



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TEMA:**

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE N<sub>2</sub> EN CINCO ESPECIES DE LEGUMINOSAS (FABOIDEAE) CRECIDAS EN DOS TIPOS DE SUELOS DE LA PARROQUIA SAN PLÁCIDO, PROVINCIA DE MANABÍ.**

**AUTORES:**

Rodríguez Loor María Eugenia

Vélez Delgado Jhon Franig

**TUTORA:**

Dra. María Luisa Izaguirre Lessmann

**LODANA- MANABÍ- ECUADOR**

2021- 2022

## **DEDICATORIA**

Dedicado a Dios quien ha sido mi guía incondicional, a mis padres Juan Rodríguez y Andrea Loor por haberme enseñado a luchar por aquello que queremos en la vida, por haberme inculcado los valores más preciados del ser humano, con su ejemplo me enseñaron que el respeto, la honestidad la constancia, amor, trabajo y humildad nos llevan a cumplir nuestros objetivos, a pesar de las dificultades y obstáculos que se presenten en el camino, nada es fácil pero sin duda es lo difícil que nos enseña a crecer en cada ámbito de nuestra vida.

A mis hermanas por su confianza, apoyo y consejos, fueron mi ejemplo a seguir, gracias por recordarme siempre que lo lograría diciéndome “no hay edad ni límites para cumplir metas”, Endita y Sara, a mi esposo quien es parte importante de este logro.

Dedicado a mí, que luche contra, sueño, cansancio, tristeza y muchas veces contra esos pensamientos negativos de no poder más, Priscila y Jhon la vida nos hizo coincidir en un mismo camino para apoyarnos, y recordarnos siempre, que sí podíamos.

María Eugenia Rodríguez Loor

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS por permitirme un día más de vida y con ello una meta cumplida, a mis padres Andrea y Juan, pilares fundamentales en mi vida, mis hermanas a mi familia, por todo el apoyo brindado, así sea un granito de arena aportado, una palabra un gesto, toda actitud positiva cuenta y suma en el proceso.

A mi esposo Cristhian Mera, por su apoyo incondicional, paciencia y comprensión, gracias por siempre haber estado ahí, por haberme brindado su tiempo y acompañarme en cada paso de la ejecución de este proyecto, aun cuando era su tiempo de descanso, valoro y agradezco por cada esfuerzo brindado.

A mis jefes Giovanni Bravo y Audrey Aguas, por la oportunidad que me dieron de trabajar y comprender que estudiar era parte de mi formación profesional, gracias por la confianza, el apoyo, por brindarme la mano siempre que los necesite, sin trabajo no hubiese sido fácil empezar mis estudios y hoy por hoy culminar esta etapa.

A mi tutora, Dr. María Luisa Izaguirre Lessmann, por transmitirnos esas energías y ambición al conocimiento, a ir más allá de lo común, por su tiempo, trabajo y paciencia brindada en este proyecto.

Gracias al Profesor Williams Méndez (PhD. Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Departamento de Construcciones Civiles UTM, por donarnos la bentonita.

Gracias amigo y compañero de tesis, Jhon Vélez y familia, por cada vivencia y aprendizaje compartido, Priscila Cedeño por estar ahí en las buenas y malas, para reírnos y llorar, a mis compañeros y docentes quienes formaron parte de este camino por la casa de valores y conocimiento llamada Universidad.

María Eugenia Rodríguez Loor

## **DEDICATORIA**

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar” *Thomas Chalmers*.

Este Trabajo de titulación se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Para mis padres: Catalina Delgado y Franklin Vélez gracias por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, carácter, empeño, perseverancia, coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos: Franklin Vélez Delgado, Génesis Vélez Delgado y Mabel Vélez Delgado por estar siempre presentes.

A mi Cuñada, Carmen Macías y mis sobrinas Melanie y Paula Vélez Macías; quienes han sido mi motivación, inspiración y felicidad.

A mis profesores del colegio Unidad Educativa “Playa Prieta” por siempre predicar e incentivar el estudio al igual que a los Ingenieros/as de la FIAG. Especialmente a la Dra. M.L. Izaguirre. A mi compañera, María E. Rodríguez y a mi enamorada Priscila Cedeño M. siendo muy fundamental a lo largo de mi periodo académico.

Jhon Franig Vélez Delgado

## **AGRADECIMIENTO**

A Jehová por siempre guiarme por el camino correcto, mis padres: Franklin Vélez Cedeño, Catalina Delgado Cevallos, hermanos; Franklin, Génesis y Mabel que gracias a su esfuerzo y sacrificio he logrado cumplir una nueva meta, además por darme fuerzas y motivación durante todo mi periodo formativo académico.

Gratitud especial a la Dr. M.L. Izaguirre Lessmann, por transmitirnos la confianza necesaria para formar un gran grupo de trabajo de inicio a fin y ante todo guiar esta investigación con pretensiones positivas para lograr los mejores resultados.

Gracias al Profesor Williams Méndez (PhD. Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Departamento de Construcciones Civiles UTM, por donarnos la bentonita.

Agradecimiento a quienes estuvieron detrás de todo este proceso a mi enamorada Ing. Priscila Cedeño Manzaba. También Ing. Jinson Cedeño Manzaba y Lic. Cristhian Mera Vaque, gracias a su disposición se pudo lograr cada periodo de los ensayos establecidos, de igual manera a la Dra. Luz Cecilia García por la coordinación del laboratorio central de la UTM.

A mi compañera de tesis María Eugenia Rodríguez, con quien mantuvimos un desafío de sacar adelante esta magnífica investigación y que juntos pudimos buscar estrategias para salir de cualquier dificultad que se presentaban en el camino.

Jhon Franig Vélez Delgado

## INDICE

DEDICATORIA .....	2
AGRADECIMIENTO .....	3
DEDICATORIA .....	4
AGRADECIMIENTO .....	5
1.    Introducción .....	14
2.    Objetivos .....	16
<b>2.1. Objetivo general .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
3.    Marco teórico .....	17
<b>3.1. Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN).....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Leguminosas de grano de interés comercial en Ecuador.....</b>	<b>18</b>
3.2.1.    Frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	18
3.2.2.    Frijol caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.).....	19
3.2.3.    Frijol de palo ( <i>Cajanus cajan</i> L.) .....	20
3.2.4.    Haba ( <i>Vicia faba</i> L.) .....	<a href="#">21</a> <del>20</del>
3.2.5.    Habichuela ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.).....	21
<b>3.3. Macro y Micronutrientes.....</b>	<b>22</b>
3.3.1.    Nitrógeno (N) .....	22
3.3.2.    Fósforo (P).....	22
3.3.3.    Calcio (Ca) .....	<a href="#">23</a> <del>22</del>
3.3.4.    Boro (B).....	23
3.3.5.    Molibdeno (Mo).....	23
<b>3.4. Enmiendas orgánicas del suelo.....</b>	<b>24</b>
3.4.1.    Melaza .....	24

3.4.2.	<b>Bentonita</b> .....	24
<b>3.5.</b>	<b>Fitohormonas</b> .....	<b>24</b>
3.5.1.	<b>Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico)</b> .....	25
3.5.2.	<b>Citoquininas</b> .....	25
4.	Metodología .....	25
<b>4.1.</b>	<b>Diseño experimental y material vegetal</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2.</b>	<b>Características generales del ensayo:</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3.</b>	<b>Determinación de los parámetros de germinación y crecimiento de las plantas.</b>	<b>27</b>
<b>4.4.</b>	<b>Descripción de los tratamientos:</b> .....	<b>28</b>
4.4.1.	<b>Composición química de las enmiendas</b> .....	28
4.4.2.	<b>Tratamientos</b> .....	28
5.	Resultados .....	29
<b>5.1.</b>	<b>Temperaturas y fisicoquímica de los suelos</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2.</b>	<b><i>Vicia faba</i></b> .....	<b>30</b>
<b>5.3.</b>	<b><i>Phaseolus lunatus</i></b> .....	<b>32</b>
<b>5.4.</b>	<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b> .....	<b>34</b>
<b>5.5.</b>	<b><i>Vigna unguiculata</i></b> .....	<b>38</b>
<b>5.6.</b>	<b><i>Cajanus cajan</i></b> .....	<b>43</b>
6.	Discusión .....	48
7.	Conclusión y recomendaciones .....	52
	Referencias bibliográficas.....	53
	ANEXOS .....	69
<b>Anexo 1.</b>	<b>Vista del área experimental</b> .....	<b>69</b>
<b>Anexo 2.</b>	<b>Tomando los datos de altura y diámetro del 1er entrenudo</b> .....	<b><a href="#">6970</a></b>

<b>Anexo 3. Vista de <i>Vicia faba</i> crecidas en S1 (SF), sin germinar en S2 (SI) y S2+NPK, a las 5 semanas después de la germinación.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 4. Plantas de <i>Phaseolus lunatus</i>, a las 5 semanas después de la germinación, y crecidas en S1 (SF), S2 (SI), S1+S2 y S2+NPK. ....</b>	<b><del>70</del>71</b>
<b>Anexo 5. Plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> a las 3 semanas después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos. ....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 6. Nódulos del tipo determinado en raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i>. ....</b>	<b><del>71</del>72</b>
<b>Anexo 7. Plantas de <i>Vigna unguiculata</i>, a los 3 (foto izquierda) y 5 semanas (foto derecha) después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 8. Plantas de <i>Cajanus cajan</i>, a los 3 (foto izquierda) y a las 12 semanas (foto derecha) después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos.....</b>	<b><del>72</del>73</b>
<b>Anexo 9. Nódulos del tipo indeterminado en raíces de <i>Cajanus cajan</i>. ....</b>	<b><del>72</del>73</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Altura (A) y diámetro del 1er entrenudo (B) a lo largo del crecimiento de plantas de <i>Vicia faba</i> crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística <math>\pm</math> error estándar de la media estadística.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 2. Peso seco de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de plantas de <i>Vicia faba</i> crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística <math>\pm</math> error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares (<math>p &lt; 0.05</math>).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 3. Altura (A) y diámetro del 1er entrenudo (B) a lo largo del crecimiento de plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística <math>\pm</math> error estándar de la media estadística.....</b>	<b>32</b>

**Figura 4.** Peso seco de las hojas (A.), tallos (B) y raíces (C) de plantas de *Phaseolus lunatus* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 33

**Figura 5.** Altura y diámetro del 1er entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. .... 34

**Figura 6.** Correlación entre el diámetro del 1er entrenudo y la altura de las plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos: (A) colectado bajo sombra (S1) y (B) expuesto a la radiación solar (S2). \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ). ..... 35

**Figura 7.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 36

**Figura 8.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos: colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 36

**Figura 9.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), citoquininas (T4) y bentonita (T5). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 37

**Figura 10.** Correlación entre el peso seco de la masa nodular en las raíces y el peso seco total de la masa aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris*. \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ). .... 38

**Figura 11.** Altura y diámetro del 1er entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en una S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. 39

**Figura 12.** Correlación entre el diámetro del 1er entrenudo y la altura de las plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en S1 (A) y en S2 (B). \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ). ..... 40

**Figura 13.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), y raíces (C) de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 41

**Figura 14.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 41

**Figura 15.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), citoquininas (T4) y bentonita (T5). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ). ..... 42

**Figura 16.** Correlación entre el peso seco total de la masa aérea y el peso seco de masa nodular en las raíces de plantas noduladas de *Vigna unguiculata*. \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ). ..... 43

**Figura 17.** Altura y diámetro del 1er entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. La fecha indica el momento del trasplante de las plantas a una funda de 3 kg. .... 44

**Figura 18.** Correlación entre el diámetro del 1er entrenudo y la altura de las plantas de *Cajanus cajan* crecidas en S1 (A) o en S2 (B). \*, correlación significativa ( $p<0.01$ ). ..... 45

**Figura 19.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), y raíces (C) de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p<0.05$ ). ..... 46

**Figura 20.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2), con o sin fertilización NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p<0.05$ ). ..... 46

**Figura 21.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), etefon (T4), citoquininas (T5) y bentonita (T6). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p<0.05$ ). ..... 47

**Figura 22.** Correlación significativa ( $p<0.01$ ) entre el peso seco de la masa nodular en las raíces y el peso seco total de la masa aérea de plantas de *Cajanus cajan*. \*, correlación significativa ( $p<0.01$ ). ..... 48

## Resumen

Especies de Fabáceas tales como frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol caupí (*Vigna unguiculata*), frijol de palo (*Cajanus cajan*), haba (*Vicia faba*) y habichuela (*Phaseolus lunatus*), son parte integral de la dieta de los ecuatorianos, siendo ampliamente cultivadas en Ecuador. Sin embargo, es común la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados a estos cultivos, desconociendo las bondades de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN), así como sus efectos negativos sobre la efectividad de la FSN y el ambiente. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue cuantificar el desarrollo de estas cinco especies de leguminosas, crecidas en dos tipos de suelos con historial de exposición a radiaciones solares contrastantes. Los suelos se recolectaron bajo la sombra de árboles (S1), y en una zona sin cobertura vegetal (S2), con temperaturas máximas de 27°C en S1 y de 49°C en S2. Las plantas crecieron bajo fotoperiodo natural y temperaturas promedio de 28°C/24°C día/noche, en fundas de plástico conteniendo 1 kg de S1, S2 o S1+S2 (1/10 p/p). Los tratamientos consistieron en la enmienda de los suelos con 0.5% NPK, 1% P, 1.2% cal, 3.5 mM melaza, 1.5% bentonita, 4 mM Etefón, 5 µM B+Mo y 5 µM citoquininas. La cosecha de haba, habichuela, frijol caupí y frijol común se llevó a cabo al comienzo del período de floración, mientras que frijol de palo fue cosechado a los 3 meses después de la germinación. La ausencia de nódulos en las raíces de haba y habichuela, sugirió la inexistencia de rizobios compatibles en S1 y S2. Mientras que nódulos del tipo determinados se observaron en raíces de frijol caupí y frijol común en S1 y en S2+P, y del tipo indeterminado en frijol de palo en S1 y S2. Todos los nódulos tenían un color rojo en su interior indicando una activa FSN. En todas las plantas, la altura y el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo, las masas nodulares y aéreas, así como la relación vástago/raíz fueron mayores en  $S1 \geq S1+S2 > S2$ . La adición de B+Mo incrementó la nodulación y el desarrollo de frijol caupí, frijol común y frijol de palo en S1+S2. Por el contrario, la adición de NPK, cal, melaza, bentonita o citoquininas no promovió la nodulación ni el crecimiento de las plantas en S1+S2. El Etefón inhibió la germinación de frijol caupí y frijol común pero no de frijol de palo. Sin embargo, redujo al mínimo la nodulación en el frijol de palo en S1+S2. Los resultados obtenidos permiten concluir la existencia de rizobios nativos promisorios en S1, compatibles con frijol caupí,

frijol común y frijol de palo, considerados como cultivos esenciales para la seguridad nutricional en Ecuador.

*Palabras clave:* Rizobios nativos, fijación simbiótica de N<sub>2</sub>, enmiendas al suelo, relación vástago/raíz, temperatura del suelo.

### **Abstract**

Common bean (*Phaseolus vulgaris*), cowpea (*Vigna unguiculata*), pigeon pea (*Cajanus cajan*), broad bean (*Vicia faba*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*) (Fabaceae), are key components of the diet of the Ecuadorians, being widely cultivated in Ecuador. Nevertheless, high doses of nitrogen fertilizers are currently applied to grain legume crops in Ecuador, hindering the establishment of the symbiotic N<sub>2</sub> fixation (FSN). Therefore, the aim of this investigation was to determine the existence and effectiveness of rhizobial populations native to the San Placido parish, Province of Manabí, symbiotically compatibles with these 5 legume species. Soils were collected under the shade provided by the canopy of trees (S1), and at the side of a rural road, without ground cover vegetation (S2). Noon temperatures of 27°C and 49°C were recorded in S1 and S2, respectively. Plants were also grown in a mixture of S1 and S2 (S1+S2) (1/10 w/w). Assays were carried out in plants grown in plastic bags filled with 1 kg S1, S2 or S1+S2. Treatments included the amendment of soils with 0.5% NPK, 1% P, 1.2% lime, 3.5 mM molasse, 1.5% bentonita, 4 mM Etefón, 5 µM B+Mo, and 5 µM citoquininas. Except pigeon pea, all plants were harvested at the beginning of the flowering stage. Pigeon pea was harvested 3 months after germination. The lack of root nodulation in broad bean and lima bean suggested the absence of compatible rhizobial strains in S1 and S2. On the other hand, determinate type of root nodules were observed in cowpea and common bean in S1, S1+S2 and S2+TP. Whereas, indeterminate type of nodules occurred pigeon pea in S1, S2 and S1+S2. All nodules displayed an intense internal red color, pointing toward an effective FSN. For all plants, the height and 1<sup>st</sup> internode stem diameter, the dry weight of the aerial and nodule masses, as well as the shoot/root ratios were greater in S1≥S1+S2>S2. Concomitantly, the addition of P and B+Mo to S1+S2 increased the dry weight of the nodule and aerial masses, as well as the shoot/root ratio of cowpea, common bean and pigeon pea above values in non-amended S1+S2. In contrast, the addition of NPK, molasse, bentonite or cytokinins did not elicit any positive effects in these species in S1+S2.

Ethephon inhibited the germination of cowpea and common bean, as well as the nodulation in pigeon pea. In conclusion, S1 harbors an effective rhizobial population symbiotically compatible cowpea, pigeon pea and common bean, considered key crops for the food security in Ecuador.

*Key words:* Native rizobia, symbiotic N<sub>2</sub> fixation, shoot/root ratio, soil amendments, soil temperature.

## 1. Introducción

El nitrógeno (N) es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, por estar involucrado en todos los procesos metabólicos que regulan el crecimiento y la productividad de los cultivos (Izaguirre-Mayoral et al., 2018). A nivel mundial, las plantas cultivadas sufren severas deficiencias de N, aun cuando el N representa el 82% de los gases de la atmósfera como molécula N<sub>2</sub>. Sin embargo, el N<sub>2</sub> es inaccesible para todos los organismos vivos, con la excepción de las  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacterias que contienen los genes *Nif* que codifican la enzima nitrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión del N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>, biológicamente disponible (Jiang et al., 2021).

A través de un largo proceso evolutivo, aproximadamente 19.300 especies de las subfamilias Faboideae, Caesalpinioideae y Mimosoideae desarrollaron la habilidad de establecer simbiosis con  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacterias de los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* y *Rhizobium* (Sprent et al., (2017), y así acceder al N<sub>2</sub> atmosférico.

Mediante esta simbiosis, especies tales como *Cajanus cajan* L. Millsp., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., y *Vigna unguiculata* L. Walp., pueden fijar entre un 80 a 90% del N requerido para su crecimiento (Izaguirre-Mayoral et al., 2018a), a cambio de fotosintatos, en un proceso denominado fijación simbiótica del N<sub>2</sub> (FSN). El 10 o 20% del N restante lo obtienen las leguminosas a partir de la asociación con bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento (PGPB), fijadoras del N<sub>2</sub> (Sabkia et al., 2021).

La FSN, además, les confiere a las leguminosas de grano la habilidad de colonizar suelos muy pobres en N, donando aproximadamente 50–70 Tg a los sistemas agrícolas, contribuyendo al desarrollo sostenible de agroecosistemas y disminuyendo la huella del N

(Sarpong et al., 2020). Actualmente, la FSN es la alternativa más viable y rentable a la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados causantes de la eutrofización de lagos y reservorios de agua y fuente de gases invernaderos responsables del calentamiento global (Shi et al., 2021).

Por otra parte, las leguminosas de grano constituyen el 27% de los cultivos mundiales, con la mayor parte de la producción siendo aportada por agricultores de bajos recursos (Muthini et al., 2020). Las leguminosas de grano son la base de la seguridad nutricional de los pueblos debido a sus altos contenidos de proteínas, microelementos incluyendo hierro (Fe), zinc (Zn) y fósforo (P), tiaminas y vitaminas, que son vitales tanto para la nutrición de los humanos como de los animales (Costa et al., 2021).

En Ecuador, las leguminosas de grano son parte integral de la dieta diaria de la población siendo cultivadas desde la costa hasta las zonas altas de los Andes. Sin embargo, una revisión exhaustiva de la literatura reveló escasas investigaciones llevadas a cabo en Ecuador sobre aislamientos de rizobios nativos. Los únicos estudios realizados en el área de la rizobiología en Ecuador demostraron la nodulación de *P. vulgaris* por: (a) cepas de *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli* y *R. etli*, incluyendo las especies *R. ecuadorensis*, aislados en las zonas andinas (Ribeiro et al., 2015), y (b) cepas de *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. mesoamericanum* y *R. undicola* aisladas a altitudes comprendidas entre los 1.078 y los 1.680 m.s.n.m., en la zona de Loja (Torres et al., 2017).

Por otra parte, son muy pocos los trabajos publicados sobre los beneficios de la FSN en leguminosas de grano de interés comercial en Ecuador (López et al., 2021), indicando el desconocimiento que prevalece sobre las ventajas de promover la FSN como fuente de N sustentable en la agricultura ecuatoriana. No es entonces sorprendente que, hasta el presente, los cultivos comerciales de leguminosas en Ecuador son fertilizados con fertilizantes químicos nitrogenados (Coque Calvache, 2021; Riofrio Acosta, 2021). Peor aún, ignorando los efectos deletéreos de los fertilizantes químicos nitrogenados sobre las PGPB del suelo (Reid et al., 2021), y las tasas de FSN (Gautrat et al., 2021).

Es importante notar que la efectividad de la FSN en leguminosas de grano, como sustituta de los fertilizantes químicos nitrogenados, va a depender del tamaño de las poblaciones nativas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacterias en los suelos ecuatorianos. En general, la

microbiota rizosférica está directamente modulada por las propiedades fisicoquímicas y temperaturas del suelo, principalmente en los horizontes edáficos más superficiales (Xu et al., 2018).

Basado en la información descrita anteriormente, se diseñó un proyecto de titulación con la finalidad de analizar el desarrollo de cinco especies de leguminosas de grano crecidas en dos suelos con historial de exposición a radiación solar contrastantes, así como la capacidad de los rizobios nativos de establecer simbiosis con estas especies. El estudio también involucró la respuesta de leguminosas de granos, en simbiosis con rizobios, a la aplicación de distintas enmiendas al suelo.

El diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y altura de las plantas, así como el peso seco de la parte aérea, radicular y nodular fueron los indicadores utilizados para la cuantificación del efecto de los distintos tratamientos en el desarrollo de las plantas. La relación vástago/raíz se consideró, igualmente, como un indicador de la disponibilidad de nutrientes en los suelos bajo estudio (Ordóñez et al., 2021; Furuya et al., (2022).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

- Cuantificar el desarrollo de plantas de haba (*Vicia faba* L.), habichuela (*Phaseolus lunatus* L.), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), frijol caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) y frijol de palo (*Cajanus Cajan* L. Millsp.), crecidas en dos tipos de suelos con historial de exposición a radiaciones solares contrastantes.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la germinación, nodulación, fenotipo de los nódulos y la distribución de la masa nodular en el sistema radical de las plantas de las cinco especies de leguminosas.

- Evaluar el efecto de macro y micronutrientes, así como de hormonas vegetales sobre el desarrollo y nodulación de *V. faba*, *P. lunatus*, *C. cajan*, *V. unguiculata* y *P. vulgaris*.
- Evaluar el efecto de la melaza como enriquecedora del carbono del suelo sobre el desarrollo y nodulación de *V. faba*, *P. lunatus*, *C. cajan*, *V. unguiculata* y *P. vulgaris*.

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)

En especies de Fabaceae, la FSN se lleva a cabo en unas estructuras especializadas denominadas nódulos, las cuales albergan los rizobios fijadores de  $N_2$ , y que se comunican con la raíz mediante haces vasculares. El establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y las raíces de leguminosas se puede resumir en 4 pasos (Baral et al., 2016): (i) la activación de los genes *Nod* en los rizobios de vida libre inducida por los flavonoides e isoflavonoides secretados por las raíces; (ii) la inducción de una activa división celular en las raíces para la morfogénesis de los nódulos, por los factores *Nod* secretados por los rizobios; (iii) la adhesión de los rizobios de vida libre a los pelos radicales, la formación del canal de infección y la colonización de los rizobios a las células de la raíz en rápida división; y, (iv) la diferenciación de los rizobios en bacteroides y la expresión simultánea de los genes *Nif* que codifican a la enzima nitrogenasa, siendo el molibdeno (Mo) y el Fe los cofactores enzimáticos. El  $NH_3$  resultante de la actividad de la nitrogenasa es posteriormente transformado en alantoína y ácido alantoico, denominados ureidos, que son translocados por la xilema a la parte aérea de la planta para su nutrición nitrogenada (Izaguirre-Mayoral et al., 2018b).

El cultivo de leguminosas de grano en simbiosis con rizobios es una alternativa económica y sostenible para afrontar la demanda nutricional asociada al incremento poblacional, en una forma más sostenible y económica que los cultivos tradicionales. Entre los beneficios del cultivo de leguminosas fijadoras del  $N_2$  se señala: (a) la eliminación del uso de fertilizantes químicos nitrogenados, con la consecuente mitigación de emisiones de

gases de efecto invernadero, y (b) el incremento de la materia orgánica del suelo, así como de la actividad sumidero de CO<sub>2</sub> de la microbiota edáfica (Hu et al., 2021).

Cabe destacar que la efectividad de la FSN depende de la eficiencia simbiótica de los rizobios nodulantes y de las tasas fotosintéticas de las plantas (Baral et al., 2016). Por lo tanto, la actividad de la FSN es susceptible a cualquier estrés abiótico que afecte tanto a la biología del suelo como a la fisiología de las plantas (Zhang et al., 2020).

Por otra parte, las leguminosas juegan un papel primordial en los sistemas agrícolas como abono verde, por sus altos contenidos de N en los tejidos, el cual es incorporado al suelo mejorando la fertilidad y calidad nutricional de los suelos agrícolas (Saldaña, 2017).

### **3.2. Leguminosas de grano de interés comercial en Ecuador**

En el Ecuador, las leguminosas son componentes importantes de los sistemas de producción, al ser cultivadas en asociación, como monocultivos o en rotación con otros cultivos importantes para la seguridad alimentaria de los ecuatorianos (Martínez Gaibor et al., 2021). Los cultivos de fabáceas en Ecuador se encuentran concentrados en la siembra de *P. vulgaris*, según datos de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2017).

Según datos del Sistema de información pública agropecuaria del Ecuador en el 2020 la siembra comercial de leguminosa de grano alcanzó las 22.040 hectáreas, con una producción de 45.036 TM de granos.

#### **3.2.1. Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**

El frijol común (Tribu: Phaseoleae), es una de las leguminosas más importantes en el mundo, figurando entre los primeros productos alimenticios cultivados por el hombre. Su centro de origen y domesticación incluye la región andina de Sudamérica y Mesoamérica (Tamayo, 2018). Este cultivo actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta alimenticia, especialmente en Centroamérica y Sudamérica (Hernández, 2018).

El frijol común se cultiva principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Boukar et al., 2013; Smýkal et al., 2015), por su tolerancia a la sequía, sus altas tasas de FSN (Goncalves et al., 2016), altos contenidos de proteínas, calorías, minerales y vitaminas (Menssen et al., 2017), y uso como abono verde enriquecido en N (Maris et al., 2021).

La importancia del frijol común en el Ecuador radica en que es uno de los alimentos predilectos de la población. Según el INEC (2019), el frijol común se cultiva aproximadamente en 16.367 ha, siendo una importante fuente de ingreso para pequeños y medianos agricultores. Detalles del cultivo de frijol común en Ecuador en cuanto a las áreas de siembra, taxonomía, variedades, germinación, la anatomía de la planta y su ciclo reproductivo, así como las propiedades nutritivas de los granos fueron descritos en detalle por Nivicela Lizaldes (2021). Específicamente para esta investigación se escogió la variedad con semillas de color negro, introducida recientemente al mercado nacional con fines de exportación.

En general, el frijol común se considera una especie promiscua que establece asociaciones simbióticas con: (a) bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*E. meliloti*, *E. fredii*, *E. medicae*, *E. americanum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium aethiopicum*, *R. acidisoli*, *R. anhuiense*, *R. azibense*, *R. ecuadoreense*, *R. esperanzae*, *R. etli*, *R. freirei*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hidalgonense*, *R. leguminosarum*, *R. leucaenae*, *R. lusitanum*, *R. mesoamericanum*, *R. mongolense*, *R. paranaense*, *R. phaseoli*, *R. sophorae*, *R. sophoriradicis*, *R. tibeticum*, *R. tropici* y *R. vallis*, formando nódulos en sus raíces en donde se lleva a cabo la FSN (Efstathiadou et al., 2021). Es generalmente aceptado que las variedades disponibles comercialmente no despliegan altas tasas de FSN (Chekanai et al., 2018), muy probablemente por haber sido seleccionadas en base la adición de fertilizantes químicos nitrogenados.

### **3.2.2. Frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**

El frijol caupí (Tribu: Phaseoleae) es una de las leguminosas más ampliamente cultivadas en regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Centro y Sur América. El frijol caupí es apreciado por su resistencia a la sequía, altas temperaturas, valor nutritivo y altas tasas de FSN (Ayalew et al., 2021).

El frijol caupí es sembrado en Ecuador como cultivo tradicional para su comercialización y consumo local (Gómez et al., 2013), siendo considerado como un excelente abono verde y forraje para el ganado, con lo cual contribuye a la economía local, así como a la protección y conservación del suelo.

Según los datos del Banco Central del Ecuador (2019), durante el tercer trimestre de 2019 la superficie cosechada y el volumen de producción del frijol caupí experimentaron un decrecimiento de 4% en su producción, como consecuencia de los factores climáticos adversos y del descenso en los precios a nivel de los mercados nacionales. A pesar de todas sus bondades nutricionales, el frijol caupí se siembra actualmente solo en un 0.12% del área agrícola nacional (INEC, 2017).

Mundialmente, el frijol caupí se considera un cultivo de alta rentabilidad gracias a su habilidad de llevar a cabo altas tasas de FSN (Adegbite et al., 2021), al establecer asociaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Ensifer* (Simbine et al., 2021). Sin embargo, en Ecuador el frijol caupí se cultiva con altas dosis de fertilización química nitrogenada, debido a la falta de conocimiento de los beneficios de la FSN (Alejandro, 2017).

### **3.2.3. Frijol de palo (*Cajanus cajan* L.)**

El frijol de palo (Tribu: Phaseoleae; Subtribu Cajaninae) es originario de la India y se encuentra entre las ocho leguminosas más cultivadas en el mundo. Es un arbusto que puede alcanzar los 3 mts de altura, con un ciclo de cultivo generalmente perenne, siendo considerado como tolerante a la sequía y a suelos pobres en nutrientes (López et al., 2021). Esta especie tiene un gran valor nutritivo por sus altos contenidos de proteínas (16-22%) en las semillas, además de la buena digestibilidad de la materia seca y su habilidad de establecer simbiosis con rizobios del suelo fijadores de N<sub>2</sub> (López et al., 2018).

En condiciones de campo, el frijol de palo establece simbiosis muy efectivas con distintas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Ensifer* (Araujo et al., 2020; Jorin et al., 2021), siendo esta simbiosis altamente susceptible a la fertilización con fertilizantes nitrogenados (Lopez et al., 2015).

#### **3.2.4. Haba (*Vicia faba* L.)**

El haba (Tribu: Viciae), es una planta de tallo grueso y recto, con un follaje verde grisáceo que produce semillas ricas en proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos (Sileshi et al., 2022). El haba también se emplea en la alimentación de animales (Duc et al., 2015), siendo sembrada en Ecuador en aproximadamente 4.664 ha (INEC, 2018). Este cultivo es de gran importancia económica para el pequeño y mediano agricultor, además es uno de los principales alimentos incorporados en la canasta alimentaria diaria, por su alto contenido nutricional.

Las habas tienen la capacidad de llevar a cabo la FSN en simbiosis muy efectivas con *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* (Allito et al., 2021; Karkanis et al., 2018; Khazaei & Vandenberg, 2020), incluso bajo condiciones de salinidad de los suelos (Boulbaba et al., 2020). Por esta razón, las habas se emplean en sistemas de rotación para recuperar los niveles de N en suelos agotados (Maluk et al., 2022).

#### **3.2.5. Habichuela (*Phaseolus lunatus* L.)**

La habichuela, también conocida como frijol lima, haba pallar o frijol mantequilla (Tribu: Phaseoleae), es uno de los cinco taxa domesticados del género *Phaseolus*, y es la segunda especie de mayor distribución, superficie cultivada y consumo en el mundo (López et al., 2016). Siembras de habichuela se encuentran en áreas tropicales y subtropicales de América, así como en algunas regiones de Europa, Asia y África. Como toda leguminosa, constituye una rica fuente de proteínas, carbohidratos, hierro, calcio, fibra, y se distingue por tener bajo contenido de grasas (Martínez Castillo, 2015).

Esta leguminosa se cultiva principalmente para el consumo de sus granos ya sean secos o verdes, ambos ricos en proteínas, fibra, carbohidratos, antioxidantes y minerales (Rodríguez et al., 2019). En Ecuador, las siembras de habichuela están circunscritas a la Costa, específicamente en la provincia de Manabí, y a los valles interandinos a una altitud entre 1.000 y 2.500 msnm (Tamayo, 2018).

Las habichuelas pueden establecer asociaciones simbióticas altamente eficientes con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (*B. elkanii* y *B. japonicum*) (Chibeba et al., 2020). En Perú, las

habichuelas son principalmente noduladas por *Bradyrhizobium paxllaeri* (Ormeño et al., 2017).

### **3.3. Macro y Micronutrientes**

#### **3.3.1. Nitrógeno (N)**

El N es el macronutriente esencial para todos los procesos metabólicos que regulan el crecimiento de las plantas, y es el principal nutriente limitante para la mayoría de las especies cultivadas. En la naturaleza, la deficiencia de N puede ser contrarrestada por las actividades de  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacterias fijadoras del  $N_2$  en la rizosfera de las plantas. En el caso de las leguminosas, la FSN suministra hasta un 98% de los requerimientos de N de las plantas (Izaguirre-Mayoral et al., 2018b).

Sin embargo, los beneficios de la simbiosis rizobios-leguminosas se ven significativamente disminuidos cuando los cultivos son fertilizados con FN. Esto se debe a que las leguminosas expresan un conjunto de factores de transcripción, asociados al establecimiento de la simbiosis en las raíces, que son regulados por los niveles de N en el suelo (Schwember et al., 2019).

#### **3.3.2. Fósforo (P)**

El P es el segundo nutriente esencial para el desarrollo de las plantas, al estar involucrado en la mayoría de pasos metabólicos en mitocondrias y cloroplastos. En los suelos agrícolas, el P se encuentra en formas químicas que no pueden ser absorbidas por las plantas, causando severos síntomas de deficiencia que afectan la productividad de los cultivos (Corrales et al., 2014).

Las leguminosas noduladas tienen mayores requerimientos de P que los pastos (Ma & Chen, 2021), debido a que los nódulos son importantes sumideros de P necesario para sustentar el metabolismo de los bacteroides y la actividad de la enzima nitrogenasa (Lara et al., 2019). Numerosos estudios publicados demuestran que la aplicación de P a los suelos agrícolas incrementa las tasas de FSN en leguminosas de grano, aumentando los rendimientos en materia seca y de granos (Hasan et al., 2021).

### 3.3.3. Calcio (Ca)

El Ca es esencial para la activación del complejo de receptores LysM-quinases que perciben los factores Nod excretados por los rizobios en vida libre y que a su vez dan inicio a la simbiosis (Cooke & Charpentier, 2019). El Ca es también necesario para neutralizar el pH de los suelos ácidos que afectan negativamente la eficiencia de FSN (Tabares da Rosa, 2019).

En paralelo, la aplicación de Ca a leguminosas en simbiosis con rizobios aumenta la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo y la capacidad de osmoregulación de las plantas en condiciones de estrés abiótico (Ma et al., 2020). Por otra parte, tanto la deficiencia como el exceso de Ca alteran la magnitud de las oscilaciones de este catión en las células de la raíz, afectando negativamente la organogénesis de los nódulos (Krylova et al., 2021).

### 3.3.4. Boro (B)

El B se encuentra entre los nutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos, incrementando las propiedades nutricionales de los cultivos forrajeros. Sin embargo, a niveles altos puede ser tóxico y afectar negativamente el crecimiento de las plantas y la calidad del forraje (Taherian et al., 2019).

El B es un componente estructural de la pared celular, estando su deficiencia asociada a un efecto cascada que afecta la elongación celular, el transporte y metabolismo de azúcares, la síntesis de fenoles y de hormonas, el metabolismo de ARN, la respiración y la fotosíntesis (Moreno et al., 2016; Verma et al., 2019; Mohamad & Mohammed, 2020; Adissie et al., 2020). Se sabe que tanto las deficiencias como los niveles tóxicos de B afectan negativamente la FSN (Fátima et al., 2021).

### 3.3.5. Molibdeno (Mo)

El Mo existe en el suelo principalmente como sales de molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{HMoO}_4^-$ , y  $\text{MoS}_2$ ), y su función en la planta radica en servir de cofactor de las enzimas nitrato reductasa, clave en la asimilación del nitrato (Perli et al., 2021), y nitrogenasa, clave para la FSN en las bacterias fijadoras del  $\text{N}_2$  (Buscagan et al., 2021).

### 3.4. Enmiendas orgánicas del suelo

#### 3.4.1. Melaza

La melaza, al ser un desecho de la caña de azúcar, contiene azúcares, proteínas, grasas, y micronutrientes, cumpliendo funciones de fertilizante orgánico (Delgado, 2017; Bagheri et al., 2021). La melaza se caracteriza por incrementar la alta relación C/N de suelos agrícolas, favoreciendo la replicación y actividades biológicas de la microbiota, especialmente de bacterias involucradas en el ciclo del N (Eom & Kim 2018; Pyakurel et al., 2019). En Ecuador, sin embargo, la melaza no está en la lista de los fertilizantes orgánicos más utilizados en la agricultura,

#### 3.4.2. Bentonita

En Ecuador, esta arcilla se obtiene en yacimientos o minas en la superficie de la tierra, ya que proviene de antiguos residuos de arena volcánica, lo cual la hace muy valiosa en el área industrial y agrícola (Canchingre & Salcedo, 2018). En la agricultura, la bentonita pulverizada se usa como enmienda a los suelos agrícolas con el fin de mejorar: (a) las propiedades físicas de suelos arenosos o ácidos (Carrión, 2016), (b) la actividad de la microbiota, (c) los contenidos de materia orgánica y (d) la disponibilidad de nutrientes, todo atribuido a la mayor retención de agua en los horizontes edáficos superiores (Mi et al., 2021). El rango de porcentaje de nutrientes de la bentonita se indica en la Tabla 1 (Rodríguez et al., 2009).

**Tabla 1.** Rango (%) del contenido de Si, Al, Fe, Mg, Ca, K, y Na, así como el % de humedad de la Bentonita.

SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
47,9-51,2	20,0-27,1	0,2-1,4	2,1-6,6	1,0-3,7	0,2-0,6	0,3-0,8	17,1-23,7

(Fuente, Rodríguez et al., 2009).

### 3.5. Fitohormonas

Las fitohormonas son una pieza clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas, con características químicas que han permitido desarrollar insumos para la agricultura,

mejorando de esta forma los rendimientos de los cultivos (Borja et al., 2020). A continuación, se describen las funciones y bondades del Etefón y de las citoquininas.

### **3.5.1. Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico)**

El Etefón, como precursor de la síntesis del etileno en las plantas (Lee et al., 2021), está directamente relacionado con el crecimiento radical, germinación de semillas (Martínez, 2017), abscisión de órganos senescentes, maduración y desarrollo de los frutos, y la activación de la respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos (Chávez et al., 2012).

Este producto, de uso comercial en la agricultura, promueve la germinación de semillas de soya, aumentado el vigor de las plántulas y la tolerancia a diversos estreses abióticos (Manoharlal & Saiprasad, 2019). Sin embargo, el etileno es un potente inhibidor de la organogénesis de los nódulos, afectando negativamente la masa nodular de leguminosas fijadoras del N<sub>2</sub> (McGuinness et al., 2021).

### **3.5.2. Citoquininas**

Son fitohormonas que participan en la división celular y son sintetizadas en los tejidos meristemáticos de pelos radiculares promoviendo la formación de raíces laterales, y estimulando a la vez la formación de nuevos brotes o follaje (Li et al., 2021).

En el contexto de la FSN en leguminosas, las citoquininas son requeridas durante los estadios tempranos de la simbiosis para la correcta organogénesis de los nódulos, influenciando el tamaño de la masa nodular en las raíces (Jarzyniak et al., 2021).

## **4. Metodología**

### **4.1. Diseño experimental y material vegetal**

Los ensayos se llevaron a cabo en el sector San Lorenzo de la parroquia San Plácido, Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí, a 77 m.s.n.m, coordenadas X: 583243, Y: 9882780. Los ensayos fueron realizados durante los meses de marzo a noviembre 2021, con temperaturas promedio de 28°C/24°C día/noche (AccuWeather, 2021 <https://www.accuweather.com>).

Los suelos utilizados en esta investigación fueron recolectados hasta una profundidad de 30 cm, luego de remover la hojarasca y restos de plantas, en: (a) una zona bajo una densa cobertura vegetal provista por árboles de limón, mamey y cacao (S1), y (b) en el borde de una carretera rural no asfaltada y sin ninguna cobertura vegetal, expuesto a la radiación solar (S2). Ninguno de los dos suelos ha sido fertilizado por lo menos en una década. La combinación de S1 y S2 (S1+S2) fue también utilizada para el crecimiento de las plantas. Para ello se mezcló, hasta total uniformidad, S1 y S2 en una proporción de 1/10 (p/p).

La temperatura promedio de los suelos fue determinada entre los 10 a 20 cm de profundidad con un termómetro digital, en días de máxima exposición solar, según datos diarios meteorológicos publicados. Las propiedades fisicoquímicas de los suelos se determinaron en la Estación Experimental de Pichilingue del INIAP.

La unidad experimental estuvo conformada por cinco especies de leguminosas: Haba (*Vicia faba*), habichuela (*Phaseolus lunatus*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol caupí (*Vigna unguiculata*) y frijol de palo (*Cajanus cajan*), con repeticiones de 10 plantas de cada especie (n=10) por tratamiento. El desarrollo de este trabajo de titulación ocurrió durante la pandemia del virus SARS-CoV-2 (COVID-19) (febrero – diciembre, 2021), lo cual obligó a adaptar el diseño experimental a las regulaciones de movilidad humana impuestos por el Gobierno del Ecuador, para esas fechas.

A tal efecto, las unidades experimentales fueron localizadas en filas, separadas entre sí por 30 cm entre líneas y por 5 cm entre plantas en un área de 30 m<sup>2</sup>, situada en el solar de la casa de los padres del estudiante J.F. Vélez Delgado (Anexo 1). El área experimental estuvo expuesta a los foto y termoperíodos naturales de esta zona geográfica, de manera uniforme en toda su extensión. Las características de uniformidad ambiental del área experimental descritas anteriormente, unido al hecho de que cada repetición estaba individualmente confinada a una funda, justifican la no implementación de un diseño de bloques al azar.

Para la siembra, las semillas de cada especie fueron pre-esterilizadas por 5 minutos en solución 5% de cloro comercial y fueron sembradas en número de tres semillas por funda. Las fundas de plástico color negro, con orificios laterales en la sección inferior, fueron

rellenadas con 1 kg de suelo colectado en cada sitio. Las plántulas fueron raleadas una por funda cuando tuvieron las hojas primarias totalmente expandidas.

#### **4.2. Características generales del ensayo:**

Número de tratamientos: 12

Número total de unidades experimentales: 60

Número de repeticiones: 10 por unidad experimental

#### **4.3. Determinación de los parámetros de germinación y crecimiento de las plantas.**

La germinación de 50 semillas por especie fue determinada por triplicado en bandejas de plástico rellenas con 5 cm<sup>3</sup> de S1 o S2, mantenidos húmedos mediante riego diario hasta 7 días después de la siembra. Los resultados de este ensayo se expresan como el porcentaje (%) de semillas germinadas en cada suelo.

A partir de la germinación, y en intervalos de 7 días, se procedió a determinar en cada planta: (a) el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo con un calibrador Vernier digital y (b) el largo total del tallo con una cinta métrica (Anexo 2). Plantas de haba, habichuela, frijol común y frijol caupí, fueron cosechadas al comienzo de la floración. Por las características arbustivas del frijol de palo, las plantas fueron trasplantadas a fundas de 3 kg a la 4<sup>ta</sup> semana y cosechadas a los 3 meses después de la germinación, sin haber alcanzado el estadio de floración.

Cada planta fue dividida en hojas, tallos, raíz y nódulos. Las raíces fueron lavadas removiendo cuidadosamente el suelo adherido para observar y colectar los nódulos, si fuese el caso. Cada compartimiento de la planta fue individualmente colocado en fundas de papel debidamente identificadas.

El secado de los compartimientos de las plantas se llevó a cabo en un horno de gas precalentado a 100°C por 10 minutos, seguido de la exposición al sol, hasta peso constante. Para esto último, las fundas de papel se colocaron en un cobertizo amplio y abierto por los lados para permitir el paso de la luz solar y la circulación del aire. El peso seco de las hojas, tallos, raíces y nódulos se determinó en una balanza analítica, en el Laboratorio de Investigación de la UTM. La suma de las masas secas de hojas y de tallos se usó para el cálculo de la relación vástago/raíz y la correlación entre la masa aérea total y nodular.

Los datos obtenidos de cada parámetro determinado en esta investigación fueron graficados con el programa GraphPad Prism 8.0, el cual también se usó para calcular la media estadística, la varianza (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ) y las correlaciones entre algunos de los parámetros determinados.

#### **4.4. Descripción de los tratamientos:**

##### **4.4.1. Composición química de las enmiendas**

N:P:K (18:9:20).

Triple fosfato (TP) (Marca comercial Yoorin): 17.5%  $P_2O_5$ , 18.5% Ca, 10% Si, 7% Mg, 0.1% B, 0.55% Zn, 0.3% Mn y 0.05% Cu.

Cal agrícola: 90%  $CaCO_3$

Boro-Molibdeno (B+Mo) (Marca comercial Microcat): 2.88% B, 1.92% Mo, 4.48% N, 6%  $P_2O_5$ , 1.44%  $K_2O$  y 2% aminoácidos libres.

Melaza agrícola: 83.64% sacarosa, 14.83% cenizas sulfatadas, densidad 1.43 g/ml.

Citoquininas: (Marca comercial Cytokin) 0.015% Citoquininass, 6.34%  $K_2O$ .

Etefón (2-chloroetilfosfonico): (Marca comercial EPIK) 720 g/L.

##### **4.4.2. Tratamientos**

- 0.5% N:P:K (p/p).
- 1.2% TP (p/p).
- 12% cal agrícola (p/p).
- 15% bentonita (p/p)
- 3.5 mM de melaza.
- 5  $\mu$ M B+Mo.
- 5  $\mu$ M citoquininas.
- 4 mM Etefón.

Las enmiendas NPK, TP, melaza, cal, y bentonita, se aplicaron premezcladas con S1, S2 o S1+S2, antes de la siembra de las semillas. Mientras que los tratamientos con B+Mo, citoquininas y Etefón se aplicaron al momento de la siembra. Para esto se añadieron 30 ml de cada una de las soluciones al horizonte superficial del suelo de cada funda, con una

inyectora desechable de 50 ml, procediendo inmediatamente a la siembra de las semillas de cada especie.

En el caso de haba, habichuela, frijol común y frijol caupí, todas las enmiendas al suelo se aplicaron una sola vez. En el caso de frijol de palo, los tratamientos se repitieron cuando se procedió a trasplantar las plantas a fundas de mayor tamaño. Plantas de las 5 especies y crecidas en S1, S2 o S1+S2 sin ninguna enmienda, sirvieron de control.

## 5. Resultados

### 5.1. Temperaturas y fisicoquímica de los suelos

La temperatura promedio de los suelos fue de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en S1 y de  $48 \pm 1^\circ\text{C}$  en S2. El S1 es un suelo franco arenoso, pH 6.7, y con 2.3 veces más materia orgánica, así como mayores contenidos de K, Zn, y Fe y B que el S2 (Tabla 3). Por el contrario, S2 es un suelo con 82% de arena, con contenido de S, Cu y Mn superiores al S1, y pH 8.1. Según la información suministrada por el INIAP, se considera que tanto el S1 como el S2 tienen contenidos altos de P y Fe, pero bajos de  $\text{NH}_4$ .

**Tabla 2.** Resultados del análisis físico-químico del suelo S1 recolectado bajo sombra y del S2 recolectado en una zona expuesta a la radiación solar.

Resultados de los análisis del suelo realizados en la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP												
SUELO	pH	ppm		meq/100ml			ppm					
		$\text{NH}_4$	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	Fe	Mn	B
S1	6,7 <b>PN</b>	15 <b>B</b>	60 <b>A</b>	0,28 <b>M</b>	11	1,0 <b>M</b>	4 <b>B</b>	18 <b>M</b>	1,8 <b>M</b>	129 <b>A</b>	10,6 <b>M</b>	0,55 <b>M</b>
S2	8,1 <b>Me</b> <b>Al</b>	16 <b>B</b>	77 <b>A</b>	0,21 <b>M</b>	11	1,0 <b>M</b>	18 <b>M</b>	3,3 <b>M</b>	2,8 <b>M</b>	76 <b>A</b>	17,8 <b>A</b>	09,28 <b>B</b>

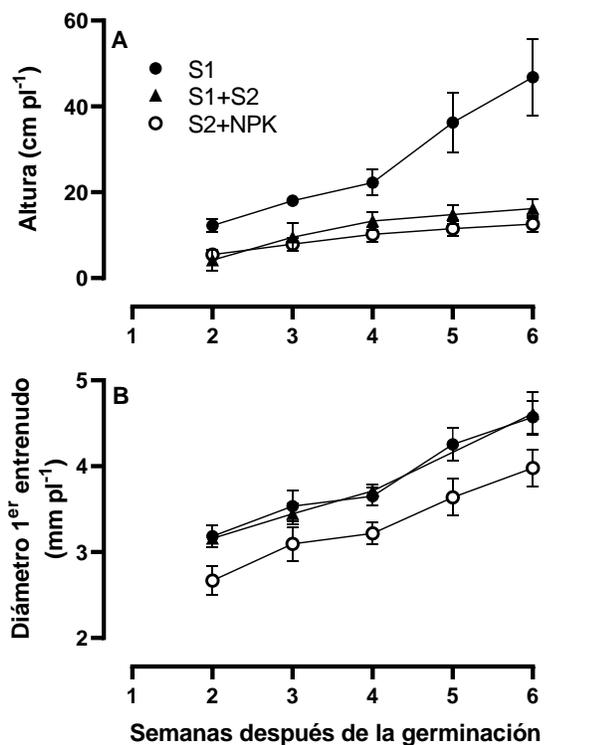
  

SUELO	% M.O	Relación de intercambio cationico			Textura %			Clase textural
		Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	Arena	Limo	Arcilla	
S1	2,1	11	3,57	42,86	70	22	8	F. arenoso
S2	0,9	11	4,76	57,14	82	16	2	Arena franca

## 5.2. Habas (*Vicia faba*)

La germinación de las habas fue de un 98 % en S1, mientras que ninguna semilla germinó en el S2. Mientras que la adición de NPK promovió en un 50% la germinación de las semillas en S2. Todas las plantas crecidas en S1, S1+S2 y S2+NPK comenzaron el período de floración a las 6<sup>ta</sup> semana luego de la germinación.

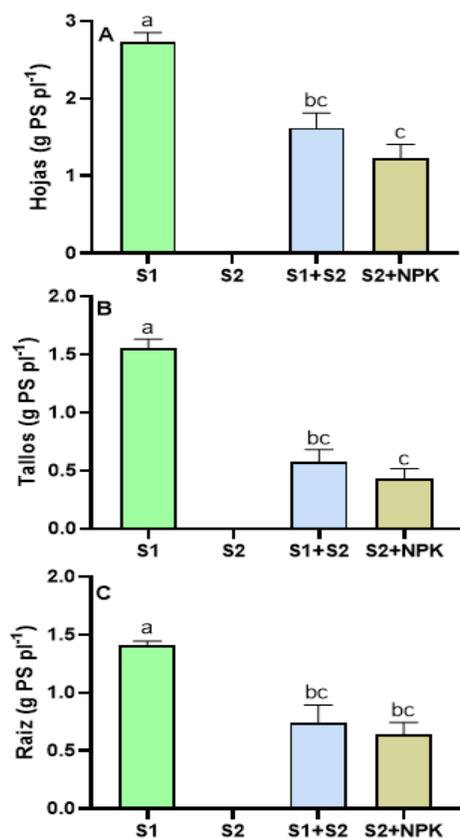
A lo largo del crecimiento, las plantas crecidas en S1 mostraron las mayores alturas, en comparación con los valores de las plantas crecidas en S1+S2 y S2+NPK (Fig. 1A). Mientras que el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo fue similar entre las plantas crecidas en S1 y S1+S2, con el valor más bajo detectado en las plantas crecidas en S2+NPK (Fig. 1B).



**Figura 1.** Altura (A) y diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo (B) a lo largo del crecimiento de plantas de *Vicia faba* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) fertilización

con NPK y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística.

Al momento de la cosecha, la mayor masa seca de hojas (Fig. 2A), tallos (Fig. 2B) y raíces (Fig. 2C) fue determinada en las plantas crecidas en S1, con los valores más bajos mostrados por las plantas crecidas en S2+NPK (Anexo 3).

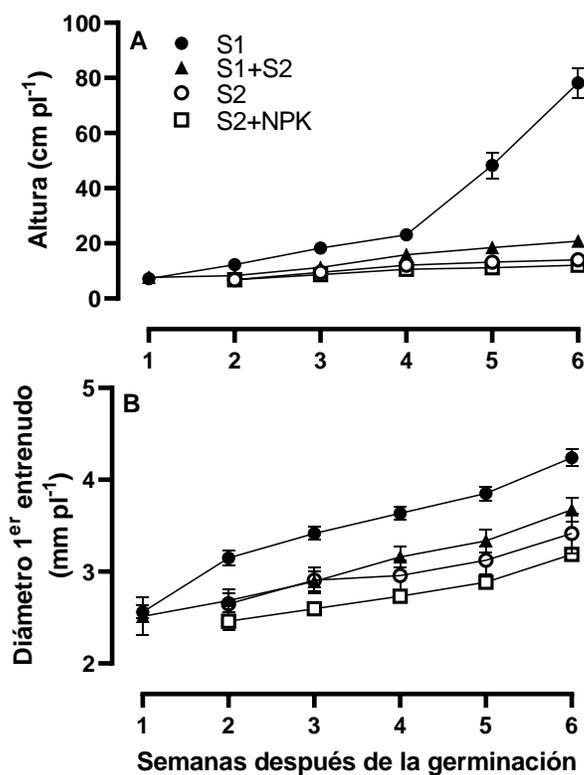


**Figura 2.** Peso seco de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de plantas de *Vicia faba* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2), con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

Ninguna de las plantas formó nódulos en sus raíces, por lo cual esta especie fue descartada de los siguientes ensayos.

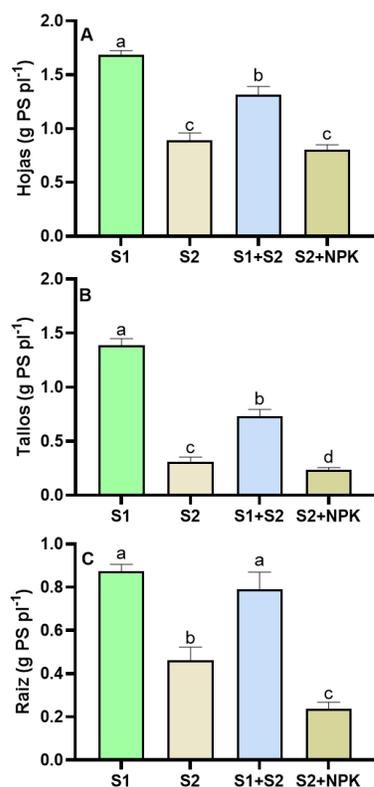
### 5.3. Habichuela (*Phaseolus lunatus*)

La germinación de esta especie alcanzó un 96 % en S1 y un 98 % en S2, siendo la diferencia entre S1 y S2 no estadísticamente significativa. Todas las plántulas germinadas en S1, S2, S1+S2 y S2+NPK alcanzaron el estadio de floración a la 6ta semana luego de la germinación. Durante todo el período de desarrollo, las plantas crecidas en S1 mostraron la mayor altura (Fig. 3A) y el mayor diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo (Fig. 3B), con los valores más bajos registrados en las plantas crecidas en S2 y S2+NPK.



**Figura 3.** Altura (A) y diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo (B) a lo largo del crecimiento de plantas de *Phaseolus lunatus* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística.

Al momento de la cosecha, el peso seco de las hojas (Fig. 4A) y tallos (Fig. 4B) fue en el orden de  $S1 \geq S1+S2 > S2 = S2+NPK$ . Mientras que el peso seco de las raíces fue similar en las plantas crecidas en S1 y S1+S2, con el menor valor registrado en las plantas crecidas en S2+NPK (Fig. 4C) (Anexo 4).



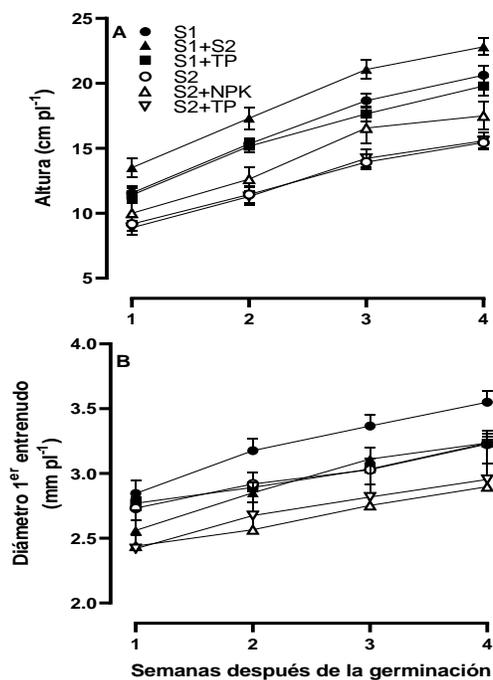
**Figura 4.** Peso seco de las hojas (A.), tallos (B) y raíces (C) de plantas de *Phaseolus lunatus* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2), con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

La ausencia total de nódulos en las raíces de las plantas crecidas en S1 y S2, con o sin fertilización, fue la razón para descartar a esta especie de los ensayos posteriores.

#### 5.4. Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

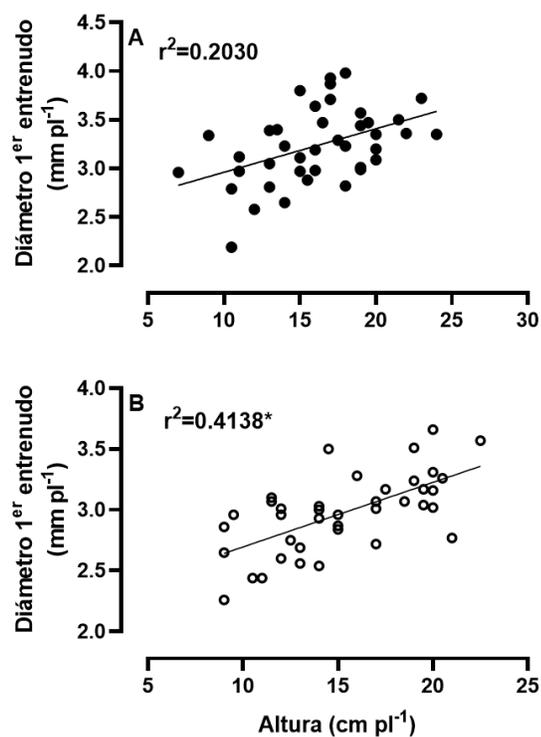
Las semillas de frijol común germinaron un 93 % en S1 y un 94 % en S2, siendo la diferencia estadísticamente no significativa. Por otra parte, el tratamiento con Etefón resultó en la inhibición de la germinación de las semillas tanto en S1 como en S2.

Todas las plantas crecidas en S1+S2 mostraron las mayores alturas desde el inicio de su desarrollo. La comparación del crecimiento entre los tratamientos indicó la altura alcanzada por las plantas crecidas en  $S1+S2 > S1 > S1+TP > S2+NPK > S2$  y  $S2+TP$  (Fig. 5A). A lo largo de todo el desarrollo, los mayores y menores diámetros del 1<sup>er</sup> entrenudo se observaron en las plantas crecidas en S1 y S2+NPK, respectivamente (Fig. 5B).



**Figura 5.** Altura y diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística.

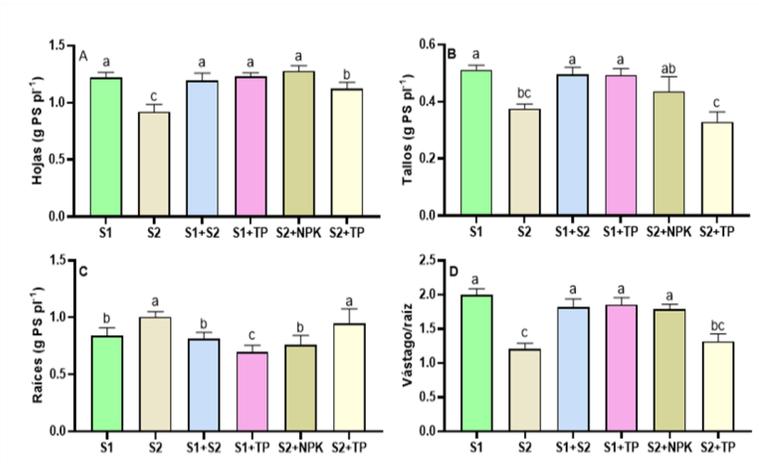
Es interesante notar la ausencia de correlación entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas crecidas en S1, con y sin fertilización (Fig. 6A). Por el contrario, una correlación positiva y significativa ( $p < 0.01$ ) se detectó entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas crecidas en S2, con y sin fertilización (Fig. 6B).



**Figura 6.** Correlación entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos: (A) colectado bajo sombra (S1) y (B) expuesto a la radiación solar (S2). \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ).

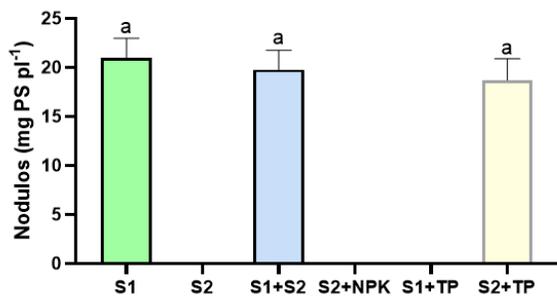
Al momento de la cosecha, las plantas de frijol común mostraron el mayor peso seco de hojas cuando fueron crecidas en S1, S1+S2, S1+TP y S2+NPK, mientras que el menor peso seco foliar se observó en plantas crecidas en S2 (Fig. 7A) (Anexo 5). El mayor peso seco de los tallos ocurrió en las plantas crecidas en S1, S1+S2 y S1+TP, con el menor peso mostrado por las plantas crecidas en S2+TP (Fig. 7B). Las plantas crecidas en S2 y S2+TP

desarrollaron los mayores sistemas radicales, como se evidencia por el peso seco de las raíces (Fig. 7C), y en la menor relación vástago/raíz (Fig.7D).



**Figura 7.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con TP y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

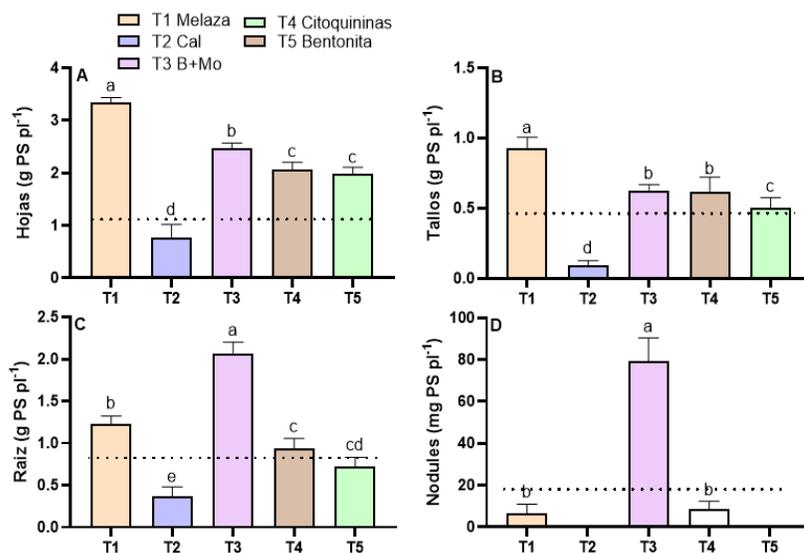
Solo las plantas crecidas en S1, S1+S2 y S2+TP establecieron simbiosis efectivas con los rizobios de vida libre en el suelo y desarrollaron nódulos en las raíces (Fig. 8).



**Figura 8.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos: colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con TP y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

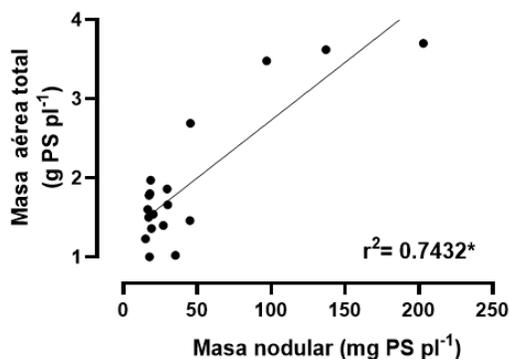
Los nódulos fueron del tipo determinado (Anexo 6), con un 90% del área interna colonizada por los rizobios y con un intenso color rojo, indicador de una activa FSN. La masa nodular se encontró distribuida a todo lo largo del sistema radical, principalmente en las raíces laterales. La fertilización con NPK inhibió la nodulación en las plantas crecidas en S1+S2.

La adición de enmiendas al suelo S1+S2 promovió el desarrollo de las hojas y tallos en el orden de melaza > B+Mo > citoquininas y bentonita > cal (Fig. 9A & B). Por otra parte, la adición de B+Mo tuvo un efecto positivo en la producción de raíces >> melaza > citoquininas y bentonita > cal (Fig. 9C). La adición de B+Mo también aumentó 4 veces la nodulación de las plantas, mientras que la adición de melaza y citoquininas redujo la nodulación de las plantas por debajo del valor en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig. 9D). Los Tratamientos de Cal y bentonita inhibieron la nodulación.



**Figura 9.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), citoquininas (T4) y bentonita (T5). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2, sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística ± error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

El análisis estadístico reveló una correlación positiva y significativa ( $p < 0.01$ ) entre el peso seco de la masa nodular y el peso seco total de la masa aérea de todas las plantas noduladas (Fig. 10).

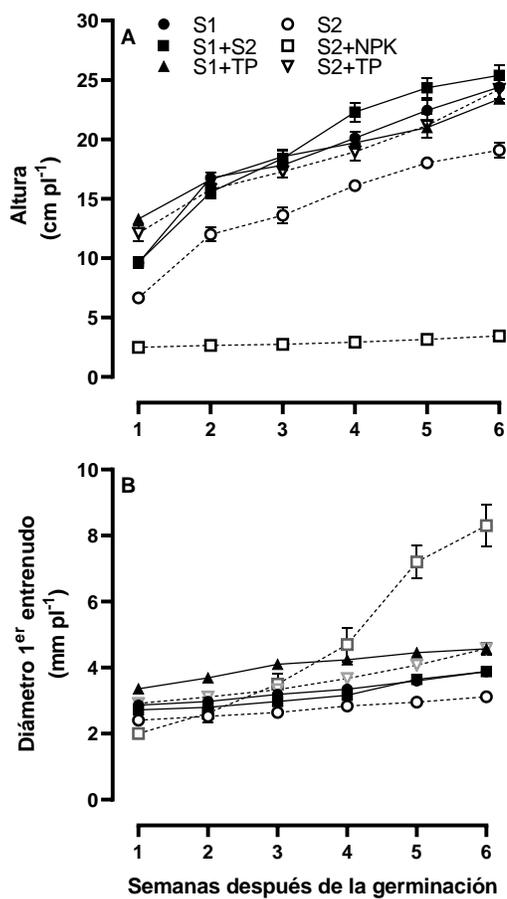


**Figura 10.** Correlación entre el peso seco de la masa nodular en las raíces y el peso seco total de la masa aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris*. \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ).

### 5.5. Frijol caupí (*Vigna unguiculata*)

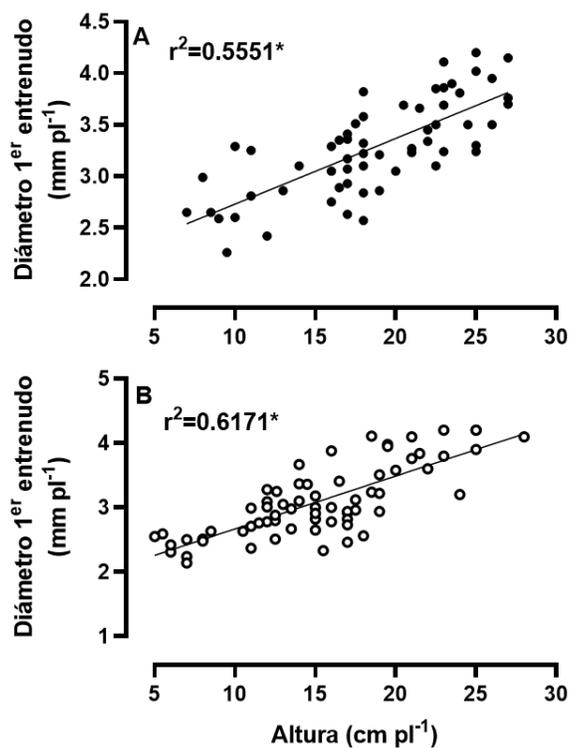
Las semillas de frijol caupí germinaron un 100 % en S1 y un 98 % en S2, siendo la diferencia estadísticamente no significativa. La adición de Etefón al suelo inhibió la germinación de las semillas en S1 y en S2.

Las plantas crecidas en S1, S1+S2, S1+TP y S2+TP mostraron un crecimiento similar, alcanzando todas las mismas alturas al cabo de 6 semanas después de la germinación (Fig. 11A). Por el contrario, las plantas crecidas en S2 mostraron un menor desarrollo, con la menor altura alcanzada por las plantas crecidas en S2+NPK. Entre la 1<sup>era</sup> y la 4<sup>ta</sup> semana de desarrollo, las plantas crecidas en S1+TP mostraron los mayores diámetros del 1<sup>er</sup> entrenudo (Fig. 11B). Sin embargo, a partir de la 4<sup>ta</sup> semana de crecimiento se detectó un incremento en el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo de plantas crecidas en S2+NPK, permaneciendo el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo de las plantas crecidas en S2 con los valores más bajos.



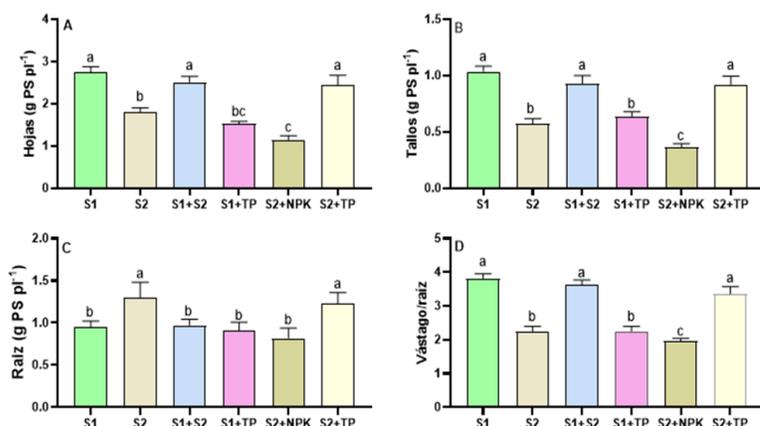
**Figura 11.** Altura y diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con o sin fertilización con triple fosfato (TP) y NPK, y en una S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística.

Correlaciones positivas y significativas se encontraron entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas crecidas en S1 y en S2, con y sin fertilización (Fig. 12A, B).



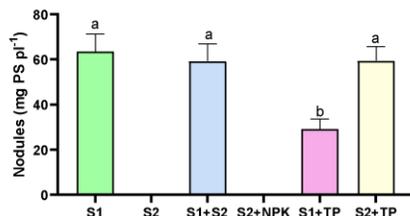
**Figura 12.** Correlación entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en S1 (A) y en S2 (B). \*, correlación significativa ( $p<0.01$ ).

Las plantas en el estadio de floración y crecidas en S1, S1+S2 y S2+TP mostraron los mayores pesos secos de hojas (Fig. 13A) y tallos (Fig. 13B). Mientras que los menores pesos secos de hojas y tallos fueron observados en plantas crecidas en S2 y S1+TP, con el menor peso seco mostrado por las plantas crecidas en S2+NPK (Anexo 7). Por el contrario, el mayor peso seco radicular fue detectado en las plantas crecidas en S2 y S2+TP (Fig. 13C), lo cual se refleja en los valores más altos de la relación vástago/raíz mostrados por las plantas crecidas en S1, S1+S2 y S2+TP (Fig. 13D).



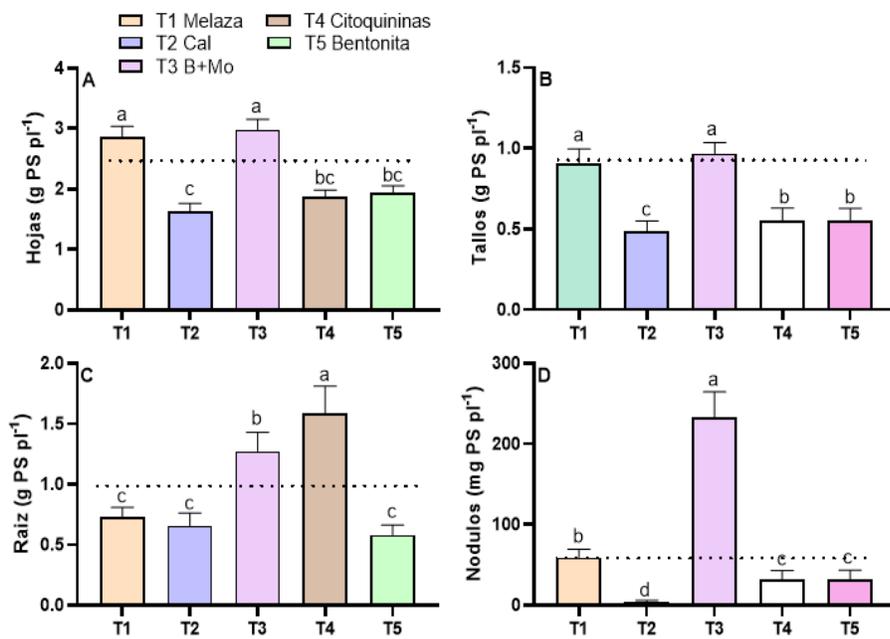
**Figura 13.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), y raíces (C) de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con TP y NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

Las mayores masas nodulares se desarrollaron en las plantas crecidas en S1, S1+S2 y S2+TP, y la menor en las plantas crecidas en S1+TP. Nódulos no fueron observados en raíces de las plantas crecidas en S2 y S2+NPK (Fig. 14). En todos los casos, los nódulos formados en las raíces fueron del tipo determinado, con un 90% del área interna colonizada por los rizobios y con un intenso color rojo, indicador de una activa FSN. La masa nodular se encontró distribuida a todo lo largo del sistema radical, principalmente en las raíces laterales.



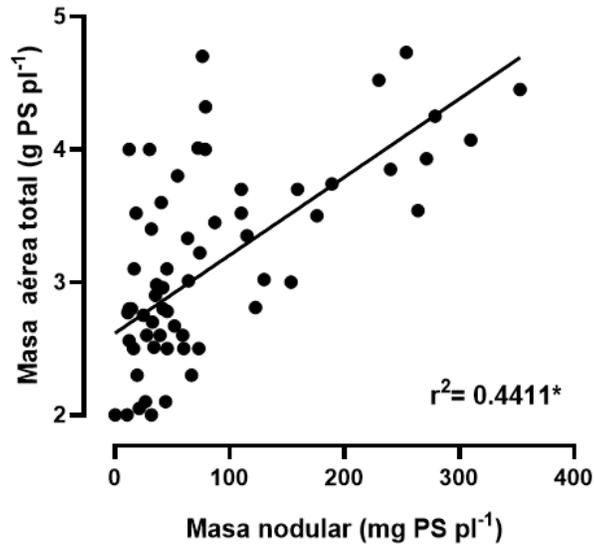
**Figura 14.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1), expuesto a la radiación solar (S2) con TP y NPK, y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

La adición de melaza y B+Mo al suelo S1+S2 incrementaron el peso seco de las hojas por arriba del valor en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig 15A). Por el contrario, los tratamientos con cal, citoquininas y bentonita redujeron el peso seco de las hojas, por debajo de los valores en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. La adición de melaza y B+Mo no tuvo efecto alguno sobre el peso seco de los tallos, mientras que las enmiendas con cal, citoquininas y bentonita afectaron negativamente el peso seco de los tallos en comparación con el valor en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig. 15B). En cambio, la adición de B+Mo y citoquininas incrementó el peso seco de las raíces, en paralelo a la reducción del peso seco de las raíces causadas por los tratamientos con melaza, cal y bentonita (Fig. 15C). La adición de B+Mo aumentó 4 veces la nodulación de las plantas, sobre el valor en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig. 15D).



**Figura 15.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Vigna unguiculata* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), citoquininas (T4) y bentonita (T5). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

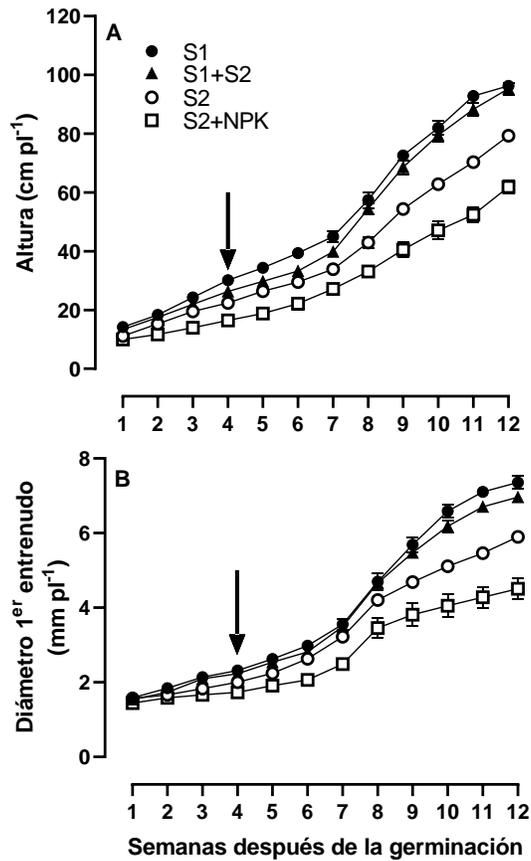
El análisis estadístico reveló una alta correlación positiva y significativa ( $p < 0.01$ ) entre el peso seco de la masa nodular y el peso seco total de la masa aérea de todas las plantas noduladas (Fig. 16)



**Figura 16.** Correlación entre el peso seco total de la masa aérea y el peso seco de masa nodular en las raíces de plantas noduladas de *Vigna unguiculata*. \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ).

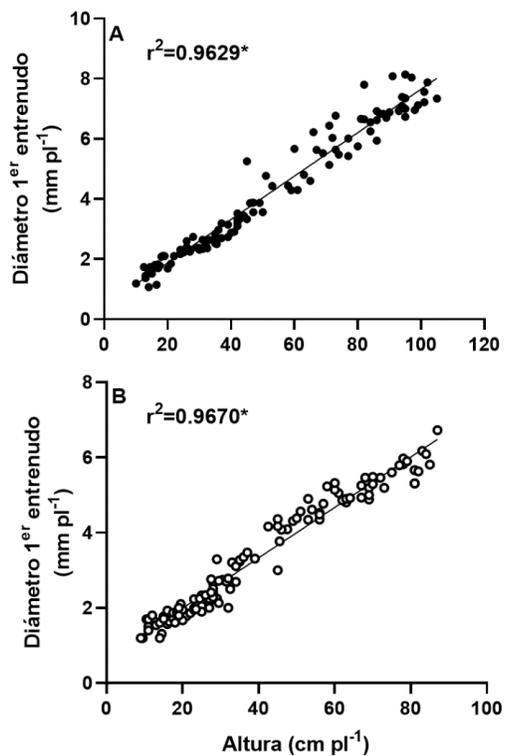
### 5.6. Frijol de palo (*Cajanus cajan*)

La germinación de semillas de frijol de palo fue de 90 % en S1 y S2. A lo largo del período experimental de 12 semanas, las plantas crecidas en S1 y S1+S2 fueron las que alcanzaron la mayor altura (Fig. 17A). La menor altura fue mostrada por las plantas crecidas en S2 > S2+NPK. Una situación similar fue observada con respecto al diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo (Fig. 17B), con los valores mayores detectados en las plantas crecidas en S1 y S1+S2, y los más bajos en las plantas crecidas en S2 > S2+NPK.



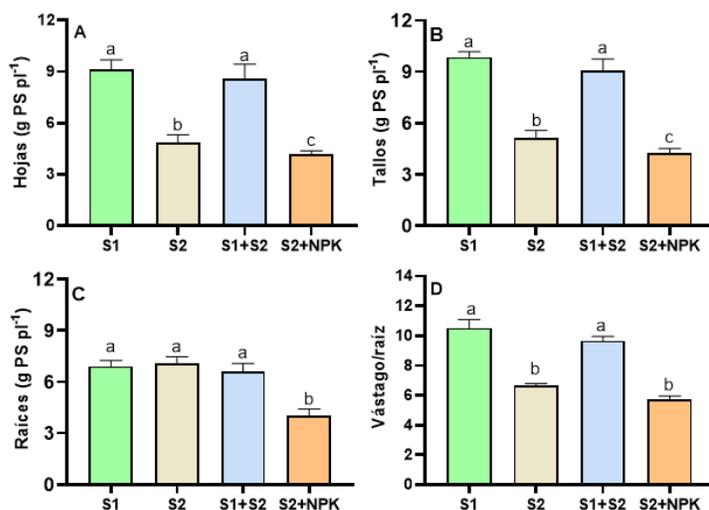
**Figura 17.** Altura y diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo a lo largo del crecimiento de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo expuesto a la radiación solar (S2), con fertilización con NPK, y en una mezcla de S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. La fecha indica el momento del trasplante de las plantas a una funda de 3 kg.

Correlaciones positivas y altamente significativas ( $p < 0.01$ ), se encontraron entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas crecidas en S1 ( $r^2 = 0.9629$ ) y en S2 ( $r^2 = 0.9670$ ), con y sin fertilización (Fig. 18A, B).



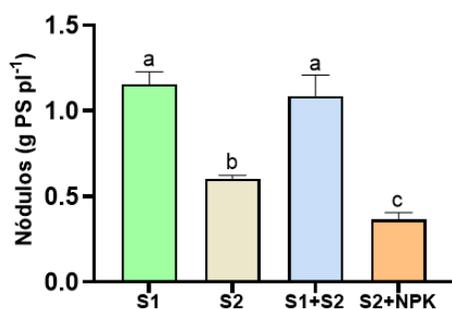
**Figura 18.** Correlación entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de las plantas de *Cajanus cajan* crecidas en S1 (A) o en S2 (B). \*, correlación significativa ( $p < 0.01$ ).

Las plantas crecidas en S1 y S1+S2 desarrollaron las mayores masas secas foliares (Fig. 19A) y de tallos (Fig. 19B), en comparación con las menores masas secas determinadas en las plantas crecidas en S2 > S2+NPK (Anexo 8). Por el contrario, la masa seca radical no mostró diferencias entre las plantas crecidas en S1, S2 y S1+S2, con los menores valores detectados en las plantas crecidas en S2+NPK (Fig. 19C). Los valores de la relación entre la masa aérea total/raíces fueron más altos en las plantas crecidas en S1 y S1+S2, y menores en las plantas crecidas en S2 y S2+NPK (Fig. 19D).



**Figura 19.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), y raíces (C) de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2), con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

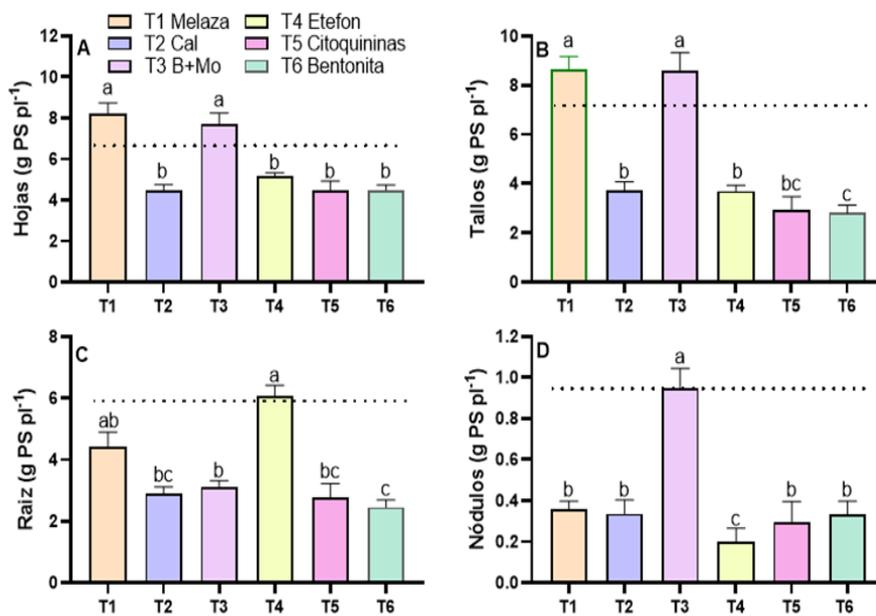
La mayor masa nodular fue determinada en las raíces de las plantas crecidas en S1 y S1+S2, en comparación con los valores en las plantas crecidas en S2 > S2+NPK (Fig. 20).



**Figura 20.** Masa de nodular en raíces de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en suelos colectados bajo sombra (S1) o expuesto a la radiación solar (S2), con NPK, y en S1+S2. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

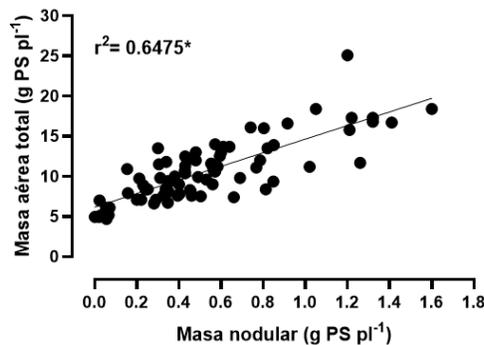
Los nódulos del tipo indeterminado (Anexo 9), con un interior de color rojo intenso, se desarrollaron a lo largo de todo el sistema radical, principalmente en las raíces laterales.

Los tratamientos con melaza y B+Mo promovieron el peso seco de la masa foliar (Fig. 21A) y de los tallos (Fig. 21B) por encima de los valores en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Con la excepción de la adición de etefon, los tratamientos aplicados al suelo S1+S2 redujeron la masa seca radical de las plantas, por debajo de los valores en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig. 21C). En el caso de la nodulación, y con la excepción de la adición de B+Mo, todos los tratamientos decrecieron la masa nodular seca en las raíces de las plantas, en relación a los valores en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas (Fig. 21D).



**Figura 21.** Peso seco de las hojas (A), tallos (B), raíces (C) y nódulos (D) de plantas de *Cajanus cajan* crecidas en un suelo S1+S2 y tratadas con melaza (T1), cal (T2), B+Mo (T3), etefon (T4), citoquininas (T5) y bentonita (T6). La línea punteada corresponde al valor correspondiente en plantas crecidas en S1+S2 sin enmiendas. Los resultados se expresan como la media estadística  $\pm$  error estándar de la media estadística. Las barras con las mismas letras en la parte superior son estadísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

El análisis estadístico reveló una alta correlación positiva y significativa ( $r^2=0.6475$ ,  $p<0.01$ ) entre el peso seco de la masa nodular y el peso seco total de la masa aérea de todas las plantas noduladas (Fig. 22).



**Figura 22.** Correlación significativa ( $p<0.01$ ) entre el peso seco de la masa nodular en las raíces y el peso seco total de la masa aérea de plantas de *Cajanus cajan*. \*, correlación significativa ( $p<0.01$ ).

## 6. Discusión

No existen dudas sobre los enormes beneficios socioeconómicos, ecológicos y nutricionales atribuidos a la siembra y consumo de leguminosas, globalmente (Ditzler et al., 2021). Por otra parte, todas las evidencias científicas presentadas en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (COP-26), celebrada en Glasgow entre el 31 de octubre y el 12 de noviembre de 2021, señalan la necesidad urgente de reducir la huella del C y del N, en el menor tiempo posible. Entre las soluciones propuestas por científicos, a gran escala, se consideró la opción de incrementar sustancialmente el uso de biofertilizantes y la siembra de leguminosas fijadoras del N<sub>2</sub> en todo el mundo, como una alternativa viable y rentable a la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados.

Sin embargo, de la revisión de la literatura y observaciones en el campo, se evidencia el retraso de Ecuador en cuanto a la implementación del uso de bioinsumos en la agricultura, siendo el único país en Latinoamérica, y entre los pocos en el mundo, que aún no aprovecha los beneficios de la FSN. Ante esta situación se llevó a cabo esta investigación con el fin de

determinar la efectividad de la microbiota fijadora de N<sub>2</sub> y nativa de suelos en las tierras bajas de Ecuador, en 5 especies de leguminosas de grano de interés comercial en Ecuador.

Un descubrimiento interesante fue la aparente ausencia de especies de rizobios compatibles con haba y habichuela en S1. Sin embargo, los resultados obtenidos durante la investigación en estas dos especies no permiten concluir, de forma definitiva, la ausencia de rizobios compatibles en S1, ya que:

(1) Es posible que en S1 el tamaño de las poblaciones de los rizobios compatibles con estas especies se encuentren en cantidades menores a 10<sup>4</sup> células/g de suelo, siendo este el nivel mínimo estimado para que ocurra la nodulación (Kebede et al., 2021); y,

(2) Es altamente probable que las semillas de haba y habichuela, adquiridas en el mercado local de Portoviejo, provengan de cultivos sometidos a una alta presión de fertilización química nitrogenada, por varias generaciones. Esto pudo haber inducido la pérdida o desactivación genómica de los locus/loci de rasgos cuantitativos (QTL) heredables de las plantas y directamente relacionados con la FSN (Goyal et al., 2021).

Por otra parte, la ausencia de nódulos en las raíces de frijol caupí y frijol común crecidas en S2 demostró los efectos deletéreos de las altas temperaturas en S2 sobre el tamaño de las poblaciones microbianas nativas de este suelo (Gomez et al., 2020). Sin embargo, la prolífica nodulación del frijol de palo crecidas en S2, así como la nodulación de frijol caupí y frijol común crecidas en S2+TP no confirman esta suposición. Por el contrario, estas observaciones apuntan hacia: (a) la presencia en S2 de rizobios tolerantes a las altas temperaturas del suelo y simbióticamente compatibles con frijol de palo (Mabiala et al., 2021), y (b) la activación de la simbiosis en frijol caupí y frijol común por efecto del TP añadido. En cultivos de *Glycine max* la fertilización con P tiene un efecto positivo mayor en suelos alcalinos que en suelos ácidos, como es el caso del S2 con pH 8.1 (Wang et al., 2022).

La efectividad de las PGPB en S1 fue también comprobada en el mayor desarrollo de las plantas crecidas en S1+S2, muy por encima de los valores en plantas crecidas en S2. La transferencia de la microbiota del S1 al S2, en una proporción de 1/10 (p/p), fue suficiente para contrarrestar las deficiencias nutricionales del S2, promoviendo el desarrollo y la nodulación de las plantas a niveles similares de las plantas en S1. Estos resultados apoyan estudios recientes que indican el impacto, altamente significativo y positivo que tiene la

inoculación de suelos con un consorcio de PGPB en el crecimiento de leguminosas de grano, en comparación con los resultados obtenidos en leguminosas inoculadas con 1 a 3 cepas aisladas de rizobios (Quides & Atamian, 2021).

En líneas generales, el mejor desarrollo de las plantas crecidas en S1 se evidenció en:

- (a) Los valores más altos de la relación vástago/raíz, directamente relacionado con la mayor disponibilidad de nutrientes en S1.
- (b) Los valores más altos de altura y de biomasa aérea observada en todas las plantas de las 5 especies de leguminosas crecidas en S1 y S1+S2.
- (c) Los mayores diámetros del 1<sup>er</sup> entrenudo y su correlación positiva y significativa con la altura de las plantas de frijol caupí y frijol de palo en S1. En variedades de *Glycine max*, el diámetro de los entrenudos está directamente relacionado con la productividad del cultivo, siendo controlado por 12 QTLs en 8 cromosomas, 3 de los cuales están influenciados por el ambiente (Sun et al., 2021). El diámetro de los entrenudos es también considerado un indicador importante de la efectividad de las PGPB en los suelos (El-Beltagi et al., 2022). Con la excepción de la ausencia de una correlación significativa entre el diámetro del 1<sup>er</sup> entrenudo y la altura de frijol común en S1, los resultados validan el uso de este parámetro, fácil de medir en el campo, como indicador de la biología del suelo en los modelos de predicción de productividad.

En paralelo se observó un incremento de 4 veces de la masa nodular en frijol caupí y frijol común por la adición de B+Mo al suelo es atribuido a: (1) la participación esencial de B en la formación de las paredes celulares y la morfogénesis de los nódulos en las raíces de leguminosas (Halder et al., 2022); y, (2) las funciones de Mo como cofactor de las enzimas involucradas en el ciclo del N, así como la síntesis de fitohormonas (Roychoudhury & Chakraborty, 2022).

Actualmente, la fertilización de los suelos agrícolas con melaza se ha convertido en algo común, gracias a sus altos contenidos de minerales y azúcares y el bajo costo del producto (Li et al., 2020). Su efecto positivo, como fertilizante orgánico, se evidenció en la mayor masa seca aérea de plantas de frijol de palo, frijol caupí y frijol común crecidas en S1+S2+melaza. Sin embargo, la promoción de las masas aéreas de estas leguminosas no pudo

ser atribuida a un efecto positivo de la melaza sobre la nodulación de las raíces. Por el contrario, la adición de melaza redujo la nodulación en frijol común y frijol de palo.

Peor aún fue el efecto negativo de la bentonita sobre la nodulación y desarrollo de frijol de palo y frijol caupí, al contrario de los numerosos beneficios de la bentonita previamente descritos en los suelos agrícolas y en la productividad de los cultivos (Mi et al., 2021).

Es posible asumir que la compactación del suelo por efecto de la melaza y la bentonita, observada al momento de la cosecha, haya constreñido el desarrollo de las raíces creando un ambiente negativo para los eventos tempranos de la simbiosis. También se observó que la enmienda del suelo con cal o Etefón tampoco tuvo un efecto positivo sobre las plantas y la simbiosis con rizobios.

Sin embargo, la respuesta de las plantas al tratamiento con citoquininas dependió de la especie, con un leve efecto positivo sobre la masa aérea de frijol común y frijol de palo, solo sobre la masa radicular de frijol caupí, inhibiendo el crecimiento de frijol de palo e inhibiendo la nodulación en las 3 especies. Es sabido que las citoquininas son esenciales para el establecimiento de la simbiosis (Rudaya et al., 2022). Mientras que la inhibición de la germinación de frijol común y frijol caupí por el etefón, siendo totalmente inocuo en el frijol de palo, tampoco fueron los efectos esperados. El etileno usualmente estimula la germinación (Jurdak et al., 2021) pero afecta negativamente los estadios tempranos de la simbiosis entre leguminosas y los rizobios del suelo (Moon & Ali, 2022).

Es posible que, en esta investigación, las concentraciones de las enmiendas del suelo utilizadas en los distintos tratamientos hayan sido tóxicas para las plantas, ya que fueron calculadas para plantas crecidas en 1 kg de suelo en base a las recomendaciones de cada producto comercial, descritas en el empaque, en kg o litros por hectárea de cultivo.

## 7. Conclusión y recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación se puede concluir:

- El mayor desarrollo de las plantas de haba, habichuela, frijol caupí, frijol común y frijol de palo crecidas en S1 permite inferir la presencia de una microbiota muy activa y capaz de sustentar el desarrollo de las plantas en este suelo. Más aún, la formación de nódulos en las raíces de plantas de frijol caupí, frijol de palo y frijol común, considerados activos fijadores de N<sub>2</sub> por su intenso color rojo interno, certifica la presencia en S1 de poblaciones nativas de rizobios, capaces de establecer simbiosis efectivas con plantas de estas tres especies.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación se recomienda:

- Ampliar el estudio de las leguminosas de interés comercial en Ecuador y su habilidad de establecer simbiosis efectivas con rizobios nativos.
- Incorporar todos los QTL relacionados con la FSN en el mejoramiento genético de leguminosas de grano en Ecuador.
- Aislar e incluir las PGPB promisorias en S1 en la producción de inoculantes en base a rizobios para la siembra de leguminosas de grano, en sustitución de los fertilizantes químicos nitrogenados.
- Informar a los agricultores ecuatorianos sobre las bondades socioeconómicas y ambientales de la FSN en el cultivo sostenible de leguminosas de grano.

## Referencias bibliográficas

- Adegbite, E. A., Atere, C. T., & Olayinka, A. (2021). Growth, nitrogen fixation and yields of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and chemical properties of an acid alfisol in response to applications of organic amendments and inorganic N. *Journal of Plant Nutrition*, 44, 692-703.
- Adissie, S., Adgo, E., & Feyisa, T. (2020). Effect of rhizobial inoculants and micronutrients on yield and yield components of faba bean (*Vicia faba* L.) on vertisol of Wereillu district, South Wollo, Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture*, 6, 1747854.
- Alejandro Salinas, I. F., & Andrade Varela, C. (2017). Efecto de diferentes densidades de siembra y control fitosanitario en frijol caupí (*Vigna unguiculata*, L Walp), en Manglaralto Provincia de Santa Elena. *Tesis de Grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena*. <http://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/4232>
- Allito, B. B., Ewusi-Mensah, N., Logah, V., & Hunegnaw, D. K. (2021). Legume-*Rhizobium* specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Scientific Reports*, 11, 1-13.
- Araujo, J., Díaz, A., Urbano, B., & González, F. (2020). Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*, 113, 125985.
- Ayalew, T., Yoseph, T., Petra, H., & Cadisch, G. (2021). Yield response of field-grown cowpea varieties to *Bradyrhizobium* inoculation. *Agronomy Journal*, 113, 3258-3268.

- Bagheri, B., Karimi-Jashni, A., & Zerafat, M. M. (2021). Application of molasses as draw solution in forward osmosis desalination for fertigation purposes. *Environmental Technology*, 42, 764-774.
- Baral, B., Teixeira, J., & Izaguirre-Mayoral, M. L. (2016). Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. A review. *Journal of Plant Physiology*, 193, 97-109.
- Borjas, V., Julca, O., & Alvarado, H. (2020). Las fitohormonas son una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8, 150-164.
- Boukar, O., Bhattacharjee, R., Fatokun, C., Kumar, P., & Gueye, B., (2013) Cowpea. In: Singh M, Upadhyaya HD, Singh IB (eds). *Genetic and genomic resources of grain legume improvement*, 137-156. Elsevier Inc. London, England,
- Boulbaba, L., Neila, A., Smari, S., Amel, A. A., Jeridi, M., Alsenidi, M. D., & Sifi, B. (2020). Effects of *Rhizobium* strain on the growth, nodulation, N<sub>2</sub> fixation and ions accumulation in *Vicia faba* plant under salt stress. *Legume Research*, 43, 573-579.
- Buscagan, T. M., Perez, K. A., Maggiolo, A. O., Rees, D. C., & Spatzal, T. (2021). Structural characterization of two CO molecules bound to the nitrogenase active site. *Angewandte Chemie*, 60, 5704-5707.
- Canchingre K. G. & Salcedo A. D. Estudio del aporte económico en la explotación minera de bentonita cálcica en el sector Villingota. *Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil*. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/37212/1/Canchingre-Salcedo.pdf>

- Carrión Gutiérrez, C. V. (2016). Utilización de diferentes niveles de bentonita para la clarificación de vino de uva. *Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/6070/1/27T0307.pdf>
- Chávez, S. L., Alvarez F. Alexander, & Ramírez F. R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33, 47-56.
- Chekanai, V., Chikowo, R., & Vanlauwe, B. (2018). Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across variable soils in Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 266, 167-173.
- Chibeba, A. M., Pereira, C. S., Antunes, J. E., Ribeiro, R. A., Almeida, L. A., Ferreira, R. L., Hungría, M. A., & Araujo, A. S. F. (2020). Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. *Symbiosis*, 80, 279-292.
- Cooke, A., & Charpentier, M. (2019). Encoding nuclear calcium oscillations in root symbioses. *The Model Legume Medicago truncatula*, 2461-466.
- Coque Calvache, A. M. (2021). Evaluación de un biofertilizante a base de *Rhizobium* en la producción del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) variedad temprana perfecta. *Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato*. Nexo <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/334780>
- Corrales, L.C.; Arévalo, Z.Y. & Moreno, V.E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova, Publicación Científica de Ciencias Biomédicas*, 12, 67-79.

- Costa, M. P., Reckling, M., Chadwick, D., Rees, R. M., Saget, S., Williams, M., & Styles, D. (2021). Legume-modified rotations deliver nutrition with lower environmental impact. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 113.
- Delgado, R. (2017). Respuesta del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la aplicación de un bioestimulantes en combinación con leche y melaza. Cantón Naranjal, Provincia del Guayas. *Tesis de Grado, Universidad Agraria del Ecuador*.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4547/1/T-UCE-0004-13.pdf>
- Ditzler, L., Van Apeldoorn, D. F., Pellegrini, F., Antichi, D., Bàrberi, P., & Rossing, W. A. (2021). Current research on the ecosystem service potential of legume inclusive cropping systems in Europe. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41, 1-13.
- Duc, G., Aleksic, J., Marget, P., Mikic, A., Paull, J., Redden, R., Sass, S., Vandenberg, A., Vishnyakova, M. & Torres, A. (2015). *Faba Bean. Manual de Fitomejoramiento*.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_5)
- Efstathiadou, E., Ntatsi, G., Savvas, D., & Tampakaki, A. P. (2021). Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Greece. *Scientific Reports*, 11, 1-15.
- El Beltagi, S., Ahmad, I., Basit, A., El Lateef, A., Hany, M., Yasir, M., Shah, T., Ullah, I., Mohamed, M., Ali, I., Ali, F., Ali, S., Aziz, I., Kandeel, M. & Zohaib, M. (2022). Effect of *Azospirillum* and *Azotobacter* species on the performance of cherry tomato under different salinity levels. *Gesunde Pflanzen*, 1-13.

- Eom, H., & Kim, S. (2018). A study on the denitrification and microbial community characteristics by the change of C/N ratio of molasses and nitrate nitrogen. *The Microbiological Society of Korea*, 54, 105-112.
- Fatima, H., Tahir, M., & Saleem, M. A. (2021). Evaluating the effect of foliar applied manganese, iron, zinc and boron at different growth stages of Mash bean [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Journal of Pure and Applied Agriculture*, 6, 34-42.
- Furuya, M., Shin, M., Masumoto, H., Takata, S., Takano, J., & Matsumura, A. (2022). Root response of soybean genotypes to low phosphorus availability from juvenile to adult vegetative stages. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1-13.
- Gautrat, P., Laffont, C., Frugier, F., & Ruffel, S. (2021). Nitrogen systemic signaling: from symbiotic nodulation to root acquisition. *Trends in Plant Science*, 26, 392-406.
- Gomez, E. J., Delgado, J. A., & Gonzalez, J. M. (2020). Environmental factors affect the response of microbial extracellular enzyme activity in soils when determined as a function of water availability and temperature. *Ecology and Evolution*, 10, 10105-10115.
- Gómez, P., Argentel, M., Ávila, A., Ruíz, D., Fernández, P., Alarcón, B., Eichler, L., López, S. (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, 11-16.
- Goncalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez P. R., Trindade, H., Rosa, E., Ferreira, L., & Rodriguez, M. (2016) Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed

multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal Science Food Agricultural*. 96, 2941-2951.

Goyal, R. K., Mattoo, A. K., & Schmidt, M. A. (2021). Rhizobial–Host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1290.

Halder, A., Poddar, R., Dey, A., Kundu, R., & Patra, S. K. (2022). Frequency of irrigation and boron on growth, yield, water use efficiency and economics of summer green gram in humid sub-tropical climate. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53, 180-198.

Hasan, K., Hoshain, S., Sharmin, T., Rabbani, M. G., Azad, M. S. K., Rahman, M. R., & Kar, P. S. (2021). Effect of integrated use of *Rhizobium* inoculum and phosphorus fertilization on nodulation, growth, and yield of soyabean cv. Binasoybean-2. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, 8, 9-17.

Hernández, R. A. (2018). Insectos plaga y enfermedades asociadas a cuatro cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Tesis de Grado, Universidad Central “Mata Abreu” de Las Villas*. <http://dspace.uclv.edu.cu:8089/handle/123456789/10180>

Hu, H. Y., Li, H., Hao, M. M., Ren, Y. N., Zhang, M. K., Liu, R. Y., Zhang, Y., Li, G., Chen, S., Ning, T., & Kuzyakov, Y. (2021). Nitrogen fixation and crop productivity enhancements co-driven by intercrop root exudates and key rhizosphere bacteria. *Journal of Applied Ecology*, 58, 2243-2255.

INEC. (2017).

Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac\_2017/Informe\_Ejecutivo\_ESPAC\_2017/

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

- INEC. (2018) Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac-2018/
- INEC. (2019). Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac2019/Boletin Tecnico, ESPAC\_2019/
- Izaguirre-Mayoral, M. L., Lazarovits, G & Baral, B. (2018a). Ureide metabolism in plant-associated bacteria: Purine plant-bacteria interactive scenarios under nitrogen deficiency. *Plant and Soil*, 428, 1-34
- Izaguirre-Mayoral, M. L., Lazarovits, G. & Baral, B. (2018b). Effects of plant associated bacteria on crop yields: The case of tropical N<sub>2</sub>-Fixing legumes. *Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia*, 137, 132-153.
- Jarzyński, K., Banasiak, J., Jamruszka, T., Pawela, A., Di Donato, M., Novák, O., Geisler, M. & Jasiński, M. (2021). Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins. *Nature Plants*, 7, 428-436.
- Jiang, X., Payá, T. L., Coroian, D., García-Rubio, I., Castellanos, R. R., Eseverri, A., López, Torrejón G. Burén, S. & Rubio, L. M. (2021). Exploiting genetic diversity and gene synthesis to identify superior nitrogenase *NifH* protein variants to engineer N<sub>2</sub>-fixation in plants. *Communications Biology*, 4, 1-11
- Jorin, B., Maluk, M., Atoliya, N., Kumar, S. C., Chalasani, D., Tkacz, A., Singh, P., Basu, A., Pullabhotla, V., Kumar, M., Mohanty, R., East, K., Ramachandran, K., James, K., Podile, R., Saxena, K., Rao, D., & Poole, S. (2021). Genomic Diversity of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) endosymbionts in India and selection of potential strains for use as agricultural inoculants. *Frontiers in plant science*, 12, 680981.

- Jurdak, R., Launay-Avon, A., Paysant-le Roux, C., & Bailly, C. (2021). Retrograde signalling from the mitochondria to the nucleus translates the positive effect of ethylene on dormancy breaking of *Arabidopsis thaliana* seeds. *New Phytologist*, 229, 2192-2205.
- Karkanis, A., Ntatsi, G., Lapse, L., Fernández, J., Vågen, I., Rewald, B., Alsina, I., Kronberga, A., Balliu, A., Olle, M., Bodner, G., Dubova, L., Rosa, E., & Savvas, D. (2018). Faba cultivation: revealing novel managing practices for more sustainable and competitive European cropping systems. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1115.
- Kebede, E., Amsalu, B., Argaw, A., & Tamiru, S. (2021). Abundance of native rhizobia nodulating cowpea in major production areas of Ethiopia as influenced by cropping history and soil properties. *Sustainable Environment*, 7, 1889084.
- Khazaei, H., Vandenberg, A. (2020). Seed mineral composition and protein content of faba beans (*Vicia faba* L.) with contrasting tannin contents. *Agronomy*, 10, 2-10.
- Krylova, V. V., Zartdinova, R., & Izmailov, S. F. (2021). CaM-stimulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity on the symbiosome membrane from broad bean root nodules and its sensitivity to chlorpromazine. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-8.
- Lara, C. L., Hernández, M. L. G., Reyes, P. J. J., Preciado, R. P., & Zulueta, R. R. (2019). Respuesta agronómica de *Phaseolus vulgaris* a la biofertilización en campo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10, 1035-1046.
- Lee, B. R., Zaman, R., La, V. H., Bae, D. W., & Kim, T. H. (2021). Ethepon-induced ethylene enhances starch degradation and sucrose transport with an interactive abscisic acid-mediated manner in mature leaves of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plants*, 10, 1670.

Li, S., Zhao, X., Ye, X., Zhang, L., Shi, L., Xu, F., & Ding, G. (2020). The effects of condensed molasses soluble on the growth and development of rapeseed through seed germination, hydroponics and field trials. *Agriculture*, 10, 260.

Código de campo cambiado

Li, S. M., Zheng, H. X., Zhang, X. S., & Sui, N. (2021). Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports*, 40, 271-282.

Lopes A. C, Gomes R. F & Araújo A. S. (2015). *Phaseolus lunatus*: diversity, growth and production. *Nova Science Publishers*, 10, 20-25.

López, H., Martínez, J., Balseca, D., Gusqui, L., & Cienfuegos, E. (2021). Initial growth of two varieties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) in the tropics of Ecuador. *Abanico Veterinario* 8, 33-46.

López, H, Martínez, J., Balseca, D., Gusqui, L., & Cienfuegos, E. (2018). Crecimiento inicial de dos variedades de gandul (*Cajanus cajan*) en el trópico de Ecuador. *Abanico Veterinario*, 8, 33-46.

López, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., & López, E. (2016). Variabilidad morfológica de *Phaseolus lunatus* L. Silvestre de la región occidente de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39, 49-58.

López, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., López, E., & Olalde, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 40, 73-81

Ma, S. Y., Ma, L., Xu, B., Yang, N., Zhang, X. H., Chai, Q., & Li, S. (2020). Physiological responses of symbiotic rhizobium pea to exogenous calcium under salt stress. *The Journal of Applied Ecology*, 31, 969-977.

- Ma, Y., & Chen, R. (2021). Nitrogen and phosphorus signaling and transport during legume–*Rhizobium* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 683601.
- Mabiala, S., Tchimbakala, J., Eckzechel, N., & Aimé, A. (2021). Isolation and characterization of native rhizobium strains nodulating some legumes species in South Brazzaville in Republic of Congo. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 12, 10-30.
- Maluk, M., Ferrando-Molina, F., Lopez del Egado, L., Langarica-Fuentes, A., Yohannes, G. G., Young, M. W., Iannetta, P. P. M. & James, E. K. (2022). Fields with no recent legume cultivation have sufficient nitrogen-fixing rhizobia for crops of faba 62ulp (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil*, 1-24.
- Manoharlal, R., & Saiprasad, G. V. S. (2019). Assessment of germination, phytochemicals, and transcriptional responses to ethephon priming in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Genome*, 62, 769-783.
- Maris, S. C., Fiorini, A., Boselli, R., Santelli, S., & Tabaglio, V. (2021). Cover crops, compost, and conversion to grassland to increase soil C and N stock in intensive agrosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 119, 83-101.
- Martínez Gaibor, R. D., & Segovia Marmolejo, J. G. (2021). Respuestas agronómicas de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) asociadas con el cultivo de café. *Tesis de Grado, Universidad Técnica de Cotopaxi*.  
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7721>

- Martínez-Castillo J. (2015) Consideraciones sobre la importancia del muestreo en los estudios de la domesticación de plantas: el caso del frijol lima (*Phaseolus lunatus*) en México. *Desde el Herbario CICY*, 7, 17-22.
- McGuinness, P. N., Reid, J. B., & Foo, E. (2021). The influence of ethylene, gibberellins and brassinosteroids on energy and nitrogen-fixation metabolites in nodule tissue. *Plant Science*, 305, 110846.
- Menssen, M., Linde, M., Otunga-Omondi, E., Abukutsa-Onyango, M., Dinssa, F., Winkelmann, T., (2017) Genetic and morphological diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) entries from East Africa. *Scientia Horticulturae*. 226, 268-276.
- Mi, J., Gregorich, E. G., Xu, S., McLaughlin, N. B., Ma, B., & Liu, J. (2021). Changes in soil biochemical properties following application of bentonite as a soil amendment. *European Journal of Soil Biology*, 102, 103251.
- Mohamad, S. M., & Mohammed, I. A. I. (2020). Effect of Inoculation with *Rhizobium*, plant growth promoting rhizobacteria and foliar spraying with boron and molybdenum on growth, nodulation and productivity of faba bean. *Journal of Plant Production*, 11, 707-716.
- Moon, Y. S., & Ali, S. (2022). Possible mechanisms for the equilibrium of ACC and role of ACC deaminase-producing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11.
- Moreno, D. L., Quiroga, I. A., Balaguera, H. E., & Magnitskiy, S. (2016). El estrés por boro afecta la fotosíntesis y la síntesis de compuestos antioxidantes en plantas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10, 137-148.

- Muthini, M., Awino, R., Kirui, K. C., Koech, K., Jalloh, A. A., Njeru, E. M. (2020). Optimizing *Rhizobium*-legume symbiosis in smallholder agroecosystems. *Sustainable Agriculture Reviews* 45, 159-177.
- Nivicela Lizaldes, T. G. (2021). Envejecimiento acelerado: efectos sobre la viabilidad de semillas en cinco variedades de frijol. *Tesis de Grado, Universidad Técnica de Machala*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/17485>.
- Ordóñez, R. A., Castellano, M. J., Danalatos, G. N., Wright, E. E., Hatfield, J. L., Burras, L., & Archontoulis, S. V. (2021). Insufficient and excessive N fertilizer input reduces maize root mass across soil types. *Field Crops Research*, 267, 108142.
- Ormeño, O. E., Rey, L., Durán, D., Canchaya, C. A., Rogel, M. A., Zúñiga, D. D., & Martínez, R. E. (2017). Draft genome sequence of *Bradyrhizobium paxllaeri* LMTR 21T isolated from lima bean (*Phaseolus lunatus*) in Peru. *Genomics Data*, 13, 38-40.
- Perli, T., van der Vorm, D. N., Wassink, M., van den Broek, M., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2021). Engineering heterologous molybdenum-cofactor-biosynthesis and nitrate-assimilation pathways enables nitrate utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 65, 11-29.
- Pyakurel, A., Dahal, B. R., & Rijal, S. (2019). Effect of molasses and organic fertilizer in soil fertility and yield of spinach in Khotang, Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 7, 49-53.
- Quides, K. W., & Atamian, H. S. (2021). A microbiome engineering framework to evaluate rhizobial symbionts of legumes. *Plant and Soil*, 463(1), 631-642.

- Reid, T. E., Kavamura, V. N., Abadie, M., Torres-Ballesteros, A., Pawlett, M., Clark, I. M., Harris, J., & Mauchline, T. H. (2021). Inorganic chemical fertilizer application to wheat reduces the abundance of putative plant growth-promoting rhizobacteria. *Frontiers in microbiology*, 12, 458.
- Ribeiro, R. A., Martins, T. B., Ormeño, O. E., Delamuta, J. M., Rogel, M. A., Martínez, E., Hungría, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. Nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 3162-3169.
- Riofrio Acosta, L. A. (2021). Respuesta agronómica de variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* L. con varias distancias de siembra en Vainillo, El Triunfo. *Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53191>
- Rodríguez, F. Vanessa; Torres, E. A. (2009). Tratamiento de aguas residuales industriales mediante arcillas naturales y modificadas. *Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander*. <https://docplayer.es/11882993-Tratamiento-de-aguas-residuales-industriales-mediante-arcillas-naturales-y-modificadas-vanessa-rodriguez-franco-armando-torres-espana.html>
- Rodríguez, M., Lopes, J., Oliveira, L., Barbosa, S., Alvez, J., Barreto, M & Ferreira, A. (2019). Current knowledge and future prospects of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)-rhizobia symbiosis. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 5, 280-288.
- Roychoudhury, A., & Chakraborty, S. (2022). Cobalt and molybdenum: deficiency, toxicity, and nutritional role in plant growth and development. En: *Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change*, 255-270. Academic Press.

- Rudaya, E. S., Kozyulina, P. Y., Pavlova, O. A., Dolgikh, A. V., Ivanova, A. N., & Dolgikh, E. A. (2022). Regulation of the later stages of nodulation stimulated by IPD3/CYCLOPS transcription factor and cytokinin in pea (*Pisum sativum* L.). *Plants*, 11, 56-65.
- Sabkia, M. H., Ongb, P. Y., Ibrahimc, N., Leea, C. T., Klemešd, J. J., Lie, C., & Gaoe, Y. (2021). A review on abiotic stress tolerance and plant growth metabolite framework by plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture. *Chemical Engineering Transactions*, 83, 367-372
- Saldaña, J. M. (2017). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4, 1-22.
- Sarpong, C.K., Zhang, X., Wang, Q., Wang, W., Jamali, Z.H., Yong, T., Song, C. (2020). Improvement of plant microbiome using inoculants for agricultural production: a sustainable approach for reducing fertilizer application. *Canadian Journal of Soil Science*, 101, 111-112.
- Schwember, A. R., Schulze, J., Del Pozo, A., & Cabeza, R. A. (2019). Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. *Plants*, 8, 333-339
- Shi, Y., Huang, G., An, C., Zhou, Y., & Yin, J. (2021). Assessment of regional greenhouse gas emissions from spring wheat cropping system: A case study of Saskatchewan in Canada. *Journal of Cleaner Production*, 301, 126917.

- Sileshi, F., Nebiyu, A., Van Geel, M., Abeele, S. V., Du Laing, G., & Boeckx, P. (2022). Spatial variability of iron, zinc and selenium content in faba 67ulph (*Vicia faba* L.) 67ulph from central and southwestern highlands of Ethiopia. *Plant and Soil*, 1-18.
- Simbine, M. G., Mohammed, M., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. (2021). Functional and genetic diversity of native rhizobial isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Mozambican soils. *Scientific reports*, 11, 1-15.
- Smykal, P., Coyne, C., Ambrose, M., Maxted, M., Schaefer, H., Blair, M., Berger, J., Greene, S., Nelson, M., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R., Roorkiwal, M., Pandey, M., Hu, J., Li, Y., Wang, L., Guo, Y., ... Varshney, R. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 43-104.
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215, 40-56.
- Sun, C. Y., Yang, Y. M., Jia, L., Liu, X. Q., Xu, H. Q., Lv, H. Y., Huang, Z. W. & Zhang, D. (2021). Mapeo QTL de la base genética del diámetro del tallo en soja. *Planta*, 253, 1-12.
- Tabares-da Rosa, S., Signorelli, S., Del Papa, M. F., Sabatini, O., Reyno, R., Lattanzi, F., & Galetti, J. M. (2019). *Rhizobium* inoculants for alfalfa in acid soils. *Agrociencia Uruguay*, 23, 1-13.
- Taherian M, Bostani A, Omid H. (2019). Boron and pigment content in alfalfa affected by nano fertilization under calcareous conditions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 53, 136-143.

- Tamayo, J. A. (2018). Evaluación de las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de aislados e hidrolizado proteico de habichuela baby lima 68ulp (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad in vitro. *Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato*. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/28384>
- Torres, G. R., Granda, K. I., Alvarado, Y. C., Rodríguez, A. S., Mogollón, N. S., & Almeida, J. D. (2017). Genetic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolates from Southern Ecuador. *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 634-647
- Verma, V. K., Yadav, J., Kumar, S., Pyare, R., & Verma, M. (2019). Superimposition effect of 68ulphur, boron, FYM and *Rhizobium* on productivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 2193-2195.
- Wang, Q., Sheng, J., Pan, L., Cao, H., Li, C., Lambers, H., & Wang, X. (2022). Soil property determines the ability of rhizobial inoculation to enhance nitrogen fixation and phosphorus acquisition in soybean. *Applied Soil Ecology*, 171, 104346.
- Xu, Z., Yu, G., Zhang, X., He, N., Wang, Q., Wang, S., Xu, X., Wang, R., & Zhao, N. (2018). Biogeographical patterns of soil microbial community as influenced by soil characteristics and climate across Chinese forest biomes. *Applied Soil Ecology*, 124, 298-305.
- Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., & Peng, S. (2020). Rhizobia at extremes of acidity, alkalinity, salinity, and temperature. In: *Microbial Versatility in Varied Environments* 51-65. Springer, Singapore.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Vista del área experimental



**Anexo 2.** Tomando los datos de altura y diámetro del 1er entrenudo



**Anexo 3.** Vista de *Vicia faba* crecidas en S1 (SF), sin germinar en S2 (SI) y S2+NPK, a las 5 semanas después de la germinación.



**Anexo 4.** Plantas de *Phaseolus lunatus*, a las 5 semanas después de la germinación, y crecidas en S1 (SF), S2 (SI), S1+S2 y S2+NPK.



**Anexo 5.** Plantas de *Phaseolus vulgaris* a las 3 semanas después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos.



**Anexo 6.** Nódulos del tipo determinado en raíces de *Phaseolus vulgaris*.



**Anexo 7.** Plantas de *Vigna unguiculata*, a los 3 (foto izquierda) y 5 semanas (foto derecha) después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos.



**Anexo 8.** Plantas de *Cajanus cajan*, a los 3 (foto izquierda) y a las 12 semanas (foto derecha) después de la germinación, y sometidas a distintos tratamientos



**Anexo 9.** Nódulos del tipo indeterminado en raíces de *Cajanus cajan*.

