

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**Efecto de una mezcla de Oligogalacturónidos en la simbiosis
Rhizobium-Phaseolus vulgaris L.**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO
ACADÉMICO DE MÁSTER EN BIOLOGÍA VEGETAL,
MENCIÓN FISIOLOGÍA VEGETAL**

Autor: Lic. Danurys Lara Acosta

**Tutores: Dr. C. María Caridad Nápoles García
Dr. C. Alejandro Falcón Rodríguez**

La Habana, 2020

UNIVERSIDAD DE LA HABANA
MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Efecto de una mezcla de Oligogalacturónidos en la simbiosis
Rhizobium-Phaseolus vulgaris L.

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO
ACADÉMICO DE MÁSTER EN BIOLOGÍA VEGETAL,
MENCIÓN FISIOLOGÍA VEGETAL

Autor: Lic. Danurys Lara Acosta

Tutores: Dr. C. María Caridad Nápoles García
Dr. C. Alejandro Falcón Rodríguez

La Habana, 2020

SÍNTESIS

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor consumo a nivel mundial por sus propiedades nutricionales. Sin embargo, su producción se ve limitada por la deficiencia de algunos nutrientes como el nitrógeno, a pesar de tener la capacidad de asociarse en simbiosis con bacterias de la familia de los rizobios que fijan el dinitrógeno de la atmósfera. Si bien la fijación simbiótica del nitrógeno es responsable de la mayor cantidad de nitrógeno biológicamente fijado en el planeta, la asociación rizobio-frijol es poco eficiente, por lo cual se buscan alternativas para mejorar su eficiencia y una de ellas es el empleo de bioproductos que mejoren el estado fisiológico de las plantas y favorezcan su interacción con estos microorganismos. En este trabajo se determinó el efecto de una mezcla de oligogalacturónidos en la simbiosis que se establece entre *Rhizobium*-frijol. Para ello se utilizó el bioestimulante Pectimorf® y se evaluó su efecto en la nodulación, fijación biológica del nitrógeno y en el crecimiento de plantas de frijol común, variedad Cuba Cueto-25-9-N, inoculadas con Azofert®-F. En el estudio se seleccionaron las concentraciones de Pectimorf® con un efecto positivo en la nodulación y el crecimiento, mediante su aplicación a las semillas conjuntamente con Azofert®-F y por aspersión foliar en plantas previamente inoculadas. Se evaluó, entonces, el efecto de las concentraciones seleccionadas en ambas formas de aplicación en la fijación biológica del nitrógeno y en el crecimiento, mediante experimentos en condiciones controladas y semicontroladas. La aplicación de Pectimorf® a plantas inoculadas incrementó las variables de nodulación, la fijación y la transformación del nitrógeno, favoreciendo la eficiencia del proceso simbiótico y el crecimiento. Los resultados demuestran que la aplicación de Pectimorf® en plantas biofertilizadas constituye una alternativa ecológica y económicamente viable para incrementar la fijación biológica del nitrógeno, proceso esencial en el cultivo del frijol, especialmente en condiciones de escaso nitrógeno.

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 El cultivo del frijol. Su importancia	4
2.1.1 Requerimientos del cultivo	6
2.1.1.1 Requerimientos nutricionales. El nitrógeno como requerimiento esencial.....	7
2.2 Fijación Biológica del Nitrógeno	9
2.2.1 Fijación Simbiótica del Nitrógeno.....	9
2.2.1.1 Nitrogenasa y mecanismo de acción	11
2.2.1.2 Factores que afectan la FSN. Cuantificación del nitrógeno fijado simbióticamente.....	13
2.2.1.3 Simbiosis <i>Rhizobium</i> -frijol	16
2.3 Bioestimulantes	18
2.3.1 Bioestimulantes microbianos	19
2.3.1.1 Azofert®	20
2.3.2 Bioestimulantes no microbianos	20
2.3.2.1 Oligosacarinas. Oligoglacturónidos. Pectimorf®.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Efecto de diferentes concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® en la nodulación y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas.....	26
3.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas a las semillas con el inoculante Azofert®-F, en la nodulación y el crecimiento	26
3.1.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas por aspersión foliar, en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F	27
3.2 Efecto Pectimorf® en la nodulación, FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F	27
3.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, en indicadores de la FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas	27

3.2.1.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación de plantas inoculadas con Azofert®-F	28
3.2.1.2 Efecto de Pectimorf® en la actividad Nitrogenasa de plantas inoculadas con Azofert®-F	29
3.2.1.3 Evaluación de la expresión génica de enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	29
3.2.1.4 Efecto de Pectimorf® en el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F	31
3.2.1.5 Efecto de Pectimorf® en la efectividad de la FBN de plantas inoculadas con Azofert®-F	31
3.2.2 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, el crecimiento, el contenido de ureidos y en el aporte de nutrientes en plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones semicontroladas	31
3.2.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación y el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F	32
3.2.2.2 Efecto de Pectimorf® en el contenido de ureidos de plantas inoculadas con Azofert®-F	32
3.2.2.3 Efecto de Pectimorf® en el contenido de nutrientes de plantas inoculadas con Azofert®-F	33
3.4 Diseño Experimental y Análisis Estadístico	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Efecto de diferentes concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® en la nodulación y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas	34
4.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas a las semillas con el inoculante Azofert®-F, en la nodulación y el crecimiento	34
4.1.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas por aspersión foliar, en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F	36
4.2 Efecto Pectimorf® en la nodulación, FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F	40
4.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, en indicadores de la FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas	40
4.2.1.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación de plantas inoculadas con Azofert®-F	40
4.2.1.2 Efecto de Pectimorf® en la actividad Nitrogenasa de plantas inoculadas con Azofert®-F	45

4.2.1.3 Evaluación de la expresión génica de enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	48
4.2.1.4 Efecto de Pectimorf® en el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F	51
4.2.1.5 Efecto de Pectimorf® en la efectividad de la FBN de plantas inoculadas con Azofert®-F	55
4.2.2 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, el crecimiento, el contenido de ureidos y en el aporte de nutrientes en plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones semicontroladas	56
4.2.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación y el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F.....	56
4.2.2.2 Efecto de Pectimorf® en el contenido de ureidos de plantas inoculadas con Azofert®-F	59
4.2.2.3 Efecto de Pectimorf® en el contenido de nutrientes de plantas inoculadas con Azofert®-F.....	61
4.3 Consideraciones generales	63
5. CONCLUSIONES	66
6. RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas comestibles más importantes, por constituir un complemento nutricional indispensable en la alimentación. Esta especie proporciona una fuente significativa de proteínas, vitaminas y minerales a la dieta humana (Rodríguez y Fernández, 2015; Polania *et al.*, 2016).

En Cuba, el frijol es un alimento de preferencia en la dieta diaria, constituye la fuente más barata de proteínas y de mayores ingresos para los pequeños productores. Por tal razón, en el país se trata de incrementar la producción de este cultivo. En el año 2018 se lograron producir 161 513 toneladas (FAO, 2020), sin embargo, esta cifra no satisface la demanda de consumo porque los rendimientos que se logran son bajos, por lo que es necesario importar grandes cantidades de este grano cada año (Calero *et al.*, 2018). El bajo rendimiento de este cultivo en nuestras condiciones responde a diversos factores como: los cambios drásticos en el clima, la presencia de plagas y enfermedades y la deficiencia de nutrientes en los suelos (Faure *et al.*, 2016).

Entre los nutrientes necesarios para el desarrollo del frijol, el nitrógeno constituye uno de los elementos esenciales limitantes (Xin *et al.*, 2014; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2018). Para incrementar la disponibilidad de este nutriente y mejorar la productividad del cultivo, se introducen al suelo fertilizantes inorgánicos (Rincón *et al.*, 2012), lo que se ha convertido en una práctica costosa que provoca en ocasiones serias consecuencias ambientales (Rincón *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2014; Yong *et al.*, 2018).

Una alternativa económica y natural a la fertilización inorgánica en el frijol, y en las leguminosas en general, es la obtención de nitrógeno a partir de la fijación biológica, proceso que permite que estas plantas puedan crecer en suelos con escasa disponibilidad de este nutriente. Esto se debe a su capacidad para establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo llamadas rizobios. Mediante este proceso estos microorganismos transforman el dinitrógeno (N₂) atmosférico en formas asimilables para las plantas (Ramírez-Bahena *et al.*, 2016; Koskey *et al.*, 2017). Sin embargo, las leguminosas son muy variables en cuanto a su eficiencia para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis, y el frijol común está considerado dentro de las estudiadas, la menos eficiente en este proceso (Slatni *et al.*, 2008; Granda *et al.*, 2009; Polania *et al.*, 2016).

Desde hace algunos años se trabaja en el mejoramiento de la relación simbiótica que se establece entre especies de *Rhizobium* y el frijol, para lo cual se buscan cepas más competitivas y eficientes, variedades más susceptibles y el desarrollo de inoculantes y formulaciones más complejas. En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas se desarrolló un producto denominado comercialmente Azofert®-F, que contiene cepas de rizobios seleccionadas por su competitividad y eficiencia, así como altas concentraciones de factores de nodulación, moléculas que generan una mayor producción de señales por la bacteria, lo que influye en el éxito de la simbiosis (Nápoles *et al.*, 2016a).

El producto Azofert®-F y los inoculantes a base de rizobios en general, son reconocidos bioestimulantes microbianos o biofertilizantes, que se emplean con frecuencia para disminuir el uso de fertilizantes inorgánicos, además constituyen una alternativa económica y asequible para los pequeños agricultores, de escasos recursos (Koskey *et al.*, 2017). En frijol, Azofert® favorece el crecimiento de las plantas, aumenta el peso de los granos y el rendimiento (Hernández y Salido, 2019), además incrementa el contenido de nitrógeno en las hojas trifoliadas (Martínez *et al.*, 2016) y minimiza los efectos ocasionados por el estrés abiótico (Estrada *et al.*, 2017).

En otras leguminosas, como la soya, la aplicación combinada de Azofert® con bioestimulantes no microbiados ha mostrado resultados positivos en la nodulación (Costales y Falcón, 2018), el crecimiento (Corbera y Nápoles, 2013) y el rendimiento (Ayala *et al.*, 2013), superiores a los obtenidos cuando solo se aplica el biofertilizante. Por lo que una solución a la baja eficiencia en la fijación de nitrógeno y al bajo rendimiento del frijol pudiera ser la combinación de este inoculante con un bioestimulante no microbiano con potencialidades en el cultivo.

Entre los bioestimulantes no microbianos, las oligosacarinas destacan por sus resultados en la agricultura, con efectos biológicos demostrados en diversas plantas. Dentro de estas moléculas las más estudiadas son los oligogalacturónidos (OGAs), los quitosanos y los factores de nodulación producidos por bacterias de la familia de los rizobios (Falcón *et al.*, 2015). La mezcla de OGAs denominada comercialmente Pectimorf® estimula el enraizamiento, el crecimiento y la diferenciación celular de diferentes especies vegetales (Cabrera *et al.*, 2013; Falcón *et al.*, 2015). Además, puede activar mecanismos de defensa y disminuir o atenuar el estrés ambiental en las plantas (Falcón *et al.*, 2015; Dell'Amico *et al.*, 2017, Núñez *et al.*, 2018). En el frijol la aplicación de Pectimorf® modifica los patrones de distribución y morfogénesis estomática

(Álvarez y Reynaldo, 2015), aumenta el rendimiento (Moreno, 2018) y minimiza los efectos provocados por el estrés hídrico (Dell'Amico *et al.*, 2017).

Aunque se han realizado estudios con los bioestimulantes Azofert®-F y Pectimorf® en frijol, aún no se ha estudiado el efecto de esta mezcla de OGAs en la simbiosis *Rhizobium*-frijol, con el objetivo de potenciar la nutrición nitrogenada y el crecimiento del cultivo. Por tanto, se propone como **hipótesis** de este trabajo:

La aplicación de Pectimorf® favorece la interacción simbiótica *Rhizobium*-frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Basado en esta hipótesis se plantea como **objetivo general**:

Determinar el efecto de la aplicación de Pectimorf® en la nodulación, la fijación biológica del nitrógeno y en el crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con Azofert®-F.

Para dar cumplimiento al objetivo general se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Definir la concentración y forma de aplicación de Pectimorf® más efectiva en la estimulación de la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F.
2. Evaluar el efecto de Pectimorf® en la fijación biológica del nitrógeno en plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo del frijol. Su importancia

El frijol común es una leguminosa que pertenece a la Familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, al género *Phaseolus* y a la especie *Phaseolus vulgaris*. Esta leguminosa se originó y domesticó en América Latina y los Incas fueron quienes lo introdujeron en Suramérica. Existen registros de semillas de 3 000 años de antigüedad, por lo que se considera uno de los cultivos más antiguos (Torres *et al.*, 2013; Lara, 2015). En la actualidad es la especie más cultivada dentro del género *Phaseolus* (Pliego *et al.*, 2013).

El frijol es la leguminosa más importante en el consumo humano, constituye un complemento nutricional indispensable en la dieta diaria de más de 300 millones de personas en el mundo y es un componente importante en los sistemas de producción agrícola. Su grano se considera estratégico, no solo por sus propiedades nutricionales y culinarias, sino además, por su presencia en los cinco continentes y su importancia para el desarrollo rural y social de muchas economías (Magaña *et al.*, 2015).

El valor nutricional de este cultivo radica, básicamente, en su alto contenido proteico, que oscila entre el 20 y 25 % del peso de las semillas secas; 2,5 veces mayor al de los cereales (Treviño y Rosa, 2013). Dentro del contenido de proteínas se destaca la abundancia de lisina y el bajo contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Ulloa *et al.*, 2011). Además de presentar proteínas, posee fibras (3 a 8 %), glúcidos (55 a 65 %), lípidos (15 %) y minerales (3 a 5 %) (Zumaran *et al.*, 2017). De manera adicional a estos compuestos, posee elevada cantidad de calcio, hierro y vitaminas tales como la tiamina y el ácido fólico (Ulloa *et al.*, 2011).

Las propiedades del frijol contribuyen a la prevención de enfermedades del corazón, del tubo digestivo y a evitar la obesidad. Es por ello que instituciones médicas a nivel mundial promueven su consumo, convirtiéndolo en un producto comercialmente atractivo (Ganesan y Xu, 2017).

En el contexto agrícola, el frijol funciona como abono o mejorador de las condiciones del suelo; como forraje verde es un excelente cultivo, apetecido por el ganado. Cuando se cultiva intercalado con otras plantas, como la soya y el sorgo se obtiene mayor rendimiento y un forraje más equilibrado en nutrientes (Méndez *et al.*, 2011).

La producción mundial del frijol ha ido en ascenso con el paso de los años, debido a la implementación de tecnologías y metodologías para su cultivo. En el año 2016 la producción estuvo alrededor de los 26,8 millones de toneladas. En ese año América Latina logró producir el 45 % de la producción mundial de frijol, seguido por África con un 20 % (Guzmán *et al.*, 2019). En el año 2017 la producción mundial de este grano se incrementó en 4,6 millones de toneladas con respecto al año anterior, destacándose Asia y América como los mayores productores, con cifras de 15,4 y 7,9 millones de toneladas, respectivamente. En este último continente el mayor productor fue Estados Unidos con 1 700 510 toneladas con un rendimiento de 2,08 t ha⁻¹. En el año 2018, en América Latina los mayores rendimientos los alcanzaron Chile, Bolivia y Colombia con 1,47; 1,32 y 1,22 t ha⁻¹, respectivamente (FAO, 2020).

En Cuba, la mayor parte de la producción de este grano se obtiene en condiciones de insuficiencia tecnológica, con poco uso de plaguicidas, fertilizantes y escasos sistemas de riego. Más del 85 % de la superficie que se cultiva en el país se encuentra en condiciones de secano (Faure *et al.*, 2016). A pesar de estas condiciones desfavorables, en el año 2017 Cuba alcanzó una productividad de 132 174 toneladas, con un rendimiento de 1,1 t ha⁻¹, cifra que incrementó en el año 2018 a 161 513 toneladas, sin embargo, el rendimiento fue de 1,09 t ha⁻¹ (FAO, 2020).

Los países de mayores niveles de consumo per cápita de frijol común se ubican generalmente en la región tropical del planeta. En América Latina el consumo es de 4 a 17 kg por año. Mientras que en África Oriental el consumo per cápita de frijol es de 50 a 60 kg por año, destacándose como los mayores consumidores Kenia, Ruanda y Uganda (Menge *et al.*, 2018). Cuba es uno de los países de América Latina que más consume esta leguminosa. En la actualidad la demanda es mucho mayor que la producción, por lo que nuestro país depende de las importaciones para cubrir el consumo doméstico de este grano, las cuales han provocado erogaciones en el orden de los 20 millones de dólares en los últimos años (ONEI, 2019).

El país cuenta con 40 variedades de frijol común, dentro de estas se incluye Cuba Cueto-25-9-N (Faure *et al.*, 2016). Esta variedad es procedente del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), tiene hábito de crecimiento indeterminado tipo III (postrado), el color del grano es negro y el peso de 100 semillas es de 22,5 g. Su periodo de siembra corresponde a los meses de septiembre a diciembre, aunque el periodo óptimo es del 15 de octubre al 30 de diciembre. La distancia de siembra recomendada es de 0,90 -

0,70 m de camellón por 0,08 - 0,10 m de narigón. La densidad de siembra comprende entre 10 y 12 plantas m⁻¹ lineal y la cantidad de semilla a emplear para la siembra oscila entre los 50 y 55 kg ha⁻¹. El ciclo económico demora entre 95 y 105 días. Esta variedad de frijol es tolerante a la roya (*Uromyces phaseoli*), al tizón común bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*), a la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), a la bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y al tizón de la raíz (*Sclerotium rolfsii*); y resulta resistente al virus del mosaico común (BCMV) (Fernández *et al.*, 2014). Por su comportamiento ante las enfermedades y manejo agronómico se incluye dentro de las 25 variedades de frijol común seleccionadas para facilitar el plan estatal de producción de semillas en Cuba (Faure *et al.*, 2016).

2.1.1 Requerimientos del cultivo

El cultivo del frijol para su desarrollo requiere transitar por diez etapas, que corresponden a un estado específico de desarrollo fisiológico. La fase vegetativa contempla cuatro etapas que comienzan con la germinación de la semilla (V0) y terminan con el despliegue del tercer trifolio (V4). La fase reproductiva del cultivo comienza con la prefloración, seguido de la floración, formación de las vainas, llenado de las vainas y por último la maduración, que no es más que el secado de las vainas. Esta fase de desarrollo del cultivo va desde R5 hasta R9 (Fernández *et al.*, 1986).

El periodo de siembra del frijol en Cuba se extiende desde el 1 de septiembre al 30 de enero, con fecha óptima del 15 de octubre al 30 de noviembre. En el caso de las áreas sin riego se recomienda sembrar entre el 1 de septiembre y el 15 de octubre (Faure *et al.*, 2016). Se plantea que la época de siembra para el frijol es aquella que ofrece las condiciones climáticas más adecuadas para un buen desarrollo (Martínez *et al.*, 2015).

Este cultivo se adapta a una diversidad de suelos y climas, aunque prefiere suelos con buen contenido de materia orgánica, plasticidad media, buena aireación y una excelente capacidad de drenaje natural. La topografía debe ser idealmente llana, aunque puede cultivarse en terrenos ligeramente inclinados. La preparación del suelo debe hacerse a una profundidad mínima de 30 cm y preferiblemente de 40 cm, para facilitar el desarrollo de las raíces de las plantas (Lardizabal *et al.*, 2013).

El rango de temperatura idónea para el crecimiento de esta especie de frijol es de 10 a 30 °C, encontrándose el óptimo para su germinación entre 16 y 29 °C. Las temperaturas por debajo de 0 °C o superiores a 40 °C pueden provocar daños irreversibles en el cultivo. Se plantea que valores de temperaturas por encima de los 30 °C afectan la floración, causando un aborto excesivo de flores o la aparición de deformaciones en las vainas, así como la separación o caída de los órganos reproductivos, lo que reduce el rendimiento. Las bajas temperaturas, sin embargo, retardan el crecimiento y las vainas tienden a desarrollarse en forma de “ganchillo” (Lardizabal *et al.*, 2013). Las temperaturas medias óptimas para el desarrollo del cultivo en épocas de otoño-invierno oscilan entre los 20 y 28 °C (Treviño y Rosa, 2013).

La humedad óptima para este cultivo varía en dependencia de las etapas de desarrollo de la planta. La humedad relativa debe estar en un rango entre 60 y 65 % en su primera etapa de desarrollo, y entre 65 y 70 % en las etapas siguientes. Las condiciones de humedad excesiva favorecen el desarrollo de enfermedades y dificultan la fecundación (Faure *et al.*, 2016), por lo que el periodo seco es el más idóneo para el desarrollo del frijol común (González *et al.*, 2017). Por tal razón, es necesario el riego del cultivo, principalmente, en las etapas críticas como la germinación, la floración, la formación de vainas y el llenado de las mismas (Faure *et al.*, 2016).

2.1.1.1 Requerimientos nutricionales. El nitrógeno como requerimiento esencial

El frijol requiere de determinados nutrientes que por su funcionalidad en la fisiología y en el metabolismo son considerados esenciales para su crecimiento y desarrollo, dentro de estos se incluyen nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) (Bernal *et al.*, 2007). Los requerimientos de estos nutrientes varían según las diferentes variedades y poblaciones. En una población de 250-300 mil plantas ha⁻¹, el promedio de absorción de nitrógeno es de 133,8 kg ha⁻¹, el de fósforo de 16,0 kg ha⁻¹ y el de potasio de 116,6 kg ha⁻¹. A causa de la deficiencia de estos elementos en el suelo se emplea el paquete tecnológico que contempla la fórmula completa (NPK) 8-24-16, con una dosis de 375 kg ha⁻¹. Se recomienda, además, aplicar urea a los 15 días de la siembra, con una dosis de 200 kg ha⁻¹, para suplir las necesidades de nitrógeno (Faure *et al.*, 2016).

El fósforo es esencial en la formación de estructuras biológicas como las nucleoproteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, que tienen múltiples funciones en el metabolismo de las plantas. Este elemento es importante en el transporte y transferencia de energía en los procesos metabólicos, en

forma de ATP. Esta molécula es necesaria en la fotosíntesis, la transformación de azúcares y almidones y en la translocación de nutrientes dentro de la planta. La ausencia de fósforo afecta el crecimiento de las hojas, hace más intenso su color y provoca que se acumule glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en hojas y en raíces (Bernal *et al.*, 2007).

El potasio se distribuye con suma facilidad de los órganos maduros a los juveniles, dada su solubilidad y su baja afinidad por los ligandos orgánicos, con los que se intercambia fácilmente. Desempeña un papel clave en la osmorregulación que tiene lugar en los procesos de apertura y cierre estomáticos y en la activación de algunas enzimas (oxidorreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetasas y quinasas). Su deficiencia produce pérdida de turgencia y marchitamiento y retrasa el crecimiento, lo que origina una reducción de la cosecha (Bonilla, 2008).

El nitrógeno es el elemento que el frijol requiere en mayor cantidad (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2018). Su importancia radica en la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, azúcares aminados y otros compuestos (Ferguson *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2013; Kuypers *et al.*, 2018). Se absorbe como elemento inorgánico por la raíz en forma de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-). Estos iones se transforman en nitrógeno orgánico para producir moléculas necesarias en el metabolismo y en la formación de estructuras en la planta (Jeannotte, 2014).

Un abastecimiento adecuado de nitrógeno favorece la síntesis de proteínas y un desarrollo vigoroso de las plantas. Sin embargo, un aporte excesivo de este elemento puede provocar un desarrollo vegetativo anormal, retraso y reducción de la floración y la maduración; lo que trae como consecuencia un alargamiento del ciclo vegetativo del cultivo (Cedano *et al.*, 2000). Algunas especies vegetales muestran reducción del crecimiento, hojas pequeñas y sistema radical raquítico, cuando son expuestas a altas concentraciones de este mineral y en casos severos conduce a la muerte de la planta. Según Sánchez *et al.* (2006), la toxicidad por nitrógeno tiene un efecto más negativo en la producción de biomasa que la deficiencia en este elemento. En el caso del frijol la deficiencia de nitrógeno se considera poco trascendente, dada la capacidad de fijar parte del elemento requerido para su desarrollo, por medio de la asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (Tikhonovich y Provorov, 2011; Rai *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013, Nápoles *et al.*, 2016a).

2.2 Fijación Biológica del Nitrógeno

El nitrógeno en forma natural, es uno de los elementos más extensamente distribuidos en la naturaleza. El mayor reservorio de nitrógeno se encuentra en la atmósfera, en forma de gas (N_2), con una abundancia del 78 %. Esta forma de nitrógeno no es metabólicamente asimilada por las plantas, debido a que la molécula presenta un triple enlace que la hace estable e inerte (Ferguson *et al.*, 2010). Algunos organismos procariotas, sin embargo, tienen la capacidad de reducir el N_2 contenido en el aire a amonio (NH_4^+) mediante la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Shah, 2014; Kuyper *et al.*, 2018).

La FBN es un proceso catalizado por el complejo enzimático Nitrogenasa, que está presente en algunas bacterias. Estos microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico son denominados diazótrofos, ellos pueden llegar a fijar 10^{11} kg de este mineral por año (Rueda *et al.*, 2015). Estas bacterias se pueden encontrar en condiciones de vida libre, donde generan amonio para su propio uso, o en asociaciones de diferentes grados de complejidad con las plantas. Este rango varía desde interacciones menos fuertes como la asociativa, hasta asociaciones complejas como la simbiótica. Dentro de la FBN, la Fijación Simbiótica del Nitrógeno (FSN) es considerada la de mayor contribución a la fertilidad de los suelos, a la producción de alimentos para el hombre y los animales, y a la racionalización en la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Chanway *et al.*, 2014.).

2.2.1 Fijación Simbiótica del Nitrógeno

La FSN es el resultado de la cooperación beneficiosa mutua que se establece entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas, la más conocida e importante desde una perspectiva agronómica es la que se establece entre rizobios y leguminosas (Chanway *et al.*, 2014). Los rizobios son un grupo genéticamente diverso y fisiológicamente heterogéneo de bacterias diazótrofes. Los géneros más estudiados son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium* (Velhal *et al.*, 2014). Mediante este proceso algunas leguminosas pueden obtener de un 60 a un 80 % del nitrógeno que requieren para su crecimiento y desarrollo, lo que posibilita que puedan crecer en suelos deficientes de este mineral (Wang *et al.*, 2018).

El establecimiento de una simbiosis efectiva entre las leguminosas y los rizobios es un proceso complejo, en el que se diferencian dos momentos fundamentales: reconocimiento rizobio-

leguminosa y formación del nódulo (Streng *et al.*, 2011). El primero se distingue por la comunicación química que se establece entre los simbioses, la leguminosa excreta en sus exudados radicales diversas señales que son reconocidas por el rizobio y que inducen la expresión de una cascada de genes bacterianos, lo que conlleva a la síntesis de factores Nod (lipoquitooligosacáridos) (Janczarek *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). La naturaleza de los exudados determina en parte la especificidad de la relación simbiótica, ya que cada especie de rizobio responde a compuestos específicos (Ferguson *et al.*, 2010).

Los factores Nod consisten en un esqueleto de 3 a 5 moléculas de N-acetil-glucosamina, que en el grupo amino del extremo no reducido se encuentra acilado con un ácido graso de 16 a 20 átomos de carbono de largo (C16-C20) (Streng *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). Los diferentes sustituyentes de estos factores, unidos a la cadena principal del oligosacárido, constituyen determinantes también de la especificidad de la simbiosis. La percepción de factores Nod por receptores de membrana en el huésped (leguminosa), produce ciertos cambios fisiológicos y morfológicos en los pelos radicales (activación de canales del núcleo y del citoplasma, despolarización y elevación de la concentración de calcio citosólico, deformación de los pelos radicales), lo que da lugar a la formación del nódulo (Ferguson *et al.*, 2010).

Una vez dentro del nódulo, las bacterias se multiplican y se convierten en bacteroides, los que son envueltos en una membrana (peribacteroidea) de origen vegetal, formando los simbiosomas, donde se realiza la fijación de nitrógeno (Wang *et al.*, 2018). Cuando los simbiosomas están completamente formados se inicia la síntesis de la Leghemoglobina, proteína que da color rosado rojizo al interior del nódulo y que está involucrada en el transporte de oxígeno (Koskey *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de nódulos, los nódulos de crecimiento determinado (NCD), presentes en géneros como *Glycine*, *Lotus* y *Phaseolus* y los nódulos de crecimiento indeterminado (NCI), que están presentes en géneros como *Medicago*, *Trifolium* y *Pisum*. Los primeros resultan de las divisiones celulares en la corteza media/externa de la raíz, carecen de un meristemo persistente y tienen forma esférica. Las divisiones celulares de un nódulo determinado cesan en las primeras etapas de desarrollo y el nódulo maduro se desarrolla a través del alargamiento celular. Las células infectadas se desarrollan más o menos sincrónicamente a la etapa de fijación de nitrógeno. Los de crecimiento indeterminado se originan a partir de divisiones celulares en la corteza interna

y poseen un meristemo apical persistente que confiere a los nódulos una forma cilíndrica, con un gradiente de desarrollo desde el ápice hasta la base del nódulo (Ferguson *et al.*, 2010; Kohlen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

En los nódulos, el nitrógeno atmosférico se transforma en NH_4^+ mediante la acción de la enzima Nitrogenasa, luego este amonio es incorporado a los esqueletos carbonados para dar lugar a aminoácidos (Hungria y Kaschuk, 2014). Este proceso puede transcurrir por dos rutas, la primera mediante las enzimas Glutamina sintetasa (GS) y Glutamato sintasa (GOGAT), donde se producen dos moléculas de glutamato y se consume una molécula de adenosintrifosfato (ATP). Mientras que la otra vía consiste en la aminación reversible del α -cetoglutarato por la enzima Glutamato deshidrogenasa (GDH), produciéndose glutamato (Chalk *et al.*, 2017). Aunque la vía GS/GOGAT presenta mayor costo energético que la vía que cataliza la GDH, la enzima GS presenta un valor de K_m inferior al de la enzima GDH. Esto garantiza que la vía GS/GOGAT sea preferencial (Freixas, 2010).

El nitrógeno fijado se convierte finalmente en ureidos o amidas y, posteriormente, se transporta hacia las hojas a través del xilema (Rodrigues *et al.*, 2013; Hungria y Kaschuk, 2014). A cambio, los rizobios reciben de la planta energía y carbono (Bensmihen, 2015; Polania *et al.*, 2016).

Mediante la asociación simbiótica las leguminosas pueden fijar de la atmósfera hasta 190 kg N $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$, tanto en ecosistemas naturales como en sistemas de cultivos. La soya (*Glycine max* L.) en simbiosis con *Bradyrhizobium* puede fijar de 100 a 150 kg N $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$, en el caso de caupí (*Vigna unguiculata* L.) este valor es de 90 kg N $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$. En asociación con *Rhizobium*, lupinus (*Lupinus* sp L.) fija de 60 a 100 kg N $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de 20 a 80 kg N $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ (Kakraliya *et al.*, 2018).

2.2.1.1 Nitrogenasa y mecanismo de acción

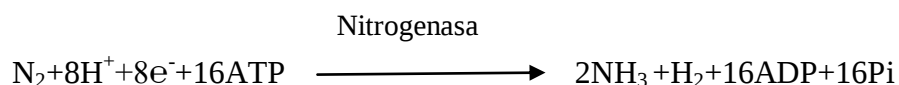
Los rizobios convierten el N_2 en NH_4^+ porque presentan el complejo enzimático Nitrogenasa (Keable *et al.*, 2018; Kuyper *et al.*, 2018). Esta enzima es una proteína dimérica que contiene una subunidad menor denominada proteína-hierro (Fe) o dinitrogenasa reductasa. La proteína-Fe está compuesta por dos subunidades idénticas (α_2), unidas por un cluster de $[4\text{Fe-4S}]$ y presenta un sitio de unión a magnesio (Mg) y a ATP, en cada subunidad (Rolff y Tucek, 2013). Su actividad principal se basa en la liberación de electrones a la subunidad mayor de la Nitrogenasa, que es

dependiente de molibdeno (Mo) y se denomina proteína-MoFe ó dinitrogenasa. Esta subunidad polipeptídica está formada fundamentalmente por un cluster metálico, que constituye el sitio activo (Keable *et al.*, 2018). La proteína-MoFe contiene 2 polipéptidos ($\alpha\beta$) y en su conjunto forman un dímero ($\alpha_2\beta_2$). Cada subunidad α se une a un cofactor MoFe y en la interfase de unión de la subunidad α a la β se enlaza otro clúster metálico denominado P-cluster [8Fe-7S], que actúa como intermediario en la transferencia de electrones (Rolff y Tucek, 2013; Keable *et al.*, 2018).

El primer paso del mecanismo de acción de la Nitrogenasa se basa en la activación de la subunidad menor o proteína-Fe. Esta etapa transcurre mediante la unión de dos moléculas de Mg y ATP a sus sitios específicos y el cluster [4Fe-4S] en su estado reducido (Morgan *et al.*, 2005). Posteriormente, ocurre la unión de la proteína-Fe a una subunidad de la proteína-MoFe, que garantiza la hidrólisis de las dos moléculas de ATP. Esta hidrólisis permite la transferencia de un electrón de la proteína-Fe al P-cluster de la proteína-MoFe. Consecutivamente, el electrón se transfiere al cofactor MoFe, el cual se une al sustrato (N_2), para que finalmente se reduzca a NH_4^+ (Igarashi y Seefeldt, 2003).

Posterior a cada evento de transferencia electrónica, la proteína-Fe se disocia, intercambia ADP por ATP y el cluster [4Fe-4S] se disocia por una pequeña proteína que transfiere electrones (ferredoxina o flavodoxina), a partir de coenzimas reducidas provenientes de la respiración del bacterioide (Ladrera *et al.*, 2007). Este ciclo debe cumplirse al menos ocho veces por cada molécula de N_2 que se reduce y de dihidrógeno que se produce (Igarashi y Seefeldt, 2003).

El proceso de fijación del N_2 es energéticamente costoso, requiere de 16 moléculas de ATP por cada N_2 que se reduce (Rolff y Tucek, 2013; Kuyper *et al.*, 2018):



La enzima Nitrogenasa es sumamente susceptible a la inactivación por el oxígeno (Kuyper *et al.*, 2018). Además, su actividad puede afectarse en condiciones de deficiencia de fósforo, como consecuencia de la inhibición de reacciones dependientes del ATP (Divito y Sadras, 2014). Su actividad también disminuye en ambientes con altas temperaturas (Hungria y Kaschuk, 2014).

2.2.1.2 Factores que afectan la FSN. Cuantificación del nitrógeno fijado simbióticamente

La fijación eficiente de nitrógeno depende de la planta hospedera, de los rizobios, el suelo y el ambiente, factores que provoquen alteraciones en alguno de ellos puede limitar la simbiosis y la FBN (Rodrigues *et al.*, 2013). Dentro de estos factores se destacan: la capacidad de fijación de la especie o de la variedad de la planta y su estado nutricional (Liu *et al.*, 2011), la abundancia, competencia y eficiencia de rizobios afines al cultivo (Torabian *et al.*, 2019) la temperatura (Hungria y Kaschuk, 2014), la permeabilidad al oxígeno, la humedad, el pH (Torabian *et al.*, 2019) y el contenido de nutrientes en el suelo como nitrógeno, fósforo, calcio, aluminio, molibdeno (Divito y Sadras, 2014) y el hierro (Slatni *et al.*, 2008); así como el estrés abiótico (Torabian *et al.*, 2019).

Entre las especies de leguminosas existen diferencias en cuanto a su eficiencia para fijar nitrógeno atmosférico. La soya mediante este proceso puede fijar hasta $150 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, sin embargo, lupinus y frijol solo pueden fijar hasta 100 y $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, respectivamente (Kakraliya *et al.*, 2018). También existen diferencias en la capacidad de fijación entre variedades de una misma especie. Polania *et al.* (2016), mediante la técnica isotópica del ^{15}N estimaron la FBN en 36 genotipos de frijol común y observaron diferencias en la capacidad de fijación entre ellos. Otros autores como Granda *et al.* (2016a) evaluaron el efecto de la inoculación de siete cepas de *Rhizobium* en los genotipos de frijol común BAT-304 e ICA Pijao y demostraron a partir de determinar el número, masa fresca y seca de los nódulos y el porcentaje de nitrógeno en la parte aérea de las plantas, una variabilidad en la capacidad de fijación de este nutriente entre los genotipos estudiados.

La abundancia de rizobios en interacción con la raíz no es el único factor que puede limitar la FSN, con relación al papel de la bacteria en este proceso, sino que la competencia entre rizobios por la alta promiscuidad de algunas leguminosas pueden influir negativamente en el éxito de la simbiosis (Cardoso *et al.*, 2012). da Conceição *et al.*, (2018) demostraron que dos cepas de *Bradyrhizobium* (*B. diazoefficiens* y *B. elkanii*) que establecen simbiosis con el frijol común no entran a la célula vegetal para formar bacteroides efectivos, sino que se quedan en los espacios intercelulares, lo que provoca que no ocurra el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico. La capacidad que tiene el frijol común de establecer simbiosis con un gran número de especies de

rizobios que no forman bacteroides efectivos podría limitar la asociación con cepas de *Rhizobium* más efectivas en la fijación de nitrógeno

Las altas temperaturas reducen la viabilidad de los rizobios en el suelo, afectan el proceso de señalización entre la planta y estos microorganismos e inhiben la actividad Nitrogenasa. Además, afectan la fotosíntesis y el metabolismo del carbono en las plantas. En frijol común, temperaturas en el suelo por encima de 28 °C disminuyen la fijación de nitrógeno y de 38 °C inhiben la formación de los nódulos (Hungria y Kaschuk, 2014). Las bajas temperaturas también tienen efectos negativos en la nodulación y en la actividad Nitrogenasa (Torabian *et al.*, 2019).

En suelos ácidos disminuye la persistencia de cepas de *Rhizobium*, la nodulación y la fijación de nitrógeno, aunque existe un pequeño número de especies de rizobios que sobreviven en suelos con valores de pH de 4,5 a 5,0 (Torabian *et al.*, 2019). Los suelos alcalinos también pueden tener un impacto negativo en la supervivencia de estas bacterias, en la nodulación y en la actividad de los nódulos (Thilakarathna y Raizada, 2018). En cultivos como *Vicia faba* L. y *Lupinus albus* L. la nodulación se favorece a pH 5,5; sin embargo en *Phaseolus vulgaris* L. y *Medicago truncatula* L. este proceso se incrementa a pH cercano al neutro (Torabian *et al.*, 2019).

La fijación de nitrógeno también se afecta cuando el cultivo es expuesto a ambientes con elevada disponibilidad de nitratos. En estas condiciones se inhibe la fijación biológica porque resulta más costosa en términos energéticos que si la planta utiliza el nitrógeno inorgánico del suelo. En plantas de soya cultivadas con solución nutritiva libre de nitrógeno, a las que se le suministró 10 mM de nitrato desde los 12 hasta los 17 días, el nitrato provocó la inhibición del crecimiento de los nódulos y la disminución en la fijación de nitrógeno (Yamashita *et al.*, 2019).

El carbono es un elemento fundamental en la FBN. Los esqueletos carbonados (sacarosa) que se transportan por el floema desde la parte aérea hasta los nódulos se emplean en la síntesis de los compuestos nitrogenados. Además, son importantes en la obtención de poder reductor y energía en el bacteroide, para su respiración y la actividad Nitrogenasa. En nódulos de *Lupinus albus* L. se determinó que el costo de carbono por gramo de nitrógeno fijado es 3,64 g, mientras que en caupí es 1,54 g (Liu *et al.*, 2011).

La disponibilidad de fósforo también es crítica para la actividad de los nódulos, debido al elevado requerimiento de ATP para el funcionamiento de la enzima Nitrogenasa. También tiene un papel

importante en la biosíntesis de membranas, en la transmisión de señales y en el desarrollo general del nódulo. La deficiencia de fósforo, potasio y azufre disminuye el número y la actividad de los nódulos (Divito y Sadras, 2014).

Condiciones de salinidad en el suelo disminuyen las poblaciones de rizobios, al igual que la capacidad de las plantas para formar nódulos. Además, de que se afecta de manera directa el proceso de FSN por la disminución de la actividad de la enzima Nitrogenasa y los niveles de Leghemoglobina en el interior de los nódulos formados (Gómez *et al.*, 2013). La reducción en la eficiencia de la fijación biológica bajo estrés salino es una consecuencia de la disminución en el aporte de fotosintatos al nódulo, de la reducción en el suministro de sustratos respiratorios a los bacteroides y de la alteración de la barrera de difusión al oxígeno (Pliego *et al.*, 2003).

La sequía es otro de los estreses abióticos que también afectan la simbiosis. A causa de este estrés disminuye el número y tamaño de los nódulos formados, así como su eficiencia (Polania *et al.*, 2016). Durante la sequía disminuye la disponibilidad de carbono y oxígeno en los nódulos y se acumulan los productos de la fijación de nitrógeno en la planta, lo que repercute negativamente en la FBN (Freixas *et al.*, 2011).

Para la medición de la FSN se emplean diferentes metodologías:

I.-La técnica de reducción del acetileno, descrita por Hardy *et al.* (1968) que mide la actividad de la enzima Nitrogenasa de manera puntual y en un corto periodo de tiempo (Polania *et al.*, 2016).

II.-Las técnicas isotópicas del ^{15}N , que permiten distinguir la proporción de nitrógeno en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y entregan valores de fijación de nitrógeno integrados para todo un ciclo de crecimiento (Chalk *et al.*, 2017). Se consideran como las únicas técnicas que ofrecen cuantificaciones globales de la FBN (García *et al.*, 2003).

III.-La técnica de diferencias en la acumulación de nitrógeno total o el rendimiento de materia seca, que cuantifica el porcentaje de nitrógeno en plantas fijadoras y no fijadoras (cultivos de referencia) (Resende *et al.*, 2003).

IV.-La técnica de ureidos, que utiliza la abundancia de ureidos en la savia del xilema como medida indirecta de la proporción de nitrógeno de la planta derivado de la FBN (Polania *et al.*, 2016). Esta técnica se emplea debido a que existen importantes diferencias en las formas

principales de nitrógeno transportadas en el xilema de leguminosas noduladas y no noduladas (Giller y Wilson, 1991).

A pesar de que son varias las metodologías que se pueden emplear, no se cuenta con un método adecuado para determinar dicho proceso, ya que no existe información precisa sobre la real capacidad de fijación. Cada método tiene ventajas y limitaciones, estos pueden depender de la disponibilidad y adecuada determinación de la FBN, para cualquier especie de leguminosa cultivada bajo todas las posibles variantes de suelo y ambientes (Campillo *et al.*, 2003).

Grageda-Cabrera *et al.* (2003) compararon diferentes métodos para estimar la fijación de nitrógeno en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Bayocel, en condiciones de campo y en diferentes momentos de crecimiento del cultivo. En este estudio la actividad reductora de acetileno fue mayor en la etapa de floración (54 días después de la siembra (DDS)) con una actividad de 4,348 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En esta misma etapa el mayor contenido de ureidos correspondió a los tallos con valores de 140 $\mu\text{M planta}^{-1}$. La técnica isotópica del ^{15}N fue otra de las metodologías que emplearon, a partir de ella determinaron que la proporción de nitrógeno en las plantas procedente de la atmósfera fue de 27,39 kg ha^{-1} a los 56 DDS, valor que incrementó a lo largo del ciclo del cultivo. La mayor fijación se observó en la etapa que corresponde al llenado de las vainas, pero solo el contenido de ureidos en tallo presentó correlación altamente significativa con el N_2 fijado que se determinó por la técnica isotópica del ^{15}N .

2.2.1.3 Simbiosis *Rhizobium*-frijol

El frijol es una leguminosa que establece simbiosis con rizobios pertenecientes al género *Rhizobium* (Carter y Tegeder, 2016; Santos *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2020). Se han descrito varias especies de este género capaces de nodular la raíz del frijol común, como: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *Rhizobium tropici* (Martinez *et al.*, 1991), *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (Segovia *et al.*, 1993), *Rhizobium gallicum* bvs *gallicum* y *phaseoli*, *Rhizobium giardinii* bvs *giardinii* y *phaseoli* (Amarger *et al.*, 1997), *Rhizobium leucaenae*, *Rhizobium lusinatum*, *Rhizobium pisi* (Dall'Agnol *et al.*, 2013), *Rhizobium ecuadorianense* (Ribeiro *et al.*, 2015) y *Rhizobium freirei* (da Conceição *et al.*, 2018).

Los primeros momentos en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-frijol común, se caracterizan por la secreción de exudados radicales enriquecidos en flavonoides que en concentraciones nano y micromolar, inducen la expresión de los genes *nod* en estas bacterias, lo que da lugar a la síntesis de factores de nodulación, moléculas que constituyen determinantes en la especificidad de la simbiosis. En *Rhizobium leguminosarum phaseoli* estos genes son inducidos por luteolina, crisina, galangina, miricetina, genisteína, isoliquiritigenina y daidzeína; mientras que en *Rhizobium tropici* se inducen por luteolina, apigenina, crisina, quercetina, naringenina y eriodictiol (Janczarek *et al.*, 2014).

Una vez dentro de la planta de frijol y ya diferenciado el rizobio a bacteroide en la célula vegetal, el complejo Nitrogenasa transforma el nitrógeno atmosférico a NH_4^+ , éste se asimila hasta formar glutamina mediante las enzimas GS/GOGAT, a partir de la cual se sintetizan los ureidos alantoína y ácido alantoico (Rodrigues *et al.*, 2013; Carter y Tegeder, 2016; Santos *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2020). Estas moléculas presentan cuatro átomos de carbono y cuatro de nitrógeno, esto las hace más eficientes para el transporte de nitrógeno que la asparagina, que solo presenta dos átomos de nitrógeno. La gran demanda de fuentes de carbono que requieren los nódulos ante una activa fijación de nitrógeno, concuerda con la eficiencia de los ureidos en transportar un número de átomos de nitrógeno equivalente al número de carbonos de su estructura (Freixas *et al.*, 2010). Sin embargo, el cultivo del frijol común, se considera entre las leguminosas estudiadas la menos eficiente en este proceso (Granda *et al.*, 2014; Polania *et al.*, 2016), solo es capaz de incorporar el 39 % del nitrógeno derivado de la atmósfera, a diferencia de otras leguminosas como la soya que pueden incorporar hasta un 68 % (Polania *et al.*, 2016).

A la baja eficiencia en la fijación de nitrógeno en frijol común contribuye la alta promiscuidad de este cultivo con un gran número de especies de rizobios, que aunque forman grandes cantidades de nódulos, los bacteroides no son efectivos (Cardoso *et al.*, 2012), como es el caso de *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*, *Azorhizobium caulinodans* y especies de *Bradyrhizobium*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia tuberum* y *Priavidus necátor* (da Conceição *et al.*, 2018). La razón por la que esto ocurre podría estar relacionada con la presencia de varias copias del gen *nod D* en muchas cepas de rizobios que permite responder a diferentes tipos de flavonoides secretados por las raíces de frijol (Peix *et al.*, 2015). También se ha observado una heterogeneidad entre los factores Nod inducidos en diferentes especies de rizobios, lo que sugiere

que el frijol no requiere especificidad estructural en los factores Nod para la formación de los nódulos (Martínez, 2003).

Dentro de las estrategias seguidas para incrementar la eficiencia de la simbiosis en frijol se incluye la coinoculación con rizobios y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum*. En estudios, da Conceição *et al.* (2018) demostraron que la coinoculación de frijol común con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y cepas de *Bradyrhizobium* (*B. diazoefficiens* y *B. elkanii*) favorece la nodulación e incrementa la biomasa aérea y el contenido de nitrógeno en las plantas. Los autores sugieren que la coinoculación con *Bradyrhizobium* podría tener un efecto positivo en la organogénesis de los nódulos, lo que estimuló la simbiosis *Rhizobium*-frijol. Otras de las estrategias es la obtención de cepas genéticamente modificadas (Martínez, 2003) y el uso de inoculantes inducidos (Nápoles *et al.*, 2016a) que incrementen la nodulación y la eficiencia de la simbiosis (Martínez, 2003; Nápoles *et al.*, 2016a), así como la selección de variedades de frijol más a fin a determinadas especies de *Rhizobium* (Martínez, 2003).

2.3 Bioestimulantes

Se consideran bioestimulantes a los microorganismos o sustancias que favorecen la nutrición de las plantas, confieren tolerancia ante el estrés abiótico e incrementan el rendimiento y la calidad de los cultivos (Du Jardin, 2015; Yakhin *et al.*, 2017). Además, pueden actuar directamente en la fisiología y en el metabolismo vegetal o mejorar las condiciones del suelo, influyendo indirectamente en el crecimiento de las plantas (Calvo *et al.*, 2014). También se consideran bioestimulantes a los productos comerciales que son mezclas de tales sustancias y /o microorganismos (Du Jardin, 2015).

Durante mucho tiempo se han empleado los bioestimulantes en la agricultura con el objetivo de reducir los insumos y al mismo tiempo incrementar el rendimiento y la calidad de los cultivos. Otro de los propósitos que se persigue con el empleo de estos compuestos naturales es la disminución en el uso de fertilizantes inorgánicos, que tanto daño causan al medio ambiente cuando se utilizan desmedidamente (Bulgari *et al.*, 2014).

En las últimas décadas el uso de los bioestimulantes en la agricultura ha aumentado significativamente. Se espera que para el 2021 el mercado de los bioestimulantes se incremente a

3 mil millones de dólares (Calvo *et al.*, 2014). La gran demanda de estos compuestos se asocia con sus efectos beneficiosos en el crecimiento, productividad y protección de las plantas (Rouphael y Colla, 2018).

Sin embargo, el modo de acción de muchos de los bioestimulantes no está definido todavía. El efecto de ellos ha llevado a considerar que pueden estar involucrados en el proceso de fotosíntesis, en la activación de señales y rutas metabólicas, en la modulación de las fitohormonas y en la activación de genes de resistencia al estrés abiótico (Yakhin *et al.*, 2017).

2.3.1 Bioestimulantes microbianos

Dentro de los bioestimulantes microbianos se incluyen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y hongos no patógenos (Du Jardin, 2015, Yakhin *et al.*, 2017). Ellos pueden ser de vida libre, rizosféricos o endosimbióticos (Du Jardin, 2015).

Los hongos como *Trichoderma* y los micorrícicos arbusculares (HMA), se consideran herramientas importantes para minimizar los efectos provocados por la salinidad y la alcalinidad en el crecimiento y la productividad de los cultivos. Los HMA le posibilitan a la planta una mayor absorción de nutrientes a través de las raíces. Por otro lado, *Trichoderma* garantiza una mejor solubilización de los micronutrientes que se encuentran en el suelo y a la vez actúa como biocontrol (Rouphael *et al.*, 2017).

Las BPCV contribuyen a mejorar la absorción de agua y nutrientes e incrementan la tolerancia al estrés abiótico y biótico en las plantas. Los bioestimulantes de BPCV se desarrollan sobre la base de inóculos vivos de una o varias especies o sobre la base de moléculas señales aisladas. Para ello se emplean señales de las bacterias a la planta, para efectos directos sobre las plantas, o incluso señales de planta a bacteria para potenciar las señales en el ambiente del suelo (Backer *et al.*, 2018).

Dentro de las BPCV endosimbióticas se destacan por su importancia agrícola y ecológica los rizobios. Por tal razón, se utilizan en la formulación de inoculantes, que tienen buenos resultados en la nutrición, en la actividad fotosintética, en la resistencia a los estreses bióticos y abióticos y en el rendimiento de las leguminosas (Van Oosten *et al.*, 2017).

2.3.1.1 Azofert®

Azofert® es un bioestimulante microbiano que contiene cepas de rizobios seleccionadas por su competitividad y eficiencia, así como altas concentraciones de factores de nodulación, que constituyen determinantes esenciales en el éxito de la simbiosis (Nápoles *et al.*, 2016a). Hasta el momento, existen tres productos registrados de Azofert®, para los cultivos de canavalia (Azofert®-Can), soya (Azofert®-S) y frijol (Azofert®-F). Estos biopreparados se distribuyen y utilizan en diferentes provincias, principalmente en Mayabeque, Villa Clara, Ciego de Ávila y Santi Spiritus (Rivera *et al.*, 2015).

Múltiples han sido los beneficios obtenidos en las leguminosas con la aplicación de Azofert®. En canavalia aumenta el crecimiento de las plantas y facilita la simbiosis con HMA, favoreciendo la absorción de los nutrientes necesarios para la planta y el proceso de fijación biológica (Martín *et al.*, 2015). En el cultivo de la soya, según Corbera y Nápoles (2013), la aplicación de Azofert® favoreció el número y la masa seca de los nódulos y el contenido de nitrógeno foliar, con un rendimiento de 1,58 t ha⁻¹. También se obtuvieron efectos positivos de Azofert®-S en las variables de nodulación y del crecimiento, cuando se combinó con quitosano (Costales y Falcón, 2018). En frijol, Nápoles *et al.* (2016a) demostraron que un inoculante a base de la cepa *Rhizobium leguminosarum* CF1 enriquecido en inductores de los genes de nodulación, genera una mayor producción de señales por la bacteria, entre ellas factores Nod y el contenido de ácidos grasos de alto peso molecular, lo que favoreció la nodulación y el aporte de nitrógeno a la planta. Otros autores como Martínez *et al.*, 2016 observaron que la inoculación de semillas Cuba Cueto 25-9-N con Azofert®-F favorece las variables de nodulación, el crecimiento e incrementa el contenido de nitrógeno y fósforo en las hojas trifoliadas. Estrada *et al.* (2017) también demostraron que este inoculante en condiciones de déficit hídrico aumenta el rendimiento de las variedades Cuba Cueto 25-9-R y Tomeguín 93.

2.3.2 Bioestimulantes no microbianos

Los bioestimulantes no microbianos agrupan extractos de algas marinas, sustancias húmicas, fosfito y otras sales inorgánicas, derivados de quitina y quitosano, antitranspirantes, hidrolizados de proteínas y aminoácidos libres. Estos se aplican de diferentes formas en diversos cultivos, con múltiples resultados en la agricultura (Du Jardin, 2015, Winkler *et al.*, 2017, Yakhin *et al.*, 2017).

Los bioestimulantes no microbianos a base de oligosacarinas pueden actuar en el desarrollo de señales para la activación de respuestas defensivas y en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Brown y Saa, 2015). Al no ser tóxicos para el hombre, ni para el medio ambiente, se proponen como una alternativa al uso de agroquímicos (Calvo *et al.*, 2014).

2.3.2.1 Oligosacarinas. Oligogalacturónidos. Pectimorf®

Las oligosacarinas son polisacáridos y oligosacáridos naturales que forman parte de las paredes celulares de las plantas y de microorganismos como los hongos. Fueron primeramente reconocidas por inducir respuestas defensivas y de resistencia en plantas. Sin embargo, estudios posteriores desarrollados en la década de los 90 las implicaron, además, en varias respuestas relacionadas con el crecimiento y el desarrollo vegetal. El descubrimiento de la estructura del esqueleto principal carbonado de los factores de nodulación, excretados por las bacterias de la familia de los rizobios y su efecto en la morfogénesis de las raíces de las leguminosas, contribuyó a establecer a las oligosacarinas como una nueva jerarquía de hormonas en las plantas, cuya acción precede la síntesis y acumulación de las conocidas hormonas tradicionales (Falcón *et al.*, 2015).

Las oligosacarinas se clasifican de tipo endógeno o exógeno, de acuerdo a si son obtenidas o liberadas de las paredes celulares de la planta o del patógeno. Entre las endógenas las más conocidas son los oligogalacturónidos y los xiloglucanos y en el caso de las exógenas se conocen los oligoglucanos, oligoquitinas, poli y oligoquitosanas y los lipo-quitin-oligosacáridos (Falcón *et al.*, 2015).

Los oligogalacturónidos (OGAs, por sus siglas en inglés) son oligosacáridos lineales de unidades de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces del tipo α (1-4). El anillo piranósido del ácido D-galacturónico aparece en la conformación de silla 4C_1 , correspondiente a su forma más estable (Ridley *et al.*, 2001). Los enlaces glicosídicos en los C-1 y C-4 están además en la posición axial-axial y el número de residuos de D-galacturonatos que contiene el oligosacárido define su grado de polimerización (Mederos *et al.*, 2014).

Los OGAs son liberados de los polisacáridos pécticos que componen la pared celular durante la degradación de estas estructuras por las enzimas pécticas de la propia planta o proveniente de los microorganismos que invaden los tejidos vegetales (Falcón *et al.*, 2015). Se consideran

actualmente biorreguladores endógenos en el desarrollo de las plantas, pues pueden regular la síntesis y acción de las hormonas y distintos procesos de organogénesis y de crecimiento. Además, regulan muchos de los procesos fisiológicos que intervienen en la formación de órganos en las plantas (Savatin *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2013). También están involucrados en el crecimiento y la formación de raíces laterales y adventicias y en la diferenciación de las células del periciclo (Vallarino y Osorio, 2012), además ejercen un efecto inductor en los procesos de diferenciación de embriones somáticos (Nieves *et al.*, 2006).

Pectimorf® es un producto natural e inocuo, constituido por una mezcla de oligogalacturónidos, obtenidos a partir de la pectina cítrica, cuyo principio activo es una mezcla de α -1,4 oligogalacturónidos con diferentes grados de polimerización. Es considerado un potente elicitador de defensa en plantas y estimulante del crecimiento y diferenciación celular de diferentes especies vegetales (Cabrera *et al.*, 2013). Además, puede disminuir o atenuar el estrés abiótico en las plantas (Dell'Amico *et al.*, 2017; Núñez *et al.*, 2018), inducir y desarrollar el enraizamiento e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor (Pérez *et al.*, 2013). Este producto se emplea satisfactoriamente en sustitución de reguladores tradicionales del crecimiento o en sinergia con determinadas fitohormonas, auxinas y citoquininas (Borges *et al.*, 2017).

En el cultivo *in vitro*, el bioestimulante Pectimorf® ha sido ampliamente estudiado, demostrándose su capacidad como sustituto de hormonas tradicionales en diferentes estadios (Borges *et al.*, 2017). Dentro de los cultivos más estudiados se encuentran la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Nieves *et al.*, 2006), los cítricos (*Citrus macrophylla*) (Bao *et al.*, 2013), la papa (*Solanum tuberosum*) (Hidrobo *et al.*, 2002), el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Plana *et al.*, 2003), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (González *et al.*, 2004), el banano (*Musa paradisiaca*) (Izquierdo, 2009), la yuca (*Manihot esculenta*) (Suárez y Hernández, 2015) y el ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) (Borges *et al.*, 2017).

En el cultivo *ex vitro* las investigaciones han estado encaminadas a determinar concentraciones y formas de aplicación que muestran un mayor efecto en el crecimiento y desarrollo vegetal. En estudios en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) concentraciones de 10 y 20 mg L⁻¹ de Pectimorf® estimularon la emisión de raíces e incrementaron la longitud radical (Falcón y Cabrera, 2007). También provocó este mismo efecto en plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) en

combinación con auxinas (Vallarino y Osorio, 2012); en esquejes de guayaba (*Psidium guajava*) var. Enana Roja Cubana (Ramos *et al.*, 2013) y en plantas ornamentales (Posada *et al.*, 2016).

En frijol, los estudios se han realizado principalmente asperjando foliarmente las plantas con 10 mg L⁻¹. En dichos estudios los principales efectos del producto se dirigieron al incremento en la tolerancia de las plantas al estrés hídrico (Dell'Amico *et al.*, 2017) y del índice estomático (Álvarez y Reynaldo, 2015). Hasta entonces no se ha estudiado el efecto de Pectimorf® en la nodulación, la fijación de nitrógeno y en el crecimiento de plantas de frijol común biofertilizadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos generales

El estudio se realizó en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque y en el Centro Nacional de Ciencias Genómicas (CCG), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México.

Material Vegetal

Se emplearon semillas de frijol, variedad Cuba Cueto-25-9-N, procedentes del Banco de germoplasma de semillas del INIFAT (Fernández *et al.*, 2014).

Bioestimulantes empleados

Se empleó el inoculante comercial Azofert®-F, con Registro No. 002/17 y patente concedida por resolución OCPI No. 556/2002, a base de la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 a una concentración de 1×10^{10} UFC mL⁻¹. Se aplicó en dosis de 200 mL por cada 46,04 kg de semilla en los estudios de concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® y en los relacionados con la fijación de nitrógeno en condiciones semicontroladas. En los experimentos en condiciones controladas se aplicó este bioestimulante a la dosis de 1 mL por semilla.

Pectimorf®, compuesto por una mezcla de oligosacáridos pécticos (oligogalacturónidos), con Registro No. RCF 017/18 y patente No. 22859/2003, se empleó en concentraciones de 1, 5, 10, 20, 40 y 100 mg L⁻¹ y a las dosis de 8,69; 43,44; 86,88; 173,76; 347,52 y 868,81 µg por kg de semilla, cuando se aplicó a las semillas conjuntamente con el inoculante Azofert®-F; y de 1,5; 7,5; 15; 30; 60 y 150 µg por planta, cuando se aplicó por aspersión foliar en plantas cuyas semillas se inocularon previo a la siembra con el bioestimulante microbiano.

Análisis químico del suelo

En los estudios de concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf®, así como en los experimentos que se realizaron en condiciones semicontroladas, se utilizó suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico, éutrico proveniente del INCA (Hernández, 2015). El análisis químico se realizó en el laboratorio de Biofertilización y Nutrición de las Plantas del INCA, para esto se tomaron

muestras de suelo de 0-20 cm de profundidad y se emplearon los métodos descritos por Paneque *et al.* (2010) (Tablas I y II).

Tabla I: Características químicas del suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico, éutrico, que se empleó en los estudios de concentración y formas de aplicación de Pectimorf®, en condiciones controladas.

pH	M.O	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ²⁺
(H ₂ O)	(g kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(cmol kg ⁻¹)			
6,22	16,10	75,00	1,23	4,62	1,40	0

pH (Potenciometría), M.O: materia orgánica (Walkley Black), P: fósforo asimilable (extracción con H₂SO₄ 0,1N, método de Oniani), K⁺: potasio y Na²⁺: sodio (fotometría de llama), Ca²⁺: calcio y Mg²⁺: magnesio (extracción con NH₄Ac 1 mol L⁻¹ a pH 7 y determinación por complejometría)

Tabla II: Características químicas del suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico, éutrico, que se empleó en los experimentos en condiciones semicontroladas.

pH	M.O	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺
(H ₂ O)	(g kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(cmol kg ⁻¹)	
7,30	30,70	395,00	14,00	2,00

pH (Potenciometría), M.O: materia orgánica (Walkley Black), P: fósforo asimilable (extracción con H₂SO₄ 0,1N, método de Oniani), Ca: calcio y Mg: magnesio (extracción con NH₄Ac 1 mol L⁻¹ a pH 7 y determinación por complejometría)

El suelo empleado en los estudios de concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® se caracterizó por presentar pH ácido, bajo contenido de materia orgánica, contenido medio de fósforo asimilable, altos valores de potasio intercambiable, bajos niveles de calcio y adecuado contenido de magnesio (Tabla I). Sin embargo, el suelo que se empleó en los experimentos en condiciones semicontroladas poseía pH cercano a la neutralidad, contenido medio de materia orgánica, un contenido alto de fósforo asimilable y niveles adecuados de calcio y magnesio (Tabla II).

3.1 Efecto de diferentes concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® en la nodulación y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas

3.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas a las semillas con el inoculante Azofert®-F, en la nodulación y el crecimiento

Las semillas de frijol se cubrieron con una mezcla que contenía Pectimorf® y el inoculante Azofert®-F a las dosis y concentraciones referidas en un volumen de 400 mL por cada 46,04 kg de semilla. Se establecieron 7 tratamientos: uno se trató solo con Azofert®-F y el resto de los tratamientos correspondieron a cada una de las concentraciones y dosis de Pectimorf® que se emplearon. Las plantas crecieron en un cuarto de luces con 16 horas luz/8 horas oscuridad, a una temperatura de 25-27 °C, con 50-70 % de humedad relativa, en envases de 0,55 kg de capacidad de suelo y se regaron cada día con agua corriente. En la etapa de crecimiento R5 (35 días después de la siembra (DDS)), cuando las plantas presentaban los primeros botones florales, se realizaron evaluaciones de algunas variables de nodulación y de crecimiento, a 20 plantas por tratamiento.

Variables de nodulación

- Número de nódulos totales por planta (u planta^{-1})
- Masa seca de nódulos totales (g planta^{-1}): La masa seca se determinó en una balanza analítica Sartorius CPA 3245 con un margen de error de 0,1 mg, después de mantener los nódulos durante 72 horas a 75 °C en una estufa (BINDER, USA).

Variables de crecimiento

- Número de hojas trifoliadas (u planta^{-1})
- Diámetro del tallo (mm planta^{-1}): La determinación se realizó en la base del tallo con un Pie de Rey electrónico digital chino (0-150 mm).
- Longitud del tallo (cm planta^{-1}): Las mediciones de la altura de la planta se hicieron desde la base del tallo hasta el brote de la hoja terminal, con la ayuda de una regla graduada de 1mm de precisión.
- Longitud radical (cm planta^{-1}): Las mediciones se realizaron desde la base del cuello hasta la cofia de la raíz principal, con la ayuda de una regla graduada de 1 mm de precisión.

- Masa seca aérea y radical (g planta^{-1}): La masa seca se determinó por órganos en una balanza analítica Sartorius CPA 3245 con un margen de error de 0,1 mg, después de mantenerlos 72 horas a 75 °C en una estufa (BINDER, USA).
- Estimación del contenido relativo de clorofilas totales (u SPAD planta^{-1}): Las mediciones del contenido de clorofilas se realizaron en la parte central sin nervadura del tercer trifolio con el empleo de un medidor portátil de clorofilas MINOLTA SPAD 502 plus (SoilPlant Analysis Development)

3.1.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas por aspersión foliar, en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F

Las semillas se inocularon con Azofert®-F en el momento de la siembra, a la dosis y concentración referida. Cuando las plantas tenían el segundo par de hojas trifoliadas (etapa de crecimiento V3), se asperjaron con 1,5 mL de Pectimorf® por planta, a las diferentes concentraciones y dosis referidas. Se establecieron 7 tratamientos: uno se trató solo con Azofert®-F y el resto de los tratamientos correspondieron a cada una de las concentraciones y dosis de Pectimorf® que se emplearon. Las plantas crecieron bajo las mismas condiciones que las del experimento anterior. En la etapa de crecimiento R5 (35 DDS) se evaluaron variables de nodulación y de crecimiento, según epígrafe 3.1.1, en 20 plantas por tratamiento.

3.2 Efecto Pectimorf® en la nodulación, FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F

3.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, en indicadores de la FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas

Para realizar este experimento se seleccionaron las concentraciones de Pectimorf® que mejores resultados mostraron en la nodulación y el crecimiento de las plantas en las distintas formas de aplicación (3.1.1 y 3.1.2). Las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito sódico diluido al 20 % (1:5 v/v) a partir de una solución comercial al 5 %, durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, en cámara de flujo laminar. Luego de la desinfección se pusieron a germinar en bandejas con ocho capas de papel absorbente humedecidas y estériles, durante 2 días a 30 °C en la oscuridad, en una cámara de crecimiento. A los dos días, cuando las

semillas habían emitido las radículas, se depositaron 5 semillas pregerminadas por maceta con vermiculita estéril (utilizada como soporte inerte para el crecimiento de las plantas), a una profundidad aproximada de 2 cm.

La mezcla de OGAs (Pectimorf®) se aplicó a las semillas conjuntamente con el inoculante Azofert®-F en el momento de la siembra a razón de 1:1 v/v (1 mL por semilla con igual volumen del inoculante) o por aspersión foliar (1,5 mL por planta), cuando las plantas inoculadas tenían el segundo par de hojas trifoliadas (etapa de crecimiento V3). Además, se estableció un tratamiento en el que las plantas solo se inocularon y otro en el que las plantas se suplementaron en el riego con 5 mM de nitrógeno. Los tratamientos se establecieron de la forma siguiente:

- T1 Suplementado con nitrógeno
- T2 Azofert®-F
- T3 Azofert®-F+Pectimorf® aplicados a las semillas
- T4 Azofert®-F+Pectimorf® (conc. 1) asperjado foliarmente
- T5 Azofert®-F+Pectimorf® (conc. 2) asperjado foliarmente

Las plantas crecieron en condiciones controladas, a 29 °C y 60 % de humedad relativa con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. La primeras semanas el riego se realizó cada dos días con 250 mL alternando solución nutritiva (Summerfield *et al.*, 1977) (Anexo 1) deficiente de nitrógeno y agua desmineralizada, excepto en el primer tratamiento, donde las plantas se regaron con solución nutritiva (Summerfield *et al.*, 1977) rica en nitrógeno (5 mM) (Anexo 1). Pasado este tiempo, las plantas se regaron con igual volumen diariamente, alternando la solución nutritiva con el agua desmineralizada.

3.2.1.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación de plantas inoculadas con Azofert®-F

A los 18, 23 y 32 DDS se cuantificaron los nódulos formados en las raíces (u planta⁻¹) y la masa seca de los nódulos totales formados por planta (g planta⁻¹). Para ello se emplearon 15 plantas por tratamiento. Para determinar si la aplicación de Pectimorf® interfiere en la colonización del tejido nodular por la bacteria, se estudió la histología de los nódulos en las plantas correspondientes a los tratamientos inoculados, a los 23 DDS. Para ello se colectaron los nódulos, se colocaron en tubos eppendorf con glutaraldehído al 2 % en tampón de fosfato (pH 7,6) por dos horas, para inmovilizar metabólicamente a las células del tejido. Después se lavaron varias veces

con buffer de fosfato (pH 7,6) y se guardaron en refrigeración. Posteriormente, con un Vibratomo (LEICA VT 1000S) se realizaron cortes, para obtener muestras de 30 μm de espesor. Las muestras se aclararon con hipoclorito de sodio diluido al 20 % (1:5 v/v), luego se enjuagaron con agua destilada estéril y se tiñeron con azul de metileno al 0,1 % por 10 minutos. Después se lavaron con agua corriente y se dejaron reposar en agua durante tres a diez horas para equilibrar el colorante. Los cortes teñidos se colocaron en portaobjetos y se protegieron con un cubreobjetos, procurando eliminar las burbujas de aire para luego observarlos en un microscopio óptico, Axioskop 2 (Zeiss), con aumento de 5X. Las imágenes se tomaron usando una cámara digital Canon Power Shot G5.

3.2.1.2 Efecto de Pectimorf® en la actividad Nitrogenasa de plantas inoculadas con Azofert®-F

La actividad Nitrogenasa se determinó a los 18, 23 y 32 DDS por el método de reducción del acetileno, descrito por Hardy *et al.* (1968). Para esto las raíces noduladas de 15 plantas por tratamiento se colocaron en frascos de vidrio de 120 mL y se sellaron con un tapón de goma para impedir el intercambio gaseoso. Luego se extrajeron 2 mL de oxígeno de los frascos y se sustituyeron por acetileno. Transcurridos 90 minutos se tomaron 1,4 mL de gas y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Varian 3300), equipado con un detector de ionización de llama y una columna empacadora Porapak (2 m x 1/8 pulg), que se ajustó a las siguientes condiciones: temperatura de la columna 95 °C, temperatura del inyector 95 °C y temperatura del detector 105 °C. La actividad Nitrogenasa se expresó en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$. La actividad Nitrogenasa específica se determinó mediante el cociente de la actividad Nitrogenasa por planta y la masa seca de los nódulos totales formados por planta, este resultado se expresó en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MSNT planta}^{-1}$.

3.2.1.3 Evaluación de la expresión génica de enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Se determinaron los niveles relativos de expresión de Glutamina sintetasa y Glutamato sintasa, enzimas implicadas en el proceso de asimilación del nitrógeno, en los nódulos de las plantas inoculadas y en las raíces de las plantas suplementadas con nitrógeno a los 18 y 23 DDS. Para ello se tomaron muestras de 5 plantas por tratamiento y los tejidos de nódulos o raíces que se colectaron se refrigeraron a -70 °C hasta el momento del análisis. La extracción del ARN se realizó

por el método del Trizol® a partir de 200 mg de nódulos y 400 mg de raíces congeladas, según las indicaciones del fabricante. Se realizaron 4 réplicas biológicas para cada tratamiento y la concentración de ARN se determinó con el empleo de un espectrofotómetro NanoDrop ND 2000 (NanoDrop Technologies, Wilmintong, DE), registrando el valor del pico máximo a 260 nm. La integridad del ARN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, a 80 V durante 45 minutos. La síntesis del ADN complementario se realizó con el empleo del kit comercial Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) a partir de 1,5 µg de ARN, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) se realizó en placas con un formato de 96 pozos, utilizando SyBR Green en el 7300 Real-Time PCR System y 7300 System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los genes de la Ubiquitina, Heat Shock Proteins (HSP) y de la Malato deshidrogenasa (Malato DH) se utilizaron para la normalización de cada corrida de qRT-PCR. Las relaciones de expresión promedio se calcularon con el método $\Delta\Delta C_t$, según lo indicado por Hernández *et al.* (2007) y se calculó la expresión de cambio en $\log_2$. Los cebadores que se utilizaron en el análisis de expresión fueron diseñados para este experimento (Tabla III).

Tabla III: Cebadores empleados para determinar la expresión de la Glutamina sintetasa y Glutamato sintasa mediante qRT-PCR.

Enzimas	Oligonucleótidos F (5'→3')	Oligonucleótidos R (3'→5')
Glutamina sintetasa	GGA GCA TAT CGC TGC TTA TGG	AGT TTC GTG TCG TCC TGT CAG A
Gluatamato sintasa	ACC AGG AGG TTG TGG ATT TT	TTT TTG CTT TCC TTC CTT CG
Ubiquitina	GCTCTCCATTTGCTCCCTGTT	TGAGCAATTTTCAGGCACCAA
HSP	CGGGGAGAGAAAGAGAGAAGA	AACACAAACTTCCGCATGAAC
Malato DH	AGGCATGGAGAGGAAAGATGT	TGGGTTAGCAACAACCAGAAC

HSP: Heat Shock Proteins, Malato DH: Malato deshidrogenasa

3.2.1.4 Efecto de Pectimorf® en el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F

A los 18, 23 y 32 DDS se evaluaron las variables de crecimiento: longitud del tallo y radical (cm planta⁻¹) y la masa seca aérea y radical (g planta⁻¹). Para esto se emplearon 15 plantas por tratamiento.

3.2.1.5 Efecto de Pectimorf® en la efectividad de la FBN de plantas inoculadas con Azofert®-F

La efectividad de la FBN se determinó a los 18, 23 y 32 DDS en 15 plantas de cada tratamiento donde se aplicó Azofert®-F y se calculó a partir de la media de la masa seca de cada uno de los órganos de estas plantas, según la siguiente expresión matemática:

$$E. FBN_T = \frac{\overline{MSAi_T} + \overline{MSRi_T} + \overline{MSNi_T}}{\overline{MSA_N} + \overline{MSR_N}} * 100$$

Donde:

E.FBN_T: efectividad de la FBN para cada tratamiento

MSAi_T: masa seca aérea de las plantas inoculadas con Azofert®-F para cada tratamiento

MSRi_T: masa seca radical de las plantas inoculadas con Azofert®-F para cada tratamiento

MSNi_T: masa seca de los nódulos totales de las plantas inoculadas con Azofert®-F para cada tratamiento

MSA_N: masa seca aérea de las plantas suplementadas con nitrógeno

MSR_N: masa seca radical de las plantas suplementadas con nitrógeno

3.2.2 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, el crecimiento, el contenido de ureidos y en el aporte de nutrientes en plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones semicontroladas

En el experimento se emplearon las concentraciones y las formas de aplicación de Pectimorf® descritas en el epígrafe 3.2.1 y se establecieron los siguientes tratamientos:

- T1** Azofert®-F
- T2** Azofert®-F+Pectimorf® aplicados a las semillas
- T3** Azofert®-F+Pectimorf® (conc. 1) asperjado foliarmente
- T4** Azofert®-F+Pectimorf® (conc. 2) asperjado foliarmente

El experimento se realizó en condiciones de invernadero, en el periodo comprendido de noviembre a diciembre de 2019. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero en envases de 0,55 kg de capacidad de suelo y se regaron cada día con agua corriente. Las variables climatológicas promedios, $21,3 \pm 2$ °C de temperatura y $80,4 \pm 4$ % de humedad relativa, se calcularon a partir del registro mensual por la Estación Meteorológica de Tapaste No. 78374, ubicada en el Km 3 ^{1/2} Carretera Tapaste, Mayabeque.

3.2.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación y el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F

En la etapa de crecimiento del cultivo R5 (40 DDS) se determinó el número (u planta⁻¹) y la masa seca de los nódulos (g planta⁻¹) formados y la masa seca aérea y radical (g planta⁻¹). Para ello se emplearon 10 plantas por tratamiento.

3.2.2.2 Efecto de Pectimorf® en el contenido de ureidos de plantas inoculadas con Azofert®-F

El contenido de ureidos en exudado xilemático se determinó en tres muestras por tratamiento, correspondientes cada una a tres plantas, cuando se encontraban en la etapa de crecimiento R5 (40 DDS). Los exudados se colectaron de tallos cortados en el horario de 12:00 a 13:00 horas y las plantas fueron regadas una hora antes de colectar las muestras. La savia recogida se almacenó a -20 °C y para el análisis se emplearon 10 µL de cada exudado. Los ureidos se determinaron según el método de detección espectrofotométrico de Young y Conway (1942). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración de alantoína (SIGMA) con un rango de concentración de 0,005-0,2 µmol mL⁻¹. El contenido de ureidos se expresó en µmol mL⁻¹ de savia xilemática.

3.2.2.3 Efecto **de** Pectimorf® en el contenido de nutrientes de plantas inoculadas con Azofert®-F

La concentración de los nutrientes nitrógeno y fósforo se determinó en las hojas trifoliadas de 10 plantas por tratamiento en la etapa de crecimiento R5 (40 DDS), luego de ser secadas en estufa (BINDER, USA) por 72 horas a 75 °C. Las determinaciones se realizaron por análisis químico en el Departamento de Biofertilización y Nutrición de las Plantas del INCA, mediante las metodologías descritas en el Manual de Técnicas de Laboratorio (Paneque *et al.*, 2010). Para determinar la concentración de nitrógeno se empleó el método Nessler y para la de fósforo el reactivo azul de molibdeno.

3.3 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron bajo un Diseño Completamente Aleatorizado con dos repeticiones, solo se muestran los resultados de una repetición dada la similitud en el comportamiento de los resultados. Todos los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple y comparación de medias por la Prueba de Tukey $p < 0,05$; en el programa estadístico SPSS, Statistics v22. Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov–Smirnov y para la homogeneidad de varianzas se empleó el estadístico de Levene. Los gráficos se realizaron en el programa Microsoft Excel 2010.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de diferentes concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® en la nodulación y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas

4.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas a las semillas con el inoculante Azofert®-F, en la nodulación y el crecimiento

Los resultados que se obtuvieron en las variables de nodulación y de crecimiento cuando se evaluó el efecto de la aplicación de Azofert®-F y Pectimorf® a las semillas, se muestran en la figura 1 y en la tabla IV. En la nodulación no se observó un efecto de las diferentes concentraciones de Pectimorf® en el número de nódulos, pero si se obtuvo un efecto negativo de la concentración de 5 mg L⁻¹ en la masa seca de estas estructuras.

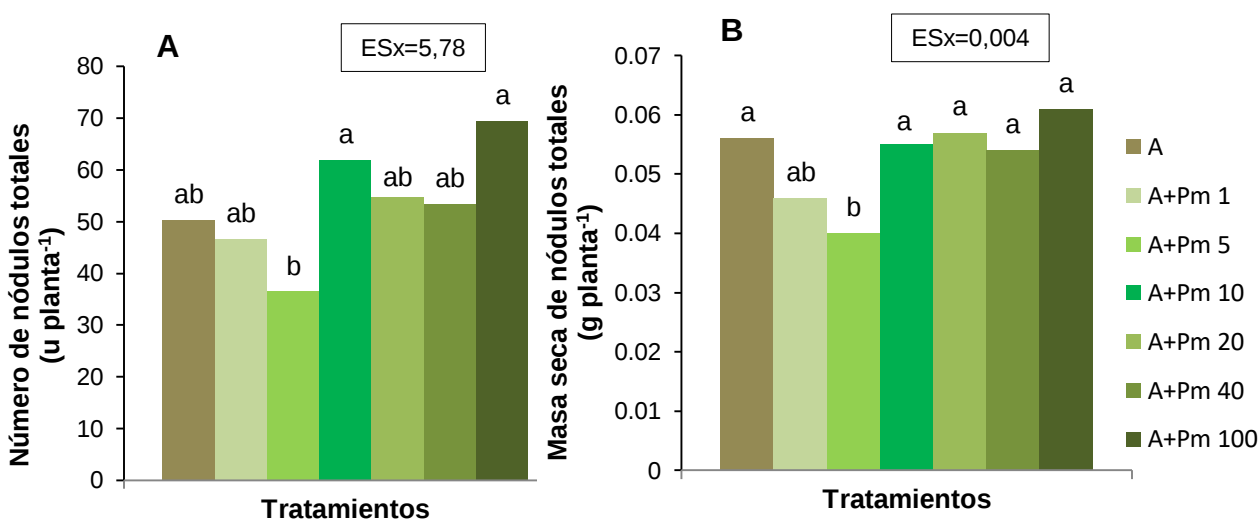


Figura 1: Efecto de la aplicación a las semillas de diferentes concentraciones de Pectimorf® (Pm) con Azofert®-F (A) en el número (A) y en la masa seca de los nódulos totales (B) de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N), en la etapa de crecimiento R5 y en condiciones controladas de cultivo. 1-100 concentraciones de Pectimorf® en mg L⁻¹. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=20$. ESx: error estándar de la media.

En ambas variables de nodulación se encontraron diferencias entre algunos tratamientos donde se aplicó este bioestimulante. A las concentraciones de 10 y 100 mg L⁻¹ las plantas presentaron más nódulos que las que se trataron con 5 mg L⁻¹. En el caso de la masa seca de los nódulos, 5 mg L⁻¹ fue la única concentración que mostró diferencias, con un valor inferior al resto de las

concentraciones que se evaluaron, excepto con 1 mg L⁻¹ (Figura 1). Todos los nódulos formados fueron efectivos.

Tabla IV: Efecto de la aplicación a las semillas de diferentes concentraciones de Pectimorf® (Pm) con Azofert®-F (A), en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N), en la etapa de crecimiento R5 y en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	N.Hojas	L.Tallo	L.Radical	D.Tallo	MSA	MSR	Clorofilas
A	4,73	68,50	26,33 ab	2,69	0,91	0,40 b	36,64 ab
A+Pm 1 mg L ⁻¹	5,00	62,97	27,83 ab	2,85	0,94	0,41 b	34,37 ab
A+Pm 5 mg L ⁻¹	4,40	55,03	30,34 a	2,70	1,00	0,48 ab	36,84 ab
A+Pm 10 mg L ⁻¹	4,60	58,46	24,55 b	2,68	0,93	0,58 a	38,69 a
A+Pm 20 mg L ⁻¹	4,81	65,97	28,09 ab	2,71	0,94	0,48 ab	34,29 ab
A+Pm 40 mg L ⁻¹	5,06	64,78	25,88 ab	2,74	0,85	0,44 ab	33,67 ab
A+Pm 100 mg L ⁻¹	5,00	66,68	25,41 ab	2,73	0,95	0,43 ab	33,22 b
ESx	0,24	4,64	1,26	0,07	0,07	0,04	1,26

N.Hojas: número de hojas (u planta⁻¹), L.Tallo: largo del tallo (cm planta⁻¹), L.Radical: longitud radical (cm planta⁻¹), D.Tallo: diámetro del tallo (mm planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (g planta⁻¹), Clorofilas: contenido relativo de clorofilas en la tercera hoja trifoliada (u SPAD planta⁻¹). 1-100 concentraciones de Pectimorf® en mg L⁻¹. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p< 0,05), n=20. ESx: error estándar de la media.

En cuanto a las variables de crecimiento: número de hojas, longitud y diámetro del tallo y masa seca aérea, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En la longitud radical los mayores valores se obtuvieron con la aplicación de Pectimorf® a la concentración de 5 mg L⁻¹, aunque solo mostró diferencias con la concentración de 10 mg L⁻¹.

Sin embargo, a la concentración de 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® se observó un incremento significativo en la masa seca radical, que no mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos, excepto con las plantas que se trataron con la concentración de 1 mg L⁻¹ y con las que solo se inocularon. Teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron en las mediciones de longitud radical, el incremento en la masa seca de este órgano se debió a un aumento en el número de raíces secundarias y/o adventicias.

El mayor valor en el contenido relativo de clorofilas totales en la tercera hoja trifoliada correspondió también a las plantas que se trataron con la concentración de 10 mg L⁻¹. Aunque este tratamiento no mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos, excepto con 100 mg L⁻¹.

El efecto de Pectimorf® obtenido en el desarrollo del sistema radical a la concentración de 10 mg L⁻¹, coincide con resultados previamente informados en plantas de soya (*Glycine max*) var. INCAsoy-24, que se inocularon con *Bradyrhizobium*. Los autores de dicha investigación plantean que en las evaluaciones que se realizaron en la etapa de floración, a los 60 días después de la siembra, el producto tuvo acción tanto en semillas inoculadas como no inoculadas (Corbera y Nápoles, 2011). Estos resultados confirman el poder enraizador que algunos autores le atribuyen a esta mezcla de OGAs (Falcón y Cabrera, 2007; Álvarez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017).

Un efecto similar de Pectimorf® se obtuvo a concentraciones menores de 10 mg L⁻¹ (2 mg L⁻¹) en plantas de plátano cultivar 'FHIA-18', en condiciones *in vitro* (Borges *et al.*, 2015). También, a concentraciones mayores (20 mg L⁻¹) en esquejes de guayaba (*Psidium guajava*) var. Enana Roja Cubana, en el que el poder enraizador de este producto se manifestó en la formación de raíces adventicias (Ramos *et al.*, 2013).

Sin embargo, Falcón y Cabrera (2007) en investigaciones en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) con Pectimorf® a la concentración de 10 mg L⁻¹, demostraron un incremento en la longitud de las raíces, pero no en la formación de raíces secundarias. En ese estudio el desarrollo del sistema radical se favoreció más con el empleo de Pectimorf® que con la aplicación de ácido indolacético (AIA). Esto corrobora lo informado por otros autores acerca de que los OGAs pueden actuar como sustituto de hormonas tradicionales, favoreciendo la diferenciación celular y la formación de órganos en las plantas (Falcón y Cabrera, 2007; Suárez y Hernández, 2015; Borges *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que la concentración de 10 mg L⁻¹ fue la única que se diferenció del tratamiento que solo se inoculó en la masa seca radical y que mostró un buen comportamiento en el resto de las variables de crecimiento y de nodulación, excepto en la longitud radical, se eligió para continuar el estudio.

4.1.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pectimorf®, aplicadas por aspersión foliar, en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F

La aplicación foliar de Pectimorf® en la etapa de crecimiento V3 a las plantas que se inocularon sus semillas con Azofert®-F, mostró efectos significativos en la nodulación y en algunas de las variables de crecimiento que se analizaron (Figura 2 y Tabla V). En las variables de nodulación, el

número de nódulos totales fue mayor en las plantas que se asperjaron con 5 y 100 mg L⁻¹, aunque las plantas que se trataron con la concentración de 5 mg L⁻¹ solo mostraron diferencias significativas con las que se asperjaron con 20 mg L⁻¹. La masa seca de los nódulos se incrementó igualmente a las concentraciones de 5 y 100 mg L⁻¹, pero las plantas que se trataron con 5 mg L⁻¹ no mostraron diferencias con los tratamientos de 1, 10 y 20 mg L⁻¹ (Figura 2). El 100 % de los nódulos formados fue efectivo.

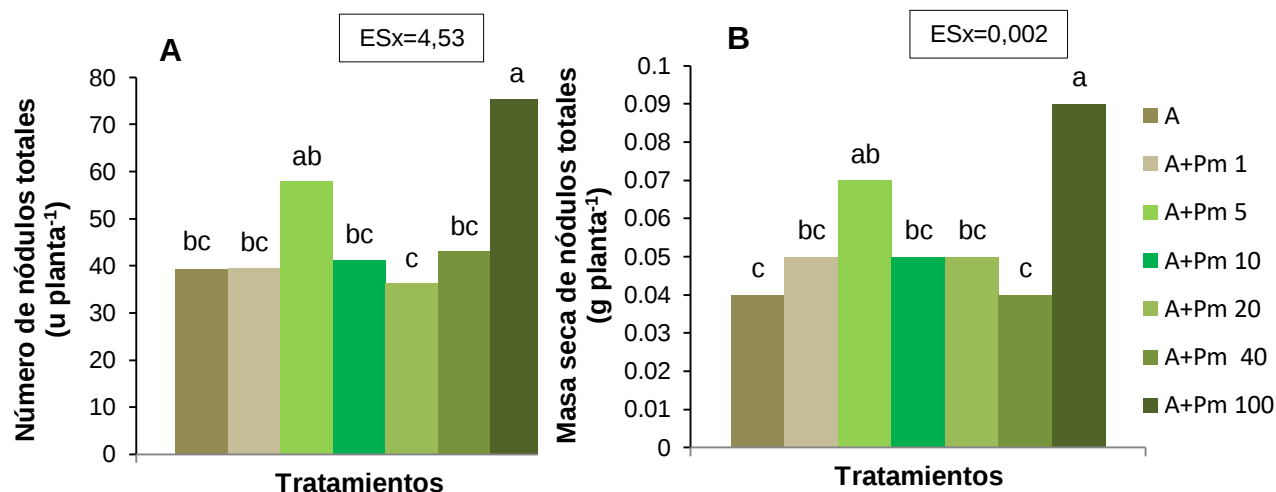


Figura 2: Efecto de la aplicación foliar (en V3) de diferentes concentraciones de Pectimorf® (Pm) en el número (A) y en la masa seca de los nódulos totales (B) formados en plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas sus semillas con Azofert®-F (A), en la etapa de crecimiento R5 y en condiciones controladas de cultivo. 1-100 concentraciones de Pectimorf® en mg L⁻¹. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=20$. ESx: error estándar de la media.

En las variables de crecimiento, el número de hojas trifoliadas se incrementó con la aplicación de la mezcla de OGAs a 100 mg L⁻¹, única concentración que mostró diferencias significativas con el tratamiento que solo se inoculó. Sin embargo, no mostró diferencias con las concentraciones de 5 y 40 mg L⁻¹ (Tabla V).

En la longitud del tallo no se observaron diferencias entre los tratamientos. En la longitud radical, las plantas alcanzaron menor tamaño con las concentraciones de 10, 40 y 100 mg L⁻¹. En cuanto al diámetro del tallo, los efectos más significativos se obtuvieron con la aspersión de 1, 5 y 10 mg L⁻¹. El resto de los tratamientos en esta última variable, no mostraron diferencias con las plantas que solo se inocularon (Tabla V).

En la masa seca aérea, la aspersión foliar de 100 mg L⁻¹ fue el único tratamiento que mostró diferencias significativas con las plantas que solo se trataron con Azofert®-F, efecto que pudiera estar relacionado con el incremento observado en el número y la masa seca de los nódulos (Figura 2). En la masa seca radical, el producto Pectimorf® tuvo efecto positivo a las concentraciones de 1, 5 y 100 mg L⁻¹ (Tabla V). Algunos autores plantean que el efecto de esta mezcla de OGAs en el desarrollo del sistema radical se debe a la actividad auxínica que tiene este bioestimulante (Posada *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2017).

Tabla V: Efecto de la aplicación foliar (en V3) de diferentes concentraciones de Pectimorf® (Pm) en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas las semillas con Azofert®-F (A), en la etapa de crecimiento R5 y en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	N.Hojas	L.Tallo	L.Radical	D.Tallo	MSA	MSR	Clorofilas
A	5,47 bc	75,50	31,62 ab	2,21 cd	0,82 b	0,28 c	33,94
A+Pm 1 mg L ⁻¹	5,20 c	67,38	34,79 a	2,53 a	1,00 ab	0,39 ab	34,65
A+Pm 5 mg L ⁻¹	5,73 abc	74,16	29,49 bc	2,34 b	0,97 ab	0,43 a	32,36
A+Pm 10 mg L ⁻¹	5,53 bc	74,68	26,52 cd	2,32 b	0,90 b	0,31 bc	33,44
A+Pm 20 mg L ⁻¹	5,60 bc	77,78	31,17 ab	2,16 d	0,91 b	0,27 c	32,61
A+Pm 40 mg L ⁻¹	6,07 ab	80,13	25,08 d	2,11 d	0,93 b	0,33 bc	33,36
A+Pm 100 mg L ⁻¹	6,47 a	81,11	24,06 d	2,31 bc	1,14 a	0,42 a	31,16
ESx	0,18	3,36	0,89	0,03	0,05	0,02	0,85

N.Hojas: número de hojas (u planta⁻¹), L.Tallo: largo del tallo (cm planta⁻¹), L.Radical: longitud radical (cm planta⁻¹), D.Tallo: diámetro del tallo (mm planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (g planta⁻¹), Clorofilas: contenido relativo de clorofilas en la tercera hoja trifoliada (u SPAD planta⁻¹). 1-100 concentraciones de Pectimorf® en mg L⁻¹. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p< 0,05), n=20. ESx: error estándar de la media.

Los resultados que se obtuvieron en la longitud y en la masa seca radical en este experimento, corroboran los obtenidos en el experimento anterior, cuando el Pectimorf® se aplicó a las semillas. Ambos resultados indican un efecto positivo en la masa seca radical, pero no en la longitud, por lo que la actividad de esta mezcla de OGAs en el desarrollo radical se puede atribuir al incremento en la densidad de las raíces y no al aumento en su longitud.

Según Dell'Amico *et al.* (2017) el desarrollo del sistema radical le posibilita a la planta, tanto en condiciones normales de crecimiento como de estrés abiótico, una mayor absorción de agua y minerales, que permite un incremento en el desarrollo foliar. A partir de lo informado por estos

autores, el incremento en el número de hojas y en la masa seca aérea en el presente estudio, quizás sea resultado del aumento en el desarrollo radical por la aplicación de 100 mg L⁻¹ de Pectimorf®.

El contenido relativo de clorofilas totales no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Algunos autores plantean que una posible vía por la cual los OGAs incrementan el crecimiento de las plantas, es porque estas moléculas estimulan la actividad fotosintética; lo que provoca una mayor ganancia de esqueletos carbonados que pueden utilizarse en la síntesis de proteínas (El-Sharkawy, 2006; Ojeda, 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad fotosintética no está determinada únicamente por el contenido de clorofilas, sino que existen, además, otros elementos como la apertura y cierre estomático y la actividad del resto de los componentes de los fotosistemas, que influyen en el proceso de fotosíntesis.

Antecedentes de la aplicación de Pectimorf® por aspersión foliar en plantas inoculadas, solo se tienen en el cultivo de soya variedades INCAsoy-24 e INCAsoy-27, a la concentración de 10 mg L⁻¹. En el caso de INCAsoy-24, la aplicación de ambos productos incrementó la masa seca aérea y radical, mientras que en INCAsoy-27 solo favoreció la masa seca aérea. En dichos experimentos la aplicación de Pectimorf® no influyó en la nodulación (Corbera y Nápoles, 2011, 2013). A diferencia de los resultados anteriores en soya, en el presente trabajo, concentraciones menores de Pectimorf® (5 mg L⁻¹) y mayores (100 mg L⁻¹) incrementaron el número y la masa de los nódulos en las plantas de frijol.

El bioestimulante Pectimorf® no solo incrementa los indicadores relacionados con el crecimiento vegetal. Existen resultados que muestran aumentos significativos en el rendimiento de cultivos como el tomate (García *et al.*, 2009), la habichuela (Nápoles *et al.*, 2016b), el rábano y la lechuga (Álvarez *et al.*, 2011) con la aplicación de esta mezcla de OGAs.

Estudios en hortalizas, frutales y plantas ornamentales, muestran que el efecto de esta mezcla de OGAs en los procesos fisiológicos, en el crecimiento y en el rendimiento en las plantas ocurre a concentraciones entre 5 y 20 mg L⁻¹ en el tratamiento de semillas, esquejes, mediante aspersión foliar y la combinación de estas formas de aplicación (Falcón y Cabrera, 2007; Álvarez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013). Sin embargo, la presente investigación muestra que el producto promueve también el crecimiento de plantas de frijol a concentraciones más elevadas (100 mg L⁻¹).

Los resultados de ambos experimentos permitieron definir que las concentraciones de Pectimorf® que mejores efectos ejercieron en la nodulación y en el crecimiento de las plantas de frijol var. Cuba Cueto-25-9-N, correspondieron a 10 mg L⁻¹, cuando se aplicó a las semillas con Azofert®-F, previo a la siembra, y 5 y 100 mg L⁻¹, cuando se aplicó por aspersión foliar en la etapa de crecimiento V3 en plantas inoculadas. Los posibles mecanismos mediante los cuales este bioestimulante incrementó las variables de nodulación y de crecimiento que se evaluaron aún no se conocen bien y pueden ser motivo de futuras investigaciones.

El efecto de Pectimorf® en las variables de crecimiento podría estar relacionado con los efectos positivos en la nodulación. Además de incrementar el número y la masa seca de los nódulos podría favorecer la fijación de nitrógeno atmosférico, lo que aumenta la disponibilidad de este nutriente para el crecimiento de las plantas. Según Haag *et al.* (2013) mayor número y masa seca de los nódulos indica mayor contenido de bacteroides, con posible incremento en el proceso de fijación. Razón por la que se consideró oportuno evaluar el efecto de las concentraciones que se destacaron en cada forma de aplicación en parámetros de la FBN y el crecimiento.

4.2 Efecto Pectimorf® en la nodulación, FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F

4.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, en indicadores de la FBN y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones controladas

4.2.1.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación de plantas inoculadas con Azofert®-F

El efecto de Pectimorf® a las concentraciones que se seleccionaron previamente en las variables de nodulación en tres momentos del crecimiento de las plantas de frijol (18, 23 y 32 DDS) inoculadas con Azofert®-F se muestra en las figuras 3 y 4. En el número de nódulos, el tratamiento a las semillas y la aspersión foliar con 5 mg L⁻¹ de Pectimorf®, incrementaron esta variable en las evaluaciones que se realizaron a los 18 y 23 DDS. La aspersión foliar con 100 mg L⁻¹ a los 18 DDS no mostró diferencias con el tratamiento que solo se inoculó ni tampoco con el resto de los tratamientos a los que se aplicó Pectimorf® (Figura 3).

A los 32 DDS la aplicación foliar con 5 mg L⁻¹ fue el único tratamiento que mostró diferencias con las plantas que solo se inocularon, aunque es importante destacar que no mostró diferencias

con el resto de los tratamientos a los que se les aplicó Pectimorf®. En esta última evaluación hubo una disminución en el número de nódulos cuando se aplicó 10 mg L⁻¹ de Pectimorf® a las semillas y 5 mg L⁻¹ por aspersión foliar, comparado con los momentos anteriores, lo que puede deberse a una senescencia nodular más temprana con relación al resto de los tratamientos (Figura 3).

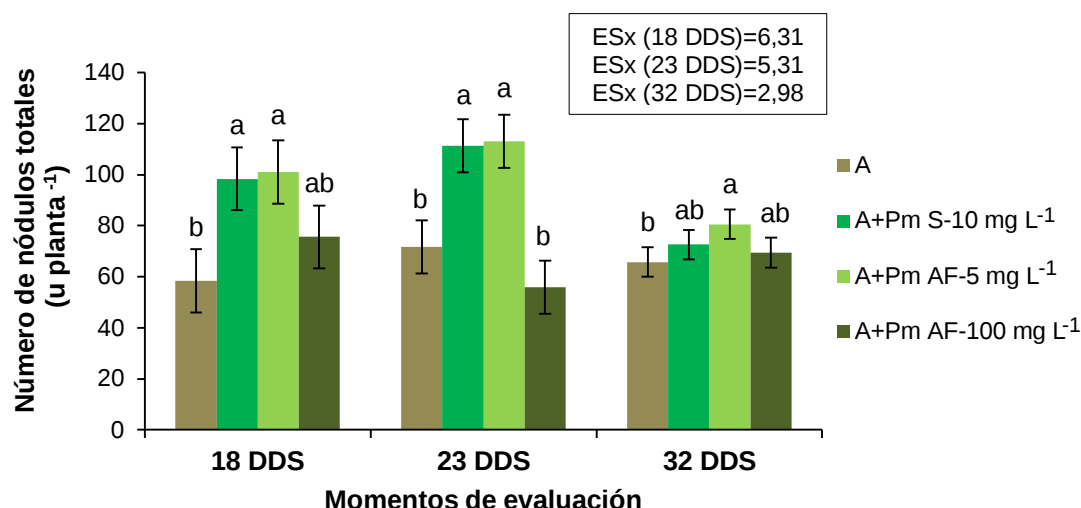


Figura 3: Efecto de la aplicación Pectimorf® en el número de nódulos totales en plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas las semillas con Azofert®-F, evaluadas a los 18, 23 y 32 DDS y en condiciones controladas de cultivo. A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+ Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=15$. ESx: error estándar de la media. Las barras corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

En la masa seca de los nódulos, a los 18 DDS (Figura 4) no se observó efecto de Pectimorf®, a pesar de haber incrementado el número de nódulos (Figura 3). Sin embargo, a los 23 DDS el producto incrementó esta variable cuando las semillas se trataron con 10 mg L⁻¹ y las plantas se asperjaron con 5 mg L⁻¹. A los 32 DDS los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación a las semillas y la aspersión foliar a 100 mg L⁻¹. En esta variable los tratamientos con Pectimorf® no mostraron diferencias significativas entre sí, para ninguno de los tres momentos evaluados.

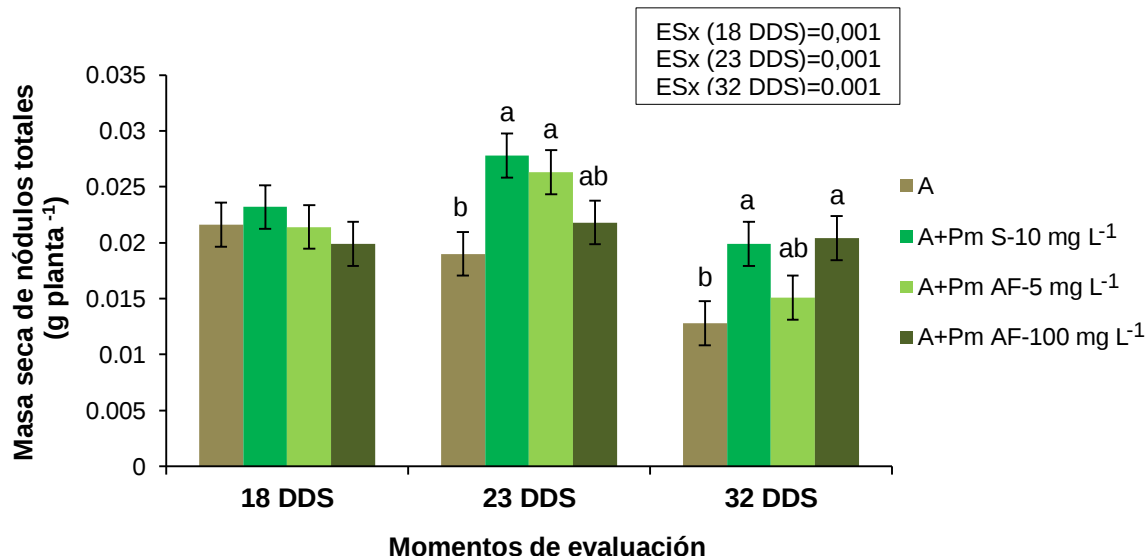


Figura 4: Efecto de la aplicación de Pectimorf® en la masa seca de nódulos totales en plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas las semillas con Azofert®-F, evaluadas a los 18, 23 y 32 DDS y en condiciones controladas de cultivo. A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+ Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=15$. ESx: error estándar de la media. Las barras corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

El desarrollo de los nódulos es un proceso energéticamente costoso, que es estrictamente regulado (Barraza *et al.*, 2018). En la formación de estas estructuras tienen una función importante las auxinas (Li *et al.*, 2014; Bensmihen, 2015; Barraza *et al.*, 2018; Kohlen *et al.*, 2018), principalmente el AIA (Barraza *et al.*, 2018). Tanto la acumulación local de auxina, como su transporte desde la parte aérea hasta la raíz, resulta esencial para inducir la nodulación, el crecimiento y el desarrollo temprano de los nódulos (Kohlen *et al.*, 2018).

En frijol común inoculado con rizobios se obtuvieron incrementos en el contenido de AIA en la raíz durante el desarrollo inicial de la asociación simbiótica. Mientras que en otras plantas que se trataron con inhibidores de transportadores de auxina, como el ácido 1-naftilftalámico y el ácido tri-indobenzoico, se redujo considerablemente el número de nódulos. Por lo que se considera que esta hormona es necesaria para el desarrollo normal de nódulos determinados (Barraza *et al.*, 2018).

Dentro de los efectos que se le atribuyen al Pectimorf® se destaca su capacidad para actuar como sustituto de hormonas tradicionales en el cultivo *in vitro*, principalmente de la auxina (Borges *et al.*, 2015; Izquierdo *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). A pesar de que aún no se han estudiado las bases moleculares que permitan definir los mecanismos mediante los cuales este producto provoca tal efecto, podría relacionarse con la transmisión de un grupo de señales que provocan incrementos en los niveles de esta fitohormona, favoreciendo todos los procesos que regula, como lo hace en el crecimiento de las raíces en peciolos de violeta africana (Falcón *et al.*, 2007) y la formación de raíces adventicias en esquejes de guayaba (Ramos *et al.*, 2013). Esto explicaría de alguna manera cómo la aplicación del producto favoreció la formación y el desarrollo de los nódulos en las plantas de frijol inoculadas. El bioestimulante Pectimorf® podría no solo tener efecto positivo en el desarrollo de los nódulos sino también en los eventos que ocurren en estas estructuras, aspecto que se intenta dilucidar en este trabajo.

Los estudios histológicos realizados en los nódulos permitieron identificar las bacterias presentes en el tejido vegetal. Tanto en los nódulos de las plantas que solo se inocularon con Azofert®-F, como en los nódulos de las plantas que se trataron con ambos bioestimulantes (Azofert®-F y Pectimorf®) se observó la presencia de un gran número de bacterias como endosimbiontes (Figura 5), lo que avala la competitividad del inoculante. Este resultado demuestra que la inoculación con Azofert®-F fue efectiva y que aparentemente la aplicación de la mezcla de OGAs no interfirió en la colonización del tejido vegetal por la bacteria.

En investigaciones llevadas a cabo por Moscatiello *et al.* (2012), con el objetivo de evaluar la posible participación de los OGAs en las comunicaciones moleculares entre leguminosas y rizobios durante el establecimiento de la simbiosis, la aplicación de OGAs con grado de polimerización de 10 a 15 moléculas de ácido galacturónico, conjuntamente con naringenina inhibió la expresión de genes *nod*. Según los autores este resultado indica una interacción antagonista entre los OGAs y la inducción por estos flavonoides en las primeras etapas de la colonización de las raíces de la leguminosa. También se observó en raíces de *Vicia sativa* subsp. *nigra* que la aplicación de filtrados de cultivo de células de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, previamente incubadas con OGAs (40 µg mL⁻¹) y naringenina (10 µM) no provocó deformaciones en los pelos radicales. Mientras que, una preparación de OGAs con grado de polimerización de 2 a 5, así como el ácido galacturónico no afectó la inducción de genes *nod* por

la naringenina. Esto sugirió que el grado de polimerización de los OGAs juega un papel crucial en su bioactividad, especialmente en la inducción nodular.

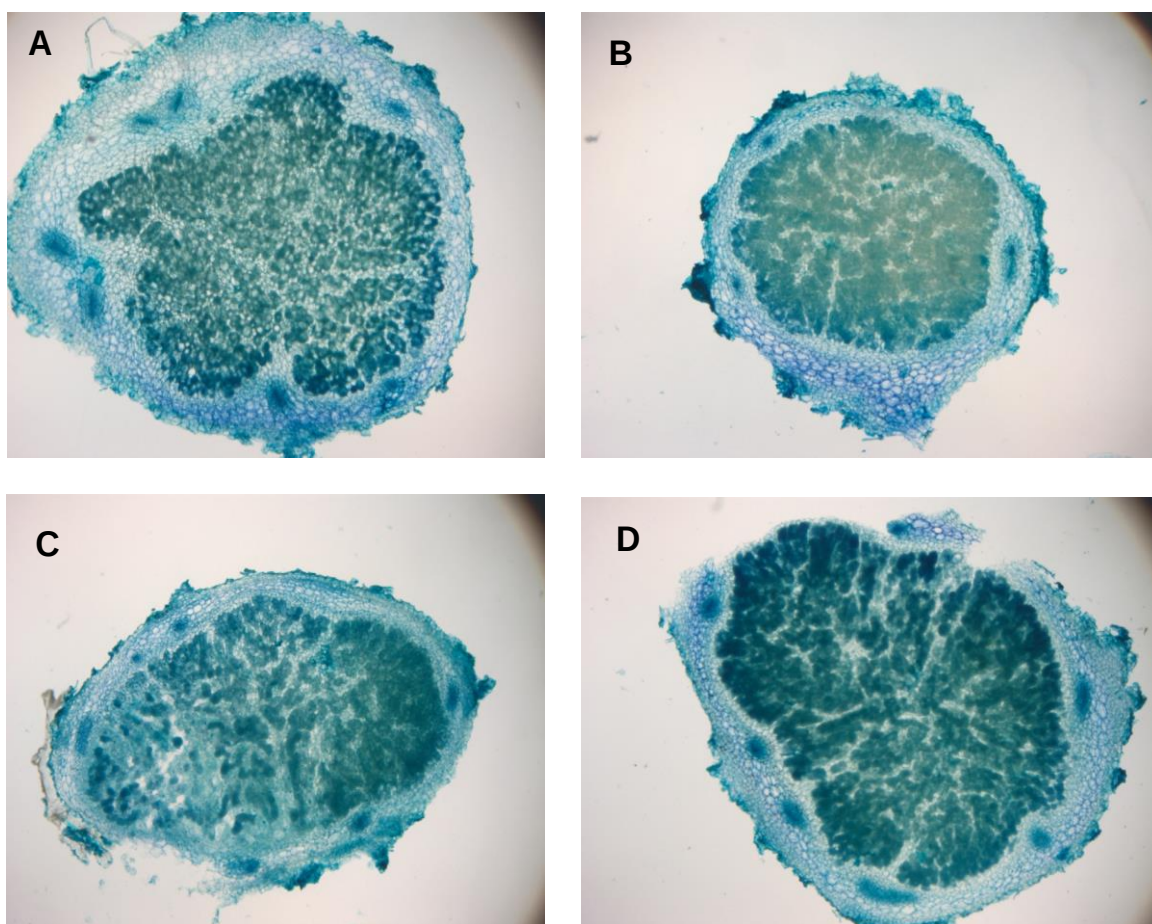


Figura 5: Imágenes de microscopía (5X) que muestran secciones de nódulos de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) de 23 DDS solo con Azofert®-F (A), tratadas las semillas con Azofert®-F y Pectimorf® (10 mg L⁻¹) (B) y Pectimorf® aplicado por aspersión foliar en V3 a las concentraciones de 5 mg L⁻¹ (C) y 100 mg L⁻¹ (D) en plantas inoculadas las semillas con Azofert®-F.

La mezcla de OGAs que se **valuó** en el presente trabajo se caracteriza por presentar entre 2 y 8 restos de ácido galacturónico (Anexo 2), por lo que según los resultados de Moscatiello *et al.* (2012) podría no actuar como antagonista de la inducción por flavonoides. Tanto el número de nódulos formados (Figura 3) como las imágenes de microscopía (Figura 5) muestran que esta mezcla no disminuyó la infectividad de la bacteria ni su establecimiento en el tejido nodular. Este resultado indica que el Pectimorf® podría no interferir en los eventos tempranos de comunicación entre macro y microsimbionte, al menos en la interacción que nos ocupa. A este

efecto también podría contribuir las características que presenta el inoculante Azofert®-F, que además de contener una cepa de *Rhizobium* eficiente, posee altas concentraciones de factores de nodulación, lo que influye positivamente en el establecimiento de la simbiosis entre la planta y la bacteria (Nápoles *et al.*, 2002).

4.2.1.2 Efecto de Pectimorf® en la actividad Nitrogenasa de plantas inoculadas con Azofert®-F

El efecto de la aplicación Pectimorf® en la actividad Nitrogenasa en los nódulos de las plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F se muestra en la figura 6. En la actividad Nitrogenasa por planta, a los 18 DDS, el mayor incremento se obtuvo con la aplicación a las semillas de Azofert®-F y Pectimorf®, con un 40,24 % por encima de la actividad de esta enzima en los nódulos de las plantas que solo se inocularon. Sin embargo, a los 23 DDS, la aspersión foliar de 5 mg L⁻¹ incrementó la actividad en un 41,43 %. A los 32 DDS, tanto la aplicación a las semillas, como la aspersión foliar a 100 mg L⁻¹ favorecieron la actividad, con incrementos de 136,87 % y 182,50 %, respectivamente, con respecto al tratamiento que solo se inoculó (Figura 6A).

En cuanto a la actividad Nitrogenasa específica, los mayores valores a los 18 DDS correspondieron a los tratamientos a los que se aplicó Azofert®-F y Pectimorf® a las semillas y donde se asperjó foliarmente a la concentración de 100 mg L⁻¹ en plantas inoculadas con Azofert®-F, con incrementos de 19,24 % y 27,30 %, respectivamente, con relación a la actividad en los nódulos de las plantas que solo se inocularon. A los 23 DDS, solo la aspersión foliar de 100 mg L⁻¹ aumentó significativamente la actividad de esta enzima, en un 49,94 %. En la evaluación correspondiente a los 32 DDS tanto la aplicación a las semillas como la aspersión foliar de la mayor concentración que se empleó (100 mg L⁻¹) incrementaron la actividad en un 108,18 % y 111,68 %, respectivamente, en comparación con la actividad de esta enzima en las plantas que solo se trataron con Azofert®-F (Figura 6B).

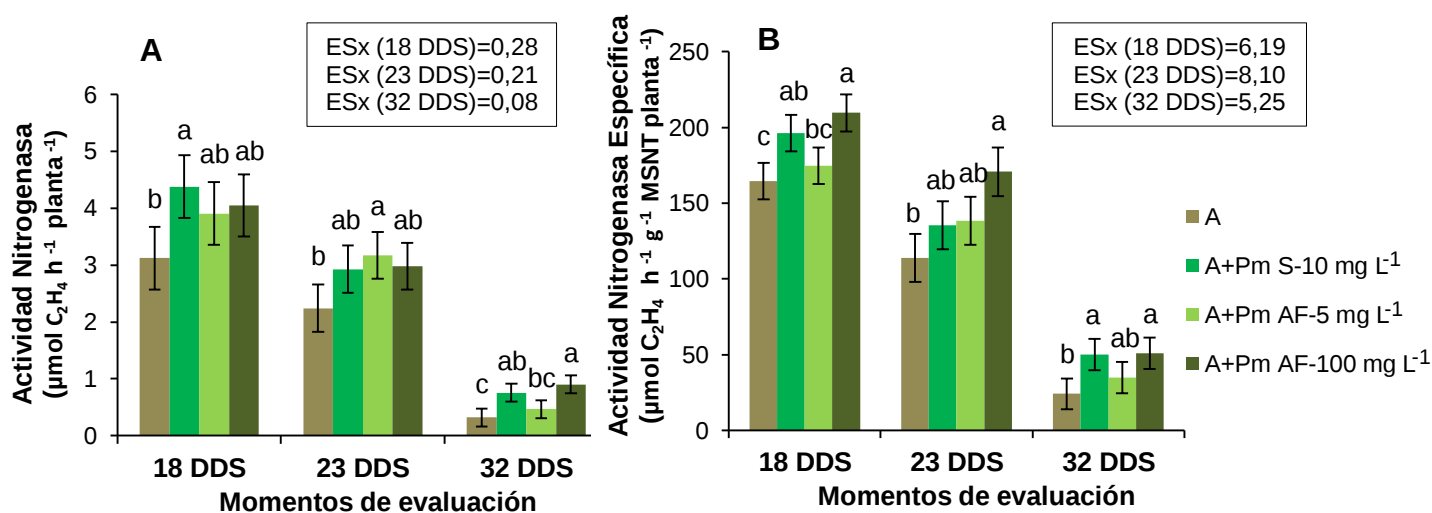


Figura 6: Efecto de la aplicación de Pectimorf® (Pm) en la actividad de la enzima Nitrogenasa por planta (A) y en la actividad Nitrogenasa específica (B) de nódulos de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas las semillas con Azofert®-F, evaluadas a los 18, 23 y 32 DDS y en condiciones controladas de cultivo. A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+ Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=15$. ESx: error estándar de la media. Las barras corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

La actividad de esta enzima disminuyó en el tiempo a causa de la **perdida** de efectividad en los nódulos. A esto quizás contribuyó la alta demanda del nitrógeno fijado en estas estructuras por parte de la planta porque la única fuente para suplir los requerimientos de este nutriente era la FBN. Sin embargo, a los 32 DDS, los incrementos en la actividad por la aplicación de Pectimorf® fueron mayores, con valores superiores al 100 % con respecto a la actividad en los nódulos de las plantas que no se trataron con este bioestimulante, **Este resultado demuestra la pérdida de actividad más rápida o temprana en los nódulos de las plantas que solo se inocularon con relación a las que se trataron con Pectimorf®.**

La pérdida de efectividad en los nódulos ocurre como consecuencia de la senescencia nodular y se puede comprobar mediante la visualización del cambio de color en el interior y la pérdida de turgencia. El color rosado (por la presencia de la Leghemoglobina) pasa a un color marrón oscuro o verde, por la alteración que sufre esta proteína a causa de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (Anderson *et al.*, 2019). En los nódulos de crecimiento determinado, como es el caso

de frijol, la senescencia comienza en la zona central de la corteza y se extiende hacia la periferia, hasta causar el deterioro total del nódulo (Fernández y Espinosa, 2008).

La disminución en la actividad Nitrogenasa específica en el transcurso del crecimiento de las plantas también fue informado por Pliego *et al.* (2003) en la variedad de frijol África, inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y crecidas en vermiculita, con la FBN como única vía de suministro de este nutriente. La máxima actividad ($103,7 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ MSNT}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) se registró a los 28 días después de la siembra y luego disminuyó significativamente a valores de $30,7 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ MSNT}^{-1} \text{ planta}^{-1}$, a los 40 días después de la siembra. Tejera *et al.* (2004) en la variedad Bayocel inoculada con esta cepa de *Rhizobium tropici* también obtuvieron un valor de actividad Nitrogenasa específica ($36,36 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ MSNT}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) inferior a los que se obtuvieron en el presente experimento con la inoculación de Azofert®-F y la aplicación de Pectimorf®. En las diferencias entre estos resultados, además de la variedad de frijol también pudieron influir las características del inoculante y el efecto de la mezcla de OGAs. En otros estudios en la variedad Bayocel, se observó un incremento en la actividad de esta enzima en el transcurso del crecimiento de las plantas, alcanzando los mayores valores en la etapa de floración, cuando las plantas además del nitrógeno fijado de la atmósfera también disponían de este nutriente por medio de la fertilización química (Grageda-Cabrera *et al.*, 2003).

Por otro lado, la enzima Nitrogenasa para su funcionamiento requiere de niveles adecuados de poder reductor y ATP. Para que los bacteroides puedan obtener estas moléculas es necesario que en los nódulos haya un suministro adecuado de compuestos carbonados (Melchor *et al.*, 2000). La principal fuente de carbohidratos que sostiene el crecimiento, desarrollo y funcionamiento de los nódulos es la fotosíntesis (Aparicio-Tejo *et al.*, 2008; Menge *et al.*, 2018). Una posible vía por la cual los OGAs **incrementan** el crecimiento de las plantas es porque estas moléculas estimulan la actividad fotosintética (El-Sharkawy, 2006; Ojeda 2015). Un mayor aporte de compuestos carbonados a los nódulos mediante la fotosíntesis significa mayor suministro de nutrientes y energía a los bacteroides, favoreciendo la actividad Nitrogenasa.

El incremento en la actividad Nitrogenasa trae consigo aumentos en la eficiencia de la fijación de nitrógeno (Gonnet y Díaz, 2010). Se pudiera considerar entonces, que la aplicación del Pectimorf® pudiera estimular la transformación del nitrógeno atmosférico, **lo que permitiría a las**

plantas disponer de mayor cantidad de iones NH_4^+ para ser utilizados en la síntesis de compuestos necesarios para el crecimiento y desarrollo.

4.2.1.3 Evaluación de la expresión génica de enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los niveles relativos de expresión de las enzimas GS y GOGAT en los nódulos de las plantas que se trataron con Azofert®-F y Pectimorf® fueron mayores que en las raíces de las plantas suplementadas con nitrógeno (5mM) (Figuras 7 y 8). En la primera evaluación (18 DDS) la expresión de GS fue mayor en los nódulos de las plantas que las semillas se trataron con Azofert®-F y Pectimorf® a 10 mg L⁻¹ en el momento de la siembra, aunque no se observaron diferencias significativas con las que solo se inocularon. A los 23 DDS, no se evidenciaron diferencias entre las plantas tratadas con los bioestimulantes, solo entre los tratamientos donde se asperjó el Pectimorf®, a favor de la mayor concentración (Figura 7)

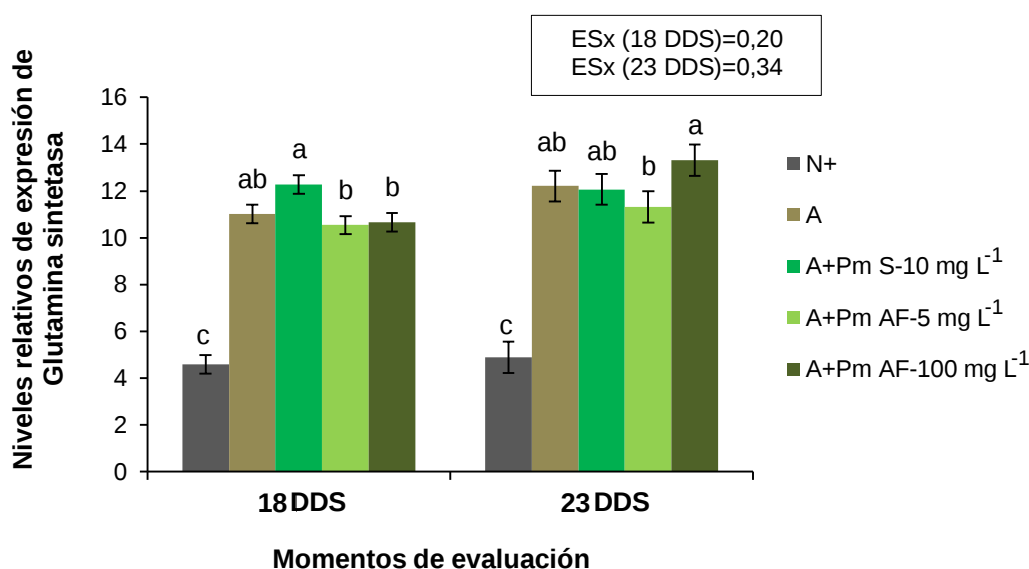


Figura 7: Expresión de la enzima Glutamina sintetasa en raíces de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) suplementadas con nitrógeno y en nódulos de plantas tratadas con Azofert®-F y Pectimorf®, en condiciones controladas de cultivo y evaluadas a los 18 y 23 DDS. N+: plantas suplementadas con nitrógeno (5 mM). A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+ Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=4$. ESx: error estándar de la media. Las barras corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

Los niveles de expresión de la enzima GOGAT fueron menores que los obtenidos para GS. Sin embargo, el efecto de la aplicación de Pectimorf® fue más evidente en la primera. Los niveles de expresión a los 18 DDS fueron mayores en las plantas que se asperjaron con Pectimorf®, con incrementos de 130,47 % con la aplicación de 5 mg L⁻¹ y de 65,74 % con la aplicación de 100 mg L⁻¹, con respecto a las plantas que solo se inocularon. A los 23 DDS solo se observó un efecto de Pectimorf® cuando se aplicó por aspersión foliar a la concentración de 100 mg L⁻¹, con un nivel de expresión superior en 74,74 %, al que se obtuvo en las plantas que solo se trataron con Azofert®-F (Figura 8).

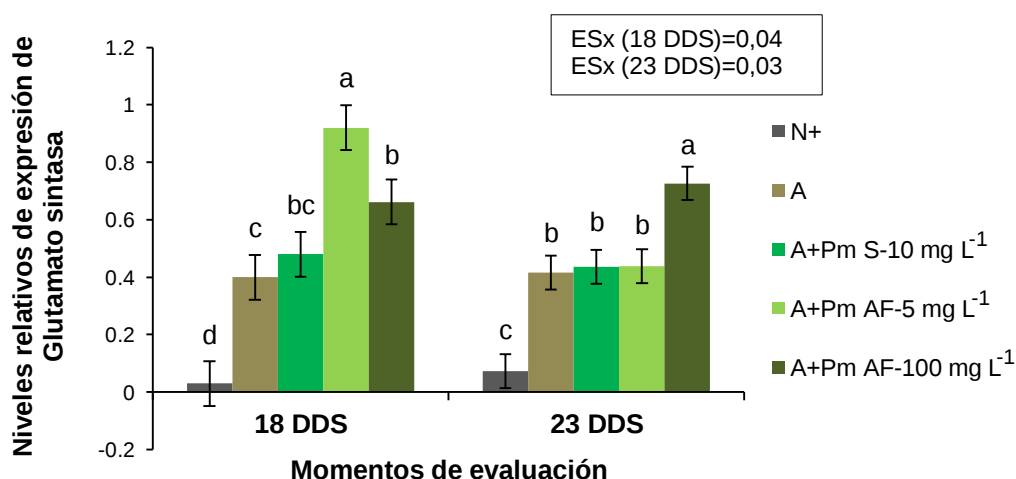


Figura 8: Expresión de la enzima Glutamato sintasa en raíces de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) suplementadas con nitrógeno y en nódulos de plantas tratadas con Azofert®-F y Pectimorf®, en condiciones controladas de cultivo y evaluadas a los 18 y 23 DDS. N+: plantas suplementadas con nitrógeno (5 mM). A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+ Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=4$. ESx: error estándar de la media. Las barras corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

Teniendo en cuenta que a los 32 DDS los resultados en el número, masa seca nodular y en la actividad Nitrogenasa disminuyeron por la senescencia nodular (Figura 3, 4 y 5), no se determinaron los niveles relativos de expresión de estas enzimas en ese momento. Según Rodrigues *et al.* (2013) la baja disponibilidad de NH₄⁺ en los nódulos provoca la inhibición de la actividad de GS y GOGAT.

Yamashita *et al.* (2019) informaron que una parte del NO_3^- que se absorbe en las raíces desde el suelo inicialmente se reduce por la actividad de la enzima Nitrato reductasa a NO_2^- y luego a NH_4^+ por acción de la Nitrito reductasa, y posteriormente se convierte en glutamato por GS y GOGAT. La otra parte del NO_3^- puede transportarse al vástago mediante el xilema y reducirse y asimilarse en las hojas. En muchas ocasiones la máxima reducción de NO_3^- se produce en este órgano (Sánchez *et al.*, 2006). Esto explicaría los bajos niveles de expresión de GS y GOGAT en las raíces de las plantas que se suplementaron con nitrógeno.

En las hojas, la enzima GOGAT más abundante es la isoforma dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) que es característica de tejidos verdes (Blanco *et al.*, 2008). En plantas de frijol ejotero la actividad de esta enzima foliar incrementa con el aumento de la fertilización nitrogenada. Sánchez *et al.* (2006) informaron que la actividad GOGAT alcanzó incrementos superiores al 65 % y GS de 85 % en las hojas, cuando se fertilizaron las plantas con 6 mM de nitrógeno.

En nódulos de frijol se identificaron dos isoenzimas dependientes de NADH (NADH-GOGAT-I y NADH-GOGAT-II). La isoenzima NADH-GOGAT-II se localiza en el tejido central del nódulo, mientras que la **insoenzima** NADH-GOGAT-I se encuentra presente en la corteza y el tejido central de los nódulos, así como en las raíces. La isoenzima NADH-GOGAT-II es la de mayor actividad en nódulos. La actividad específica de NADH-GOGAT en estas estructuras es aproximadamente 27 veces mayor que en la raíz (Blanco *et al.*, 2008). Todo lo planteado anteriormente pudiera justificar las diferencias en los niveles de expresión de estas enzimas en los nódulos de las plantas inoculadas y en las raíces de las plantas suplementadas con nitrógeno.

Las actividades de GS y GOGAT están determinadas por la presencia de NH_4^+ (Sánchez *et al.*, 2006) y aumentan en paralelo con la actividad Nitrogenasa y con la de otras enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno (Younesi y Moradi, 2015). Los incrementos en la actividad Nitrogenasa permiten un mayor contenido de amonio para ser asimilado por la planta y garantizarían una mayor expresión de las enzimas GS y GOGAT en nódulos. A pesar de que el Pectimorf®, en ambas formas de aplicación, incrementó la actividad Nitrogenasa, los niveles de expresión de GS no aumentaron significativamente con la aplicación del producto. Sin embargo, los resultados mostraron incrementos significativos en la expresión de GOGAT con el empleo de la mezcla de OGAs, sobretodo en el primer momento que se evaluó con la aplicación foliar de

ambas concentraciones (5 y 100 mg L⁻¹). En este sentido, investigaciones llevadas a cabo en alfalfa y en frijol común, mostraron también que la actividad de la enzima GS no se correlacionó con la actividad Nitrogenasa, pero las actividades GOGAT y Nitrogenasa mostraron una correlación positiva (Khadri *et al.*, 2001; Gonnet y Díaz, 2010). De esta forma, hay autores que sugieren que la actividad GOGAT puede considerarse un método que permite determinar cuán eficiente es la fijación de nitrógeno (Gonnet y Díaz, 2010). Sin embargo, otros autores consideran que tanto GS como GOGAT dependiente de NADH, son los indicadores más eficientes en la FBN en plantas leguminosas (Hungria y Kaschuk, 2014).

Por otro lado, la diferencia en los niveles de expresión de estas enzimas en los nódulos de leguminosas puede estar relacionada con la actividad de cada una de ellas en la asimilación del amonio. En la literatura se informan estudios en nódulos de plantas de frijol, variedad Bolivar, inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 899, en los que la actividad GS fue 10 veces mayor que la actividad GOGAT. Mientras que en *Vicia faba*, la actividad GS solo duplicó la actividad GOGAT (Olivera *et al.*, 2004). En plantas de caupí inoculadas con *Bradyrhizobium* también se observaron niveles de actividades GS superiores a la de la actividad GOGAT (Santos *et al.*, 2018).

El incremento que provoca esta mezcla de OGAs en la expresión de la enzima GOGAT podría significar una mayor transformación de glutamina, metabolito que se obtiene mediante la reacción que media la GS, a glutamato. De ser así, la planta podría disponer de un mayor contenido de compuestos orgánicos para la síntesis de aminoácidos y compuestos nitrogenados (Chalk *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018), que son necesarios para su crecimiento, desarrollo y productividad.

4.2.1.4 Efecto de Pectimorf® en el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F

La tabla VI muestra el comportamiento de las variables de crecimiento evaluadas en los diferentes tratamientos a los 18 DDS en el experimento en condiciones controladas. Se observa que en general las plantas respondieron mejor al tratamiento suplementado con nitrógeno. La aplicación de Pectimorf® favoreció más el desarrollo del sistema radical que el crecimiento de la parte aérea. Su efecto en estas variables dependió de la forma de aplicación.

La aspersión foliar de la mezcla de OGAs a la concentración de 5 y 100 mg L⁻¹ a plantas inoculadas con Azofert®-F provocó aumentos en la longitud del tallo con respecto al tratamiento inoculado, con incrementos de 37,66 % y 35,76 % respectivamente, sin mostrar diferencias con el tratamiento a las semillas ni con las plantas suplementadas con nitrógeno. En la longitud radical solo se observó efecto significativo de Pectimorf® en las plantas que se asperjaron con 5 mg L⁻¹, con un incremento de 25,50 %, aunque no mostró diferencias con el tratamiento asperjado con 100 mg L⁻¹ ni con el suplementado con nitrógeno (Tabla VI).

Tabla VI: Efecto en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) a los 18 DDS, tratadas con Azofert®-F (A) y Pectimorf® (Pm) o suplementadas con nitrógeno, en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	L.Tallo	L.Radical	MSA	MSR
Suplementado con nitrógeno	28,90 a	37,05 ab	0,46 a	0,55 a
A	16,33 c	33,53 b	0,32 b	0,16 b
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	17,62 bc	35,32 b	0,37 b	0,23 a
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	22,48 ab	42,08 a	0,35 b	0,22 a
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	22,17 ab	38,58 ab	0,37b	0,23 a
ESx	1,31	1,37	0,02	0,01

L.Tallo: longitud del tallo (cm planta⁻¹), L.Radical: longitud radical (cm planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (cm planta⁻¹). Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p< 0,05), n=15. ESx: error estándar de la media.

En el caso de la masa seca aérea, todos los tratamientos mostraron valores inferiores al tratamiento suplementado con nitrógeno, sin diferencias entre ellos. Sin embargo, tanto la aplicación a las semillas, como la aspersión foliar de Pectimorf® en ambas concentraciones, incrementaron significativamente la masa seca radical, con aumentos de 43,75 % para la aplicación a las semillas y la aspersión foliar de 100 mg L⁻¹ y de 37,50 % para la aspersión foliar de 5 mg L⁻¹, con respecto al tratamiento que solo se inoculó. Los resultados fueron similares al tratamiento suplementado con nitrógeno

En las evaluaciones correspondientes a los 23 DDS (Tabla VII), de manera similar a los 18 DDS, ningún tratamiento superó los resultados obtenidos con el tratamiento que recibió suministro de nitrógeno. La longitud del tallo aumentó en las plantas que se asperjaron con Pectimorf® a 100 mg L⁻¹, con respecto al resto de las plantas que se trataron con los bioestimulantes, superior en 61,32 % al tratamiento que solo se inoculó. En la longitud de la raíz y en la masa seca aérea no hubo efecto significativo de la mezcla de OGAs. Sin embargo, en la masa seca radical, tanto la aplicación a las semillas, como la aspersión foliar de Pectimorf® incrementó significativamente esta variable con respecto al tratamiento que solo se inoculó, con valores de 46,03 % y 29,41 %, respectivamente. El efecto en esta variable coincidió con el que se obtuvo en la evaluación que se realizó a los 18 DDS (Tabla VI).

Tabla VII: Efecto en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) a los 23 DDS, tratadas con Azofert®-F (A) y Pectimorf® (Pm) o suplementadas con nitrógeno, en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	L.Tallo	L.Radical	MSA	MSR
Suplementado con nitrógeno	45,86 ab	38,30	0,68 a	0,77 a
A	31,28 c	41,56	0,55 b	0,17c
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	35,26 bc	38,40	0,65 ab	0,25 b
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	31,56 c	40,05	0,57 ab	0,25 b
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	50,46 a	37,90	0,58 ab	0,22 b
ESx	3,05	1,51	0,03	0,01

L.Tallo: longitud del tallo (cm planta⁻¹), L.Radical: longitud radical (cm planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (cm planta⁻¹). Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p< 0,05), n=15. ESx: error estándar de la media.

A diferencia del resto de las evaluaciones, a los 32 DDS solo se observó efecto positivo de esta mezcla de OGAs en la longitud del tallo. Ambas formas de aplicación incrementaron esta variable con respecto a las plantas que se inocularon, con incrementos de 30,13 %, 34,07 % y 40,04 %, respectivamente (Tabla VIII). En este momento, la longitud radical de todos los tratamientos superó la obtenida con el suministro de nitrógeno.

Tabla VIII: Efecto en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) a los 32 DDS, tratadas con Azofert®-F (A) y Pectimorf® (Pm) o suplementadas con nitrógeno, en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	L.Tallo	L.Radical	MSA	MSR
Suplementado con nitrógeno	83,99 a	32,85 b	1,11 a	0,90 a
A	51,95 c	40,10 a	0,66 b	0,21b
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	67,60 b	38,10 a	0,73 b	0,26 b
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	69,65 ab	39,51 a	0,66 b	0,27 b
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	72,75 ab	38,50 a	0,63 b	0,24 b
ESx	3,84	1,18	0,04	0,03

L.Tallo: longitud del tallo (cm planta⁻¹), L.Radical: longitud radical (cm planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (cm planta⁻¹). Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=15$. ESx: error estándar de la media.

En los tres momentos que se evaluaron, el tratamiento suplementado con nitrógeno mostró resultados superiores al resto de los tratamientos en casi todas las variables, excepto en la longitud radical. Evidentemente el suministro de nitrógeno influyó positivamente en el desarrollo de las plantas.

Los mejores efectos en el crecimiento con la aplicación de Pectimorf® a plantas inoculadas con Azofert®-F se obtuvieron en la longitud del tallo en los tres momentos que se evaluaron y en la masa seca radical a los 18 y 23 DDS. Los efectos en esta última variable coinciden con los resultados que se obtuvieron anteriormente en los estudios de concentración y formas de aplicación, razón por la que muchos autores le atribuyen poder enraizador a esta mezcla de OGAs (Falcón y Cabrera, 2007; Álvarez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017). Según Dell'Amico *et al.* (2017), el incremento en el crecimiento radical le posibilita a la planta un mayor contacto con el suelo, lo que le garantiza una mayor absorción de agua y minerales, favoreciendo la nutrición de las plantas, su crecimiento y desarrollo, que puede repercutir positivamente en la productividad del cultivo. Estos resultados entonces nos hacen pensar que los incrementos en la longitud del tallo podrían estar relacionados con el aumento en la masa seca

radical y que los minerales que absorbieron las plantas, quizás no fueron suficientes para favorecer el desarrollo foliar.

4.2.1.5 Efecto de Pectimorf® en la efectividad de la FBN de plantas inoculadas con Azofert®-F

Al analizar el efecto de los biostimulantes en la efectividad de la FBN (E.FBN) se pudo apreciar que el Pectimorf® incrementó esta variable cuando se aplicó a las semillas conjuntamente con Azofert®-F, así como cuando se asperjó en la etapa de crecimiento V3 en plantas inoculadas con este bioestimulante microbiano. Los mayores efectos se observaron en los primeros momentos de evaluación. A los 18 DDS, el mayor resultado se obtuvo con la aspersión foliar a 5 mg L⁻¹, con un incremento de 23,36 % con respecto al tratamiento que solo se inoculó. Sin embargo, a los 23 DDS la aplicación a las semillas fue el tratamiento que más incrementó esta variable, con 23,84 % (Tabla IX).

Tabla IX: Efectividad de la fijación biológica del nitrógeno (E.FBN) en plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) tratadas con Azofert®-F (A) y Pectimorf® (Pm), evaluada a los 18, 23 y 32 DDS y en condiciones controladas de cultivo.

Tratamientos	E.FBN (%)		
	18 DDS	23 DDS	32 DDS
A	49,78	48,52	36,62
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	60,75	60,09	39,03
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	61,41	58,79	36,77
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	61,19	57,85	37,47

A los 32 DDS, disminuyó la E.FBN en todos los tratamientos, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en el número y la masa seca de los nódulos y en la actividad Nitrogenasa previamente analizados (Figuras 3, 4 y 6). Al parecer los cambios fisiológicos que ocurren en los nódulos a causa de la senescencia, provocaron una disminución en estos indicadores, que conllevaron a la pérdida de eficiencia en la FBN. Según Anderson *et al.* (2019), en frijol común la senescencia nodular disminuye la actividad Nitrogenasa, lo que provoca una disminución en la fijación de nitrógeno.

Los incrementos observados en la E.FBN con el empleo de Azofert®-F y Pectimorf® en sus dos formas de aplicación y a las tres concentraciones que se evaluaron, podrían ser resultado de los aumentos significativos observados en las variables de nodulación: número (Figura 3) y masa seca de los nódulos totales (Figura 4). Un mayor número de estas estructuras garantiza mayor cantidad de sitios donde fijar el nitrógeno atmosférico. Los incrementos en la masa seca nodular se relacionan con mayor cantidad de bacterias infectando el tejido vegetal, lo que se corresponde con una mayor actividad Nitrogenasa (Haag *et al.*, 2013). A su vez, el incremento en la actividad de esta enzima, aumenta la disponibilidad de NH_4^+ para la síntesis de glutamato por la acción de las enzimas GS y GOGAT, que garantiza mayor síntesis de compuestos nitrogenados, que serán utilizados por la planta para su crecimiento (Chalk *et al.*, 2017).

Los resultados hasta aquí observados, demuestran que la aplicación de Pectimorf® a plantas inoculadas con Azofert®-F incrementó la nodulación, la fijación y asimilación del nitrógeno atmosférico, sin embargo no se observó un efecto positivo en la biomasa aérea, solo en la longitud del tallo y en la biomasa radical. En este resultado quizás influyeron las condiciones de cultivo que conllevaron a una pérdida temprana en la actividad de los nódulos. Tal vez si estas estructuras se hubiesen mantenido activas durante más tiempo hubiese garantizado que el aporte de nitrógeno mediante la FBN contribuyera a mayores incrementos en la biomasa aérea.

No obstante, el bioestimulante Pectimorf® pudiera constituir una alternativa que incremente la baja eficiencia de la simbiosis *Rhizobium*-frijol común. Se consideró oportuno evaluar entonces el efecto de esta mezcla de OGAs en la nodulación, el crecimiento, el contenido de ureidos y el aporte de algunos nutrientes, en condiciones menos controladas de cultivo.

4.2.2 Efecto de Pectimorf® en la nodulación, el crecimiento, el contenido de ureidos y en el aporte de nutrientes en plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F, en condiciones semicontroladas

4.2.2.1 Efecto de Pectimorf® en la nodulación y el crecimiento de plantas inoculadas con Azofert®-F

La tabla X muestra el efecto de la aplicación de Pectimorf® en las variables de nodulación y de crecimiento que se evaluaron en las plantas de frijol inoculadas con Azofert®-F y cultivadas en condiciones semicontroladas. En el número y en la masa seca de los nódulos totales formados por

planta, los incrementos significativos se obtuvieron con la aplicación a las semillas de ambos bioestimulantes y con la aspersión foliar de Pectimorf® a la concentración de 100 mg L⁻¹, con aumentos de 30,12 % y 50,60 %, respectivamente, en el número de nódulos y de 62,50 % y 50,00 % en la masa seca de estas estructuras, con respecto al tratamiento que solo se inoculó. Algunos autores consideran a la masa seca nodular como una forma indirecta de estimar la efectividad de la simbiosis que se establece entre los rizobios y las leguminosas (De Andrade *et al.*, 2018). En estas condiciones de cultivo menos controladas se confirman los resultados antes encontrados para la aplicación a las semillas de ambos bioestimulantes y la aspersión foliar de Pectimorf® a 100 mg L⁻¹ (Figuras 3 y 4).

Tabla X: Efecto de la aplicación de Pectimorf® (Pm) en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas con Azofert-F® (A), en la etapa de crecimiento R5 y condiciones semicontroladas de cultivo.

Tratamientos	NNT	MSNT	MSA	MSR
A	83 c	0,08 b	1,21 b	0,46 c
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	108 ab	0,13 a	1,35 ab	0,59 ab
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	94 bc	0,10 ab	1,22 b	0,49 bc
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	125 a	0,12 a	1,49a	0,62 a
ESx	5,86	0,004	0,06	0,03

NNT: número de nódulos totales (u planta⁻¹), MSNT: masa seca de nódulos totales (g planta⁻¹), MSA: masa seca aérea (g planta⁻¹), MSR: masa seca radical (g planta⁻¹). Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey (p< 0,05), n=10. ESx: error estándar de la media.

En los indicadores relacionados con el crecimiento vegetal, los mayores efectos se observaron igualmente con la aplicación de Azofert-F® y Pectimorf® a las semillas y la aspersión foliar a la mayor concentración que se aplicó (100 mg L⁻¹), con incrementos de 28,26 % y 34,78 %, respectivamente, en la masa seca de la raíz, con relación a las plantas que solo se trataron con Azofert-F®. Sin embargo, la masa seca aérea solo mostró incrementos significativos con la aplicación de este último tratamiento, superior en 23, 14 % al tratamiento que solo se inoculó. Este tratamiento también incrementó esta variable en los estudios de concentración (Tabla V).

Es importante señalar, que en este experimento, el tratamiento con mejores resultados en la nodulación y el crecimiento, con efecto positivo en todas las variables evaluadas corresponde a la aspersión foliar de Pectimorf® a 100 mg L⁻¹ a plantas inoculadas con Azofert-F®, aunque la aplicación de estos bioestimulantes a las semillas solo no estimuló significativamente la masa seca aérea. En la literatura, varios autores informan que los incrementos en la nodulación traen consigo aumentos en las variables de crecimiento (Granda *et al.*, 2014; Carter y Tegeder, 2016; Granda *et al.*, 2017, Costales y Falcón, 2018). Granda *et al.* (2014) en frijol común, demostraron una correlación positiva entre el número de nódulos y la masa seca radical. Granda *et al.*, (2016b) también observaron en el cultivar Mantequilla inoculadas con *R. leguminosarum* y *R. etli* una correlación positiva entre el número, la masa seca de nódulos, la masa seca radical y la masa seca aérea. Según estos autores, los incrementos en las variables de crecimiento se deben a una mayor disponibilidad de nitrógeno como resultado de la fijación de este elemento, proceso que se favoreció con el incremento en el número de nódulos y en la masa seca de estas estructuras.

De forma general, en este estudio en condiciones semicontroladas, se observó un efecto positivo de la mezcla de OGAs, principalmente en la nodulación y en el desarrollo radical. Este mismo efecto del bioestimulante se obtuvo en los estudios en condiciones controladas (Figuras 1, 2, 4 y 5; Tablas IV, V, VI y VII). Es importante resaltar que en este experimento en condiciones menos controladas, la aplicación foliar de Pectimorf® a la concentración de 100 mg L⁻¹ incrementó la masa seca aérea. Es probable que este resultado se deba a un mayor aporte de nitrógeno mediante la fijación biológica comparado con el experimento anterior, porque en el momento de la evaluación (R5) los nódulos aún permanecían efectivos. Además de la FBN las plantas también contaban con el nitrógeno procedente del suelo, que a pesar de que se encontraba en bajos niveles, pudo haber favorecido el crecimiento de las plantas. Los resultados demuestran que el producto no solo promueve el crecimiento y el desarrollo de las plantas a concentraciones entre 5 y 20 mg L⁻¹, según lo informado antes por Falcón y Cabrera (2007), Álvarez *et al.* (2011), Pérez *et al.* (2013) y Ramos *et al.* (2013), sino que puede tener efectos similares a una concentración más alta, como 100 mg L⁻¹.

4.2.2.2 Efecto de Pectimorf® en el contenido de ureidos de plantas inoculadas con Azofert®-F

El contenido de ureidos en los exudados xilemáticos de las plantas de frijol Cuba Cueto 25-9-N tratadas con Azofert®-F y Pectimorf® se muestra en la figura 9. No se observaron diferencias entre los tratamientos con ambos bioestimulantes, pero la aplicación de Azofert®-F y Pectimorf® a las semillas, mostró diferencias significativas con las plantas que solo se inocularon, con un valor de 20,85 % por encima de este tratamiento control. Esta forma de aplicación de Pectimorf® también provocó aumentos significativos en el número y en la masa seca de los nódulos, como se observó anteriormente en la tabla X y en el experimento en condiciones controladas (Figuras 3 y 4).

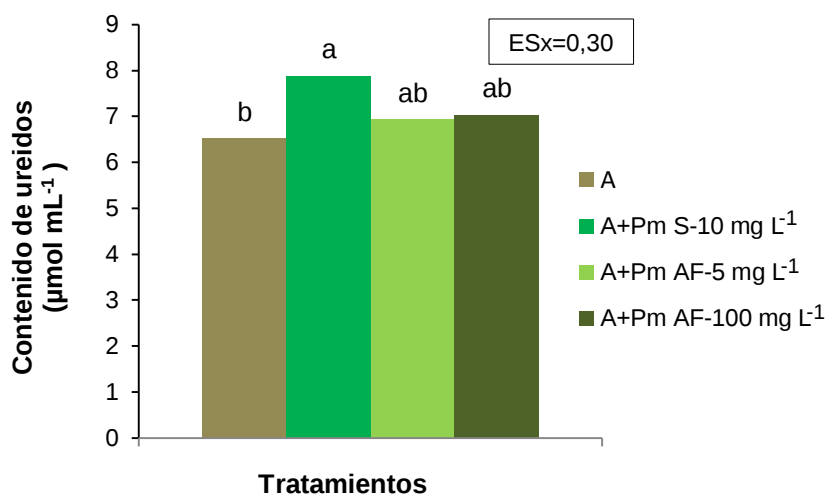


Figura 9: Efecto de la aplicación de Pectimorf® en el contenido de ureidos en exudado xilemático de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas sus semillas con Azofert®-F, en la etapa de crecimiento R5 y condiciones semicontroladas de cultivo. A: Azofert®-F, A+Pm S-10 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (10 mg L⁻¹) aplicados a las semillas, A+Pm AF-5 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (5 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3, A+Pm AF-100 mg L⁻¹: Azofert®-F+Pectimorf® (100 mg L⁻¹) asperjado foliarmente en V3. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=6$. ESx: error estándar de la media.

De acuerdo a la literatura, las plantas que nodulan acumulan más ureidos que cualquier otro compuesto nitrogenado en los exudados del xilema, estos metabolitos pueden comprender hasta el 90 % del nitrógeno total en este tejido conductor (Ramírez *et al.*, 2013; Hungria y Kaschuk, 2014). Según Péliissier *et al.* (2004) en plantas de soya noduladas, que recibieron nitrógeno exclusivamente a través de la fijación biológica, el contenido de ureidos en los exudados del

xilema fue de aproximadamente el 78 %, mientras que en los exudados de las plantas que no nodularon y que se fertilizaron con NO_3^- fue de un 6 %.

La aplicación de ambos bioestimulantes a las semillas, además de incrementar el contenido de ureidos y las variables de nodulación favoreció la acumulación de materia seca en la raíz, pero no incrementó la biomasa aérea. Sin embargo, la aplicación foliar de 100 mg L^{-1} de Pectimorf® a plantas inoculadas con Azofert®-F incrementó las variables de nodulación, la biomasa radical y aérea, aunque no aumentó significativamente el contenido de ureidos en los exudados xilemáticos. Estos resultados muestran que no se obtuvo un incremento significativo en el contenido de ureidos en los exudados xilemáticos y en la biomasa aérea con el mismo tratamiento, aunque es importante señalar que en la masa seca aérea la aplicación a las semillas de ambos bioestimulantes no mostró diferencias significativas con el tratamiento con mayor efecto en esta variable. Es posible que en este resultado influyera la etapa de crecimiento en la que se evaluó el cultivo, quizás cuando se asperjaron las plantas con Pectimorf® a la concentración de 100 mg L^{-1} , en etapas anteriores el contenido de ureidos transportado por el xilema hacia la parte aérea era mayor, por lo que contribuyó al crecimiento de la planta en etapas posteriores. Otra razón podría ser, el incremento en la absorción del nitrógeno del suelo en forma de NO_3^- o NH_4^+ , y no solo nitrógeno, también otros nutrientes que son importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, teniendo en cuenta el efecto que tiene esta mezcla de OGAs en el desarrollo del sistema radical. Además, no se puede descartar la posibilidad de que el bioestimulante Pectimorf® también tenga un efecto positivo en el metabolismo del nitrógeno absorbido por la raíz.

Los OGAs también estimulan la actividad fotosintética, lo que provoca mayor ganancia de esqueletos carbonados para ser utilizados en la síntesis de compuestos necesarios para el crecimiento de las plantas (El-Sharkawy, 2006; Ojeda, 2015). Este podría ser otro mecanismo mediante el cual el bioestimulante Pectimorf® incrementó la biomasa aérea de las plantas cuando se aplicó por aspersión foliar a 100 mg L^{-1} en plantas inoculadas con Azofert®-F.

4.2.2.3 Efecto de Pectimorf® en el contenido de nutrientes de plantas inoculadas con Azofert®-F

El contenido de nutrientes en la planta refleja la eficiencia en la toma y asimilación de los mismos mediante la absorción por la raíz y la FBN (Pádua *et al.*, 2017), por lo que se consideró entonces evaluar el contenido de los nutrientes nitrógeno y fósforo en las hojas trifoliadas de las plantas de frijol tratadas con los bioestimulantes Azofert®-F y Pectimorf®. En la tabla XI se observa que el contenido de nitrógeno fue mayor en las hojas de las plantas que se inocularon las semillas con Azofert®-F y se asperjaron posteriormente con Pectimorf® a la concentración de 100 mg L⁻¹, superior en un 18,35 % con respecto al contenido en las plantas que solo se inocularon. En cuanto al contenido de fósforo, los incrementos se obtuvieron con la aplicación de 10 mg L⁻¹ a las semillas conjuntamente con Azofert®-F y con la aspersión foliar posterior de 5 mg L⁻¹ de Pectimorf®, con incrementos de 11,11 % y 13,89 %, respectivamente.

Tabla XI: Efecto de la aplicación de Pectimorf® (Pm) en el contenido de nitrógeno y fósforo en hojas trifoliadas de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas con Azofert®-F (A) y cultivadas en condiciones semicontroladas.

Tratamientos	Elementos	
	N (%)	P (%)
A	3,87 b	0,36 b
A+Pm 10 mg L ⁻¹ a semillas	3,92 b	0,40a
A+Pm asperjado foliarmente a 5 mg L ⁻¹	4,22 ab	0,41 a
A+Pm asperjado foliarmente a 100 mg L ⁻¹	4,58 a	0,37 b
ESx	0,1	0,007

N: nitrógeno, P: fósforo. Medias con letras iguales no difieren significativamente según Tukey ($p < 0,05$), $n=2$. ESx: error estándar de la media.

Resulta interesante señalar que el tratamiento asperjado con 100 mg L⁻¹ mostró mayor contenido de nitrógeno en las hojas pero un menor contenido de fósforo, con respecto al resto de los tratamientos con Pectimorf®. Este resultado quizás sea consecuencia de un gasto energético superior debido al incremento en la fijación y/o al metabolismo del nitrógeno. Se conoce que el fósforo se requiere en grandes concentraciones para la síntesis de ATP, molécula que tiene una

función importante en la fijación biológica y en el metabolismo del nitrógeno, ya que interviene en el funcionamiento de la enzimas Nitrogenasa y Glutamina sintetasa, en la biosíntesis de membrana y en la transmisión de señales (Samavat *et al.*, 2012; Divito y Sadras, 2014). El fósforo es fundamental también en procesos como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de carbohidratos, así como en la división y elongación celular y en la formación de las semillas (Ghanbari *et al.*, 2013).

En el resto de los tratamientos con Pectimorf®, el incremento de fósforo en las hojas trifoliadas demuestra una mayor absorción de este nutriente por las raíces, lo que podría estar dado por el alto contenido de fósforo en el suelo donde crecieron estas plantas (Tabla II) y por el incremento en el desarrollo radical, como resultado de la aplicación de esta mezcla de OGAs (Tablas VI, VII, X). Es importante aclarar que, aunque en la masa seca radical, la aplicación foliar de Pectimorf® a 5 mg L⁻¹ no mostró diferencias significativas con las plantas que solo se trataron con Azofert®-F, tampoco se observaron diferencias entre este tratamiento y la aplicación de ambos bioestimulantes a las semillas, que sí tuvo un efecto significativo.

En otros estudios, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) la aplicación foliar de Pectimorf® a los 12 y 30 DDS, provocó incrementos significativos en el contenido de nitrógeno foliar, que favoreció el rendimiento del cultivo. Sin embargo, esta mezcla de OGAs no aumentó el contenido de fósforo (Terry *et al.*, 2011).

Por otro lado, el tratamiento foliar con 100 mg L⁻¹ además de incrementar el contenido de nitrógeno en las hojas trifoliadas mostró un efecto positivo en la masa seca aérea de las plantas (Tabla X). Hayat *et al.* (2008) en plantas de frijol también obtuvieron un alta correlación entre estos indicadores. Las plantas con mayor contenido de nitrógeno en las hojas, también presentaron los incrementos más significativos en las variables de nodulación (número y masa seca de los nódulos) y en la masa radical (Tabla X), pero no en el contenido de ureidos en los exudados xilemáticos (Figura 9). Estos resultados indican que el incremento de este macronutriente no solo podrían relacionarse con el efecto de la aplicación combinada de Azofert®-F y Pectimorf® en la fijación de nitrógeno, sino que además, el bioestimulante Pectimorf® podría favorecer el metabolismo del nitrógeno proveniente del suelo cuando se aplicó foliarmente a la concentración de 100 mg L⁻¹. Tampoco se observó una relación entre el contenido de ureidos en los exudados xilemáticos y el contenido de nitrógeno en las hojas trifoliadas cuando se aplicaron ambos

bioestimulantes a las semillas, quizás los compuestos nitrogenados productos de la FBN, se almacenaron en el tallo, para luego en etapas posteriores de crecimiento del cultivo movilizarse hacia la parte aérea. Según Grageda-Cabrera *et al.* (2003) y Yong *et al.* (2018), en frijol, los ureidos pueden almacenarse en los tallos, principalmente en las etapas tempranas del desarrollo reproductivo y luego se movilizan a las vainas para la síntesis de proteínas, que contribuyen al desarrollo de las semillas.

Es importante aclarar que el contenido de nitrógeno total que se determinó en las hojas trifoliadas en el presente trabajo, no brinda información precisa de qué porcentaje de este elemento se incorporó a la planta mediante la fijación biológica. Para cuantificar el nitrógeno fijado biológicamente es necesario recurrir a técnicas isotópicas de marcaje con ^{15}N , este es el único método que permite distinguir la contribución relativa del nitrógeno del suelo, del fertilizante y de la atmósfera, al nitrógeno total de la planta (Grageda-Cabrera *et al.*, 2003).

A pesar de no determinar el contenido de nitrógeno fijado de la atmósfera, se demostró que la aplicación foliar de Pectimorf® a la concentración de 100 mg L^{-1} a las plantas de frijol inoculadas las semillas con Azofert®-F, incrementó la concentración de este elemento en las hojas trifoliadas. Esto constituye un resultado importante para la ciencia, fundamentalmente para la agricultura, ya que el nitrógeno es considerado uno de los elementos que más influyen en el rendimiento de los cultivos (Liriano *et al.*, 2012). El incremento en el contenido de este macronutriente permite también que las células de las plantas lleguen más tarde a la senectud, manteniéndolas turgentes, retrasa la lignificación, el endurecimiento de los tejidos y acelera el desarrollo (Raigón *et al.*, 2006).

4.3 Consideraciones generales

La FSN posee gran importancia para la Agricultura, dada su contribución a la fertilidad de los suelos, a la producción de alimentos y a la racionalización en la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Chanway *et al.*, 2014.). Sin embargo, no todos los sistemas simbióticos muestran una eficiencia similar y la que establecen los rizobios con el frijol común resulta de las menos competitivas (Kakraliya *et al.*, 2018), por lo que se buscan alternativas para incrementar la eficiencia en este proceso. Los estudios para resolver esta problemática se han dirigido fundamentalmente a encontrar cepas más competitivas y eficientes y variedades más susceptibles

(Martínez, 2003; Nápoles *et al.*, 2016a), pero en este trabajo nos propusimos evaluar el posible efecto de un bioestimulante no microbiano en esta interacción simbiótica.

Los experimentos demostraron, de forma general, un efecto positivo de Pectimorf® a la concentración de 10 mg L⁻¹ conjuntamente con Azofert®-F y cuando se asperjó foliarmente a la concentraciones de 5 y 100 mg L⁻¹ en plantas inoculadas, en el número y la masa seca los nódulos, lo que implicó mayor cantidad de sitios de infección y bacteroides establecidos. También incrementó la fijación y transformación del nitrógeno atmosférico, a partir de aumentos en la actividad de la enzima Nitrogenasa y en la expresión de la enzima GOGAT garantizando una mayor disponibilidad de compuestos nitrogenados, lo que deja claro el efecto positivo de este bioestimulante en la efectividad de la FBN. Los resultados en el contenido de nitrógeno y fósforo foliar, así como en la biomasa aérea y radical, confirman un efecto posterior y consecuente en el crecimiento. Además, en todos los experimentos resaltó la acción de este bioestimulante en el desarrollo del sistema radical.

Mediante este estudio también se encontró que el producto Pectimorf® favorece el crecimiento por encima de 20 mg L⁻¹, que hasta entonces era la mayor concentración que se había informado como efectiva en la literatura (Falcón y Cabrera, 2007; Álvarez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013 y Ramos *et al.*, 2013) y que la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899, base del bioestimulante Azofert®-F, presentó una alta infectividad en la variedad de frijol Cuba Cueto-25-9-N, lo que permitió que los eventos que posibilitan la formación y el funcionamiento de los nódulos ocurrieran exitosamente. En otras investigaciones en *Phaseolus vulgaris* también se ha demostrado que esta cepa establece una simbiosis efectiva con esta leguminosa (Pliego *et al.*, 2003; Tejera *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2013). Al éxito de esta simbiosis pudo contribuir además, las altas concentraciones de factores de nodulación que posee el producto, determinantes en la interacción entre la planta y la bacteria (Nápoles *et al.*, 2002).

De igual modo se observó que las condiciones de cultivo como temperatura y humedad relativa, así como las características del suelo donde crecen las plantas pueden influir sobre el efecto de las diferentes formas de aplicación del producto en las variables de nodulación y crecimiento. En los estudios de concentración, la aplicación a las semillas de ambos bioestimulantes no incrementó las variables de nodulación y el efecto solo se observó en la masa seca radical. Sin embargo, en los estudios en condiciones semicontroladas el efecto en la nodulación fue

significativo. Es probable que las diferencias en el contenido de fósforo y de pH en ambos suelos contribuyeran a estos resultados. En el experimento en condiciones semicontroladas los niveles de este nutriente eran mayor con respecto al suelo empleado anteriormente. Un suelo enriquecido en fósforo favorece la simbiosis, permite la formación de mayor número y masa de los nódulos e incrementa la fijación de nitrógeno (Mayz, 2011). En el caso del pH, los valores cercanos al neutro favorecen la nodulación y la actividad de estas estructuras en frijol (Torabian *et al.*, 2019), razón por la que quizás se obtuvo mayor nodulación en los experimentos en condiciones menos controladas.

Los resultados de la presente investigación permiten afirmar que la aplicación del bioestimulante Pectimorf®, en combinación con el inoculante Azofert®-F, constituye una alternativa ecológica y económicamente viable para incrementar la FBN en frijol, teniendo en cuenta que es un cultivo poco favorecido en este proceso. Tanto su efecto enraizador, comprobado una vez más en este estudio, como los beneficios que provoca en la fijación biológica, podrían garantizar un adecuado crecimiento, desarrollo e incrementos en el rendimiento en esta leguminosa. Esta constituye la primera evidencia científica relacionada con la influencia de una mezcla de OGAs en la eficiencia de la simbiosis en plantas de frijol.

5. CONCLUSIONES

1. El efecto de Pectimorf® en la nodulación y en el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculadas con Azofert®-F, depende de su concentración y de la forma de aplicación empleada.
2. De las concentraciones y formas de aplicación de Pectimorf® estudiadas, los mejores efectos se obtienen con la aplicación a las semillas de 10 mg L⁻¹, conjuntamente con Azofert®-F y con la aspersión foliar de 100 mg L⁻¹ en la etapa de crecimiento V3 en plantas previamente inoculadas, lo que sugiere diferencias en los mecanismos de acción que benefician el desarrollo de este cultivo.
3. El mayor efecto Pectimorf® en el crecimiento de las plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) biofertilizadas con Azofert®-F se obtiene en el desarrollo del sistema radical.
4. El bioestimulante Pectimorf® combinado con Azofert®-F incrementa la nodulación, la fijación y transformación del nitrógeno atmosférico, lo que favorece en más de un 10 % la eficiencia de la simbiosis en el frijol (Cuba Cueto-25-9-N).

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la combinación de las formas de aplicación de Pectimorf® a las concentraciones seleccionadas en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N).
2. Realizar experimentos en campo para determinar el efecto de la aplicación Pectimorf® en el rendimiento y en la calidad del cultivo del frijol (Cuba Cueto-25-9-N) inoculado con Azofert®-F.
3. Evaluar el efecto de Pectimorf® en el metabolismo del nitrógeno proveniente del suelo y del carbono en plantas de frijol (Cuba Cueto-25-9-N) biofertilizadas con Azofert®-F.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez, I., Reynaldo, I., Cartaya, O., Terán, Z. (2011). Efectos de una mezcla de oligogalacturónidos en la morfología de hortalizas de importancia económica. Cultivos Tropicales 32(3), 69-74. ISSN: 0258-5936. 
2. Álvarez, I. y Reynaldo, I.M. (2015). Efecto del Pectimorf® en el índice estomático de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales 36(3), 82–7. ISSN 0258-5936. 
3. Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of Systemic Bacteriology 47, 996-1006. ISSN: 0020-7713.
4. Anderson, H., Santana, V., Villarinho, D.D., Sanches, R., Simoes, J.L. (2019). Molecular and biochemical changes of aging-induced nodules senescence in common bean. Symbiosis 79(1), 33-48. doi: 10.1007/s13199-019-00618-2.
5. Aparicio-Tejo, P., Arrese-Igor, C., Becana, M. (2008). Fijación biológica de nitrógeno En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Eds. J. Azcón-Bieto y M. Talón. McGraw-Hill Interamericana de España, S.L., p. 305-322. ISBN: 978-84-481-9293-8.
6. Ayala, P.J., Tornés, N., Reynaldo, I.M. (2013). Efecto de biofertilizantes y Pectimorf en la producción de soya (*Glycine max* L.) en condiciones de secano. Revista Granma Ciencia 17(2), 1-11. ISSN: 1027-975X.
7. Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science 9(1473), 1-17. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
8. Bao, L., Hernández, R.M., Diosdado, E., Román, M.I., González, C., Rojas, A., Rodríguez, A. (2013). Embriogénesis somática de *Citrus macrophylla* Wester con el empleo del Pectimorf® y análogos de brasinoesteroides. Revista Colombiana de Biotecnología 15(1), 189–194. ISSN: 1909-8758.
9. Barraza, A., Coss, E.L., Vizuet, J.C., Martínez, K., Hernández, J.L., Ordaz, J.J., Winkler, R., Tiessena, A., Alvarez, R. (2018). Down-regulation of PvTRX1h increases nodule number and affects auxin, starch, and metabolic fingerprints in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 274, 45–58. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.05.006.
10. Bensmihen, S. (2015). Hormonal Control of Lateral Root and Nodule Development in Legumes. Plants 4, 523-547. doi:10.3390/plants4030523. 
11. Bernal, L., Coello, P., Acosta, J., Martínez-Barajas, E. (2007). Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Agrociencia 41(4): 417-423. ISSN: 2521-9766.

12. Blanco, L., Reddy, P.M., Silvente, S., Bucciarelli, B., Khandual, S., Alvarado-Affantranger, X., Sánchez, F., Miller, S., Vance, C., Lara-Flores, M. (2008). Molecular cloning, characterization and regulation of two different NADH-glutamate synthase cDNAs in bean nodules. *Plant, Cell and Environment* 31, 454–472. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01774.x.
13. Bonilla, I. (2008). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Eds. J. Azcón-Bieto y M. Talón. McGraw-Hill Interamericana de España, S.L., p. 103-120. ISBN: 978-84-481-9293-8.
14. Borges, M., Reyes, D.M., Zayas, J.M., Destrade, R. (2015). Efecto de Pectimorf® en el enraizamiento *in vitro* de plantas de ‘FHIA-18’ (Musa AAAB). *Biotecnología Vegetal* 15(4), 227–232. ISSN: 2074-8647.
15. Borges, M., González, O., Reyes, D.M., Rodríguez, M., Villavicencio, A., Estrada, E. (2017). Respuesta de plantas *in vitro* de ñame clon ‘Blanco de Guinea’ al uso del Pectimorf®. *Cultivos Tropicales* 38(2), 129-136. ISSN: 1819-4087.
16. Brown, P. y Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science* 6(671), 1-3. doi: 10.3389/fpls.2015.00671.
17. Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., Ferrante, A. (2014). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture: an International Journal for Sustainable Production Systems* 31(1), 1-17. doi: 10.1080/01448765.2014.964649.
18. Cabrera, J.C. (2000). Obtención de una mezcla de (1-4) - α -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. Tesis de Doctorado. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Universidad Agraria de la Habana, Cuba, 100 p.
19. Cabrera, J.C. (2003). Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Patente Cubana no. 22859/2003.
20. Cabrera, J.C., González, G., Nápoles, M.C., Falcón, A.B., Costales, D., Rogers, H.J., Diosdado, E., González, S., Cabrera, G., González, L., Wattiez, R. (2013). Use of Oligosaccharins in Agriculture. *Acta Horticulturae* 1009, 195-212. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.1009.24.
21. Calero, A., Castillo, Y., Quintero, E., Pérez, Y. (2018). Efecto de cuatro densidades de siembra en el rendimiento agrícola del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia* 71(1), 88-100. doi: 10.15446/rev.fac.cienc.v7n1.67773.
22. Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383(1–2), 3–41. doi: 10.1007/s11104-014-2131- 8.
23. Campillo, R.R., Urquiaga, S., Pino, I.N., Montenegro, B.A. (2003). Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas forrajeras mediante la metodología del ¹⁵N. *Agricultura técnica* 63(2), 169-179. doi: 10.4067/S0365-28072003000200006.

24. Cardoso, J.D., Hungria, M., Andrade, D.S. (2012). Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 2035–2049. doi: 10.1007/s00253-011-3708-2.
25. Carter, A.M. y Tegeder, M. (2016). Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. *Current Biology* 26, 2044–2051 doi: 10.1016/j.cub.2016.06.003.
26. Cedano, J., de la Rosa, D., Sánchez, A., Oviedo, F. (2000). Fraccionamiento de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el valle de San Juan. *Agronomía Mesoamericana* 11(1), 151-154.
27. Chalk, P.M., He, J.Z., Peoples, M.B., Chen, D. (2017). ¹⁵N₂ as a tracer of biological N₂ fixation: A 75-year retrospective. *Soil Biology & Biochemistry* 106, 36-50. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.12.010. 
28. Chanway, C.P., Anand, R., Yang, H. (2014). Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. En: *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. p. 1-20. doi: 10.5772/57532.
29. Corbera, J. y Nápoles, M.C. (2011). Evaluación de la inoculación conjunta *Bradyrhizobium elkanii*-Hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya, cultivada en época de primavera. *Cultivos Tropicales* 32(4), 13-19. ISSN: 1819-4087.
30. Corbera, J. y Nápoles, M.C. (2013). Efecto de la inoculación conjunta *Bradyrhizobium elkanii*-Hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya (*Glycine max* L. Merrill), cultivar INCASoy-27. *Cultivos Tropicales* 34(2), 5-11. ISSN: 1819-4087.
31. Costales, D. y Falcón, A.B. (2018). Combinación de formas de aplicación de quitosano en el desarrollo de soya biofertilizada. *Cultivos Tropicales* 39(3), 71-79. ISSN: 1819-4087.
32. da Conceição, E., de Almeida, R., do Amaral, R., da Silva, O.O, Araújo, A.P. (2018). Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. *Plant Soil* 425, 201-2015. doi: 10.1007/s11104-017-3541-1.
33. Dall'Agnol, R.F., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M.A., Delamuta, J., Andrade, D., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov.; a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(11), 4167-4173. doi: 10.1099/ijs.0.052928-0.
34. De Andrade, A., Albenísio, J., Bonifacio, A., Cerqueira, A., Barreto, V. (2018). Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt. *Brazilian Journal of Microbiology* 49(3), 513-521. doi:10.1016/j.bjm.2017.12.003.

35. Dell'Amico, J., Morales, D., Jerez, E., Rodríguez, P., Álvarez, I., Martín, R., Días, Y. (2017). Efecto de dos variantes de riego y aplicaciones foliares de Pectimorf® en el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales 38(3), 129-134. ISSN: 1819-4087.
36. Divito, G.A. y Sadras, V.O. (2014). How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. Field Crops Research 156, 161-171. doi:10.1016/j.fcr.2013.11.004.
37. Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Scientia Horticulturae 196, 3–14. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.
38. El-Sharkawy, M.A. (2006). Utility of basic research in plant/crop physiology in relation to crop improvement: a review and a personal account. Plant Physiology 18(4), 419-446. doi: 10.1590/S1677- 202006000400001.
39. Estrada, W., Chávez, L., Jerez, E., Nápoles M.C., Sosa, A., Cordoví C., Celeiro, F. (2017). Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico. Centro Agrícola 44 (3), 36-42. ISSN 0253-5785.
40. Falcón, A.B. y Cabrera, J.C. (2007). Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturónidos en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Cultivos Tropicales 28(2), 87-90. ISSN: 0258-5936
41. Falcón, A.B., Costales, D., González, D., Nápoles, M. C. (2015). Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. Cultivos Tropicales 36(no. especial), 111-129. ISSN: 1819-4087.
42. FAO. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. En sitio web: www.fao.org/faostat/es/#data/QC. [Consultado 17/04/2020].
43. Faure, B., García, A., Placido, L., Benítez, R. (2016). Manual para la producción sostenible del frijol común. Edición y diseño: Molinos SA. Instituto de Investigaciones de Granos. MINAG. La Habana, Cuba. 114 p.
44. Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 52(1), 61–76 doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x.
45. Fernández, F., Gepts, P., López, M. (1986). Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 26 p. ISBN: 84-89206-54-6.
46. Fernández, E. y Espinosa, D. (2008). Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 26(2), 133-144. ISSN 2395-8030.

47. Fernández, L., Shagarodsky, T., Cristóbal, R., Nuñez, L., Gil, J.F., Sánchez, Y., González, M., Moreno, V., Fundora, Z.M., Castiñeiras, L., León, N., Rodríguez, A., Acuña, G., Walón, L. (2014). Catálogo de variedades INIFAT, p. 31. ISBN: 978-959-7223-06-1.
48. Fonseca, D., Vivas, N.J., Balaguera, H.E., Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 21(1), e1342. doi: 10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342.
49. Freixas, J.C., Reynaldo, I.M., Nápoles M.C. (2010). Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium*-soya. Cultivos Tropicales 31(2), 66-73. ISSN 0258-5936.
50. Freixas, J.C., Torres, C.W., Reynaldo, I.M., Nápoles, M.C. (2011). Niveles de ureidos en plantas de soya con diferentes inoculantes y sometidas a déficit hídrico. Cultivos Tropicales 32(2), 122-135. ISSN 0258-5936.
51. Ganesan, K. y Xu, B. (2017). Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. International Journal of Molecular Sciences 18(11), 23-31. doi:10.3390/ijms18112333 
52. García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., Zapata, F. (2003). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. Agronomía Mesoamericana 14(2), 207-214. ISSN: 1021-7444.
53. García, M.L., Martínez, V., Avendaño, A.N., Padilla, M.C., Izquierdo, H. (2009). Acción de oligosacáridos en el rendimiento y calidad de tomate. Revista fitotecnica mexicana 32(4), 295–301.
54. Ghanbari, A.A., Shakiba, M.R., Toorchi, M., Choukan, R. (2013). Nitrogen changes in the leaves and accumulation of some minerals in the seeds of red, white and Chitti beans (*Phaseolus vulgaris*) under water deficit conditions. Australian Journal of Crops Science 7(5), 706-712. ISSN: 1835-2707. 
55. Giller, K.E. y Wilson, K.J. (1991) Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CAB International, Wallingford, England, 409 p. ISBN: 0-85199-417-2.
56. Gómez E.J., Argente L., Ávila C., Ruiz B., Fernández M., Alarcón K., Eichler-Loebermann, B., López, B. (2013). Evaluación de la tolerancia a la salinidad en frijol caupí a partir de variables relacionadas con la nodulación y la acumulación de nitrógeno foliar. Cultivos Tropicales 34(3), 11-16. ISSN: 1819-4087.
57. Gonnet, S. y Díaz, P. (2010). Glutamine synthetase and Glutamate synthase activities in relation to nitrogen fixation in Lotus spp. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal 12(3), 195-202. doi: 10.1590/S0103-31312000000300003.
58. González, S., Cabrera, J.C., Nato, A. (2004). Efecto del Pectimorf sobre la morfogénesis in vitro en tabaco (*Nicotiana tabacum*). Revista del Jardín Botánico Nacional 25/26, 187–97.

59. González, O., Abreu, B., Herrera, M., López, E. (2017). Uso del agua durante el riego del frijol en suelos Eutric cambisol. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 26(1), 70-77. ISSN: 1010-2760.
60. Grageda-Cabrera, O.A., Vera-Núñez, J.A., Castellanos, J.Z., Peña-Cabriales, J.J. (2003). Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *Terra Latinoamericana* 21(1), 65-71. ISSN: 2395-8030.
61. Granda, K., Colás, A., Cupull, R., Gutiérrez, Y., Torrez, R. (2009). Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola* 36(4), 5-14. ISSN: 2072-200.
62. Granda, I.K., Ochoa, M., Ruilova, V., Guamán, F., Torres, R. (2014). Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro de Biotecnología* 3(1), 25-37.
63. Granda, K.I., Colás, A., Gutiérrez, Y., Cupull, R., Alvarado, Y., Torres, R. (2016a). Efecto de aislados de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos y la fijación de nitrógeno en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola* 43(1), 62-72. ISSN: 2072-2001.
64. Granda, K.I., Nápoles, M.C., Robles, A.R., Alvarado, Y., Torres, R. (2016b). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. *Centro Agrícola* 43(4), 49-56. ISSN: 2072-2001.
65. Granda, K.I., Alvarado, Y., Torres, R. (2017). Efecto en campo de la cepa nativa COL6 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* sobre frijol común cv. Percal en Ecuador. *Centro Agrícola* 44(2), 5-13. ISSN: 2072-2001.
66. Guzmán, E., De la Garza, M., García, J., Rebollar, S., Hernández, J. (2019). Determinantes de la oferta de frijol por tipo de tecnología en México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 27(76), 49-59. ISSN: 2521-9758.
67. Haag, A.F., Arnold, M.F., Myka, K.K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Mateo, Z., Mergaert, P., Ferguson, G.P. (2013). Molecular insight into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 364-383. doi: 10.1111/1574-6976.2012.12003.
68. Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43(8), 1185-1207. doi: 10.1104/pp.43.8.1185.
69. Hayat, R., Ali, S., Ijaz, S.S., Chatha, T.H., Siddique, M.T. (2008). Estimation of N₂-fixation of Mung bean and Mash bean through xylem ureide technique under rainfed conditions. *Pakistan Journal of Botany* 40(2), 723-734.

70. Hernández, G., Ramírez, M., Valdes-López, O., Tesfaye, M., Graham, M.A., Czechowski, T., Schlereth, A., Wrey, M., Erban, A., Cheung, F., Wu, H., Lara, M., Town, C.D., Kopka, J., Udvardi, M.K., Vance, C.P. (2007). Phosphorus stress in common bean: Root transcript metabolic responses. *Plant Physiology* 144, 752–767. doi: 10.1104/pp.107.096958.
71. Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D., Castro, N. (2015). Clasificación de los suelos de Cuba. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p.
72. Hernández, L. y Salido, Y. (2019). Influencia de la aplicación de Azofert inoculante a base *Rhizobium* en el cultivo del fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Delicias 364 en finca Juan Sáez. Manatí”, Revista Caribeña de Ciencias Sociales. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/01/cultivo-frijol-comun.html>.
73. Hidrobo, A., Ardisana, E., Cabrera, J., Jomarrón, I. (2002). Utilización del Pectimorf y Biobras-16 en la embriogénesis somática de la papa. *Biotechnología Vegetal* 2(1), 9–14. ISSN: 2074-8647.
74. Hungria, M. y Kaschuk, G. (2014). Regulation of N₂ fixation and NO₃⁻/NH₄⁺ assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany* 98, 32–39. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.10.010.
75. Igarashi, R.Y. y Seefeldt, L.C. (2003). Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38(4), 351-384. doi: 10.1080/10409230391036766.
76. Izaguirre-Mayoral, M.L., Lazarovits, G., Baral, B. (2018). Ureide metabolism in plant-associated bacteria: purine plant-bacteria interactive scenarios under nitrogen deficiency. *Plant Soil* 428, 1–34. doi: 10.1007/s11104-018-3674-x.
77. Izquierdo, O.H. (2009). Los oligogalacturónidos de origen péctico y su acción en las plantas. *Temas de Ciencia y Tecnología de México* 13(39), 31–40.
78. Izquierdo, H., Diosdado E., González, M.C., Núñez, M., Cabrera, J.C., Hernández, R.M., González, J.L., Hernández, M.M., Héctor, E.F., Gómez, R., Proenza, R., Velásquez, M. (2016). Contributions to knowledge of the functioning of national bioestimulators in plant biotechnology processes. *Biotechnología Aplicada* 33(3), 3511-3516. ISSN: 1027-2852.
79. Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., Palusińska-Szys, M. (2014). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–*Rhizobium* interaction. *Applied Soil Ecology* 85, 94-113. doi: org/10.1016/j.apsoil.2014.08.010.
80. Jeannotte, R. (2014). Nitrogen Metabolism. *Encyclopedia of Food Microbiology* 2, 544-560. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00199-3.
81. Jordan, D. C. (1984). Rhizobiaceae. *Manual of Systematic Bacteriology*. En: N. R. Krieg and J. G. Holt. Eds. *Bergey's*. Baltimore: Williams and Wilkins, vol 1, p. 1234-1242.

82. Kakraliya, S.K., Singh, U., Bohra, A., Choudhary, K.K., Kumar, S., Swaroop, R., Jat, M.L. (2018). Nitrogen and Legumes: A Meta-analysis. In: Meena, R., Das, A., Yadav, G., Lal, R. (eds) Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer, Singapore. p. 279-304. doi: 10.1007/978-981-13-0253-4_9. 
83. Keablea, S.M., Vertemarab, J., Zadvornyy, O.A., Eilers, B.J., Danyal, K., Rasmussend, A.J., De Gioia, L., Zampella, G., Seefeldt, L.C. (2018). Structural characterization of the nitrogenase molybdenum-iron protein with the substrate acetylene trapped near the active site. *Journal of Inorganic Biochemistry* 180, 129–134. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.12.008.
84. Khadri, M., Pliego, L., Soussi, M., Lluch, C., Ocaña, A. (2001). Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Agronomie, EDP Sciences* 21(6-7), 635-643. doi: 10.1051/agro:2001155.
85. Kohlen, W., Liang Pin Ng, J., Deinum, E.E., Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *Journal of Experimental Botany* 69(2), 229–244. doi:10.1093/jxb/erx308.
86. Koskey, G., Mburu, S.W., Njeru, E.M., Kimiti, J.M., Ombori, O., Maingi, J.M. (2017). Potential of native rhizobia in enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of eastern Kenya. *Frontiers in Plant Science* 8(443), 1-12. doi: 0.3389/fpls.2017.00443.
87. Kuypers, M.M., Marchant, H.K., Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Microbial Biogeochemistry* 16, 263-276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9.
88. Ladrera, R., Marino, D., Estíbaliz, L., González, E. M. y Arrese-Igor, C. (2007) Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiology* 145(2), 539-546. doi: 10.1104/pp.107.102491.
89. Lara, M. (2015). El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria* 16(2), 1-11. ISSN: 1607 – 6079.
90. Lardizabal, R., Arias, S., Segura, R. (2013). Manual de producción de frijol. Primera Edición, 23 p. ISBN: 978-99926-794-3-2.
91. Li, X., Lei, M., Yan, Z., Wang, Q., Chen, A., Sun, J., Luo, D., Wang, Y. (2014). The REL3-mediated TAS3 ta-siRNA pathway integrates auxin and ethylene signaling to regulate nodulation in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 201(2), 531–544. doi: 10.1111/nph.12550.
92. Liriano, R., Núñez, D.B., Barceló, R. (2012). Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorrizas en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola* 39(4), 17-20. ISSN: 2072-2001.

93. Liu, Y., Wu, L., Baddeley, A.J., Watson, C.A. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/INRA 31(1), 155-172. doi: 10.1051/agro/2010008.
94. Magaña, D., Gaucín, S., Flores, L. (2015). Análisis Sectorial y de la dinámica de los precios del frijol en México. *Dirección de Investigación Económica y Sectorial, FIRA-Banco de México* 2(3), 1-21. ISSN 1390-8391.
95. Martín, G.M., Reyes, R., Ramírez, J.F. (2015). Coinoculation of *Canavalia ensiformis* with *Rhizobium* and Arbuscular Mycorrhizal Fungus in two soils from Cuba. *Cultivos Tropicales* 36 (2), 22-29. ISSN: 1819-4087.
96. Martinez, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P.H., Prado, M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systemic Bacteriology* 41(3), 417-426. doi: 10.1099/00207713-41-3-417.
97. Martínez, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252(1), 11–23. doi: 10.1023/A:1024199013926.
98. Martínez, S., Leiva, M., Rodríguez, M., Gómez, O., Quintero, E., Rodríguez, G., García, A., Cárdenas, M. (2015). Nuevas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para la Empresa Agropecuaria “Valle del Yabú”, Santa Clara, Cuba. *Centro Agrícola* 42(4), 89-91. ISSN: 2072-2001.
99. Martínez, L., Reyes, Y., Falcón, A., Nápoles, M.C., Núñez, M. (2016). Efecto de productos bioactivos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) biofertilizadas. *Cultivos Tropicales* 37(3), 165-171. doi: 10.13140/RG.2.1.1077.0165. 
100. Mayz, J. (2011). Efectividad de cepas rizobianas de frijol bajo diferentes regímenes de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología* XIII(2), 162-169. ISSN: 0123-3475.
101. Mederos, Y., Reynaldo, I.M., Hormaza, J. (2014). Características metrológicas en la determinación de azúcares reductores para el control de la calidad en mezclas de oligogalacturonidos. *Cultivos Tropicales* 35(2), 86–89. ISSN: 1819-4087.
102. Méndez, J., Chang R., Salgado Y. (2011). Influencia de diferentes dosis de Fitomas-E en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Granma Ciencia* 15 (2), 1-10. ISSN 1027-975x.
103. Melchor, J.I., Vargas, J.J., Ferrera, R., Etchevers J.D., Velázquez, A. (2000). Actividad de la nitrogenasa en *Gliricidia sepium* en diferentes regímenes de poda. *Terra Latinoamericana* 17(4), 299-308. ISSN: 2395-8030.
104. Menge, E.M., Njeru, E.M., Koskey, G., Maing, J. (2018). Rhizobial inoculation methods affect the nodulation and plant growth traits of host plant genotypes: A case study of

- Common bean *Phaseolus vulgaris* L. germplasms cultivated by smallholder farmers in Eastern Kenya. *Advances in Agricultural Science* 6(3), 77-94. ISSN: 2588–3801.
105. Moreno, J.L. (2018). Efecto de bioestimulantes de oligosacarinas en el desarrollo y productividad del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) C.V. ODILE. Tesis de grado en opción al título de ingeniero agrónomo. Universidad Agraria de la Habana, Mayabeque, 54 p.
 106. Morgan, J., Bending, G., White, P. (2005) Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417), 1729-1739. doi:10.1093/jxb/eri205.
 107. Moscatiello, R., Baldan, R., Squartini, A., Mariani, P., Navazio, Lorella. (2012). Oligogalacturonides: Novel Signaling Molecules in *Rhizobium*-Legume Communications. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(11), 1387–1395. doi: 10.1094/MPMI-03-12-0066-R.
 108. Nápoles, M.C., Gutiérrez, A., Corbera, J. (2002). Medio de cultivo para *B. japonicum*. Biopreparado resultante. Patente Cubana 22 797.
 109. Nápoles, M.C., Cabrera, J.C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández, I., Martínez, L., Núñez, M. (2016a). Señales en la interacción *Rhizobium leguminosarum*-frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 37(2), 37- 44. doi: 10.13140/RG.2.1.4466.8405.
 110. Nápoles, S., Garza, T., Reynaldo, I.M. (2016b). Respuesta del cultivo de habichuela (*Vigna unguiculata* L.) var. Lina a diferentes formas de aplicación del Pectimorf. *Cultivos Tropicales* 37(3), 172–177. doi: 10.13140/ RG.2.1.3698.4566.
 111. Nieves, N., Poblete, A., Cid, M., Lezcano, Y., González, J.L., Cabrera, J.C. (2006). Evaluación del Pectimorf como complemento del 2, 4-D en el proceso de la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum spp*). *Cultivos Tropicales* 27(1), 25–30. ISSN: 0258-5936.
 112. Núñez, M., Martínez, L., Reyes, Y. (2018). Oligogalacturónidos estimulan el crecimiento de plántulas de arroz cultivadas en medio salino. *Cultivos Tropicales* 39(2), 96-100. ISSN: 1819-4087.
 113. Ojeda, C.M. (2015). Efecto de un producto bioactivo compuesto por oligogalacturónidos como mitigador del estrés hídrico en variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC, California, 176 p.
 114. Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocana, A., Lluch, C. (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121, 498–505. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00355.x.
 115. ONEI (2019). Agricultura; ganadería; silvicultura y pesca. En: Oficina Nacional de Estadística e Información República de Cuba. En sitio web: www.onei.cu/aec2018/09%20Agricultura%20Ganaderia%20Silvicultura%20Pesca.pdf [Consultado 06/06/2019].

116. Pádua, D., Alves, M., Lima, B., Stivanin, O.H., Dias, F.A., Rufini, M., Peixoto, C., Pereira, R., Ramalho, A., de Souza, M., Bastos, M.J. (2017). Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17(4), 922-934. doi: 10.4067/S0718-95162017000400007.
117. Paneque, V.M., Calaña, J.C., Calderon, M., Borges, Y., Hernández, T.C., Caruncho, M. (2010). Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA, p. 12-62. ISBN: 978-959-7023-51-7.
118. Peix, A., Ramírez, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2015) Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 17-42. doi: 10.1080/07352689.2014.897899.
119. Péliissier, H.C., Frerich, A., Desimone, M., Schumacher, K., Tegeder, M. (2004). PvUPS1, an Allantoin Transporter in Nodulated Roots of French Bean. *Plant Physiology* 134, 664–675. doi: 10.1104/pp.103.033365.
120. Pérez, R., Aranguren, M., Luzbet, R., Reynaldo, I.M., Rodríguez, J. (2013). Aportes a la producción intensiva de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) a partir de esquejes en los viveros comerciales. *CitriFrut* 30(2), 11-16.
121. Plana, D., Álvarez, M., Florido, M., Lara, R., Cabrera, J. (2003). Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis in vitro del tomate (*Lycopersico esculentum*, Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales* 24(1), 29–33. ISSN: 0258-5936.
122. Pliego, L., Ocaña, A., Lluch, C. (2003). Metabolismo del carbono en el citosol nodular y bacteroide en la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris* var. Africa en condiciones salinas. *Terra Latinoamericana* 21(2), 203-212. ISSN: 2395-8030.
123. Pliego, L., López, J., Aragón, E. (2013). Características físicas, nutricionales y capacidad germinativa de frijol criollo bajo estrés hídrico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Pub. Esp (6), 1197-1209. ISSN: 2007-0934.
124. Polania, J., Poschenrieder, Ch., Rao, I., Beebe, S. (2016). Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixationability of common bean under drought stress using ¹⁵N natural abundance in grain. *European Journal of Agronomy* 79, 66–73. doi: 10.1016/j.eja.2016.05.014.
125. Posada, L., Padrón, Y., González, J., Rodríguez, R., Barbón, R., Norman, O., Norman, O., Rodríguez, R.C., Gómez, R. (2016) Efecto del Pectimorf® en el enraizamiento y la aclimatización in vitro de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar Maradol Roja. *Cultivos Tropicales* 37(3), 50–9. doi:10.13140/ RG.2.1.1642.2642.

126. Rai, R., Dash, P. K., Mohapatra, T., Singh, A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Experimental Biology* 50(5), 340-350. ISSN 0019-5189.
127. Raigón, M.D, García, M.D., Guerrero C., Esteve, P. (2006). Actividad de la nitrato reductasa y su relación con los factores productivos en lechuga. VII Congreso SEAE Zaragoza, N° 157.
128. Ramírez, M., Guillén, G., Fuentes, S.I., Iñiguez, L.P., Aparicio-Fabre, R., Zamorano-Sánchez, Encarnación-Guevara, S., Panzeri, D., Castiglioni, B., Cremonesi, P., Strozzi, F., Stellac, A., Girarda, L., Sparvoli, F., Hernández, G. (2013). Transcript profiling of common bean nodules subjected to oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 149: 389-407. doi:10.1111/ppl.12040.
129. Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Velázquez, E. y Bedmar, E. J. (2016). Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor* 192(779), a319. doi: 10.3989/ arbor.2016.779n3009. 
130. Ramos, L., Arozarena, N.J., Lescaille, J., García, F., Tamayo, Y., Castañeda, E., Lozano, S., Rodríguez, G. (2013). Dosis de Pectimorf® para enraizamiento de esquejes de guayaba var. Enana Roja Cubana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6 (Número Especial), 1093-1105. ISSN: 2007-0934.
131. Resende, A., Alves, B.J., Boddey, R.M., Urquiaga, S. (2003). Técnicas utilizadas na quantificacao da fixacao biológica de nitrógeno. Brasil: Seropedica: EMBRAPA Agrobiologia. ISSN 1517-8498.
132. Ribeiro, R., Ormeño, E., Fuzinatto, R., Graham, P., Martinez, E., Hungria, M. (2013). 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. doi: 10.1016/j.resmic.2013.05.002.
133. Ribeiro, R.A.; Martins, T.B.; Ormeño-Orrillo, E.; Delamuta, J.R.M.; Rogel, M.A.; Martínez-Romero, E.; Hungria, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov.; an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(9), 3162-3169. doi: 10.1099/ijsem.0.000392.
134. Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57(6), 929–967. doi:10.1016/ S0031-9422(01)00113-3.
135. Rincón, C., Emilia, L., Gutiérrez, A., Ancíza, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología* XIV(1), 285-295. ISSN: 0123-3475.

136. Rivera, R., Calderón, A., Nápoles, M.C., Falcón, A., Martin, J.V., Marrero, Y., Calderón, A., Hernández, I., Calana, J.M., Hernández, A., Lara, D. (2015). La factibilidad de la aplicación conjunta de biofertilizantes y bioestimulantes en el cultivo del frijol. En: Impacto ambiental de Bioproductos en la agricultura. Premio MES al Resultado de Mayor Contribución al Medioambiente.
137. Rodrigues, A.C., Gomes, J.A., Bonifacio, A., Barreto, M. (2013). Metabolism of nitrogen and carbon: Optimization of biological nitrogen fixation and cowpea development. *Soil Biology & Biochemistry* 67, 226-234 doi: 10.1016/j.soilbio.2013.09.001.
138. Rodríguez, S. y Fernández, X.E. (2015). Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana* 26(1), 145-151. doi: 10.15517/am.v26i1.16937.
139. Rolff, M. y Tucek, F. (2013). Nitrogenase and Nitrogen Activation. *Comprehensive Inorganic Chemistry II*. Cap. 9, p. 593-618.
140. Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Colla, G. (2017). Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. *Frontiers in Plant Science* 8(131), 1-12. doi: 10.3389/fpls.2017.00131 
141. Rouphael, Y. y Colla, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9(1655), 1-7. doi:10.3389/fpls.2018.01655.
142. Rueda, E.O., Ortega, J., Barrón, J.M., López, J., Murillo, B., Hernández, L.G., Alvarado, A.G., Valdez, R.D. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *INVURNUS* 10(1): 10-17.
143. Samavat, S., Mafakheri, S., Shakouri, M.J. (2012). Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the co-inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* isolates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 18(3), 387-395.
144. Sánchez, E. Soto, J.M, Ruiz, J.M., Romero, L. (2006). Asimilación de nitrógeno en raíces y hojas de frijol ejotero: Deficiencia vs toxicidad de nitrógeno. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 29(3), 187–195. ISSN: 0187-7380.
145. Santi, C., Bogusz, D., Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany* 111, 743–767. doi: 10.1093/aob/mct048.
146. Santos, A., Beovides, Y., Mollineda, M., López, J., Basail, M., Gutiérrez, Y., Rayas, A., Medero, V., Rodríguez, D., Bauta, M. (2017). Efecto del Pectimorf® como biorregulador del crecimiento en la micropopagación del cultivar ‘INIVIT MX-2008’ (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Agricultura Tropical* 3(1), 52-63. ISSN: 2517-9292.

147. Santos, A.A., Silveira, J.A., Guilherme, E.A., Bonifacio, A., Rodrigues, A.C., Figueiredo, M. (2018). Changes induced by co-inoculation in nitrogen–carbon metabolism in cowpea under salinity stress. *Brazilian Journal of Microbiology* 49(4), 685-694. doi:10.1016/j.bjm.2018.01.007.
148. Savatin, D.V., Ferrari, S., Sicilia, F., De Lorenzo, G. (2011). Oligogalacturonide auxin antagonism does not require posttranscriptional genes ilencingor stabilization of auxin response repressors in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157(3), 1163–74. doi:10.1104/pp.111.184663.
149. Segovia, L., Young, J.P.W., Martinez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains of *Rhizobium etli* sp.nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 43, 347-377. doi: 10.1099/00207713-43-2-374.
150. Shah, A. (2014). Determination of biological nitrogen fixation induced N₂O emission from arable soil by using a closed chamber technique. *Applied and Environmental Soil Science* 685168, 1-10. doi: 10.1155/2014/685168.
151. Slatni, T., Krouma, A., Aydi, S., Chaiffi, C., Gouia, H., Abdelly, C. (2008). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean subjected to iron deficiency. *Plant Soil* 312, 49–57. doi: 10.1007/s11104-007-9481-4.
152. Streng, A., Camp, R., Bisseling, T. y Geurts, R. (2011) Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant Signaling & Behavior* 6(10), 1510-1514. doi: 10.4161/psb.6.10.17444.
153. Suárez, L. y Hernández, M. (2015). Efecto del Pectimorf® en el cultivo de ápices de plantas in vitro de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), clones ‘CMC-40’ y ‘Señorita’. *Cultivos Tropicales* 36(4), 55–62. doi: 10.1007/BF00017097.
154. Summerfield, R.J., Huxley, P.A., Minchin, F.R. (1977). Plant Husbandry and Management Techniques for Growing Grain Legumes Under Simulated Tropical Conditions in Controlled Environments. *Experimental Agriculture* 13(1), 81-92. doi: 10.1017/s0014479700007638.
155. Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuan, J., Lluch, Carmen. (2004). Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Plant Physiology* 161, 329–338. doi:10.1078/0176-1617-01050.
156. Terry, E., Ruiz, J., Tejeda, T., Reynaldo, I., Díaz, M.M. (2011). Respuesta del cultivo de la lechuga (*Latuca sativa* L.) a la aplicación de diferentes productos bioactivos. *Cultivos Tropicales* 23(1), 28-37. ISSN: 0258-5936.
157. Thilakarathna, M.S. y Raizada, M.N. (2018). Challenges in Using Precision Agriculture to Optimize Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes: Progress, Limitations, and Future

- Improvements Needed in Diagnostic Testing. *Agronomy* 8(78), 1-21. doi: 10.3390/agronomy8050078.
158. Tikhonovich, I. y Provorov, N. (2011). Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. *Annals of Applied Biology* 159(2), 155-168. doi: 10.1111/j.1744-7348.2011.00489.x.
159. Torabian, S., Farhangi-Abriz, S., Dentona, M.D. (2019). Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? *Soil & Tillage Research* 185, 113–121. doi: 10.1016/j.still.2018.09.006.
160. Torres, E., Quisphe, D., Sanchez, A., Reyes, M., González, B., Torres, A., Cedeño, A., Haro, A. (2013). Caracterización de la producción de frijol en la provincia de Cotopaxi Ecuador: Caso comuna Panyatug. *Ciencia y Tecnología* 6(1), 23-31. doi: 10.18779/cyt.v6i1.176.
161. Treviño, C. y Rosa, R. (2013). El frijol común: Factores que merman su producción. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/319471946>..
162. Ulloa, J.A., Ulloa, P., Ramírez, J.C., Ulloa, B.E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente* 3(8), 5-9. ISSN: 2007 – 0713.
163. Vallarino, J.G. y Osorio, S. (2012). Signaling role of oligogalacturonides derived during cell wall degradation. *Plant Signaling & Behavior* 7(11), 1447–1449. doi:10.4161/psb.21779.
164. Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(5), 1-12. doi: 10.1186/s40538-017-0089-5.
165. Velhal, C., Sant, M., Godbole, T., Waghmode, S., Kulkarni, C. (2014). Effect of *Rhizobium* based biofertilizer combined with *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of Hyacinth bean. *International Journal of Plant & Soil Science* 3(8), 959-968. doi:10.9734/IJPSS/2014/9284.
166. Wang, Q., Liu, J., Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-*Rhizobium* interactions. *Frontier in Plant Science* 9(313), 1-8. doi: 10.3389/fpls.2018.00313.
167. Winkler, A.J., Aranaz, I., Domínguez, J.A., Berrocal, M. (2017). Short-chain chitin oligomers: promoters of plant growth. *Marine Drugs* 15(2), 40. doi: 10.3390/md15020040.
168. Xin, C., Qing-we, Y., Jia-lin, S., Shuang, X., Fu-chun, X., Ya-jun, C. (2014). Research Progress on Nitrogen Use and Plant Growth. *Journal of Northeast Agricultural University* 21(2), 68-74. doi:1006-8104(2014)-02-0068-07.

169. Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., Brown P.H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science* 7(2049). doi: 10.3389/fpls.2016.02049.
170. Yamashita, N., Tanabata, S., Ohtake, N., Sueyoshi K., Sato, T., Higuchi, K., Saito, T., Higuchi, K., Saito, A., Ohya, T. (2019). Effects of different chemical forms of nitrogen on the quick and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation activity. *Frontiers in Plant Science* 10(131), 1-8. doi: 10.3389/fpls.2019.00131.
171. Yong, T., Chen, P., Dong, Q., Du, Q., Yang, F., Wang, X., Liu, W., Yang, W. (2018). Optimized nitrogen application methods to improve nitrogen use efficiency and nodule nitrogen fixation in a maize-soybean relay intercropping system. *Journal of Integrative Agriculture* 17(3), 60345-7. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61836-7.
172. Younesi, O. y Moradi, A. (2015). Effect of salinity on nodulation, glutamine synthetase activity in nodules of alfalfa. *Cercetari Agronomice in Moldova* 4 (164), 61-70. doi: 10.1515/cerce-2015-0053.
173. Young, E.G. y Conway, C.F. (1942). On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *Journal of Biological Chemistry* 142, 839-853.
174. Zumaran, E.M., Juárez, M., Mancillas, J., Ávila, M., Leyva, A. (2017). Desarrollo de un pay de harina de frijol negro San Luis con mermelada de chilacayote de altas propiedades nutricionales. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 25(71), 27-33. ISSN: 1665-4412.

ANEXO 1

Solución Summerfield

Para las plantas suplementadas con nitrógeno

Solución 1

Concentración de nitrógeno: 5 mM

Ca (NO₃) . 4H₂O..... 11 g

KNO₃..... 50,55 g

(NH₄)₂SO₄..... 1,38 g

H₂O destilada..... 1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución 2 (100X)

MgSO₄ . 7H₂O..... 27,5 g

NaFeEDTA..... 4,08 g

H₂O destilada..... 1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución 3 (100X)

K₂HPO₄..... 17,54 g

K₂SO₄..... 12,54 g

H₂O destilada..... 1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución de micronutrientes

KCl..... 1,340 g

H₃BO₃..... 0,375 g

MnSO₄.H₂O..... 0,850 g

ZnSO₄.7H₂O..... 0,135 g

CuSO₄.5H₂O..... 0,120 g

(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O..... 0,135 g

H₂SO₄(concentrado)..... 0,54 mL

H₂O destilada..... 1 L

Usar 0,2 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Añadir 0,4425 g CaSO₄.2H₂O por 1 L de solución nutritiva

Para las plantas inoculadas con *Rhizobium*

Solución 1

Concentración de nitrógeno: 0,385 mM

Ca (NO₃) . 4H₂O..... 5,5 g

KNO₃..... 1,37 g

(NH₄)₂SO₄..... 0,69 g

H₂O destilada..... 1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución 2

MgSO₄ . 7H₂O.....27,5 g

NaFeEDTA.....4,08 g

H₂O destilada.....1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución 3

K₂HPO₄..... 0,087 g

K₂SO₄..... 12,54 g

H₂O destilada..... 1 L

Usar 10 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Solución de micronutrientes

KCl..... 1,340 g

H₃BO₃..... 0,375 g

MnSO₄.H₂O..... 0,850 g

ZnSO₄·7H₂O..... 0,135 g

CuSO₄·5H₂O..... 0,120 g

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O..... 0,135 g

H₂SO₄(concentrado)..... 0,54 mL

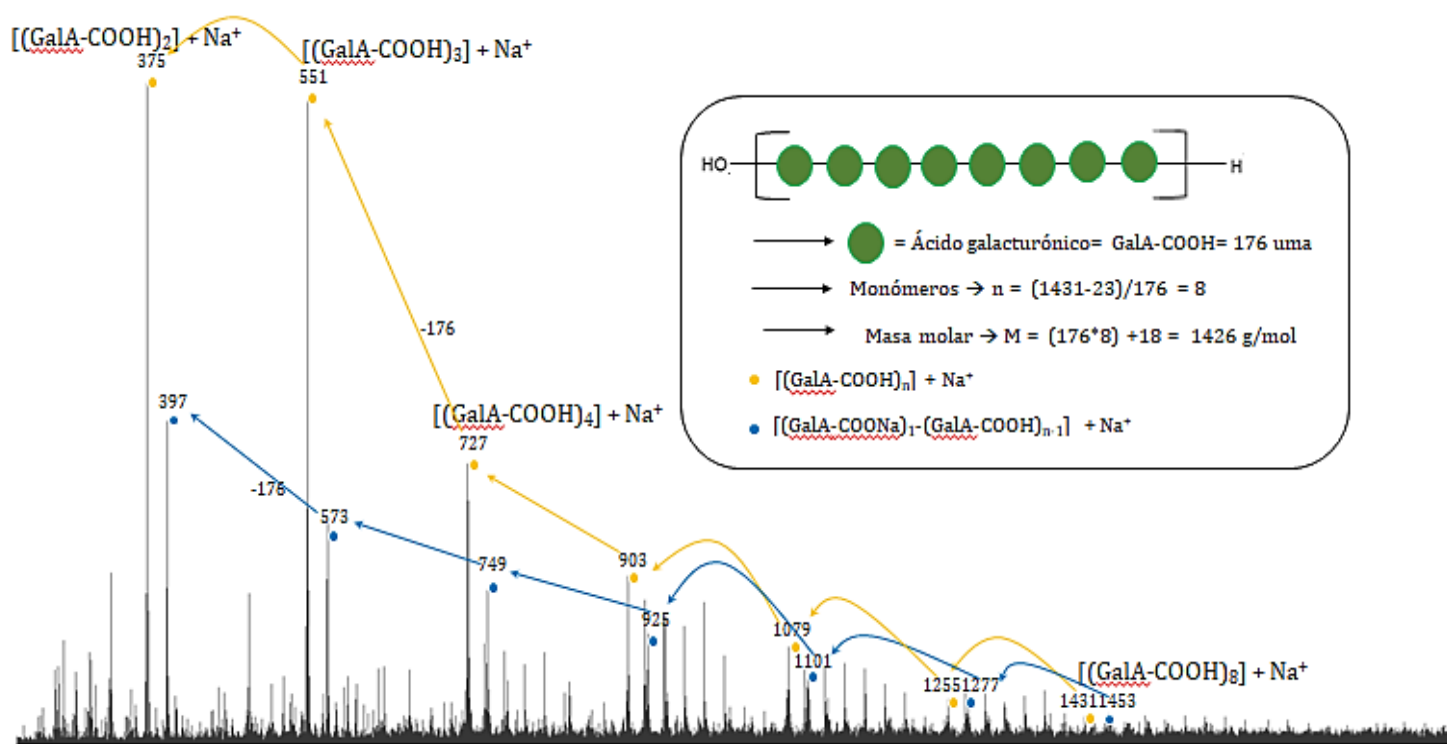
H₂O destilada..... 1 L

Usar 0,2 mL de la solución por 1 L de solución nutritiva

Añadir 0,4425 g CaSO₄·2H₂O por 1 L de solución nutritiva

ANEXO 2

Mezcla de Oligosacáridos Pécicos (Pectimorf®)



Análisis MS (MALDI) en un equipo Water QTOF Premier: Muestra solubilizada (1mg mL⁻¹) en una mezcla Metanol/Agua (v/v ; 1/9) + cationización por adición de Yoduro de sodio (NaI)