinosa, con exudación abundante de apariencia líquida. Mediante la tinción de Gram, se reportaron flagelos polares finos no esporulados con un crecimiento de 3 mm en 72 horas.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

**Agradecimientos:** N/A

**Contribución de los autores:** N/A

**Fuente de financiamiento:** N/A

## REFERENCIAS

- Acosta A. y Pardo M. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. Universidad de Santander.
- Arévalo, H. (2013). *Evaluación de cinco variedades de arveja (Pisum sativum) bajo condiciones de invernadero en Tumbaco-Pichincha*. [ Tesis de de grado de ingeniero agrónomo]. Universidad San Francisco de Quito. Revista USFQ de Quito.
- Berrada H., Nouioui I., Iraqui H., Ghachtouli N., Gtari M. y Fikri, B. (2012). Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. African Journal of Microbiology Research 6:5314-5324. DOI:10.5897/AJMR11.1505
- Bernal, G., Suárez, A., Campaña, D., Jerez, M., Salvador, C., Graham, P. y Aguilar, M. (2004). Selección de cepas de *Rhizobium* adaptadas a condiciones de campo, y su uso como inoculantes de leguminosas de la Sierra y Costa Ecuatoriana. Ed. G. Bernal.
- Castro, R. (2012). Respuesta a la inoculación con tres dosis de *Rhizobium* en el cultivo de arveja *Pisum sativum* L. variedad roger temprana. Espejo - Carchi. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Constitución de la República del Ecuador. (2011). Capítulo tercero Art. 281. Soberanía Alimentaria. Quito; Asamblea Nacional del Ecuador. [https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4\\_ecu\\_const.pdf](https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4_ecu_const.pdf)
- Chanway, C., Anand R. y Yang h. (2014). 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. DOI: 10.5772/57532

- Crespo L. y Paz, J. (2012). Identificación y caracterización de *Rhizobium* nativo para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Díaz, C. (2010). *Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.), en la República Dominicana*. [Tesis de doctorado]. Universidad de León. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias.
- Ferrera, R. y Alarcón, A. (2007). Microbiología agrícola. Editorial Trillas. <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UES.157824>
- García, M., Pino J., Onderwater R., Wattiez R., Forte H., González J. y Vázquez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito (Ecuador). Estación Experimental Santa Catalina. (2008). Muestreo de suelos para su análisis químico.
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. *Fitosanidad* 14(3):189-195.
- García, M., Uruburu F. (2001). La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia, España. Temas de la actualidad»
- Gonzales, M. (2013). *Estudio de la diversidad de cepas de Rhizobium provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. [Tesis para optar el Título de Biólogo]. UINALM. Lima-Perú.
- Guamán, F., Torres, R., Granda, K y Nápoles, M. (2016). Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. en el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 40-47.
- Hernández, F., Ionel, N., María, C., Rosales, G., Pedro, R., Ramírez, P., Juan, F. y Ponte B., S. (2017). Tolerancia a la acidez de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 38(3), 55-57. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362017000300001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000300001)
- Hernández, J., Cubillos, H. y Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe Isolation of *Rhizobium* spp., associated two forage leguminous in the Caribbean Biotechnological Center. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2).
- INEC (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS EC). (2011) III Censo Nacional Agropecuario. Resultados Nacionales y Provinciales. Quito-Ecuador.
- Jerez, M. (2004). *Evaluación de Biotipos de Bradyrhizobium spp. en el cultivo del maní (Arachis hypogaea L.) en las provincias de Manabí y Loja*. [Título de ingeniero Agrónomo]. EC. UCE, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Lindström K., Murwira A., Willems, A. y Altier N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161(6), 453-463.
- López, M. (2002). *El uso de marcadores moleculares de ADN en el estudio de la biodiversidad de rizobios nodulantes de leguminosas silvestres del Noroeste Argentino*. [Tesis doctora]. Universidad Nacional de la Plata. Sistema Nacional de Repositorios Digitales.
- López A. y Rogelio L. (2017). Caracterización Morfológica y Bioquímica de Cepas de *Rhizobium* Colectadas en Frijol Común Silvestre y Domesticado. *Rev. Fitotec. Mex.*, 40(1), 73 – 81.
- Marquina M., González N. y Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(3), 1017-1036. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3375>
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S. y Sánchez J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos*, 77(2010), 15-23.
- Patil, S., Patil, D., Patil, M., Gaikwad, P., Bhamburdekar, S. y Patil, P. (2012) Isolation, characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* sp. from root nodules of some legumes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 1005-1008.
- Pantoja, J., Villalta, V., Basantes, E., y Montalvo, A. (2015). La aplicación de urea en secano resulta en menor producción de arveja (*Pisum sativum L.*), Var. INIAP 436 Liliana, en Ambuela, Perucho, Pichincha, Ecuador. En Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE (Vol. 10, No. 1, pp. 47-52).
- Pérez, A., Grisales, T. y Fuentes, J. (2011). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas en el municipio de Tolú en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3(1), 62-89. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n1.2011.254>
- Plazas, C. (2007). *Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras*. [Tesis de Microbióloga industrial]. Pontificia Universidad Javeriana. Revista de la corporación colombiana de investigación agropecuaria.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (2004). Microbiología. Traducida de la 5ta edición en inglés. Mac Graw Hill-Interamericana de España.
- Ribeiro, R., Martins T., Ormeño O., Delamuta J., Rogel M., Martínez R. (2015). *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. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000392>
- Rojas, D., Garrido M. y Bonilla R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 70-80. <https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/131>
- Rodríguez, M. (1993) Asociación *Rhizobium*-leguminosa. *Manual de Agromicrobiología*. Editorial Trillas. <https://acortar.link/MK5nmU>
- Ricillo, P., Munglia C., Brujin, F, Row, A., Booth, I. y Aguilar, O. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*, 182, 1748-1753. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692382/>
- Romero-Rojas, G. D. (2009). Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de "*Rhizobium*", asociadas a pueraria (*Pueraria phaseoloides*), como cultivo cobertura de la palma aceitera (*Elaeis guineensis jacq*). Quito, EC. ESPE, IASA II. pp. 112.
- Saldaña, J. (2017). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Rev. Iberoam. Prod. Académica y Gestión Educativa*, 4(7):1-22.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. (2017). Plan Nacional para el Buen Vivir 2017. SENPLADES. <https://observatorioplanificacion.cepal.org/es/planes/plan-nacional-de-desarrollo-2017-2021-toda-una-vida-de-ecuador>.
- Wang, T., J. Romero-Martínez & I. López-Lara. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis, cap. 8. In E. Martínez-Romero & J. Martínez-Romero (eds.). *Microbios*. Centro de investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Yadegari, M. y Rahmani H. (2010). 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. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1935.1939