

Incidencia y severidad del tizón común en plantas de frijol inoculados con *Rhizobium phaseoli*

José Osvaldo Aguilar Ramírez¹
Gabriel Gallegos Morales¹
Francisco Daniel Hernández Castillo¹
Melchor Cepeda Siller¹
David Sánchez-Aspeytia^{2§}

¹Departamento de Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 01(844) 4110326. (uaaan-osvaldo@hotmail.com; fdanielhc@hotmail.com; melchoresraza2010@hotmail.com; aspeytia.david@inifap.gob.mx). ²Campo Experimental Saltillo-INIFAP. Carretera Saltillo-Zacatecas km 342+119, núm. 9515, Colonia Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 01(844) 2912234.

Autor para correspondencia: ggalmor@uaaan.mx.

Resumen

El tizón común bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* es una enfermedad que ataca al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*), se encuentra presente 83% de las áreas de producción de semilla y hasta 79% en campos comerciales y reduce los rendimientos hasta 55%. La inoculación de *Rhizobium* en plantas como promotor de crecimiento vegetal, fijador de nitrógeno, a la síntesis del ácido indolacético, producen en la planta mayor vigor y tolerancia a las enfermedades. Se determinó el comportamiento de la incidencia y severidad del tizón común de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Para ello se aislaron cepas de *Rhizobium* (FM-1, N-2, PS-3, M-4, BJ-5) de nódulos radiculares de plantas de frijol y *Xanthomonas* (Xant 1) de manchas foliares necróticas. Los aislados se identificaron con base en características morfológicas celulares, coloniales y bioquímicas. Los ensayos en invernadero y en campo, se efectuaron en semillas inoculadas con 10^6 ufc mL⁻¹ de *Rhizobium* y una segunda aplicación a los 10 días después de la siembra. Posteriormente 15 días después de la emergencia del frijol se inoculó por aspersión *Xanthomonas axonopodis* directamente a la planta. Transcurridos 30 días del cultivo en invernadero se observó que la severidad del tizón común fue inferior en plantas con presencia de nódulos en raíz (14.5%), que en el testigo (46%), también se encontró que las plantas inoculadas con *Rhizobium phaseoli* BJ-5 desarrollaron mayor vigor, diámetro de tallo, peso seco, número de hojas y longitud de raíz. En campo, la inoculación con la cepa BJ-5 mostró menor severidad (25.6%) respecto al testigo (55.8%) y resultó tener mejor crecimiento en la planta. La inoculación de frijol con *Rhizobium phaseoli* permite favorecer nutricional y fitosanitariamente al cultivo.

Palabras claves: control biológico, fitosanitario, promotor de crecimiento.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: marzo de 2019

Introducción

El tizón común bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* es una bacteria que ataca al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en todo el mundo (Gent *et al.*, 2005). Está presente en 83% de las áreas de producción de semillas y hasta 79% en campos comerciales, reduce los rendimientos en un 55%, los que se incrementan a temperaturas de 27 °C, con alta humedad relativa (Fourie, 2002; Belete y Basta, 2017). Para su manejo pueden ser utilizados métodos de control químico, biológicos, cultural y genético (Francisco *et al.*, 2013). El uso de químicos ha permitido obtener mayor producción, pero su empleo excesivo ocasiona problemas al medio ambiente, por lo que las búsquedas de alternativas al manejo de las enfermedades son de vital importancia (Zavaleta, 2000). Se ha reportado la compatibilidad en *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* y *Rhodococcus fascians* con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, cuya simbiosis ayuda desarrollando una actividad protectora contra el tizón común del frijol (Zanatta *et al.*, 2007).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), son usadas como agentes de control biológico, estas bacterias se caracterizan por su habilidad para facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje, la estimulación indirecta del crecimiento de plantas se debe a que la bacteria permite la acción fúngica (Essalmani y Lahlou, 2003). La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002), la producción de hormonas (Perrine *et al.*, 2004), de enzimas (Mayak *et al.*, 2004) y la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999). Este trabajo tuvo como objetivo determinar el comportamiento de plantas de frijol, inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli* y su relación con la presencia y desarrollo del tizón común en la planta.

Materiales y métodos

Aislamiento de *Xanthomonas* spp.

Se colectaron plantas con manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por halo amarillo, en diferentes áreas de las hojas (Fourie, 2002) en el campo experimental. El bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Las muestras se cortaron en trozos, se desinfectaron con hipoclorito al 1% por 3 min y se lavaron con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en un mortero estéril donde se maceraron en solución salina 0.85%, posteriormente se tomó una asada, que se estrió en el medio de cultivo YDC (Schaad, 1988). Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h. Al término del periodo, se seleccionaron las colonias bacterianas con color amarillo, convexas, con bordes enteros y de aspecto mucoide (Schaad, 2001) y se purificaron por estría. La identificación se realizó por caracterización morfológica, colonial y bioquímica (Abd-Alla y Bashandy, 2008; Francisco *et al.*, 2013; Osdaghi, 2014).

Aislamiento de *Rhizobium* spp.

Se colectaron muestras de nódulos de coloración rojiza de diferentes variedades de frijol, en periodo prefloración (Cuadro 1), se lavaron y se desinfectaron con hipoclorito 1% durante 3 min, enseguida se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en tubo estéril donde se maceraron, posteriormente se tomó una asada y se sembró en placas con el medio extracto levadura manitol agar rojo congo (ELMA-RC) (Vincent, 1970; CIAT, 1988). Las placas se incubaron a 28

°C por 4 días. Las colonias de color rojo se sembraron en placas con el mismo medio, hasta obtener cultivos puros, cada aislado se caracterizó por pruebas fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y coloniales.

Cuadro 1. Coordenadas de localización del área del estudio.

Localización	Coordenadas	Altitud (m)	Muestras	Cepas
UAAAN Buenavista, Saltillo, Coahuila.	25° 22" norte y 101° 02" oeste	1742	Frijol, etapa de prefloración	FM-1
San Andrés Tlalamac, Edo. México.	18° 58' 1" norte y 98° 48' 28" oeste	2 073	Frijol, etapa de prefloración	N-2 y M-4
UAAAN Buenavista, Saltillo, Coahuila.	25° 22 norte y 101° 02' oeste	1742	Frijol, etapa de prefloración	PS-3 y BJ-5

Reproducción bacteriana

Para incrementar las poblaciones de *Xanthomonas* se usó el medio YDC líquido, mientras que para *Rhizobium* fue ELMA líquido, propagándose en una incubadora giratoria (C25 Incubator Shaker New Brunswick Scientific) a 28 °C y 150 rpm durante 72 h, para obtener de cada bacteria un concentrado celular.

Experimento en invernadero

Para determinar la relación que guarda la presencia del tizón común y su severidad en plantas de frijol inoculadas con *R. phaseoli*, inicialmente se desinfectaron las semillas de frijol, para ello se usó hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, lavando las semillas tres veces con agua estéril. Cada semilla se impregnó por aspersión con una solución de 1×10^6 células de *R. phaseoli*, posteriormente se colocaron en recipientes de unicel de 1 litro de capacidad con $\frac{3}{4}$ partes de *peat moss*-perlita (en proporción 3:1), una segunda aplicación se realizó 10 días después de la siembra. Cada planta representó una unidad experimental, siendo diez plantas por tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño experimental para evaluar el comportamiento de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación de *R. phaseoli* y del tizón común.

Tratamientos	Cepas					
	FM-1	N-2	PS-3	M-4	BJ-5	Xant-1
I. <i>Rhizobium</i> (FM-1)	+	-	-	-	-	+
II. <i>Rhizobium</i> (N-2)	-	+	-	-	-	+
III. <i>Rhizobium</i> (PS-3)	-	-	+	-	-	+
IV. <i>Rhizobium</i> (M-4)	-	-	-	+	-	+
V. <i>Rhizobium</i> (BJ-5)	-	-	-	-	+	+
VI. Irrigado solo con agua no inoculado, control absoluto(CA)	-	-	-	-	-	+

+ = aplicado; - = no aplicado.

El patógeno (*Xanthomonas axonopodis*) se inóculo a quince días de crecimiento del cultivo, con una suspensión de 1.6×10^6 células, aplicadas por aspersión al follaje (Pastor, 1991; Abeysinghe, 2009). La evaluación se efectuó treinta días después para determinar incidencia y severidad del tizón común. acorde a la escala del grado de amarillamiento y necrosis de las plantas inoculadas: 0= ausencia de síntomas; 1= de 1 a 12.5% de área dañada; 2= de 13 a 25.5%; 3= de 26 a 38.5%; 4= de 39 a 51.5%; 5= de 52 a 64.5%; 6= de 65 a 77.5%; 7= de 78 a 90.5%; 8= de 91 a 100% de área foliar dañada (Gilberston *et al.*, 1988; Osdaghi *et al.*, 2009).

Experimento en campo

Para determinar el comportamiento de plantas de frijol inoculados con *R. phaseoli* y la presencia de tizón común en campo se estableció una parcela experimental de 10 m de largo con cinco surcos a 80 cm de distancia entre ellos. Cada aislamiento de *Rhizobium* se aplicó como tratamiento (Cuadro 2), para inocular la semilla y la planta se siguió el mismo procedimiento para el experimento de invernadero.

Posteriormente las semillas inoculadas se sembraron a 3 cm de profundidad intercaladas cada 10 cm en el surco en toda la parcela establecida con sistema de riego por goteo. Quince días después de la siembra se aplicó *Xanthomonas axonopodis* a una concentración de 1.6×10^6 ufc mL⁻¹ al follaje del cultivo (Pastor, 1991) y 50 días posteriores se determinó la incidencia y la severidad del tizón común con la escala (Gilberston *et al.*, 1988; Osdaghi *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

El comportamiento de las variables analizadas en cada experimento, así como la incidencia y la severidad del tizón común del frijol en cada planta, fue procesado bajo un diseño completamente al azar, donde cada planta se consideró como una unidad experimental, tomando datos de 10 plantas por tratamiento. La varianza entre los datos (Anova) se analizó a través de comparación de medias según Tukey (<0.05) procesando los datos en el paquete estadístico SAS Statistical Analysis System versión 9.0.

Resultados y discusión

Se lograron recuperar cinco aislamientos de *Rhizobium* spp., a partir de nódulos radiculares de plantas de frijol, en el Cuadro 3 se muestran los resultados a diferentes pruebas bioquímicas y las características de forma, borde, elevación, aspecto y color, las cuales nos indican que los aislamientos tienen las características de un buen inoculante del tipo de *Rhizobium phaseoli*, lo que concuerda con estudios realizados por (Cuadrado *et al.*, 2009; Berrada *et al.*, 2012; Granda *et al.*, 2013).

La coloración de las colonias de los aislamientos obtenidos con una coloración beige a las 72 h, que torna en rojo intenso a los 8 días de incubación (Rojas *et al.*, 2009) para descartar la semejanza se realizaron pruebas bioquímicas con el género *Agrobacterium*, se utilizó el medio levadura manitol adicionado azul de bromotimol (LMA-ABT), donde los aislamientos de *Rhizobium* acidificaron el medio tornándolo amarillo mientras que los reportes indican que *Agrobacterium* alcaliniza el medio tornándolo azul (Cuadrado *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Comportamientos bioquímicos, morfológicos y coloniales de *R. phaseoli*.

Cepas	Bioquímico y morfológico							Colonial				
	Tinción gram	Oxidasa	Catalasa	Crecimiento en NaCl 2, 3 y 5 %	Crecimiento en pH 4, 5, 7 y 9	Crecimiento MacConckey	Crecimiento LMA- ABT	Forma	Borde	Elevación	Aspecto	Color
FM-1	-	-	-	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo
N-2	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo
PS-3	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Planoconvexa	Mucoide	Rojo
M-4	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Planoconvexa	Mucoide	Rojo
BJ-5	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo

A partir de hojas con síntomas de tizón común se aislaron cepas que presentaron características típicas del género *Xanthomonas*, tales como colonias amarillas con borde entero, convexo y un aspecto mucoide, lo que concuerda con lo descrito por (Corzo *et al.*, 2015). Las cepas aisladas dieron negativo a la tinción de gram, producción de levana y pigmentos fluorescentes, mientras que a las pruebas de peroxidasa, catalasa, metabolismo oxidativo y fermentativo de la glucosa e hidrólisis de almidón fueron positivas, lo que nos indica que la cepa recuperada corresponde a *Xanthomonas axonopodis* y concuerda con las características reportadas por (Schaad, 2001; Francisco *et al.*, 2013).

Experimento en invernadero

La inoculación de *Rhizobium phaseoli* en plantas de frijol indujo una mayor tolerancia a la expresión en hojas del tizón común. En la Figura 1, se muestra que la cepa *Rhizobium phaseoli*-BJ-5 mostró menor severidad (14.5%) a esta enfermedad en comparación al control absoluto inoculado con *Xanthomonas axonopodis* que registró 46% de daño.

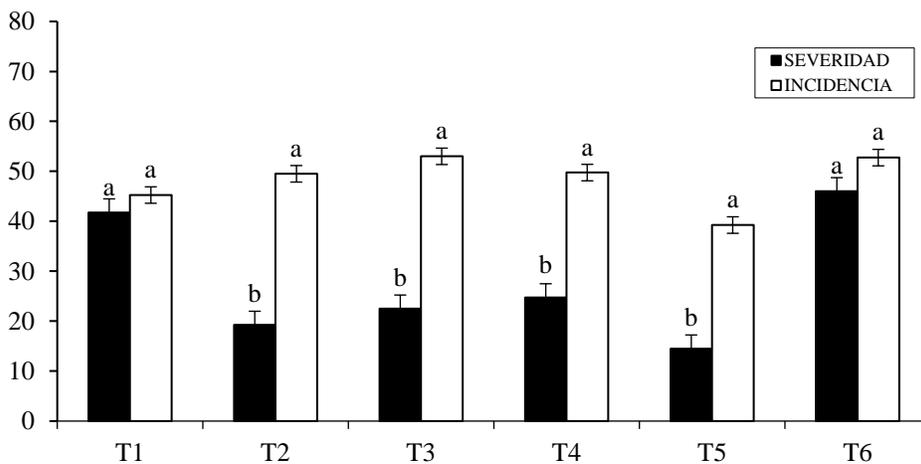


Figura 1. Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* en *Phaseolus vulgaris* y la presencia y desarrollo del tizón común en invernadero. T₁= *Rhizobium* (FM); T₂= *Rhizobium* (N); T₃= *Rhizobium* (PS); T₄=*Rhizobium* (M); T₅=*Rhizobium* (BJ) y T₆= control absoluto (CA).

También se observó que todos los tratamientos se comportaron estadísticamente igual ($p < 0.05$) respecto a la incidencia del tizón común respecto del testigo, lo cual indicó que el patógeno está activo en todas las plantas infestadas y no existe diferencia entre ellas respecto de su presencia, no así en el grado de respuesta o daño en la manifestación de la enfermedad donde dos de los inoculantes de *Rhizobium phaseoli* T2 y T5, indujeron o redujeron el nivel de daño (Figura 1) del tizón común respecto del testigo estadísticamente ($p < 0.05$), resultados experimentales similares fueron reportados por Zanatta *et al.* (2007) quien reporta la inducción de resistencia que genera *Rhizobium* spp., en las plantas de frijol.

Mientras que Osdagui *et al.* (2011) reportan resultados similares a los del presente estudio, donde muestran diferencias significativas en la manifestación del tizón común en plantas inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* pv *phaseoli* comparados con plantas fertilizadas con urea y el testigo.

En el Cuadro 4 se muestra la respuesta de *Phaseolus vulgaris* infestado con *Xanthomonas axonopodis* y con cinco inoculantes de *R. phaseoli*; a través, de biomasa vegetal producida, donde se observa que en la mayoría de las variables cuantificadas las plantas inoculadas manifestaron mayor peso, número de hojas y longitud de raíz que el testigo sin inocular, aunado a esto presentó mayor nodulación por rizobios al emplearlos como inoculantes favoreció un mayor número y la presencia de nódulos en las plantas dentro del experimento.

Cuadro 4. Comportamiento de variables agronómicas en plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* en invernadero.

Tratamientos	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Núm. de hoja	Longitud raíz (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Núm. de nódulos
<i>Rhizobium</i> FM-1	35.05 a	5.6 a	31.8 ab	20.6 abc	4.06 b	199 a
<i>Rhizobium</i> N-2	25.75 ab	4.2 a	26.8 c	21.6 a	4.32 b	120.2 b
<i>Rhizobium</i> PS-3	25.34 ab	4.4 a	27.6 bc	21.2 ab	5.22 a	116 b
<i>Rhizobium</i> M-4	25.25 ab	3.6 a	28 abc	19.2 bc	4.08 b	73 bc
<i>Rhizobium</i> BJ-5	33.09 a	5.6 a	32.6 a	21 abc	4.44 b	228 a
Control absoluto	16.82 b	3.6 a	29 abc	18.8 c	4.08 b	48 c
SE \pm	1.38	0.25	0.57	0.27	0.09	12.61
CV	18.78	27.51	8.41	5.73	7.73	19.36

Valores con letras distintas tienen diferencias estadísticas según Tukey < 0.05 .

Las cepas de *Rhizobium* spp., utilizadas en este estudio indujeron el mejoramiento al cultivo posiblemente debido a la habilidad de los rizobios para producir hormonas como el ácido indol acético y ácido giberélico sustancias reguladoras del crecimiento en las plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa y desarrollo del sistema radical (Dey *et al.*, 2004; Perrine *et al.*, 2004; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Otro estudio mostró que *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Rhizobium etli* tuvo 100% de germinación o emergencia en 4 y 8 días, respectivamente, valores con diferencia estadística en comparación con 62.5% en 7.5 días con *Phaseolus vulgaris* sin inocular y como control absoluto (García *et al.*, 2016).

Experimento en campo

Como se muestra en la Figura 2, la presencia de *X. axonopodis* en las hojas de la planta de frijol disminuyó-claramente por la inoculación de *Rhizobium phaseoli* cepa BJ-5 (18.4%) seguida por la cepa FM-1 (19.8%) con respecto al control absoluto (CA).

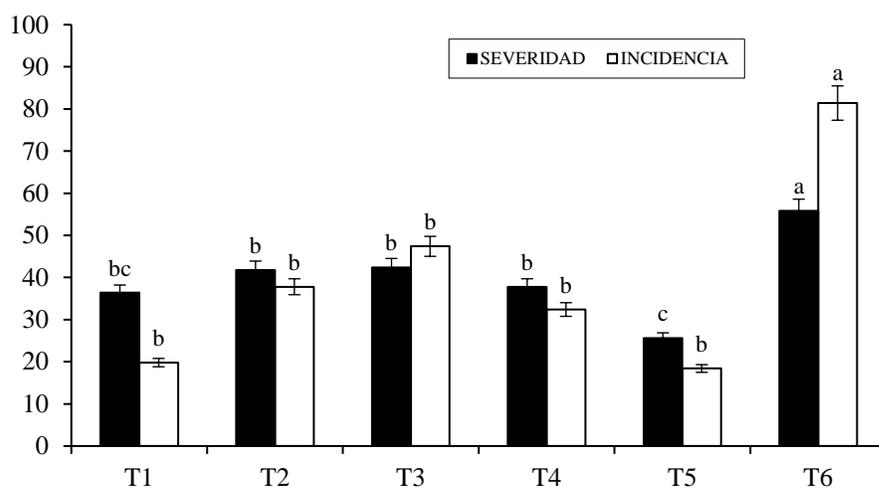


Figura 2. Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* en *Phaseolus vulgaris* y la presencia y desarrollo del tizón común en campo. T₁= *Rhizobium* (FM); T₂= *Rhizobium* (N); T₃= *Rhizobium* (PS); T₄= *Rhizobium* (M); T₅= *Rhizobium* (BJ) y T₆= control absoluto (CA).

La severidad de la enfermedad en las hojas foliares de la planta de frijol en el cultivo fue catalogada como leve, dado a que la cepa BJ-5 (25.6%) los valores numéricos en esta fase, fueron estadísticamente diferentes comparados con el no inoculado o CA con 55.8%, el efecto que muestra la inoculación de *R. phaseoli* en el cultivo de frijol en presencia y severidad de la enfermedad en las hojas, recalando la disminución en la cepa BJ-5.

Resultados similares han sido reportados por Osdagui *et al.* (2011). Quienes consignan que la severidad de la enfermedad en el campo evaluado a los 50 días era muy severa (necrosis completa de las hojas) en el cultivar susceptible y línea que fueron fertilizados con urea y en el grupo de control, con pérdida muy severa en el rendimiento, pero en las plantas inoculadas con *R. leguminosarum* pv *phaseoli*, la severidad de la enfermedad fue relativamente baja ($p < 0.01$). De acuerdo a Bartsev *et al.* (2004) *Rhizobium* spp., puede inducir resistencia en frijol común y limitar la presencia del tizón común bacteriano. Otros estudios mencionan que el tratamiento de *Rhizobium* spp., reduce la pudrición del tallo y la raíz en comparación con plantas no inoculadas (Bécquer, 2011; Rahman *et al.*, 2017).

En el Cuadro 5 se presenta la respuesta de *P. vulgaris* en el rendimiento de biomasa a nivel plántula *Rhizobium* en campo donde al igual que invernadero se observó mayor rendimiento de peso fresco, seco, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíz en plantas inoculadas, que las no inoculadas, resaltando la cepa *Rhizobium phaseoli* BJ-5 donde estas variables tuvieron mayores valores en rendimiento.

Cuadro 5. Comportamiento de variables agronómicas en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* en campo.

Tratamientos	Peso fresco (g)	Núm. de hojas	Longitud de raíz (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Núm. de nódulos
<i>Rhizobium</i> FM-1	404 a	68.2 a	17.4 ab	8.72 a	54.2 ab
<i>Rhizobium</i> N-2	290 ab	61.4 ab	18.68 ab	9.8 a	34 b
<i>Rhizobium</i> PS-3	390 a	63 ab	17.62 ab	8.76 a	34.2 b
<i>Rhizobium</i> M-4	312 ab	51 ab	15.34 b	7.9 a	39.2 ab
<i>Rhizobium</i> BJ-5	535 a	69.8 a	19.98 ab	9.78 a	79.8 a
Control absoluto	136 b	43.8 b	20.2a	8.34 a	12 b
SE ±	31.21	2.39	0.5	0.22	5.3
CV	37.51	16.87	13.26	12.77	51.78

Valores con letras distintas tienen diferencias estadísticas según Tukey < 0.05.

El efecto promotor de crecimiento vegetal de *Rhizobium phaseoli* en *P. vulgaris* coincide con lo reportado por Yadegari (2008); Moreno *et al.* (2007). Otros estudios señalan que *Rhizobium* spp., incrementa la nodulación en las raíces y proporciona mayor fijación de nitrógeno, productividad y fertilidad en los cultivos, incluso bajo condiciones adversas del suelo, otorgando una alternativa para poder usarlo como reemplazo de fertilizantes nitrogenados (Solaiman *et al.*, 2005; Bhattacharjee y Sharma, 2012).

Estos resultados también coinciden con los de Colás *et al.* (2014) quienes mencionan que todas las plantas coinoculadas con *Rhizobium* spp., producen mayores rendimientos y números de nódulos que en las no inoculadas, lo que demuestra el potencial del uso de inóculos mixtos para mejorar la productividad del frijol común.

Conclusiones

El empleo de inoculantes simbióticos del tipo *Rhizobium phaseoli* tiene el potencial para reducir y prevenir los daños causados por *Xanthomonas axonopodis* y la aparición de síntomas asociados a la enfermedad en el cultivo como lo son la clorosis y el tizón común bacteriano del frijol, lo cual puede considerarse una ventaja para evitar el uso de bactericidas y los fertilizantes nitrogenados químicos. El empleo de agentes microbianos pudiera ser una alternativa en el cultivo de frijol por su actividad como promotor de crecimiento vegetal y resolver problemas de orden nutricional y fitosanitario.

Literatura citada

- Abd, A, M. H. and Bashandy, S. R. 2008. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:291-292. Doi 10.1007/s11274-007-9385-8.
- Abeyasinghe, S. 2009. Induced systemic resistance (ISR) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mediated by rhizobacteria against bean rust caused by *Uromyces appendiculatus* under greenhouse and field conditions. Arch. Phytopathol. Plant Protec. 42(11):1079-1087. Doi: 10.1080/03235400701622154.

- Bartsev, A.; Kobayashi, H. and Broughton, W. J. 2004. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. *In*: Plant Microbiol. (Gillings, M. y Holmes, A. (Ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. 19-31 p.
- Bécquer, C.; Salas, Á.; Palmero, L. y Nápoles, J. 2011. Efecto de la inoculación con rizobios procedentes de Alberta, Canadá, en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), en condiciones de campo. Pastos y Forrajes 34: 303-311. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v34n3/pyf06311.pdf>.
- Belete, T. and Bastas, K. K. 2017. Common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. J. Plant Pathol. Microbiol. 8:403. doi: 10.4172/2157-7471.1000403.
- Berrada, H.; Nouioui, I.; Iraqui, H. M.; Ghachtouli, N.; Gtari, M. and Fikri, B. K. 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of *rhizobia* isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. Afr. J. Microbiol. Res. 6:5314-5324. Doi: 10.5897/AJMR11.1505.
- Bhattacharjee, S. and Sharma, G. D. 2012. Effect of dual inoculation of arbuscular *mycorrhiza* and *Rhizobium* on the chlorophyll, nitrogen and phosphorus contents of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Adv. Microbiol. 2:561-564. Doi: 10.4236/aim.2012.24072.
- CIAT. 1988. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Simbiosis leguminosas *Rhizobium*. Manual de métodos evaluación, selección y manejo. Sección microbiología de suelos. Programa de pastos tropicales y Programa de frijol. CIAT, Cali-Colombia 178 p. http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABE088.pdf.
- Colás, S. A.; Torres, G. R.; Cupull, S. R.; Rodríguez, U. A.; Fauvart, M.; Michiels, J. and Vanderleyden, J. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. Eur. J. Soil Biol. 62:105-112. Doi: 10.1016/j.ejsobi.2014.03.004.
- Corzo, L. M.; Rivero, G. D.; Zamora, G. L.; Martínez, Z. Y. y Martínez C. B. 2015. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. Rev. Protección Vegetal. 30 (2):97-103. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n2/rpv03215.pdf>.
- Cuadrado, B.; Rubio, G. y Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionadas de los cultivos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Químico-Farmacéuticas, 38(1):78-104. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>.
- Dey, R.; Pal, K.; Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting *rhizobacteria*. Microbiol. Res. 159: 371-394. DOI: 10.1016/j.micres.2004.08.004.
- Essalmani, H. et Lahlou, H. 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis*. C.R. Biologies. 326:1163-1173. Doi: 10.1016/j.crv.2003.10.003.
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. J. Phytopathol. Zeitschrift. 150:220-226. Doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00745.
- Francisco, F. N.; Gallegos, M. G.; Ochoa, F. Y. M.; Hernández, C. F. D.; Benavides, M. A. y Castillo, R. F. 2013. Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control. Rev. Mex. Fitopatol. 31(2):147-160. http://rmf.smf.org.mx/Vol3122013/articulosrevision/ar_aspectos.pdf.

- García, R. V. E.; García, O. V. R.; Escareño, H. J. J. y Sánchez, Y. J. M. 2016. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Sci. Agropec.* 7(3):313-319. Doi: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.20.
- Gent, D. H.; Lang, J. M. and Schwartz, H. F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* and *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Dis.* 89:558-564. Doi: 10.1094/PD-89-0558.
- Gilberston, R. L.; Rand, R. E.; Carlson, E. and Hagedorn, D. J. 1988. The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of beans. *Plant Dis.* 72:385-389. Doi: 10.1094/PD-72-0385.
- Granda, M. K.; Paccha C. H.; Campoverde S. C. y Torres G. R. 2013 Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur del Ecuador. *Centro de Biotecnología* 2:6-15. <http://revistas.unl.edu.ec/index.php/biotecnologia/article/view/83>.
- Hassan, D. G. H.; Zargar, M. Y. and Beigh, G. M. 1997. Biocontrol of *Fusarium* Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microbial Ecol.* 34:74-80 <https://link.springer.com/article/10.1007/s002489900036>.
- Kuykendall, D.; Young, J.; Martinez, E.; Kerr, A. and Sawada, H. 2005. *Rhizobium*. In: *bergey's manual of systematic bacteriology*. Second Edition. Volume 2 The Proteobacteria. Part C The *Alpha-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Brenner, D. J.; Krieg, N. R. and Staley, J. T. (Eds.). Garrity, G. M. (Ed.). Springer Science and Business Media Inc, New York, USA. 325-340 p.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *The Ann. Rev. Microbiol.* 63:541-556. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Martínez, P. M.; Castañeda, V. H.; Martínez, M. J. M.; Ruiz L. M. y Álvarez, M. C. 2005. Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus silvestres* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev. Sci.* 7(2):175-181. <https://www.researchgate.net/publication/279941626>.
- Mayak, S.; Tirosh, T. and Glick, B. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42:565-572. Doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009.
- Moreno, S. N.; Moreno, R. L. F. y Uribe, D. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. In: Izaguirre-Mayoral, M. L.; Labandera-C. and Sanjuan, J. (Eds.). *Biofertilizantes en Iberoamerica: visión técnica, científica y empresarial*. Denad Internacional, Montevideo. Vol. 1. 38-45 pp.
- Osdaghi, E.; Alizadeh, A.; Shams-bakhsh M. and Lak, R. M. 2009. Evaluation of common bean lines for their reaction to the common bacterial blight pathogen. *Phytopathol. Mediterranea.* 48:461-468. https://www.researchgate.net/publication/279596913_evaluation-of-common-bean-lines-for-their-reaction-to-the-common-bacterial-blight-pathogen.
- Osdaghi, E.; Shams-bakhsh, M.; Alizadeh, A.; Lak, R. M. and Maleki, H.H. 2011. Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and decrease of common bacterial blight. *Phytopathol. Mediterranea.* 50:45-54. https://www.researchgate.net/publication/258689140_Induction_of_resistance_in_common-bean-by-rhizobium-leguminosarum-bv-phaseoli-and-decrease-of-common-bacterial-blight.

- Osdaghi, E. 2014. Occurrence of common bacterial blight on mungbean (*Vigna radiata*) in Iran caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. New Disease Reports 30. 9. Doi: 10.5197/j.2044-0588.2014.030.009.
- Pastor, C. M. 1991. Técnica, materiales y métodos utilizados en la evaluación de frijol por su reacción a las enfermedades. In: frijol: investigación y producción. López, M.; Fernández, F. y Schoonhoven, A. (Eds.). 2^{da} reimpresión. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 157-168 pp.
- Pérez, G.; Gómez, G.; Nápoles, M. y Morales, B. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Pastos y Forrajes. 31(2):151-159. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942008000200005.
- Perrine, F.; Rolfe, B.; Hynes M. and Hocart, C. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. Plant Physiol. Biochem. 42:723-729. Doi: 10.1016/j.plaphy.2004.07.008.
- Prakash, V. J.; Yadav, J.; Tiwari, K. and Kumar, A. 2013. Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. Ecological Engineering. 51:282-286. Doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.12.022.
- Rahman, M.; Ali, M. E.; Alam, F.; Islam, M. N. and Bhuiyan, M. A. H. 2017. Combined effect of arbuscular mycorrhiza, *Rhizobium* and *Sclerotium rolfsii* on grass pea (*Lathyrus sativus*). The Agriculturists. 15(1):143-155. Doi:10.3329/agric.v15i1.33438.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17:319-339. Doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- Rojas, T. D. F.; Garrido, R. M. F. y Bonilla, B. R. R. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 10(1):70-80. Doi: 10.21930/rcta.vol10-num1-art:131.
- Saddler, G. S. and Bradbury, J. F. 2005. *Xanthomonadales* ord. nov. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM, List no.106. Inter. J. Sys. Evol. Microbiol. 55:2235-2238. Doi: 10.1099/ij.s.0.64108-0.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 2nd ed. The American Phytopathological Society; St Paul, Minnesota. 84-107 pp.
- Schaad, N. W.; Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 3rd (Ed.). American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 218 p.
- Sessitsch, A.; Howieson, J. G.; Perret, X.; Antoun, H. and Martínez-Romero, E. 2002. Advances in *Rhizobium* research. Critical Rev. Plant Sci. 21:323-378. Doi:10.1080/0735-260291044278.
- Solaiman, A. R. M.; Rabbani, M. G. and Molla, M. N. 2005. Effects of inoculation of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhiza, poultry litter, nitrogen, and phosphorus on growth and yield in chickpea. The Korean Soc. Crop Sci. 50(4):256-261. <https://www.researchgate.net/publication/264148718>.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for practical study of root nodule bacteria. In: international biology program handbook No. 15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford. 164 p. <http://www.sciepub.com/reference/103923>.

- Yadegari, M.; Rahmani, H.A.; Noormohammadi G. and 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. 11:1935-1939. Doi: 10.3923/pjbs.2008.1935.1939.
- Zanatta, Z. G. C. N.; Moura, A. B.; Maia, L. C. y dos Santos, A. S. 2007. Biossay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Braz. J. Microbiol. 38:511-515. Doi:10.1590/S1517-83822007000300024.
- Zavaleta, E. 2000. Alternativa de manejo de las enfermedades de las plantas. Revista Mexicana de la Ciencia del Suelo. Terra Latinoam. 17:201-207. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57317304.pdf>.