



Identificación de rizobios promotores del crecimiento vegetal asociados a garbanzo (*Cicer arietinum* L.)¹

Rizobia identification promoters of the vegetable growth associated to chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Marisel Ortega García², Yoania Ríos Rocafull², Lily Zelaya Molina³, Juan Lara Aguilera³,
Ramón Arteaga Garibay³, María Caridad Nápoles García⁴

¹ Recepción: 25 de mayo, 2022. Aceptación: 8 de agosto, 2022. Este trabajo forma parte de una tesis doctoral del primer autor, titulada “Selección de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y simbioses. Propuesta de fertilización al cultivo”, la cual se encuentra respaldada y financiada por el proyecto Nacional “Estudio de la diversidad de rizobios asociados a legumbres para la adaptación al cambio climático en agroecosistemas de Cuba.

² Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), La Habana, Cuba. subdircientifica@inifat.co.cu (autora para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-8076-2675>); dpagrobiotec@inifat.co.cu (<https://orcid.org/0000-0003-1774-0868>).

³ Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. lilyzelayam@yahoo.com.mx (<https://orcid.org/0000-0002-3474-3289>); ing.juanlara@yahoo.com (<https://orcid.org/0000-0002-4702-6094>); arteaga.ramon@inifap.gob.mx (<https://orcid.org/0000-0002-5745-8149>).

⁴ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque, Cuba. tere@inca.edu.cu (<https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>).

Resumen

Introducción. *Rhizobium* ha sido utilizado como estimulador del crecimiento en leguminosas. Diferentes especies de este grupo se asocian al garbanzo (*Cicer arietinum* L.), por lo que resulta importante obtener aislados con capacidad de beneficiar su crecimiento y productividad. **Objetivo.** Seleccionar e identificar aislados de *Rhizobium* sp. en cuanto a sus atributos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con mayor efectividad en su asociación a cultivares de garbanzo. **Materiales y métodos.** Los estudios se realizaron entre los años 2017-2020, en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, La Habana, Cuba. Se identificaron por secuenciación del gen 16S ARN tres cepas de rizobios, obtenidas de nódulos de garbanzo y se caracterizaron por su potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se realizó un experimento en condiciones de campo en dos campañas para demostrar su efectividad en la interacción con las plantas. Para los experimentos en condiciones de laboratorio se utilizó un diseño completamente aleatorizado, mientras que los ensayos en campo se realizaron bajo un diseño de bloques al azar, en ambos casos se realizó un análisis de varianza. **Resultados.** Las tres cepas bacterianas asociadas al garbanzo e identificadas como *Rhizobium* sp., fijaron nitrógeno atmosférico, solubilizaron fosfato de calcio, liberaron fitohormonas y fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* y *Fusarium moniliforme*. La inoculación en el garbanzo, incrementó la nodulación y las variables de rendimiento del cultivo número de vainas por planta y masa fresca de los granos (g). **Conclusión.** Se identificaron cepas de *Rhizobium* sp. con atributos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a cultivares nacionales de garbanzo que incrementaron su nodulación y rendimiento.

Palabras claves: taxonomía, caracterización, nodulación, selección, rendimiento.



Abstract

Introduction. *Rhizobium* has been used as a growth stimulator in leguminous. Different species of this group are associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.), so it is important to obtain isolated with capacity of benefitting their growth and productivity. **Objective.** To select and identify isolates of *Rhizobium* sp. in terms of their attributes as plant growth-promoting rhizobacteria with greater effectiveness in their association with chickpea cultivars. **Materials and methods.** The studies were carried out during the years 2017-2020, at the Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, Havana, Cuba. Three rhizobia strains, obtained from chickpea nodules were identified by 16S RNA gene sequencing and characterized for their potential as growth-promoting bacteria. An experiment was carried out in field conditions in two campaigns to demonstrate their effectiveness in the interaction with plants. For the experiments under laboratory conditions a completely randomized design was used, while the field trials were conducted under a randomized block design, in both cases an analysis of variance was performed. **Results.** The three bacterial strains associated with chickpea and identified as *Rhizobium* sp. fixed atmospheric nitrogen, solubilized calcium phosphate, released phytohormones and were able to inhibit the growth of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, and *Fusarium moniliforme*. Inoculation in chickpea increased the nodulation and the crop yield variables such as number of pods per plant and fresh grain mass (g). **Conclusions.** *Rhizobium* sp. strains were identified with attributes as plant growth-promoting bacteria associated with national chickpea cultivars, that increased their nodulation and yield.

Keywords: taxonomy, characterization, nodulation, selection, yield.

Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.), especie de interés para el consumo humano y animal (Apáez Barrios et al., 2020), tiene un contenido proteico de alrededor del 20 %, elevada cantidad de carbohidratos (40 %), alta digestibilidad, es rico en ácidos grasos insaturados y posee pocos elementos antinutritivos (León de la Rocha et al., 2019). Además, a su consumo se le confiere un efecto positivo en la prevención de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer y problemas digestivos (Costa de Camargo et al., 2019).

En Cuba, ante la necesidad de diversificar especies de importancia agrícola, en especial de granos, y de disminuir los costos de producción, el garbanzo cobra cada vez mayor importancia en el país. Constituye un cultivo que se destaca por su valor nutricional y amplia aceptación popular, además de poseer atributos favorables como la tolerancia a la sequía y a las altas temperaturas. Ello lo convierte en un cultivo de interés como parte de la estrategia para mitigar los efectos del cambio climático en la producción de alimentos en el país (Vargas-Blandino & Cárdena-Travieso, 2021).

Los estudios de diversidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) que se asocian al garbanzo, durante largo tiempo se limitaron al género *Mesorhizobium*, con las especies *Mesorhizobium mediterraneum* (Jarvis et al., 1997), *M. ciceri* (Dibut et al., 2005), *M. amorphae*, *M. tianshanse* (Rogel et al., 2011) y nuevas especies de *Mesorhizobium* (Zhang et al., 2020). En los últimos años se ha descrito la presencia de otras especies como *Rhizobium pusense* (Panday et al., 2011), *Rhizobium* sp. (Ali et al., 2015) y *Rhizobium leguminosarum* (Martínez-Hidalgo et al., 2015), lo que demuestra la diversidad de interacciones con el cultivo. En Cuba, aunque se ha demostrado el efecto positivo de la especie *M. cicerii* en el crecimiento y rendimiento del garbanzo (Dibut et al., 2005; Shagarodsky et al., 2001), no se han detectado ni evaluado otros microorganismos. La cepa utilizada como base de los inoculantes, ha perdido efectividad (Amaro-Arroche, 2012), por lo que resulta necesario buscar cepas más eficientes que se asocien a variedades de interés nacional que

constituyan una herramienta necesaria para su manejo (Di Benedetto et al., 2017), mediante beneficios como la fijación de nitrógeno, absorción de los nutrientes, mejoras en la estructura del suelo, entre otras (Altaf & Ahmad, 2017; Sánchez López & Pérez Pazos, 2018).

Dentro de los microorganismos que más se destacan como PGPB se encuentra el género *Rhizobium* (Ali et al., 2015), el cual presenta actividad como solubilizador de fosfatos, mecanismo que le permite un aporte entre el 20-40 % de las necesidades de fósforo del cultivo (Hussain et al., 2018), nutriente fundamental en el proceso de fijación de nitrógeno (Velázquez et al., 2019). También sobresalen géneros como *Mesorhizobium* (Imen et al., 2015) y *Rhizobium* (Khaitov et al., 2020), ya que disminuyen el pH del medio extracelular producto de la liberación de ácidos orgánicos como el ácido 2-cetoglucónico (Goswami et al., 2016). Además, producen compuestos indólicos del tipo AIA, que actúa como molécula de señalización en la comunicación entre la planta y el microorganismo (Li et al., 2018), y posibilita la penetración de los rizobios mediante el intercambio de señales bioquímicas emitidas por el microsimbionte (Lebrazi et al., 2020).

Investigaciones sobre los beneficios de utilizar PGPB han documentado el incremento de los rendimientos con la aplicación de *Rhizobium* sp. en diferentes leguminosas sorgo y frijol, respectivamente (Korir et al., 2017; Mohamed Haasanien et al., 2017).

El presente estudio se realizó con el objetivo de seleccionar e identificar aislados de *Rhizobium* sp. en cuanto a sus atributos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con mayor efectividad en su asociación a cultivares nacionales de garbanzo.

Materiales y métodos

Identificación taxonómica de bacterias

Entre los años 2017 y 2020, se utilizaron tres cepas de bacterias obtenidas de nódulos de garbanzo y conservadas en glicerol al 20 % de la Colección de Bacterias Beneficiosas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT) en Cuba, y por ultracongelación en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) en Tepatitlán de Morelos, México, bajo los códigos R1:CM-CNRG 560, R2:CM-CNRG 561 y R3: CM-CNRG 562. Todas se revitalizaron en el medio de cultivo levadura manitol agar (LMA) (Vincent, 1970), para su estudio.

Con el fin de extraer el ADN genómico, los aislados se cultivaron en medio triptona extracto de levadura (TY, por sus siglas en inglés) (Josey et al., 1979), durante 24 h, a 30 °C. Una colonia aislada se suspendió en 100 μ L de agua ultra pura estéril y se centrifugó (equipo HERMLE Z 207 M) durante 2 min a 19 000 g. Las células se resuspendieron en una solución de 100 μ L de hidróxido de sodio (NaOH, 0,05 M), posteriormente se calentó a 100 °C, durante 4 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 900 μ L de agua destilada estéril y se centrifugó a 19 000 g por 2 min. Se retiraron 700 μ L del sobrenadante, este se mezcló con igual volumen de glicerol al 25 % (v/v) y se conservó a -20 °C.

La amplificación parcial del gen ARNr 16S, se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador (SelectCycler). Se utilizaron los iniciadores 27f (secuencia 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') y 1492r (5'- CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT -3') (Bautista et al., 2017).

La mezcla de reacción consistió en: 2 μ L de cada cebador a una concentración de 10 μ M, 25 μ L de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 4,0 μ L de ADN y 17 μ L de agua ultra pura. Para la PCR se empleó un termociclador con la siguiente programación: desnaturalización inicial a 95 °C, 5 min, treinta ciclos de 95 °C por 30 s (desnaturalización) 59 °C por 30 s (hibridación o alineamiento) y 72 °C, 90 s (extensión), y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (m/v) en buffer Tris acetato EDTA (TAE) 1X. La corrida se realizó durante 40 min a 90 V.

Los geles se fotografiaron con el empleo de un foto documentador GoodView (Beijing SBS. GenetechCo. Ltd.), en una relación de 1 μ L:50 mL (colorante: agarosa). El tamaño correcto del amplicón (1500 pares de bases) se confirmó mediante su comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kbDNA Ladder (Thermo Scientific #SM1332), al exponer el gel a luz ultravioleta. Los productos de la PCR se enviaron a secuenciar a la empresa MACROGEN Inc., Corea.

Las secuencias entregadas en formato *.abi se transformaron a formato FASTA con el programa BioEdit versión 7.0.9.0. Se analizaron en las bases de datos del NCBI, mediante el programa MegaBlast versión 2.2.22 y se construyó una minería de secuencias homólogas del GenBank, por medio del programa ClustalX, versión 2.0. Se generó el alineamiento que se editó con el programa Seaview versión 4.0. Con la secuencia consenso, se realizó un nuevo análisis en el programa MegaBlast versión 2.2.22, para determinar la reconstrucción filogenética de las secuencias. Se utilizó como criterio para establecer la categoría de género, una identidad porcentual mayor al 99 %. La asignación final de identidades se realizó con base en la concordancia de la comparación de la agrupación de las secuencias con secuencias homólogas y la identidad porcentual mayor al 99 % en las bases de las plataformas BLAST (base de nucleótidos y de 16S de Bacterias y Archeas), leBiBi y EzBiocloud.

Caracterización de los microorganismos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Se evaluó de forma cualitativa la fijación biológica de nitrógeno (FBN), según la metodología propuesta por Elbeltagy et al. (2001). Se utilizó el medio de cultivo específico NFb semisólido (Baldani et al., 2014). El crecimiento microbiano se evaluó entre dos y cinco días, a partir del halo de crecimiento en el medio de cultivo, lo que se consideró como resultado positivo, por el acercamiento a la capacidad de fijar nitrógeno. La temperatura de incubación fue de 28-30 °C. Se utilizaron cinco tubos por aislado, en las dos repeticiones del ensayo. Los aislados que crecieron se cultivaron mediante cuatro pases sucesivos en el mismo medio de cultivo sin nitrógeno, para asegurar que no crecieron a expensas de trazas de N del medio anterior.

Para evaluar la solubilización de fosfatos, los microorganismos se inocularon con un asa bacteriológica en cuatro puntos distantes de la superficie del medio de cultivo NBRIP sólido (Shekhar Nautiyal, 1999), vertido en cajas Petri de 90 mm. Se midió con un pie de rey (0,05 mm de error) el halo de solubilización que se formó alrededor de la colonia a las 72 h de incubación a 30 °C de temperatura. Se utilizaron cinco cajas para cada aislado, en las dos repeticiones del ensayo.

Se utilizó la metodología de Glickmann & Dessaux (1994) para medir la producción de compuestos indólicos de las bacterias. Los microorganismos se inocularon a partir de una asada en 5 mL de medio de cultivo caldo triptona soya (TSC) y se incubaron en un agitador orbital durante 24 h, a 120 rpm y 28-30 °C. Los cultivos bacterianos obtenidos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min y al sobrenadante se añadió 500 μ L del reactivo de Salkowski. La mezcla se incubó por 30 min en reposo, oscuridad y temperatura de 30 °C. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de espectro visible a $\lambda=535$ nm. Además, se realizó una curva patrón con soluciones de 5, 10, 15, 20, 60 y 80 μ g mL⁻¹ de ácido indol acético (AIA sintético). El contenido de compuestos indólicos se expresó como μ g mL⁻¹. Se emplearon cinco réplicas para cada aislado.

Para obtener la actividad antagonista de las PGPB, se utilizó el método descrito por Goberlak et al. (2014). Se prepararon suspensiones celulares desde los aislados en 9 mL de agua destilada estéril, a una concentración aproximada de 10⁸ UFC/mL, según escala de McFarland (1907). Se tomó 1 mL de cada suspensión y se inoculó a profundidad en 10 mL del medio de cultivo agar avena (Vieille Oyarzo et al., 2019) vertido en cajas Petri de 90 mm de diámetro. Después de 4 h, se colocó en el centro de las cajas inundadas un disco de 7 mm de diámetro de las cepas 2675 de *Fusarium oxysporum*, 2022 de *Fusarium chlamydosporum* y 2360 de *Fusarium moniliforme*, procedentes de la Colección de Hongos del INIFAT [853 de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés)]. Las cajas se incubaron a 30 °C de temperatura durante siete días, hasta que el

micelio cubrió toda la superficie del medio de cultivo. Luego se midió el diámetro del micelio fúngico con pie de rey (0,05 mm de error). Se calculó el porcentaje de inhibición micelial (IM) según la ecuación 1.

$$IM (\%) = \frac{dmc - dt}{dmc} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

dmc: diámetro del micelio del tratamiento control.

dt: diámetro del micelio de los tratamientos correspondientes a los aislados.

Crecimiento y rendimiento de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) variedad Nacional-29 inoculada con cepas de *Rhizobium* sp. en condiciones de campo

Las cepas de *Rhizobium* sp. se aplicaron en el garbanzo en condiciones de campo en lotes agrícolas del INIFAT, en un suelo Ferralítico Rojo Compactado (Hernández Jiménez et al., 2015), caracterizado por una fertilidad baja, con bajos valores de materia orgánica, pH neutro, bajo contenido de sodio, alto de calcio y niveles medios de fósforo y potasio (Martínez-Rodríguez et al., 2021) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Propiedades químicas del suelo Ferralítico Rojo utilizado en la investigación. Cuba. 2017.

Table 1. Chemical properties of the Red Ferralitic soil used in the investigation. Cuba. 2017.

Materia orgánica (%)	pH KCL	P ₂ O ₅ mg 100 g ⁻¹	K ⁺	cmol _c kg ⁻¹		
				Na ⁺	Mg ⁺	Ca ⁺
2,03	7,45	22,95	1,34	0,04	1,30	20,33
2,07	7,48	23,02	1,28	0,07	1,27	20,74

Para la caracterización del suelo se colectaron muestras aleatorias a una profundidad de 0–20 cm de la capa arable y se conformó una muestra compuesta. El porcentaje de materia orgánica se determinó por el método de Walkley y Black y el pH por el método potenciométrico con una relación suelo: solución de KCl 1:2,5. Para cuantificar el P₂O₅ asimilable (mg kg⁻¹), se realizó una extracción con H₂SO₄ 0,1 Mol L⁻¹, con una relación suelo: solución de 1:25. Los cationes intercambiables (cmol_c kg⁻¹) se obtuvieron mediante una extracción con NH₄Ac 1 Mol L⁻¹ a pH 7. Los cationes se determinaron por complejometría (Ca y Mg) y por fotometría de llama (Na y K). El contenido de K₂O (mg kg⁻¹) se calculó a partir del K intercambiable (Paneque Pérez et al., 2010).

Se utilizó garbanzo de la variedad Nacional 29, cuya semilla certificada procedió del Banco de Germoplasma del INIFAT. La siembra se realizó de forma manual. El ensayo contó con cuatro réplicas por tratamiento y un tamaño de parcela de 30 m², con seis surcos de 5 m de largo por 6 m de ancho para cada tratamiento y una distancia entre plantas de 0,20 m y 0,70 m entre surcos. El cultivo se regó en el momento de la siembra (etapa R1 de inicio de la floración) y después de esta (etapa R3 de formación de vainas). El control cultural fue el recomendado para el cultivo en Cuba (Shagarodsky et al., 2021).

Se utilizaron cinco tratamientos: testigo absoluto sin aplicación de microorganismos ni fertilizantes, testigo fertilizado a una dosis de 100 kg ha⁻¹ de N que se aplicó al fondo del surco y las tres cepas (R1, R2 y R3). Los inóculos con una concentración de 2,4 x 10¹⁰ UFC/mL se obtuvieron mediante un proceso de fermentación sumergida en zaranda orbital en medio de cultivo LM (Vincent, 1970) con una agitación orbital de 200 rpm, durante 48 h y a una temperatura de 30 °C. Los microorganismos se aplicaron por imbibición de las semillas durante 15 min, a razón

de 1:10 (v:v). Para los tratamientos testigos, las semillas se embebieron en agua común durante igual periodo. En todos los casos, las semillas se orearon a la sombra sobre un tamiz, antes de proceder a la siembra.

A los 60 días después de la siembra, correspondiente a la etapa de máxima nodulación del cultivo (Dibut et al., 2005), se extrajeron diez plantas por cada tratamiento, se removieron con ayuda de una pala, para evitar el desprendimiento de los nódulos, se lavaron las raíces y separaron los nódulos a los que se les determinó su número (u) y masa seca por planta (g), esto último después de mantener las raíces en una estufa a una temperatura de 70 °C, durante 72 h. En el momento de la cosecha, se desecharon los bordes de cada parcela y se utilizaron diez plantas por surco para determinar a cada una de ellas los siguientes indicadores: longitud de la raíz (cm), altura (cm), ancho de la copa (cm), número de ramas primarias (u), número de vainas (u) y masa fresca de los granos (g). Las mediciones de la longitud de las raíces, altura y ancho de la copa de las plantas, se realizaron con una regla graduada. La masa de los nódulos y de las 100 semillas se determinó con una balanza semi-analítica (0,01 g de error). Para cuantificar la masa fresca de los granos se utilizó una balanza de precisión (1 g de error).

En los ensayos cuantitativos que se realizaron en condiciones de laboratorio, como la solubilización de fosfatos, la producción de indoles y la actividad antagonista, se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Para los experimentos que se ejecutaron en condiciones de campo se usó un diseño de bloques al azar y para el procesamiento se utilizó la media de los datos de las dos campañas. Una vez obtenidos los resultados, se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas (pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Cochran C, Hartley y Bartlett), se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % de significancia, con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus versión 5.0

Resultados

Identificación taxonómica de bacterias

El árbol filogenético con los resultados de similitud de las secuencias del gen ARNr 16S de los tres aislados de rizobios R1, R2 y R3 se muestra en la Figura 1. El análisis filogenético indicó que las cepas pertenecen al género *Rhizobium* y compartieron un 99,80 % de homología con dos cepas de referencia de la especie *Rhizobium pusense*, aunque también manifestaron cercanía al género *Agrobacterium*, las especies *A. salinitolerans* y *A. fabrum*, y en menor cuantía a *Rhizobium pongamiae* y *A. larrymoorei*, lo que se corrobora en el Cuadro 2.

Caracterización de los microorganismos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las tres cepas de *Rhizobium* mostraron crecimiento en el medio NFb después de cinco días de incubación. Ello sugiere su posible capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, ya que dicho medio de cultivo no dispone de otra fuente de este nutriente para el crecimiento de la bacteria. El control no inoculado no mostró crecimiento (Figura 2).

La estimación de la actividad solubilizadora de fósforo constituye una herramienta para la selección de aislados promisorios para la biofertilización. Los mayores valores tanto del halo de solubilización como del AIA liberado al medio de cultivo correspondieron a la cepa R3 y los menores para la cepa R2 (Cuadro 3).

La presencia de las bacterias en el medio de cultivo inhibió al menos en un 30 % el crecimiento de *Fusarium incarnatum*, *F. chlamydosporum* y *F. oxysporum*. Se destacó por su efecto como controlador biológico la cepa R1, aunque la cepa R3 presentó un porcentaje de inhibición micelial superior al 60 % tanto para *F. moniliforme* como para *F. oxysporum* (Cuadro 4).

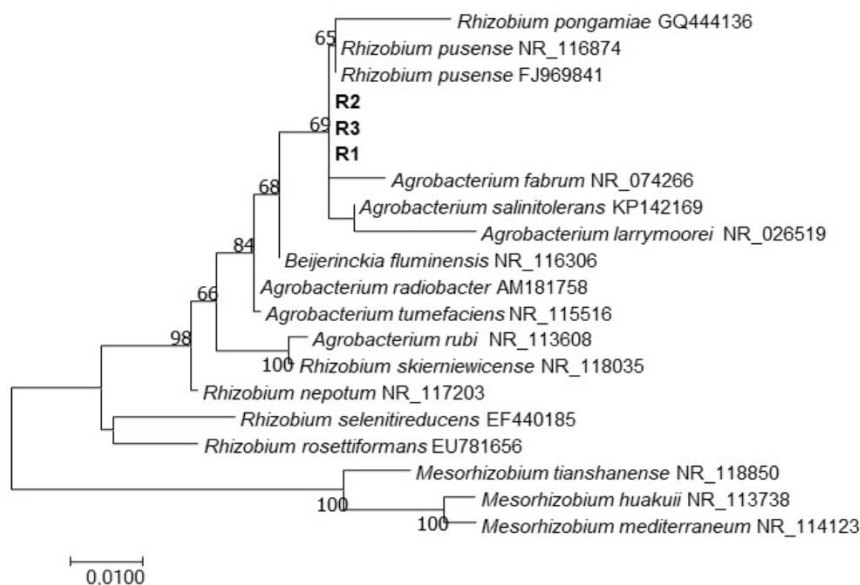


Figura 1. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas de rizobios R1, R2 y R3, generado con el programa MEGA 7, con el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica de K2P+G+I. Todos los números indican los valores de bootstrap con 1000 repeticiones. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2017.

Figure 1. Phylogenetic tree of the 16S ARNr sequences gene of the strains R1, R2, and R3, generated with the program MEGA 7, using the maximum likelihood method and the nucleotide substitution of K2P+G+I model. All the numbers indicate the bootstrap values with 1000 repetitions. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, Mexico. 2017.

Cuadro 2. Similitud de las secuencias del gen 16S ARNr para las cepas de rizobios en estudio con diversas especies. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2017.

Table 2. Similarity of the 16S ARNr gene sequences for rhizobia strains in study with diverse species. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, Mexico. 2017.

Aislado	Identidad	Longitud de la secuencia (pb)	Número de acceso del Genbank	Especie	Cepa tipo más probable		Referencia
					Número de acceso del Genbank	Similitud (%)	
R1	<i>Rhizobium</i> sp.	1366	MK108015	<i>Rhizobium pusense</i>	FJ969841	99,8	Panday et al. (2011)
R2		1345	MK108016	NRCPB10	LC460882	99,6	Artigas Ramírez et al. (2020)
R3		1365	MK108017	AmV15	LC460882	100,0	
				<i>Rhizobium pusense</i>		99,8	
				AmV15		99,6	Artigas Ramírez et al. (2020)
				<i>Agrobacterium salinitolerans</i> YIC 5082	KP142169	100,0	Zafar et al. (2011)
						99,5	
						99,7	
				<i>Agrobacterium fabrum</i> ATCC:33970	NR_074266	99,3	Zafar et al. (2011)
						99,4	
						99,5	

R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: cepa R3. / R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3.

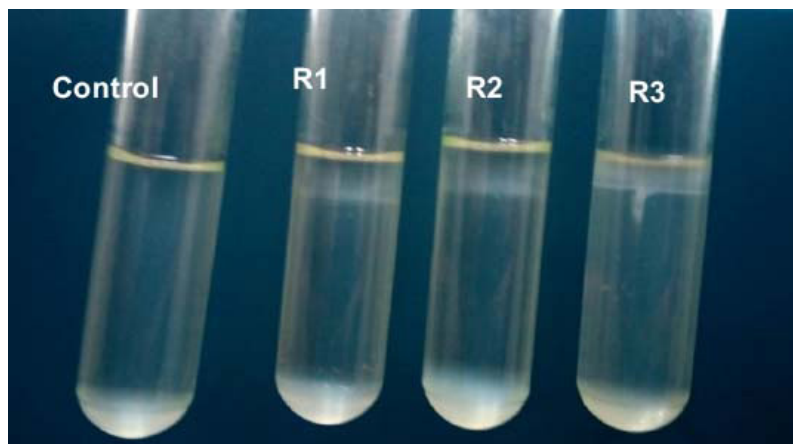


Figura 2. Halo de crecimiento que muestra la capacidad de fijación biológica del nitrógeno en el medio de cultivo NFb por aislados de rizobios asociados al cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Cuba. 2017.

Figure 2. Growth halo that shows the capacity of biological nitrogen fixation in the medium NFb cultivation of rizobia associated to chickpea (*Cicer arietinum* L.). Cuba. 2017.

Cuadro 3. Solubilización de fosfato tricálcico en el medio de cultivo Pikoskaya y liberación de AIA por parte de tres cepas de *Rhizobium pusense*. Cuba. 2017.

Table 3. Solubilización of tricalcium phosphate in Pikoskaya crop medium and AIA release by three *Rhizobium pusense* strains. Cuba, 2017.

Cepas	Solubilización de fosfato tricálcico en medio de cultivo Pikoskaya (cm)	Producción de compuestos indólicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en medio de cultivo Caldo Triptona soya con triptófano
R1	0,17 b	15,24 b
R2	0,10 c	10,17 c
R3	0,28 a	21,01 a
ESx	0,087	0,047

R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: cepa R3. Letras iguales no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, $\alpha=0,05$, $n=10$. / R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3. Same letters don't differ significantly to each other, according to the test of Multiple Ranges of Duncan, $\alpha=0.05$, $n=10$.

Crecimiento y rendimiento de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) variedad Nacional-29 inoculadas con cepas de *Rhizobium* sp. en condiciones de campo

La aplicación de las cepas R1, R2 y R3 de *Rhizobium* sp. sobre la variedad Nacional-29 de garbanzo, demostró resultados positivos en las variables estudiadas. Se destacó por su efecto en los indicadores del crecimiento la cepa R3, la cual estimuló en mayor proporción la longitud de la raíz, el ancho de la copa, la masa seca por plantas y el número de ramas primarias, con respecto a las restantes cepas y los testigos utilizados (Cuadro 5).

Cuadro 4. Actividad antagonista de tres cepas de *Rhizobium* sp. frente a los patógenos *Fusarium incarnatum*, *F. chlamydosporum* y *F. oxysporum*. Cuba. 2017.

Table 4. Antagonistic activity of three strains of *Rhizobium* sp. against the pathogens *Fusarium incarnatum*, *F. chlamydosporum* and *F. oxysporum*. Cuba. 2017.

Cepas	Inhibición micelial (%)		
	<i>F. incarnatum</i>	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>F. oxysporum</i>
R1	88,83 a	60,47 a	44,72 b
R2	78,06 c	50,77 b	44,43 b
R3	86,62 b	30,76 c	60,46 a
Esx	0,650	0,301	0,342

R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: cepa R3. Letras iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, $\alpha = 0,05$, $n=10$. / R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3. Same letters in the same column don't differ significantly to each other, according to the test of Multiple Ranges of Duncan, $\alpha = 0,05$, $n=10$.

Cuadro 5. Efecto de tres cepas de *Rhizobium* sp. en el crecimiento del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) variedad Nacional-29, en condiciones de campo. Cuba. 2017.

Table 5. Effect of three strains of *Rhizobium* sp. in the growth of the chickpea cultivation (*Cicer arietinum* L.) variety National-29 under field conditions. Cuba. 2017.

Tratamientos	Altura (cm)	Longitud raíz (cm)	Ancho copa (cm)	Masa seca (g)	Número de ramas primarias (u)
Testigo absoluto	53,0 ab	7,2 b	25,25 d	55,2 c	2,04 d
Testigo fertilizado	55,6 a	8,8 b	27,09 bc	58,8 a	2,46 c
R1	52,8 bc	9,6 b	27,61 b	57,8 a	2,64 b
R2	54,4 ab	9,2 b	26,46 c	56,4 bc	2,46 c
R3	50,2 c	12,2 a	31,22 a	57,8 a	3,02 a
Esx	2,581	2,362	2,200	2,160	0,341

R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: cepa R3. Letras iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, $\alpha = 0,05$, $n= 10$. / R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3. Same letters in the same column don't differ significantly to each other, according to the test of Multiple Ranges of Duncan, $\alpha = 0,05$. $n=10$.

Las plantas inoculadas con la cepa R3 mostraron un mayor número y masa seca de los nódulos con respecto a las plantas inoculadas con el resto de las cepas de *Rhizobium* sp. y los tratamientos testigos (Figura 3), al igual que sucedió con los indicadores asociados al rendimiento del cultivo (Figura 4).

Discusión

El análisis filogenético mostró que las tres cepas en estudio pertenecen al género *Rhizobium*, de ahí que sea posible su presencia asociada a esta especie vegetal bajo las condiciones de Cuba, aunque este constituye el primer informe que muestra su presencia en el cultivo del garbanzo.

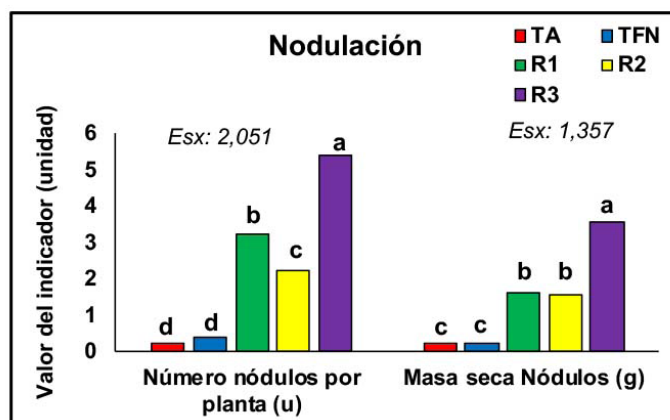


Figura 3. Número y masa de los nódulos de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de la variedad Nacional-29 inoculadas y no inoculadas con tres cepas de *Rhizobium* sp. Cuba. 2017.

TA: testigo absoluto, TFN: testigo fertilizado, R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: cepa R3. Letras iguales no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, $\alpha = 0,05$, $n = 10$.

Figure 3. Number and nodules mass of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants of the Nacional-29 variety inoculated and not inoculated with three *Rhizobium* sp. strains. Cuba. 2017.

TA: absolut control, TFN: fertilized control, R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3. Same letters in the same column don't differ significantly to each other, according to the test of Multiple Ranges of Duncan, $\alpha = 0.05$, $n = 10$.

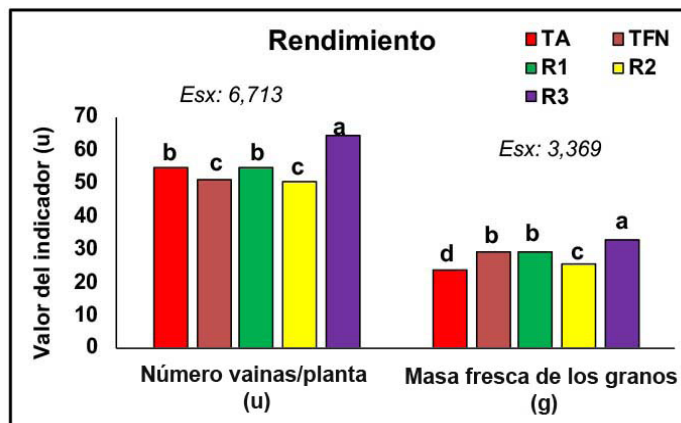


Figura 4. Comportamiento de componentes del rendimiento de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en la variedad Nacional-29, inoculadas y no inoculadas con tres cepas de *Rhizobium* sp. Cuba. 2017.

TA: testigo absoluto, TFN: testigo fertilizado, R1: cepa R1, R2: cepa R2, R3: Letras iguales no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, $\alpha = 0,05$, $n = 10$.

Figure 4. Yield behavior of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants in the Nacional-29 variety, inoculated and not inoculated with three *Rhizobium* sp. strains. Cuba. 2017.

TA: absolut control, TFN: fertilized control, R1: strain R1, R2: strain R2, R3: strain R3. Same letters in the same column don't differ significantly to each other, according to the test of Multiple Ranges of Duncan, $\alpha = 0.05$, $n = 10$.

Las tres cepas de *Rhizobium* (R1, R2 y R3) mostraron mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal (Moreno Reséndez et al., 2018), al fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato de calcio, liberar fitohormonas y presentar actividad antagonista ante *F. chlamyosporum*, *F. oxysporum* y *F. incarnatum*. La fijación de nitrógeno es una característica de los rizobios descrita para diferentes especies de este grupo bacteriano (Madigan et al., 2017), a la cual se asocia gran parte de los beneficios de la aplicación de estas bacterias promotoras del crecimiento en leguminosas.

Varios autores describieron para los rizobios la capacidad de liberar AIA dentro de sus productos metabólicos, y le atribuyeron parte del efecto estimulador que se obtuvo mediante su aplicación (Flórez-Márquez et al., 2017; Singha et al., 2017). Otros comprobaron que los rizobios producen valores de AIA entre 3 y 47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Hernández Forte & Nápoles García, 2019), donde se insertan los obtenidos en esta investigación para las cepas R1, R2 y R3.

Las tres cepas de *Rhizobium* en estudio limitaron el crecimiento de *F. incarnatum*, *F. chlamyosporum* y *F. oxysporum*. La fusariosis vascular del garbanzo es una enfermedad que puede comprometer hasta el 40 % de la producción. De ellas se destacan como las enfermedades más importantes asociadas a esta especie vegetal las causadas por *F. oxysporum* (Fierros Leyva et al., 2019), de ahí que resulte importante su control.

La aplicación de las tres cepas de *Rhizobium* en la variedad Nacional 29 de garbanzo en condiciones de campo, demostró que esta especie bacteriana estimuló la nodulación, el crecimiento y el rendimiento del cultivo, incluso con resultados superiores a la fertilización nitrogenada, cuando se establece la interacción de la planta con la cepa R3. El incremento de la longitud de la raíz con la inoculación de esta cepa puede tener un efecto directo en el rendimiento del garbanzo, pues una mayor profundidad en las raíces permite al cultivo beneficiarse de los nutrientes con mayor facilidad (Di-Benedetto et al., 2017).

En el caso de los nódulos todos mostraron presencia de los mismos en la raíz primaria y las raíces secundarias e incrementaron en número y masa cuando se inocularon las cepas de *Rhizobium*, lo que indica una mayor afinidad entre estas cepas y el cultivar, una mayor colonización del sistema radicular y un mayor establecimiento de los bacteroides dentro de los nódulos, evidenciado por la mayor masa nodular (Velázquez et al., 2017). Además, eran nódulos efectivos (Molina-Romero et al., 2015), lo que se asocia con un proceso de fijación simbiótica de nitrógeno más eficiente que podría reflejarse en el aumento de la biomasa de la planta y en su rendimiento (Stringlis et al., 2018).

Con la aplicación de las cepas R1, R2 y R3, aun cuando mostraron diferencias en los resultados alcanzados para los indicadores del crecimiento y rendimiento, se demostró su potencial para la inoculación de la variedad Nacional 29, bajo las condiciones edafoclimáticas de Cuba.

Conclusiones

Se identificaron cepas de *Rhizobium* sp. con atributos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a cultivares nacionales de garbanzo e incrementaron la nodulación y el rendimiento de esta leguminosa.

Referencias

- Altaf, M. M., & I. Ahmad. (2017). *In vitro* and *in vivo* biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization. *Rhizosphere*, 3(1), 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.009>
- Ali, A., Khalid, R., Ali, S., Akram Z., & Hayat, R. (2015). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *British Microbiology Research Journal*, 6(1), 32–40. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/14496>

- Amaro-Arroche, E. J. (2012). Evaluación del balance de nitrógeno en suelos cultivados con garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Revista Avances*, 14(3), 219–228.
- Apáez Barrios, M., Escalante Estrada, J. A. S., Apáez Barrios, P., & Álvarez Hernández, J. C. (2020). Producción, crecimiento y calidad nutricional del garbanzo en función del nitrógeno y fósforo. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1273–1284. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2226>
- Artigas Ramírez, M. D., España, M., Lewandowska, S., Yuan, K., Okazaki, S., Ohkama-Ohtsu, N., & Yokoyama, T. (2020). Phylogenetic analysis of symbiotic bacteria associated with two *Vigna* species under different agro-ecological conditions in Venezuela. *Microbes and Environments*, 35(1), article ME19720. <http://doi.org/10.1264/j sme2.ME19120>
- Baldani, J. I., Massena Reis, V., Sampaio Videira, S., Boddey, L. E., & Divan Baldani, V. L. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384, 413–431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Bautista, V. V., Barcellano, E. V., Monsalud, R. G., & Yokota, A. (2017). Isolation and identification of bacteria from root nodules of Philippine legumes using 16S rRNA gene sequencing. *The Philippine Agricultural Scientist*, 100(1), 103–117.
- Costa de Camargo, A., Trevenzoli Favero, B., Caldeira Morzelle, M., Franchin, M., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Vilar Geraldí, M., Maróstica Júnior, M. R., Shahidi, F., & Schwember, A. R. (2019). Is Chickpea a Potential Substitute for Soybean? Phenolic Bioactives and Potential Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), Article 2644. <https://doi.org/10.3390/ijms20112644>
- Di Benedetto, N. A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Cataldi, M. P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Flagella, Z. (2017). The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology*, 3(3), 413–434. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
- Dibut, B., Shagarodsky, T., Martínez, R., Ortega, M., Ríos, Y., & Fey, L. (2005). Biofertilización del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) con *Mesorhizobium cicerii* cultivado sobre suelo Ferralítico Rojo. *Cultivos Tropicales*, 26(1), 5–9. <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/408>
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in plant a nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285–5293. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5285-5293.2001>
- Fierros Leyva, G. A., Acosta Gallegos, J. A., Ortega Murrieta, P. F., Padilla Valenzuela, I., Álvarez Bravo, A., Ramírez Soto, M., & Velarde Félix, S. (2019). Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(1), 131–142. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1730>
- Flórez-Márquez, J. D., Leal-Medina, G. I., Ardila-Leal, L. D., & Cárdenas-Caro, D. M. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*, 51(4), 373–391. <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1298>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1994). A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793–796. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.793-796.1995>
- Goberlak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2014). The impact of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi. *Folia Biologica et Oecologica*, 10, 107–112. <https://doi.org/10.2478/fobio-2014-0008>

- Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C., & Tejada Moral, M. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), Article 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Hernández Forte, I., & Nápoles García, M. C. (2019). Rhizobia promote rice (*Oryza sativa* L.) growth: First evidence in Cuba. In F. González-Andrés, D. Zúñiga-Davila, & E. Ormeño-Orrillo (Eds.), *Microbial probiotics for agricultural systems: Advances in agronomics use* (pp. 155–168). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_10
- Hernández Jiménez, A., Pérez Jiménez, J. M., Bosch Infante, D., & Castro Speck, N. (2015). *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and drought stresses in crop plants: Implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00393>
- Imen, H., Neila, A., Adnane, B., Manel, B., Mabrouk, Y., Saidi, M., & Bouazis, S. (2015). Inoculation with phosphate solubilizing *Mesorhizobium* strains improves the performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 38(11), 1656–1671. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1061543>
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernández, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895–898. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>
- Josey, D. P., Beynon, J. L., Johnston, A. W. B., & Beringer, J. E. (1979). Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Applied Bacteriology*, 46(2), 343–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb00830.x>
- Khaitov, B., Karimov, A., Abdiev, A., Farrukh, J., & Park, K. (2020). Beneficial effect of Rhizobium inoculation on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in saline soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(1), 96–104. <https://www.agrojournal.org/26/01-12.html>
- Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y., & Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of Rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>
- Lebrazi, S., Fadiel, M., Chraibi, M., & Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, Article 21. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00035-9>
- León de la Rocha, J. F., Sariol Sánchez, D. M., & Juárez Cortez, J. A. (2019). Efecto de la fertilización nitrogenada y fechas de siembra en el cultivo de garbanzo (*Cicer Arietinum* L.) en Tehuacán, Puebla, México. *Roca. Revista científico - Educativa de la Provincia Granma*, 15(3), 25–34. <https://revistas.udg.co.cu/index.php/roca/article/view/925>
- Li, Z., Li, Y., Zhang, Y., Cheng, B., Peng, Y., Zhang, X., Ma, X., Huang, L., & Yan, Y. (2018). Indole-3-acetic acid modulates phytohormones and polyamines metabolism associated with the tolerance to water stress in white clover. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.009>
- McFarland, J. (1907). The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176–1178. <http://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>

- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. (2017). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. -D, Menéndez, E., Rivas, R., Carro, L., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., León-Barrios, M., & Velázquez, E. (2015). Cicer canariense, an endemic legume to the Canary Islands, is nodulated in mainland Spain by fast-growing strains from simbiovar trifolii phylogenetically related to *Rhizobium leguminosarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), 346–350. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.011>
- Martínez-Rodríguez, Ó. G., Can-Chulim, Á., Ortega-Escobar, H. M., Bojórquez-Serrano, J. I., Cruz-Crespo, E., García-Paredes, J. D., & Madueño-Molina, A. (2021). Fertilidad e índice de calidad del suelo de la cuenca del río San Pedro en Nayarit. *Terra Latinoamericana*, 39, Article e766. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.766>
- Mohamed Haasanien, S., Afiyah, S. A., El-Hadidy, A. E., & Balah, A. M. (2017). Multifaceted potentialities of some rhizobacteria associated with sorghum plants on their growth and development. *Egyptian Academic Journal of Biological Science, Microbiology*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.21608/EAJBSG.2017.16339>
- Molina-Romero, D, Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24–34. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=207>
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Panday, D., Schumann, P., & Das, S. K. (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), 2632–2639. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028407-0>
- Paneque Pérez, V. M., Calaña Naranjo, J. M., Calderón Valdés, M., Borges Benítez, Y., Hernández García, T. C., & Caruncho Contreras, M. (2010). *Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. <https://bit.ly/31FLAFC>
- Rogel, M., Ormeño-Orillo, E., & Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
- Sánchez López, D. B., & Pérez Pazos, J. V. (2018). Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* in vitro. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 75–91. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780>
- Shagarodsky, T., Chiang, M.L., & López, Y. (2001). Evaluación de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Agronomía Mesoamericana*, 12(1), 95–98. <https://doi.org/10.15517/am.v12i1.17298>
- Shagarodsky, T., Veitia, M., & Cabrera, M. (2021). *Manual para el manejo y producción sostenible del cultivo del garbanzo (Cicer arietinum L.) en Cuba*. Editorial Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”.
- Shekhar Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265–275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Singha, B., Behari Mazumder, P., & Pandey, P. (2017). Characterization of plant growth promoting rhizobia from root nodule of two legume species cultivated in Assam. *Biological Sciences*, 88, 1007–1016. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0836-6>

- Stringlis, I. A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M. C., Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2018). Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *The Plant Journal*, *93*(1), 166–180. <https://doi.org/10.1111/tpj.13741>
- Vargas-Blandino, D., & Cárdenas-Travieso, R. (2021). Cultivo del garbanzo, una posible solución frente al cambio climático. *Cultivos Tropicales*, *42*(1), Article e09. <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1583>
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. -H., & Peix, A. (2019). Bacteria-inducing legume nodules involved in the improvement of plant growth, health and nutrition. In V. Kumar, R. Prasad, M. Kumar, & D. Choudhary (Eds.), *Microbiome in Plant Health and Disease* (pp. 79–104). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0_4
- Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Molina-Martínez, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In A. Zaidi, M. Khan, & J. Musarrat (Eds.), *Microbes for legume improvement* (pp. 1–43). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_1
- Vieille Oyarzo, P., Cruz Choappa, R., & Álvarez Duarte, E. (2019). Diferenciación morfofisiológica y molecular por curvas de melting de alta resolución (HRMA) y secuenciación del complejo *Trichophyton mentagrophytes* en cepas humanas en Valparaíso, Chile. *Revista Argentina de Microbiología*, *52*(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.002>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publications.
- Zafar, M., Abbasi, M. K., Rahim, N., Khaliq, A., Shaheen, A., Jamil, M., & Shahid, M. (2011). Influence of integrated phosphorus supply and plant growth promoting rhizobacteria on growth, nodulation, yield and nutrient uptake in *Phaseolus vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(74), 16793–16807. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/97756>
- Zhang, J., Peng, S., Shang, Y., Brunel, B., Li, S., Zhao, Y., Liu, Y., Chen, W., Wang, E., Pratap Singh, R., & James, E. K. (2020). Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north Central China) and gene flow within symbiotic *Mesorhizobium muleiense* populations. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(4), Article 126089. <https://doi.org/10.1016/j.syam.2020.126089>