

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE DOS CEPAS DE *RHIZOBIUM* SPP. SOBRE LA
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO Y LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL GRANO DE
FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS* L) EN LAS VARIEDADES GUAYMÍ NEGRO Y
CABÉCAR ROJO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de
Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Suelos

KENNETH SEGURA HIDALGO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

DEDICATORIA

A mi familia.

A la Dra. Lidieth Uribe por recibirme, acompañarme y aconsejarme.

A todas las personas que estuvieron presentes y formaron parte de este proceso, cuyos nombres quizás no se mencionen aquí, pero que fueron una parte importante del camino recorrido.

Aunque hoy todo pareciera terminar con este documento, las huellas de las personas, sus consejos, y las decisiones tomadas, se sentirán a través de los años venideros.

¡Muchas gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis por su invaluable ayuda.

A los miembros del tribunal asesor por su anuencia y consejo.

A todas y cada una de las personas que integran el Laboratorio de Microbiología Agrícola por sus consejos, su paciencia y su colaboración.

A las personas del CIGRAS B por su guía y apoyo durante los ensayos realizados allí.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Suelos”

Dr. Pablo Bolaños Villegas
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado

Dra. Lidieth Uribe Lorío
Directora de tesis

Dra. Marcela Dumani Echandi
Asesora

Dra. Andrea Irías Mata
Asesora

Dra. Catalina Salas
Directora

Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales

Kenneth Segura Hidalgo
Candidato

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
RESUMEN	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
MARCO TEÓRICO	5
Importancia nutricional del frijol	5
Simbiosis <i>Rhizobium</i> -frijol.....	6
Factores que determinan el establecimiento de <i>Rhizobium</i> spp.....	8
Temperatura	9
Acidez.....	9
Fósforo	10
Solubilización de hierro.....	11
Salinidad.....	11
Parámetros de calidad de grano.....	13
Polifenoles del grano de frijol	13
Capacidad de imbibición del grano de frijol.....	16
Proteína.....	17

Saponinas	17
METODOLOGÍA	19
Ubicación.....	19
Selección de dos cepas de <i>Rhizobium</i> spp.	19
Tolerancia a diferentes condiciones de la salinidad.	20
Tolerancia a diferentes condiciones de pH.....	20
Sobrevivencia a diferentes temperaturas.	20
Presencia de sideróforos	20
Solubilización de P	21
Tolerancia a diferentes concentraciones de Al ³⁺	21
Evaluación del crecimiento en diferentes concentraciones de Al de 20 cepas de <i>Rhizobium</i>	22
Capacidad de formar nódulos en las variedades utilizadas.....	23
Índice de selección	24
Promoción de crecimiento	24
Efecto de la inoculación de <i>Rhizobium</i> spp sobre la calidad del grano de frijol.	25
Análisis de datos	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Caracterización de las cepas.....	29
Tolerancia a la temperatura	29
Tolerancia a la salinidad.....	30
Tolerancia al pH	32
Capacidad de solubilización de fósforo	33
Producción de sideróforos.....	36
Tolerancia al aluminio	37

Capacidad de nodulación.....	41
Índice de selección.....	41
Promoción de crecimiento.....	43
Análisis foliar.....	45
Efecto de la inoculación de <i>Rhizobium</i> spp sobre la calidad del grano de frijol.....	50
Contenido total de Polifenoles.....	50
Polifenoles solubles e insolubles totales.....	52
Relación de polifenoles solubles / insolubles (RPSI).....	53
Perfil de polifenoles en la fracción soluble.....	54
Ácidos Fenólicos.....	54
Flavonoides en la fracción soluble.....	58
Perfil de polifenoles de la fracción Insoluble.....	60
Contenido de proteína.....	62
Saponinas.....	63
Imbibición.....	65
CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS.....	118
A.1.1. Agar levadura manitol (ALM) medio base.....	118
A.1.3. Agar levadura manitol a diferentes concentraciones de NaCl.....	118
A.1.4. Agar levadura manitol a pH 5,5 y 8.....	118
A.1.5. CAS (cromo azurol sulfonato) blue Agar (sideróforos).....	119
A.1.6 Medio de roca fosfórica (Osorio & Habte, 2001).	119
A.1.7 Medio de Pikovskaya (TM Media, TH543, L M5E3IR01)....	120

A.1.8 Medio base modificado con la adición de fosfato de hierro y aluminio.	121
A.1.9 Caldo levadura manitol con la adición de diferentes concentraciones de aluminio.....	122
ANEXO 4 Datos climáticos	125
Anexo 5. Caracterización de las cepas.....	126
Anexo 3. Análisis químico de suelo	133

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno que resulta de la relación simbiótica entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas de la familia de las leguminosas, como el frijol común, además de los aportes de nitrógeno a la planta, puede interferir en la producción de compuestos bioactivos. **Metodología:** Se realizó una selección de cepas de *Rhizobium* spp procedentes de la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola (LMA - UCR). Para tal efecto, se tomaron en cuenta la tolerancia a la salinidad, temperatura, pH y al aluminio, así como la producción de sideróforos y la solubilización de fósforo. Con las dos cepas mejor valoradas se realizaron dos ensayos en invernadero. Se utilizó suelo autoclavado dos veces a 120°C por un hora y macetas de 5L. En ambos casos, se inocularon semillas de frijol de las variedades Cabécar y Guaymí con una suspensión 10⁸ UFC y con los tratamientos T1 (CIAT899); T2 (CR4019B); T3 (CIAT899 + CR4019B); T4 (Urea) y T5 (Testigo). El primer bioensayo se cosechó en floración y se tomaron muestra de tejido foliar para un análisis químico completo en el Laboratorio de Suelos y Foliar (CIA-UCR). El segundo ensayo, se llevó a cosecha y se realizó la extracción de polifenoles solubles e insolubles en el Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS. **Resultados:** La selección de cepas mostró que las variables de salinidad, producción de sideróforos y solubilización de fósforo fueron las de mayor peso. Las cepas mejor evaluadas fueron la CIAT899 y la CR4019B. El análisis foliar mostró que ambas cepas de *Rhizobium* spp suministran suficiente nitrógeno foliar, con diferencias solamente en la variedad Cabécar entre el T1 y el T5. Microelementos como el Zn presentan diferencias en la variedad Guaymí. El análisis de las fracciones de polifenoles muestra que los tratamientos inoculados presentan mayor contenido de polifenoles solubles y menor contenido de polifenoles insolubles. La relación de polifenoles solubles/insolubles (RSI) mostró que *Rhizobium* afecta el perfil de estos compuestos. Se encontró una posible relación entre el contenido de saponinas y la imbibición del grano. **Conclusiones:** *Rhizobium* parece tener influencia sobre la imbibición del grano en la variedad Guaymí, lo que mejoraría el tiempo de cocción. Además, modifica el perfil de polifenoles del grano y la RSI lo que se relaciona con una mayor capacidad antioxidante.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Índice de selección de cepas de <i>Rhizobium</i> spp.,	42
Cuadro A.2.1. Solución nutritiva libre de nitrógeno	124
Cuadro A.5.1. Prueba de tolerancia a la temperatura de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	126
Cuadro A.5.2. Prueba de tolerancia a la salinidad de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	127
Cuadro A.5.3. Tolerancia de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp., a dos pH	128
Cuadro A.5.4. Capacidad de solubilización de fósforo de 20 cepas de <i>Rhizobium</i>	129
Cuadro A.5.5. Capacidad de producción de sideróforos de cepas de <i>Rhizobium</i> spp	129
Cuadro A.5.6. Tolerancia al aluminio de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	131
Cuadro A.5.7. Porcentaje de susceptibilidad de cepas de <i>Rhizobium</i> spp., a tres concentraciones de aluminio	132
Cuadro A.3.1. Análisis químico completo del suelo utilizado para el ensayo de frijol	133

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Número de cepas de <i>Rhizobium</i> spp. capaces de crecer a 25, 30, 35 y 40°C.....	29
Figura 2.	Prueba de tolerancia a la salinidad de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	31
Figura 3.	Tolerancia a la salinidad de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	31
Figura 4.	Prueba de tolerancia al pH de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	32
Figura 5.	Capacidad de solubilización de fósforo de 20 cepas de <i>Rhizobium</i> spp	33
Figura 6.	Solubilización de fósforo	34
Figura 7.	Capacidad de solubilización de fósforo en medio Pikovskaya's agar para la cepa de <i>Rhizobium</i> spp	34
Figura 8.	Producción de sideróforos en cepas de <i>Rhizobium</i> spp	36
Figura 9.	Sobrevivencia de cepas de <i>Rhizobium</i> spp	38
Figura 10.	Porcentaje de susceptibilidad de cepas de <i>Rhizobium</i> spp	39
Figura 11.	Recuento en plato de bacterias de <i>Rhizobium</i> spp., (UFC / mL) de las cepas CR4019BB y CIAT899	40
Figura 12.	Peso seco de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculadas con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	44
Figura 13.	Contenido de nitrógeno en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp	45
Figura 14.	Unidades SPAD plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	46
Figura 15.	Contenido de fósforo en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	47
Figura 16.	Contenido de potasio en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	48
Figura 17.	Contenido de calcio en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	49
Figura 18.	Contenido de boro en plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculado con <i>Rhizobium</i> spp., en invernadero	50

Figura 19.	Contenido total de polifenoles (solubles + insolubles) presentes en granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp	51
Figura 20.	Contenido total de polifenoles solubles e insolubles presentes en granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.	52
Figura 21.	Relación de los polifenoles solubles / insolubles de granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.....	54
Figura 22.	Concentración de ácido vanílico (1) y siríngico (2) presente en la fracción soluble de granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.	55
Figura 23.	Ácidos fenólicos totales	56
Figura 24.	Concentración de ácidos fenólicos componentes del perfil de polifenoles presentes en la fracción soluble de granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.....	57
Figura 25.	Concentración de flavonoides con significancia estadística componentes del perfil de polifenoles de la fracción soluble de granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.	58
Figura 26.	Flavonoides totales.....	59
Figura 27.	Concentración de Ac. Siríngico y Ac. Vanillico en la fracción insoluble de granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.....	60
Figura 28.	Ácidos fenólicos totales	61
Figura 29.	Contenido de proteína en el grano de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp	63
Figura 30.	Concentración de saponinas en granos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.....	64
Figura 31.	Imbibición del grano de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp.....	65
Figura 32.	Comparación de la imbibición y el contenido de saponinas en el grano de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados con <i>Rhizobium</i> spp	67

Figura A. 2.1. Bolsas de crecimiento utilizadas para evaluar la capacidad de nodulación de las cepas de <i>Rhizobium</i> spp.....	123
Figura A 4.1. Temperara y humedad relativa registrada durante el ensayo de invernadero para la calidad del grano.....	125

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo fundamental en la dieta de muchos países. En Costa Rica, aporta entre un 16 % y un 27 % de proteína (Mencía Guevara et al., 2021). Aunque los hábitos de consumo de los costarricenses han cambiado en los últimos años, su ingesta sigue siendo relevante en la alimentación de la población debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, fibra, vitaminas y antioxidantes (Dumani, 2021) y como fuente de hierro vegetal (Jiménez-Cardozo et al., 2024).

A pesar de la importancia del cultivo, el país está lejos de ser autosuficiente y depende de las importaciones (Achicanoy et al., 2024), en el año 2023 Costa Rica importó aproximadamente 49,725.42 toneladas de frijol, principalmente desde EE. UU. y Nicaragua (FAOSTAD, s. f.). En cuanto a la producción nacional, el área de siembra fue de 17,608 hectáreas en el periodo 2020-2021 y aumentó a 19,865 hectáreas en 2022-2023 (Mora Ramírez et al., 2023).

Es conocido que algunos microorganismos ejercen beneficios en la promoción de crecimiento de las plantas e influyen sobre las cualidades de producción lo cual contribuye a una agricultura más sostenible (Mittra et al., 2021). Así, la inoculación del frijol con bacterias del género *Rhizobium* presenta un gran potencial debido a que los rizobios establecen una relación simbiótica con las raíces de las leguminosas (Sessitsch et al., 2002) y, como parte de sus funciones metabólicas realizan la fijación biológica de nitrógeno (FBN) al reducir el nitrógeno atmosférico y hacerlo disponible para las plantas (Ortega et al., 2004), promueven además el crecimiento general (Preyanga et al., 2021) mediante la solubilización de minerales como el P (Yamamoto et al., 2023), la producción de sideróforos (Banjare et al., 2023) y estimulan la síntesis de fitohormonas (Wulandari et al., 2024), entre otros.

En general, las plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* spp. presentan ventajas en cuanto al rendimiento de grano se refiere, obteniéndose diferencias importantes en comparación con plantas no inoculadas (Cáceres-Acosta et al.,

2024; Cantaro-Segura et al., 2019; Flores et al., 2023; Lapa-Unoc et al., 2024) y beneficios en cuanto al reciclaje de nitrógeno (Dueña Vega et al., 2024).

Los rizobios son atraídos hacia las raíces de las leguminosas mediante exudados radiculares que desencadenan la activación de una serie de genes (nodABC), cuyo resultado final es la formación de nódulos (Fernández Canigia, 2020). Estas bacterias, presentan una amplia adaptabilidad a condiciones de suelo como el pH (Lowendorf et al., 1981) y en algunos casos a la sequía (Amine-Khodja et al., 2022). Además, algunos rizobios producen compuestos llamados sideróforos capaces de quelatar el Fe^{3+} , lo que estimula el crecimiento de las plantas y las bacterias (Moreno Sarmiento, 2016). La producción de sideróforos favorece la competencia con otros microorganismos de suelo por la disponibilidad limitada de Fe^{+3} (Storey et al., 2006) ya que, ante esta situación restrictiva, las bacterias producen péptidos no ribosomales con afinidad por el hierro (Aguado-Santacruz et al., 2012) y Al^{+3} (Roy & Chakrabartty, 2000).

Aunado al importante aporte nutricional del frijol (Lin et al., 2008), estos granos presentan otros compuestos fitoquímicos de interés como los polifenoles, relacionados con un alto poder antioxidante, que han cobrado relevancia debido a su efecto sobre la promoción del bienestar físico al reducir el estrés oxidativo (Mojica et al., 2015). La presencia de estos compuestos se ha encontrado en las variedades Cabécar y Guaymí (León-Cortés et al., 2025), cabe destacar que, en el año 2023, la variedad de frijol rojo con mayor demanda en el país fue la Cabécar, junto con la variedad Guaymí de grano negro, ambas variedades se encuentran entre la oferta de semilla certificada que ofrece la Oficina Nacional de Semillas (Oficina Nacional de Semillas, 2020; SEPSA, 2023).

Recientemente varios estudios han establecido experimentalmente que hay relación entre la inoculación de microorganismos benéficos, entre ellos *Rhizobium* spp. con un aumento en las propiedades nutraceuticas y en la calidad de los frutos y granos (Dhole et al., 2023; Jiménez-Gómez et al., 2017; Khodaei & Hamidi-Esfahani, 2019; Platamone et al., 2023; Yildirim et al., 2015).

Para determinar la calidad alimentaria del frijol se evalúan variables como el contenido de proteína, la presencia de minerales en el grano (Aguilar et al., 2024), el contenido de polifenoles (Yang et al., 2018) y la capacidad de imbibición, que se refiere a la capacidad de la membrana del grano para absorber agua e iniciar los procesos metabólicos que estimulan el desarrollo del embrión (Hershey, 1998; Upretee et al., 2024).

Si bien se ha trabajado en la relación simbiótica del frijol – *Rhizobium* spp. y su efecto positivo sobre el rendimiento, se desconoce su efecto sobre la calidad del grano en relación con el contenido de polifenoles y el tiempo de imbibición, de ahí la necesidad de realizar este estudio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos cepas de *Rhizobium* pp. sobre la promoción de crecimiento, y calidad nutricional del grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) en las variedades Guaymí negro y Cabécar rojo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar 20 cepas de *Rhizobium* pp. de acuerdo con su tolerancia a condiciones de acidez, temperatura alta, salinidad y aluminio in vitro.
2. Evaluar a nivel de invernadero el efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* spp. sobre la promoción de crecimiento en las variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) Guaymí negro y Cabécar rojo.
3. Determinar la calidad nutricional del grano (contenido de polifenoles totales, capacidad de imbibición y contenido de proteína) en las variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) Guaymí y Cabécar, inoculadas con las cepas de *Rhizobium* spp. seleccionadas.

MARCO TEÓRICO

Importancia nutricional del frijol

El frijol, debido a su contenido de proteína, fibra y compuestos bioactivos, contribuye a la seguridad alimentaria en los sistemas agroproductivos (Uebersax et al., 2023). De acuerdo con el *Common Bean Observatory*, (2023), para el año 2021 el frijol se fijó como el alimento número seis en importancia debido a su aporte proteico.

La producción nacional de frijol reportada para la temporada 2023-2024 fue de aproximadamente 12,444 Tm, lo que representa una disminución del 5,6 % en comparación con la temporada 2022-2023. En cuanto al área sembrada, esta se estima en 15,765 ha, lo que equivale a una reducción del 13,7 % respecto a la temporada 2022 - 2023. Según el Boletín Estadístico Agropecuario N.º 34 (SEPSA, 2024).

El consumo de frijol en Costa Rica ronda los 37, 5 gramos per cápita, con un aumento en las zonas rurales de hasta 46,8 gramos (Rodríguez-González & Fernández-Rojas, 2015). Para el año 2018, según una encuesta realizada por el Ministerio de salud de Costa Rica, el consumo en personas adultas rondó los 31,6 gramos por día (Caravaca Rodríguez & Madrigal Meneses, 2018).

En cuanto a la calidad nutricional, el contenido de proteína cruda del frijol costarricense oscila entre un 16 al 27%, situándose como un alimento de gran importancia nutricional en la dieta de la población (Mencía Guevara et al., 2021), este importante aporte de proteína, aunado su aporte de hierro no hemínico, es parte de la importancia nutricional que sustenta, y toma en consideración el Reglamento Técnico: RTCR:384: Frijol En Grano No 32149, (2005) para promover la comercialización de frijol en Costa Rica.

Sin embargo, los programas de mejoramiento genético llevados a cabo durante las décadas pasadas se enfocaron más en rendimiento que en la calidad nutricional respondiendo a las demandas de su tiempo, lo que provocó en muchos

productos vegetales un efecto de dilución de nutrientes y compuestos bioactivos (Davis, 2009; Mayer, 1997; Prohens et al., 2016), un ejemplo de esto son los ácidos fenólicos debido a su efecto en el color de los productos vegetales y las tendencias del mercado dirigidas hacia un color particularmente comercial (Kaushik et al., 2015). Este un problema que este estudio busca abordar.

Simbiosis *Rhizobium*-frijol

La familia *Rhizobiaceae* está conformada por bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *AlloRhizobium*, *Ensifer* (= *SinoRhizobium*), *NeoRhizobium*, *ParaRhizobium*, *Rhizobium*, and *Shinell* (Klepa et al., 2024) que establecen una relación simbiótica, especialmente con el grupo de las leguminosas (*Fabacea*), dentro de las que destacan plantas de importancia agrícola como la soya, frijoles, maní, entre otras (Untergasser et al., 2009).

El género *Rhizobium* está constituido por bacilos gran negativos (Garabato, 2018) pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, a la fecha se han descrito 95 especies (LPSN, 2025) siendo *R leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici* y *R. phaseoli* las que nodulan el frijol (Aserse et al., 2012; Terezinha Moura et al., 2023; P. Van Berkum & Eardly³, 1996). Estas bacterias aportan nitrógeno a las plantas por lo que constituyen una parte importante de la producción agrícola de granos básicos (Velasco-Jiménez et al., 2020), tomando en cuenta que el contenido de nitrógeno es una de las mayores limitantes en la producción (Meyerholt et al., 2020; Y. P. Wang et al., 2010).

A grandes rasgos *Rhizobium* spp. obtiene la energía necesaria para realizar la fijación de nitrógeno directamente de los fotoasimilados de la planta huésped (Ke & Wang, 2024; Paredes, 2013) y la planta obtiene nitrógeno de los nódulos, transferido a través del xilema (Bidwell, 1979; Garza-Aguilar et al., 2024).

En el caso del frijol la inoculación con *Rhizobium* pp. se traduce en una mejora de las cosechas (Cantaro-Segura et al., 2019; Hurtado et al., 2019), en el rendimiento y crecimiento de la planta (Lapa-Unocc et al., 2024), en aumento en el

número de semillas por vaina, número de vainas por planta, materia seca total, peso de 100 semillas, entre otras variables agronómicas (Yadegari et al., 2008).

En un ambiente deficiente en nitrógeno, el establecimiento de la simbiosis se inicia cuando la leguminosa secreta flavonoides e isoflavonoides hacia la rizosfera, los rizobios perciben estas señales y activan la producción de genes *nodD*, que actúan como factores de transcripción al controlar la expresión de genes involucrados en la síntesis de los factores Nod; las respuestas a estas señales dependen de cada cepa, y, por lo tanto, determinan su especificidad (Via et al., 2016).

Adicionalmente, las plántulas de frijol liberan mediante exudados radicales, compuestos tales como azúcares, aminoácidos, nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, que promueven el desarrollo de *Rhizobium* spp. (Kato et al., 2012). Además, algunas prácticas agronómicas como la labranza mínima mejoran la diversidad genética de las poblaciones de *Rhizobium* spp. en el suelo (Hungria & Vargas, 2000).

La primera barrera en el establecimiento de la simbiosis está dada por la epidermis de la raíz, en donde los pelos radiculares juegan un papel central en facilitar la entrada de la bacteria (Oldroyd & Downie, 2008). En *Phaseolus vulgaris* el primer signo de la infección es un encorvamiento de los pelos radiculares seis a nueve días después de la inoculación y al ser tratados con azul de tolouina se aprecian de color rojo brillante, en contraste, con los pelos radiculares no infectados que se observan de color azul (Baird & Webster, 1982).

Una vez que la bacteria ha ingresado a través de la pared de los pelos radiculares de la planta, se forma un cordón de infección tubular que dirige a las bacterias a medida que ingresan en las células hospedantes, hasta llegar a la corteza de la raíz donde cesa la síntesis de pared o es degradada para liberar a la bacteria en las células que formarán el nódulo (Calvo García, 2011). En el caso del frijol y la soya, los nódulos crecen en forma esférica, afuera del córtex (Larrainzar et al., 2020) y, además, presentan un ciclo de actividad limitado ya que entran en

senescencia y pierden el meristemo central y su habilidad para infectar (Popp & Ott, 2011).

Mandal et al., (2009) encontraron que el contenido de ácidos fenólicos presentes en plantas con nódulos fue 1,6 mayor que en plantas sin nódulos, esto sugiere que los ácidos fenólicos pueden servir como estimulador para la producción de ácido indol butírico (AIA) durante la simbiosis, cabe destacar que la producción de AIA por parte de *Rhizobium* ha sido detectada en medio de cultivo, por lo que esta fitohormona podría tener un papel en la simbiosis (Atzorn et al., 1988; Baba et al., 2015; Datta & Basu, 2000), ya que se ha comprobado que tanto el AIA como los polifenoles mejoran la actividad de la nitrogenasa (Dangar & Basu, 1992).

Los compuestos fenólicos actúan como señalizadores durante el inicio de la simbiosis que da lugar al establecimiento de *Rhizobium* spp. (Mandal et al., 2010). Además, se han relacionado con un incremento en el contenido de componentes energéticos de reserva en los nódulos y la actividad de la leghemoglobina (Dhir et al., 1992), una proteína vinculada con la simbiosis (Cutting & Schulman, 1971) cuya principal función es el transporte de oxígeno desde el citosol de las células infectadas hacia el centro de fijación biológica en concentraciones compatibles con la actividad de la nitrogenasa (Appleby, 1992; Meilhoc et al., 2025; Rocha et al., 2025; L. Wang et al., 2019).

Factores que determinan el establecimiento de *Rhizobium* spp

Las bacterias del género *Rhizobium* deben, antes de establecer la simbiosis con las leguminosas, ser capaces de colonizar el suelo y competir con otras cepas por su sitio en la rizosfera. Las bacterias deben sobrevivir a factores bióticos y abióticos como la temperatura, la humedad, la acidez del suelo (Fernandes et al., 2017; Tang, 1986; Yeremko et al., 2025), entre otros.

Temperatura

Por su parte, la temperatura del suelo influye sobre el desarrollo de la bacteria y el establecimiento de la relación simbiótica (Sindhu et al., 2020). En términos generales, la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa es afectada por temperaturas mayores a 36 °C, por lo que a temperaturas menores mejores se obtienen mejores resultados en cuanto a peso seco de la planta, sin embargo, se han evaluado exitosamente cepas de *R. leguminosarum* con una tolerancia de hasta 39 °C con capacidad de nodular (Pinto et al., 1998). De manera similar, Kouki et al., (2022) reportan para cepas de *Rhizobium* spp, entre las que se incluye la CIAT899, una temperatura óptima de crecimiento de alrededor de 30 °C, sin embargo, la cepa Ras.JB se clasificó como muy tolerante.

Acidez

Los valores bajos de pH estimulan la solubilización de elementos tóxicos para las plantas como el Al^{+3} o el Mn^{+3} (Barrientos, 1989; Wekesa, Muoma, et al., 2022a). Se han encontrado cepas de *Rhizobium* spp. capaces de tolerar condiciones ácidas, lo que permite una mejor adaptación de las cepas a las condiciones de campo (Guerrero-Castro et al., 2018).

En plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha reportado una respuesta positiva de la fijación biológica de nitrógeno al encalado ($CaCO_3$), sin embargo, parece estar más relacionado a una corrección de acidez de suelo (García et al., 2003). A su vez, la selección de cepas tolerantes a la acidez permite el uso de estas cepas en suelos ácidos (Forte et al., 2017).

Adicionalmente, en suelos ácidos con altas concentraciones de aluminio se ven afectadas etapas vitales de la sobrevivencia de *Rhizobium* spp (Richardson et al., 1988). La sobrevivencia de *Rhizobium* spp., bajo condiciones ácidas se encuentra mediada por una alta respuesta metabólica que demanda una gran cantidad de energía dirigida a la biosíntesis de proteínas y aminoácidos (Nilsson et al., 2021), por lo que es importante la selección de cepas tolerantes al aluminio,

y para realizar tal caracterización ha dado mejores resultados el uso de medios de cultivo líquidos (Segura, 1995).

Fósforo

El fósforo es un elemento esencial para todas las formas de vida (Behera et al., 2017), sin embargo, la disponibilidad para las plantas es limitada debido a la fijación en suelos ácidos con óxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al) (Johan et al., 2021).

La solubilización de fósforo en el suelo se genera mediante la producción de ácidos orgánicos por parte de algunas cepas de *Rhizobium* spp., lo que le permite a la planta, el acceso a las reservas del mineral que de otra forma no podría obtener debido a que son fuentes insolubles, por lo tanto, inaccesibles para la absorción iónica (Ahemad & Kibret, 2014; Beltrán Pineda, 2014; Constanza et al., 2014).

El contenido de P inorgánico en el suelo tiene relación con la efectividad de la nodulación (Castro et al., 1993; Edwards et al., 2006; Kleinert et al., 2014; Sulieman et al., 2013; M. Zheng et al., 2016), por lo que se recomienda un aporte de P_2O_5 en dosis de 40 a 80 Kg · Ha¹ con el fin de favorecer la nodulación y algunos valores cuantitativos de producción como el peso seco total e individual de nódulos y variables cualitativas cómo la aparición de nódulos rojos (Figuroa, 2011).

Una técnica para la selección de microorganismos solubilizadores de fósforo debe de contemplar la acidez del suelo, y tomar en cuenta los principales complejos del fósforo presentes en el suelo, ya sea en fosfatos de calcio para suelos alcalinos, o fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos, estos últimos, podrían ser aún menos solubles que el fosfato tricálcico en el suelo debido a las muchas interacciones que se generan en el espacio edáfico (Bashan et al., 2013; Sharma et al., 2013).

Solubilización de hierro

La deficiencia de hierro disminuye el crecimiento de la planta huésped y la nodulación (Abdelmajid et al., 2008; Slatni et al., 2008), a pesar de que el Fe^{+3} es abundante en la corteza terrestre, su baja solubilidad lo hace poco disponible para las plantas, por lo tanto, algunos microorganismos como *Rhizobium* spp. se han adaptado para producir compuestos de bajo peso molecular conocidos como sideróforos, que presentan una gran afinidad por el Fe^{+3} (Hider & Kong, 2009) para suplir la síntesis de proteínas contenedoras de hierro, incluyendo la altamente demandante leghemoglobina (Brear et al., 2013).

La principal función de los sideróforos es quelatar el Fe^{+3} y hacerlo disponible para la absorción de las plantas (Ahmed & Holmström, 2014). La producción de sideróforos es una forma en que las bacterias del suelo influyen de manera positiva sobre el crecimiento de las plantas (Aguado-Santacruz et al., 2012; Antoun et al., 1998).

La detección de sideróforos en cepas de *Rhizobium* spp. se ha realizado con éxito utilizando Cromo Azurol Sulfanato (CAS) y se basa en la acción quelante de los sideróforos y su reacción con el agar CAS, produciendo un complejo CAS - férrico que decolora el medio (Dhul et al., 1998) formando un halo anaranjado alrededor de las colonias (Blanco & Castro, 2021; Louden et al., 2011; Ogutcu & Avsar, 2020).

La producción de sideróforos se puede relacionar a una nodulación efectiva debido a que la planta requiere de hierro para sus funciones y, como ya se ha mencionado, este se encuentra de forma insoluble en la corteza terrestre (Carson et al., 1992; M. Li et al., 2023; Y. Li et al., 2024; Rahimi et al., 2020).

Salinidad

La salinización del suelo constituye un problema global creciente que amenaza la productividad de los sistemas agrícolas. Estudios recientes estiman que aproximadamente el 30% de las tierras cultivables podrían perderse durante esta

década debido al incremento en la concentración salina. Las proyecciones a 25 años son aún más alarmantes, sugiriendo que hasta el 50% de los suelos arables podrían verse afectados por este fenómeno (Corwin, 2021; Eswar et al., 2021; A. Singh, 2022).

En cuanto a la fijación biológica de nitrógeno, la salinidad interfiere en el proceso de intercambio de señales entre hospedero y *Rhizobium* spp., durante la simbiosis (Miransari & Smith, 2009; Oldroyd & Downie, 2004), sin embargo, se reportó que la inoculación con *Rhizobium* spp. mantuvo estable la concentración de los iones Na^+ y K^+ tanto en raíces como en brotes durante periodos de estrés por salinidad, lo que se perfila como un mecanismo importante que ayuda a mediar la salinidad de los suelos (Alinia, Seyed, et al., 2022), además de sintetizar enzimas que ayudan a proteger los nódulos del daño oxidativo producido por la salinidad (Zahran, 1999).

Se reportó de forma inicial que la formación de nódulos se ve reducida bajo condiciones salinas de hasta 0,2% de NaCl, observaciones más detalladas mostraron que los pelos radiculares de las plantas no presentaron las características típicas del inicio de la formación de nódulos (Lakshmi-Kumari et al., 1974). Sin embargo, más recientemente se han reportado cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium meliloti* con tolerancia a un amplio rango de condiciones de salinidad (Alinia, Kazemeini, et al., 2022; Bertrand et al., 2020; Franzini et al., 2019). En Costa Rica las caracterizaciones de suelos en la provincia de Guanacaste apuntan a que la salinidad es una amenaza latente en la provincia (Oca et al., 2016) de manera que, seleccionar cepas que se adapten a tales condiciones confiere una ventaja para la sobrevivencia de las cepas en el suelo (Aslam et al., 2013; R. López et al., 1998; Noori et al., 2018). Este problema se hace más frecuente en zonas agrícolas donde el agua de riego presenta un contenido de sales elevado (Jaiswal et al., 2018).

A pesar de que la salinidad priva a la planta de agua y nutrientes, se ha demostrado que la inoculación con *Rhizobium* spp., restablece el balance nutricional en los tejidos vegetales mediante la movilización de minerales (Wekesa, Asudi,

et al., 2022). Los procesos de osmorregulación varían entre las diferentes cepas de *Rhizobium* spp., y depende de las adaptaciones genéticas intrínsecas (Miller & Wood, 1996; Wekesa, Asudi, et al., 2022) de este modo, la bacteria resulta ser más tolerante a la salinidad que la propia simbiosis y que las leguminosas (Tejera et al., 2004; Zahran, 1999).

Se ha descrito que *Rhizobium* spp. induce un aumento en la cantidad de aquaporinas en la planta de frijol, lo que se traduce en un mejor flujo osmótico radicular (Franzini et al., 2019), además, la evolución de la cepa con su sitio de origen tiene un rol importante para el desarrollo de tolerancia, puesto que las cepas procedentes de suelos con tendencias salinas tendrían una mejor adaptación evolutiva (Singleton et al., 1982).

Parámetros de calidad de grano.

Entre los parámetros de calidad del grano se encuentra la capacidad de absorción de agua denominada imbibición (Mex-Álvarez et al., 2021) y las propiedades nutricionales en donde se enlista el contenido de minerales y proteínas (Fernández Valenciano & Sánchez Chávez, 2017). Esta última ha sido calculada mediante el método de Dumas que se basa en la determinación de nitrógeno (mediante Kjeldahl) y, mediante un factor de conversión establecido para cada alimento se calcula el contenido de proteína (Madrid Concon & Soltess, 1973; Mederos, 2006).

Polifenoles del grano de frijol

Los compuestos bioactivos de origen vegetal que ejercen efectos beneficiosos para la salud, más allá de su valor nutricional básico, se denominan nutraceuticos (Ulloa et al., 2011). Los polifenoles son compuestos químicos naturales que se encuentran en las plantas como productos secundarios, en términos químicos se trata de sustancias con al menos un anillo aromático (Watson, 2018).

El grano de frijol constituye una rica fuente de fitoquímicos (Ganesan & Xu, 2017) con propiedades antioxidantes naturales englobadas en los compuestos fenólicos, en dependencia del genotipo, el medio ambiente, madurez a la cosecha, tamaño, edad y peso del grano y mostrando un amplio rango de beneficios para la salud humana (Hosseinian et al., 2017).

El consumo de frijol eleva significativamente los niveles de α -tocoferol en el plasma sanguíneo y, en menor medida, los niveles de γ -tocoferol, componentes con efecto antioxidante que parecen estar relacionados con la prevención de la trombosis (Ulloa et al., 2003) y la reducción del estrés oxidativo ayudando así a prevenir enfermedades degenerativas (Ganesan & Xu, 2017).

En frijoles negros se han encontrado 22 componentes fenólicos, además de importantes cantidades de flavonoides, proantocianidinas (ubicadas principalmente en la testa de la semilla), estos polifenoles son señalados como los responsables principales de la actividad antioxidante encontrada en los frijoles negros. El contenido de polifenoles de los frijoles comunes incluye ácidos fenólicos (A. López et al., 2013; Yang et al., 2018). Sin embargo, es importante aclarar que el color del grano no puede utilizarse como único indicador de la concentración de estos compuestos (Espinosa-Alonso et al., 2006).

Así mismo, componentes como las cumarinas, se han ligado con propiedades anticancerígenas (Jain & Joshi, 2012) y en el alivio del tratamiento por radioterapia, centrándose en su alta capacidad biológica y baja toxicidad (Küpeli Akkol et al., 2020).

El contenido total de polifenoles (TPC) está relacionado a la capacidad antioxidante, y estos varían notablemente de un cultivar a otro, por lo tanto, es importante no generalizar y evaluar cada cultivar por separado (Perez-Hernandez et al., 2021). Por su parte, Rocha-Guzman et al., (2013) reportan que la capacidad antioxidante encontrada en los frijoles negros fue la más alta.

Luthria & Pastor-Corrales, (2006) cuantificaron el promedio total de polifenoles de 15 variedades de frijol en 31.2 mg/100 g, variando de 19.1 a

48.3 mg/100 g dependiendo de la muestra, además reportan que un 83% del total de ácidos fenólicos se mantuvieron en los frijoles durante el proceso de cocción.

En estudios realizados en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIGRAS) (Irías-Mata et al. 2022 comunicación personal) se encontró que la variedad Guaymi y la variedad Cabécar presentan altos contenidos de polifenoles. La variedad Guaymí es de crecimiento indeterminado y con un ciclo de 38 días a floración y de 76 días para cosecha con un grano de color negro brillante y amplia adaptabilidad, con un rendimiento promedio de 1 226 Kg · ha⁻¹ (Hernández Fonseca, 2009), se reporta una resistencia media a la mustia hilachosa y a la mancha angular (Estrada Garro, 2013). Por su parte la variedad Cabécar presenta un ciclo a floración de 35 – 39 días y a cosecha de 72 – 75 días y un grano color rojo claro de gran valor comercial debido a que las evaluaciones realizadas mostraron un buen comportamiento agronómico en variables cómo: resistencia a enfermedades y tolerancia a altas temperaturas, además, se reportó un rendimiento promedio de 1 033 Kg · Ha⁻¹ y un máximo de 1 935 Kg · Ha⁻¹ (Hernández Fonseca, 2009). Está variedad mostró su mejor potencial en condiciones de época seca y altas temperaturas en Cañas Guanacaste (Araya Villalobos & Hernández Fonseca, 2007).

En el cultivo de *Vicia fava* L. se reportó que la cantidad de polifenoles totales se vio estimulada por la inoculación con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Abdelkhalek et al., 2022) y que estos se acumulan principalmente en los granos (Amalfitano et al., 2018). Además, se ha comprobado que el contenido de polifenoles en raíces de *Vigna mungo* con nodulación, es mayor que en las raíces que no fueron inoculadas (Mandal et al., 2009), resultados similares se reportan en maní *Arachis hypogaea* L. (Chakraborty et al., 2008), en este mismo cultivo, la inoculación con *Rhizobium* spp. incrementó significativamente el contenido de polifenoles tanto en las raíces cómo en los brotes (Charitha Devi & Reddy, 2002). Se desconoce si la inoculación con *Rhizobium* spp. afecta el contenido de polifenoles en las variedades Guaymí negro y Cabécar rojo.

Capacidad de imbibición del grano de frijol

Se entiende imbibición cómo la absorción inicial de agua por parte del grano seco durante el proceso de germinación, que desencadena alteraciones en la tasa respiratoria y la actividad metabólica (Azcón-Bieto & Talón, 2008; Bareke, 2018), a partir de las proteínas y fuentes de almidón almacenadas (Kikuchi et al., 2006). Además, estimula la síntesis de compuestos fenólicos en el grano (Di Stefano et al., 2019; Huang et al., 2014; Tajoddin et al., 2014; Tarzi et al., 2012). En este proceso, la testa del grano juega un rol importante al actuar como una membrana que regula el paso de agua hacia el interior del grano (Corte et al., 2003; Upretee et al., 2024), de igual forma, otras estructuras cómo el micropilo y el hilio también se encuentran relacionadas (Lechowska et al., 2019; Pérez-Herrera & Acosta-Gallegos, 2002).

La capacidad de imbibición se encuentra estrechamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes y con propiedades de calidad culinaria como el tiempo de cocción, por esto es una característica de mucha valía ((Ilse de Jager, 2019; Pérez Herrera et al., 2002; Syanda et al., 2019). Se ha determinado que, a mayor imbibición de agua por parte del grano, el tiempo de cocción es menor; esta cualidad se valora mucho en el mercado y por ello es algo que se busca en los programas de reproducción (Syanda et al., 2018; Zamindar et al., 2013).

Cómo parte del fenómeno osmótico que tiene lugar durante la imbibición, se liberan, mediante procesos de lixiviación y degradación enzimática, compuestos no deseados en la alimentación, a la vez que se mejora la solubilidad de la fibra (Ikram et al., 2021; Njoumi et al., 2019), este proceso influye de forma positiva en la disponibilidad de hierro (Cominelli et al., 2022; Petry et al., 2010) y no afecta el contenido de proteína disponible (Ravoninjatovo et al., 2022).

Una mala imbibición del grano lleva a un estado de insuficiencia en la transferencia de calor y como consecuencia se genera un fallo en la inactivación de compuestos antinutricionales (Cominelli et al., 2020; Petry et al., 2013; Swanson et al., 1985; Taiwo et al., 1997). Se definen estos compuestos como aquellos que afectan o alteran de forma negativa el valor nutricional de un alimento (Elizalde et al., 2009).

Proteína

El cuerpo humano está constituido por aproximadamente por un 15 % de proteína que se encuentra distribuida en la mayoría de las células del cuerpo y cumple funciones tan vitales como el transporte de oxígeno o el transporte de sustancias al interior de las células (García Fernández, 2018). Las proteínas se encuentran formadas por unidades denominadas aminoácidos, los cuales tiene un papel biológico relevante puesto que constituyen las unidades de otras biomoléculas como algunos neurotransmisores, coenzimas entre otros (Paolo et al., 2017).

Se pueden sintetizar 11 aminoácidos en el cuerpo a través del metabolismo intermediario, los cuales se conocen como aminoácidos no esenciales. No obstante, existen 10 aminoácidos que el organismo no puede producir por sí mismo y, por lo tanto, deben obtenerse necesariamente a través de la dieta. Cuando un alimento contiene proteínas con todos los aminoácidos esenciales, se considera que es de alta calidad. (Muntane Coca, 2020). En el caso de las leguminosas, sus granos son deficientes en aminoácidos sulfurados como metionina y cisteína (Cid-Gallegos et al., 2023; Rezende et al., 2017) por lo que se recomienda combinarlos con la proteína procedente de cereales para completar los aminoácidos esenciales (Jacinto Hernández & Escudero, 2016).

Saponinas

Las saponinas son un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en una gran variedad de plantas y presentan una alta diversidad fitoquímica, representando las dicotiledóneas la principal fuente de triterpenoides y dentro de ellas, las leguminosas constituyen la principal fuente alimenticia de saponinas (Greene, 2016; Moses et al., 2014; Xu & Chang, 2011). En el frijol común las saponinas se concentran en el hilio con una concentración total estimada de 455,95 mg/100 g que tiende a aumentar hasta dos veces con el remojo hasta un estimado de 1063,62 mg/100 g, lo que no sucede con las saponinas alojadas en los

cotiledones que su concentración disminuye levemente con el remojo desde 6,79 mg/100 g a 5,29 mg/100 g (Guajardo-Flores et al., 2012).

Las saponinas fueron consideradas compuestos anti nutricionales durante muchos años, sin embargo, recientemente se ha despertado el interés en este grupo debido a sus efectos sobre la reducción del colesterol, la acción antiinflamatoria, hepatoprotectora, que actúa como prebiótico (Chávez-Santoscoy et al., 2013, 2016; Chen et al., 2015; Guajardo-Flores et al., 2013; Yao et al., 2014), de poseer efecto inmunomodulador (Shen et al., 2024) y neuroprotector (Aqib et al., 2023; Greene, 2016).

Las saponinas poseen una gran resistencia al calor lo que les permite mantener su actividad biológica aún después de la cocción (Aqib et al., 2023). Se ha reportado que las principales saponinas presentes en especies de *Phaseolus vulgaris* (L) se mantienen constantes después de la cocción mediante métodos tradicionales, y para el caso específico de la soya, la saponina mostró un ligero aumento en su concentración después de la cocción (Nina et al., 2023). En procesos industriales de cocción de frijol los datos muestran que las pérdidas de saponinas pueden variar desde 6,62% hasta el 70,03% dependiendo del tiempo de remojo y de cocción (Shi et al., 2009). Se medirá el efecto de la inoculación con *Rhizobium* spp sobre el contenido de polifenoles del grano de frijol puesto que se conoce poco al respecto.

METODOLOGÍA

Ubicación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) y en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica.

El trabajo se dividió en tres etapas: 1. Selección de dos cepas 2. Efecto de las cepas en la promoción de crecimiento. 3. Efecto de la inoculación de *Rhizobium* spp sobre la calidad del grano de frijol.

Selección de dos cepas de *Rhizobium* spp.

Se realizó una selección de cepas con base en sus características de sobrevivencia bajo diferentes condiciones abióticas. La caracterización de las cepas se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, para ello se analizaron 20 cepas de *Rhizobium* spp., con base en la capacidad de las cepas para tolerar diferentes condiciones de salinidad, temperatura y pH de acuerdo con Kouki et al., (2022), además se determinó el crecimiento a diferentes concentraciones de aluminio (Richardson et al., 1988) la capacidad de solubilización de P (Nautiyal, 1999) y de producción de sideróforos.

De las 20 cepas de *Rhizobium* spp., 18 se tomaron de la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola (LMA) que fueron liofilizadas en el año 1987 en viales de vidrio, el número se completó con 2 cepas provenientes de nódulos de *Mucuna* sp (CR4020) y *Sesbania* sp (CR4021). Las cepas se reconstituyeron con agua desionizada estéril y se rayaron en el medio agar levadura manitol con rojo Congo (Anexo 1).

Tolerancia a diferentes condiciones de la salinidad.

Se determinó la capacidad de las cepas para crecer a diferentes concentraciones de NaCl mediante inoculación de las cepas de *Rhizobium spp.*, en el medio agar levadura manitol (ALM) suplementado con 25, 50, 75 y 100 mM NaCl (Anexo 1). Cada plato se dividió en 4 secciones en cada una de ellas se inoculó una de las cepas, con tres repeticiones en platos diferentes. Los platos se incubaron a temperatura ambiente por tres días. Se evaluó el crecimiento mediante una escala visual de 0 a 4 en donde 0 es ausencia de crecimiento y 4 es un crecimiento completo a través de la línea de rayado.

Tolerancia a diferentes condiciones de pH.

Las diferentes cepas se cultivaron durante 72 horas en platos de ALM con rojo Congo. Se preparó medio de ALM más púrpura de bromocresol (Anexo 1) con un pH ajustado a 5,5 utilizando HCl 1M y medio ALM ajustado a un pH 8 usando NaOH 1M. Cada plato se dividió en 4 secciones en cada sección se inoculó por picadura una de las cepas, con tres repeticiones en platos diferentes. Los platos se incubaron a temperatura ambiente y el crecimiento se evaluó a los 8 días de inoculados utilizando una escala visual previamente descrita.

Sobrevivencia a diferentes temperaturas.

Se dividieron los platos de ALM con rojo Congo en 4 secciones y se inoculó por triplicado una de las cepas en cada sección. Los platos inoculados se incubaron a 25°, 30°, 35° y 40°C durante tres días y el crecimiento se evaluó a los 8 días con una escala visual ya descrita.

Presencia de sideróforos

Se determinó la capacidad de las cepas de producir sideróforos de acuerdo con la metodología descrita por Milagres et al., (1999).

Las cepas se inocularon en platos de medio de cultivo que contenían en una mitad el medio ALM y en la otra el medio CAS BLUE (Anexo 1). La presencia de sideróforos se determinó midiendo el avance de cambio en el color del medio CAS-BLUE, partiendo del límite entre los dos medios. El cambio de color se debe a la remoción del hierro del complejo Fe-CAS por los sideróforos producidos por las bacterias, lo que ocasiona un viraje de azul a tonos anaranjados (Alexander & Zuberer, 1991).

Solubilización de P

La solubilización de P por parte de las cepas de *Rhizobium* se determinó utilizando tres medios de cultivo con fuentes diferentes de P (Anexo 1). El medio agar Pikovskaya (Pikovskaya, 1948), el medio descrito por Osorio & Habte (2001) y el medio descrito por Gadagi & Sa, (2002) como medio base modificado (Anexo 1). El medio Pikovskaya utiliza como fuente de fósforo insoluble el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Singh et al., 2014), y la capacidad de solubilizar fosfatos se visualiza por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia (Sigma-Aldrich, 2013). Por su parte el medio desarrollado por Osorio & Habte (2001) utiliza roca fosfórica como fuente de fósforo y verde de bromocresol como indicador de pH (Silva et al., 2001), la solubilización de P se detecta mediante la formación de un halo amarillo alrededor de la colonia. Finalmente, con el medio base modificado (Gadagi & Sa, 2002) se determinó la solubilización de fosfatos de hierro y aluminio mediante el cambio de color de azul a anaranjado alrededor de la colonia (Gadagi & Sa, 2002; Reyes et al., 1999). El ensayo se realizó por triplicado y en cada plato se inoculó con una gota de 10 μL de una suspensión de cada cepa. La suspensión se preparó a partir del crecimiento de tres días en el medio ALM con rojo Congo a temperatura ambiente.

Tolerancia a diferentes concentraciones de Al^{3+}

La tolerancia a diferentes concentraciones de aluminio se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Castillo et al., (2008). Se preparó caldo levadura manitol y se le adicionó una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1000 μM en dosis equivalentes

a 22,3 μM Al, 44,7 μM Al y 67,0 μM Al, se utilizó $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ como fuente de aluminio y todos los medios de cultivo suplementados con Al se llevaron a un pH de 5,5 utilizando HCl 1M (Anexo 1).

Determinación del tiempo de ensayo.

Para determinar el tiempo adecuado para medir la absorbancia se realizó un bioensayo con la cepa CIAT899 como referencia. Se utilizaron tubos cónicos con caldo levadura manitol (CLM) con los tres niveles de aluminio y se realizaron tres repeticiones para cada concentración. Se midió la absorbancia a las 24, 48 y 72 horas, seleccionándose como tiempo óptimo aquel en el que no se observó crecimiento irregular de las bacterias (formación de hilachas en el medio de cultivo).

Evaluación del crecimiento en diferentes concentraciones de Al de 20 cepas de *Rhizobium*

Una vez elegido el tiempo de lectura, se evaluó el crecimiento de las 20 cepas en las concentraciones 0 μM Al, 2,3 μM Al, 44,7 μM Al y 67,0 μM Al. Para cada cepa en estudio se utilizó un diseño experimental completamente al azar con los siguientes tratamientos: cuatro niveles de aluminio y tres repeticiones.

Se preparó una suspensión de cada una de las cepas de *Rhizobium* spp., con el estándar N° 5 del Nefelómetro de Mac Farland y se procedió a inocular los diferentes caldos de cultivo con 30 μL de la suspensión. Los tubos así inoculados se incubaron a 28 °C con agitación constante a 120 rpm por 48 horas (según los resultados del primer bioensayo), y se determinó la absorbancia a 610 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 1 Wekesa, Muoma, et al., (2022) y se calculó para cada tratamiento, se tomó como control el crecimiento de la bacteria en caldo levadura manitol (CLM) sin aluminio.

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ inhibición: } \left(1 - \frac{\text{Absordancia del tratamiento}}{\text{Absordancia del control}} \right) \times 100$$

Concentración de *Rhizobium* a las 48 horas

Se repitió el ensayo para las dos cepas que presentaron el mejor índice de selección, y con el objetivo de cuantificar la cantidad de células viables se tomó a las 48 horas de incubación 1 mL de cada uno de los cultivos bacterianos y se realizó un recuento en plato por la técnica de diluciones seriadas para las 4 concentraciones de AI. Los resultados se reportaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (mL).

Capacidad de formar nódulos en las variedades utilizadas

Para determinar si las cepas en estudio eran capaces de formar nódulos se utilizaron bolsas de crecimiento (Figura A.2.1, Anexo 2) según el procedimiento descrito por CIAT, (1988). A cada una de las bolsas de crecimiento se les añadió 40 mL de solución nutritiva libre de nitrógeno y se llevaron a la autoclave a 121 °C por 15 minutos. En las bolsas se colocaron dos semillas previamente pregerminadas de las variedades Guaymí y Cabécar proveídas por el CIGRAS. La preparación de las semillas se realizó siguiendo la metodología de Vidal Fernández, (2012). Las semillas, dentro de la cámara de flujo laminar, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 2 minutos, una vez transcurrido el tiempo se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y se trasvasaron a un recipiente con alcohol etílico al 95 % por un minuto, luego se lavaron con agua desionizada estéril una vez. Cuando las semillas estuvieron secas, se colocaron en beakers estériles con medio agar agua al 1% para su germinación, en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad durante 48 horas (Fernandez-Flouret & Cleyet-Marel, 1988). Las semillas pregerminadas sin contaminación visible fueron transferidas a las bolsas de crecimiento estériles que contenían solución nutritiva libre de nitrógeno Broughton y Dillworth (Somasegaran & Hoben, 1994) ajustada con NaOH (1 N) a un pH entre 6,6 a 6,8 y utilizada a razón de 5 mL de cada una de las soluciones en 10 L de agua (Anexo 2). Se adicionó solución nutritiva a la bolsa según fuera necesario.

Se procedió a preparar una suspensión de cada una de las cepas de *Rhizobium* spp., con el estándar N° 5 del Nefelómetro de Mac Farland y se

inocularon las semillas pregerminadas en cada bolsa de crecimiento (Figura A.2.1, Anexo 2) con 5 mL de la suspensión. Para cada cepa se hizo un recuento viable para determinar la cantidad de UFC presentes en la suspensión. El experimento se cosechó a los 15 días de sembrado. Se evaluó si las cepas fueron capaces de nodular las dos variedades

Índice de selección

Para la selección de las dos cepas de *Rhizobium* spp., se fue puntuando cada variable según se detalla en la Ecuación 2, con el fin de calcular un índice basado en el aporte de cada una de las pruebas. Para esto se dividió los datos obtenidos por cada cepa entre el valor máximo posible de cada prueba, de forma que cada prueba aporta un valor de 1 al total del índice.

Ecuación 2. Cálculo del índice de selección para las cepas de *Rhizobium* spp.,

$$\text{Índice de selección} = \frac{\sum \text{del valor obtenido por cada cepa}}{\text{Valor máximo posible para la prueba}}$$

Promoción de crecimiento

Para determinar el efecto de las dos cepas que presentaron el mejor índice de selección sobre el crecimiento de plantas de frijol de las variedades Cabécar y Guaymí se estableció un experimento en el invernadero del laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas.

Las semillas de las variedades Cabécar y Guaymí fueron provistas por el CIGRAS de un mismo lote con el fin de reducir la variabilidad.

Se preparó caldo de levadura con manitol en botellas de vidrio de 1 L, se autoclavaron a 121 °C durante 30 minutos y se inocularon con las cepas, previamente sembradas en platos Petri con agar levadura manitol tres días antes.

Las botellas inoculadas se llevaron a la incubadora a una temperatura de 28 °C con agitación constante de 150 rpm por 24 horas. A cada botella con el inóculo respectivo, se le realizó un recuento en plato para obtener la concentración 24 horas después de inoculadas.

Se utilizó un suelo procedente de una zona boscosa de Coronado, San José, Costa Rica. El suelo se esterilizó en la autoclave dos veces a 120°C por una hora y se dejó reposar por una semana para evitar problemas de toxicidad. En el Cuadro A.3.1 se presentan los resultados del análisis químico del suelo, antes y después de autoclavar. Se llenaron macetas de 4 L de capacidad, se sembraron 5 semillas de frijol de las variedades Cabécar y Guaymí y a la semana se procedió a ralear a dos plantas por maceta. La inoculación se realizó al momento de la siembra según cada tratamiento.

Se midió a los 30 días el contenido de clorofila mediante las unidades SPAD y al inicio de floración se procedió a cosechar en ensayo y a medir peso fresco y seco de la parte aérea y raíz. Además, una muestra de tejido foliar se llevó al Laboratorio de Suelos y Foliares de la UCR para un análisis químico completo.

Efecto de la inoculación de *Rhizobium* spp sobre la calidad del grano de frijol.

Se evaluó el efecto de la inoculación de las dos cepas que presentaron el mejor índice de selección sobre la calidad del grano de frijol de las variedades Cabécar y Guaymí, para ello se estableció un experimento en el invernadero del laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas.

Se utilizó un diseño irrestricto al azar, la unidad experimental consistió en una maceta con dos plantas de frijol, se usaron tres repeticiones. Para cada variedad se establecieron los siguientes tratamientos: T1 (899), T2 (CR4019B), T3 (899 + CR4019B), T4 (control sin inocular con fertilización con urea a una dosis de 150 kg · Ha⁻¹) (Acuña & Castro, 1996) y T5 (control sin inocular y sin fertilización nitrogenada).

Las semillas de frijol de las variedades Cabécar y Guaymí fueron inoculadas con 10 mL de una suspensión de bacterias 10^8 UFC \cdot mL⁻¹ por maceta en la forma previamente descrita y se colocaron en macetas de 4 L, cada maceta corresponde a una unidad experimental. En cada maceta se sembraron 5 semillas, a los 15 días se realizó un raleo a dos plantas por maceta.

Todos los tratamientos con *Rhizobium* spp. se les suministró P₂O₅ a una dosis de 100 Kg \cdot Ha⁻¹ (Acuña & Uribe, 1996) y 70 Kg \cdot Ha⁻¹ de K₂O₅ (Acuña & Castro, 1996) para todas las enmiendas se basaron en una densidad de 170 000 plantas por hectárea (Mora et al., 1998).

A los 90 días ya las plantas se encontraban en vainas, las cuales se dejaron secar en la planta por dos semanas. Se cuantificó el contenido de polifenoles solubles e insolubles, contenido de saponinas, proteína, y el tiempo de imbibición.

La determinación de polifenoles se basó en el trabajo de Lux et al., (2020) y se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS).

Para la extracción de polifenoles solubles se pesaron 100 mg de frijol molido, se adicionaron 3 mL de metanol (80% v/v) y se homogenizó la suspensión en el baño ultrasónico 2 x 30 segundos. Posteriormente se llevó a la centrifuga a 1718 xg por 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se extrajo el precipitado 3 veces más con 2 mL de metanol (80% v/v). Los sobrenadantes colectados se evaporaron al vacío.

Para los polifenoles insolubles, se tomó el precipitado remanente de la extracción anterior y se suspendió de nuevo en 2 mL de NaOH (2 mol \cdot L⁻¹). Se colocó en agitación por 4 h a 20 °C. Posteriormente se acidificó la solución con HCl (6 mol \cdot L⁻¹) a pH 2, se añadió 2 mL de agua ultrapura y se procedió a realizar una extracción líquido-líquido con 3 mL de acetato de etilo; esta extracción se realizó por duplicado. Las fracciones de acetato de etilo colectadas se evaporaron al vacío. Las mediciones se realizaron en el UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Thermo Scientific, Ultimate 3000, TSQ Endura), siguiendo un

método cromatográfico ya descrito (León-Cortés et al., 2025). Se identificaron los polifenoles comparando el perfil de ionización y tiempos de retención de los compuestos con la base de datos espectral de los polifenoles disponible en el equipo; y para cuantificar cada polifenol identificado, se emplearon las curvas de calibración correspondientes, utilizando como referencia los materiales proporcionados por el CIGRAS para cada compuesto.

La extracción de saponinas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología empleada por Sanchez et al., (2018). Se tomó 0,5 gramos de muestra, se le adicionó 5 mL de metanol 80% y se colocó en el baño ultrasónico por 5 minutos. Para eliminar el metanol, la muestra se evaporó en condiciones de vacío en una centrifuga evaporatoria al vacío (SpeedVac) durante 8 horas a 15 psi. El extracto se suspendió en 1 mL de agua destilada, se le adicionó una alícuota de 200 μ L de acetona, se llevó a la centrifuga a 2500 rpm durante 15 minutos y se separó el sobrenadante.

Para determinar la concentración de saponinas se utilizó el método empleado por Dini et al., (2009). Se tomó 0,1 mL del sobrenadante de la operación anterior, se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico al 72% y 0,5 de vainillina al 8% en etanol y se incubó a 60°C durante 20 minutos. Una vez fría la muestra, se midió la absorbancia a 544 nm y se estimó la concentración de saponinas mediante el coeficiente de extinción molar de la soyasaponina B ($\epsilon = 5278$) (M. Sánchez, comunicación personal, 25 de setiembre de 2024).

En cuanto a la determinación del tiempo de imbibición se utilizó el método descrito por Bolaños-Silvestre (2014). Se tomaron 12 granos de frijol al azar, se colocaron en platos Petri y se les añadió 50mL de agua desionizada. Se dejaron en un lugar lejos de la luz solar directa por 18 horas, posterior a esto, se drenó el agua y se colocaron en papel toalla para eliminar el excedente de agua. Cada una de las muestras se pesó para medir la cantidad de agua absorbida.

Para determinar el contenido de proteína se cuantificó la cantidad de nitrógeno total mediante el método Kjeldahl en el Laboratorio de Suelos y Foliares

del CIA-UCR y se transformó a contenido de proteína cruda multiplicando por 6,25 (Bolaños Silvestre, 2014; Jacinto-Hernández et al., 2019).

Análisis de datos

Para cada variable se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias LSD Fisher (alfa = 0.05). Previo al análisis de varianza se comprobó los supuestos de normalidad mediante prueba Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas mediante prueba Bartlett.

Se utilizó un diseño irrestricto al azar, la unidad experimental consistió en una maceta con dos plantas de frijol. Se usaron tres repeticiones con los siguientes tratamientos: T1 (899), T2 (CR4019B), T3 (899 + CR4019B), T4 (control sin inocular con fertilización con urea a una dosis de $150 \text{ kg} \cdot \text{Ha}^{-1}$) (Acuña & Castro, 1996) y T5 (control sin inocular y sin fertilización nitrogenada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las cepas

Tolerancia a la temperatura

La exposición de las cepas de *Rhizobium* spp., a un rango de temperaturas de 25°C hasta 35°C en medio sólido ALM, mostró que todas las cepas fueron capaces de crecer de forma abundante (categoría 3 y 4) (Cuadro A.5.1, Anexo 5), lo que muestra una gran tolerancia a las diferentes temperaturas por parte de la mayoría de las cepas (Figura 1), sin embargo, cuando se expusieron a una temperatura de 40 °C, disminuyó la abundancia de crecimiento presentando 15 de las cepas un crecimiento moderado, mientras que las cepas CIAT639, CIAT899, CR4002B, CR4003B, CR4004B no mostraron ningún crecimiento a esta temperatura (Figura 1, Cuadro A.5.1).

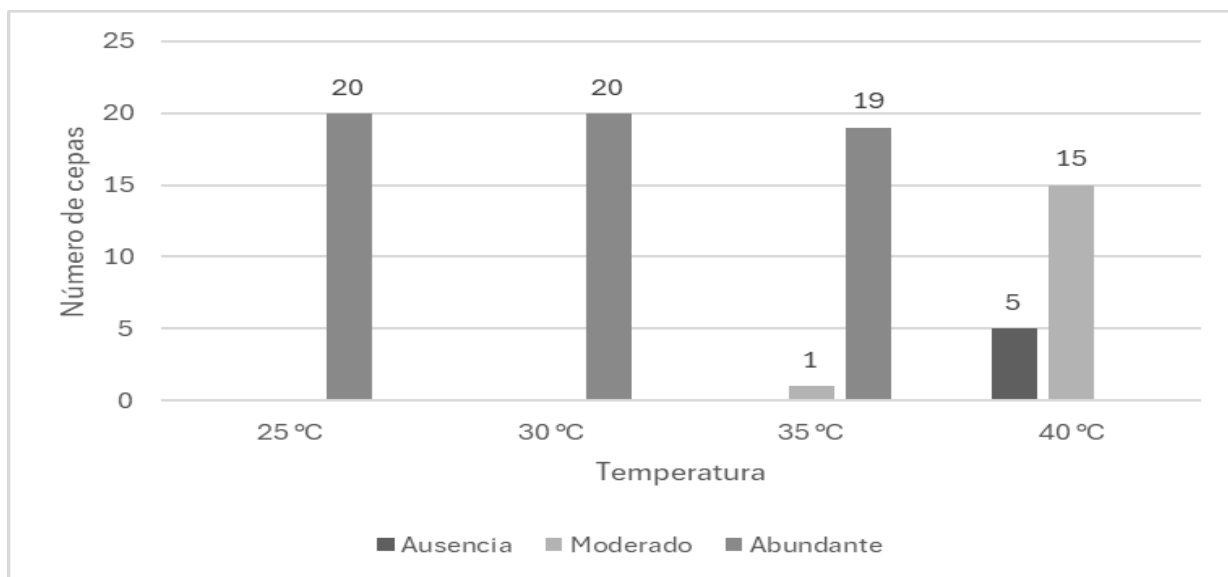


Figura 1. Número de cepas de *Rhizobium* spp. capaces de crecer a 25, 30, 35 y 40°C incubadas por tres días en medio agar levadura manitol (ALM).

Temperaturas de suelo cercanas o superiores a los 35°C pueden alterar la actividad de la nitrogesasa (Hungria & Vargas, 2000; Piha & Munns, 1987). Además, cuando se superan los 37°C, se han reportado problemas con el desarrollo de la nodulación (F. Zhang, 1995).

En medio ALM, la literatura reporta que *Rhizobium* spp., tiende a reducir su crecimiento a valores cercanos a 40°C (Eugenia Marquina et al., 2011), lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. Sin embargo, en medio líquido de caldo levadura manitol, se ha reportado que algunas cepas de *Rhizobium* spp., han sobrevivido hasta los 45°C (Kumar Patel et al., 2020). Cabe analizar si las cepas que presentaron crecimiento a temperaturas superiores a 35°C son capaces de formar nódulos bajo dichas temperaturas.

Tolerancia a la salinidad

El crecimiento de las cepas se vio afectado por la salinidad, observándose una menor tolerancia al incrementar la concentración de NaCl. A 23 mM de NaCl el crecimiento de 15 cepas fue abundante, mientras que solo 2 cepas sobrevivieron a 100 mM (Figura 2). Con respecto al nivel de tolerancia de las cepas, CIAT 899, CR4014B y CR4019BB crecieron a concentraciones salinas desde los 25 mM hasta los 50 mM de NaCl (Cuadro A.5.2, Anexo 5). A la máxima salinidad evaluada, las cepas CR4001B, CR4007B, CR4010B, CR4011B, CR4012B y CR4018B mostraron una tolerancia media, mientras que las cepas CR4014B y CR4019BB se identificaron como las cepas con mejor tolerancia a 100 μ M de NaCl (Figura 3).

Específicamente, la cepa CIAT 899 presentó un patrón de crecimiento consistente con lo reportado por Fernandez-Aunián et al., (2010), quienes determinaron su óptimo desarrollo a 50 mM de NaCl y una tolerancia máxima hasta 200 mM, resultados similares a los documentados por Wekesa, Asudi, et al., (2022).

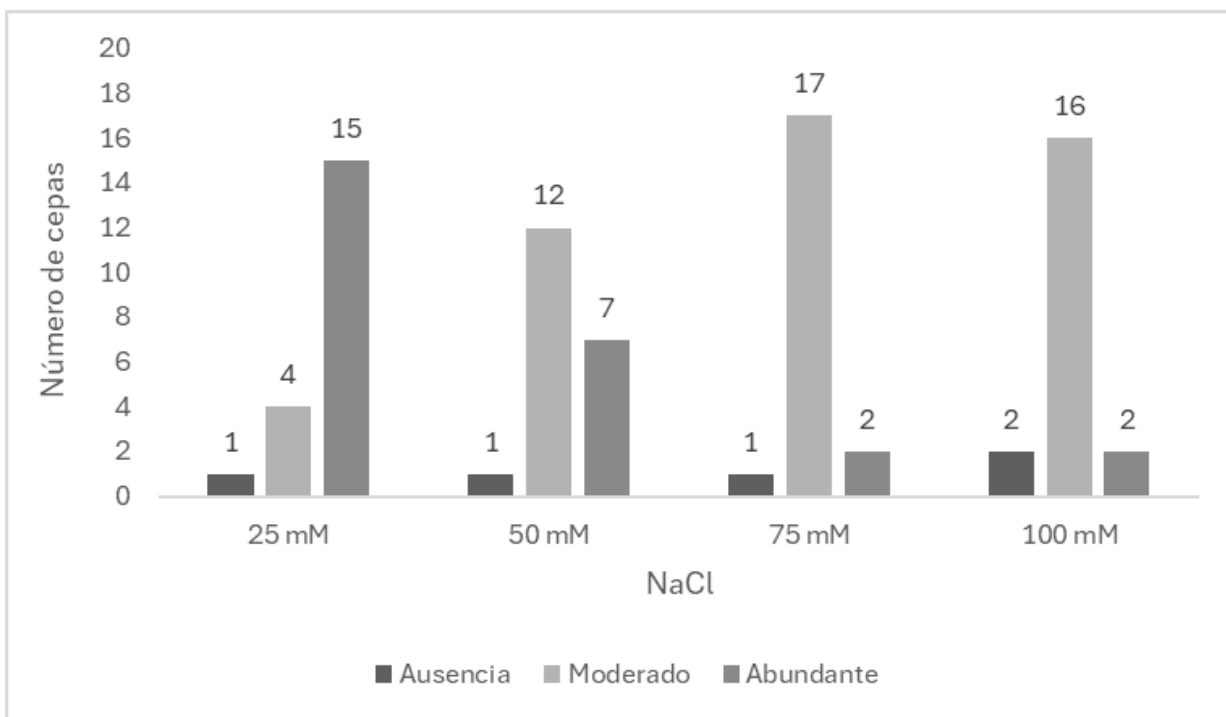


Figura 2. Prueba de tolerancia a la salinidad de 20 cepas de *Rhizobium* spp en medio sólido agar levadura manitol (ALM) adicionado con 25, 30, 35 y 40 mM de NaCl incubadas a temperatura ambiente durante tres días.

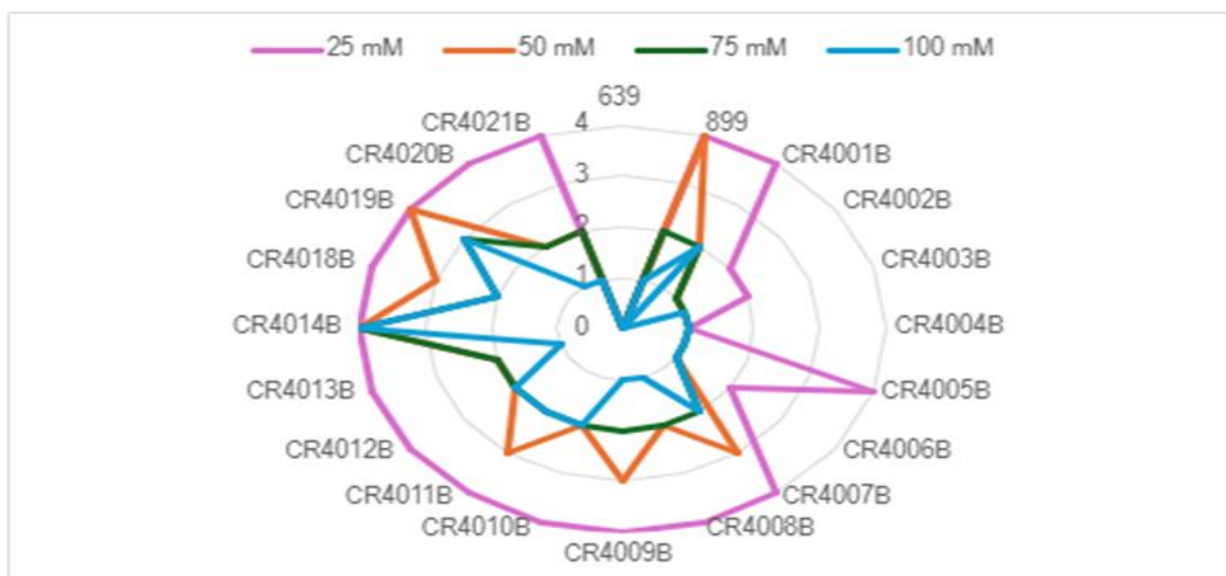


Figura 3. Tolerancia a la salinidad de 20 cepas de *Rhizobium* spp en medio sólido agar levadura manitol (ALM) suplementado con 25, 30, 35 y 40 mM NaCl incubadas a temperatura ambiente durante tres días.

Tolerancia al pH

El pH del medio no resultó ser una limitante para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium* spp. (Figura 4), con las excepciones de la cepa 639 que se mostró afectada a un pH de 5,5 y la cepa CR4005B que presentó una reducción del crecimiento tanto a un pH de 5,5 como 8 (Cuadro A.5.3, Anexo 5).

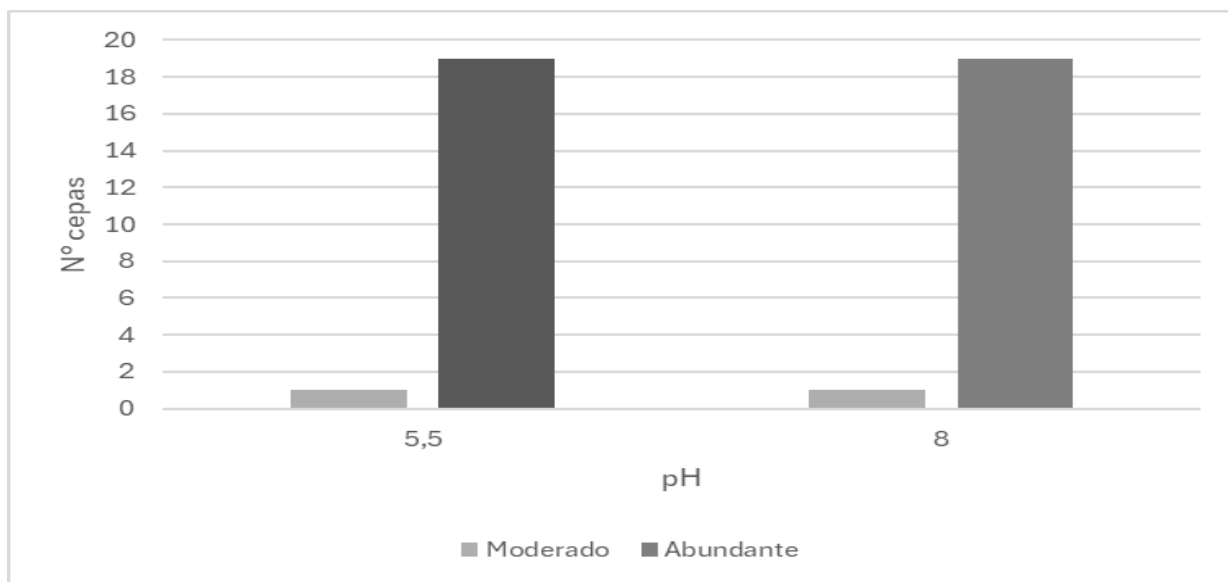


Figura 4. Prueba de tolerancia al pH de 20 cepas de *Rhizobium* spp en medio sólido agar levadura manitol (ALM) ajustado a pH 5,5 y 8. Incubadas a temperatura ambiente durante tres días.

En particular, la cepa CIAT899 ha demostrado que se encuentra bien adaptada a los suelos ácidos con un pH de hasta 4,5 (Morón et al., 2005). Esto es importante para el caso de Costa Rica donde la producción de frijol se concentra en suelos del orden Ultisol (Hernández Fonseca, 2009) con intrínsecas características ácidas y abarcan un 46,81% del territorio nacional (INTA, 2016).

Capacidad de solubilización de fósforo

El medio en el que una mayor cantidad de bacterias fueron capaces de solubilizar el fósforo fue el medio de Osorio & Habte, (2001), seguido por los medios cuya fuente de fósforo eran fosfatos de hierro, aluminio y por último el medio Pikoskaya (Figura 5).

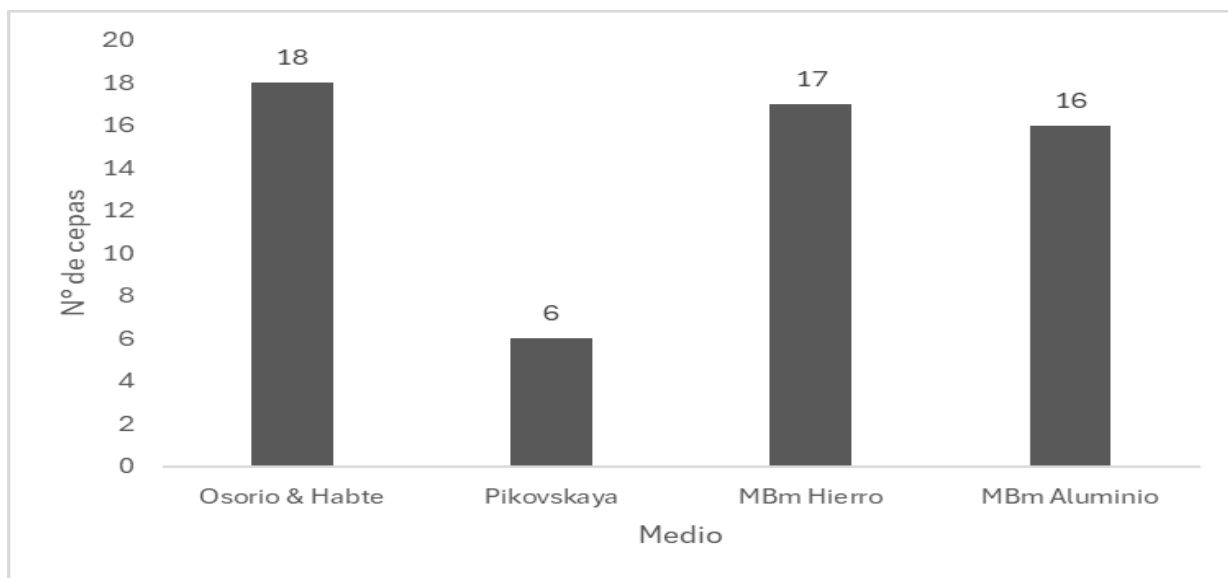


Figura 5. Capacidad de solubilización de fósforo de 20 cepas de *Rhizobium* spp., en medio sólido incubadas a temperatura ambiente.

Debido a que la fijación de nitrógeno es un proceso altamente energético que requiere una alta cantidad de ATP (Bardin et al., 1996; Rees et al., 2005), la capacidad de solubilización de P observada en las cepas evaluadas podría favorecer el establecimiento de la relación simbiótica con el hospedero (Halder & Chakrabarty, 1993) por parte de estas bacterias, lo que podría constituir una característica importante para su uso en los biofertilizantes (Shome et al., 2022).

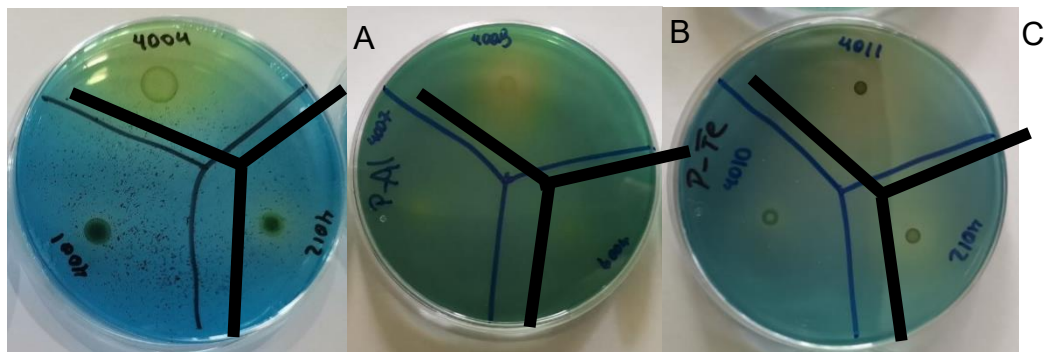


Figura 6. Solubilización de fósforo en el medio de Osorio et al (2001) (A), medio con fuente de fosfato de aluminio (B) y de hierro (C).

En el medio Pikovskaya, que utiliza fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como fuente de fósforo, sólo se hizo evidente la formación del halo transparente en las cepas CR4002B, CR4006B, CR4011B, CR4012B, CR4018B y CR4019BB (Figura 7). Algunas cepas como la CR4014B presentaron crecimiento en el medio Pikovskaya, sin embargo, no se observó la formación del halo. Los fosfatos tricálcicos se encuentran en forma insoluble en suelos con un pH superior a 7 (Bashan et al., 2013) en donde el fosfato se acompleja con iones Ca^{2+} (Shaheen & Rinklebe, 2018).



Figura 7. Capacidad de solubilización de fósforo en medio Pikovskaya's agar para la cepa de *Rhizobium* spp CR4006B. El halo transparente alrededor de la colonia es indicativo de solubilización.

En cuanto a las diferencias en los resultados entre los medios de Osorio & Habte, (2001) y Pikovskaya (1948), estas podrían deberse además de la fuente de P, a la fuente de nitrógeno utilizada, ya que el medio Osorio & Habte contiene nitrato de amonio, mientras que el medio Pikovskaya sulfato de amonio. Se sabe que la fuente de N influye sobre la capacidad de solubilización de P (Reyes et al., 1999), al respecto algunos microorganismos han demostrado preferencia por el nitrato de amonio (Seshadri et al., 2004). De esta manera, Batool & Iqbal, (2019) en uno de los pocos trabajos que comparan las fuentes utilizadas en esta evaluación (NH_4NO_3 y NH_4SO_4), concluyen que el nitrato de amonio presentó los mejores resultados de solubilización de P. Además, resulta importante mencionar que en el medio de Osorio & Habte el nitrato de amonio que contiene alrededor de 34%¹ de N y se utiliza 1 gramo por L, mientras que en el medio Pikovskaya el sulfato de amonio tiene alrededor de 21%¹ de N y utiliza la mitad de la cantidad (0,5 gramos por L), lo que implica una mayor cantidad de N en el medio de Osorio & Habte que en el medio Pikovskaya lo que podría contribuir a la mayor solubilización de P observada en dicho medio.

Estas fuentes de fósforo inorgánico empleadas para determinar la solubilización de P se encuentran ligadas a suelos de pH neutro o alcalinos, lo que excluye a los suelos ácidos, por esto, se recomienda el uso de fosfatos de hierro y aluminio como fuentes de P para esta evaluación y como un criterio más amplio el uso de varias fuentes de P permite determinar mejor la habilidad de los microorganismos de suelo para solubilizar diferentes fuentes de fosfato (Bashan et al., 2013; García Aguilar, 2017).

En lo que respecta a los medios a base de fosfatos de Fe o Al (Figura 6), los resultados muestran que la mayoría de las cepas disponen de la capacidad para poder utilizar el fósforo del medio, con la excepción de las cepas CR4005b, CR4009 y CR4021 (Figura 5, Cuadro A.5.4, Anexo 5). Como se ha mencionado, el fósforo en los suelos ácidos se asocia con el Fe o el Al presente en el suelo.

¹ (Giraud Billoud & Lascano, 2020)

La cepa CIAT899 además de su capacidad de solubilizar fosfatos de calcio en medio sólido, se ha probado su habilidad para solubilizar fosfatos de aluminio ($\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$) (de Oliveira Mendes et al., 2014) y fosfatos de hierro ($\text{Fe PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) en medio líquido (Marra et al., 2011) lo que concuerda con los resultados de esta investigación (Cuadro A.5.4).

Dado que el fósforo es un elemento de baja disponibilidad en el suelo (Johan et al., 2021) la capacidad de solubilización de P por parte las bacterias de *Rhizobium* spp., se vuelve una característica importante (Shome et al., 2022).

Producción de sideróforos

En lo que respecta a la producción de sideróforos se encontró que las cepas CIAT899, CR4001B, CR4003B, CR4010B, CR4011B, CR4012B, CR4013B y CR4019BB (Cuadro A.5.5, Anexo 5) produjeron sideróforos en el medio CAS. EL mayor viraje del medio se obtuvo en las cepas CR4012B, CR4001B, CR4003B y CR4010B en orden decreciente de la mejor respuesta hacia la menor. En estas cepas se observan los tonos rojizos sobre el medio CAS (Figura 8) tal y como lo menciona Milagres et al., (1999) como resultado de la solubilización del hierro acomplejado, sin embargo, la cepa CR4019BB presentó, además, coloraciones amarillentas que, de igual manera se encuentra ligada con la producción de sideróforos (Ingole et al., 2023; Srimathi & Suji, 2019).

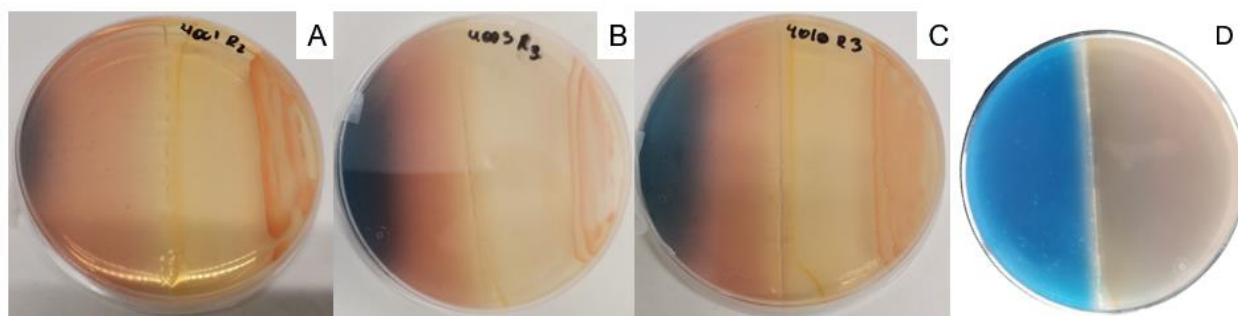


Figura 8. Producción de sideróforos en cepas de *Rhizobium* spp., (A = CR4001B; B = CR4003B; C = CR4010B; D = Plato de referencia sin inocular).

La producción de sideróforos es una cualidad de gran importancia para la selección de microorganismos que presentan potencial como promotores de crecimiento debido a que generan competencia por el hierro en la rizosfera, lo que deja en desventaja a otros habitantes de suelo como lo pueden ser microorganismos fitopatógenos, de esta manera las bacterias productoras de sideróforos podrían actuar como controladores biológicos (Blanco Carrero & Castro Molina, 2021; Butaité et al., 2017; Contreras-Moreno et al., 2024; Gu et al., 2020; Kümmerli, 2023; O'Sullivan & O'Gara, 1992; Santoyo et al., 2010).

La producción de sideróforos está influenciada por la concentración de Al^{3+} en el suelo, ya que estos compuestos, sintetizados por *Rhizobium* spp., tienen la capacidad de quelatar tanto Fe^{3+} como Al^{3+} . Estudios han demostrado que la formación del complejo Al^{3+} - sideróforo puede mitigar los efectos tóxicos del aluminio, reduciendo su impacto negativo en los microorganismos y las plantas (Roy & Chakrabarty, 2000). Se ha reportado que este complejo Al^{3+} - sideróforo puede disminuir el efecto tóxico del aluminio (Rogers et al., 2001).

Tolerancia al aluminio

Definición del tiempo de cultivo

En el bioensayo realizado para determinar el tiempo adecuado para medir el crecimiento de las cepas en el medio al que se adicionó aluminio, se observó que el cultivo se mantuvo con un aumento de la absorbancia hasta las 48 horas. No obstante, en la medición realizada a las 72 horas se observó una gran cantidad de filamentos por lo que se eligió medir la absorbancia a las 48 horas. Esto concuerda con el tiempo de medición realizado por Wekesa, Muoma, et al., (2022).

La presencia de filamentos puede deberse a que el aluminio tiende a ligarse al ADN de la bacteria e interferir con el proceso de replicación celular, lo que sería un indicativo de sensibilidad al aluminio, el gran aumento en la síntesis de ADN reportado por Johnson & Wood, (1990) se atribuyó a un intento de las células de cepas sensibles por autorepararse e impedir de esta forma la caída en la viabilidad de las células.

Sobrevivencia de las bacterias a la toxicidad por aluminio

A una concentración de 22,3 μM de aluminio, 18 cepas presentaron una absorbancia entre 0,6 y 1,0, mientras que a 67 μM (Figura 9) solo 3 cepas mantuvieron este rango. En el control sin aluminio, 11 cepas mostraron una absorbancia $>1,0$, evidenciando el efecto inhibitorio del aluminio sobre el crecimiento bacteriano. Destacan las cepas CR4008B, CR4008B y CR4014B, que a 67 μM registraron las absorbancias más altas del estudio (Cuadro A.3.6, Anexo 3), identificándolas como las más resistentes a esta concentración.

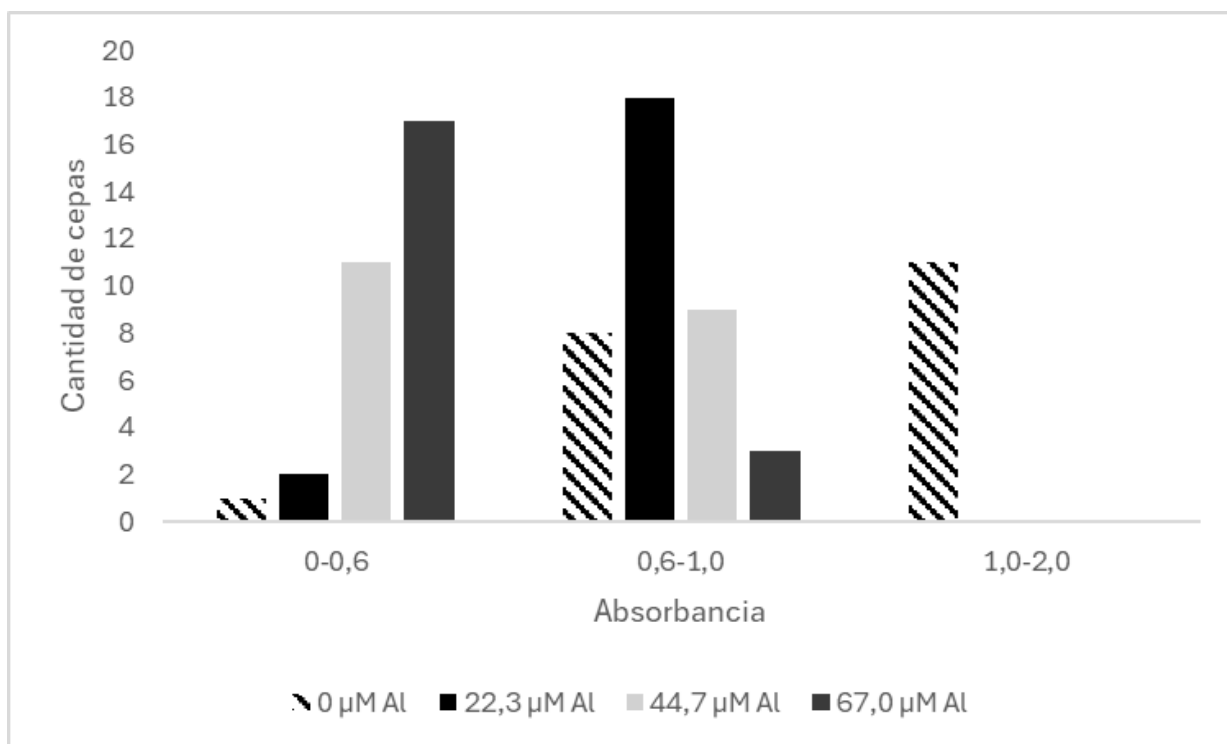


Figura 9. Sobrevivencia de cepas de *Rhizobium* spp., a tres concentraciones de aluminio en medio líquido 22,3 μM , 44,7 μM T3 67,0 μM .

El análisis de susceptibilidad al aluminio (Figura 10) reveló que 15 cepas presentaron una sensibilidad $\leq 40\%$ a 22,3 μM de Al, mientras que la mayoría mostró un rango de susceptibilidad entre 40% y 70% en todas las concentraciones

evaluadas; solo 6 cepas alcanzaron una susceptibilidad elevada (70%-100%) a la máxima concentración probada (67 μM de Al). El porcentaje susceptibilidad de la cepa CIAT899 se mantuvo constante entre los 44,7 y 67,0 μM de Al (A.3.6, Anexo3), esto concuerda con lo expresado por Wekesa, Asudi, et al., (2022) que reporta una inhibición para esta cepa cercana al 60%. Por otra parte, Kingsley & Bohlool, (1992) expone que a concentraciones cercanas a 80 μM Al, la cepa CIAT899 produce compuestos extra e intracelulares que la podrían proteger contra la toxicidad causada por el aluminio.

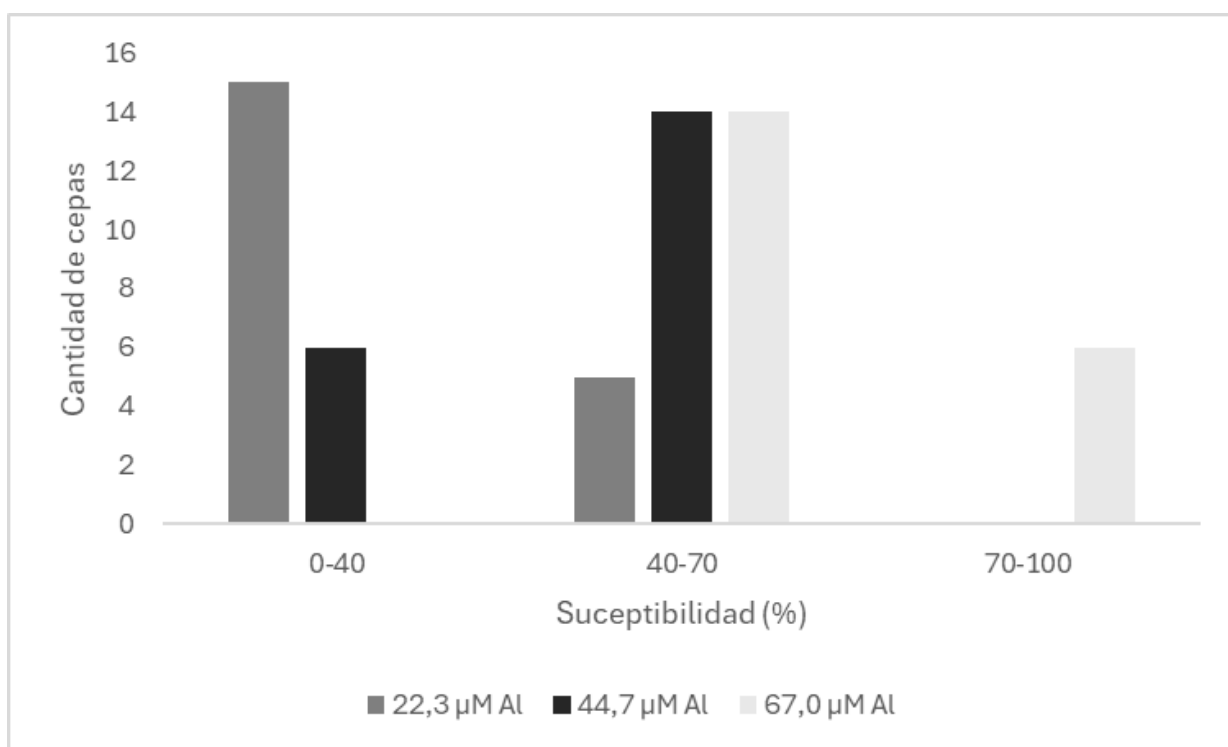


Figura 10. Porcentaje de susceptibilidad de cepas de *Rhizobium* spp., a tres concentraciones de aluminio en medio líquido 22,3 μM , 44,7 μM , 67,0 μM .

Cuando se estudió el efecto de los niveles de aluminio sobre la viabilidad (recuento variable en plato) de las cepas CR4019BB y CIAT 899 (Figura 11), se encontró una menor cantidad de bacterias en los niveles más altos de Al. La cepa

CR4019BB presentó un descenso de células viables de 9,2 a 8,8 UFC / mL con la concentración más baja de Al y se mantuvo sin diferencias hasta los 44,7 μ M. Estos resultados sugieren que CR4019BB podría poseer un mecanismo de amortiguamiento frente a la toxicidad por aluminio hasta 44.7 μ M, posiblemente asociado a la autorregulación de su pH interno (Lei et al., 2011) mientras que la cepa CIAT 899 muestra un descenso continuo y sostenido. En resumen, las diferencias significativas en cuanto a la cantidad de bacterias presentes en todas las concentraciones de Al evaluadas indican que, a mayor concentración de aluminio, menor es la población de *Rhizobium*.

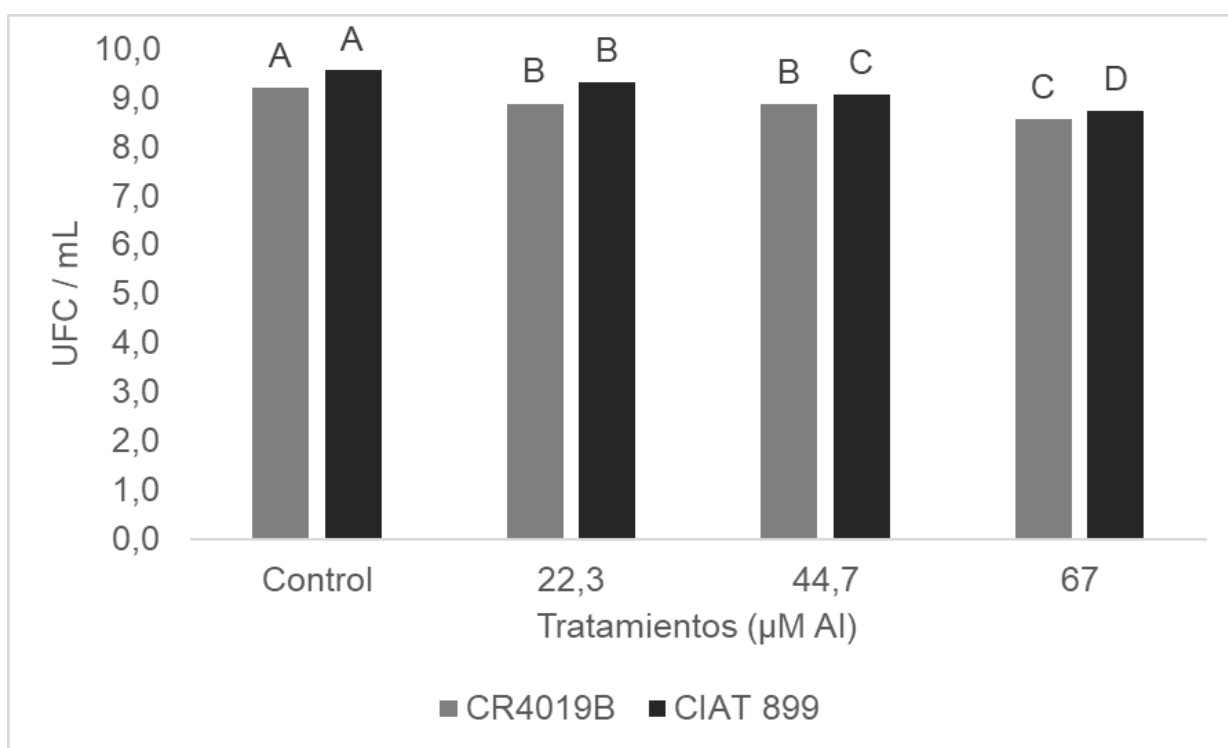


Figura 11. Recuento en plato de bacterias de *Rhizobium* spp., (UFC / mL) de las cepas CR4019BB y CIAT899 cultivadas en el medio CLM con diferentes concentraciones de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ durante 48 horas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Con respecto a la cepa CIAT899 el recuento en plato muestra diferencias significativas del número de colonias (22,3 μ M de Al) al igual que la cepa

CR4019BB, sin embargo, a diferencia de esta, la cepa CIAT899 disminuyó en el nivel de 44,7 μM de Al y se mantuvo constante sin diferencias significativas hasta 67 μM de Al. Ferreira et al., (2012) reportó la tolerancia de la cepa CIAT899 hasta los 100 μM de Al. Esto concuerda con el % de inhibición que se muestra en el cuadro 8, en donde la cepa CIAT899 se mantuvo constante entre los 44,7 μM de Al y 67 μM de Al mientras que la cepa CR4019BB se mantuvo relativamente constante entre los 22,3 μM de Al y los 44,7 μM .

Capacidad de nodulación

Todas las cepas de *Rhizobium* spp., evaluadas fueron capaces de generar nódulos en las variedades Cabécar y Guaymí. Esta respuesta se debe a que la mayoría de las cepas fueron aisladas de frijol y este, ha tenido una amplia exposición a una gran variabilidad genética de cepas de *Rhizobium* spp., y con esta exposición ha desarrollado una amplia capacidad para establecer el enlace simbiótico con este género de bacterias (O. M. Aguilar et al., 2022; Martínez-Romero, 2003; Shamseldin & Encarna Velázquez, 2020).

Índice de selección

El índice de selección muestra que las cepas CR4019BB y CIAT899 son las cepas con las mejores calificaciones en las pruebas realizadas (Cuadro 2). Se destacan su capacidad de solubilización de P y la producción de sideróforos, lo que les permitiría competir en la rizosfera con otros microorganismos presentes en el suelo. Adicionalmente puede resultar beneficioso para la promoción del crecimiento vegetal. La presencia de estas dos características en un solo microorganismo se percibe como una excelente combinación (Parra-Cota et al., 2018; Vassilev et al., 2006; Fernández & Rodríguez, 2005; Pineda, 2015; Scavino & Pedraza, 2013; Vargas Barrantes & Castro Barquero, 2018).

Cuadro 1. Índice de selección de cepas de *Rhizobium* spp., de acuerdo con su tolerancia a la salinidad, temperatura, pH, capacidad de solubilizar P, tolerancia al aluminio, producción de sideróforos y capacidad de nodulación².

Cepa	Tolerancia a				Capacidad de		Producción de sideróforos	Índice de selección (IS)
	la Salinidad	la temperatura	al pH	al aluminio	solubilizar P	nodulación		
CR4019BB	0,85	0,88	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	0,95
CIAT899	0,81	0,75	1,00	0,61	1,00	1,00	1,00	0,88
CR4012B	0,81	0,56	1,00	0,69	1,00	1,00	1,00	0,87
CR4011B	0,81	0,63	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	0,85
CR4010B	0,81	0,50	1,00	0,78	0,75	1,00	1,00	0,83
CR4013B	0,81	0,44	1,00	0,77	0,75	1,00	1,00	0,82
CR4001B	0,81	0,50	1,00	0,95	0,50	1,00	1,00	0,82
CR4019BB	0,85	0,88	1,00	0,91	1,00	1,00	0,00	0,81
CR4019BB	0,85	0,88	1,00	0,91	1,00	1,00	0,00	0,81
CR4014B	0,88	1,00	1,00	0,96	0,75	1,00	0,00	0,80
CR4003B	0,77	0,31	1,00	0,73	0,75	1,00	1,00	0,79
CR4018B	0,81	0,63	1,00	0,74	1,00	1,00	0,00	0,74
CR4008B	0,81	0,44	1,00	0,88	0,75	1,00	0,00	0,70
CR4007B	0,81	0,63	1,00	0,93	0,50	1,00	0,00	0,69
CR4004B	0,77	0,25	1,00	1,00	0,75	1,00	0,00	0,68
CR4002B	0,75	0,25	1,00	0,70	1,00	1,00	0,00	0,67
CR4006B	0,44	0,25	1,00	0,90	1,00	1,00	0,00	0,65
CR4009B	0,81	0,63	1,00	0,69	0,25	1,00	0,00	0,63
CR4005B	0,79	0,44	0,63	0,88	0,25	1,00	0,00	0,57
639	0,75	0,00	0,75	0,52	0,50	1,00	0,00	0,50

² Salinidad (25, 50 75, 100 μ M NaCl); Temperatura (25, 30, 35, 40 °C), pH (5,5 y 8), Capacidad de solubilizar P (Pikovskaya's Agar y el medio de (Osorio & Habte, 2001)), tolerancia al aluminio (0; 22,3; 44,7; 67,0 μ M Al), producción de sideróforos (CAS blue agar). Nota: 1 = máximo posible en cada categoría de análisis; 0 = No hubo respuesta; IS = sumatoria de todas las variables

Promoción de crecimiento.

Las plantas fueron inoculadas con una población de $2,0 \times 10^8$ para la cepa 4019 y $8,4 \times 10^8$ UFC/mL para la cepa CIAT899. Cáceres-Acosta et al., (2024) concluyeron que una concentración de 10^8 es adecuada para un biofertilizante a base de *Rhizobium* spp., con efecto positivos en la promoción del crecimiento. Diversos estudios reportan que una concentración de 10^8 UFC/mL (Martins et al., 2004; Rodríguez & López, 2009; Valero Valero et al., 2021) induce respuestas significativas en parámetros productivos (Chipana et al., 2017).

El peso seco (Figura 12) de la parte aérea de las plantas de frijol inoculado con la mezcla de cepas T3 (CIAT899 + CR4019BB) de la variedad Guaymí, presentó diferencias con respecto a las plantas inoculadas con T1 (CIAT899) dentro de la variedad Cabécar. Mientras que el peso seco de la raíz indica que el T4 (Urea) de la variedad Cabécar mostró diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos.

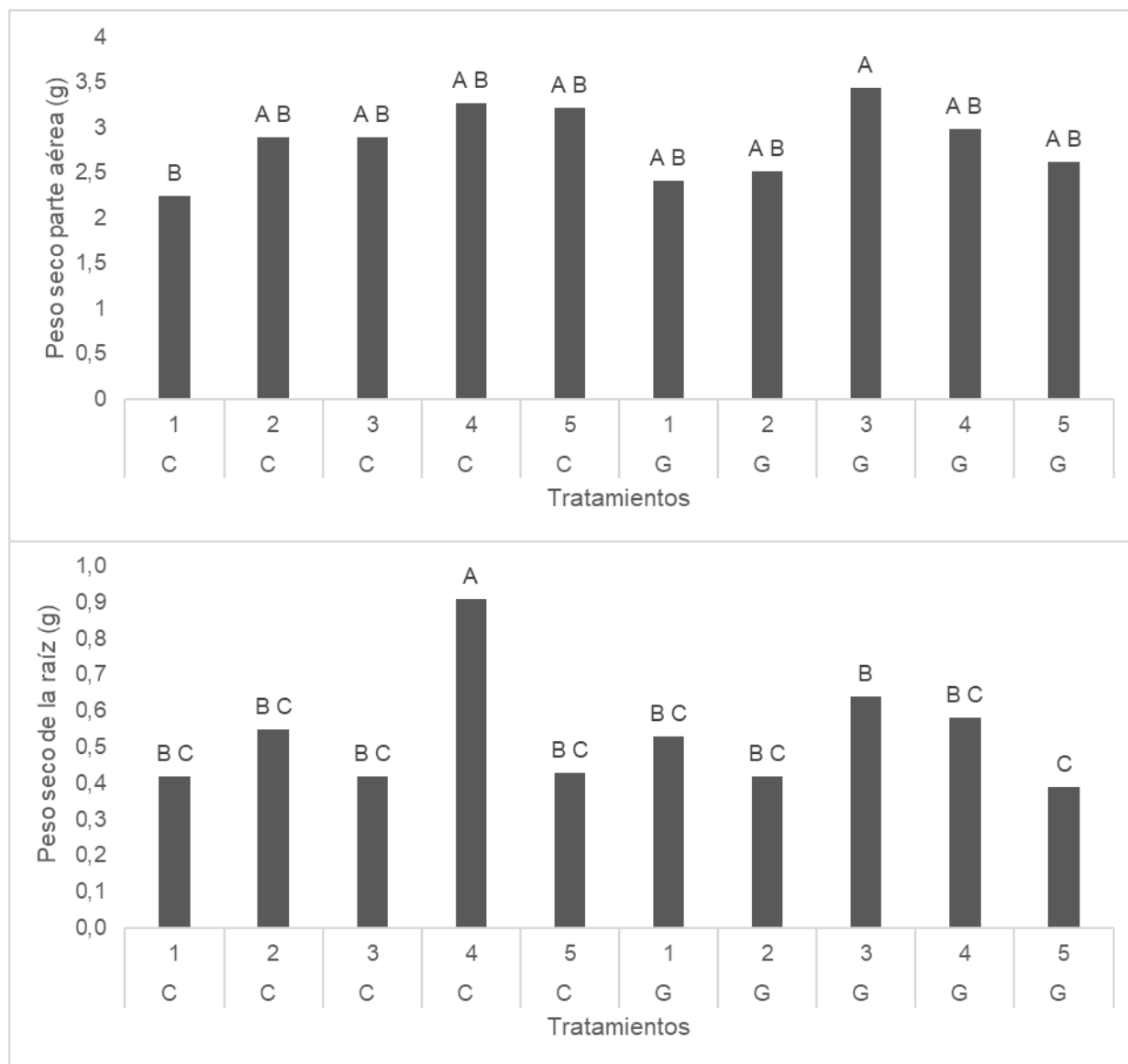


Figura 12. Peso seco de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Análisis foliar

En lo que respecta al contenido de nitrógeno en las plantas, se encontró un rango de 1,54 a 2,11 %. Las plantas de los tratamientos Cabécar T1 (CIAT899) y Guaymí T2 (CR4019BB) tendieron a presentar el contenido más alto de N para cada variedad. En cuanto a la variedad Cabécar, se aprecia que el T1 (CIAT899) presenta diferencias significativas con respecto al T5 (Testigo), por otra parte, la variedad Guaymí no mostró respuesta a la inoculación en esta variable, puesto que no se encontraron diferencias entre los tratamientos con respecto al testigo (Figura 13), cabe mencionar que las plantas inoculadas con la mezcla de las cepas (T3) obtuvo un porcentaje de N significativamente menor que la cepa CR4019BB.

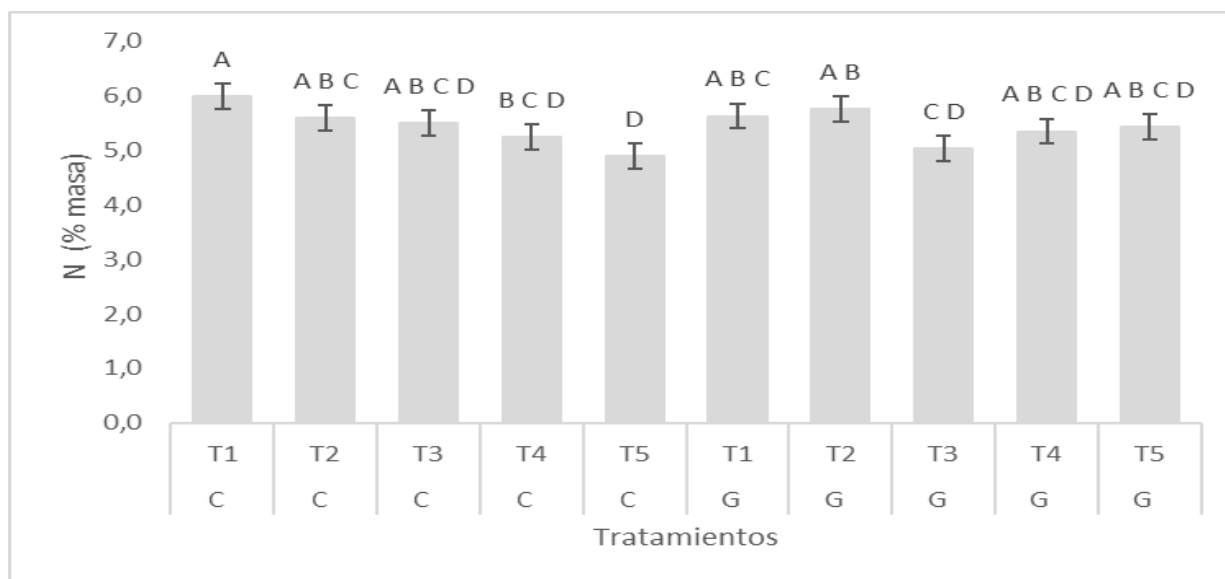


Figura 13. Contenido de nitrógeno en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los valores de unidades SPAD (Figura 14), mostraron un rango de 26,95 a 31,28 en donde las plantas a las que se aplicaron los tratamientos T1 (CIAT899) y T2 (CR4019BB) de la variedad Cabécar mostraron los mayores valores y los más bajos se observaron en las plantas de los tratamientos T3 y T5 de la variedad Guaymí.

En un ensayo llevado a cabo por Fernández-Luqueño et al., (2010) se reporta que el contenido máximo de clorofila en frijol -medido en unidades SPAD- ocurre entre los 60 y 80 días después de la siembra. Los datos obtenidos a los 30 días muestran que las unidades SPAD anduvieron entre 29 y 35 lo que concuerda con los tratamientos T1 (CIAT899), T2 (CR4019B) y T4 (Urea) de variedad Cabécar y el T2 (CR4019B) de la variedad Guaymi

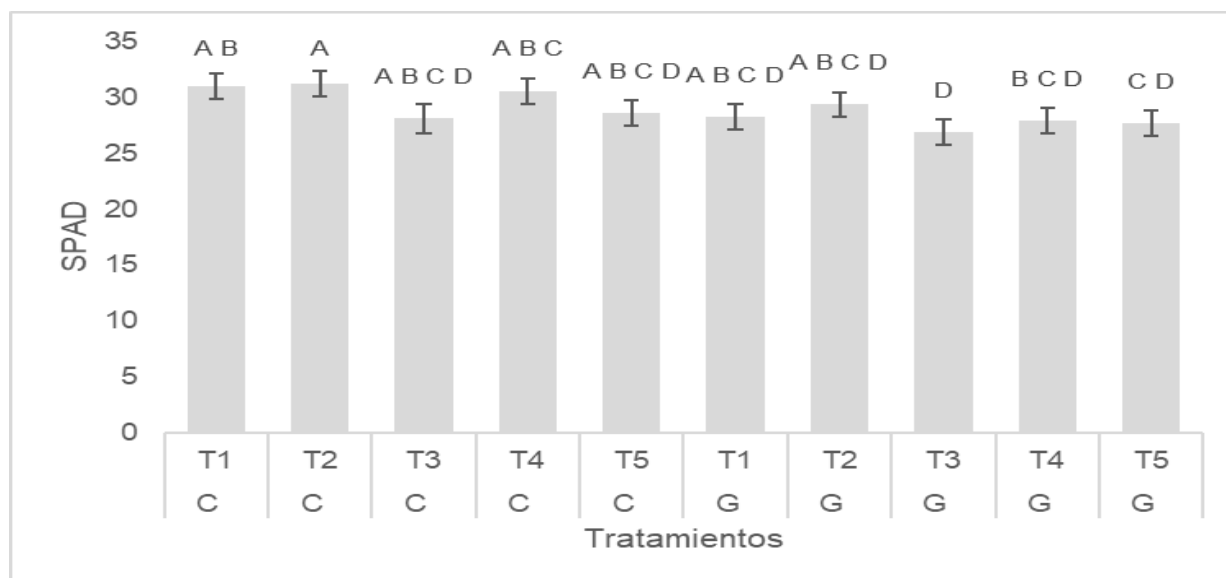


Figura 14. Unidades SPAD plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El contenido de fósforo (Figura 15) muestra que las plantas inoculadas con el T1 (CIAT 899) y el T2 (CR4019BB) de la variedad Cabécar presentaron un mayor contenido de P que el T5 (Testigo), mientras que en el caso de la variedad Guaymí los frijoles

inoculados con la cepa CR4019BB y el tratamiento al que se aplicó Urea también presentaron diferencias significativas con el Testigo T5. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura científica (SAMAGO & DAKORA, 2024; Tajini et al., 2011), donde se ha documentado el efecto positivo de *Rhizobium* spp. sobre el contenido de fósforo en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cabe señalar que ambas cepas fueron capaces de solubilizar P en medio de cultivo. Un resultado interesante es que en el caso de la variedad Guaymí, el tratamiento inoculado con las dos cepas (T3) fue significativamente menor que el inoculado con la cepa CIAT899.

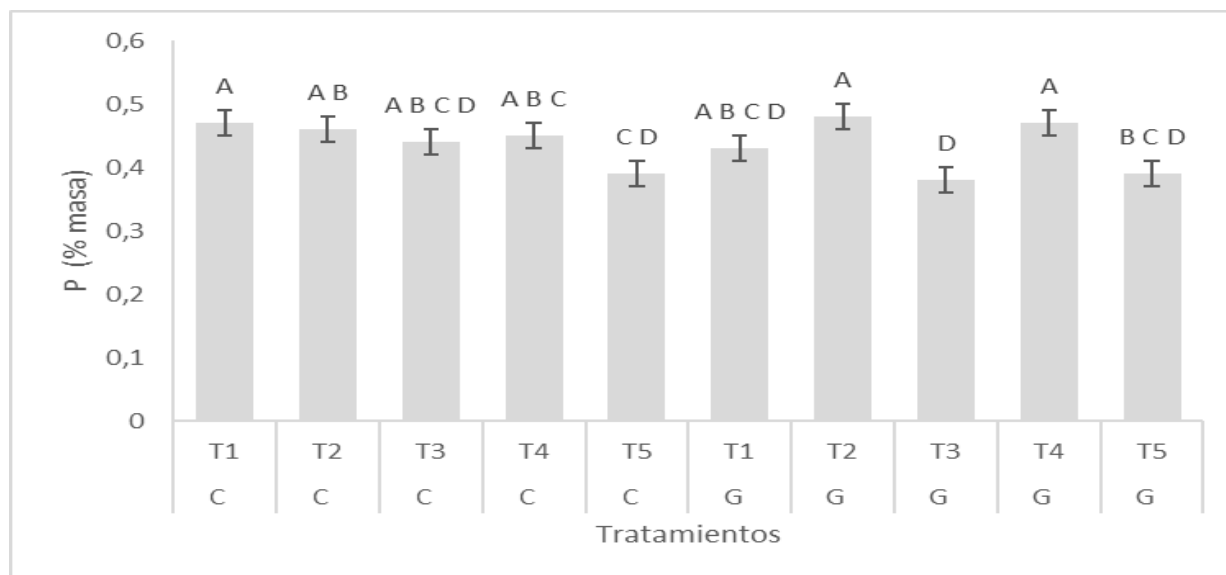


Figura 15. Contenido de fósforo en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar; G= Guaymí; T1 = CIAT899; T2= CR4019BB; T3= CIAT899 + CR4019BB; T4= urea; T5= Testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El contenido de K en la variedad Cabécar (Figura 16) tiende a ser mayor en las plantas inoculadas con la cepa CIAT899 (T1) mientras que las plantas a los que no se aplicó fertilizante nitrogenado (T5) tendieron a presentar el menor valor. Dentro de cada una de las variedades no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados conservadores en cuanto al efecto de *Rhizobium* spp., sobre este elemento, también fueron reportadas por Hernández Salido & Salido García, (2019).

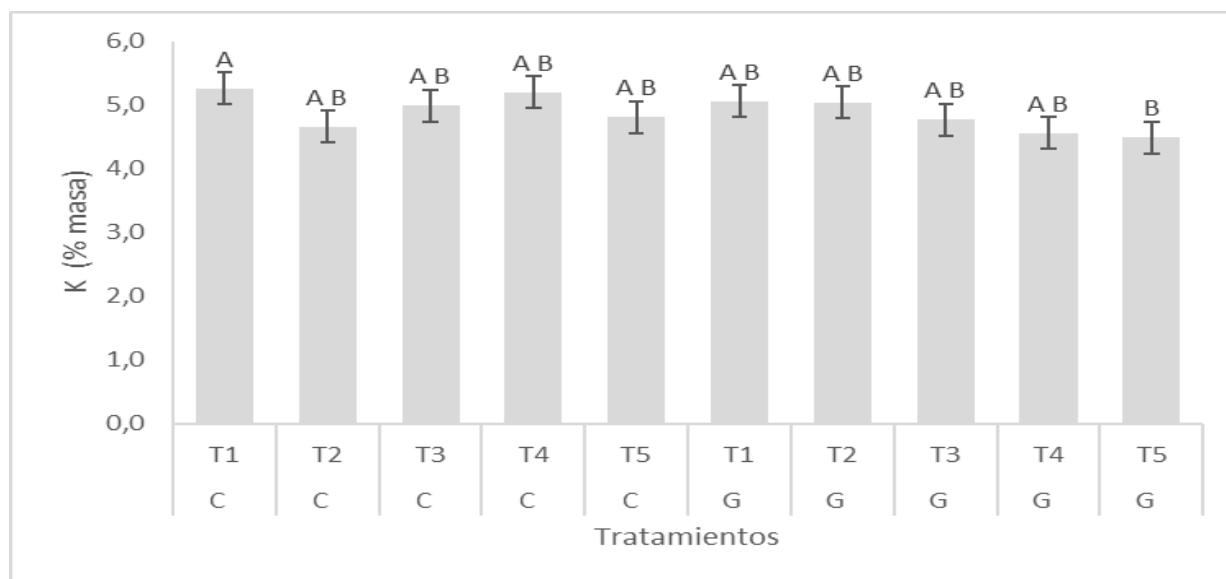


Figura 16. Contenido de potasio en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Con respecto al contenido de calcio (Figura 17) en la variedad Cabécar, el valor de calcio en la planta sino presentó diferencias entre los tratamientos. En la variedad Guaymí el T1 (CIAT 899) mostró diferencias significativas con respecto al T4 (Urea) y el T5 (Testigo) lo que implica una mejor nutrición de calcio en la planta como resultado posible de la inoculación con *Rhizobium* spp. Una mejora en el contenido de calcio en plantas inoculadas por *Rhizobium* spp., también fue reportado por Bērtiņš et al. (2021). Como referencia, el suelo utilizado para el ensayo presentó un contenido de calcio de 4,02 cmol / L después de ser esterilizado en la autoclave (Cuadro A.4.1, Anexo 4).

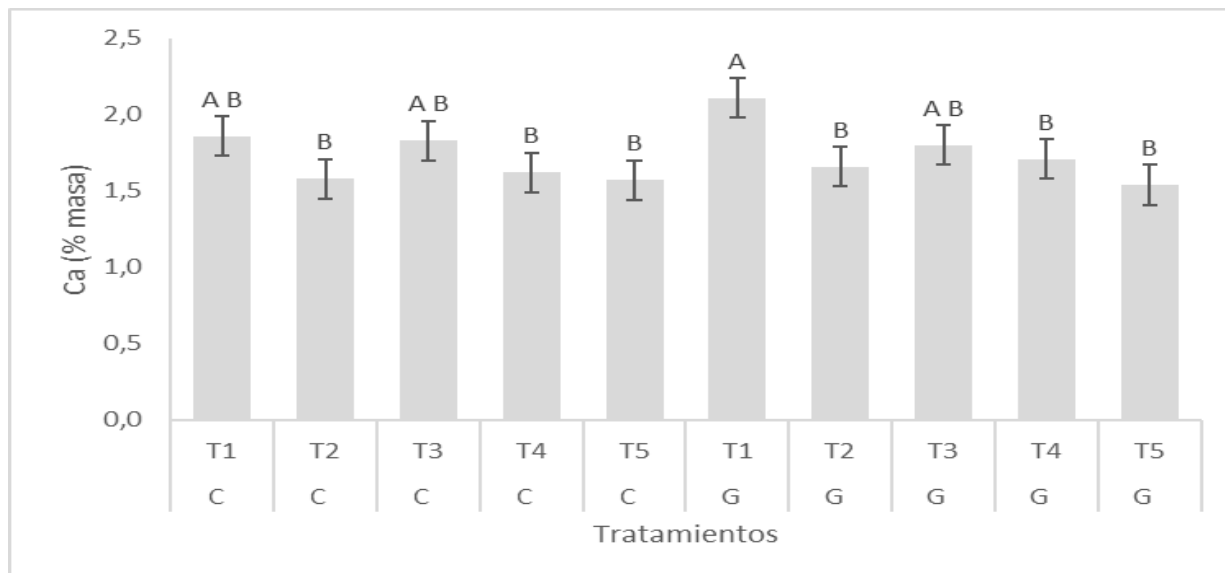


Figura 17. Contenido de calcio en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El contenido de boro foliar (Figura 18) resulta particularmente interesante, ya que tanto el tratamiento T2 (CR4019B) como el T1 (CIAT899) en la variedad Guaymí mostraron diferencias significativas en comparación con el T5 (Testigo). En contraste, dichas diferencias no se observaron en la variedad Cabécar. Algunos estudios, como el realizado por Ndakidemi et al. (2011), han investigado el efecto de *Rhizobium* spp. en el contenido de micronutrientes en plantas de frijol. Los resultados indicaron que, en plantas inoculadas, el contenido de ciertos micronutrientes, como el boro, se incrementó significativamente en comparación con las plantas no inoculadas.

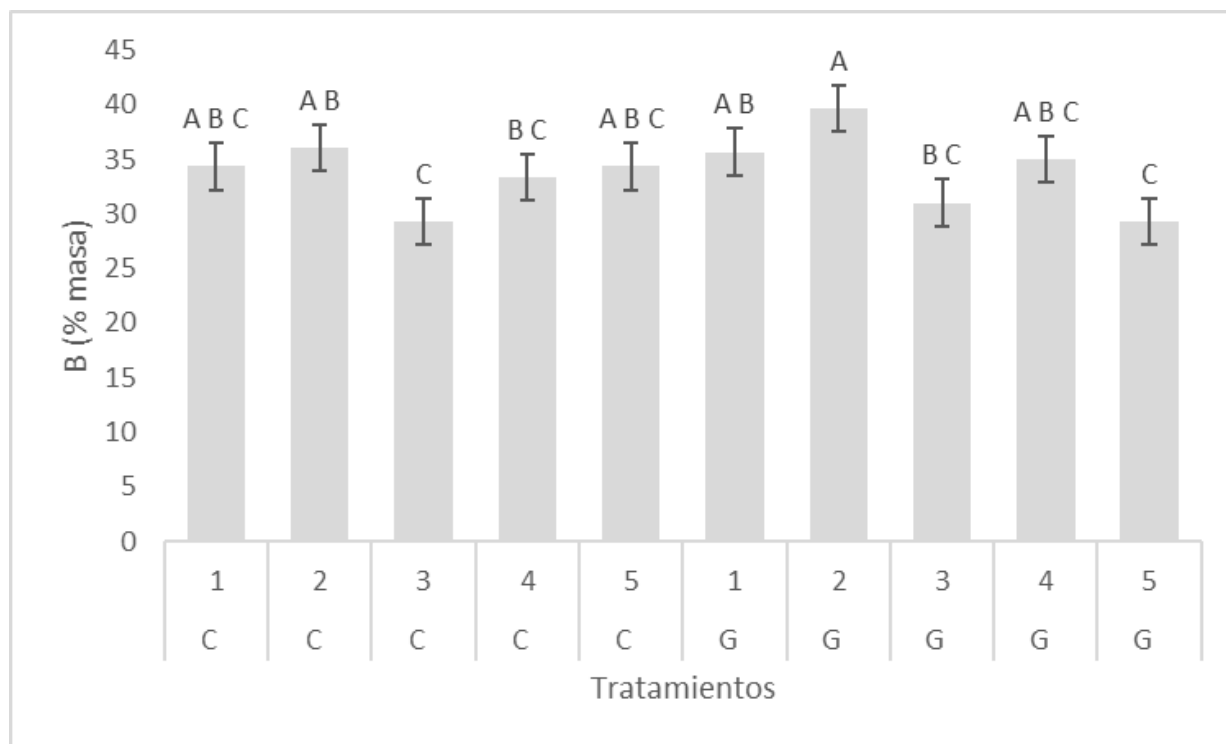


Figura 18. Contenido de boro en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., en invernadero (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Efecto de la inoculación de *Rhizobium* spp sobre la calidad del grano de frijol.

Contenido total de Polifenoles

Los polifenoles totales corresponden a la suma de polifenoles solubles e insolubles. En términos generales, se observa un menor contenido de polifenoles totales (Figura 19) en las plantas inoculadas que en las plantas del tratamiento control fertilizado con urea (T4) y el tratamiento sin urea y sin inocular (T5) debido a una mayor acumulación de polifenoles insolubles en estos tratamientos (Figura 19). Cuando se estudió la variedad Cabécar se encontró que el tratamiento T3 (CIAT899+CR4019BB) no se diferenció de los tratamientos T4 y T5. De acuerdo con investigaciones del CIGRAS, la variedad Cabécar ha mostrado una mayor cantidad de polifenoles que la variedad Guaymí en

plantaciones comerciales (León-Cortés et al., 2025), sin embargo, esto puede variar con la procedencia de la muestra (De Lima et al., 2014; Ga et al., 2007; Gao et al., 2017; Y.-K. Wang et al., 2016), aún en el mismo lote puede encontrarse diferencia entre cosechas consecutivas (Dinelli et al., 2006). En la variedad Guaymí el contenido de polifenoles tanto en el tratamiento con urea (T4) como el testigo (T5) presentaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos inoculados.

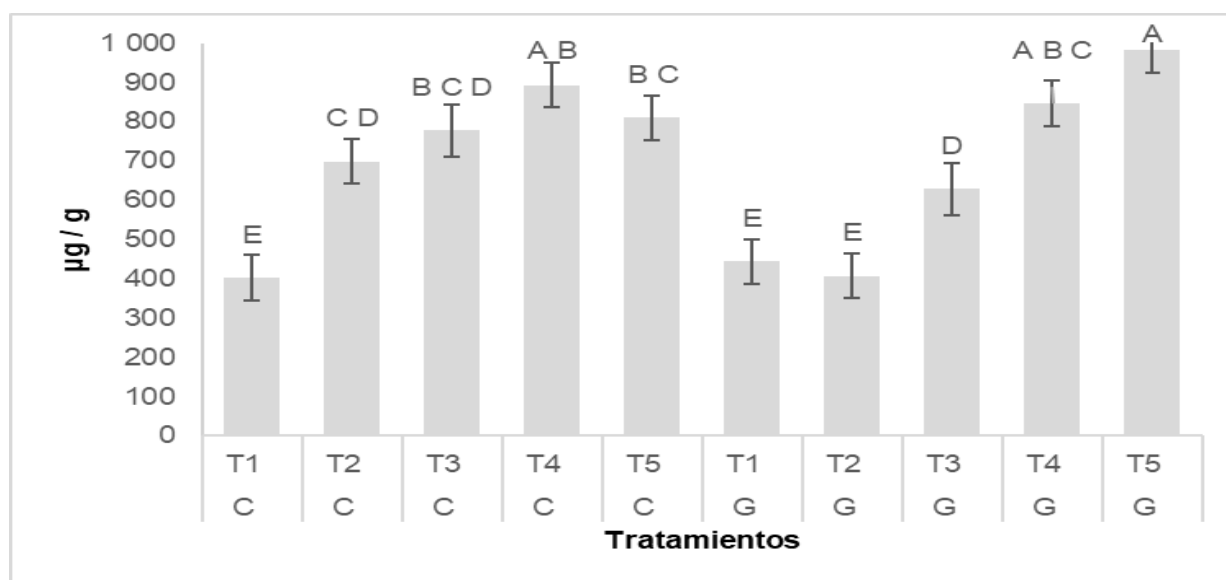


Figura 19. Contenido total de polifenoles (solubles + insolubles) presentes en granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Polifenoles solubles e insolubles totales

La variedad Cabécar destaca por su contenido significativamente superior de polifenoles solubles totales (Figura 20) en comparación con la variedad Guaymí, de igual manera, se observan diferencias significativas en las plantas de los tratamientos T2 (CR4019BB), T3 (CIAT899 + CR4019BB) con respecto al T4 (Urea), lo que no sucede para la variedad Guaymí que se mantiene sin diferencias entre los tratamientos. La fracción soluble de polifenoles es importante debido a que representa la fuente disponible más rápida de estos compuestos en el grano de frijol (Alam et al., 2016; Yeh & Yen, 2003).

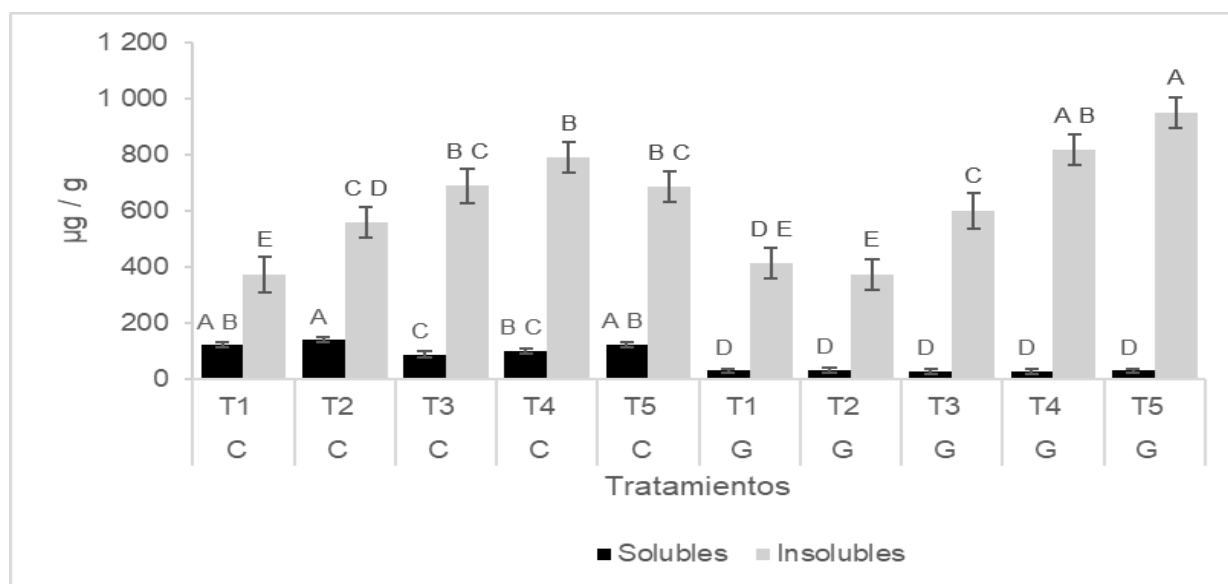


Figura 20. Contenido total de polifenoles solubles e insolubles presentes en granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Relación de polifenoles solubles / insolubles (RPSI)

Cuando se analizó la relación polifenoles solubles/insolubles (Figura 21) se encontró diferencias significativas entre los granos de frijol de T1 (CIAT 899) de la variedad Cabécar, y el T2 (CR4019B), con respecto al T4 (Urea). La variedad Guaymí presenta diferencias en el RPSI en los granos del T1 (CIAT 899), T2 (CR4019B) y T3 (CIAT 899 + CR4019B) con respecto al T4 (Urea) y T5 (Testigo) que mantuvieron el mayor contenido de polifenoles insolubles totales. Se encontró que la fracción insoluble de polifenoles totales fue la predominante en ambas variedades de frijol, lo que coincide con lo encontrado para el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Rivas Medina, 2018; Rochín-Medina et al., 2021). Cabe mencionar que esta fracción se encuentra enlazada a la matriz del grano donde interactúan con compuestos rígidos de la pared celular (de la Rosa et al., 2019; Nicolás-García et al., 2021; Shahidi et al., 2016a) por lo que *Rhizobium* spp., podría estar modificando el perfil de polifenoles totales a favor de acumular menos polifenoles insolubles en beneficio de la permeabilidad de la membrana celular (Vijayan et al., 2023).

Cabe destacar que la relación de polifenoles solubles/insolubles se encuentra ligada a parámetros de calidad de grano dado que afecta su potencial antioxidante (Rasera et al., 2020), y es indicativa de procesos internos del grano (Yeo & Shahidi, 2015). Esta relación también se ha ligado a parámetros de bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos debido al desequilibrio con su par conjugado (Rocchetti et al., 2017).

Valores entre los 0,07 y 0,55 de la RPSI han sido encontrados en variedades de frijol mexicanos (Rochín-Medina et al., 2021), los autores indican que la capacidad antioxidante fue más alta cuando los valores de RPSI se situaban entre 0,2 y 0,3, valores distintos produjeron una caída en la capacidad antioxidante. En esta investigación el tratamiento T2 (CR4019BB) de la variedad Cabécar presentó el mayor valor en comparación con los demás tratamientos. Esto significa que el contenido de polifenoles totales debe de ser analizado con base en la distribución de sus fracciones (Yang et al.,

2018) debido a la compleja interacción que presentan con otros compuestos fitoquímicos (Sęczyk et al., 2021; Yang et al., 2020).

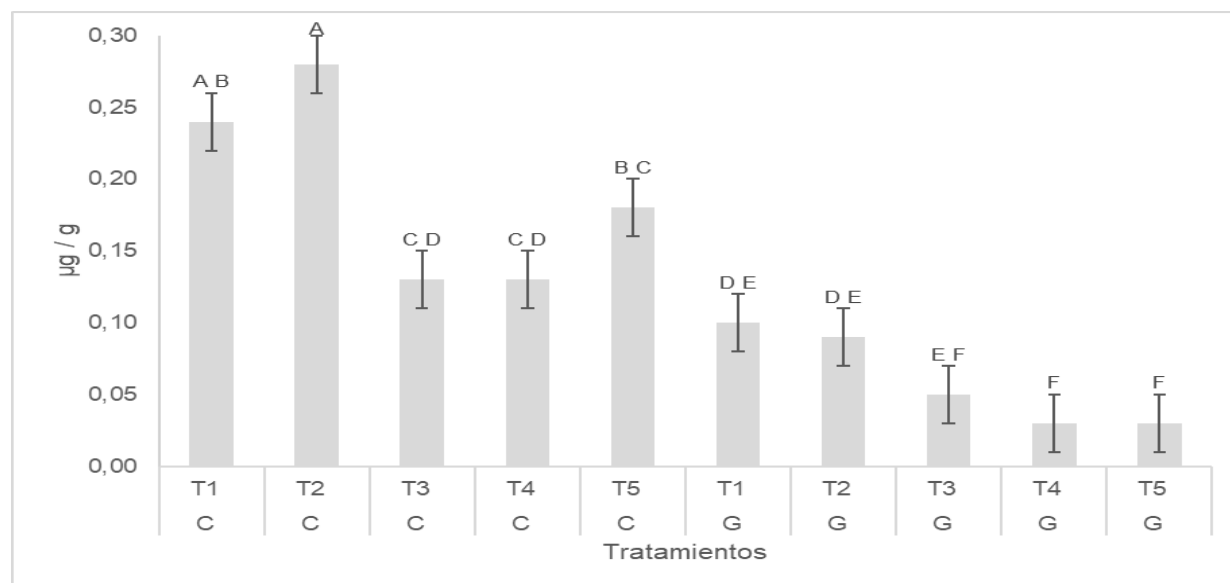


Figura 21. Relación de los polifenoles solubles / insolubles de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Perfil de polifenoles en la fracción soluble

Ácidos Fenólicos

Cuando se caracterizaron los polifenoles solubles se encontró que los ácidos siríngico y vanílico se presentaron sólo en una de las dos variedades estudiadas (Figura 22), el ácido vanílico se encontró en la Cabécar y el ácido siríngico sólo en la variedad Guaymí. En la variedad Cabécar se detectó ácido vanílico, sin diferencias significativas entre los tratamientos y en la variedad Guaymí se encontró ácido siríngico en mayor cantidad en los granos del T1(CIAT 899) con diferencias con respecto a los demás

tratamientos. Tanto el ácido vanílico como el ácido siríntrico se han reportado en ambas variedades (Espinosa-Alonso et al., 2006; Gao et al., 2017; Nyau et al., 2015; Okafor et al., 2022).

Esto concuerda con lo reportado por Ombra et al., (2016), quienes no encontraron ácido vanílico en variedades de grano negro, sin embargo, Yang et al. (2018) señala que tanto el ácido vanílico como el ácido siríntrico están entre los ácidos fenólicos de mayor ocurrencia en granos de frijol.

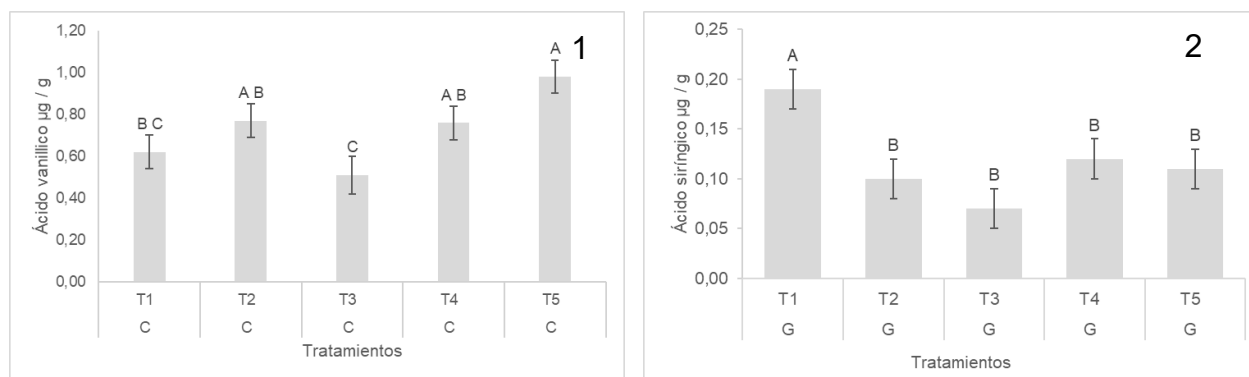


Figura 22. Concentración de ácido vanílico (1) y siríntrico (2) presente en la fracción soluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El comportamiento de los ácidos fenólicos presentes en la fracción soluble (Figura 23) muestra que el T1 (CIAT 899) de la variedad Cabécar presenta diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Los ácidos fenólicos se encuentran con mayor frecuencia en el cotiledón (Madrera et al., 2021; Rodríguez Madrera et al., 2023) en donde desempeñan funciones importantes como moléculas señalizadoras durante el establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y *Rhizobium* spp., (Seneviratne & Jayasinghearachchi, 2003; Shimamura et al., 2022) hasta la tolerancia a diferentes tipos de perturbaciones bióticas o abióticas, la germinación y el crecimiento de la planta (Kumar & Goel, 2019; Pillimúé et al., 2024).

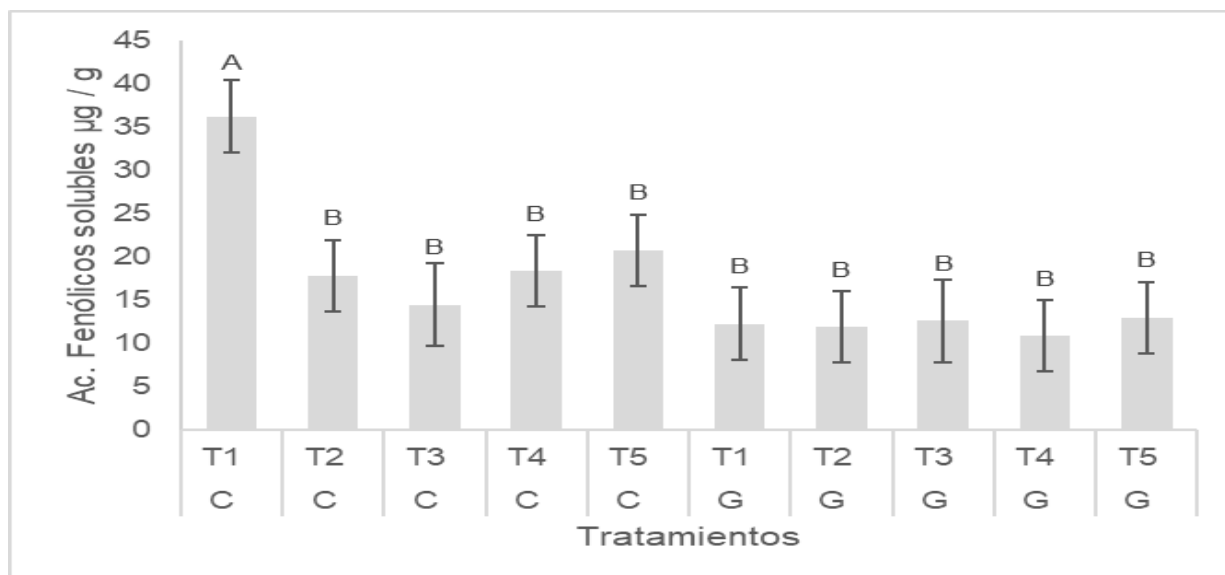


Figura 23. Ácidos fenólicos totales (Ac. Siringico, Ac. Vanillico, Ac.4-Hidroxibenzoico, Ác. Cafeíco, Ac.o – Comarico, Ac. Ferulico, Ac. Gálico, Ac. Sináptico, Ac.Protocatecuico, Ac. Transcumárico) presentes en la fracción soluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

De los seis ácidos fenólicos encontrados en la fracción soluble (Figura 24), sólo cuatro se encontraron en las dos variedades, ya que el ácido siringico y el ácido vanílico sólo estuvieron presentes en una de las variedades (Figura 22), observándose diferencias significativas en los granos del T1 (CIAT 899) de la variedad Cabécar con todos los tratamientos, con la excepción del ácido 4-hidroxibenzoico. En contraste, la variedad Guaymí no presentó diferencias entre los tratamientos. Es conocido que el perfil de ácidos fenólicos puede variar según los factores ambientales; sin embargo, estudios previos han reportado que los ácidos p-cumárico y sináptico se encuentran entre los más comunes en muestras de frijol (Luthria & Pastor-Corrales, 2006). Su alta frecuencia en el grano, y la significativa respuesta del T1 (CIAT 899) en la concentración de estos ácidos, podrían respaldar la hipótesis de una posible influencia de *Rhizobium* spp., sobre el perfil de estos ácidos en el grano de frijol.

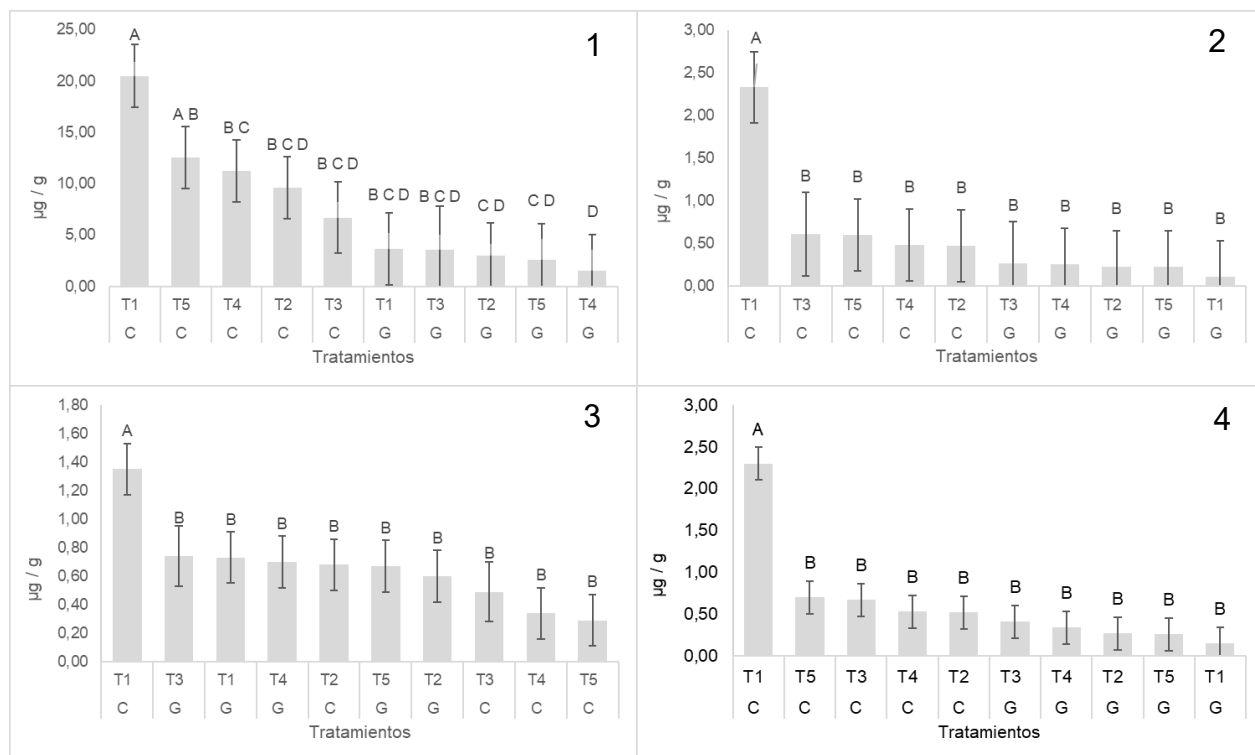


Figura 24. Concentración de ácidos fenólicos componentes del perfil de polifenoles presentes en la fracción soluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp (1= Ac 4 -hidroxibenzoico; 2= Ac. Sináptico; 3= 4= Ac. o- coumárico; Ac. p-coumárico; C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Flavonoides en la fracción soluble

En la fracción soluble, los flavonoides catequina, epicatequina y el kaempferol (Figura 25) se encontraron con diferencias significativas en los granos del frijol del T2 (CR4019BB) de la variedad Cabécar, y la isoquercetina se encontró con diferencias en el T2 (CR4019BB) de la variedad Guaymí, esto con respecto a los demás tratamientos. Esta tendencia de acumulación de flavonoides en la variedad Cabécar se debe a que estos compuestos se encuentran relacionados con el color del grano (Pitura & Arntfield, 2019; Rodríguez Madrera et al., 2020; Yang et al., 2018). Resultados similares fueron reportados por León-Cortés et al., (2025) para la variedad Cabécar.

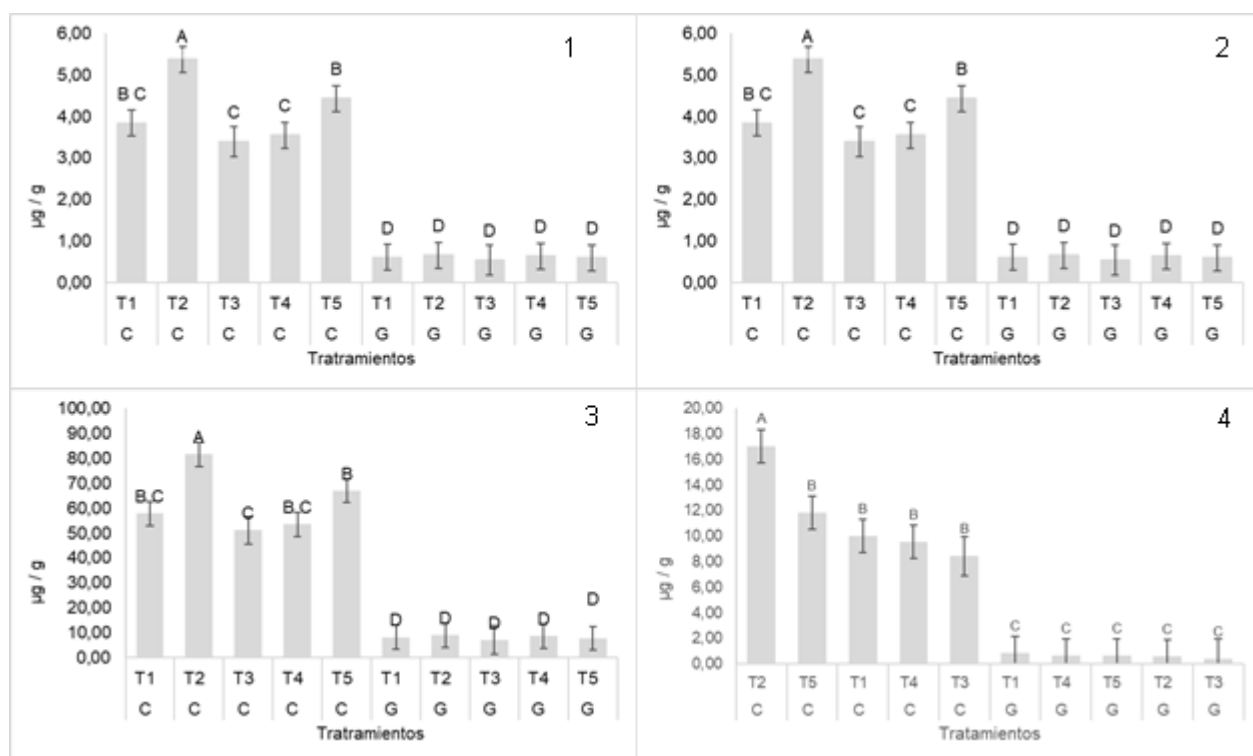


Figura 25. Concentración de flavonoides con significancia estadística componentes del perfil de polifenoles de la fracción soluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (1= Catequina; 2= Epicatequina; 3= Isoquercetina; 4= Kaempferol; C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El contenido de flavonoides totales en la fracción soluble (Figura 25) muestra que el T2 (CR4019BB) de la variedad Cabécar presenta diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, además de una clara dominancia en relación con el contenido de ácidos fenólicos (Figura 26). Esta relación es relevante debido a la asociación de los flavonoides con la actividad antioxidante (Calado et al., 2015; Chandra et al., 2014; Chaurasia & Saxena, 2014; Ombra et al., 2016; Pitura & Arntfield, 2019; Zhu et al., 2020). Sin embargo, dicha actividad también depende de las interacciones o sinergias con otros compuestos que pueden actuar como desencadenantes (W. Zheng & Wang, 2001).

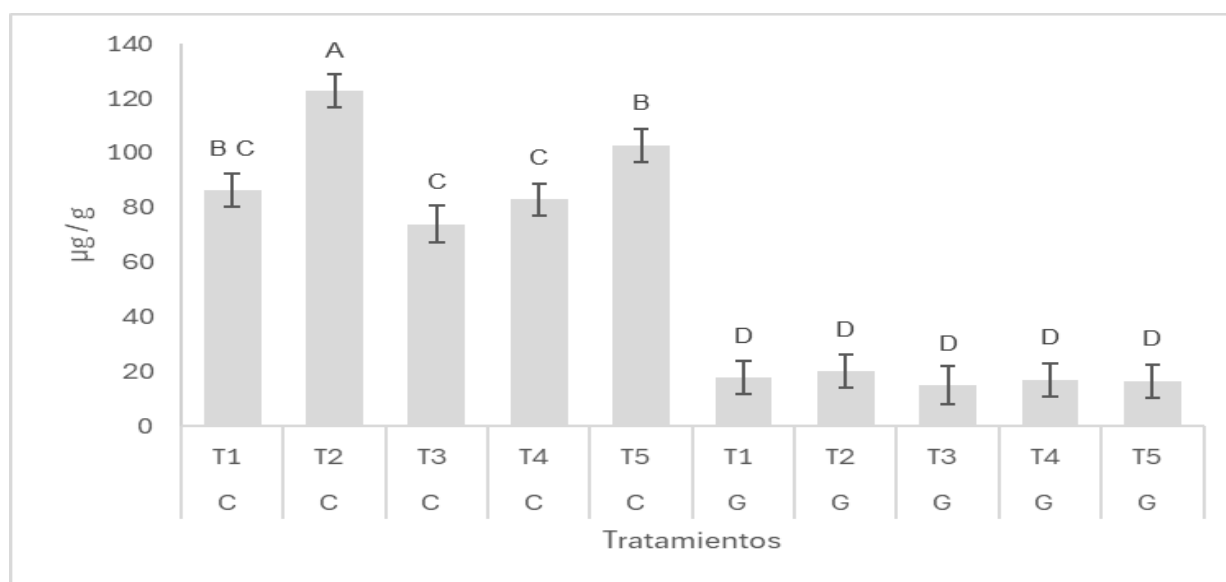


Figura 26. Flavonoides totales (Catequina, Epicatequina, Isoquercetina, Kempferol, Naringenina, Procidiamina B2 y Rutina) presentes en la fracción soluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Perfil de polifenoles de la fracción Insoluble

A diferencia de la fracción soluble, en la variedad Guaymí se detectó la presencia de ácido vanílico (Figura 27), mientras que el ácido siríntrico sigue sin aparecer en la variedad Cabécar, a pesar de que ambos se encuentran entre los ácidos fenólicos más comunes en frijol (Shahidi & Yeo, 2016b; Yang et al., 2018). Los demás ácidos no mostraron diferencias significativas.

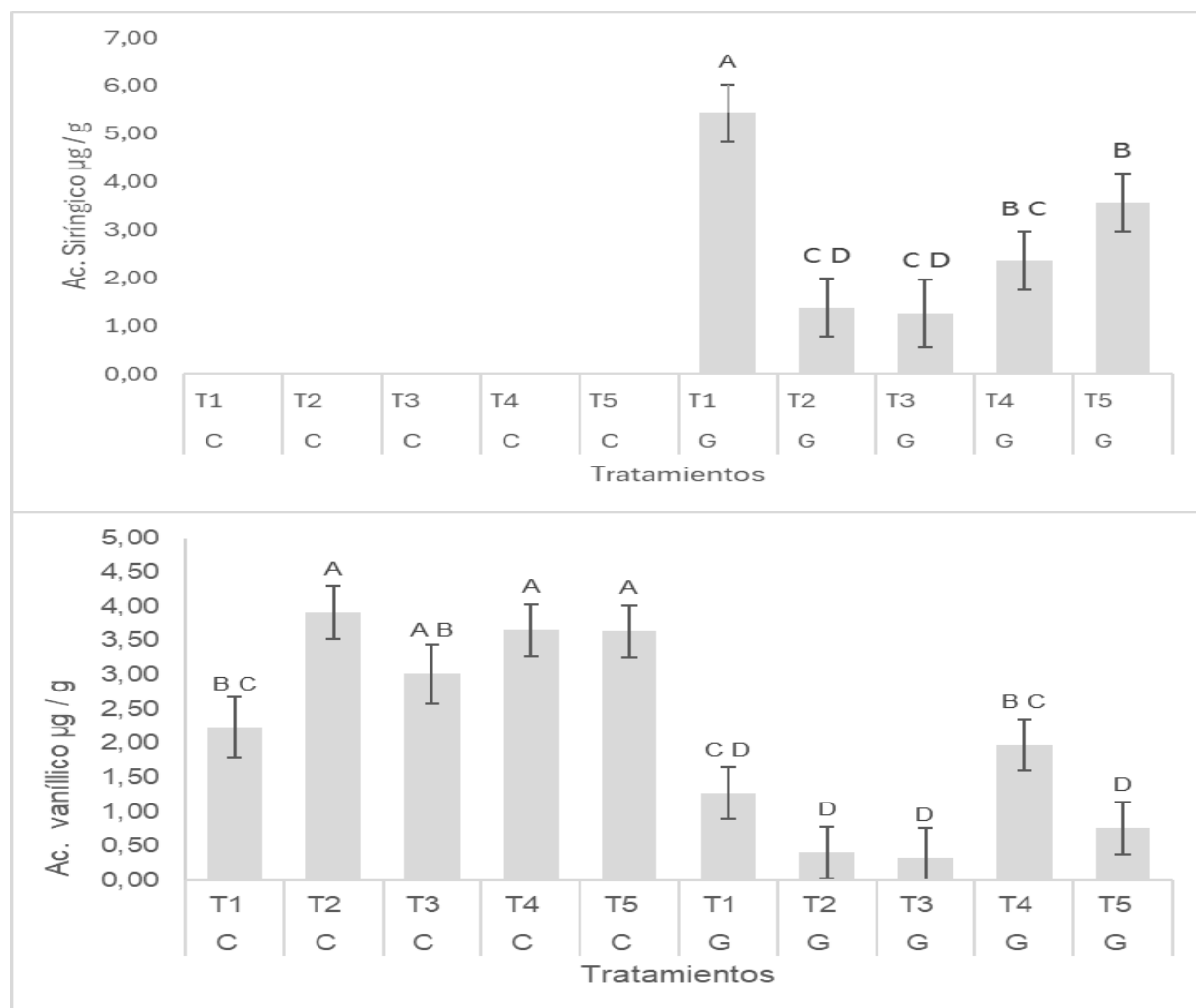


Figura 27. Concentración de Ac. Siríntrico y Ac. Vanílico en la fracción insoluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los ácidos fenólicos (Figura 28) en la fracción insoluble tienden a acumularse en mayor concentración en los tratamientos no inoculados T4 (Urea), T5 (Testigo) y en menor medida en los tratamientos T1 (CIAT 899) y T2 (CR4019BB), probablemente *Rhizobium* spp. afecta la distribución de ácidos fenólicos en el grano, favoreciendo una menor acumulación en los tratamientos inoculados como resultado de la modulación genética del sistema de defensa de las leguminosas, permitiendo la infección inicial que da paso a la simbiosis (Chakraborty & Mandal, 2008; Glyan'ko et al., 2007; Lohar et al., 2006). Cabe señalar que la mayoría de los ácidos fenólicos en frijol se encuentran en su forma insoluble (Yang et al., 2018) esto se ha relacionado con un aumento en la dureza del grano en algunos cereales (Cabrera-Soto et al., 2009) y con un aumento en la fermentación de estos compuestos en el colon (L. Zhang et al., 2023; Zhu et al., 2020).

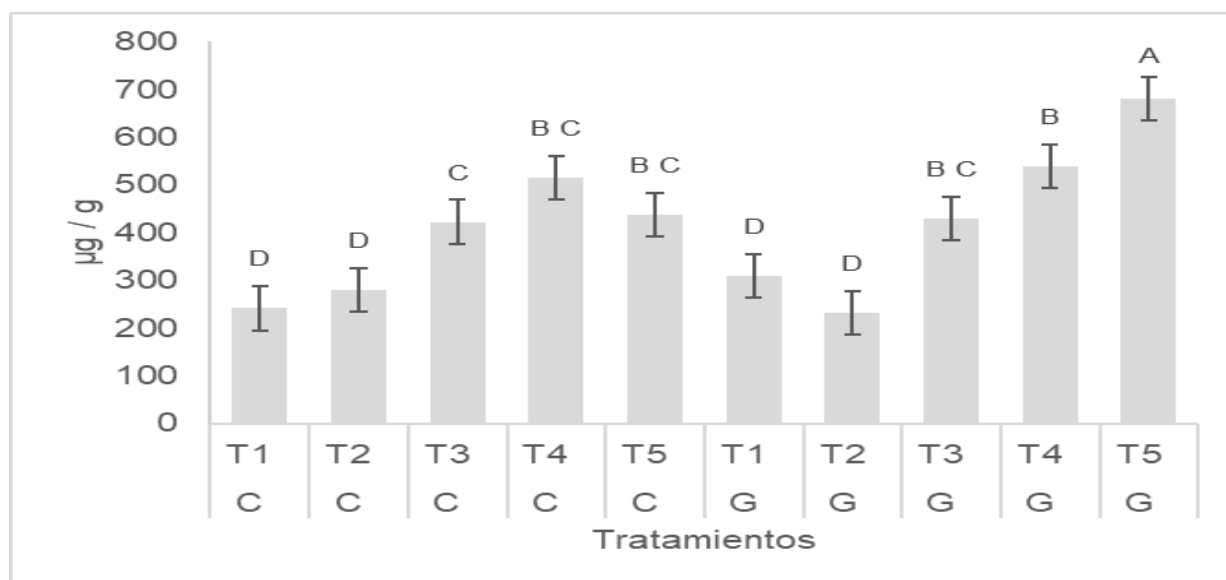


Figura 28. Ácidos fenólicos totales presentes en la fracción insoluble de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Contenido de proteína

En las dos variedades evaluadas, el mayor contenido de proteína en el grano de frijol (Figura 29) se encontró en el tratamiento T4 (Urea). En el caso de la variedad Cabécar el contenido de proteína en los granos del T4 (Urea) muestra diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, por lo que se puede inferir que la inoculación con *Rhizobium* spp no tuvo el efecto esperado, sin embargo, a pesar de que su respuesta fue menor el contenido de proteína se encuentra dentro de rango reportado por Mencía Guevara et al., (2021) para muestras de frijol en Costa Rica (16 a 27%).

En el caso de la variedad Guaymí, el contenido de proteína del grano en los tratamientos T1 (CIAT899), y T2 (CR4019B) muestran diferencias con el T5 (Testigo), y su media se encuentra sin diferencias con respecto al T4 (Urea), lo que indica que la fijación biológica de nitrógeno mediada por las bacterias aportó suficiente nitrógeno para mantener el contenido de proteína del grano en valores alrededor del 24%. Esta observación se puede atribuir al aumento de nitrógeno producto de la fijación biológica de nitrógeno (Lopetinsky et al., 2014; Sufar et al., 2024). Cabe destacar que existen diferencias entre las interacciones entre la cepa de *Rhizobium* y la variedad de frijol, lo que podría explicar la limitada respuesta observada en la variedad Cabécar.

En el marco de la bioeconomía y en la búsqueda de mitigar los efectos del cambio climático (FAO, 2023; Medina Morales et al., 2024), los resultados obtenidos podrían enmarcar el uso de *Rhizobium* dentro de la llamada proteína sostenible (Bolaños-Quirós et al., 2024; Celemín Pérez, 2024; García López, 2023) que busca forjarse como una alternativa ante la gran huella energética generada por la fabricación de fertilizantes sintéticos (Armas Vega, 2024; Navarro-Saltos et al., 2025) y el uso de biofertilizantes (Corrales-Ramírez MSc et al., 2017).

Todas estas prácticas se encuentran dentro de los objetivos de Desarrollo Sostenible y la agenda 2030 (ONU, 2025), en donde se busca el cambio de la producción agrícola hacia practicas responsables que aseguren un producto más saludable para la población, esto se alinea con los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a proteína y a los compuestos bioactivos encontrados.

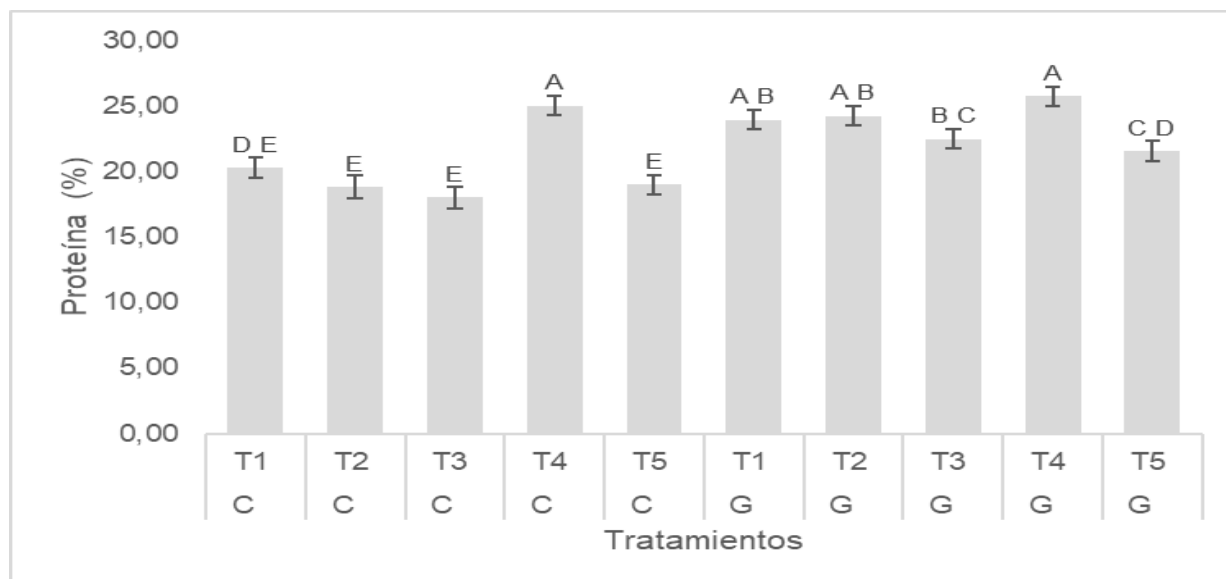


Figura 29. Contenido de proteína en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Saponinas

La concentración de saponinas en los granos de frijol mostró una gran variabilidad, sin embargo, se puede apreciar (Figura 30) que los granos del T2 de la variedad Guaymí presentaron una mayor concentración de saponinas que el tratamiento T3 de la variedad Cabécar. Por su parte, Ramos et al., (2024) encontraron que las variedades de frijol negro presentaron mayor contenido de saponinas. Al respecto, se ha relacionado el contenido de saponinas con el oscurecimiento del grano durante el almacenamiento (Bento et al., 2021), además de presentar efectos antifúngicos (Bhide et al., 2022; Narale et al., 2025; Pillimúé et al., 2024) como resultado del aumento de la permeabilidad de las membranas celulares del hongo debido a sus propiedades emulsionantes (Yulia et al., 2025).

Con respecto a sus efectos fisiológicos, se ha evidenciado que el consumo de saponinas ejerce un impacto significativo en el control glucémico, mediante la inhibición de la enzima α -glucosidasa intestinal, responsable de la hidrólisis y posterior absorción

de carbohidratos complejos (Nina et al., 2023) y con un aumento en el HDL posterior al consumo (Mahwish et al., 2023). Las saponinas presentes en la cubierta externa del grano de frijol han dado buenos resultados en la disminución de grasa acumulada en el hígado y un aumento en el colesterol excretado (Chavez-Santoscoy et al., 2014) debido al efecto de permeabilidad de las saponinas sobre las membranas lipídicas (Donoso-Quezada et al., 2020).

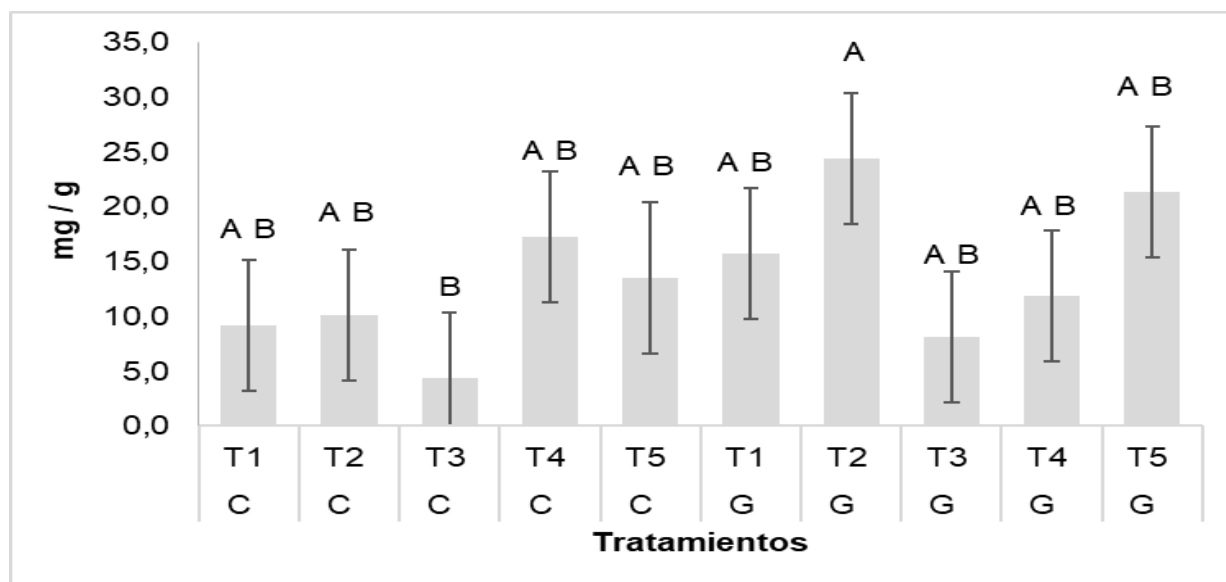


Figura 30. Concentración de saponinas en granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Imbibición

La absorción de agua del grano (Figura 31), no mostró diferencias para la variedad Cabécar, que, además, presentó granos sin absorción al momento de la evaluación. Por su parte, en la variedad Guaymí, se aprecian diferencias en los granos del T2 (CR4019BB) con respecto al T5 (Testigo), lo que parece indicar que la inoculación con *Rhizobium* spp mejoró la permeabilidad del grano y su imbibición. Esta cualidad se encuentra relacionada al tiempo de cocción, por lo que, una mejor capacidad de hidratación representa un frijol con una cocción más rápida (Sofi et al., 2022). Además, se ha reportado que la subsecuente dureza del grano como resultado de una baja imbibición provoca una caída en la cantidad de compuestos fenólicos y en la capacidad antioxidante (Claros Osorio, 2021).

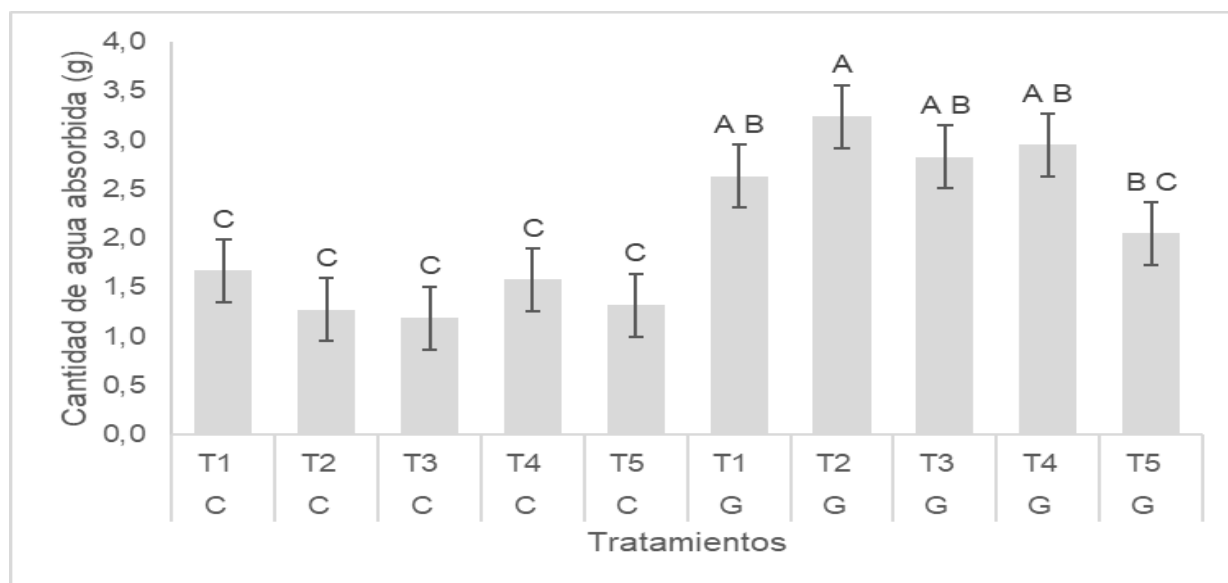


Figura 31. Imbibición del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las investigaciones en frijol han demostrado que el proceso de imbibición está regulado por genes que no siguen patrones de herencia mendeliana (Castillo Crisóstomo, 2023). Este hallazgo indica que dicha característica podría estar modulada por factores ambientales, como las condiciones edafoclimáticas del sitio de cultivo, y potencialmente influenciada por la inoculación con *Rhizobium* spp. Los resultados respecto a la variedad Cabécar coinciden con lo expuesto por Karaca (2016) que encontró una mejor hidratación del grano de frijol en plantas inoculadas con *Rhizobium* spp. Por otra parte, se ha reportado que las variedades de frijol negro presentan una mejor capacidad para absorber agua en comparación con las variedades de color rojo (Viquez Rodríguez, 1999).

Componentes como el almidón han sido reconocidos como determinantes clave en la absorción de agua por las semillas (Upretee et al., 2024). Considerando que la inoculación con *Rhizobium* spp. incrementa significativamente el contenido de almidón en los granos (Massa et al., 2020), este mecanismo podría explicar la mayor capacidad de imbibición observada en la variedad Guaymí. Sin embargo, es fundamental señalar que, si bien la imbibición es un proceso fisiológico esencial para activar la germinación, la absorción de agua no necesariamente garantiza la germinación exitosa, como lo demuestran los hallazgos de Piedra-Chacón (2022). Por lo tanto, este parámetro no debe interpretarse como un indicador absoluto de viabilidad germinativa.

Aunque la información al respecto es limitada, parece existir una relación entre la concentración de saponinas en el grano de frijol y su proceso de imbibición (Figura 32), puesto que la baja absorción de agua observada en la variedad Cabécar coincidió con el menor contenido de saponinas en el grano.

Algunos estudios sugieren que la concentración de saponinas en el grano favorece la absorción de agua durante la germinación de ciertas semillas (Helmkamp & Bonner, 1953; Moses et al., 2014), ya que sus propiedades detergentes mejoran la permeabilidad de la membrana (Navarro Del Hierro et al., 2020), sin embargo, esto dependería de la concentración de las saponinas y del tipo (Davidyants, 2024; Debnath et al., 2020).

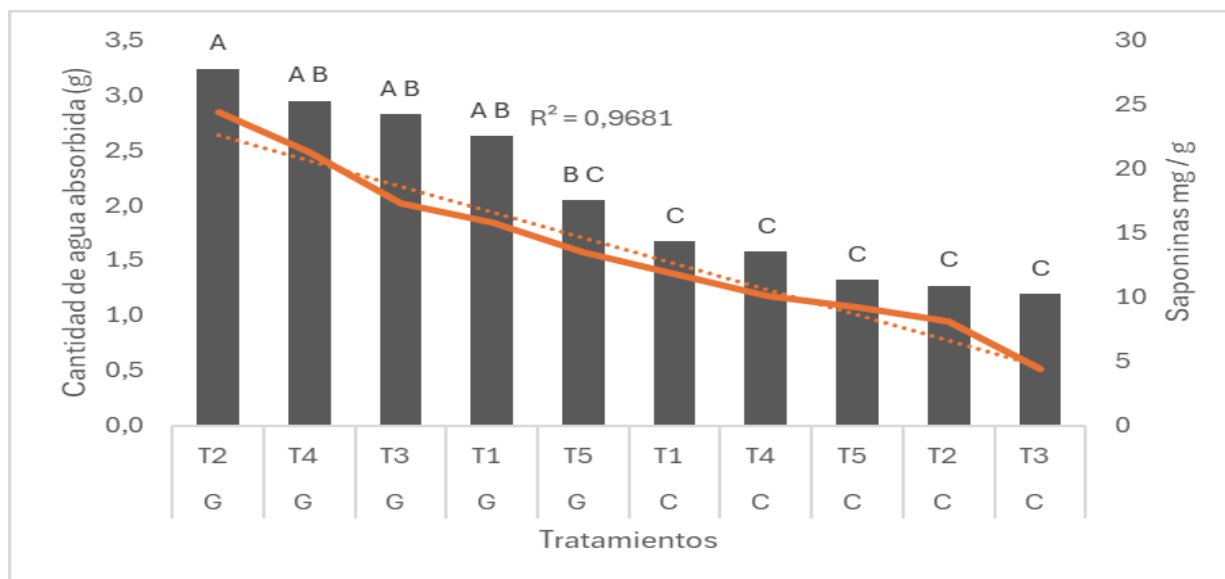


Figura 32. Comparación de la imbibición y el contenido de saponinas en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados con *Rhizobium* spp. (C= Cabécar, G= Guaymí, T1 = CIAT899, T2= CR4019BB, T3= CIAT899 + CR4019BB, T4= urea, T5= Testigo). Línea corresponde a saponinas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

CONCLUSIONES

Dentro de las cepas evaluadas, se encontró que las variables de mayor peso para la selección de las cepas fueron la tolerancia a la salinidad, la solubilización de fósforo y la producción de sideróforos, puesto que, no se encontró mucha variabilidad en cuanto a temperatura y pH.

Los resultados demuestran que la inoculación con la cepa CIAT 899 en la variedad Cabécar muestra diferencias significativas en el suministro de nitrógeno foliar comparado con la fertilización con nitrógeno sintético y el testigo. Esto evidencia que la fijación biológica de nitrógeno mediada por la cepa CIAT899, en esta variedad, es suficiente para suplir las necesidades de N de la planta.

Los polifenoles de la fracción insoluble de los granos mostraron una reducción significativa en su acumulación en el grano, particularmente en los tratamientos inoculados, T1 (CIAT 899) en ambas variedades (Guaymí y Cabécar) y en el T2 (CR 4019b) de Guaymí. Estos hallazgos indican que *Rhizobium* spp. podría alterar selectivamente la biosíntesis o deposición de polifenoles insolubles durante el desarrollo del grano, en beneficio de la capacidad antioxidante. En cuanto al efecto de la inoculación sobre la calidad de grano, la variedad cabécar mostró la mayor respuesta.

El efecto de la inoculación sobre la calidad del grano fue diferente en cada variedad. En cuanto al perfil de polifenoles, la variedad Cabécar mostró una mejor respuesta, mientras que la variedad Guaymí, destacó en imbibición y contenido de proteína.

Se detectó una tendencia positiva entre el contenido de saponinas y la capacidad de absorción de agua en el grano. La variedad Guaymí (T2 CR 4019b) registró los niveles más altos de saponinas, coincidiendo con una mayor imbibición, mientras que Cabécar —con menor absorción hídrica— presentó concentraciones reducidas de estos metabolitos. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, los resultados sugieren un posible rol de las saponinas en la regulación de la hidratación inicial de la semilla.

La inoculación con *Rhizobium* spp influye sobre la calidad nutricional del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), de manera que, el contenido de proteína resulta similar o mejor que con la aplicación de fertilizante sintético, además, mejora el perfil de compuestos fenólicos.

RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se recomienda realizar un ensayo más detallado del efecto de *Rhizobium* spp sobre la permeabilidad de la membrana y un análisis químico completo al grano, para evaluar el efecto sobre los microelementos y su posible rol como biofortificador del grano.

REFERENCIAS

- Abdelkhalek, A., El-Gendi, H., Al-Askar, A. A., Maresca, V., Moawad, H., Elsharkawy, M. M., Younes, H. A., & Behiry, S. I. (2022). Enhancing systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to Bean yellow mosaic virus via soil application and foliar spray of nitrogen-fixing *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain 33504-Alex1. *Frontiers in Plant Science*, 13(933498). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.933498>
- Abdelmajid, K., Karim, B. H., & Chedly, A. (2008). Symbiotic response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to iron deficiency. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0087-5>
- Achicanoy, V., Reyes, B., & Wiegel, J. (2024). *Perspectivas sobre el frijol común en Costa Rica: tendencias en la producción, distribución y consumo*. <https://cgspace.cgiar.org/server/api/core/bitstreams/919b26c3-8cdd-4d58-9fca-fbceba29c7ec/content>
- Acuña, O., & Castro, L. (1996). Efecto de la variedad de frijol y la cepa de *Rhizobium* sobre la respuesta a la inoculación en tres localidades de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 20(2), 151–157. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v20n02_151.pdf
- Acuña, O., & Uribe, L. (1996). Inoculation of the common bean with three selected *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* strains. *Agronomía Mesoamericana*, 7(1). <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24786/24999>
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.*, 35(1), 9–21.
- Aguilar, J. G., Palestina, C. U. L., Escalante, E. P., Espinoza, J. M. P., Sáenz, Y. O. S., & Fuentes, A. D. H. (2024). Comparación del análisis bromatológico proximal de las variedades de frijol “Huitel 143” y “Primavera 28.” *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 31, 66–71.

<https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4661>

- Aguilar, O. M., Collavino, M. M., & Mancini, U. (2022). Nodulation competitiveness and diversification of symbiosis genes in common beans from the American centers of domestication. *Scientific Reports*, *12*, 4591. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08720-0>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, *26*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, *7*(3), 196. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, *13*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, *12*(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Alinia, M., Kazemeini, S. A., Sepehri, M., & Dadkhodaie, A. (2022). Simultaneous Application of Rhizobium Strain and Melatonin Improves the Photosynthetic Capacity and Induces Antioxidant Defense System in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Under Salinity Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(3), 1367–1381. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10386-3>
- Alinia, M., Seyed, ·, Kazemeini, A., Sepehri, M., & Dadkhodaie, · Ali. (2022). Simultaneous Application of *Rhizobium* Strain and Melatonin Improves the Photosynthetic Capacity and Induces Antioxidant Defense System in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Under Salinity Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*, 1367–1381. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10386-3>

- Amalfitano, C., Gomez, L. D., Frendo, P., De Pascale, S., Pepe, O., Simister, R., Ventrino, V., Agrelli, D., Borrelli, C., McQueen-Mason, S. J., & Caruso, G. (2018). Plant–Rhizobium symbiosis, seed nutraceuticals, and waste quality for energy production of *Vicia faba* L. as affected by crop management. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0126-z>
- Amine-Khodja, I. R., Boscari, A., Riah, N., Kechid, M., Maougal, R. T., Belbekri, N., & Djekoun, A. (2022). Impact of Two Strains of *Rhizobium leguminosarum* on the Adaptation to Terminal Water Deficit of Two Cultivars *Vicia faba*. *Plants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11040515>
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., & Chabot, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Lalande Source: Plant and Soil*, 204(1), 57–67.
- Appleby, C. A. (1992). The origin and functions of haemoglobin in plants. *Science Progress*, 76, 365–398. <https://www.jstor.org/stable/43421309?seq=1>
- Aqib, A. I., Atta, K., Muneer, A., Arslan, M., Shafeeq, M., & Rahim, K. (2023). Saponin and its derivatives (glycyrrhizin) and SARS-CoV-2. In K. Niaz (Ed.), *Application of Natural Products in SARS-CoV-2* (pp. 25–46). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95047-3.00018-6>
- Araya Villalobos, R., & Hernández Fonseca, J. C. (2007). *Variedades de frijol de grano rojo, obtenidas por Fitomejoramiento Participativo en Costa Rica 2000 - 2007*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9381.pdf>
- Armas Vega, F. V. (2024). Beneficios de la agricultura regenerativa en la salud del suelo. *RECIAMUC*, 8(2), 665–677. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/8.\(2\).abril.2024.665-677](https://doi.org/10.26820/reciamuc/8.(2).abril.2024.665-677)
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Assefa, F., Hailemariam, A., & Lindström, K. (2012). Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.005>

- Aslam, A., Yahya Khan, M., USMAN Jamshaid, M., & Ahmad, M. (2013). Co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi arid climate. *Agri. Biol*, 1(1), 7–12. <https://www.researchgate.net/publication/236231203>
- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., & Sandberg, G. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175(4), 532–538. <https://www.jstor.org/stable/23379317?seq=1&cid=pdf->
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. In *McGraw Hill* (2nd ed.). UNIVERSITAT DE BARCELONA. https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/46663/mod_resource/content/1/Fundamentos%20de%20Fisiologia%20Vegetal-Azc%C3%B3nBieto%20ed%20%281%29.pdf
- Baba, Z., Asif, M., Sheikh, T., Sheikh, F., Bhat, Z., Khan, S., Saher, T., & Hamid, B. (2015). Plant Growth Promoting Potential of *Rhizobium* Isolates and Soil Health. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(5), 423. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015.04.043>
- Baird, L. M., & Webster, B. D. (1982). Morphogenesis of Effective and Ineffective Root Nodules in *Phaseolus vulgaris* L. *Botanical Gazette*, 143(1), 41–51. <https://www.jstor.org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/stable/2474377>
- Banjare, U., Patel, A. K., Pandey, A. K., Kumar, S., Singh, R. K., Masurkar, P., Singh, R. K., & Gupta, S. K. (2023). Biochemical and Molecular Evaluation of *Rhizobium* spp. and its Growth Promotion Studies with Lentil (*Lens culinaris* Medik. L.). *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 17(1), 155–166. <https://doi.org/10.22207/JPAM.17.1.04>
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., & Finan, T. M. (1996). A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4540–4547. <https://doi.org/10.1128/JB.178.15.4540-4547.1996>
- Bareke, T. (2018). Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants & Agriculture Research*, Volume 8(Issue 4), 336–346. <https://doi.org/10.15406/APAR.2018.08.00335>

- Barrientos, L. (1989). *Antecedentes de la fijación biológica de nitrógeno*. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/41551/NR07140.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 1–2. <https://doi.org/10.1007/S00374-012-0756-4/METRICS>
- Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1400–1410. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.024>
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169–178. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2017.01.003>
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 101–113.
- Bento, J. A. C., Ribeiro, P. R. V., Bassinello, P. Z., Brito, E. S. de, Zocollo, G. J., Caliar, M., & Soares Júnior, M. S. (2021). Phenolic and saponin profile in grains of carioca beans during storage. *LWT*, 139, 110599. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110599>
- Bērtiņš, M., Klūga, A., Dubova, L., Petrēvics, P., Alsiņa, I., & Vīksna, A. (2021). Study of Rhizobia Impact on Nutritional Element Concentration in Legumes. *Proceedings of*

- the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 75(6), 457–462. <https://doi.org/10.2478/prolas-2021-0068>
- Bertrand, A., Gatzke, C., Bipfubusa, M., Lévesque, V., Chalifour, F. P., Claessens, A., Rocher, S., Tremblay, G. F., & Beauchamp, C. J. (2020). Physiological and Biochemical Responses to Salt Stress of Alfalfa Populations Selected for Salinity Tolerance and Grown in Symbiosis with Salt-Tolerant *Rhizobium*. *Agronomy*, 10(4), 569. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10040569>
- Bhide, Y. S., Nehete, J. Y., & Bhambar, R. S. (2022). Botanical, chemical and pharmacological review of *phaseolus vulgaris* L. (common bean). *International Journal of Health Sciences*, 11527–11543. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns5.11137>
- Bidwell, G. S. G. (1979). *Fisiología vegetal* (1st ed.). A.G.T Editor. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/fisiologiavegetalbidwell.pdf>
- Blanco Carrero, E. L., & Castro Molina, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6–16. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>
- Bolaños Silvestre, E. (2014). Evaluación de las características físico químicas en frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad; pinto saltillo de dos periodos 2009 y 2010. [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA]. <https://repositorio.uaaan.mx/xmlui/handle/123456789/476>
- Bolaños-Quirós, F., Fallas-Rodríguez, P., Murillo-González, L., Pérez, A. M., & Quirós, A. M. (2024). Development of a green drink with spirulina (*Arthrospira* sp.) using the experimental mixture design. *Agronomia Mesoamericana*, 35. <https://doi.org/10.15517/am.2024.60115>
- Brear, E., Day, D., & Smith, P. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00359>

- Butaité, E., Baumgartner, M., Wyder, S., & Kümmerli, R. (2017). Siderophore cheating and cheating resistance shape competition for iron in soil and freshwater *Pseudomonas* communities. *Nature Communications*, 8(1), 414. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00509-4>
- Cabrera-Soto, M. L., Salinas-Moreno, Y., Velázquez-Cardelas, G. A., & Trujillo, E. E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia*, 43, 827–839.
- Cáceres-Acosta, E. A., Aguirre-Flores, A. A., Castro-Brindis, R., Almaraz-Suárez, J. J., Colinas-León, M. T., Juárez-Hernández, Ma. de J., & Montes-Colmenares, R. O. (2024). EFECTO DE BIOFERTILIZANTES EN EL RECuento DE RIZOBIOS E INDICADORES MORFOLÓGICOS DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.) EN ECUADOR. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 40(1), 66–80. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS40-7EBER70007>
- Calado, J. C. P., Albertão, P. A., Oliveira, E. A. de, Letra, M. H. S., Sawaya, A. C. H. F., Marcucci, M. C., Calado, J. C. P., Albertão, P. A., Oliveira, E. A. de, Letra, M. H. S., Sawaya, A. C. H. F., & Marcucci, M. C. (2015). Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Fruit, Vegetables and Other Types of Food. *Agricultural Sciences*, 6(4), 426–435. <https://doi.org/10.4236/AS.2015.64042>
- Calvo García, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos Del Tomás*, 3, 173–186.
- Campos Segura, R. (1995). Selección in vitro de *Rhizobium* tolerante a acidez y aluminio. *Agronomía Colombiana*, 12(2), 142–148. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/34168>
- Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zúñiga-Dávil, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*, 37(4), 73–81. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000400073>

- Caravaca Rodríguez, I., & Madrigal Meneses, M. (2018). Patrones de consumo aparente de alimentos según disponibilidad de acuerdo con la encuesta nacional de ingresos y gastos 2018.
- Carson, K. C., Holliday, S., Glenn, A. R., & Dilworth, M. J. (1992). Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. *Arch Microbiol*, 157, 264–271.
- Castillo Crisóstomo, D. S. (2023). Regulación genética durante la imbibición y su relación con la capacidad germinativa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones con baja disponibilidad de agua [Universidad de Costa Rica]. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/server/api/core/bitstreams/35aa8d87-b239-4845-a1ec-2db88eaf442a/content>
- Castillo R, C. G., Rubio H, R., Urzúa S, H., & Borie B, F. (2008). Interacción *Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii* y hongos micorrícicos en un andisol con diferentes niveles de saturación de aluminio. *Idesia (Arica)*, 26(3), 7–19. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292008000300002>
- Castro, L., Uribe, L., & Alvarado, A. (1993). Efecto del enriquecimiento del inoculante de *Rhizobium* con dosis crecientes de p sobre el crecimiento. *Agronomía Costarricense*, 17(1), 55–59. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v17n01_055.pdf
- Celemín Pérez, M. (2024). EL ESTIGMA DE LOS ALIMENTOS DE PROTEÍNA VEGETAL [Universidad Pontificia Comillas]. In <https://repositorio.comillas.edu/xmlui/bitstream/handle/11531/78742/TFG%20ADE-Maria%20Celemin.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. <https://repositorio.comillas.edu/xmlui/bitstream/handle/11531/78742/TFG%20ADE-Maria%20Celemin.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Chakraborty, D., & Mandal, S. M. (2008). Fractional changes in phenolic acids composition in root nodules of *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regulation*, 55(3), 159–163. <https://doi.org/10.1007/S10725-008-9275-6/FIGURES/2>
- Chakraborty, D., Santi, A. E., & Mandal, M. (2008). Fractional changes in phenolic acids composition in root nodules of *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regu*, 55(3), 159–163. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9275-6>

- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., Elsohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(1), 253875. <https://doi.org/10.1155/2014/253875>
- Charitha Devi, M., & Reddy, M. N. (2002). Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. *Plant Growth Regulation* 2002 37:2, 37(2), 151–156. <https://doi.org/10.1023/A:1020569525965>
- Chaurasia, S., & Saxena, R. (2014). Evaluation of Total Phenol and Flavonoid Content, Antioxidant and Iron Chelation Activities of Ethanolic Extracts of Green Beans. *American Journal of PharmTech Research*, 4(3). <http://www.ajptr.com/>
- Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Uribe, J. A., Granados, O., Torre-Villalvazo, I., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., Palacios-González, B., & Tovar, A. R. (2014). Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *British Journal of Nutrition*, 112, 886–899. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001536>
- Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2013). Effect of Flavonoids and Saponins Extracted from Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Coats as Cholesterol Micelle Disruptors. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 416–423. <https://doi.org/10.1007/S11130-013-0384-7/FIGURES/3>
- Chávez-Santoscoy, R. A., Lazo-Vélez, M. A., Serna-Saldivar, S. O., & Gutiérrez-Uribe, J. A. (2016). Delivery of Flavonoids and Saponins from Black Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seed Coats Incorporated into Whole Wheat Bread. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS17020222>
- Chen, L., Tai, W. C. S., & Hsiao, W. L. W. (2015). Dietary saponins from four popular herbal tea exert prebiotic-like effects on gut microbiota in C57BL/6 mice. *Journal of Functional Foods*, 17, 892–902. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.050>
- Chipana, V., Clavijo, C., Medina, P., & Castillo, D. (2017). Inoculación de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) con diferentes concentraciones de *Rhizobium etli* y su

- influencia sobre el rendimiento del cultivo. *Ecología Aplicada*, 16(2), 91. <https://doi.org/10.21704/rea.v16i2.1012>
- CIAT. (1988). *Simbiosis Leguminosa-Rizobio Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico*. https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABE088.pdf
- Cid-Gallegos, M. S., Gómez y Gómez, Y. de las M., Corzo-Ríos, L. J. C.-R., Sanchez-Chino, X. M., Moguel-Concha, D., Borges-Martínez, E., & Jiménez-Martínez, C. (2023). Potencial nutricional y bioactivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en la salud humana. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 309–318. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.42>
- Claros Osorio, P. del P. (2021). *Evaluación de la capacidad antioxidante total y contenido de polifenoles totales del Phaseolus vulgaris "frijol"* [UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN]. <https://repositorio.unjpsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/5297/PATRICIA%20DEL%20PILAR%20CLAROS%20OSORIO.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Cominelli, E., Galimberti, M., Pongrac, P., Landoni, M., Losa, A., Paolo, D., Daminati, M. G., Bollini, R., Cichy, K. A., Vogel-Mikuš, K., & Sparvoli, F. (2020). Calcium redistribution contributes to the hard-to-cook phenotype and increases PHA-L lectin thermal stability in common bean low phytic acid 1 mutant seeds. *Food Chemistry*, 321, 126680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126680>
- Cominelli, E., Sparvoli, F., Lisciani, S., Forti, C., Camilli, E., Ferrari, M., Le Donne, C., Marconi, S., Juan Vorster, B., Botha, A.-M., Marais, D., Losa, A., Sala, T., Reboul, E., Alvarado-Ramos, K., Waswa, B., Ekesa, B., Aragão, F., & Kunert, K. (2022). Antinutritional factors, nutritional improvement, and future food use of common beans: A perspective. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.992169>
- Common Bean Observatory. (2023). *Consumo*. <https://commonbeanobservatory.org/es/data/consumption>

- Constanza, L., Ramírez, C., Yurieth, Z., Galvez², A., Estefanía, V., & Burbano², M. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova: Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 12(21).
- Contreras-Moreno, F. J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., Cuéllar, V., Soto, M. J., Pérez, J., & Muñoz-Dorado, J. (2024). Siderophores and competition for iron govern myxobacterial predation dynamics. *The ISME Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae077>
- Corrales-Ramírez MSc, L. C., Caycedo-Lozano, L., Gómez-Méndez, M. A., Ramos-Rojas, S. J., Rodríguez-Torres, J. N., Corrales-Ramírez MSc, L. C., Caycedo-Lozano, L., Gómez-Méndez, M. A., Ramos-Rojas, S. J., & Rodríguez-Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702017000100046&script=sci_arttext
- Corte, A. D., Moda-Cirino, V., Scholz, M. B. S., & Destro, D. (2003). Environment effect on grain quality in early common bean cultivars and lines. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, 3(3), 193–202. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v03n03a03>
- Corwin, D. L. (2021). Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. In *European Journal of Soil Science* (Vol. 72, pp. 842–862). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ejss.13010>
- Cutting, J. A., & Schulman, H. M. (1971). The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the *rhizobium*-legume symbiosis for leghemoglobin specificity. *BBA - Protein Structure*, 229, 58–62. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(71\)90317-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(71)90317-5)
- Dangar, T. K., & Basu, P. S. (1992). Phenol metabolism in relation to iaa content, nodulation and nitrogen fixation in root nodules of leguminous trees. *Indian Plant Physiology*, 35(2), 114–124. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11616.17922>
- Datta, C., & Basu, P. S. (2000). Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiol. Res*, 155, 123–127. <http://www.urbanfischer.de/journals/microbiolres>

- Davidyants, E. S. (2024). Triterpene Glycosides as Plant Growth Regulators: Application Potential and Prospects (A Review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 50(7), 2730–2752. <https://doi.org/10.1134/S1068162024070100>
- Davis, D. R. (2009). Declining Fruit and Vegetable Nutrient Composition: What Is the Evidence? *HortScience*, 44(1), 15–19. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.1.15>
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (1st ed., pp. 253–271). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- De Lima, P. F., Colombo, C. A., Chiorato, A. F., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., & Carbonell, S. A. M. (2014). Occurrence of isoflavonoids in brazilian common bean germplasm (*phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9699–9704. <https://doi.org/10.1021/JF5033312>
- de Oliveira Mendes, G., Moreira de Freitas, A. L., Liparini Pereira, O., Ribeiro da Silva, I., Bojkov Vassilev, N., & Dutra Costa, M. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64(1), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>
- Debnath, B., Sarkar, S., & Das, R. (2020). Effects of saponin capped triangular silver nanocrystals on the germination of *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Vigna radiata* seeds & their subsequent growth study. *IET Nanobiotechnology*, 14, 25–32. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0161>
- Dhir, K. K., Rao, L., Singh, K. J., & Chark, K. S. (1992). Effect of phenolic compounds on symbiotic nitrogen fixation in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *BIOLOGIA PLANTARUM*, 34(6), 409–413.
- Dhole, A. M., Shelat, H. N., Patel, H. K., & Jhala, Y. K. (2023). Evaluation of the Co-inoculation Effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Non-rhizobial Endophytes on *Vigna radiata*. *Current Microbiology*, 80(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S00284-023-03266-4/FIGURES/4>

- Dhul, M., Suneja, S., & Dadarwal, K. R. (1998). Role of siderophores in chickpea (*Cicer arietinum* L.)-*Rhizobium* symbiosis. *Microbiol. Res.*, *153*, 47–53.
- Di Stefano, E., Tsopmo, A., Oliviero, T., Fogliano, V., & Udenigwe, C. C. (2019). Bioprocessing of common pulses changed seed microstructures, and improved dipeptidyl peptidase-IV and α -glucosidase inhibitory activities. *Scientific Reports*, *9*(1), 15308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51547-5>
- Dinelli, G., Bonetti, A., Minelli, M., Marotti, I., Catizone, P., & Mazzanti, A. (2006). Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry*, *99*(1), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.028>
- Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2009). Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chemistry*, *113*(2), 411–419. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.07.053>
- Donoso-Quezada, J., Guajardo-Flores, D., & González-Valdez, J. (2020). Enhanced exosome-mediated delivery of black bean phytochemicals (*Phaseolus vulgaris* L.) for cancer treatment applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *131*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110771>
- Dueña Vega, G., Muñiz Ugarte, O., Gómez Jorrín, L., & Fraser Gálvez, T. (2024). Reciclaje de nitrógeno en una sucesión frijol-maíz/canavalia-frijol en suelo ferralítico rojo. *Eco Solar*, *84*, 8–10. <http://ecosolar.cubaenergia.cu/index.php/ecosolar/article/view/141>
- Dumani, M. (2021). *Los frijoles ticos: más que un alimento nutritivo*. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2021/10/25/los-frijoles-ticos-mas-que-un-alimento-nutritivo.html>
- Edwards, E. J., McCaffery, S., & Evans, J. R. (2006). Phosphorus Availability and Elevated CO₂ Affect Biological Nitrogen Fixation and Nutrient Fluxes in a Clover-Dominated Sward. *The New Phytologist*, *169*(1), 157–167. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01568.x>

- Elizalde, A. de D., Pismag Portilla, Y., & Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 45–54. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612009000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4436–4444. https://doi.org/10.1021/JF060185E/SUPPL_FILE/JF060185ESI20060424_050003.PDF
- Estrada Garro, F. (2013). “Frijol-región brunca” marco del proyecto regional PRESICA. <http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/09/00549-.pdf>
- Eswar, D., Karuppusamy, R., & Chellamuthu, S. (2021). Drivers of soil salinity and their correlation with climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 50, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2020.10.015>
- Eugenia Marquina, M., Enrique González, N., & Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(3), 1017–1036.
- FAO. (2023). *La bioeconomía es un catalizador para la transformación de los sistemas agroalimentarios hacia una mayor sostenibilidad*. <https://www.fao.org/newsroom/detail/FAO-Bioeconomy-Agrifood-Systems-Science-Innovation-Forum-2023/Es>. <https://www.fao.org/newsroom/detail/FAO-bioeconomy-agrifood-systems-science-innovation-forum-2023/es>
- FAOSTAD. (2025). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/TM>
- Fernandes, G. D. C., Hauf, K., Sant’ Anna, F. H., Forchhammer, K., & Passaglia, L. M. P. (2017). Glutamine synthetase stabilizes the binding of GlnR to nitrogen fixation gene operators. *The FEBS Journal*, 284(6), 903–918. <https://doi.org/10.1111/febs.14021>

- Fernández Canigia, M. V. (2020). *Factores determinantes de la nodulación* (1st ed.). https://images.engormix.com/externalFiles/6_factores_determinantes_de_la_nodulacion.pdf
- Fernández Valenciano, A. F., & Sánchez Chávez, E. (2017). Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova Scientia*, 9(18), 133–148. <https://openurl.ebsco.com/contentitem/fap:123744135?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:fap:123744135&crl=c>
- Fernandez-Aunián, C., Hamouda, T. Ben, Iglesias-Guerra, F., Argandña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J. J., Aouani, M. E., & Vargas, C. (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-192/FIGURES/9>
- Fernandez-Flouret, D., & Cleyet-Marel, J.-C. (1988). Competition Between *Bradyrhizobium* [aponicura Strains for Nodulation: Characterization of Nodulation Patterns Using Plastic Growth Pouches. *Symbiosis*, 6, 281–294.
- Fernández-Luqueño, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Salomón-Hernández, G., Yáñez-Meneses, J., Ceballos-Ramírez, J. M., & Dendooven, L. (2010). Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioresource Technology*, 101(1), 396–403. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.07.058>
- Ferreira, P. A. A., Bomfeti, C. A., Soares, B. L., & de Souza Moreira, F. M. (2012). Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 1947–1959. <https://doi.org/10.1007/S11274-011-0997-7/TABLES/3>
- Figueroa, J. M. (2011). Efectividad de cepas rizobianas de frijol bajo diferentes regímenes de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 162–169. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27995>

- Flores, Randalth. C. M., Bárcenas, Miguel. J., Miranda, María. D. S., Morales, A. T. L., & Jiménez, M. A. (2023). Evaluation of the potential of mycorrhizal fungi and *RHIZOBIUM* bacteria in the phenological development and yield of the bean (*PHASEOLUS VULGARIS*) crop. *Nexo Revista Científica*, 36(06), 808–819. <https://doi.org/10.5377/NEXO.V36I06.17436>
- Franzini, V. I., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2019). Rhizobial symbiosis modifies root hydraulic properties in bean plants under non-stressed and salinity-stressed conditions. *Planta*, 249(4), 1207–1215. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-03076-0>
- Ga, L., Ranilla, L., Ine Ä, M., Genovese, S., Franco, A., & Lajolo, M. (2007). Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 90–98. <https://doi.org/10.1021/JF062785J>
- Gadagi, R. S., & Sa, T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(4), 615–618. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409246>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>
- Gao, Y., Ma, S., Wang, M., & Feng, X.-Y. (2017). Characterization of Free, Conjugated, and Bound Phenolic Acids in Seven Commonly Consumed Vegetables. *Molecules*, 22(11), 1878. <https://doi.org/10.3390/molecules22111878>
- Garabato, B. F. (2018). *Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas* [Universidad de la República de Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21379/1/uy24-19135.pdf>
- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., & Zapata, F. (2003). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, 14(2), 207–214.

- García Aguilar, M. Á. (2017). *Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de múltiples fuentes de fosfato inorgánico* [CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL]. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1609/SSIT0014743.pdf?sequence=1>
- García Fernández, Horacio. (2018). *La cacería del genoma humano* (2nd ed.). Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- García López, D. A. (2023). ELABORACIÓN DE PROTEINA A BASE DE HARINA DE GRILLO – GRYPROTEIN [ESCUELA DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA PRIVA]. In <https://repositorio.zegel.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13065/495/GRYPROTEIN%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. <https://repositorio.zegel.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13065/495/GRYPROTEIN%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Garza-Aguilar, S. M., Ramos-Parra, P. A., Urrea-López, R., Berdeja-Zamudio, W. J., Lozano-Guajardo, J., Benavides-Lozano, J., Ramírez-Yáñez, M., & Díaz de la Garza, R. I. (2024). Folate Biosynthesis is Boosted in Legume Nodules. *Plant, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.15294>
- Giraud Billoud, M. A., & Lascano, L. M. (2020). *Fertilizantes Orgánicos: un fortalecimiento de la Agroecología*. https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:vahIUxmu1J4J:scholar.google.com/++sulfato+de+amonio+y+nitrato+de+amonio+y+la+absorci%C3%B3n+de+P&hl=es&as_sdt=0,5&as_ylo=2020&as_vis=1
- Glyan'ko, A. K., Akimova, G. P., Sokolova, M. G., Makarova, L. E., & Vasil'eva, G. G. (2007). The defense and regulatory mechanisms during development of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(3), 260–267. <https://doi.org/10.1134/S0003683807030052/METRICS>
- Greene, C. (2016). *Saponins* (1st ed.). Hauppauge: Nova Science Publishers, Incorporated.

- Gu, S., Wei, Z., Shao, Z., Friman, V.-P., Cao, K., Yang, T., Kramer, J., Wang, X., Li, M., Mei, X., Xu, Y., Shen, Q., Kümmerli, R., & Jousset, A. (2020). Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology*, 5(8), 1002–1010. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0719-8>
- Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry*, 134(3), 1312–1319. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.03.020>
- Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2013). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 141(2), 1497–1503. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.04.010>
- Guerrero-Castro, J., Lozano, L., & Sohlenkamp, C. (2018). Dissecting the acid stress response of *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 846. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00846/BIBTEX>
- Halder, A. K., & Chakrabartry, P. K. (1993). Solubilization of Inorganic Phosphate by. *Folia Microbiol*, 38(4), 325–330.
- Helmkamp, G., & Bonner, J. (1953). Some Relationships of Sterols to Plant Growth. *Physiology*, 28(3), 428–436.
- Hernández Fonseca, J. C. (2009). *Manual de recomendaciones técnicas del cultivo del frijol*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández Forte, I., Nápoles García, M. C., Rosales Genqui, P. R., Ramírez Pedroso, J. F., & Ponte Betancourt, S. (2017). Tolerancia a la acidez de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 38(3), 55–57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000300001
- Hernández Salido, L., & Salido García, Y. (2019). Influencia de la aplicación de Azofert inoculante a base *Rhizobium* en el cultivo del fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. Delicias 364 en finca Juan Sáez. Manatí. *Revista Caribeña de Ciencias*

Sociales (RCCS), ISSN-e 2254-7630, N^o. 1 (Enero), 2019, 1, 19.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9158732&info=resumen&idioma=SPA>

Hershey, D. R. (1998). Bean Seed Imbibition. *Science Activities: Classroom Projects and Curriculum Ideas*, 35(2), 25–27. <https://doi.org/10.1080/00368129809602077>

Hider, R. C., & Kong, X. (2009). Chemistry and biology of siderophores. *The Royal Society of Chemistry*, 27, 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>

Hosseinian, F., Oomah, B. D., & Campos-Vega, R. (2017). *Dietary Fibre Functionality in Food and Nutraceuticals: From Plant to Gut* (1, Ed.). John Wiley & Sons, Incorporated. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=4770532>

Huang, X., Cai, W., & Xu, B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.080>

Hungria, M., & Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2–3), 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2)

Calero-Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., Quintero Rodríguez, E., Olivera Vicedo, D., & Peña Calzada, K. (2019). Efecto de la aplicación asociada entre *Rhizobium leguminosarum* y microorganismos eficientes sobre la producción del frijol común. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(2), 2500–5308. https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num2_art:1460

Ikram, A., Saeed, F., Afzaal, M., Imran, A., Niaz, B., Tufail, T., Hussain, M., & Anjum, F. M. (2021). Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 9(8), 4617–4628. <https://doi.org/10.1002/FSN3.2408>

- Ilse de Jager. (2019). Nutritional benefits of legume consumption at household level in rural areas of sub-Saharan Africa: A literature study. *Gates Open Research*, 3, 936. <https://doi.org/https://doi.org/10.21955/gatesopenres.1115819.1>
- Ingole, A., Ismail, S., & Dhamak, A. (2023). Evaluation of Siderophore Production by Different Promising Microbial Isolates. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(19), 1091–1096. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i193647>
- INTA. (2016). *Boletín técnico 1. Suelos de Costa Rica: Orden Ultisol*. www.platicar.go.cr
- Irshad, A., Rehman, R. N. U., Abrar, M. M., Saeed, Q., Sharif, R., & Hu, T. (2021). Contribution of *rhizobium*–legume symbiosis in salt stress tolerance in medicago truncatula evaluated through photosynthesis, antioxidant enzymes, and compatible solutes accumulation. *Sustainability (Switzerland)*, 13. <https://doi.org/10.3390/su13063369>
- Jacinto Hernández, C., & Escudero, A. (2016). Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agronomía Mesoamericana*, 4, 42. <https://doi.org/10.15517/am.v4i0.25165>
- Jacinto-Hernández, C., Coria-Peña, M., Contreras-Santos, G., Martínez-López, L., Zapata-Martelo, E., Ayala-Carrillo, M. del R., Jacinto-Hernández, C., Coria-Peña, M., Contreras-Santos, G., Martínez-López, L., Zapata-Martelo, E., & Ayala-Carrillo, M. del R. (2019). Azúcares totales y proteína en frijol nativo de la región Triqui Alta, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1667–1674. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V10I7.2114>
- Jain, P., & Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 236–240. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2643>
- Jaiswal, S. K., Naamala, J., & Dakora, F. D. (2018). Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and rhizobia. *Biology and Fertility of Soils*, 54(3), 309–318. <https://doi.org/10.1007/S00374-018-1262-0/TABLES/2>

- Jiménez-Cardozo, N., Díaz-Vesga, M. C., Gallego-Castillo, S., Álvarez, D., Orozco-Agredo, J. C., Ortega, J. G., & Morales-Jiménez, C. (2024). Functional and Nutritional Characterization of a Natural Diet Based on BIO102 Iron Biofortified Beans in Newly Weaned Mice. *Legume Science*, 6. <https://doi.org/10.1002/leg3.70016>
- Jiménez-Gómez, A., Celador-Lera, L., Fradejas-Bayón, M., & Rivas, R. (2017). Plant probiotic bacteria enhance the quality of fruit and horticultural crops. *AIMS Microbiology*, 3(3), 483. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.3.483>
- Johan, P. D., Ahmed, O. H., Omar, L., & Hasbullah, N. A. (2021). Phosphorus Transformation in Soils Following Co-Application of Charcoal and Wood Ash. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 2010, 11(10), 2010. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11102010>
- Johnson, A. C., & Wood, M. (1990). DNA, a Possible Site of Action of Aluminum in *Rhizobium* spp. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 56(12), 3629–3633.
- Karaca, Ü. (2016). Grain Yield and Quality Response of Common Bean Cultivar to Inoculation with Native Rhizobacteria. *J Agr Food Sci*, 30(1), 1–7.
- Kato, K., Arima, Y., & Hirata, H. (1997). Effect of exudate released from seeds and seedling roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on proliferation of *Rhizobium* sp. (*Phaseolus*). *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(2), 275–283. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.10414752>
- Kaushik, P., Andújar, I., Vilanova, S., Plazas, M., Gramazio, P., Javier Herraiz, F., Singh Brar, N., Prohens, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velazquez, D. (2015). Breeding Vegetables with Increased Content in Bioactive Phenolic Acids. *Molecules*, 20, 18464–18481. <https://doi.org/10.3390/molecules201018464>
- Ke, X., & Wang, X. (2024). Energy sensors: emerging regulators of symbiotic nitrogen fixation. In *Trends in Plant Science* (Vol. 29, pp. 730–732). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.01.010>

- Khodaei, D., & Hamidi-Esfahani, Z. (2019). Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, *156*, 110944. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2019.110944>
- KIKUCHI, K., KOIZUMI, M., ISHIDA, N., & KANO, H. (2006). Water Uptake by Dry Beans Observed by Micro-magnetic Resonance Imaging. *Annals of Botany*, *98*(3), 545–553. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl145>
- Kingsley, M. T., & Bohlool, B. B. (1992). Extracellular Polysaccharide Is Not Responsible for Aluminum Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* CIAT899. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1095. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.4.1095-1101.1992>
- Kleinert, A., Venter, M., Kossmann, J., & Valentine, A. (2014). The reallocation of carbon in P deficient lupins affects biological nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*, *171*, 1619–1624. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.017>
- Klepa, M. S., Helene, L. C. F., & Hungria, M. (2024). Understanding the Diversity and Evolution of Rhizobia from a Genomic Perspective. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 89–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-13320-6.00019-6>
- Kouki, S., L'taief, B., Al-Qthanin, R. N., Rouissi, M., & Sifi, B. (2022). Phenotypic diversity and biochemical characteristics of selected rhizobia nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro*, *34*(1), 15–26. <https://doi.org/10.51372/bioagro341.2>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, *24*, e00370. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00370>
- Kumar Patel, A., Banjare, U., Kumari, A., Kumar Singh, R., & Deo Pandey, K. (2020). Temperature tolerant *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Strains with Plant Growth Promotion Traits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *14*(4), 2603–2609. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.4.36>

- Kümmerli, R. (2023). Iron acquisition strategies in pseudomonads: mechanisms, ecology, and evolution. *Biometals*, 36(4), 777. <https://doi.org/10.1007/S10534-022-00480-8>
- Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Karpuz, B., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R. (2020). Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers*, 12(7), 1959. <https://doi.org/10.3390/cancers12071959>
- Lakshmi-Kumari, M., Singh, C. S., & Rao, N. S. S. (1974). Root hair infection and nodulation in lucerne (*Medicago sativa* L.) as influenced by salinity and alkalinity. *Plant and Soil*, 40(2), 261–268.
- Lapa-Unocc, P. F., Salazar-Paucar, R. E., Saldaña-Barillas, P. I., Laura-Lucas, L. M., Taipe-Cancho, M. H., Mañuico-Mendoza, R., Lapa-Unocc, P. F., Salazar-Paucar, R. E., Saldaña-Barillas, P. I., Laura-Lucas, L. M., Taipe-Cancho, M. H., & Mañuico-Mendoza, R. (2024). Efectividad de diferentes cepas de rizobios sobre el rendimiento del cultivo de frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*, 42(3), 55–62. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292024000300055>
- Larrainzar, E., Villar, I., Rubio, M. C., Pérez-Rontomé, C., Huertas, R., Sato, S., Mun, J.-H., & Becana, M. (2020). Hemoglobins in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *New Phytologist*, 228(2), 472–484. <https://doi.org/10.1111/nph.16673>
- Lechowska, K., Kubala, S., Wojtyła, Ł., Nowaczyk, G., Quinet, M., Lutts, S., & Garnczarska, M. (2019). New insight on water status in germinating brassica napus seeds in relation to priming-improved germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030540>
- Lei, Z., Jian-Ping, G., Shi-Qing, W., Ze-Yang, Z., Chao, Z., & Yongxiong, Y. (2011). Mechanism of acid tolerance in a *Rhizobium* strain isolated from *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(6), 514–524. <https://doi.org/10.1139/W11-036>
- León-Cortés, D., Arce-Villalobos, K., Bogantes-Ledezma, D., Irías-Mata, A., Chaves-Barrantes, N., & Vinas, M. (2025). Anti-aflatoxin potential of phenolic compounds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 469, 142597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142597>

- Li, M., Watanabe, S., Gao, F., & Dubos, C. (2023). Iron Nutrition in Plants: Towards a New Paradigm? In *Plants* (Vol. 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12020384>
- Li, Y., Guan, Y., Jiang, Z., Xie, Q., Wang, Q., Yu, C., & Yu, W. (2024). Soil Microbial and Metabolomic Shifts Induced by Phosphate-Solubilizing Bacterial Inoculation in *Torreya grandis* Seedlings. *Plants*, 13(22), 3209. <https://doi.org/10.3390/plants13223209>
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., & Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 399–410. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.08.038>
- Lohar, D. P., Sharopova, N., Endre, G., Peñuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K. A. T., & VandenBosch, K. A. (2006). Transcript Analysis of Early Nodulation Events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 140(1), 221–234. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070326>
- Lopetinsky, K. J., Lupwayi, N. Z., Olson, M. A., Akter, Z., & Clayton, G. W. (2014). Contrasting *Rhizobium* inoculation requirements of zero-tannin faba bean and narrow-leafed lupin in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(7), 1117–1123. <https://doi.org/10.4141/CJPS2013-314/ASSET/IMAGES/CJPS2013-314TAB8.GIF>
- López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., Gómez-Serranillos, M. P., Palomino, O. M., & Carretero, M. E. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138(1), 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.107>
- López, R., Ramirez, R., & Gonzalez Granma (Cuba), L. (Instituto de I. A. "Jorge D. (1998). Effect of salinity on nitrogen fixation in plants of *Teramnus labialis*. *Pastos y Forrajes*, 21(4).
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education: JMBE*, 12(1), 51. <https://doi.org/10.1128/JMBE.V12I1.249>

- Lowendorf, H. S., Baya, A. M., & Alexander, M. (1981). Survival of *Rhizobium* in Acid Soils. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 42(6), 951–957. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.42.6.951-957.1981>
- LPSN. (2025). *Rhizobium*. *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/rhizobium>
- Luthria, D. L., & Pastor-Corrales, M. A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.09.003>
- Lux, P. E., Freiling, M., Stuetz, W., Von Tucher, S., Carle, R., Steingass, C. B., & Frank, J. (2020). (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (*Zea mays* L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(2), 612–622. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B07009/SUPPL_FILE/JF9B07009_SI_001.PDF
- Madrera, R. R., Negrillo, A. C., Valles, B. S., & Fernández, J. J. F. (2021). Phenolic content and antioxidant activity in seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/FOODS10040864/S1>
- Madrid Concon, J., & Soltess, D. (1973). Rapid Micro Kjeldahl Digestion of Cereal Grains and Other Biological Materials'. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 53, 3541.
- Mahwish, , Saeed, F., Nosheen, F., -Ain, Q., Niaz, B., Afzaal, M., Ehsan, K., Hussain, M., Imran, M., & Al Jbawi, E. (2023). Bio-evaluation of alkaloids and saponins from bitter melon: Probing more desirable compound in treating hyperglycemia and hyperlipidemia. *Cogent Food & Agriculture*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2242634>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359. <https://doi.org/10.4161/PSB.5.4.10871>
- Mandal, S., Mandal, M., Das, A., Pati, B., & Ghosh, A. (2009). Stimulation of indoleacetic acid production in a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* by root nodule phenolic acids.

- Archives of Microbiology*, 191(4), 389–393. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0455-6>
- Marra, L. M., de Oliveira, S. M., Soares, C. R. F. S., & de Souza Moreira, F. M. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68(5), 603–609. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500015>
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11–23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926/METRICS>
- Martins, A., Kimura, O., Goi, S. R., & Baldani, J. I. (2004). Effect of the co-inoculation of plant-growth promoting rhizobacteria and rhizobia on development of common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Floresta Ambien*, 11(2), 33–39.
- Massa, N., Cesaro, P., Todeschini, V., Capraro, J., Scarafoni, A., Cantamessa, S., Copetta, A., Anastasia, F., Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., & Bona, E. (2020). Selected autochthonous rhizobia, applied in combination with AM fungi, improve seed quality of common bean cultivated in reduced fertilization condition. *Applied Soil Ecology*, 148, 103507. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103507>
- Mayer, A. (1997). Historical changes in the mineral content of fruits and vegetables. *British Food Journal*, 99(6), 207–211. <https://doi.org/10.1108/00070709710181540>
- Mederos, Y. (2006). Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 27(3). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825009>
- Medina Morales, P., Morales Ibarra, M., & González Monterrubio, C. (2024). Bioinsumos y bioeconomía circular contra el cambio climático: Alianza para la productividad, regeneración de suelos y captura de carbono en la agricultura de México, Biofábrica Siglo XXI. *C3-BIOECONOMY: Circular and Sustainable Bioeconomy*, 5, 125–142. <https://doi.org/10.21071/c3b.vi5.17771>
- Meilhoc, E., Boscari, A., Pauly, N., Lepetit, M., Frendo, P., Bruand, C., Puppo, A., & Brouquisse, R. (2025). Oxygen and derived reactive species in legume–rhizobia

- interactions: paradoxes and dual roles. *Journal of Experimental Botany*.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraf160>
- Mencía Guevara, A., Villalobos Moya, K., Rubí Zeledón, J., Granados Rojas, L., Hernández Aguirre, C., & Brenes Monge, H. (2021). Evaluación de propiedades fisicoquímicas del frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris*) como estrategia de diferenciación y valorización. *Perspectivas Rurales*, 18(35).
<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/perspectivasrurales/article/view/14787/24581>
- Mendoza Sánchez, M. (2018). *Inducción de metabolitos de interés nutracéutico en germinados de frijol (Phaseolus vulgaris L.) y el efecto de su consumo en un modelo de dislipidemia* [TESIS QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO]. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1176>
- Mex-Álvarez, R. M. de J., Garma-Quen, P. M., Yanez-Nava, D., Guillen-Morales, M. M., Novelo-Pérez, M. I., Mex-Álvarez, R. M. de J., Garma-Quen, P. M., Yanez-Nava, D., Guillen-Morales, M. M., & Novelo-Pérez, M. I. (2021). Caracterización morfométrica de *Phaseolus vulgaris* en Campeche, México. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 32–38. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Meyerholt, J., Sickel, K., & Zaehle, S. (2020). Ensemble projections elucidate effects of uncertainty in terrestrial nitrogen limitation on future carbon uptake. *Global Change Biology*, 26(7), 3978–3996. <https://doi.org/10.1111/GCB.15114>
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- Miller, K. J., & Wood, J. M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 50, 101–137.

- Miransari, M., & Smith, D. L. (2009). Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) – *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein. *European Journal of Soil Biology*, 45(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2008.11.002>
- Mitra, D., Mondal, R., Khoshru, B., Shadangi, S., Das Mohapatra, P. K., & Panneerselvam, P. (2021). Rhizobacteria mediated seed bio-priming triggers the resistance and plant growth for sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100071>
- Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M. A., & de Mejía, E. G. (2015). Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International*, 69, 38–48. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.12.007>
- Mora, B., Fernández, S., Flores, G., & Solórzano, A. (1998). Efecto de las densidades de siembra y un fungicida en el rendimiento del frijol. *Agronomía Mesoamericana*, 9(2), 09–15.
- Mora Ramírez, S., Mora Monge, E., Jaén Barrantes, L., & Monge Cordero, D. (2023). *Boletín Estadístico Agropecuario Serie Cronológica 2019-2022 Edición N° 33*. www.infoagro.go.cr
- Moreno Sarmiento, N. (2016). La agricultura sostenible un reto para la microbiología del suelo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57828>
- Morón, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M., & Sousa, C. (2005). Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chemistry & Biology*, 12, 1029–1040. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.06.014>
- Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439–462. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>

- Muntane Coca, M. D. (2020). Aminoácidos esenciales y sus funciones. In Ediciones Díaz de Santos (Ed.), *Dietética Antiaging y Anticáncer*. (2nd ed.). <https://www.digitaliapublishing.com/a/136032>
- Narale, H. H., Raut, Y. B., & Bais, S. K. (2025). Exploring the Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Pharmacy and Herbal Technology*, 3(1), 2583–8962. www.ijprdjournals.com
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13383.X>
- Navarro Del Hierro, J., Piazzini, V., Reglero, G., Martín, D., & Bergonzi, M. C. (2020). In Vitro Permeability of Saponins and Sapogenins from Seed Extracts by the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: Effect of in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(5), 1297–1305. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B07182/ASSET/IMAGES/LARGE/JF9B07182_0002.JPEG
- Navarro-Saltos, G. E., Intriago-Intriago, A. P., Bustamante-Mieles, X. A., & Guerrero-Calero, J. M. (2025). Análisis de estrategias para reducir la huella de carbono en la producción agroindustrial. *Innova Science Journal*, 3(2), 27–38. <https://doi.org/10.63618/omd/isj/v3/n2/51>
- Ndakidemi, P. A., Bambara, S., & Makoi, J. H. J. R. (2011). Micronutrient uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by *Rhizobium* inoculation, and the supply of molybdenum and lime. *POJ*, 4(1), 40–52.
- Nicolás-García, M., Perucini-Avendaño, M., Jiménez-Martínez, C., Perea-Flores, M. de J., Gómez-Patiño, M. B., Arrieta-Báez, D., & Dávila-Ortiz, G. (2021). Bean phenolic compound changes during processing: Chemical interactions and identification. *Journal of Food Science*, 86(3), 643–655. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15632>
- Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Mogro, E. G., Wibberg, D., Winkler, A., Hansen, L. H., Schluüter, A., Puühler, A., Kalinowski, J., Tejerizo, G. A. T., & Pistorio, M. (2021). Global transcriptome analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response

to acid stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1).
<https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAA235>

Nina, N., Theoduloz, C., Paillán, H., Jiménez-Aspee, F., Márquez, K., Schuster, K., Becker, L., Oellig, C., Frank, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2023). Chemical profile and bioactivity of Chilean bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Functional Foods*, 104, 105513. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2023.105513>

Njoumi, S., Josephe Amiot, M., Rochette, I., Bellagha, S., & Mouquet-Rivier, C. (2019). Soaking and cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(5), 551–561.
[https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544229/SUPPL_FILE/IJF_A_1544229_S M5495.PDF](https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544229/SUPPL_FILE/IJF_A_1544229_S_M5495.PDF)

Noori, F., Etesami, H., Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., & Alishahi, F. (2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 129–138.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.092>

Nyau, V., Prakash, S., Rodrigues, J., Farrant, J., Lin, K.-W., & Sharma, B. (2015). HPLC-PDA-ESI-MS Identification of Polyphenolic Phytochemicals in Different Market Classes of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 8(4), 1–11.
<https://doi.org/10.9734/IJBCRR/2015/21608>

Oficina Nacional de Semillas. (2020). *Memoria Anual 2020*. https://ofinase.go.cr/wp-content/uploads/ons_memoria2020.pdf

Ogutcu, H., & Avsar, H. (2020). Characterization and Siderophores Production of *Rhizobium* spp. Isolated from wild Legumes. *International Journal of Computational and Experimental Science and ENgineering (IJCESEN)*, 6(3), 176–179.
<https://doi.org/10.22399/ijcesen.718084>

- Okafor, J. N. C., Meyer, M., Le Roes-Hill, M., & Jideani, V. A. (2022). Flavonoid and Phenolic Acid Profiles of Dehulled and Whole *Vigna subterranea* (L.) Verdc Seeds Commonly Consumed in South Africa. *Molecules*, 27(16), 5265. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27165265/S1>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 566–576. <https://doi.org/10.1038/nrm1424>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Ombra, M. N., d’Acierno, A., Nazzaro, F., Riccardi, R., Spigno, P., Zaccardelli, M., Pane, C., Maione, M., & Fratianni, F. (2016). Phenolic Composition and Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Extracts of Twelve Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Endemic Ecotypes of Southern Italy before and after Cooking. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1). <https://doi.org/10.1155/2016/1398298>
- ONU. (2025). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. <https://Ods.Cr/Es/Objetivo/Objetivo-2>.
- Ortega, E., Ortega-Rodes, P., & Rodés, R. (2004). La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar. *Mol Biol Evol*, 21, 541–554. <https://www.researchgate.net/publication/200042092>
- Osorio, N. W., & Habte, M. (2001). Synergistic Influence of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus and a P Solubilizing Fungus on Growth and P Uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Research and Management*, 15(3), 263–274. <https://doi.org/10.1080/15324980152119810>
- O’Sullivan, D. J., & O’Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*, 56(4), 662–676. <https://doi.org/10.1128/mr.56.4.662-676.1992>
- Paolo, J., Morales, Z., Juvenal, W., Pizarro, Z., Iván, V., Macías, V., Avalos Moreno, E., Aminoácidos, L., El, E., & Humano, C. (2017). Los Aminoácidos en el cuerpo

humano. *RECIMUNDO: Revista Científica de La Investigación y El Conocimiento*, 1(5), 379–391. <https://doi.org/10.26820/recimundo/1.5.2017.379-391>

Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas* [Universidad Católica Argentina]. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>

Parra-Cota, F. I., Coronel-Acosta, C.-B., Amézquita-Avilés, C. F., De los Santos-Villalobos, S., & Escalante-Martínez, D. I. (2018). Diversidad metabólica de microorganismos edáficos asociados al cultivo de maíz en el Valle del Yaqui, Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2), 431–442. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1083>

Pérez Herrera, P., Esquivel Esquivel, G., Rosales Serna, R., & Acosta-Gallegos, J. A. (2002). Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(2), 172–180. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-062220020002000009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Perez-Hernandez, L. M., Hernández-Álvarez, A. J., Morgan, M., Boesch, C., & Orfila, C. (2021). Polyphenol bioaccessibility and anti-inflammatory activity of Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with diverse seed colour. *CyTA - Journal of Food*, 19(1), 682–690. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1965660>

Pérez-Herrera, P., & Acosta-Gallegos, J. A. (2002). Permeabilidad de la testa y la porción micrópilo-hilio en semilla de frijol silvestre y cultivado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(1), 57–57. <https://doi.org/10.35196/RFM.2002.1.57>

Petry, N., Egli, I., Champion, B., Nielsen, E., & Hurrell, R. (2013). Genetic Reduction of Phytate in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds Increases Iron Absorption in Young Women. *The Journal of Nutrition*, 143(8), 1219–1224. <https://doi.org/10.3945/JN.113.175067>

Petry, N., Egli, I., Zeder, C., Walczyk, T., & Hurrell, R. (2010). Polyphenols and Phytic Acid Contribute to the Low Iron Bioavailability from Common Beans in Young

Women. *The Journal of Nutrition*, 140(11), 1977–1982.
<https://doi.org/10.3945/JN.110.125369>

Piedra Chacón, J. (2022). *Determinación de viabilidad y la relación entre imbibición y germinación de semillas de frijol, provenientes de un banco de germoplasma, almacenadas por 30 años* (L. O. Barboza Barquero, Ed.) [Licenciatura, Universidad de Costa Rica].
<https://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr/server/api/core/bitstreams/a3a0efd0-f357-4e1f-80f0-dfc6328bd282/content>

Piha, M. I., & Munns, D. N. (1987). Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant and Soil*, 98(2), 183–194.
<https://doi.org/10.1007/BF02374822/METRICS>

Pillimué, J. S. U., Méndez, J. R. B., Beltrán, G. A. V., Jojoa, W. A., Pillimué, J. S. U., Méndez, J. R. B., Beltrán, G. A. V., & Jojoa, W. A. (2024). Antifungal evaluation of saponins extracted from quinoa husk (*Chenopodium quinoa* Willd) against *Botrytis cinerea* in strawberry. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(2), 10679–10690. <https://doi.org/10.15446/RFNAM.V77N2.109082>

Pinto, P. P., Raposeiras, R., Macedo, A. M., Seldin, L., Paiva, E., & Sá, N. M. H. (1998). Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. *Revista de Microbiología*, 29(4), 295–300. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141998000400012>

Pitura, K., & Arntfield, S. D. (2019). Characteristics of flavonol glycosides in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. *Food Chemistry*, 272, 26–32.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.220>

Platamone, G., Procacci, S., Maccioni, O., Borromeo, I., Rossi, M., Bacchetta, L., & Forni, C. (2023). *Arthrobacter* sp. Inoculation Improves Cactus Pear Growth, Quality of Fruits, and Nutraceutical Properties of Cladodes. *Current Microbiology*, 80(8), 266.
<https://doi.org/10.1007/S00284-023-03368-Z/FIGURES/5>

- Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>
- Preyanga, R., Anandham, R., Krishnamoorthy, R., Senthilkumar, M., Gopal, N. O., Vellaikumar, A., & Meena, S. (2021). Groundnut (*Arachis hypogaea*) nodule *Rhizobium* and passenger endophytic bacterial cultivable diversity and their impact on plant growth promotion. *Rhizosphere*, 17, 100309. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2021.100309>
- Prohens, J., Casañas, F., & Ferreira, J. J. (2016). Variedades tradicionales en una agricultura moderna: estrategias de re-valorización. In J. Ruiz de Galarreta, J. Prohens, & R. Tierno (Eds.), *Las variedades locales en la mejora genética de plantas* (pp. 79–100). Servicio Central de Publicaciones = Argitalpen Zerbitzu Nagusia. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=769121&info=resumen&idioma=BAQ>
- Rahimi, S., Talebi, M., Baninasab, B., Gholami, M., Zarei, M., & Shariatmadari, H. (2020). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in improving iron acquisition by altering physiological and molecular responses in quince seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.045>
- Ramos, Y., Espinosa, R., Ramos, Y., & Espinosa, R. (2024). Effect of saponins and alkaloids on stink bugs control and yield of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 40(2), 407–417. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS40-35EVYR20035>
- Rasera, G. B., Hilker, M. H., & de Castro, R. J. S. (2020). Free and insoluble-bound phenolics: How does the variation of these compounds affect the antioxidant properties of mustard grains during germination? *Food Research International*, 133, 109115. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109115>
- Ravoninjatovo, M., Ralison, C., Servent, A., Morel, G., Achir, N., Andriamazaoro, H., & Dornier, M. (2022). Effects of soaking and thermal treatment on nutritional quality of

- three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Madagascar. *Legume Science*, 4(4), e143. <https://doi.org/10.1002/leg3.143>
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., & Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971–984. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1539>
- Reglamento Técnico: RTCR:384: Frijol En Grano N° 32149, Pub. L. No. 384, La Gaceta (2005).
http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_norma.aspx?param1=NRM&nValor1=1&nValor2=54163&nValor3=59249&strTipM=FN
- Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., & Antoun, H. (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3), 281–290. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.1999.TB00583.X>
- Rezende, A. A., Pacheco, M. T. B., da SILVA, V. S. N., & Ferreira, T. A. P. de C. (2017). Nutritional and protein quality of dry Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology*, 38(3), 421–427. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.05917>
- Richardson, A. E., Djordjevic, M. A., Rolfe, B. G., & Simpson, R. J. (1988). Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *And Soil*, 109(1), 37–47. <https://about.jstor.org/terms>
- Rivas Medina, M. (2018). *Identificación de Compuestos Bioactivos en Frijol Común (Phaseolus vulgaris L) Bioprocesado. Propiedades Antioxidante e Hipoglucemiante*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA.
- Rocchetti, G., Lucini, L., Chiodelli, G., Giuberti, G., Montesano, D., Masoero, F., & Trevisan, M. (2017). Impact of boiling on free and bound phenolic profile and antioxidant activity of commercial gluten-free pasta. *Food Research International*, 100, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.031>

- Rocha, A. P., Palmeiras, M. A., de Oliveira, M. A., Florentino, L. H., Cataldi, T. R., Bittencourt, D. M. de C., Labate, C. A., Rosinha, G. M. S., & Rech, E. L. (2025). *Cell-Free production of soybean leghemoglobins and non-symbiotic hemoglobin*. <https://doi.org/10.1101/2025.03.16.643390>
- Rocha-Guzman, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Gonzalez-Laredo, R. F., Cardoza-Cervantes, V., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gomez, M., Garcia-Gasca, T., & Salazar, A. D. A. (2013). Evaluation of culinary quality and antioxidant capacity for Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) canned in pilot plant. *International Food Research Journal*, 20(3), 1087–1093. <https://www.proquest.com/docview/1426249789/citation/CEA823FF61594F9DPQ/1>
- Rochín-Medina, J. J., Mora-Rochín, S., Navarro-Cortez, R. O., Tovar-Jimenez, X., Quiñones-Reyes, G., Ayala-Luján, J. L., & Aguayo Rojas, J. (2021). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de variedades de frijol sembradas en el estado de Zacatecas. *Acta Universitaria*, 31, 1–13. <https://doi.org/10.15174/au.2021.3059>
- Rodríguez, B., & López, M. (2009). Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de un ultisol de la altiplanicie del estado guarico. *Agronomía Tropical*, 59(4), 381–386. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000400003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rodríguez Madrera, R., Campa Negrillo, A., & Ferreira Fernández, J. J. (2023). Modulation of the nutritional and functional values of common bean by farming system: organic vs. conventional. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1282427. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2023.1282427/BIBTEX>
- Rodríguez Madrera, R., Campa Negrillo, A., Suárez Valles, B., & Ferreira Fernández, J. J. (2020). Characterization of extractable phenolic profile of common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Spanish diversity panel. *Food Research International*, 138, 109713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109713>

- Rodríguez-González, S., & Fernández-Rojas, X. E. (2015). Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 145. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16937>
- Rogers, N. J., Carson, K. C., Glenn, A. R., Dilworth, M. J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (2001). Alleviation of aluminum toxicity to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* by the hydroxamate siderophore vicibactin. *BioMetals*, 14(1), 59–66. <https://doi.org/10.1023/A:1016691301330/METRICS>
- Roy, N., & Chakrabartty, P. K. (2000). Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*). *Current Microbiology*, 41(1), 5–10. <https://doi.org/10.1007/S002840010082/METRICS>
- SAMAGO, T. Y., & DAKORA, F. D. (2024). Combined use of *Rhizobium* inoculation and low phosphorus application increased plant growth, root nodulation and grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Ethiopia. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 0-. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2024556>
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Peña-Cabriales, J. J., & Farías-Rodríguez, R. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 53–60. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316076006>
- Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U., & Świeca, M. (2021). Influence of Phenolic-Food Matrix Interactions on In Vitro Bioaccessibility of Selected Phenolic Compounds and Nutrients Digestibility in Fortified White Bean Paste. *Antioxidants*, 10(11), 1825. <https://doi.org/10.3390/antiox10111825>
- Seneviratne, G., & Jayasinghearachchi, H. S. (2003). Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration? *Plant and Soil*, 252(2), 385–395. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1024725511783>
- SEPSA. (2021). *Boletín Estadístico Agropecuario Serie Cronológica 2020-2023 Edición N° 34*. Boletines Estadísticos Agropecuarios. N° 32. Serie Cronológica 2018-2021. chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/BEA34.pdf

SEPSA. (2023). *Informe de Gestión del Sector Agropecuario, 2023 - 2024*. www.sepsa.go.cr

SEPSA. (2024). *Boletín Estadístico Agropecuario Serie Cronológica 2020-2023 Edición N° 34*. www.infoagro.go.cr

Seshadri, S., Ignacimuthu, S., & Lakshminarasimhan, C. (2004). Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 191(8), 1043–1052. <https://doi.org/10.1080/00986440490276308>

Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., & Martinez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323–378.

Shaheen, S. M., & Rinklebe, J. (2018). Phosphate in Soils. In H. M. Selim (Ed.), *Phosphate in Soils: Interaction with Micronutrients, Radionuclides and Heavy Metals*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351228909>

Shahidi, F., Yeo, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velazquez, D. (2016a). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21091216>

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016b). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>

Shamseldin, A., & Encarna Velázquez, . (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

- Shen, L., Luo, H., Fan, L., Tian, X., Tang, A., Wu, X., Dong, K., & Su, Z. (2023). Potential Immunoregulatory Mechanism of Plant Saponins: A Review. *Molecules*, 29(1), 113. <https://doi.org/10.3390/molecules29010113>
- Shi, J., Xue, S. J., Ma, Y., Li, D., Kakuda, Y., & Lan, Y. (2009). Kinetic study of saponins B stability in navy beans under different processing conditions. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2008.12.035>
- Shimamura, M., Kumaki, T., Hashimoto, S., Saeki, K., Ayabe, S., Higashitani, A., Akashi, T., Sato, S., & Aoki, T. (2022). Phenolic Acids Induce Nod Factor Production in Lotus japonicus–*Mesorhizobium* Symbiosis. *Microbes and Environments*, 37(1), ME21094. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME21094>
- Shome, S., Barman, A., & Solaiman, Z. M. (2022). *Rhizobium* and Phosphate Solubilizing Bacteria Influence the Soil Nutrient Availability, Growth, Yield, and Quality of Soybean. *Agriculture*, 12(8), 1136. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081136>
- Sigma-Aldrich. (2013). *P1602 Pikovskaya's Agar*. Product Information. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/191/794/p1602dat.pdf>
- Silva, C. R., Pereira, R. B., & Sabadini, E. (2001). Color changes in indicator solutions: An intriguing and elucidative general chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 78(7), 939–940. https://doi.org/10.1021/ED078P939/SUPPL_FILE/JCE2001P0939W.ZIP
- Sindhu, S., Dahiya, A., Gera, R., Satyavir, •, & Sindhu, S. (2020). Mitigation of Abiotic Stress in Legume-Nodulating Rhizobia for Sustainable Crop Production. *Agricultural Research*, 9(4), 444–459. <https://doi.org/10.1007/s40003-020-00474-3>
- Singh, A. (2022). Soil salinity: A global threat to sustainable development. *Soil Use and Management*, 38(1), 39–67. <https://doi.org/10.1111/sum.12772>
- Singh, P., Kumar, V., & Agrawal, S. (2014). Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/426483>

- Singleton, P. W., El Swaify, S. A., & Bohlool, B. B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 884–890. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.4.884-890.1982>
- Slatni, T., Krouma, A., Aydi, S., Chaiffi, C., Gouia, H., & Abdelly, C. (2008). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) subjected to iron deficiency. *Plant & Soil*, 312(1/2), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9481-4>
- Sofi, P. A., Mir, R. R., Zargar, S. M., Rani, S., Fatima, S., Shafi, S., & Zaffar, A. (2022). What makes the beans (*Phaseolus vulgaris* L.) soft: insights into the delayed cooking and hard to cook trait. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 88(2), 142–159. <https://doi.org/10.1007/s43538-022-00075-4>
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. *Handbook for Rhizobia*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Srimathi, K., & Suji, H. A. (2019). Siderophores detection by using blue agar CAS assay methods. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 5(6), 180. <https://doi.org/10.26438/IJSRBS/V5I6.180185>
- Storey, E. P., Boghozian, R., Little, J. L., Lowman, D. W., & Chakraborty, R. (2006). Characterization of “Schizokinen”; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *BioMetals*, 19(6), 637–649. <https://doi.org/10.1007/S10534-006-9001-7>
- Sufar, E. K., Hasanaliyeva, G., Wang, J., Bilsborrow, P., Rempelos, L., Volakakis, N., Baranski, M., & Leifert, C. (2024). *Effect of Rhizobium Seed Inoculation on Grain Legume Yield and Protein Content – a Systematic Review and Meta-Analysis*. <https://doi.org/10.20944/preprints202404.0344.v1>
- Sulieman, S., Ha, C. Van, Schulze, J., & Tran, L. S. P. (2013). Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2701–2712. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT122>

- Swanson, B. G., Hughes, J. S., & Rasmussen, H. P. (1985). Seed Microstructure: Review of Water Imbibition in Legumes. *Food Structure*, 4(1), 115–124.
- Syanda, J., Nguluu, S., Kimatu, J., Mwami, B., & Karanja, D. (2018). Evaluating the Effects of water Imbibition on Cooking Time of Commonly Grown Bean (*Phaseolus Vulgaris* L) Genotypes in Semi-Arid Eastern Kenya. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 3(6), 57–62. www.ijisrt.com
- Syanda, J., Nguluu, S., Kimatu, J., Mwami, B. M., & Karanja, D. (2019). The effects of physical properties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties on soaking and cooking time. *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*, 3(3), 44. https://ijaeb.org/uploads2018/AEB_03_187.pdf
- Taiwo, K. A., Akanbi, C., & Ajibola, O. O. (1997). The effects of soaking and cooking time on the cooking properties of two cowpea varieties. *Journal of Food Engineering*, 33(3–4), 337–346. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)87278-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)87278-0)
- Tajini, F., Trabelsi, M., & Drevon, J. J. (2011). Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 157. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2011.11.003>
- Tajoddin, M., Manohar, S., & Lalitha, J. (2014). Effect of soaking and germination on polyphenol content and polyphenol oxidase activity of mung bean (*Phaseolus Aureus* L.) cultivars differing in seed color. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 782–790. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654702>
- Tang, M. (1986). Factores que afectan la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. *Pastos y Forrajes*, 9(3), 193–209. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=1489>
- Tarzi, B. G., Gharachorloo, M., Baharinia, M., & Mortazavi, S. A. (2012). The Effect of Germination on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1137–1143.

- Tejera, N. A., Campos, R., Sanjuan, J., & Lluch, C. (2004). Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 161(3), 329–338. <https://proquest.proxyucr.elogim.com/scholarly-journals/nitrogenase-antioxidant-enzyme-activities/docview/206886401/se-2?accountid=28692>
- Moura, F. T., Helene, L. C. F., Ribeiro, R. A., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2023). The outstanding diversity of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mato Grosso do Sul, central-western Brazil, revealing new *Rhizobium* species. *Archives of Microbiology*, 205(9), 325. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03667-w>
- Uebersax, M. A., Cichy, K. A., Gomez, F. E., Porch, T. G., Heitholt, J., Osorno, J. M., Kamfwa, K., Snapp, S. S., & Bales, S. (2023). Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security—A review. *Legume Science*, 5(1), e155. <https://doi.org/10.1002/LEG3.155>
- Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, M., Ramírez Ramírez, J. C., & Ulloa Ángel, B. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Fuente*, 3(8). <http://192.100.162.123:8080/bitstream/123456789/582/1/EI%20frijol%20%28Phaseolus%20vulgaris%29%2c%20su%20importancia%20nutricional.pdf>
- Ulloa, J. H., Ulloa, J., & Alam, H. (2003). Efectos antioxidante y antiagregante del frijol rojo: un probable factor ateroprotector en la población latinoamericana. *Revista Colombiana de Cirugía*, 18(3).
- Untergasser, A., Bisseling, T., & Geurts, R. (2009). Making *Rhizobium*-Infected Root Nodules. In K. Pawlowski (Ed.), *Prokaryotic Symbionts in Plants* (pp. 45–69). Springer. https://doi.org/10.1007/7171_2008_119
- Upretee, P., Bandara, M. S., & Tanino, K. K. (2024). The Role of Seed Characteristics on Water Uptake Preceding Germination. *Seeds*, 3(4), 559–574. <https://doi.org/10.3390/seeds3040038>

- Valero Valero, N. O., Vergel Castro, C. M., Ustate Morales, Y. E., & Gómez Gómez, L. C. (2021). Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycoides*. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(2), 119–134. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1608>
- Van Berkum, P., Beyene, D., & Eardly, B. D. (1996). Phylogenetic Relationships among *Rhizobium* Species Nodulating the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 240–244.
- Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/S00253-006-0380-Z/TABLES/2>
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333–345. <https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I2.470>
- Via, V. D., Zanetti, M. E., & Blanco, F. (2016). How legumes recognize rhizobia. *Plant Signaling & Behavior*, 11(2). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1120396>
- Vidal Fernández, J. E. (2012). *Respuesta de la simbiosis tripartita Rhizobium-Leguminosa-Micorriza arbuscular ante vanadio y níquel* [Tesis para el grado de master en ciencias, Colegio de posgraduados]. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/753>
- Vijayan, S. S., Nagarajappa, N., & Ranjitha, H. P. (2023). Seed coat composition in black and white soybean seeds with differential water permeability. *Plant Biology*, 25(6), 935–943. <https://doi.org/10.1111/PLB.13551>
- Viquez Rodríguez, F. (1999). *Determinación de los principales polisacáridos no almidonosos causantes de flatulencia en el frijol común (Phaseolus vulgaris L.). Efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa sobre su digestibilidad y aceptabilidad* [Universidad de Costa Rica]. <https://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr/handle/123456789/15741>

- Wang, J., Zhang, J., Yu, Z.-L., Chung, S. K., & Xu, B. (2024). The roles of dietary polyphenols at crosstalk between type 2 diabetes and Alzheimer's disease in ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt signaling pathways. *Ageing Research Reviews*, 99, 102416. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102416>
- Wang, L., Rubio, M. C., Xin, X., Zhang, B., Fan, Q., Wang, Q., Ning, G., Becana, M., & Duanmu, D. (2019). CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist*, 224, 818–832. <https://doi.org/10.1111/nph.16077>
- Wang, Y. P., Law, R. M., & Pak, B. (2010). A global model of carbon, nitrogen and phosphorus cycles for the terrestrial biosphere. *Biogeosciences*, 7(7), 2261–2282. <https://doi.org/10.5194/BG-7-2261-2010>
- Wang, Y.-K., Zhang, X., Chen, G.-L., Yu, J., Yang, L.-Q., & Gao, Y.-Q. (2016). Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. *Journal of Functional Foods*, 24, 359–372. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.026>
- Watson, R. R. (2018). *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation* (2nd ed.). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Wekesa, C., Asudi, G. O., Okoth, P., Reichelt, M., Muoma, J. O., Furch, A. C. U., & Oelmüller, R. (2022). Rhizobia Contribute to Salinity Tolerance in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cells*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/CELLS11223628/S1>
- Wekesa, C., Muoma, J., Reichelt, M., Asudi, G., Furch, A., & Oelmüller, R. (2022). The Cell Membrane of a Novel *Rhizobium phaseoli* Strain Is the Crucial Target for Aluminium Toxicity and Tolerance. *Cells*, 11(5), 873. <https://doi.org/10.3390/cells11050873>
- Wulandari, D., Baskoro, K., Mahmuudah, Y., Kusmiyati, F., Pratiwi, A. R., & Budiharjo, A. (2024). Bioprospecting of Rhizobia as Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential from Root Nodules of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Trends in Sciences*, 21(7), 7651. <https://doi.org/10.48048/tis.2024.7651>

- Xu, B., & Chang, S. K. C. (2011). Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. *Food Chemistry*, 129(3), 974–981. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.05.057>
- Yadegari, M., Rahmani, H. A., Noormohammadi, G., & Ayneband, A. (2008). Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pak J Biol Sci*, 11(15), 1935–1939. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1935.1939>
- Yamamoto, S., Okazaki, S., Monica, N. D., Ohkama-Ohtsu, N., Tanaka, H., & Sugihara, S. (2023). Effect of *rhizobium* inoculation on rhizosphere phosphorous dynamics and fertilised phosphorous use efficiency in a maize–pigeon pea intercropping system in weathered tropical soil. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 2(3), 357–368. <https://doi.org/10.1002/SAE2.12067>
- Yang, Q. Q., Farha, A. K., Cheng, L., Kim, G., Zhang, T., & Corke, H. (2020). Phenolic content and in vitro antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are not directly related to anti-proliferative activity. *Food Bioscience*, 36, 100662. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2020.100662>
- Yang, Q. Q., Gan, R. Y., Ge, Y. Y., Zhang, D., & Corke, H. (2018). Polyphenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, Analysis, and Factors Affecting Composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1518–1539. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12391>
- Yao, Y., Yang, X., Shi, Z., & Ren, G. (2014). Anti-Inflammatory Activity of Saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages Cells. *Journal of Food Science*, 79(5), H1018–H1023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12425>
- Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2003). Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1474–1479.

<https://doi.org/10.1021/JF0208132/ASSET/IMAGES/LARGE/JF0208132F00005.JPG>

- Yeo, J., & Shahidi, F. (2015). Critical evaluation of changes in the ratio of insoluble bound to soluble phenolics on antioxidant activity of lentils during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 379–381. https://doi.org/10.1021/JF505632P/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2014-05632P_0001.JPG
- Yeremko, L., Czopek, K., Staniak, M., Marenych, M., & Hanhur, V. (2025). Role of Environmental Factors in Legume-*Rhizobium* Symbiosis: A Review. In *Biomolecules* (Vol. 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom15010118>
- Yildirim, E., Turan, M., Ekinçi, M., Dursun, A., Gunes, A., & Donmez, M. (2015). Growth and mineral content of cabbage seedlings in response to nitrogen fixing rhizobacteria treatment. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), 10929. <https://www.researchgate.net/publication/316463933>
- Yulia, R., Chatri, M., Advinda, L., & Handayani, D. (2025). Saponins Compounds as Antifungal Against Plant Pathogens [Resumen]. *Seram Biologi*, 8(2). <https://serambibiologi.ppj.unp.ac.id/index.php/srmb/article/view/197/106>
- Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999>
- Zamindar, N., Shahedi Baghekhandan, M., Nasirpour, A., & Sheikhzeinoddin, M. (2013). Effect of line, soaking and cooking time on water absorption, texture and splitting of red kidney beans. *J Food Sci Technol*, 50(1), 108–114. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0234-2>
- Zhang, F. (1995). Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max.* (L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. *Environmental and Experimental Botany*, 35(3), 279–285. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(95\)00017-7](https://doi.org/10.1016/0098-8472(95)00017-7)

- Zhang, L., Wu, T., Zhang, Y., Chen, Y., Ge, X., Sui, W., Zhu, Q., Geng, J., & Zhang, M. (2023). Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation in vitro. *Food Chemistry*, 402, 134111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134111>
- Zheng, M., Li, D., Lu, X., Zhu, X., Zhang, W., Huang, J., Fu, S., Lu, X., & Mo, J. (2016). Effects of phosphorus addition with and without nitrogen addition on biological nitrogen fixation in tropical legume and non-legume tree plantations. *Biogeochemistry*, 131(1–2), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0265-x>
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/JF010697N/ASSET/IMAGES/LARGE/JF010697NF00004.JPG>
- Zhu, L., Li, W., Deng, Z., Li, H., & Zhang, B. (2020). The Composition and Antioxidant Activity of Bound Phenolics in Three Legumes, and Their Metabolism and Bioaccessibility of Gastrointestinal Tract. *Foods*, 9(12), 1816. <https://doi.org/10.3390/FOODS9121816>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo**A.1.1. Agar levadura manitol (ALM) medio base.**

Reactivo	Cantidad
Manitol (J.K. Baker, CAS 69-65-8)	10 g/L
Extracto de levadura (OXOID R. LP0021B; L 4414328-02)	2 g/L
K ₂ HPO ₄ (J.K. Baker, CAS 7758-11-4)	0,5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O (J.K. Baker, CAS 10034-99-8)	0,2 g/L
NaCl (Merck, R. 927K12572504; L 8353A)	0,1 g/L
Agar bacteriológico (Liofilchem, R 611001; L 071724505)	15 g/L
Agua desionizada	1 L
pH	6,8

El medio de cultivo se autoclavó durante 20 minutos a 121° C y se vertió en platos Petri estériles.

A.1.2. Agar levadura manitol con rojo Congo.

Al medio ALM se le adicionó, antes de autoclavar 10 mL/L de la solución madre de rojo Congo (0,25 g de rojo Congo (Merck, 9020878) en 100mL de agua desionizada). El medio autolavado se distribuyó en platos Petri estériles.

A.1.3. Agar levadura manitol a diferentes concentraciones de NaCl.

Se preparó para cada concentración de NaCl el medio ALM con rojo Congo (A.1.2) cambiando la concentración de NaCl, por la correspondiente a 25, 50, 75 y 100 mM NaCl. Cada uno de los medios se autoclavó y se distribuyó en platos de Petri estériles.

A.1.4. Agar levadura manitol a pH 5,5 y 8.

- pH 5,5: Al medio A.L.M (A.1.1) se le adiciona antes de autoclavar, púrpura de bromocresol al 0,5%. Después de autoclavar se corrige el pH con HCl 1M hasta el

viraje del indicador a un color café claro y el medio se distribuye en platos Petri estériles.

- pH 8: Se prepara el medio ALM en la forma descrita en el punto A.1.2 y se adiciona, antes de autoclavar NaOH 1M para corregir el pH a 7 y 8. Los medios se distribuyen en condiciones estériles en platos Petri estériles.

A.1.5. CAS (cromo azurol sulfonato) blue Agar (sideróforos).

Se preparó 1L de solución de Fe⁺³ (1 mM FeCl₂·6H₂O, Merck, 2184571) y 100 mL de HCl 3 M. En un beaker de 50 mL se agregó 0,03025 g de CAS (SIGMA, CAS 1667-99-8) y 25 mL de agua desionizada, seguido de 5 mL de la solución de Fe³⁺. Por aparte, en un balón de 100 mL se agregó 0,03645 g de HDTMA (SIGMA, CAS 57-09-0) y se disolvió en 20 mL de agua, se agitó y se agregó la solución de CAS + Fe³⁺. Esta solución junto con el agar (15g/L), la solución de piperazina (SIGMA, CAS 110-85-0) y paletas de madera, se autoclavaron a 121 °C por 25 minutos.

Para la preparación del agar CAS-BLUE se mezcló lentamente la solución de CAS +Fe³⁺ con el agar. Además, se agregó de forma simultánea la solución de piperazina y el HCl 3M (~50 mL) hasta obtener un color azul y un pH de 6,8.

Para dividir el plato Petri se utilizaron las paletas estériles y se vertió el medio en una de las mitades, se dejó solidificar y una vez frío, se vertió la otra mitad con medio ALM con rojo Congo. Se incubó a temperatura ambiente por seis semanas en condiciones de oscuridad.

A.1.6 Medio de roca fosfórica (Osorio & Habte, 2001).

Reactivo	Cantidad
NaCl (Merck, R. 927K12572504; L 8353A)	1 g/L
CaCl ₂ 2H ₂ O (FPS, R 36, S 22-24)	0,2 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O (J.K. Baker, CAS 10034-99-8)	0,4 g/L
NH ₄ NO ₃ (Merck, 4166408)	0,2 g/L
Glucosa (Oxoid, RLP0071; L1984633-02)	10 g/L
Roca fosfórica	3,5 g/L
Agar bacteriológico (Liofilchem, R 611001; L 071724505)	15 g/L

Agua desionizada	1 L
Verde de bromocresol (SIGMA; CAS 76-60-8)	30 mg/L
pH	6,8

A.1.7 Medio de Pikovskaya (TM Media, TH543, L M5E3IR01).

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	0,5 g/L
Dextrosa	10 g/L
Fosfato de calcio	5 g/L
Sulfato de amonio	0,5 g/L
Cloruro de potasio	0,2 g/L
Sulfato de magnesio	0,1 g/L
Sulfato de manganeso	0,0001 g/L
Sulfato ferroso	0,0001 g/L
Agar bacteriológico	15 g/L
Agua desionizada	1 L
pH	6,8

Producto comercial, la descripción de reactivos hace referencia a la etiqueta.

A.1.8 Medio base modificado con la adición de fosfato de hierro y aluminio.

Reactivo	Cantidad
Sucrosa (Oxoid, RLP0071; L1984633-02)	10 g/L
NaCl (Merck, R. 927K12572504; L 8353A)	0,1
MgSO ₄ 7H ₂ O (J.K. Baker, CAS 10034-99-8)	0,5
Extracto de levadura (OXOID R. LP0021B; L 4414328-02)	0,2
NH ₄ Cl (Merck, 4166408)	0,5
MnSO ₄ H ₂ O (Mallinkrodt, CAS 10101-68-5)	0,1
K ₂ HPO ₄ (J.K. Baker, CAS 7758-11-4)	0,5
Agar bacteriológico (Liofilchem, R 611001; L 071724505)	15
Agua desionizada	1 L
Verde de bromocresol (SIGMA; CAS 76-60-8)	30 mg/L

Para la preparación de los medios de cultivo se adicionó al medio base antes de autoclavar:

- Fosfatos de hierro: 2 g/L de FePO₄ (Merck, 5265475)
- Fosfatos de aluminio: 5g/L de AlPO₄ (SIGMA; CAS 7784-30-7)

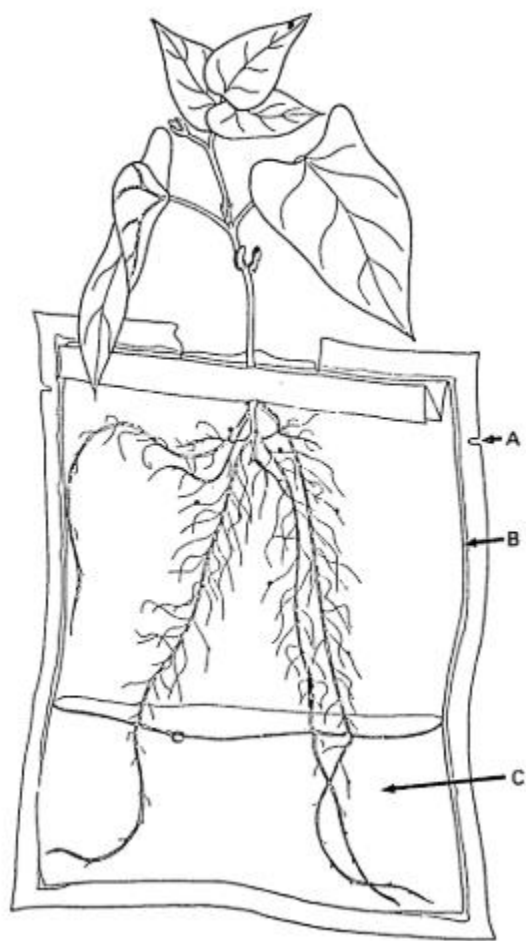
A.1.9 Caldo levadura manitol con la adición de diferentes concentraciones de aluminio.

Reactivo	Cantidad
Manitol (J.K. Baker, CAS 69-65-8)	10 g/L
Extracto de levadura (OXOID R. LP0021B; L 4414328-02)	2 g/L
K ₂ HPO ₄ (J.K. Baker, CAS 7758-11-4)	0,5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O (J.K. Baker, CAS 10034-99-8)	0,2 g/L
NaCl (Merck, R. 927K12572504; L 8353A)	0,1 g/L
Agua desionizada	1 L
AlCl ₃ 6H ₂ O (R36138)	

Se adicionó antes de autoclavar una solución de AlCl₃ 6·H₂O 1000 µM en la cantidad correspondiente 2,3 µM Al, 44,7 µM Al y 67,0 µM Al. El medio se distribuyó en tubos cónicos de 25mL a razón de 5mL por tubo y se autoclavó durante 20 minutos a 121° C. Se inoculó con una aza metálica y se llevó a incubación a 28°C con agitación a 100 rpm.

Anexo 2. Prueba de nodulación

Figura A. 2.1. Bolsas de crecimiento utilizadas para evaluar la capacidad de nodulación de las cepas de *Rhizobium* spp. (A: Bolsa de polipropileno; B: Hoja de papel absorbente; C: Solución nutritiva).



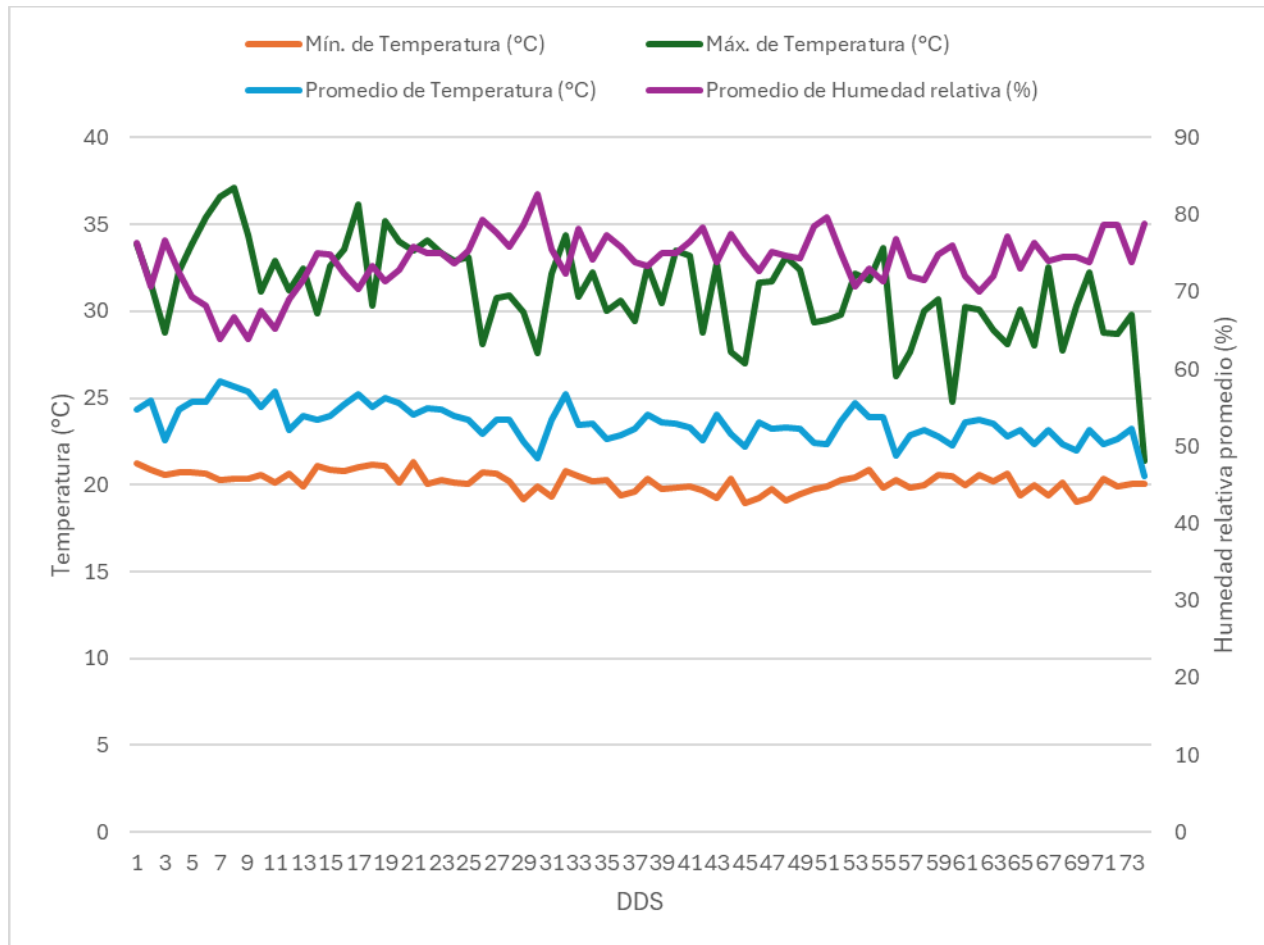
Cuadro A.2.1. Solución nutritiva libre de nitrógeno de Broughton W.J. and Dillworth M.J. 1970.

Solución	Elemento	Fuente	Cantidad (g · L ⁻¹)
1	Ca	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	294,1
2	P	KH ₂ PO ₄	136,1
3	Fe	Citrato de hierro	6,7
	Mg	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	123,3
	K	K ₂ SO ₄	87,3
	Mn	MnSO ₄ · H ₂ O	0,338
4	B	H ₃ BO ₃	0,247
	Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,288
	Cu	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.100
	Co	CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,056
	Mo	Na ₂ MoO ₂ · 2 H ₂ O	0,048

Las soluciones se autoclavan y se utilizan a razón de 5 mL de cada una de las soluciones en 10 L de agua. Se adiciona el volumen requerido en bolsas de germinación estériles y en la cámara de flujo laminar.

ANEXO 4 Datos climáticos

Figura A 4.1. Temperatura y humedad relativa registrada durante el ensayo de invernadero para la calidad del grano.



Anexo 5. Caracterización de las cepas

Cuadro A.5.1. Prueba de tolerancia a la temperatura de 20 cepas de *Rhizobium* spp en medio sólido agar levadura manitol (ALM) incubadas a 25, 30, 35 y 40°C durante tres días.

Cepa	Temperatura			
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
639	4	4	4	0
899	4	4	4	0
CR4001B	4	4	4	1
CR4002B	4	4	4	0
CR4003B	4	4	4	0
CR4004B	4	4	4	0
CR4005B	4	4	4	1
CR4006B	4	4	1	1
CR4007B	4	4	4	1
CR4008B	4	4	4	1
CR4009B	4	4	4	1
CR4010B	4	4	4	1
CR4011B	4	4	4	1
CR4012B	4	4	4	1
CR4013B	4	4	4	1
CR4014B	4	4	4	2
CR4018B	4	4	4	1
CR4019BB	4	4	4	2
CR4020B	4	4	4	1
CR4021B	4	4	4	1

Nota: 0 = No hay evidencia de crecimiento; 4 = Crecimiento óptimo de la cepa en medio ALM.

Cuadro A.5.2. Prueba de tolerancia a la salinidad de 20 cepas de *Rhizobium* spp en medio sólido agar levadura manitol (ALM) adicionado con 25, 30, 35 y 40 mM NaCl incubadas a temperatura ambiente durante tres días.

Cepa	mM NaCl			
	25 mM	50 mM	75 mM	100 mM
639	0	0	0	0
899	4	4	2	1
CR4001B	4	2	2	2
CR4002B	2	1	1	0
CR4003B	2	1	1	1
CR4004B	1	1	1	1
CR4005B	4	1	1	1
CR4006B	2	1	1	1
CR4007B	4	3	2	2
CR4008B	4	2	2	1
CR4009B	4	3	2	1
CR4010B	4	2	2	2
CR4011B	4	3	2	2
CR4012B	4	2	2	2
CR4013B	4	2	2	1
CR4014B	4	4	4	4
CR4018B	4	3	2	2
CR4019B	4	4	3	3
CR4020B	4	2	2	1
CR4021B	4	2	2	1

Nota: 0 = No hay evidencia de crecimiento; 4 = Crecimiento óptimo de la cepa en medio ALM.

Cuadro A.5.3. Tolerancia de 20 cepas de *Rhizobium* spp., a dos pH en medio sólido agar levadura manitol (ALM) incubadas a temperatura ambiente.

Cepa	pH		Cepa	pH	
	5,5	8		5,5	8
639	2	4	CR4009B	4	4
899	4	4	CR4010B	4	4
CR4001B	4	4	CR4011B	4	4
CR4002B	4	4	CR4012B	4	4
CR4003B	4	4	CR4013B	4	4
CR4004B	4	4	CR4014B	4	4
CR4005B	3	2	CR4018B	4	4
CR4006B	4	4	CR4019B	4	4
CR4007B	4	4	CR4020B	4	4
CR4008B	4	4	CR4021B	4	4

Nota: 0 = No hay evidencia de crecimiento; 4 = Crecimiento óptimo de la cepa en medio ALM.

Cuadro A.5.4. Capacidad de solubilización de fósforo de 20 cepas de *Rhizobium* spp., en medio sólido incubadas a temperatura ambiente.

Cepa	Medio			
	<u>Osorio & Habte</u> <u>2001</u>	Pikovskaya	Hierro	Aluminio
639	0	0	1	1
899	4	0	1	1
CR4001B	0	0	1	1
CR4002B	1	1	1	1
CR4003B	1	0	1	1
CR4004B	4	0	1	1
CR4005B	4	0	0	0
CR4006B	3	3	1	1
CR4007B	2	0	1	0
CR4008B	2	0	1	1
CR4009B	1	0	0	0
CR4010B	2	0	1	1
CR4011B	1	2	1	1
CR4012B	1	1	1	1
CR4013B	4	0	1	1
CR4014B	4	0	1	1
CR4018B	1	1	1	1
CR4019B	4	2	1	1
CR4020B	3	0	1	1
CR4021B	1	0	0	0

Nota: 0 = Sin solubilización, 4 = Mayor respuesta

Cuadro A.5.5. Capacidad de producción de sideróforos de cepas de *Rhizobium* spp., mediante agar CAS blue incubadas a temperatura ambiente por 21 días.

Cepa	Producción de sideróforos	Cepa	Producción de sideróforos
639	0	CR4009B	0
899	1	CR4010B	3
CR4001B	3	CR4011B	2
CR4002B	0	CR4012B	3
CR4003B	3	CR4013B	2
CR4004B	0	CR4014B	0
CR4005B	0	CR4018B	0
CR4006B	0	CR4019B	3
CR4007B	0	CR4020B	0
CR4008B	0	CR4021B	0

Nota: 0 = No hay evidencia, 4 = Mayor respuesta

Cuadro A.5.6. Tolerancia al aluminio de 20 cepas de *Rhizobium* spp a 0 μM , 200 μM , 400 μM y 600 μM de AlCl_3 (22,3 μM , 44,7 μM , 67,0 μM Al), incubado durante 48 horas en medido por densidad óptica en espectrofotómetro a 620nm.

Cepa	T0	22,3 μM	44,7 μM	67,0 μM
639	0,855	0,609	0,413	0,154
899	0,954	0,806	0,303	0,258
CR4001B	1,471	0,973	0,69	0,466
CR4002B	0,883	0,658	0,493	0,42
CR4003B	0,885	0,749	0,542	0,347
CR4004B	1,453	0,962	0,615	0,667
CR4005B	0,976	0,951	0,679	0,336
CR4006B	1,817	0,655	0,681	0,674
CR4007B	1,008	0,848	0,776	0,456
CR4008B	1,269	0,664	0,658	0,649
CR4009B	1,101	0,783	0,452	0,319
CR4010B	0,803	0,804	0,553	0,393
CR4011B	1,027	0,525	0,351	0,254
CR4012B	0,986	0,702	0,494	0,354
CR4013B	1,581	0,808	0,538	0,387
CR4014B	1,213	0,963	0,655	0,537
CR4018B	1,134	0,683	0,53	0,457
CR4019B	1,654	0,981	0,646	0,413
CR4020B	0,814	0,718	0,651	0,418
CR4021B	0,576	0,4	0,382	0,203

Cuadro A.5.7. Porcentaje de susceptibilidad de cepas de *Rhizobium* spp., a tres concentraciones de aluminio en medio líquido 22,3 μ M, 44,7 μ M, 67,0 μ M.

Cepa	T1	D.E	T2	D.E	T3	D.E
639	28,66	6,76	51,6	4,68	82,08	8,93
899	15,36	14	68,24	6,61	72,95	2,62
CR4001B	33,81	4,97	53,07	2,32	68,38	1,33
CR4002B	25,25	6,09	44	9,15	52,19	10,6
CR4003B	14,7	12,41	38,27	8,03	60,3	8,1
CR4004B	33,74	2,08	57,73	4,69	53,91	5,25
CR4005B	2,57	4,61	30,5	8,85	65,65	2,81
CR4006B	63,75	3,95	62,46	2,39	62,63	5,62
CR4007B	15,29	10,9	22,37	10,05	54,25	7,9
CR4008B	47,69	1,51	47,95	5,93	48,82	1,74
CR4009B	28,73	8,54	59,03	1,33	70,8	5,83
CR4010B	-0,6	10,68	30,89	7,18	51	6,16
CR4011B	48,91	10,44	65,74	4,92	75,27	4,18
CR4012B	26,2	23,86	48,06	15,4	63,97	2,86
CR4013B	48,97	4,48	65,95	2,96	75,52	2,35
CR4014B	20,39	6,42	46	4,05	55,51	7,04
CR4018B	39,77	3,42	53,24	0,99	59,69	2,06
CR4019B	40,72	6,28	60,99	2,11	74,88	5,66
CR4020B	11,97	3,23	19,3	9,53	48,49	8,86
CR4021B	28,96	16,39	32,32	15,77	64,19	8,52

Anexo 3. Análisis químico de suelo

Cuadro A.3.1. Análisis químico completo del suelo utilizado para el ensayo de frijol con dos cepas de *Rhizobium* spp., para el ensayo de calidad de grano.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS														
Solución Extractora:	pH	Cmol (+) / L					%			mg/L				mS / cm
KCl-Olsen Modificado	H ₂ O	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn	CE	
ID USUARIO	5,5	0,5	4	1	0,2	5		10	3	1	10	5	1,5	
SUELO AUTOCLAVADO	6,3	0,12	4,02	1,01	0,39	5,54	2	7	5,6	6	123	50	0,2	
SUELO SIN AUTOCLAVAR	6,4	0,11	7,25	1,74	0,49	9,59	1	13	10,5	8	166	8	0,2	