

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Análisis de fitohormonas tipo ácido indol acético y giberelinas
producidas por rizobios simbiotes de dos variedades de haba
(*Vicia faba*) en la parroquia de Cangahua**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

LUIS ALFREDO SOLÓRZANO VERA

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología del candidato Luis Alfredo Solórzano Vera ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna

Directora de la Disertación

Quito,

DEDICATORIA

A mi madre, la cual siempre me brindó su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy especial a mi familia y amigos que me apoyaron durante toda la carrera. Gracias a mis profesores y tutores que me brindaron directrices para la realización del presente trabajo.

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

La Granja: Revista de Ciencias de la Vida

Título

Análisis de fitohormonas tipo ácido indol acético y giberelinas producidas por rizobios simbioses de dos variedades de haba (*Vicia faba*) en la parroquia de Cangahua

Autores

Luis Alfredo Solórzano Vera*, Jeniffer Marcela Yáñez Altuna**

Correo electrónico

*lasolorzano@puce.edu.ec, **jyanez989@puce.edu.ec

Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de La Granja: Revista de Ciencias de la Vida a partir de la siguiente página.

Normas para autores: <https://lagranja.ups.edu.ec/pdf/granja/normas.pdf>

1 Sección (Marcar)
2 Artículo científico _x_
3 Revisión Bibliográfica ____
4 Punto de vista ____
5 Special Issue” Ciencias de los Recursos Naturales” ____
6

7 **Análisis de fitohormonas tipo ácido indol acético y giberelinas**
8 **producidas por rizobios simbiotes de dos variedades de haba**
9 **(*Vicia faba*) en la parroquia de Cangahua**

10
11 *Analysis of phytohormones indole acetic acid kind and gibberellins*
12 *produced by symbiotic rhizobia of two varieties of bean (*Vicia faba*)*
13 *in the parish of Cangahua*

14
15 Luis Solórzano*¹ y Jeniffer Yáñez-Altuna¹

16
17 ¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Código Postal 170102, Quito, Ecuador.

18 *Autor para correspondencia: lasolorzano@puce.edu.ec
19

20 **RESUMEN**

21 El cultivo de haba (*Vicia faba*) es uno de los más importantes en todo el mundo y en el Ecuador,
22 debido a su gran aporte de nutrientes. Para abastecer con la producción de haba se busca
23 alternativas sostenibles como el uso de biofertilizantes a base de rizobios. Los rizobios son
24 bacterias Gram negativas capaces de formar nódulos en las leguminosas en una asociación
25 benéfica que optimiza el desarrollo de las plantas. Uno de los mecanismos promotores de
26 crecimiento vegetal más relevante, producto de esta simbiosis, se encuentra la producción de
27 fitohormonas tipo ácido indol acético y giberelinas, involucradas directamente en el crecimiento
28 vegetal con un impacto positivo sobre la germinación, elongación celular, maduración,
29 producción de frutos y nodulación exitosa. En este contexto, el presente estudio tiene como
30 objetivo analizar la producción de fitohormonas procedentes de rizobios simbiotes autóctonos
31 provenientes de dos variedades nativas de haba, siendo un parámetro fundamental para la

32 selección de cepas efectivas a ser usadas como inoculantes. Los morfotipos obtenidos fueron
33 diferenciados mediante sus características macroscópicas en el medio YMA+RC. Se obtuvo
34 variación en la producción de fitohormonas, con los ejemplares HB3 y SV4 los mayores
35 productores de AIA, y HB4 y SV2 los mayores productores de GAs. Al realizar la identificación
36 genotípica y relaciones evolutivas de cada morfotipo se observó que corresponden a cepas
37 diferentes, pero estrechamente relacionadas, esto indica que existen organismos autóctonos
38 más eficientes que otros. El género predominante asociado a *Vicia faba* fue *Rhizobium*, con alta
39 especificidad en esta simbiosis rizobio-leguminosa.

40

41 **ABSTRACT**

42 The cultivation of faba beans (*Vicia faba*) is one of the most important in the world and in
43 Ecuador, due to its great contribution of nutrients. To supply bean production, sustainable
44 alternatives are sought, such as the use of rhizobia-based biofertilizers. Rhizobia are Gram-
45 negative bacteria capable of forming nodules in legumes in a beneficial association that
46 optimizes plant development. One of the most relevant plant growth promoting mechanisms,
47 product of this symbiosis, is the production of phytohormones such as indole acetic acid and
48 gibberellins, directly involved in plant growth with a positive impact on germination, cell
49 elongation, maturation, fruit production and successful nodulation. In this context, the present
50 study aims to analyze the production of phytohormones from autochthonous symbiont rhizobia
51 from two native varieties of bean, being a fundamental parameter for the selection of effective
52 strains to be used as inoculants. The morphotypes obtained were differentiated by their
53 macroscopic characteristics in the YMA+RC medium. Variation was obtained in the production
54 of phytohormones, with HB3 and SV4 the largest producers of AIA, and HB4 and SV2 the
55 largest producers of GAs. When performing the genotypic identification and evolutionary
56 relationships of each morphotype it was observed that they correspond to different strains, but
57 closely related, this indicates that there are more efficient autochthonous organisms than
58 others. The predominant genus associated with *Vicia faba* was *Rhizobium*, with high specificity
59 in this rhizobio-legume symbiosis.

60

61 **Palabras clave**

62 *Vicia faba*, *Rhizobium*, fitohormonas, simbiosis, promotores de crecimiento

63

64 **Keywords**

65 *Vicia faba*, *Rhizobium*, phytohormones, symbiosis, growth promoters

66

67 **1. Introducción**

68

69 *Vicia faba* (haba) es una leguminosa cultivada en todo el mundo gracias a su buen aporte de
70 proteínas, celulosa, almidón y minerales usado como fuente de alimento y forraje (Zhang, 2022).

71 Presenta un gran rendimiento en campo y adaptación a diferentes condiciones ambientales, por

72 lo que es de gran interés para los agricultores (Chen *et al.*, 2018). Juega un papel importante en

73 la optimización de cultivos de cereales y en la fertilidad del suelo. En Ecuador, el haba se cultiva

74 principalmente en la región Sierra, con cerca de 26 000 hectáreas cultivadas en todo el país. Es

75 ampliamente consumido debido a sus beneficios nutricionales y su bajo costo (Morales-Miranda,

76 2023). La falta de nitrógeno del suelo es comúnmente reemplazada con fertilizantes sintéticos

77 que aportan este mineral al suelo. Sin embargo, su uso extensivo puede tener un impacto en el

78 ecosistema, ya que, la planta no utiliza todo el agroquímico y este se pierde por volatilización o

79 se acumula en los suelos y fuentes de agua cercanas (Zhang, 2022). Por lo tanto, es necesario

80 buscar alternativas ecológicas en remplazo de agroquímicos que brinden los nutrientes

81 necesarios a la planta, pero sin alterar la integridad tanto del ecosistema como del suelo a

82 trabajar. Una de las opciones más viables es el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento

83 vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) que actúan como biofertilizantes y bioestimulantes

84 (Alemneh *et al.*, 2020).

85 Las habas se asocian con rizobios en una simbiosis mutualista donde la planta proporciona

86 nutrientes y nicho a los rizobios, mientras que los rizobios aportan N₂ atmosférico en forma de

87 amoníaco y compuestos que promueven el crecimiento vegetal. Esta asociación es un recurso

88 renovable para una agricultura sostenible (Chen *et al.*, 2018). Se estima que las habas en

89 asociación con rizobacterias tienen una de las mayores tasas de fijación de N₂ atmosférico
90 seguidos de la soja, el maní y el fréjol común. De tal forma, que el cultivo de habas es una
91 alternativa para una agricultura sostenible (Efstathiadou, Savvas y Tampakaki, 2020). La
92 asociación se da de manera específica donde existe un intercambio de señales químicas entre
93 el hospedador y las bacterias. Las leguminosas excretan componentes orgánicos como
94 flavonoides, las cuales inducen la transcripción de genes nod en los rizobios, los cuales son
95 necesarios para el inicio de infección en los pelos radicales o aberturas en la raíz. Los exudados
96 varían de acuerdo a cada hospedador, los factores nod son diferentes de acuerdo a cada especie
97 y simbiovar de las rizobacterias. Dada esta especificidad, ciertos grupos de rizobios pueden
98 establecer simbiosis con determinadas leguminosas (Ghantasala y Roy Choudhury, 2022).
99 Existen leguminosas que pueden ser noduladas por una amplia variedad de rizobios y se los
100 considera hospedantes promiscuos, mientras que otras solo pueden asociarse con pocas cepas
101 de rizobios y se los considera hospedantes restrictivos (Efstathiadou, Savvas y Tampakaki, 2020;
102 Morales-Miranda, 2023).

103 Las rizobacterias pertenecen al grupo α -proteobacteria y β -proteobacteria que son capaces de
104 infectar las raíces de las leguminosas con la consecuente formación de nódulos y se consideran
105 bacterias benéficas con potencial promotor de crecimiento vegetal (PGP, por sus siglas en inglés)
106 (Morales-Miranda, 2023). Los géneros más reconocidos de rizobios son *Allorhizobium*,
107 *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Allito *et al*, 2021).
108 *V. faba* se considera un huésped restrictivo con alto grado de especificidad que establece una
109 simbiosis efectiva comúnmente con bacterias del género *Rhizobium*, dentro del cual, el simbiovar
110 *viciae* es el que mejor establece una fijación de N₂ efectiva con *V. faba* (El-Shinnawi *et al.*, 2021;
111 Zhang, 2022). Las habas pueden ser noduladas con rizobios que presenten genes de nodulación
112 particulares como nodD tipo g o nosDF-2 (Efstathiadou Savvas y Tampakaki, 2020). Se han
113 catalogado especies como *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. fabae*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*,
114 *R. vallis*, *R. etli* y *R. sophorae* que son capaces de generar una simbiosis efectiva en haba (Chen
115 *et al.*, 2018). Para obtener una mejoría en la fijación biológica de nitrógeno es necesario
116 seleccionar cepas adecuadas que demuestren competitividad y eficiencia de nodulación
117 (Efstathiadou, Savvas y Tampakaki, 2020). La infección de rizobios inicia con una serie de
118 eventos coordinados tanto morfológicos como fisiológicos que resultan en la formación de

119 nódulos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico (Stella *et al.*, 2021). Un aspecto
120 importante como mecanismo PGP es la producción de fitohormonas que juegan un papel directo
121 optimizando el crecimiento de las plantas con cambios en su fisiología y morfología, y se
122 consideran el principal factor responsable de las interacciones entre huésped y rizobacteria
123 (Lebrazi *et al.*, 2020). Las fitohormonas producidas por rizobios alteran el equilibrio de hormonas
124 en la planta donde se favorece la invasión y la consecuente formación eficaz de los nódulos. Las
125 fitohormonas mejoran la eficiencia de la simbiosis y regulan el número total de nódulos (Nadzieja,
126 Stougaard, y Reid, 2019). Dentro de este grupo se destacan las auxinas, las giberelinas, las
127 citoquinas, el etileno y el ácido abscísico (Fahde *et al.*, 2023). Las fitohormonas son vistas como
128 los mayores elementos en la regulación del crecimiento de las plantas, siendo AIA del grupo de
129 las auxinas y sustancias tipo giberelinas las más destacadas. Si bien se conoce las funciones y
130 efectos de estas fitohormonas se conoce poco acerca de su rol e implicación en la formación de
131 nódulos (Swarnalakshmi *et al.*, 2020).

132 Las auxinas son el regulador central del desarrollo de plantas. La acumulación de auxinas es un
133 prerequisite para la formación de tejidos en las plantas (Qureshi *et al.*, 2019). El ácido indol
134 acético (AIA) es una de las auxinas más activas, producto del metabolismo del L-triptófano
135 (compuesto orgánico excretado en condiciones naturales en las raíces de leguminosas), que
136 puede ser sintetizado por varios microorganismos incluidos las PGPR como metabolito
137 secundario (Ferreira *et al.*, 2020; Suliasih y Widawati, 2020). La mayoría de rizobacterias pueden
138 producir AIA, pero difieren en sus concentraciones dependiendo de la especie o cepas de la
139 misma especie (Lebrazi *et al.*, 2020). Esta fitohormona influye positivamente el desarrollo de las
140 plantas, teniendo impacto sobre la organogénesis como la elongación y división celular (Gao *et*
141 *al.*, 2020). Estimula principalmente el crecimiento de raíces, aumentando su longitud y mayor
142 número de raíces laterales y pelos radiculares. El área radicular al tener mayor superficie de
143 contacto con el suelo facilita la absorción de nutrientes por parte de la planta (Igiehon, Babalola
144 y Aremu, 2019).

145 Las giberelinas (GAs) participan en muchos procesos biológicos, incluida la floración,
146 germinación de semillas y la elongación celular. Se ha demostrado que es necesario en varias
147 etapas de la nodulación donde su contenido está estrictamente controlado para que el desarrollo
148 de nódulos se lleve a cabo con éxito (Nett, Bender y Peters, 2022). En comparación con el tejido

149 radicular, los nódulos tienen niveles más altos de GA, según varios estudios iniciales (Nadzieja,
150 Stougaard y Reid, 2019). Pocos nódulos de color blanco, con estructuras irregulares y pequeños
151 se desarrollan cuando hay niveles bajos de GA (McGuinness, Reid y Foo, 2021). Parece que una
152 concentración óptima de GA es necesaria para que la nodulación tenga éxito. Además, se ha
153 reportado que la nodulación de leguminosas regula varios genes de biosíntesis de GA (Nadzieja,
154 Stougaard y Reid, 2019).

155 Dado el efecto que tienen estas sustancias en promover el crecimiento vegetal e inducir la
156 asociación entre la bacteria y la planta hospedera, es de gran interés evaluar su producción. La
157 capacidad de biosíntesis de fitohormonas tipo AIA y GAs de rizobios que se encuentran en
158 simbiosis con las raíces de las variedades nativas de haba HB y SV no se ha investigado. En
159 este contexto, este estudio se centra en cuantificar la producción de fitohormonas y determinar
160 su diversidad filogenética, al ser aspectos importantes para comprender la dinámica de esta
161 simbiosis y poder realizar ensayos posteriores para desarrollar inóculos eficientes en remplazo
162 al uso de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de las variedades de haba de importancia
163 agronómica.

164 **2. Materiales y Métodos**

165

166 **2.1. Muestreo y desinfestación de nódulos**

167

168 Se obtuvieron cuatro muestras de raíz de cada una de las variedades: Haba Blanca (HB) y
169 Siempre Verde (SV) de entre 5 y 6 meses de desarrollo que presentaban nódulos visibles . Las
170 raíces se lavaron y se desinfestaron con agua destilada estéril, etanol al 95% y cloruro de
171 mercurio al 0,1% siguiendo las instrucciones de Lebrazi *et al.* (2020).

172

173 **2.2. Aislamiento de rizobios**

174

175 Los nódulos que presentaron características favorables como consistencia firme y coloración
176 rosada en su interior fueron seleccionados. Los rizobios se liberaron a través de la maceración

177 de los nódulos con agua destilada estéril, y esta suspensión se utilizó para sembrar por
178 agotamiento en placas que contenían YMA+RC a 28 °C de 3 a 5 días por triplicado, para obtener
179 colonias aisladas y diferenciarlas por sus características morfológicas, de acuerdo a su
180 tamaño, color, forma, bordes y aspecto (Fathy *et al.*, 2021; Morales-Miranda, 2023). Los distintos
181 morfotipos se sembraron nuevamente en diferentes placas para obtener colonias puras. Se
182 realizó la tinción de Gram de cada morfotipo para visualizar sus características microscópicas.
183 Cada morfotipo se conservó en congelación a –80 °C en tubos de 1,5 ml de capacidad que
184 contenían YMB + glicerol al 20% (Allito *et al.*, 2021; Zhang, 2022).

185

186 **2.3. Identificación de la producción de fitohormonas**

187

188 Se preparó sobrenadante libre de células a partir de cultivos líquidos en el medio *Yeast Mannitol*
189 *Broth* (YMB) suplementado con triptófano a razón de 1g/L, con inóculos estandarizados. Se
190 incubó durante siete días a 28 a 30 °C con 150 rpm Los tubos fueron centrifugados a 10 000rpm
191 durante 15 minutos a 4 °C. La producción de AIA se verificó mezclando 1,5 ml de extracto libre
192 de bacterias con 4 ml del reactivo de Salkowski con tres repeticiones para cada morfotipo (Gang
193 *et al.*, 2019; Suliasih y Widawati, 2020). La solución se incubó durante 1h en oscuridad
194 evidenciado viraje del color del medio a rosado en distintas tonalidades. La concentración en
195 ppm se calculó usando una curva estándar con concentraciones establecidas de AIA con cada
196 una de las absorbancias obtenidas a 520nm en espectrofotómetro (Swarnalakshmi *et al.*, 2020).
197 La producción de GA3 se verificó realizando una solución homogénea que contenía 1 ml de
198 extracto libre de bacterias, 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (modificado), 3 ml de agua
199 destilada estéril y 1 ml de HCL concentrado, la cual fue llevada a ebullición durante 5 minutos
200 hasta obtener viraje de color de amarillo a azul verdoso (Suliasih y Widawati, 2020). Su
201 concentración en ppm se calculó utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas
202 de GAs con cada una de las absorbancias obtenidas a 765nm en espectrofotómetro. Cada una
203 de las soluciones se realizaron por triplicado para obtener el promedio de cada una de ellas.

204

205 **2.4. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen 16 ARNr**

206

207 Los reactivos del *Wizzard Genomic DNA Purification Kit* se utilizaron para la extracción de ADN,
208 siguiendo las instrucciones para bacterias Gram negativas del fabricante (Promega Corp.,
209 EE.UU.). La concentración y pureza del ADN se midió utilizando el espectrofotómetro DeNovix
210 DS-11+, ajustando sus concentraciones entre 40 y 70 µg/ml. El gen 16S fue amplificado
211 utilizando los cebadores universales 16S ARNr 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y
212 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. La amplificación se realizó en un termociclador
213 SimpliAmp con las siguientes condiciones de PCR: 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por
214 30 segundos y 72°C por 40 segundos con desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos y
215 extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizó un volumen de reacción de 25µ que contenía: 12,5µl
216 de *GoTaq Master Mix* (Promega Corp., EE.UU.), 8µl de agua libre de nucleasas, 1,25µl de cada
217 *primer* y 2µl de ADN. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen
218 Company Corea del Sur mediante el método de Sanger (Giani *et al.*, 2020). Cada una de las
219 secuencias fueron alineadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology*
220 *Information* (NCBI, por sus siglas en inglés) y su identidad comparada mediante la herramienta
221 Blastn y, además, en la base de datos del EZBioCloud mediante la herramienta 16S- Based ID.

222

223 **2.5. Toma de huellas dactilares genómicas por Rep-PCR**

224

225 El Rep-PCR es un método rápido y reproducible para diferenciar genotipos bacterianos que se
226 encuentran estrechamente relacionados que da como resultado la amplificación de fragmentos
227 de ADN con longitudes características y pueden identificar a nivel de subespecies y cepas, así
228 como también para análisis filogenéticos (Hossain *et al.*, 2022). La reacción de PCR se realizó
229 en un termociclador bajo el siguiente protocolo de amplificación: 30 ciclos de 94°C por 1 minuto,
230 40°C por 1 minuto y 65°C por 8 minutos con desnaturalización inicial a 94°C por 7 minutos y
231 extensión final a 65°C por 16 minutos. Volumen de reacción de 25µl: 9 µl de agua libre de
232 nucleasas, 14µl de *GoTaq Master Mix* (Promega Corp., EE.UU.), 1 µl de primer (GTG)₅ 5' -
233 GTGGTGGTGGTGGTG - 3' y 1 µl de ADN. Los amplicones se analizaron por electroforesis con

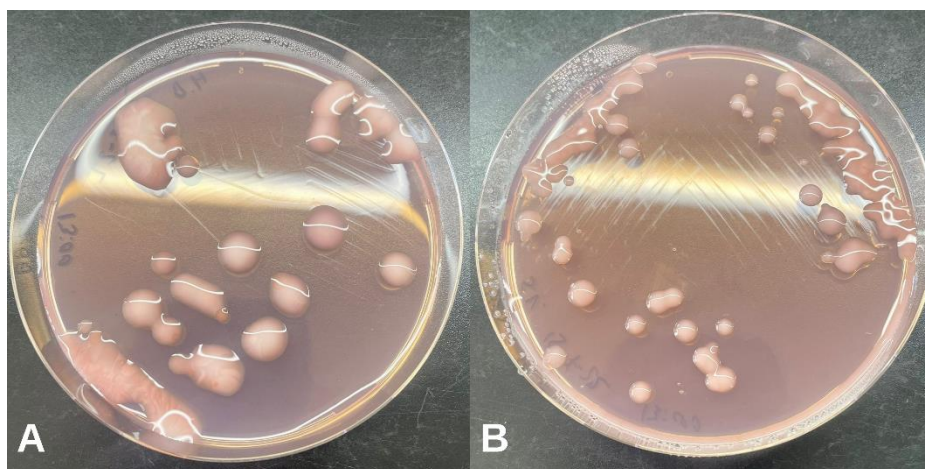
234 agarosa al 2% a 72V por 4 horas 20 minutos utilizando escalera molecular de 1kb (Promega
235 Corp., EE. UU).

236

237 3. Resultados y Discusión

238

239 Se obtuvo crecimiento abundante de rizobios característicos en el medio YMA+ RC con colonias
240 mucoides, brillantes y mala absorción del tinte (Figura 1). Todos los aislados son bacilos Gram
241 negativos. Se diferenció ocho morfotipos para la variedad HB y ocho morfotipos para la variedad
242 SV según sus características morfoculturales presentando colonias circulares e irregulares, de 2
243 a 6 mm, brillantes u opacas, con bordes enteros y onduladas, y con diferentes tonalidades de
244 color (Tabla 1). Las colonias presentaron rápido crecimiento en un periodo de 3 a 5 días, lo cual,
245 puede ser un indicio de que los rizobios pertenecen al género *Rhizobium* (Mbah *et al.*, 2022). El
246 tinte rojo Congo ayuda a diferenciar a los rizobios de bacterias que pueden estar presentes en la
247 superficie de los nódulos, por norma general, los rizobios presentan nula o mala absorción del
248 tinte rojo Congo y con presencia de abundante mucosidad (Buestán-Morales, 2023; Fuskhah y
249 Darmawati, 2019). La variación en sus características morfoculturales está dado por sus
250 características bioquímicas con variación en su forma colonial y la conformación de sus
251 exopolisacáridos que brindan diferentes tonalidades de tinte absorbido (El-Shinnawi *et al.*, 2021;
252 Stella *et al.*, 2021).



253

254

255

256

257

Figura 1) Crecimiento de rizobios característicos en medio YMA+RC. A) Rizobios provenientes de Haba Blanca. B) rizobios provenientes de Siempre Verde

Tabla 1) Características morfológicas de los diferentes aislados

Código	Tamaño	Color	Forma	Bordes	Aspecto
HB1	4mm	Naranja claro	Circular	Entero	Brillante
HB2	4mm	Naranja pálido	Irregular	Entero	Brillante
HB3	4mm	Naranja-blanco	Circular	Entero	Opaco
HB4	3mm	Naranja oscuro	Irregular	Ondulado	Opaco
HB5	2mm	Naranja oscuro	Irregular	Entero	Opaco
HB6	2mm	Naranja-rosado	Circular	Ondulado	Opaco
HB7	4mm	Naranja pálido	Irregular	Entero	Brillante
HB8	3mm	Rosado claro	Circular	Entero	Brillante
SV1	3mm	Naranja-rosado	Circular	Entero	Brillante
SV2	4mm	Rosado pálido	Irregular	Entero	Brillante
SV3	4mm	Rosado claro	Circular	Entero	Opaco
SV4	4mm	Rosado oscuro	Circular	Entero	Opaco
SV5	5mm	Rosado claro	Circular	Ondulado	Brillante
SV6	3mm	Rosado oscuro	Irregular	Ondulado	Opaco
SV7	6mm	Rosado pálido	Circular	Ondulado	Brillante
SV8	5mm	Rosado claro	Circular	Entero	Brillante

259

260 AIA y GAs fue producido por todos los aislados al crecer en YMB suplementado con triptófano.
261 Dentro de la variedad HB, HB3 produjo la mayor cantidad de AIA con 12 µg/ml, seguido de HB1
262 y HB2, y HB4 produjo la mayor cantidad de GAs con 20,3 µg/ml, seguido de HB1 y HB7. Para la
263 variedad SV, SV4 produjo la mayor cantidad de AIA con 10,16 µg/ml, seguido de SV1 y SV3, y
264 SV2 produjo la mayor cantidad de GAs con 16 µg/ml, seguido de SV8 y SV3 (Tabla 2). Está bien
265 establecido que los mayores productores de AIA en su mayoría son bacterias Gram negativas y
266 que sintetizan esta auxina al momento que la planta excreta naturalmente triptófano (Rajguru y
267 Bhatt, 2022). La producción de AIA varía entre diferentes especies y cepas y está influenciada
268 por las condiciones de cultivo, etapa de crecimiento y disponibilidad de sustrato. Las rizobacterias
269 y en concreto los rizobios son productores de auxinas más eficientes que bacterias aisladas del
270 suelo a granel (Buhian y Bensmihen, 2018; Lebrazi *et al.*, 2020). La técnica de Salkowski para la
271 detección de AIA es una alternativa relevante para la determinación semicuantitativa que asegura
272 la presencia de la fitohormona dentro del sobrenadante, excretado como metabolito secundario,

273 de cultivos bacterias o formulaciones líquidas de bioinoculantes. Detectar la fitohormona AIA se
 274 considera una herramienta efectiva para detectar la presencia de microorganismos beneficios
 275 con potencial PGP y que pueden tener un efecto significativo sobre el crecimiento de plantas,
 276 induciendo la proliferación de raíces laterales y pelos radiculares (Gupta y Pandey, 2021). Las
 277 giberelinas son producidas por un amplio rango de rizobacterias y su compuesto es homólogo a
 278 las giberelinas endógenas. El método de Folin ciocalteu permite cuantificar la cantidad total de
 279 giberelinas en el compuesto incluyendo a las moléculas bioactivas involucradas en la promoción
 280 de crecimiento vegetal y con moléculas de señalización en interacción con su hospedador
 281 (Rafique *et al*, 2021).

282

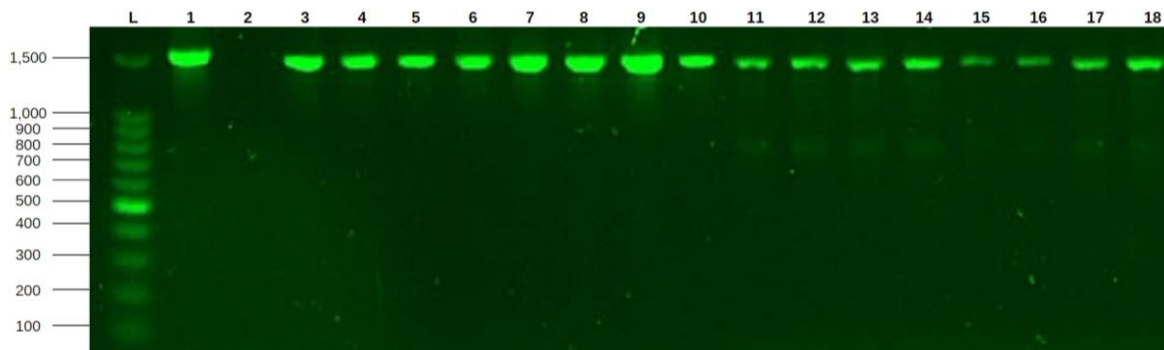
283 **Tabla 2)** Valores de AIA y GAs expresados en ppm ($\mu\text{g/ml}$) de los diferentes rizobios aislados

	HB1	HB2	HB3	HB4	HB5	HB6	HB7	HB8
AIA	10,5	7,11	12	4,55	5,33	5,11	5,61	5,16
GAs	19,33	16,19	17,72	20,3	17,05	18,23	18,15	17,74
	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5	SV6	SV7	SV8
AIA	9,44	7,66	9,38	10,16	6,44	9,11	8,83	8,94
GAs	14,34	16	15,05	14,88	14,21	14,36	14,88	15,07

284

285 La amplificación del 16s ARNr corresponden a productos de cerca 1500pb en todos los aislados
 286 (Figura 2). Se tomaron las identidades de los rizobios que sean mayores al 97% al ser analizados
 287 en Blastn (Allito *et. al*, 2021). El género *Rhizobium* está presente en todos los morfotipos aislados.
 288 Dentro de la variedad HB se encontró cuatro morfotipos que pertenecen a *R. sophorae* en el
 289 rango de 98,85 al 100% de similitud y un morfotipo a *R. leguminosarum* con 99,9% de similitud
 290 al ser comparados con las dos bases de datos. En la variedad SV se obtuvo tres morfotipos que
 291 pertenecen a *R. sophorae* en el rango de 99,9 al 100% de similitud y un morfotipo a *R.*
 292 *leguminosarum* con 98,99 al 99,06% de similitud al ser comparados en las dos bases de datos.
 293 Los resultados que presentaron discrepancias entre las bases de datos fueron catalogados como
 294 *Rhizobium sp.* (Tabla 3). Si bien la amplificación del gen 16S ARNr es una técnica eficaz en la
 295 identificación a nivel de especie de bacterias, existe cierta dificultad cuando se aplica en rizobios
 296 (Eldomiaty y Mahgoub, 2021). Los rizobios tienen la particularidad de compartir genes de
 297 nodulación y simbióticos dentro de plásmidos y en su genoma, y que se ha visto que está
 298 localizados dentro del gen 16S ARNr por lo que este gen es menos variable en comparación a

299 otras bacterias y no es muy adecuado para identificar a nivel de especie (Andrews et al., 2018).
 300 Si bien existe una predilección por la especie *R. sophorae* y *R. leguminosarum* como dos
 301 especies presentes dentro de ambas variedades es porque pueden compartir el gen simbiótico
 302 *viciae*. Algunos de los rizobios que se encuentran en asociación al haba se identifican como *R.*
 303 *anhuiense*, *R. fabae*, *R. vallis*, *R. sophorae*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, etc (Yesmin et al.,
 304 2021).



305
 306 **Figura 2)** Amplificación región 16s ADNr de aproximadamente 1500 pb. Ladder 100 pb Promega (L); carril
 307 1 (control positivo); carril 2 (control negativo); carriles del 3 al 10, muestras provenientes de Haba Blanca
 308 (HB1 - HB8 en orden); carriles del 11 al 18, muestras provenientes de Siempre Verde (SV1 - SV8 en
 309 orden).

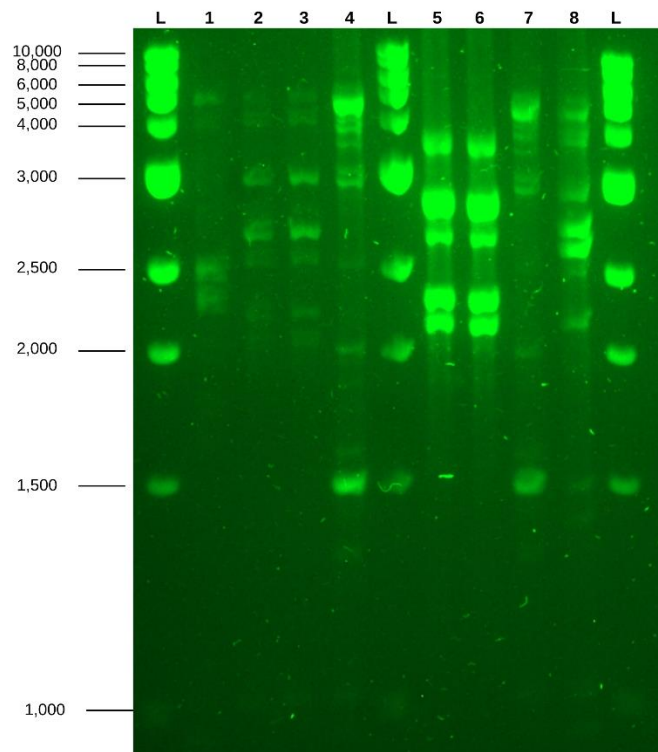
310
 311

Tabla 3) Identidades de morfotipos provenientes de HB y SV

Código	NCBI			EzBioCloud		
	Identidad	Similitud	Acceso	Identificación	Similitud	Acceso
H1	<i>Rhizobium</i> sp.	100%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	100%	KJ921033
H2	<i>Rhizobium</i> sp.	100%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	100%	KJ921033
H3	<i>Rhizobium</i> sp.	99,89%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	99,89%	KJ921033
H4	<i>R. leguminosarum</i>	99,9%	MT645960.1	<i>R. leguminosarum</i>	99,9%	MRDL01000029
H5	<i>R. sophorae</i>	100%	MT645958.1	<i>R. sophorae</i>	100%	KJ831229
H6	<i>R. sophorae</i>	98,85%	OQ690733.1	<i>R. sophorae</i>	98,94%	KJ831229
H7	<i>R. sophorae</i>	100%	MT645963.1	<i>R. sophorae</i>	99,82%	KJ831229
H8	<i>R. sophorae</i>	100%	MT645955.1	<i>R. sophorae</i>	100%	KJ831229
S1	<i>Rhizobium</i> sp.	100%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	100%	KJ921033
S2	<i>Rhizobium</i> sp.	98,62%	OQ291569.1	<i>R. leuminosarum</i>	98,62%	MRDL01000029
S3	<i>Rhizobium</i> sp.	99,89%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	99,89%	KJ921033
S4	<i>Rhizobium</i> sp.	100%	MH567326.1	<i>R. acidisoli</i>	100%	KJ921033
S5	<i>R. leguminosarum</i>	99,06%	KY587866.1	<i>R. leuminosarum</i>	98,99%	MRDL01000029
S6	<i>R. sophorae</i>	99,9%	MT645958.1	<i>R. sophorae</i>	100%	KJ831229
S7	<i>R. sophorae</i>	99,91%	MT645955.1	<i>R. sophorae</i>	100%	KJ831229
S8	<i>R. sophorae</i>	100%	MT645955.1	<i>R. sophorae</i>	100%	KJ831229

312

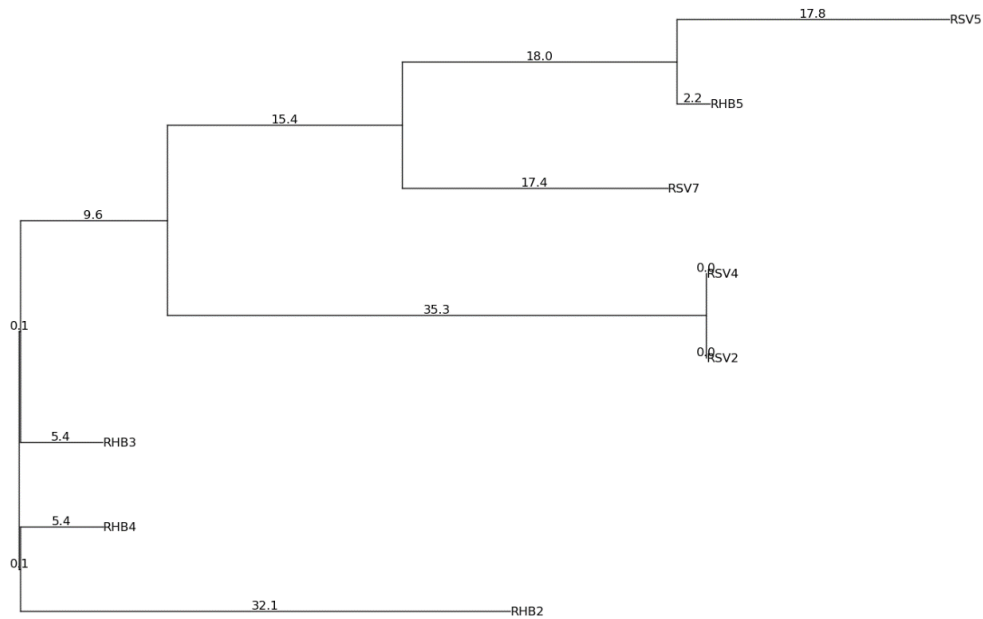
313 Se encontraron diferentes patrones de bandas entre los morfotipos que revelan posibles cepas
314 estrechamente relacionadas (Figura 3). El análisis por *Neighbour joining* muestra las relaciones
315 evolutivas al construir su árbol filogenético con variación genética entre sus aislados (Figura 4).
316 Tanto los rizobios aislados de la variedad SV y de la variedad HB se encuentran agrupadas entre
317 sí, sin preferencias marcadas de acuerdo a su hospedador. *Vicia faba* posee una mayor
318 selectividad en su simbiosis con rizobios presentes en el suelo, en comparación a otras
319 leguminosas, que se deriva en asociaciones más eficientes (Teulet *et al.*, 2022; Purwaningsih,
320 Agustiyani y Antonius, 2021). A pesar de esta selectividad existen diferencias genéticas entre los
321 aislados, dados genes simbióticos compartidos entre los diferentes rizobios que se expresan por
322 los flavonoides producidos por el haba (Benidire *et al.*, 2018; Morales-Miranda, 2023).



323

324 **Figura 3)** Perfil de huellas dactilares genómicas de los diferentes rizobios. Ladder 1kb Promega (L); carril
325 1 (HB2), carril 2 (HB3), carril 3 (HB4), carril 4 (HB5), carril 5 (SV2), carril 6 (SV4), carril 7 (SV5), carril 8
326 (SV7)

327



328

329 **Figura 4)** Árbol filogenético por *Neighbour joining* de los diferentes morfotipos de *Rhizobium* identificados

330

331 **4. Conclusiones**

332

333 La producción de fitohormonas de cada uno de los aislados varió, con rizobios más efectivos que
 334 otros, siendo los morfotipos HB3 y SV4 los mayores productores de AIA, y los morfotipos HB4 y
 335 SV2 los mayores productores de GAs. El análisis filogenético demostró que existe relación entre
 336 las variedades Haba Blanca y Siempre Verde respecto a sus rizobios simbiotes. Si bien existe
 337 variación genética esta puede ser mínima, la cual otorga un alto grado de especificidad de
 338 asociación con rizobios en comparación a otras leguminosas. La evaluación de sustancias
 339 promotoras de crecimiento y de la interacción rizobio-leguminosa por métodos moleculares son
 340 parámetros relevantes para la selección y formulación de bioinoculantes eficientes.

341

342 **Agradecimientos**

343 El autor expresa sus agradecimientos a Mtr. Jeniffer Yáñez, a PhD. Martín y Marcial y a PhD.
 344 Diana Astorga, los cuales brindaron directrices relevantes para la realización de este trabajo de
 345 investigación.

346

347

348 **Referencias**

349

- 350 Alemneh, A. A., Zhou, Y., Ryder, M. H. y Denton, M. D. (2020) Mechanisms in plant growth-
351 promoting rhizobacteria that enhance legume–rhizobial symbioses. *Journal of Applied*
352 *Microbiology* [en línea], 129(5), 1133-1156. Disponible en<
353 10.1111/jam.14754>[consulta: 22 enero 2023].
- 354 Allito, B. B., Ewusi-Mensah, N., Logah, V. y Hunegnaw, D. K. (2021) Legume-rhizobium specificity
355 effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba*
356 L.). *Scientific reports* [en línea], 11(1), 3678. Disponible en<
357 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83235-8>>[consulta: 12 junio 2023].
- 358 Andrews, M., De Meyer, S., James, E. K., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M. F. y Young, J.
359 P. W. (2018) Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial
360 Genera: Occurrence and Importance. *Genes* [en línea], 9(7), 321. Disponible en
361 <<https://doi.org/10.3390/genes9070321>>[consulta: 09 febrero 2023].
- 362 Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., Fatemi, Z., Gomez, R., Göttfert, M., y Oufdou, K. (2018).
363 Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study
364 of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied*
365 *Microbiology* [en línea], 41(1). Disponible
366 en<<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.003>>[consulta: 09 febrero 2023].
- 367 Buestán Morales, J. C. (2023) *Caracterización de Rhizobium spp. a partir de trébol violeta*
368 *(Trifolium pratense) en cuatro localidades del cantón Ambato-Tungurahua*. Tesis de
369 licenciatura. Universidad Técnica de Ambato [en línea]. Disponible
370 en<<https://t.ly/bN94p>>[consulta: 15 marzo 2023].
- 371 Buhian, P., y Bensmihen, S. (2018) Mini-review: nod factor regulation of phytohormone signaling
372 and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in Plant Science* [en línea],
373 9, 1247. Disponible en< <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01247>>[consulta: 15 marzo
374 2023].
- 375 Chen, Y. X., Zou, L., Penttinen, P., Chen, Q., Li, Q. Q., Wang, C. Q. y Xu, K. W. (2018) Faba
376 bean (*Vicia faba* L.) nodulating rhizobia in Panxi, China, are diverse at species, plant
377 growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Frontiers in Microbiology* [en
378 línea], 9, 1338. Disponible en<<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01338>>[consulta: 22
379 marzo 2023].
- 380 Efsthadiadou, E., Savvas, D. y Tampakaki, A. P. (2020) Genetic diversity and phylogeny of
381 indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. *Systematic and*
382 *Applied Microbiology* [en línea], 43(6), 126149. Disponible
383 en<<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126149>>[consulta: 04 abril 2023].
- 384 Eldomiaty, A. S. y Mahgoub, E. I. (2021) Morphological, Biochemical and Molecular
385 Characterization of Rhizobia of Faba Bean Plants Grown in North Nile Delta
386 Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS* [en línea], 24(6), 672-679.
387 Disponible en< 10.3923/pjbs.2021.672.679 >[consulta: 24 febrero 2023].
- 388 El Idrissi, M. M., Lamin, H., Bouhnik, O., Lamrabet, M., Alami, S., Jabrone, Y. y Abdelmoumen,
389 H. (2020) Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco
390 and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli*. *Systematic and applied*
391 *microbiology* [en línea], 43(3), 126084. Disponible
392 en<<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126084>>[consulta: 24 febrero 2023].
- 393 El-Shinnawi, M. M., Abou Hussien, E. A., EL Zembrany, H. M y Abo Elsoud, A. A. (2021) Response
394 of some leguminious plants to specific rhizobial inoculation timing within germination

- 395 stage. *Menoufia Journal of Soil Science* [en línea], 6(8), 297-298. Disponible en<
396 <https://10.21608/mjss.2021.199011>>[consulta: 05 mayo 2023].
- 397 Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B. y Amri, A. (2023) Rhizobia: A Promising Source of Plant
398 Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining
399 Applications and Mechanisms. *Agriculture* [en línea], 13(7), 1279. Disponible
400 en<<https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>>[consulta: 05 mayo 2023].
- 401 Fathy, D., Eldomiaty, A., El-Fattah, H., Mahgoub, E. y Hassanin, A. (2021) Morphological,
402 biochemical and molecular characterization of rhizobia of faba bean plants grown in north
403 Nile delta Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences* [en línea], 24(6). Disponible
404 en<<https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.672.679>>[consulta: 14 abril 2023].
- 405 Ferreira, N. S., Matos, G. F., Meneses, C. H., Reis, V. M., Rouws, J. R., Schwab, S. y Rouws, L.
406 F. (2020) Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and
407 their effect on plant development. *Plant and Soil* [en línea], 451, 221-238. Disponible
408 en< <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04388-0>>[consulta: 27 junio 2023].
- 409 Fuskhah, E. y Darmawati, A. (2019) Inoculation of *Rhizobium* bacteria and nutrient of seawater
410 to increase soybean production and quality as food. In *IOP Conference Series: Earth and
411 Environmental Science* [en línea], 292 (1), 012058. Disponible en<[https://doi.org/
412 10.1088/1755-1315/292/1/012058](https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012058)>[consulta: 22 junio 2023].
- 413 Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M. y Schumacher, J. (2019) Analysis of indole-3-acetic
414 acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*
415 [en línea], 9(9), e3230-e3230. Disponible
416 en<<https://10.21769/BioProtoc.3230>>[consulta: 25 junio 2023].
- 417 Gao, J. L., Wang, L. W., Xue, J., Tong, S., Peng, G., Sun, Y. C. y Sun, J. G. (2020) *Rhizobium*
418 *rhizophillum* sp. nov., an indole acetic acid-producing bacterium isolated from rape
419 (*Brassica napus* L.) rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary
420 Microbiology* [en línea], 70(9), 5019-5025. Disponible en<
421 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004374>>[consulta: 27 junio 2023].
- 422 García, C., y Sato, M. (2019) Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepa de
423 *Rhizobium Azospirillum* y producción de inoculantes. Repositorio de Universidad
424 Nacional de San Cristóbal de Huamanga [en línea]. Disponible
425 en<<https://t.ly/nup2L>>[consulta: 03 junio 2023].
- 426 Ghantasala, S. y Roy Choudhury, S. (2022) Nod factor perception: An integrative view of
427 molecular communication during legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* [en
428 línea], 110(6), 485-509. Disponible en<[https://doi.org/10.1007/s11103-022-01307-
429 3](https://doi.org/10.1007/s11103-022-01307-3)>[consulta: 28 junio 2023].
- 430 Giani, A. M., Gallo, G. R., Gianfranceschi, L. y Formenti, G. (2020) Long walk to genomics: History
431 and current approaches to genome sequencing and assembly. *Computational and
432 Structural Biotechnology Journal* [en línea], 18, 9-19. Disponible
433 en<<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.002>>[consulta: 22 abril 2023].
- 434 Gupta, S. y Pandey, S. (2021) Exploiting the potential of plant growth-promoting rhizobacteria in
435 legume production. In *Abiotic Stress and Legumes* [en línea], 1-32. Disponible
436 en<<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815355-0.00001-1>>[consulta: 13 junio 2023].
- 437 Hossain, M. M., Masud, M. M., Hossain, M. I., Haque, M. M., Uddin, M. S., Alam, M. Z. y Islam,
438 M. R. (2022) Rep-PCR analyses reveal genetic variation of *Ralstonia solanacearum*
439 causing wilt of Solanaceous vegetables in Bangladesh. *Current Microbiology* [en
440 línea], 79(8), 234. Disponible en<<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02932-3>>[consulta:
441 02 abril 2023].

- 442 Igiehon, N. O., Babalola, O. O. y Aremu, B. R. (2019) Genomic insights into plant growth
443 promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought
444 stress. *BMC microbiology* [en línea], 19(1), 1-22. Disponible
445 en<<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1536-1>>[consulta: 26 marzo 2023].
- 446 Lebrazi, S., Fadil, M., Chraibi, M. y Fikri-Benbrahim, K. (2020) Screening and optimization of
447 indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface
448 methodology. *Journal, genetic engineering & biotechnology* [en línea], 18(1), 21.
449 Disponible en<<https://doi.org/10.1186/s43141-020-00035-9>>[consulta: 12 abril 2023].
- 450 Mbah, G.C., Mohammed, M., Jaiswal, S.K. y Dakora, F. D. (2022) Phylogenetic Relationship,
451 Symbiotic Effectiveness, and Biochemical Traits of Native Rhizobial Symbionts of
452 Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in South African Soil. *J Soil Sci Plant Nutr* [en línea],
453 22, 2235–2254. Disponible en<<https://doi.org/10.1007/s42729-022-00805-z>>[consulta:
454 19 junio 2023].
- 455 McGuinness, P. N., Reid, J. B. y Foo, E. (2021) The influence of ethylene, gibberellins and
456 brassinosteroids on energy and nitrogen-fixation metabolites in nodule tissue. *Plant*
457 *Science* [en línea], 305, 110846. Disponible
458 en<<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110846>>[consulta: 09 junio 2023].
- 459 Morales-Miranda, C. M. (2023) *Caracterización de Rhizobium spp. a partir de haba (Vicia faba*
460 *L.) en cuatro localidades del cantón Tisaleo* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de
461 Ambato [en línea]. Disponible en<<https://t.ly/d9HN>>[consulta: 19 marzo 2023].
- 462 Nadzieja, M., Stougaard, J. y Reid, D. (2019) A toolkit for high resolution imaging of cell division
463 and phytohormone signaling in legume roots and root nodules. *Frontiers in Plant Science*
464 [en línea], 10, 1000. Disponible en<<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01000>>[consulta:
465 14 abril 2023].
- 466 Nett, R. S., Bender, K. S. y Peters, R. J. (2022) Production of the plant hormone gibberellin by
467 rhizobia increases host legume nodule size. *The ISME Journal* [en línea], 16(7), 1809-
468 1817. Disponible en<<https://doi.org/10.1038/s41396-022-01236-5>>[consulta: 23 abril
469 2023].
- 470 Purwaningsih, S., Agustiyani, D. y Antonius, S. (2021) Diversity, activity, and effectiveness of
471 *Rhizobium* bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng,
472 central Java. *Iranian Journal of Microbiology* [en línea], 13(1), 130. Disponible
473 en<<https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504>>[consulta: 18 febrero 2023].
- 474 Qureshi, M. A., Shahzad, H., Saeed, M. S., Ullah, S., Ali, M. A., Mujeeb, F. y Anjum, M. A. (2019)
475 Relative potential of *Rhizobium* species to enhance the growth and yield attributes of
476 cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Eurasian Journal of Soil Science* [en línea], 8(2), 159-
477 166. Disponible en<<https://doi.org/10.18393/ejss.544747>>[consulta: 15 mayo 2023].
- 478 Rafique, M., Naveed, M., Mustafa, A., Akhtar, S., Munawar, M., Kaukab, S. y Salem, M. Z. (2021)
479 The combined effects of gibberellic acid and *Rhizobium* on growth, yield and nutritional
480 status in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Agronomy* [en línea], , 11(1), 105. Disponible en<
481 <https://doi.org/10.3390/agronomy11010105>>[consulta: 03 julio 2023].
- 482 Rajguru, B. R. y Bhatt, V. D. (2022) Review on Mechanism of Mineral Phosphate Solubilization
483 in Fast-Growing Rhizobia Based on Sugar Utilization. *Plant breeding and biotechnology*
484 [en línea], 10(4), 203-211. Disponible
485 en<<https://doi.org/10.9787/PBB.2022.10.4.203>>[consulta: 23 abril 2023].
- 486 Stella, M., Sharma, R., Nema, S., Ramakrishnan, R. S. y Kumar, A. (2021) Genetic
487 characterization and diversity of Rhizobia isolated from root nodules of green gram (*Vigna*
488 *radiata* L.) found in Central Plateau of India. *Legume Research-An International Journal*
489 [en línea], 44(3), 353-361. Disponible en<<https://doi.org/10.18805/LR-4258>>[consulta: 24
490 marzo 2023].

- 491 Suliasih y Widawati, S. (2020) Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis*
492 from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production. IOP
493 Conference Series: *Earth and Environmental Science* [en línea], 572(1), 012025.
494 Disponible en<<https://doi.org/10.1088/1755-1315/572/1/012025>>[consulta: 16 enero
495 2023].
- 496 Swarnalakshmi, K., Yadav, V., Tyagi, D., Dhar, D. W., Kannepalli, A. y Kumar, S. (2020)
497 Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: Growth promotion
498 and crop production. *Plants* [en línea], 9(11), 1596. Disponible
499 en<<https://doi.org/10.3390/plants9111596>>[consulta: 07 febrero 2023].
- 500 Teulet, A., Camuel, A., Perret, X. y Giraud, E. (2022). The versatile roles of type III secretion
501 systems in rhizobium-legume symbioses. *Annual Review of Microbiology* [en línea], 76,
502 45-65. Disponible en<<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041020-032624>>[consulta:
503 13 enero 2023].
- 504 Yesmin, M. M., Rashid, M. H. O., Prosun, T. A., Ali, M. Y., Haider, M. J. y Paul, S. K. (2021)
505 Isolation and characterization of *Rhizobium* strains from root nodules of Faba bean (*Vicia*
506 *faba* L.). *Journal of the Bangladesh Agricultural University* [en línea], 19(3), 302-309.
507 Disponible en< <https://doi.org/10.5455/JBAU.86499>>[consulta: 07 mayo 2023].
- 508 Zhang, J., Li, S., Wang, N., Yang, T., Brunel, B., Andrews, M. y Wang, E. (2022) *Rhizobium*
509 *sophorae* is the dominant rhizobial symbiont of *Vicia faba* L. In North China. *Systematic*
510 *and Applied Microbiology* [en línea], 45(1), 126291. Disponible
511 en<<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126291> >[consulta: 26 abril 2023].
- 512